

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



THESE

Présentée par :

M^{me} MAKHLOUF Chahrazed Epouse KRABI

En vue de l'obtention du titre de

DOCTORAT

EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Biologiques

THEME

**ETUDE DE LA TOXICITE DE L'IVERMECTINE CHEZ LE LAPIN
D'UNE SOUCHE LOCALE EN ALGERIE**

Soutenue publiquement le **16/09/2021**.

Devant le jury composé de :

M^{me} BENABDESSALEM R.	Professeur	UMMTO	Présidente
M^{me} KHALDOUN-OULARBI H.	MCA	USDB1	Directrice
M^{me} ZERROUKI-DAOUDI N.	Professeur	UMMTO	Co-directrice
M^{me} BOUMEHDI-MERAD Z.	Professeur	USDB1	Examinatrice
M^r LAMARA A.	Professeur	ENSV	Examineur
M^r BOUAZZA B.	MCA	UMMTO	Examineur

2020 / 2021

A

*La Présidente de thèse Mme BENABDESSALEM R.,
Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce
travail.*

*Je vous prie de trouver ici L'expression de mon profond respect
Et de mon entière reconnaissance.*

A

*Ma Directrice de thèse Madame, KHALDOUN-OULARBI H., je
vous remercie vivement d'avoir dirigé ce travail, d'avoir facilité
mon intégration au sein de votre équipe,
Pour le temps que vous m'avez consacré,
Pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos orientations et vos
remarques fructueuses.*

*Je vous prie de retrouver ici l'expression de
Ma respectueuse et profonde reconnaissance.*

A

*Ma Co-Directrice de thèse Madame ZERROUKI DAOUDI N.,
Je vous remercie vivement pour votre confiance que vous
m'avez témoigné en m'accueillant au sein de votre laboratoire
de recherche.*

*Pour votre soutien moral, votre gentillesse, votre disponibilité et
vos conseils scientifiques.*

A

Mes examinateurs

Madame BOUMEHDI-MERRAD Z.

Monsieur LAMARA A.

Monsieur BOUAZZA B.

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites

*En acceptant de juger ce travail.
Soyez remerciés de votre présence dans ce jury et
Soyez assurés de tout mon respect*

À

*Mes parents adorés, qui m'ont toujours soutenu, qui m'ont gardé
toute leur confiance et leur amour pendant les périodes difficiles
de mon cursus. Je suis heureuse de leur offrir cette thèse.
Je voudrais dire : vous êtes pour moi les meilleurs parents du
monde.*

Merci à mes

*Frères Kader, Moussa et Islam, à leurs conjoints, à mon neveu et
Ma nièce pour ces grains que nous partageons, qui ont un
pouvoir de germination infini et qui se transmettent avec les
générations.*

À

*Mes adorables enfants : Wail et ADEM Pardon pour tout le
stress que je vous ai fait subir*

À mes beaux parents

*A **SMAIL** mon accompagnant permanent de vie, tu as été une
source continue d'encouragement pendant toutes les phases de ce
doctorat.*

*Je te remercie de m'avoir rendu ma vie plus belle tous les
Jours, de m'avoir soutenue, épaulé, encouragé et aidé chaque fois
que tu le pouvais.*

*Tu as contribué à l'aboutissement de ce travail car tu l'as vécu
au Quotidien.*

Merci pour tout.

PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A LA THESE

Makhlouf, C., Khaldoun Oularbi, H., Bokreta, S., Tarzali, D., Boukrid, A., Boulahia, M., Daoudi Zerrouki, N. (2021). Beneficial effects of ascorbic acid on Ivermectin repeated high-dose therapy in rabbits: biochemical and histopathological investigations. *European Journal of Biological Research*, 11(1): 1-13.

Makhlouf, C., Khaldoun Oularbi, H., Bokreta, S., Oularbi, Y., Zerrouke, H., Daoudi Zerrouki, N. (2021). Protective effects of vitamin C on Ivermectin induced toxicity on kidney functions and brain tissue in rabbits (*oryctolagus cuniculus*). *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (D-Histology and histochemistry)*, 13(1): 63- 76.

AUTRES PUBLICATIONS

Bokreta, S., Khaldoun-Oularbi, H., Ferhat, M. A., **Makhlouf, C.**, Daoudi-Zerrouki, N. (2021). Protective Effects of Thymus vulgaris Essential Oil Against Voliam Targo® Induced Kidney and Brain Toxicity in Male Rabbits. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (D-Histology and histochemistry)*, 13(1) : 79- 95.

Khaldoun-Oularbi, H., Bouzid, N., Boukreta, S., **Makhlouf, C.**, Derriche, F., Djennas, N. (2017). Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats. *Journal of xenobiotics*, 7(1) : 25-30.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

MAKHLLOUF C., **KHALDOUN-OULARBI H.**, **BOKRETA S.**, **SETTAR A.**, **OULARBI Y.**, **DAOUDI-ZERROUKI N.** " Effet amélioratif de l'acide ascorbique contre l'hépatotoxicité induite par L'AVIMEC chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Étude biochimique et histopathologique". 1er Séminaire International PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ENVIRONNEMENT & REPRODUCTION (PEER 2021), Université Blida 1, Blida, Algérie. 07 au 08 juillet 2021.

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., SETTAR A., OULARBI Y., DAOUDI-ZERROUKI N. " Toxicité pulmonaire de l'AVIMEC® et effet amélioratif de la vitamine C chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Etude histopathologique". 1er Séminaire International PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ENVIRONNEMENT & REPRODUCTION (PEER 2021), Université Blida 1, Blida, Algérie. 07 au 08 juillet 2021.

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N. "Efficacité de l'ivermectine dans le traitement du COVID-19". The first international seminar: Impact of Covid19 on the environment, University Saad Dahlab-Blida1, Blida, Algeria, '30th & 31st December 2020'.

KHALDOUN-OULARBI H., BOUZID N., BOKRETA S., **MAKHLOUF C.**, DJENNAS N., DAOUDI-ZERROUKI N. "Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney, liver, cerebellum and hippocampus of male rats". Colloque international Biosciences "Génie enzymatiques et production de métabolites", Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), Oran, Algérie, 28-29 octobre 2018.

KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N., BENDJABOU Z., ZOUAOU S., **MAKHLOUF C.**, FARHAT M.A. "Contribution à la recherche de l'effet amélioratif de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) chez le lapin d'une souche locale (*Oryctolagus cuniculus*) traité par l'insecticide « Voliam Targo 063SCe »". Colloque international Biosciences "Génie enzymatiques et production de métabolites", Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), Oran, Algérie, 28-29 octobre 2018.

COMMUNICATIONS NATIONALES

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N. 2020. "Impact neurotoxique de l'Avimec® et effet amélioratif de l'acide ascorbique chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Etude histopathologique". 1^{er} Symposium National Biomolécules & Biotechnologies, Blida, 18-19 Décembre 2019.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : liste des différentes formulations d'IVM à usage vétérinaire enregistrées en Algérie (MADRP, 2018)	33
Tableau 2 : Variation du poids corporel et le pourcentage de prise de poids (% PP) des lapins témoins et traités. PI : poids initial, PF : poids final.....	61
Tableau 3 : Variation de la consommation d'aliment et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) chez les lapins témoins et traités. PIA : poids initial d'aliment, PFA : poids final d'aliment	62
Tableau 4 : Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson (% PB) chez les lapins témoins et traités. VBI : volume de boisson initial, VBF : volume de boisson final.....	63
Tableau 5 : Poids absolu et relative des organes des lapins témoins et traités pendant 21 jours.....	64
Tableau 6 : Paramètres biochimiques de la fonction hépatique (glucose, γ -GT, ALAT, ASAT) des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	65
Tableau 7 : Paramètres biochimiques de la fonction rénale des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	68
Tableau 8 : Paramètres biochimiques du bilan lipidique des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Foie polylobé chez le lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) (Stamatova-Yovcheva <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figure 2 : Schéma représentant la structure et l’histologie du foie (Gartner, 2018).....	7
Figure 3 : Schéma d’une coupe longitudinale de rein chez l’homme (Lacour, 2013).....	9
Figure 4 : Schéma de la structure d’un néphron avec une coupe du corpuscule rénal (Lacour, 2013).....	10
Figure 5 : Schéma d’une coupe histologique du rein (cortex et medulla). Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	12
Figure 6 : Schéma représentant les voies aériennes inférieurs du système respiratoire (König <i>et al.</i> , 2007).....	14
Figure 7 : Anatomie des poumons chez le lapin (Van Praag, 2014).....	15
Figure 8 : Schéma d’une coupe histologique de poumon. Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	17
Figure 9 : Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise). Imprégnation argentique, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	19
Figure 10 : Coupe histologique de l’hippocampe chez le rat. Hématoxyline-éosine, Gx40 (Amin <i>et al.</i> , 2013).....	20
Figure 11 : Représentation de la composition d'une lipoprotéine (Heuillet, 2013).....	22
Figure 12 : Composition des lipoprotéines (Marshall <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figure 13 : Métabolisme des lipoprotéines (Heuillet, 2013).....	24
Figure 14 : Structure du marché mondial du médicament vétérinaire en 2009, en fonction des produits (Crosia, 2011).....	25
Figure 15 : Filiations schématiques des lactones macrocycliques : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques (Pitchard <i>et al.</i> , 2012).....	26
Figure 16 : structure chimique des avermectines (Fischer et Mrozik, 2012).....	28
Figure 17 : Structure chimique de l'ivermectine (Bruyère <i>et al.</i> , 2013).....	29

Figure 18: Schéma représentant le mécanisme d'action de l'IVM sur les canaux chlorures glutamate-dépendants chez les invertébrés (Bruyère <i>et al.</i> , 2013)	31
Figure 29 : Schéma du métabolisme des xénobiotiques (Beaune et Lorient, 2000).....	36
Figure 20 : Structure chimique tridimensionnelle (A) et cyclique (B) de la vitamine C (acide ascorbique) (Combs, 2008).....	40
Figure 21: Oxydation de l'ascorbate (AscH-) par deux étapes successives d'oxydation à un électron pour donner respectivement le radical ascorbyle (Asc • -) et l'acide déhydroascorbique (DHA) (Packer, 2002).....	41
Figure 22: Biosynthèses de l'acide ascorbique chez les animaux (Linster et Schaftigen, 2006)	42
Figure 23 : Variation des taux plasmatiques d'ALAT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	66
Figure 24 : Variation des taux plasmatiques d'ASAT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	67
Figure 25 : Variation des taux plasmatiques de γ -GT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	68
Figure 26 : Variation des taux plasmatiques du glucose au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	69
Figure 27 : Variation des taux plasmatiques de créatinine au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	70
Figure 28 : Variation des taux plasmatiques d'acide urique au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	71
Figure 29 : Variation des taux plasmatiques de l'urée au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	71
Figure 30 : Variation des taux plasmatiques du Cholestérol total (CT) au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	74

Figure 31 : Variation des taux plasmatiques des triglycérides (TG) au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	75
Figure 32 : Variation des taux plasmatiques de LDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	76
Figure 33 : Variation des taux plasmatiques de VLDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	77
Figure 34 : Variation des taux plasmatiques d'HDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	78

LISTE DES PLANCHES

Planche 1 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	80
Planche 2 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM (2mg/kg p.c.) . Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	81
Planche 3 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	82
Planche 4 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	83
Planche 5 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. coloration H&E : (a, c, e et g) × 100 et (b, d, f et h) × 400.....	84
Planche 6 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100. Coloration H&E.....	86
Planche 7 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et C), Gx400 (B). Coloration H&E.....	87
Planche 8 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A: par gavage, B : supplémentée en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E....	88
Planche 9 : Aspect histologique du cortex rénal des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, b, d et e) × 100 et (c) × 400.....	89
Planche 10: Aspect histologique du poumon chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (B et C), Gx400 (A). Coloration H&E.....	92
Planche 11 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E.....	93
Planche 12 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E.....	94
Planche 13 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	95

- Planche 14 :** Aspect histologique du poumon des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, f et g) $\times$ 100 et (b, d, e et h) $\times$ 400.....96
- Planche 15 :** Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....99
- Planche 16 :** Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B et C).....100
- Planche 17 :** Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....101
- Planche 18 :** Aspect histologique du cortex cérébral des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times$ 100 et (b et d) $\times$ 400.....102
- Planche 19 :** Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....104
- Planche 20 :** Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....105
- Planche 21 :** Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....106
- Planche 22 :** Aspect histologique de l'hippocampe des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times$ 100 et (b et d) $\times$ 400.....107

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Ascorbique
ABC: ATP-Binding Cassette
Abs: Absorbance
ALAT : Alanine Amino-Transférase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APO : Apolipoprotéines
ASAT : Aspartate Amino-Transférase
ATP : Adénosine Triphosphate
AVM : Avermectine
AVMs : Avermectines
CA : Corne d'Ammon
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein
CM : Chylomicron
CRD : Centre de Recherche et de Développement
CT: Cholestérol Total
CYP 3A4: Cytochrome P450 3A4
DO : Densité Optique
EMTX : Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques
ERO : Espèces Réactivés d'Oxygène
FA : Facteurs Athérogènes
GABA : Acide Gamma-Amino-Butyrique
GD : Gyrus Denté
GGT ou γ -GT : Gamma-Glutamyl Transférase
GLDH : Glutamate Déshydrogénase
GOD : Glucose Oxydase
GPO : Glycérol-Phosphate Déshydrogénase
H&E: Hématoxyline-Eosine
HDL-C: High Density Lipoprotein-Cholesterol

HL : Lipase Hépatique
IAP : Indice Athérogène du Plasma
IDL-C: Intermediate Density Lipoprotein-Cholesterol
IgA : Immunoglobuline A
IVM : Ivermectine
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LDH: Lactate Déshydrogénase
LDL-C: Low Density Lipoprotein-Cholesterol
LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor
LMs: Lactones Macrocycliques
LPL : LipoProtéine Lipase
MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MCV : Maladies Cardiovasculaire
MDA : Malondialdéhyde
MDH : Malate Déshydrogénase
MDR1: Multi-Drug-Resistance
MRP: Multidrug Related Protein
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène
% PA : Pourcentage de Prise d'Aliment
% PB : Pourcentage de Prise de Boisson
p.c. : poids corporel
PF: Poids Final
PFA: Poids Final d'Aliment
P-gp: P glycoprotéine
PI: Poids Initial
PIA: Poids Initial d'Aliment
PLTP: Phospholipid Transfer Protein
POD: Peroxydase
% PP : Pourcentage de Prise de Poids
REL : Réticulum Endoplasmique Lisse
SD : Standard Deviation ou l'écart type

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SR : Scavenger Receptor

TG : Triglycérides

TGO : Oxaloacétate de Glutamate Transaminase

TGP : Pyruvate de Glutamate Transaminase

UDP Glucuronosyl-Tranfèreses : Uridines Di-Phospho Glucuronosyl-Transférases

VFB : Volume Final de Boisson

VIB : Volume Initial de Boisson

VLDL-C: Very Low Density Lipoprotein-Cholesterol

Résumé

Actuellement, la mise sur le marché de nouveaux médicaments antiparasitaires à usage vétérinaire a permis une meilleure gestion thérapeutique de différentes parasitoses. Cependant, leur utilisation excessive occasionne des effets toxiques sur la santé animale et humaine. L'ivermectine (IVM), un médicament antiparasitaire d'efficacité élevée et d'utilisation très fréquente spécifiquement en médecine vétérinaire. La présente étude vise dans un premier temps à évaluer les effets toxiques d'une administration répétée d'une forte dose d'IVM et dans un deuxième temps de déterminer un éventuel effet amélioratif d'une coadministration d'un antioxydant puissant la vitamine C (acide ascorbique) chez les lapins (*Oryctolagus cuniculus*) biochimiquement et histopathologiquement. Vingt lapins mâles ont été divisés en quatre groupes (n = 5) et traités pendant trois semaines consécutives : Groupe témoin ; Groupe traité par l'IVM (2 mg / kg p.c. par voie sous-cutanée, 3 fois par semaine); Groupe traité par IVM + vitamine C par gavage (20 mg/ml) et groupe traité par IVM + vitamine C supplémenté en aliment (200 mg / kg d'aliment). Au 14^{ème} et au 21^{ème} jour de l'expérimentation, des échantillons de sang ont été collectés pour l'analyse biochimique et à la fin de l'expérimentation, les lapins ont été euthanasiés et les organes foie, rein, poumon et cerveau ont été soigneusement pesés et fixés pour l'étude histologique. Nos résultats ont montré des troubles du comportement, une diminution du poids corporel, de la prise d'aliment et l'eau de boisson, des variations du poids absolu et relatifs des organes étudiés chez le lot IVM en comparaison avec les témoins et les coadministrés par la vitamine C. L'IVM a induit une perturbation des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique et rénale et des paramètres du bilan lipidique avec une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux plasmatique de glucose, ALAT, ASAT, γ -GT, créatinine et HDL-C et une diminution significative du taux de TC, TG, LDL-C et VLDL-C chez le lot IVM par rapport au groupe témoin. La coadministration de la vitamine C a significativement amélioré ces paramètres biochimiques. L'examen histopathologique du foie, des reins du cerveau et des poumons montre une désorganisation tissulaire chez le lot IVM. Toutefois, on a noté que les animaux traités par l'IVM + vitamine C (par gavage ou en alimentation) présentent une architecture tissulaire moins altérée et semblable à ceux du groupe témoin. A l'issus de ces résultats, la coadministration de la vitamine C s'avère une solution efficace pour atténuer les effets toxiques induits par l'IVM sur les différents systèmes biologiques du lapin. D'où, on recommande l'association de la vitamine C par gavage chez l'animal traité par l'IVM pour éliminer ses effets nocifs.

Mots clés : Ivermectine, Vitamine C (acide ascorbique), Analyse biochimique, Histopathologie, Lapin.

Abstract

Currently, the marketing of new antiparasitic drugs for veterinary use has enabled better therapeutic management of various parasitoses. However, their excessive use causes toxic effects on animal and human health. Ivermectin (IVM), an antiparasitic drug of high efficacy and very frequent use specifically in veterinary medicine. The present study aims firstly to assess the toxic effects of repeated administration of a high dose of IVM and secondly to determine a possible ameliorative effect of a co-administration of a powerful antioxidant, vitamin C (ascorbic acid) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histopathological investigations. Twenty male rabbits were divided into four groups (n = 5) and treated for three consecutive weeks: control group; Group treated with IVM (2 mg / kg bw subcutaneously, 3 times per week); Group treated with IVM + vitamin C by gavage (20 mg / mL) and group treated with IVM + vitamin C supplemented with food (200 mg / kg of food). On the 14th and 21st day of the experiment, blood samples were collected for biochemical analysis and at the end of the experiment, the rabbits were euthanized and the liver, kidney, lung and brain organs were carefully weighed and fixed for histological study. Our results showed behavioral disorders, a decrease in body weight, food and water intake, variations in the absolute and relative weight of the organs studied in the IVM group compared to control and vitamin C co-treated groups. IVM induced a disruption of biochemical markers of hepatic and renal function and parameters of the lipid profile with a significant ($p < 0.05$) increase in the plasma level of glucose, ALT, AST, γ -GT, creatinine and HDL-C and a significant decrease of the level of TC, TG, LDL-C and VLDL-C in the IVM batch compared to the control group. Co-administration of vitamin C significantly improved these biochemical parameters. Histopathological examination of the liver, kidneys, brain and lungs shows tissue disruption in the IVM group. However, it was noted that the animals treated with IVM + vitamin C (by gavage or food) show less altered tissue architecture, which are similar to those in the control group. Following these results, the co-administration of vitamin C has proved to be an effective solution to attenuate the IVM induced toxic effects on the various biological systems of the rabbit. Hence, it is recommended to combine vitamin C by gavage with IVM treatment in animals to eliminate its harmful effects.

Keywords: Ivermectin, Vitamin C (ascorbic acid), Biochemical analysis, Histopathology, Rabbit.

ملخص

حاليًا، أتاح تسويق الأدوية الجديدة المضادة للطفيليات للاستخدام البيطري تحكم علاجي أفضل للطفيليات المختلفة. ومع ذلك، فإن استخدامها المفرط يسبب آثارًا سامة على صحة الحيوان والإنسان. الأيفرمكتين (Ivermectin)، دواء مضاد للطفيليات ذو فعالية عالية واستخدام كثيف للغاية خاصة في مجال الطب البيطري. تهدف الدراسة الحالية أولاً إلى تقييم الآثار السامة الناتجة عن التناول المتكرر لجرعة عالية من الأيفرمكتين وثانيًا للتأكد من فعالية التناول المشترك لمضاد الأكسدة القوي، فيتامين ج (حمض الاسكوربيك) لدى الأرانب (*Oryctolagus cuniculus*) عن طريق الدراسات البيوكيميائية والنسجية. تم تقسيم عشرين أرنبًا ذكرًا إلى أربع مجموعات (ن = 5) وعولجوا لمدة ثلاثة أسابيع متتالية: المجموعة الشاهدة؛ المجموعة المعالجة بالايفيرمكتين (2 مغ / كغ من وزن الجسم تحت الجلد، 3 مرات في الأسبوع)؛ المجموعة المعالجة بالايفيرمكتين + فيتامين ج بالتزقيم (20 مغ / مل) والمجموعة المعالجة بالايفيرمكتين + فيتامين ج المضاف الى الطعام (200 مغ / كغ من الطعام). في اليومين الرابع عشر والحادي والعشرين من التجربة، تم جمع عينات الدم للتحليل الكيميائي الحيوي، وفي نهاية التجربة، تم ذبح الأرانب ووزن الكبد والكلى والرئة والدماغ بعناية وثبيتها للدراسة النسجية. أظهرت نتائجنا اضطرابات سلوكية، وانخفاض في وزن الجسم، وتناول الطعام والماء، واختلافات في الوزن المطلق والنسبي للأعضاء المدروسة لدى المجموعة المعالجة بالأيفرمكتين مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعتين المعالجتين بالأيفرمكتين مع الفيتامين ج. تسبب الأيفرمكتين في اختلال العلامات البيوكيميائية لوظائف الكبد والكلى ومعلّات توازن الدهون مع زيادة كبيرة ($p < 0.05$) في مستويات البلازما من الجلوكوز، ALAT، ASAT، γ -GT، الكرياتينين و HDL-C وانخفاض ملحوظ في مستوى كل من TC و TG و LDL-C و VLDL-C في المجموعة المعالجة بالأيفرمكتين مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى التناول المشترك لفيتامين ج إلى تحسن كبير في هذه المعلامات البيوكيميائية. أظهر الفحص التشريحي المرضي للكبد والكلى والدماغ والرئتين اضطرابًا في الأنسجة في مجموعة المعالجة بالأيفرمكتين. ومع ذلك، لوحظ أن الحيوانات التي عولجت بالأيفرمكتين + فيتامين ج (بالتزقيم أو الطعام) تظهر بنية نسيجية أقل تغيرًا ومثابة للبنية الخاصة بالمجموعة الشاهدة. على ضوء هذه النتائج، أثبتت دراستنا ان الاستعمال المشترك لفيتامين ج يعتبر حل فعال للتخفيف من الآثار السامة التي يسببها الأيفرمكتين على الأنظمة البيولوجية المختلفة للأرانب. لذلك، يوصى بدمج الفيتامين ج عن طريق التزقيم لدى الحيوانات المعالجة بالأيفرمكتين للتخلص من آثاره الضارة.

الكلمات المفتاحية: آيفرمكتين، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك)، التحليل البيوكيميائي، التشريح المرضي، الأرنب.

*TABLE DES
MATIERES*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES PLANCHES	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
RESUME	XIV
ABSTRACT	XV
ملخص	XVI

INTRODUCTION GENERALE	1

PARTIE BIBIOGRAHIQUE

**CHAPITRE 1 ORGANES CIBLES & MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE
L'ETUDE**

1.FOIE : ORGANE DE METABOLISATION	4
1.1.Rappels anatomiques.....	4
1.2.Rappels histologiques.....	5
1.3.Fonctions métaboliques du foie	8
1.3.1.Fonction exocrine du foie.....	8
1.3.2.Fonction endocrine du foie.....	8
2.REIN : ORGANE D'EPURATION	9
2.1.Présentation du rein.....	9
2.2.Rappels anatomiques.....	9
2.3.Rappels histologiques.....	11
2.4.Fonctions physiologiques du rein.....	13
2.4.1.Fonction de détoxification rénale.....	13

3.POUMON	14
3.1.Présentation du poumon.....	14
3.2.Rappels anatomiques.....	15
3.3.Rappels histologiques.....	16
3.4.Fonctions physiologiques du poumon.....	17
4.Système nerveux central (SNC)	18
4.1.Structure générale du cerveau	18
4.2.Anatomie et histologie du cortex cérébral	18
4.3.Anatomie et histologie de l'hippocampe.....	20
5.MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE	21
5.1.Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique	21
5.2.Marqueurs biochimiques de la fonction rénale	21
5.3.Marqueurs biochimiques du bilan lipidique.....	22

CHAPITRE 2 MEDICAMENTS ANTIPARASITAIRES & IVERMECTINE

1.Lactones macrocycliques et Avermectines.....	26
1.1.Lactones macrocycliques	26
1.1.1.Classification	26
2.Avermectines	27
2.1.Propriétés générales	27
2.2.Dérivés des avermectines.....	27
3.Médicament ciblé par l'étude « Ivermectine »	28
3.1.Structure chimique.....	28
3.2.Propriétés physico-chimiques	29
3.Propriétés Pharmacologiques.....	30
3.3.1.Mécanisme d'action.....	30
3.3.2.Effets pharmacologiques.....	31
3.3.3.Formes galéniques	32
3.3.4.Les génériques de l'ivermectine homologués dans le marché national des médicaments vétérinaires.....	32
3.4.Propriétés Pharmacocinétiques	34
3.4.1.Absorption et la distribution	34
3.4.2.Métabolisme.....	35
3.4.3.Elimination.....	35
3.5.Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : rôle majeur de détoxification	35
3.6.Effets secondaires	37
3.7.Toxicité	37

CHAPITRE 3 ANTIOXYDANTS & VITAMINE

1. Définition des Antioxydants	39
2. Définition et classification des vitamines	39
3. Vitamine C ou Acide ascorbique	40
3.1. Structure chimique	40
3.2. Propriétés physico-chimiques	41
3.3. Biosynthèse de la vitamine C	41
3.4. Source de vitamine C	42
3.5. Fonctions physiologiques	43
3.5.1. Agent antioxydant	43
3.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	43
3.5.3. Agent d'oxydo-réduction	43
3.5.4. Agent d'hydroxylation	43
3.5.5. Agent neuroprotecteur	44
4. Toxicité de la vitamine C	44

PARTIE EXPERIMENTALE

Présentation de l'étude	45

CHAPITRE 1 MATERIEL & METHODES

1. Matériel	46
1.1. Matériel biologique (modèle animal)	46
1.1.1. Systématique	46
1.2. Matériel non biologique	47
2. Méthodes	47
2.1. Protocole expérimental	47
2.2. Prélèvement sanguin	49
2.3. Analyses biochimiques	49
2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes	57
2.5. Etude histologique des organes	57
2.6. Traitement des données et analyse statistique	58

CHAPITRE 2 RESULTATS & DISCUSSION.....	60
1. RESULTATS.....	60
1.1.Effet du traitement sur le comportement du lapin	60
1.2.Variation du poids corporel et pourcentage de prise de poids	60
1.3.Variation de la consommation de l'aliment et de boisson	61
1.3.1.Variation de la consommation de l'aliment et le pourcentage de prise alimentaire	61
1.3.2.Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson	62
1.4.Variation du poids absolu et relatif des organes	63
1.5.Paramètres biochimiques	65
1.5.1.Paramètres biochimiques de la fonction hépatique.....	65
1.5.2.Paramètres biochimiques de la fonction rénale	70
1.5.3.Paramètres biochimiques du bilan lipidique	72
1.6.Résultats histologiques	79
1.6.1.Histopathologie du foie.....	79
1.6.2.Histopathologie du rein.....	85
1.6.3.Histopathologie du poumon.....	90
1.6.4.Histopathologie du système nerveux centrale	97
2. DISCUSSION GENERALE.....	108
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122
ANNEXES	

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Actuellement, l'élevage des animaux de rente fait face à de nombreuses restrictions, dont les plus dominantes sont les pathologies animales. Effectivement les maladies infectieuses et plus spécifiquement les parasitoses sont les plus prédominantes, causant ainsi une défaillance dans la production animale et des taux de mortalité élevés. En Algérie, les pertes économiques annuelles causées par ces maladies s'estimeraient à des dizaines de millions de dinars.

Pour confronter à ces problèmes sanitaires, notre pays importe une quantité considérable de médicament vétérinaire pour préserver la santé des animaux producteurs des denrées alimentaires et celle de l'homme comme consommateur principal (MADRP, 2018). En 2018, le marché national du médicament vétérinaire est estimé à 40 millions d'euros. Au sein de ce marché, les agents antimicrobiens, les vaccins et les vitamines occupent une place prédominante (Anonyme, 2018). Parmi les médicaments antimicrobiens disponibles sur ce marché, les molécules antiparasitaires occupent une place considérable (15,3 % des médicaments vétérinaires).

Un antiparasitaire idéal est un médicament à large index thérapeutique, efficace après une dose unique, facile à administrer, peu coûteux et ne laisse pas de résidus (Walter, 2008). La majorité de ses critères sont répondues dans une famille particulière, les endectocides, ensemble de produits agissant à la fois sur les parasites internes (end-) et les parasites externes (-ecto-), qui représente 32% de part de marché local des médicaments vétérinaires antiparasitaires. L'ivermectine (IVM), un dérivé semi-synthétique d'avermectines (AVMs), représente la première molécule endectocide mise sur le marché en 1981 en tant que médicament vétérinaire. Il est depuis devenu l'un des médicaments les plus réussis en raison de son large spectre d'activité contre les nématodes et les ectoparasites, sa forte rémanence et son excellente sécurité chez les vertébrés (Grayson *et al.*, 2017).

Dans le marché national des médicaments à usage vétérinaire, plusieurs formulations médicamenteuses à base d'AVMs ont été homologuées, dont la majorité est représentée par l'IVM. Notre synthèse sur le nombre des génériques d'IVM enregistrés en médecine vétérinaire a fait ressortir 30 formulations utilisées actuellement en Algérie. La disponibilité d'une telle molécule efficace en dose unique et moins toxique, constitue une utilisation aisée pour les éleveurs. Cependant, malgré sa marge de sécurité élevée, l'emploi excessif de l'IVM

peut présenter un risque majeur sur la santé animale et humaine, d'où l'intérêt de choix d'étude de cette molécule.

L'efficacité de l'IVM dans le traitement des parasitoses humaines est attesté par l'attribution du prix Nobel de médecine en 2016 (Laing *et al.*, 2017). L'IVM est bien transporté dans le sang, où elle se lie aux protéines plasmatiques, la plus grande quantité se trouve dans le foie, tandis que la plus faible quantité se trouve dans le cerveau en raison de la restriction par la barrière hémato-encéphalique. L'IVM est métabolisé par le cytochrome P450 dans le foie et excrété presque entièrement dans les selles (Kudzi *et al.*, 2010). Par conséquent, sa persistance sous forme inchangée dans les fèces après traitement a rapidement conduit à des préoccupations sur la faune non ciblée (en particulier les insectes coprophages) qui dépendent de ce milieu et sur l'éventuelle durée prolongée de dégradation de ces fèces.

L'IVM, comme tous les AVMs, interagit avec les canaux chlorures glutamate-dépendants présents dans les cellules nerveuses et musculaires des invertébrés induisant ainsi leurs paralysies (Cully *et al.*, 1994). L'IVM peut interagir avec d'autres canaux chlorures ligand-dépendants à savoir celui-ci faisant intervenir le GABA (acide gamma-amino-butérique). Ce système GABA est présent aussi chez les vertébrés mais uniquement au niveau du système nerveux où il est protégé par la barrière hémato-méningée par l'intermédiaire de la glycoprotéine P (P-gp), cette dernière joue un rôle essentiel dans la protection contre l'accumulation des AVMs dans le cerveau (Mayer, 2000). Des nouvelles recherches indiquent que tous les AVMs sont capables de perturber l'activité du transport par la P-gp, pouvant ainsi causer leurs accumulations dans le système nerveux et bien d'autres tissus (Radi *et al.*, 2020).

Le risque de défaillance des endectocides dans l'avenir prendra pour origine un emploi excessif et/ ou un choix erroné dans les doses ou les voies d'administration utilisées. Ainsi, l'utilisation exagérée des AVMs est associée aux problèmes d'efficacité et de résistance. Dans ce contexte, l'étude de la toxicité des AVMs en appliquant des protocoles spécifiques sur des modèles animaux de laboratoire permet d'apprécier les risques et effets toxiques liés à l'administration excessive de ces médicaments vétérinaires.

L'usage des antioxydants naturels pour améliorer les différentes altérations induites par les xénobiotiques chez les vertébrés devient un domaine d'intérêt de nombreuses recherches récentes. Parmi les antioxydants les plus puissants, la vitamine C (acide ascorbique), vitamine hydrosoluble, qui protège les compartiments cellulaires face aux espèces réactives de

l'oxygène (ERO). C'est l'un des principaux éléments importants du système biologique. Cette vitamine doit être incorporée dans l'alimentation car elle ne peut pas être produite dans les organismes de mammifères.

C'est dans ce contexte, que s'inscrit le présent travail de thèse qui a comme objectifs d'une part de donner un aperçu sur l'effet toxique d'une forte dose d'une formulation médicamenteuse antiparasitaire « l'AVIMEC ® » sur les paramètres biochimiques et histologiques. D'autre part de rechercher l'effet protecteur et amélioratif d'une co-administration d'un antioxydant puissant, l'acide ascorbique, soit par gavage soit supplémenté dans l'alimentation du lapin en se focalisant sur les changements du comportement, l'évolution pondérale, la variation des poids des organes, la consommation d'aliment et l'eau de boisson et l'examen histologique des organes vitaux à savoir le foie, les reins, les poumons et le cerveau suite à une toxicité subaiguë chez le lapin mâle de souche (*Oryctolagus cuniculus*).

Ce manuscrit s'articule en deux grandes parties :

- ❖ Une première partie expose une synthèse des données bibliographiques relatives aux organes étudiés (foie, rein, poumon et cerveau) ; aux médicaments antiparasitaires, et particulièrement les anthelminthiques de la famille des avermectines ; leur impact sur la santé humaine et les différents tests de toxicité. Également, nous présentons l'importance de l'utilisation des antioxydants naturels pour améliorer les effets toxiques liés à l'exposition aux xénobiotiques chez les mammifères, spécifiquement la vitamine C ou acide ascorbique.
- ❖ La seconde partie est initiée par une présentation du dispositif expérimental mis en œuvre dans le cadre de ce projet de thèse et qui concerne l'analyse biochimique et histologique chez le lapin mâle. Cette partie est dédiée à nos travaux de recherche et se présente par une seule expérimentation qui étudie la toxicité subaiguë de l'IVM. Ce chapitre étudie les effets hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques et la toxicité pulmonaire d'un médicament vétérinaire (ivermectine ; AVIMEC®) et l'effet amélioratif de la vitamine C après une toxicité subaiguë de 21 jours chez le lapin mâle (*Oryctolagus cuniculus*).

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

ORGANES CIBLES

&

MARQUEURS

BIOCHIMIQUES DE

L'ETUDE

CHAPITRE 1
ORGANES CIBLES
&
MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE

1. FOIE : ORGANE DE METABOLISATION

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme après la peau, ses fonctions sont à la fois exocrines et endocrines. Par sa fonction exocrine, le foie produit la bile qui est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire avant d'être excrétée dans le duodénum. Les sécrétions biliaires sont responsables de l'émulsification des lipides avant leur absorption intestinale. Par sa fonction endocrine, le foie joue un rôle important dans le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines (König *et al.*, 2007).

1.1. Rappels anatomiques

Chez le lapin, le foie est situé dans la région épigastrique, entre les deux arcades costales, atteignant le niveau de la 7^{ème} côte droite et de la 9^{ème} côte gauche (Stamatova-Yovcheva *et al.*, 2012). Le foie est entouré d'une capsule de tissu conjonctif formé de collagène dense et irrégulier (la capsule de Glisson), les éléments du tissu conjonctif dérivés de la capsule de Glisson pénètrent dans le parenchyme hépatique et subdivisant ce dernier en lobes et lobules (Gartner, 2018). Il s'agit d'un organe polylobé, composé de cinq lobes, à savoir ; le lobe hépatique droit, le lobe caudé, le lobe quadrant et le lobe hépatique gauche qui est séparé en deux parties latérale et médiale (Figure 1).

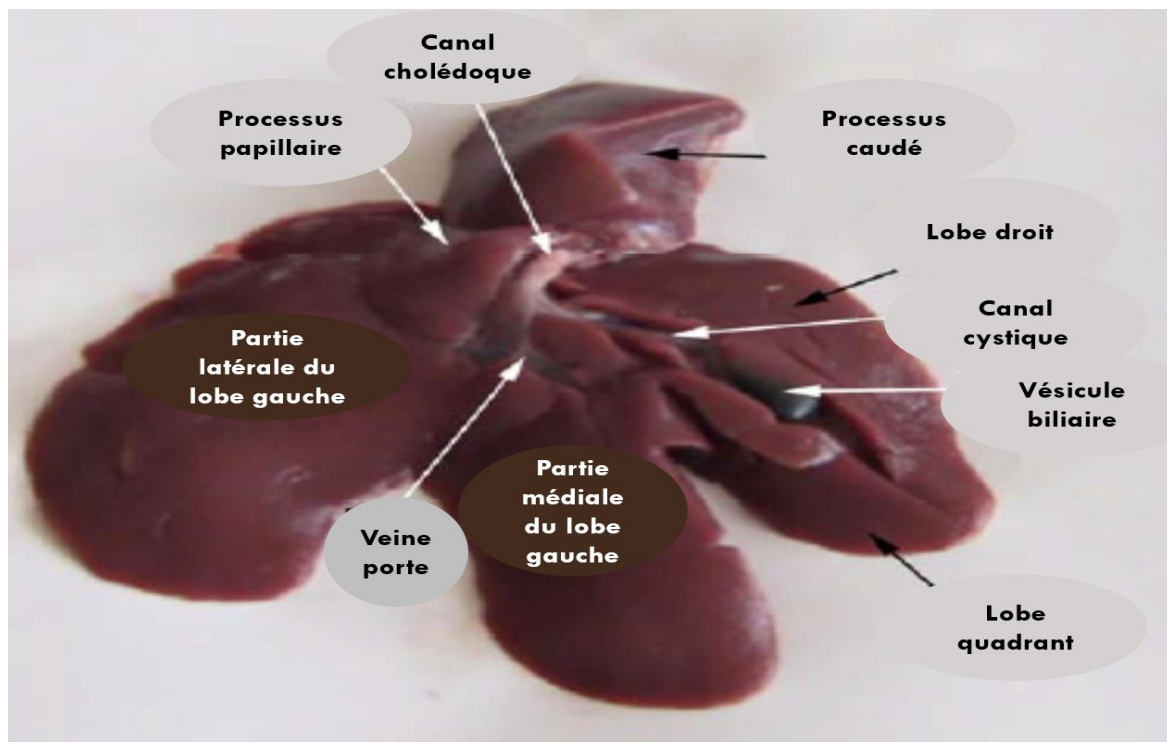


Figure 1 : Foie polylobé chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) (Stamatova-Yovcheva *et al.*, 2012).

1.2. Rappels histologiques

L'unité structurelle et fonctionnelle du foie est le **lobule hépatique**. Au centre de chaque lobule se trouve la **veine centrolobulaire**, à partir de laquelle rayonnent des travées de cellules hépatiques (**hépatocytes**) séparées par de larges canaux vasculaires appelés **sinusoïdes** (Figure 2). Au niveau des angles de chaque lobule, se répartissent les espaces portes où sont groupées les branches de l'**artère hépatique**, de la **veine porte** hépatique, du **canal biliaire** et des **vaisseaux lymphatiques**. Le sang veineux et artériel des espaces portales périphériques se mélange d'abord dans les sinusoïdes hépatiques et s'écoule vers la veine centrolobulaire. De là, le sang pénètre dans la circulation générale par les veines hépatiques qui quittent le foie et pénètrent dans la veine cave inférieure (Eroschenko, 2008).

Les sinusoïdes hépatiques sont des canaux sanguins sinueux et dilatés bordés d'une couche discontinue de cellules endothéliales fenêtrées qui présentent également des fenestrations et une lame basale discontinue. Les sinusoïdes hépatiques sont séparées des hépatocytes sous-jacents par un espace péri-sinusoïdal sous-endothélial (espace de **Disse**). En conséquence, le matériel ingéré transporté dans le sang sinusoïdal a un accès direct à travers la paroi endothéliale discontinue avec les hépatocytes.

En plus des **cellules endothéliales**, les sinusoides hépatiques contiennent également des macrophages, appelés **cellules de Kupffer**, situés du côté luminale des cellules endothéliales ([Eroschenko, 2008](#)). Les cellules de stockage de lipide (**cellules Ito**) sont situées dans l'espace de Disse. Les cellules Ito ont pour rôle le stockage de la vitamine A, mais dans le cas de la cirrhose alcoolique, ces cellules fabriquent également du collagène du type I, responsable de la fibrose hépatique ([Gartner, 2018](#)).

Les hépatocytes sécrètent la bile dans des petits canaux appelés **canalicules biliaires** intercellulaires situés entre les hépatocytes individuels. Les canalicules convergent à la périphérie des lobules hépatiques dans les espaces portes sous forme de canaux biliaires interlobulaires. À l'intérieur des lobules hépatiques, la bile s'écoule dans les canalicules biliaires vers le canal biliaire interlobulaire dans l'espace porte dans le sens inverse du courant sanguin, tandis que le sang s'écoule dans les sinusoides vers la veine centro-lobulaire. En conséquence, la bile et le sang ne se mélangent pas ([Eroschenko, 2008](#)).

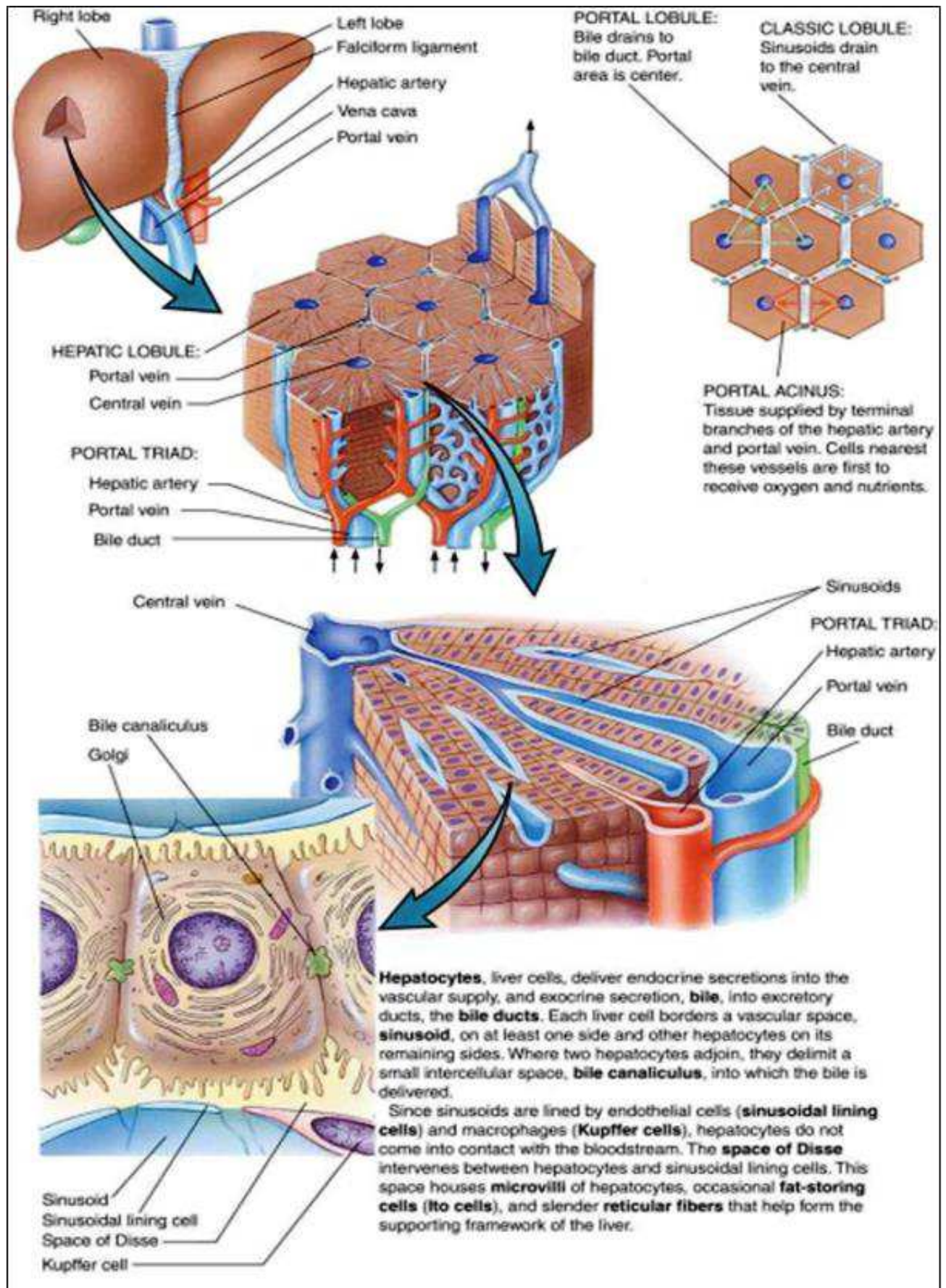


Figure 2 : Schéma représentant la structure et l'histologie du foie (Gartner, 2018).

1.3. Fonctions métaboliques du foie**1.3.1. Fonction exocrine du foie**

Le foie forme environ 1,2 L de bile par jour, qui représente sa sécrétion exocrine (Gartner, 2018). La bile est délivrée dans un système de conduits « canalicules biliaires ; cholangioles ; passage de Hering; canaux biliaires interlobulaires; canaux hépatiques droit et gauche», qui dirigent ensuite la bile dans le canal hépatique commun; et de là, via le canal cystique dans la vésicule biliaire, un organe de stockage associé au foie.

La bile est un liquide vert un peu visqueux composé d'eau, d'ions, de cholestérol, de phospholipides, de glucuronide de bilirubine, d'IgA sécrétoire et d'acides biliaires.

1.3.2. Fonction endocrine du foie

Le foie est l'organe principal de synthèse, de stockage et du métabolisme de nombreux produits (Gartner, 2018) :

- Le foie synthétise et libère de nombreuses protéines plasmatiques et d'autres composants plasmatiques, tels que le fibrinogène, l'urée, l'albumine, la prothrombine, l'angiotensine et les lipoprotéines.
- Il fabrique également des protéines qui régulent le transfert et le métabolisme du fer.
- Il stocke également les lipides et le glucose et, si nécessaire, synthétise le glucose à partir de sources non glucidiques, un processus connu sous le nom de néoglucogenèse.
- Le foie synthétise également les cinq classes de lipoprotéines.
- Le foie est également responsable de la désintoxication de divers médicaments, toxines, sous-produits métaboliques et produits chimiques.

2. REIN : ORGANE D'EPURATION

2.1. Présentation du rein

Le système urinaire se compose de deux reins, deux uretères menant à une seule vessie et d'un seul urètre. Les reins sont en forme d'haricot et situés dans la zone rétro-péritonéale adjacente à la paroi postérieure de l'abdomen. Sur chaque rein se trouve la glande surrénale intégrée dans la graisse rénale et le tissu conjonctif (Eroschenko, 2008). Le rein joue un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme, la formation de l'urine, la régulation de la pression artérielle, l'équilibre acido-basique et la formation et la libération de certaines hormones.

2.2. Rappels anatomiques

Chez les mammifères, le bord médial concave du rein est le hile, qui contient trois grandes structures, l'artère rénale, la veine rénale et le bassinet rénal en forme d'entonnoir. Autour de ces structures se trouve le sinus rénal. Chaque rein est recouvert d'une capsule rénale. Une coupe longitudinale du rein (Figure 3) montre un cortex externe plus sombre et une médulla interne plus claire, qui se compose de nombreuses pyramides rénales (pyramides de Malpighi) en forme de cône.

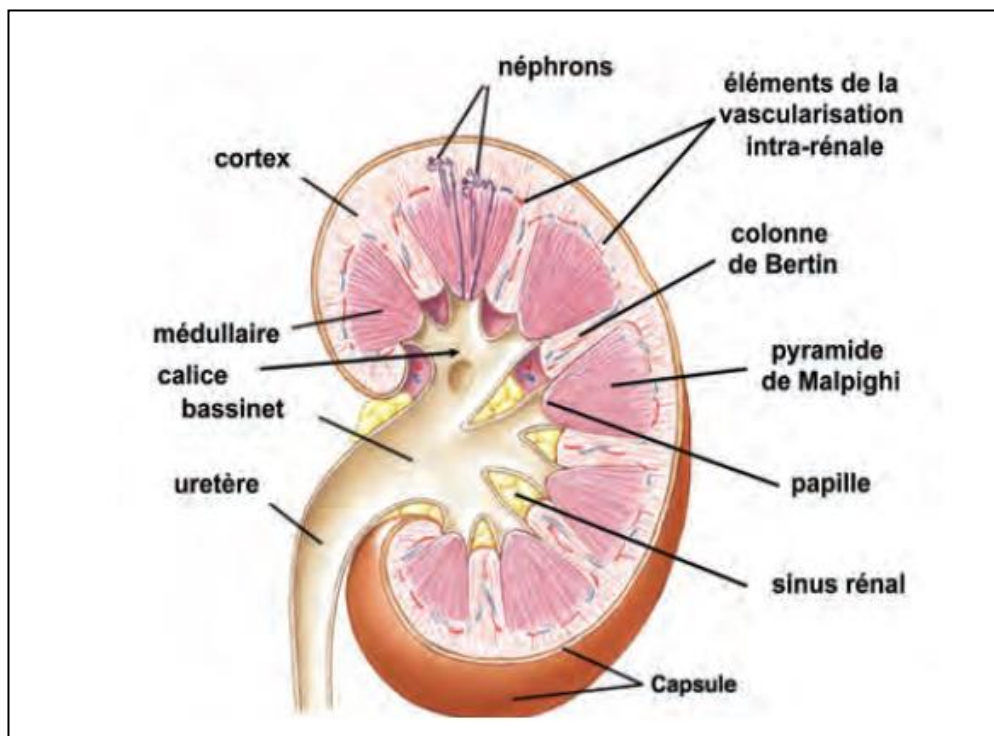


Figure 3 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein chez l'homme (Lacour, 2013).

La base de chaque pyramide fait face au cortex et forme la limite cortico-médullaire. Le sommet rond de chaque pyramide s'étend vers le bas jusqu'au bassinet rénal pour former la papille rénale. Chaque papille rénale est entourée d'un calice mineur en forme d'entonnoir, qui

recueille l'urine de la papille. Les calices mineurs se rejoignent dans le sinus rénal pour former un calice majeur. Les calices majeurs, à leur tour, se rejoignent pour former le bassinet rénal plus grand en forme d'entonnoir. Le bassinet rénal quitte chaque rein à travers le hile, il se rétrécit pour devenir un uretère musculaire et descend vers la vessie de chaque côté de la paroi postérieure de l'abdomen (Eroschenko, 2008).

Le rein des lapins est assez primitif par rapport à celui d'autres mammifères. Cependant, il a fait l'objet de recherches approfondies car ses tubules rénaux peuvent être facilement retirés avec leur membrane basale intacte, ce qui facilite l'étude rénale (Dimitrov *et al.*, 2012).

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron constitué d'un corpuscule rénal et d'un long tubule rénal coudé (Figure 4). Le rein humain contient environ un million de néphron (Wheater *et al.*, 2001). Le corpuscule rénal est composé d'un glomérule rénal entouré d'une capsule de Bowman. Le tubule est divisé par un étranglement ou anse de Henlé en deux parties, le tubule contourné proximal faisant suite aux cellules pariétales du glomérule et le tubule contourné distal qui s'abouche dans un canal collecteur. Les canaux collecteurs aboutissent dans le bassinet rénal (Eroschenko, 2008).

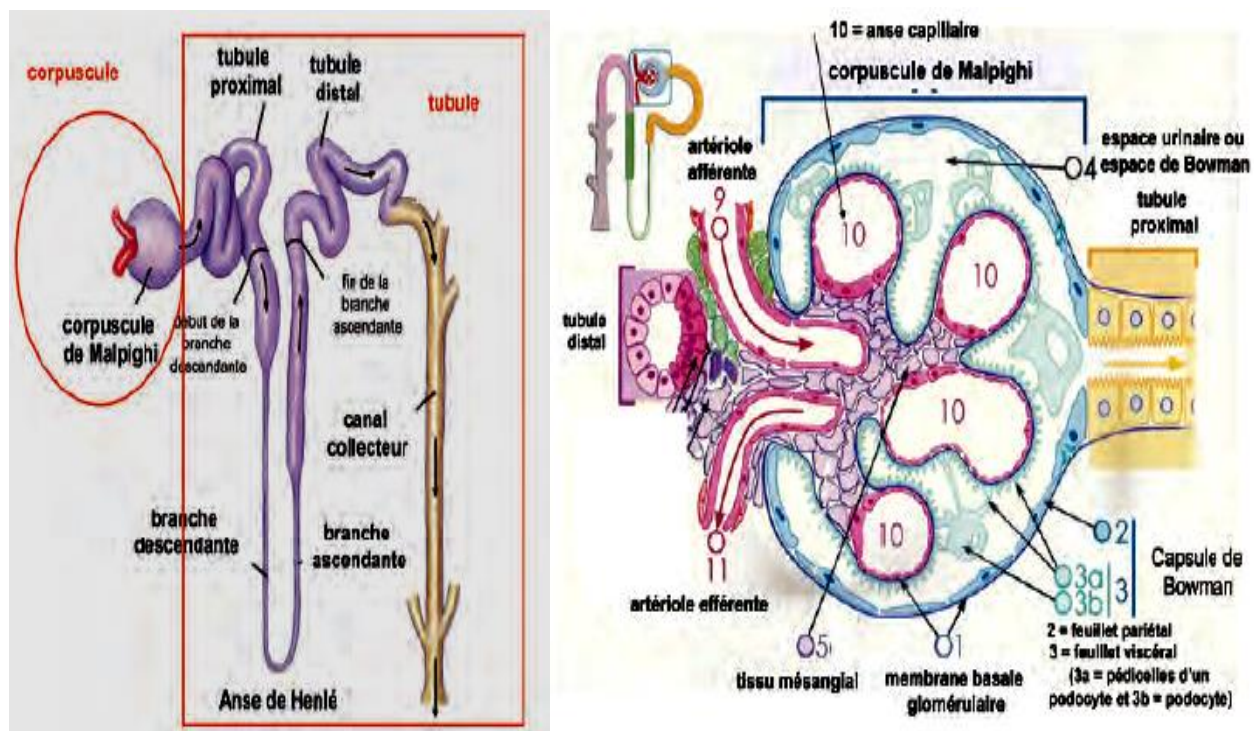


Figure 4 : Schéma de la structure d'un néphron avec une coupe du corpuscule rénal (Lacour, 2013).

2.3. Rappels histologiques

Le rein est subdivisé en un cortex externe de coloration plus sombre et d'une médulla interne de coloration plus claire (**Figure 5**). Le cortex rénal est recouvert d'une capsule rénale constituée d'un tissu conjonctif dense et irrégulier (1).

Le cortex rénal contient des tubules contournés distaux et proximaux (4, 11), des glomérules (2) et des rayons médullaires (3). Les artères interlobulaires (12) et les veines interlobulaires (13) sont également présentes dans ce cortex. Les rayons médullaires (3) sont formés par les portions droites de néphrons, les vaisseaux sanguins, et les tubules collecteurs qui se rejoignent dans la médulla pour former les plus grands canaux collecteurs (6). Les rayons médullaires ne s'étendent pas jusqu'à la capsule rénale (1) à cause des tubules contournés sous capsulaires (10).

La médulla comprend les pyramides de Malpighi. La base de chaque pyramide (5) est adjacente au cortex et son sommet forme la papille rénale pointue (7) qui fait saillie le petit calice (16), ce dernier représente la partie dilatée de l'uretère. La zone cribrosa (9) est percée de petits trous, qui représentent les ouvertures des tubes collecteurs (6) dans le petit calice (16).

La pointe de la papille rénale (7) est généralement recouverte d'un simple épithélium cylindrique (8). Lorsque l'épithélium cylindrique de la papille rénale (7) se réfléchit sur la paroi externe du calice mineur (16), il devient un épithélium de transition (16). Une fine couche de tissu conjonctif et de muscle lisse (non illustré) sous cet épithélium se confond alors avec le tissu conjonctif du sinus rénal (15).

Les branches de l'artère et de la veine rénales appelées artères interlobaires (17) et veines interlobaires (18) sont présentes dans le sinus rénal (15). Les vaisseaux interlobaires (17, 18) pénètrent dans le rein et se cambrent au-dessus de la base de la pyramide (5) à la jonction cortico-médullaire en tant qu'artère et veine arquées (14). Les vaisseaux arqués (14) donnent naissance à des artères interlobulaires plus petites (12) et des veines interlobulaires (13) qui passent radialement dans le cortex rénal et donnent naissance aux artères glomérulaires afférentes qui donnent naissance aux capillaires des glomérules (3).

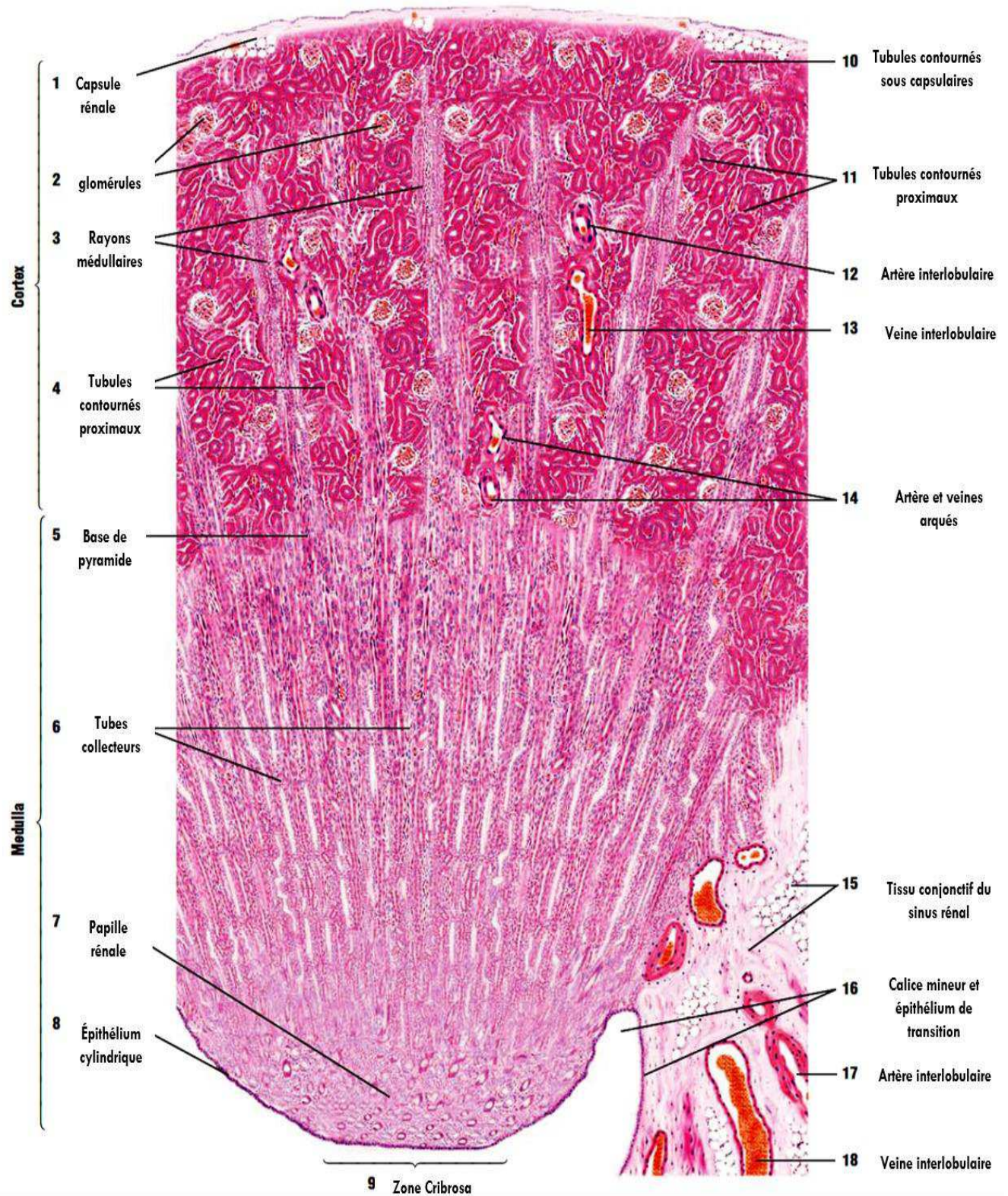


Figure 5 : Schéma d'une coupe histologique du rein (cortex et medulla). Hématoxyline-éosine, faible grossissement ([Eroschenko, 2008](#)).

2.4. Fonctions physiologiques du rein

Les reins sont des organes vitaux qui maintiennent l'homéostasie de l'organisme vivant. Cette fonction est réalisée en régulant la pression artérielle, la composition sanguine, le pH, le volume des fluides et l'équilibre acido-basique dans l'organisme. Les reins produisent également de l'urine, qui se fait en trois étapes principales : la filtration glomérulaire du sang, la réabsorption des nutriments et autres substances du filtrat qui pénètre dans les tubules contournés proximaux et distaux, et la sécrétion ou excrétion des déchets métaboliques, des produits chimiques indésirables ou des substances du filtrat. Environ 99% du filtrat glomérulaire produit par les reins est réabsorbé au niveau tubulaire vers le sang; le 1% restant pénètre dans la vessie pour être évacué sous forme d'urine.

De plus, les cellules rénales produisent deux substances importantes, une enzyme « rénine » et une hormone glycoprotéine « l'érythropoïétine ». La rénine régule la pression artérielle pour maintenir une pression de filtration adéquate dans les glomérules rénaux. L'érythropoïétine, que l'on pense être produite et libérée par les cellules endothéliales du réseau capillaire péri-tubulaire, stimule la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse rouge ([Eroschenko, 2008](#)).

2.4.1. Fonction de détoxification rénale

Le rein est un organe cible majeur de la toxicité induite par les xénobiotiques, en raison de ses fonctions de filtration, de transport, de réabsorption et de métabolisme des produits chimiques. Le rein purifie l'organisme de ses déchets endogènes (produits de dégradation métaboliques: urée, ammoniac, etc.) ou exogènes en détoxifiant et en éliminant les xénobiotiques (toxines, médicaments, pesticides, etc.) ([khaldoun-Oularbi, 2015](#)).

3. POUMON

3.1. Présentation du poumon

Le système respiratoire représente le lieu privilégié des échanges avec le milieu extérieur, dans lequel on peut distinguer les voies aériennes de conduction (nez, pharynx, larynx, trachée et bronches) et les voies aériennes inférieures (la partie respiratoire proprement dite) (**Figure 6**), qui forment la plus grande surface des échanges gazeux (majeure partie des poumons : bronchioles, canaux alvéolaires et alvéoles). Toutes ces parties de l'appareil respiratoires sont en continuité (**Raoul, 2005**).

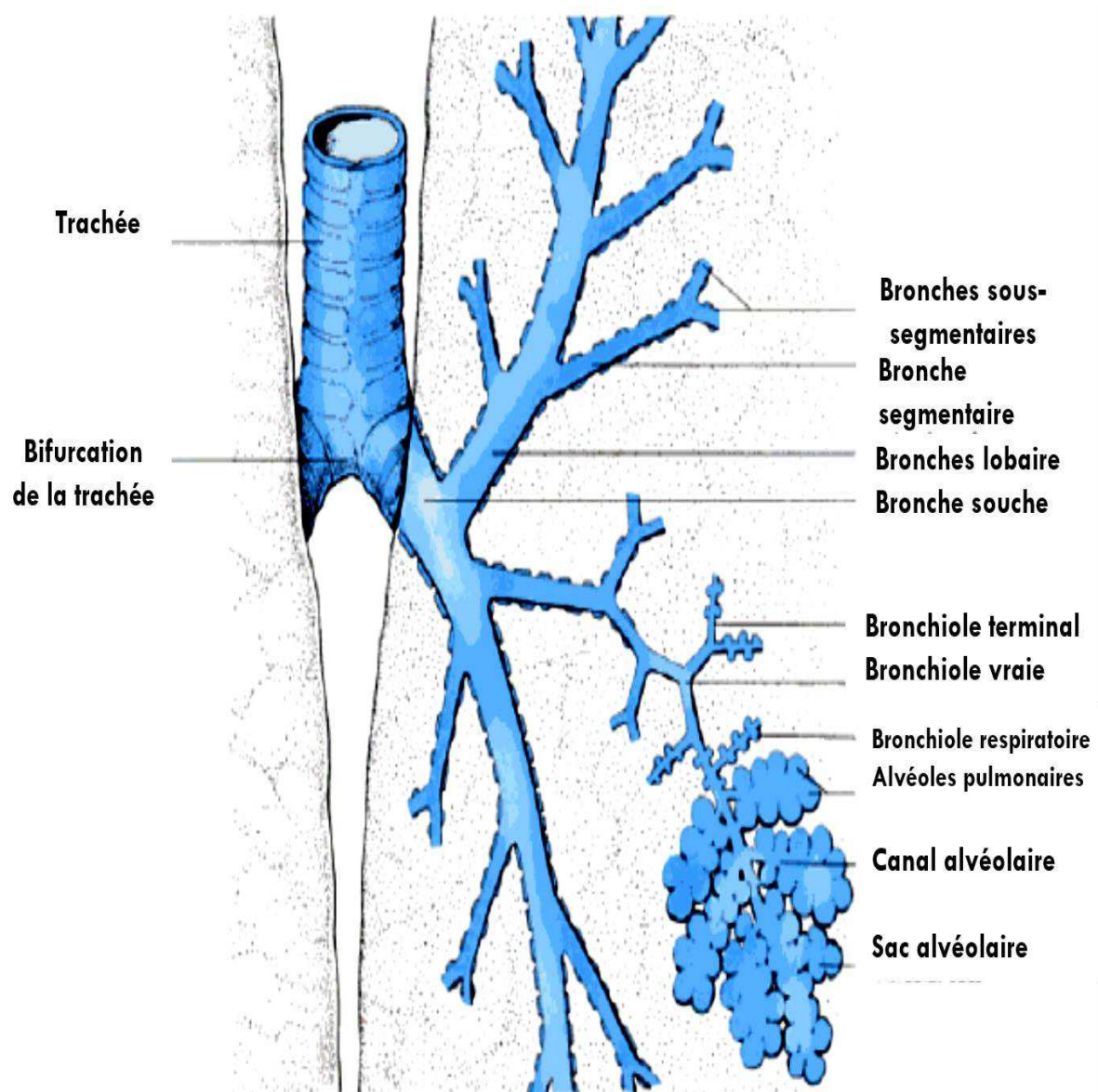


Figure 6 : Schéma représentant les voies aériennes inférieures du système respiratoire (**König et al., 2007**).

3.2. Rappels anatomiques

Chez le lapin, les deux poumons reposent sur le diaphragme, un muscle situé à la limite inférieure du thorax. Chaque poumon est enveloppé par une membrane séreuse composée de deux couches séparées par la cavité pleurale. Le poumon droit est plus volumineux que le poumon gauche, car l'apex et les ventricules du cœur sont dirigés vers la gauche. Les poumons sont divisés en lobes qui sont libres dans la cavité thoracique et ils sont rattachés au diaphragme par le ligament pulmonaire, aux différents vaisseaux sanguins, à la trachée et aux bronches (**Figure 7**). La position haute du cœur dans le médiastin entraîne une réduction des lobes pulmonaires supérieurs chez le lapin.

Les lapins ont une plèvre très fine et, contrairement aux autres mammifères domestiques, il n'y a pas de cloisons divisant le poumon en lobules ([Ringler et Newcomer, 2014](#)).

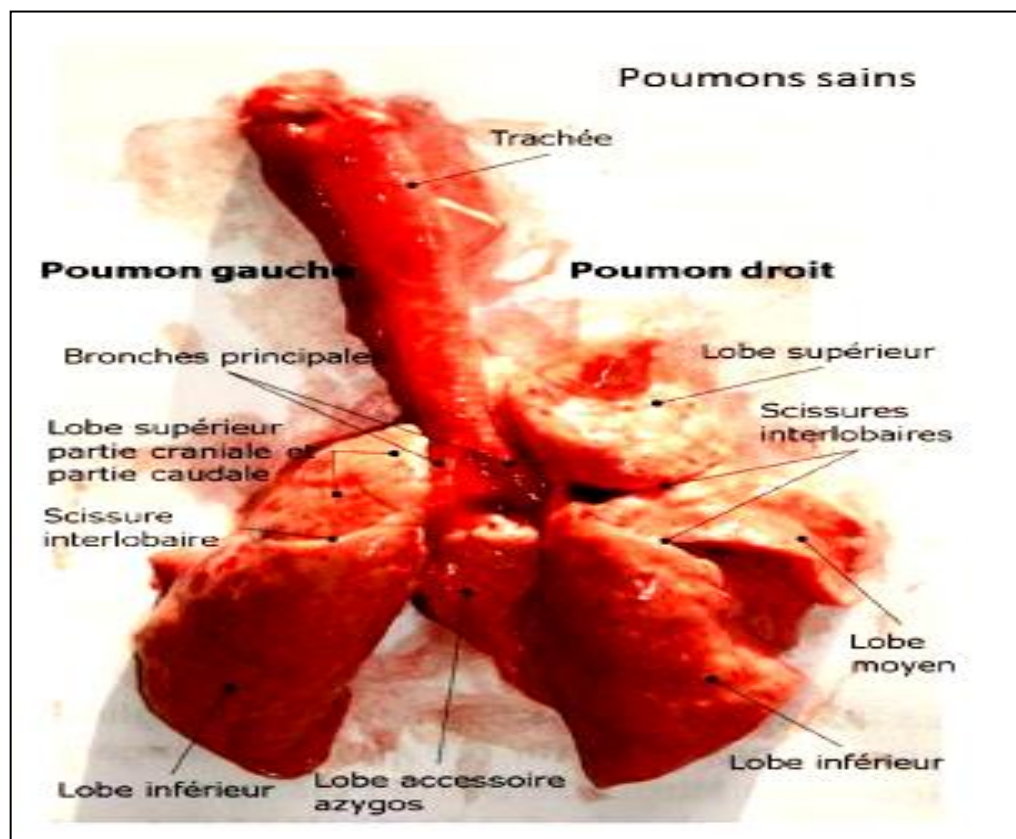


Figure 7 : Anatomie des poumons chez le lapin ([Van Praag, 2014](#)).

3.3. Rappels histologiques

La **Figure 8** montre les principales structures pulmonaires pour la conduction aérienne et les échanges gazeux (respiration) :

La paroi d'une bronche intrapulmonaire (5) est identifiée par les plaques environnantes de cartilage hyalin (7). La bronche (5) est également tapissée d'épithélium cilié cylindrique pseudostratifié. La paroi de la bronche intrapulmonaire (5) est constituée d'une fine lamina propria (4), d'une fine couche de muscle lisse (3), d'une sous-muqueuse (2) avec des glandes bronchiques (6), de plaques de cartilage hyalin (7) et de l'adventice (1).

Dans la bronchiole (17), la lumière est tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudostratifié. La lumière montre aussi des plis muqueux (18) provoqués par les contractions de la couche environnante de muscle lisse (19). Les glandes bronchiques et les plaques cartilagineuses ne sont plus présentes et la bronchiole (17) est entourée par l'adventice (16). Dans cette illustration, un nodule lymphatique (15) et une veine (15) adjacente à l'adventice (16) accompagnent la bronchiole (17). Les bronchioles terminales (8, 10) présentent des plis muqueux (10) et sont bordées par un épithélium cilié cylindrique dépourvu de cellules caliciformes. Ces bronchioles sont entourées par une fine couche de lamina propria, un muscle lisse (11) et une adventice.

Les bronchioles respiratoires (12, 22) sont directement reliées aux canaux alvéolaires (13, 20) et aux alvéoles (23). Les bronchioles respiratoires (12, 22) sont constituées d'un épithélium cuboïde et cilié dans leur partie proximale. Ces bronchioles sont entourées d'une fine couche de tissu conjonctif soutenant le muscle lisse, des fibres élastiques de la lamina propria et des vaisseaux sanguins (21). Les alvéoles (12) des parois des bronchioles respiratoires (12, 22) se présentent sous forme de petites évaginations ou out-pockets.

Chaque bronchiole respiratoire (12, 22) se divise en plusieurs canaux alvéolaires (13, 20). Les parois de ces canaux sont garnies d'alvéoles (23) qui débouchent directement dans le canal alvéolaire. Les amas d'alvéoles (23) qui entourent et s'ouvrent dans les canaux alvéolaires (13, 20) sont appelés sacs alvéolaires (24).

La veine (9) et l'artère pulmonaire (9) accompagnent les bronches et les bronchioles dans le poumon. Des petits vaisseaux sanguins sont également observés dans les trabécules du tissu conjonctif (25) qui sépare les poumons en différents segments.

Les poumons sont entourés d'une séreuse (14) ou plèvre viscérale. Cette plèvre (14) se compose d'une fine couche de tissu conjonctif pleural (14a) et d'une simple couche squameuse de mésothélium pleural (14b).

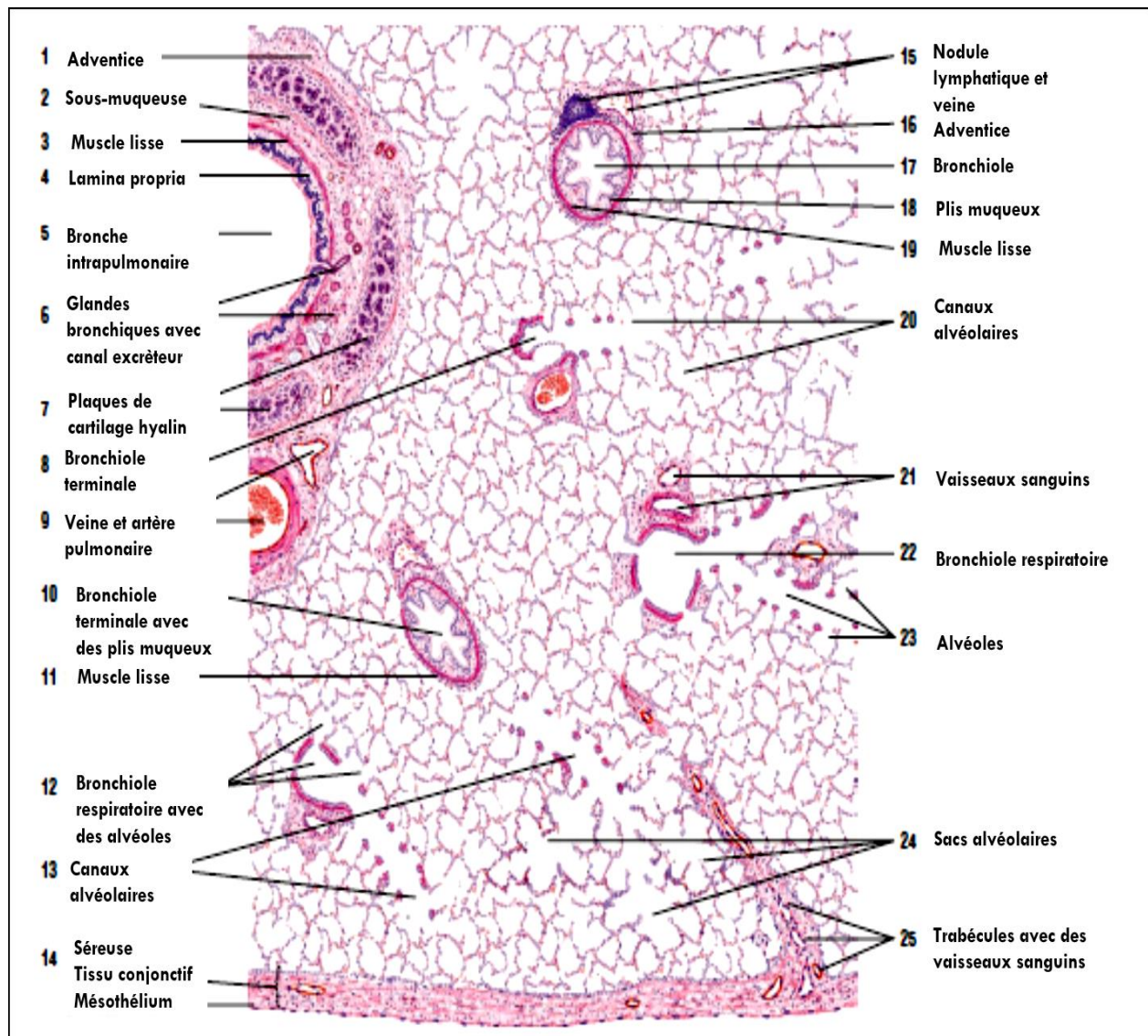


Figure 8 : Schéma d'une coupe histologique de poumon. Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).

3.4. Fonctions physiologiques du poumon

La principale fonction des poumons est la *respiration*. Cependant, les poumons remplissent d'autres fonctions métaboliques. Ils transforment par exemple l'angiotensine I en angiotensine II et éliminent certaines molécules (comme la sérotonine) du compartiment sanguin. La circulation pulmonaire joue en outre un rôle de tampon pour le volume sanguin et intercepte les petits caillots dans le sang veineux avant que ceux-ci ne causent des dégâts dans les voies artérielles (cœur, cerveau) (Silbernagl *et al.*, 2001).

4. Système nerveux central (SNC)

Le système nerveux des mammifères est divisé en deux parties principales : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC se compose du cerveau et de la moelle épinière. Les composants du SNP, les nerfs crâniens et rachidiens, sont situés à l'extérieur du SNC (Eroschenko, 2008).

Le SNC est protégé par un boîtier osseux, constitué du crâne et de la colonne vertébrale, ainsi que par les méninges, une gaine de tissu conjonctif à trois couches (Gartner, 2018) :

- La méninge la plus externe est la dure-mère fibreuse épaisse.
- L'arachnoïde, une gaine de tissu conjonctif non vasculaire, se trouve profondément dans la dure-mère.
- La pie-mère, une gaine vasculaire la plus interne, est le revêtement le plus intime du SNC.
- Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est situé entre l'arachnoïde et la pie-mère.

4.1. Structure générale du cerveau

Le cerveau est divisé en deux parties : l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche. 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 neurogenèse 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.

4.2. Anatomie et histologie du cortex cérébral

Les différents types de cellules qui constituent la matière grise du cortex cérébral sont répartis en six couches, avec un ou plusieurs types de cellules prédominant dans chaque couche. Les axones horizontaux et radiaux associés aux cellules neuronales dans les différentes couches donnent au cortex cérébral un aspect stratifié. Les différentes couches sont marquées avec des chiffres romains sur le côté droit de la **Figure 9**.

La couche la plus superficielle du cortex est la couche moléculaire (I), cette couche est recouverte par la pie-mère (1). La partie périphérique de la couche moléculaire (I) est composée principalement par des cellules neurogliales (2) et des cellules horizontales de *Cajal*. La couche granulaire externe (II) contient principalement différents types de cellules neurogliales et des cellules pyramidales de petite taille (3). Les dendrites apicales des cellules pyramidales (4, 7) sont dirigées vers la périphérie du cortex, tandis que leurs axones s'étendent à partir de leurs bases cellulaires.

La couche pyramidale externe (III) est composée principalement par les cellules pyramidales de taille moyenne (5). La couche granulaire interne (IV) est une couche mince et contient principalement de petites cellules granulaires (6), des cellules pyramidales et différentes cellules neurogliales qui forment des connexions complexes avec les cellules pyramidales. La couche pyramidale interne (V) contient de nombreuses cellules neurogliales et des cellules pyramidales de grande taille (8), en particulier dans la zone motrice du cortex cérébral. La couche la plus profonde est la couche multiforme (VI). Cette couche est adjacente à la substance blanche (10) du cortex cérébral. La couche multiforme (VI) contient des cellules mélangées de différentes formes et tailles, telles que les cellules fusiformes, les cellules granulaires, les cellules étoilées et les cellules de Martinotti. Des paquets d'axones (9) entrent et sortent de la substance blanche (10).

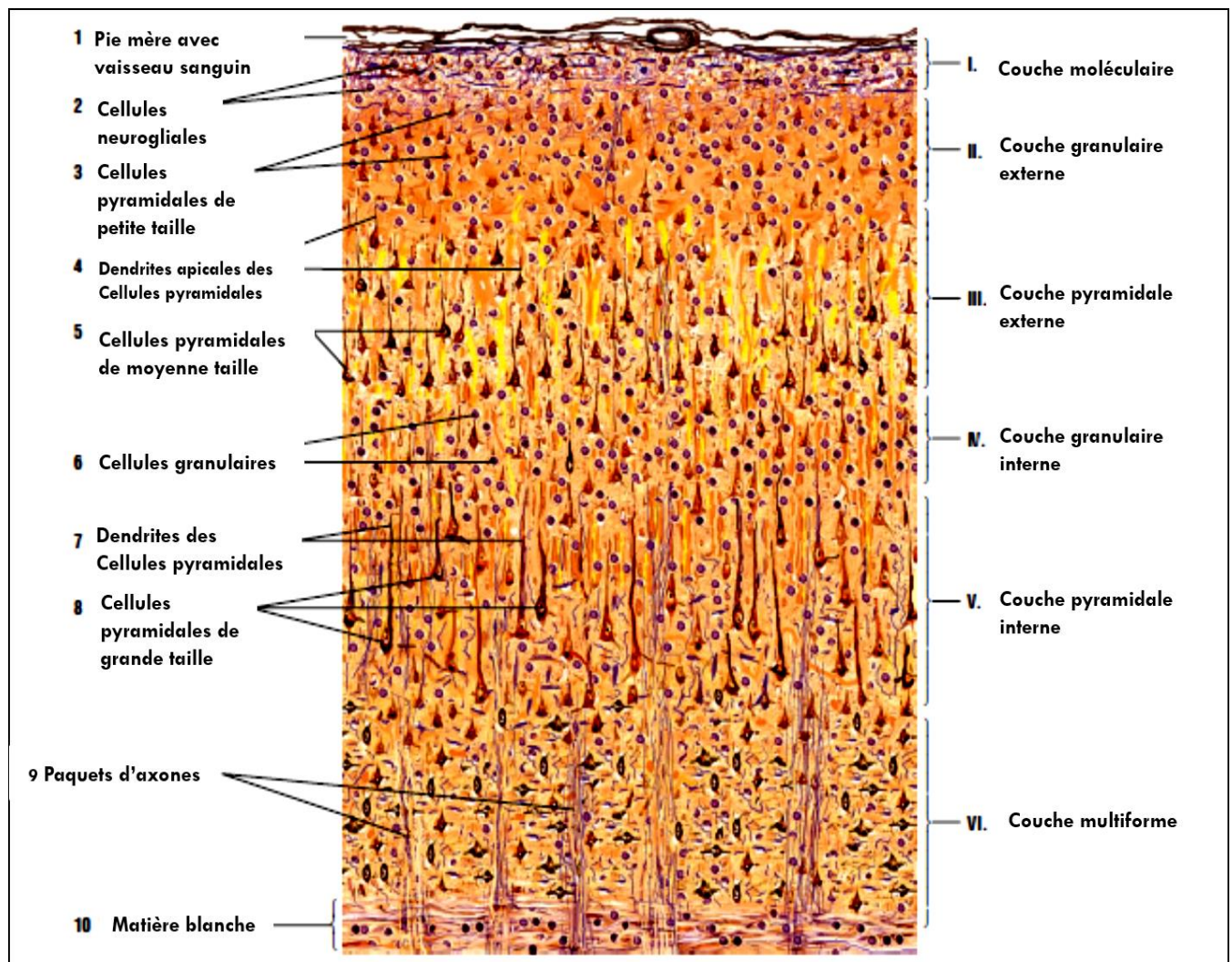


Figure 9 : Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise). Imprégnation argentique, faible grossissement (Eroschenko, 2008).

4.3. Anatomie et histologie de l'hippocampe

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite formation allongée, 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 limbique. 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 d'U inversé, le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA), subdivisée-elle même en quatre régions (CA1, CA2, CA3 et CA4) (**Figure 10**).

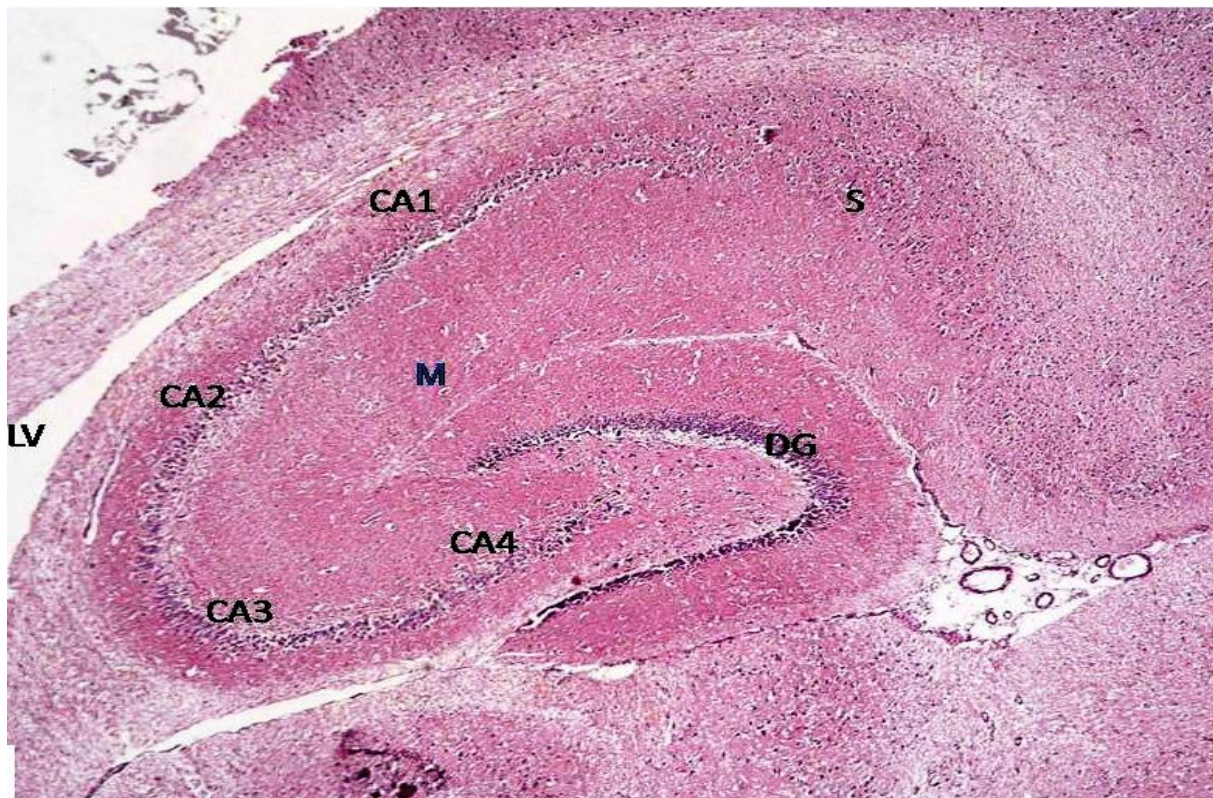


Figure 10 : Coupe histologique de l'hippocampe chez le rat. Hémalun-éosine, Gx40 ([Amin et al., 2013](#)).

CA1, CA2, CA3 & CA4 : les quatre régions de corne d'ammon, DG : gyrus denté
S : subiculum, LV : ventricule latéral, M : couche moléculaire.

5. MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE

5.1. Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

Pour évaluer l'état du foie, un examen complet doit être mis en place, il comporte des tests biochimiques (enzymatiques et protéines plasmatiques) et histologiques ([Rajender et Faust, 2006](#)). Les paramètres biochimiques et fonctionnels utilisés dans l'évaluation de la fonction hépatique sont :

ALAT : Alanine Amino-Transférase, est une enzyme produite par les hépatocytes. Le taux plasmatique d'ALAT augmente lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus supérieur qu'à la normale. Les élévations sont souvent exprimées en nombre de fois la normale.

ASAT : Aspartate Amino-Transférase, est une autre enzyme liée aux cellules parenchymateuses du foie. Son taux est élevé lors des hépatites aiguës, mais elle est présente également dans les hématies ainsi que dans les muscles cardiaques et squelettiques ; ce qui diminue sa spécificité au foie.

γ -GT : Gamma glutamyltranspeptidase, est une enzyme spécifique du foie, et représente un biomarqueur plus sensible, pour les troubles cholestatiques. Les taux de cette enzyme peuvent être élevés, même légèrement, suite à un dysfonctionnement hépatique sub-clinique.

Glycémie : La propriété glucogénique du foie est habituellement la dernière fonction qui pourrait être perdue suite à un dysfonctionnement hépatique ([Djerrou, 2011](#)).

5.2. Marqueurs biochimiques de la fonction rénale

Les anomalies touchant le rein peuvent entraîner des atteintes spécifiques de la fonction glomérulaire et rarement de la fonction tubulaire. La fonction principale de glomérule est de filtrer l'eau et les composés de faible poids moléculaire du sang. Tandis que les molécules de hauts poids moléculaires sont retenues ([Marshall et al., 2005](#)).

Actuellement, les concentrations plasmiqes d'urée et de créatinine sont les marqueurs les plus utilisés pour déterminer l'état de la fonction glomérulaire du rein, malgré leur faible sensibilité et de spécificité ([Omshi et al., 2018](#)).

5.3. Marqueurs biochimiques du bilan lipidique

Les principaux lipides du plasma sont : les acides gras, les triglycérides (TG), le cholestérol et les phospholipides. Des concentrations plasmatiques élevées en lipides, particulièrement en cholestérol, sont associées par un lien de causalité à la pathogenèse de l'athérosclérose qui est responsable de la plupart des maladies cardiovasculaires (MCV ; maladies coronariennes, cérébrovasculaires et vasculaire périphériques) (Marshall *et al.*, 2005).

➤ Structure des lipoprotéines

Les lipides sont des molécules insolubles dans les compartiments biologiques aqueux, ils sont transportés à travers les différents milieux extracellulaires de l'organisme par l'intermédiaire des complexes solubles comportant une partie protéique et lipidique : les lipoprotéines.

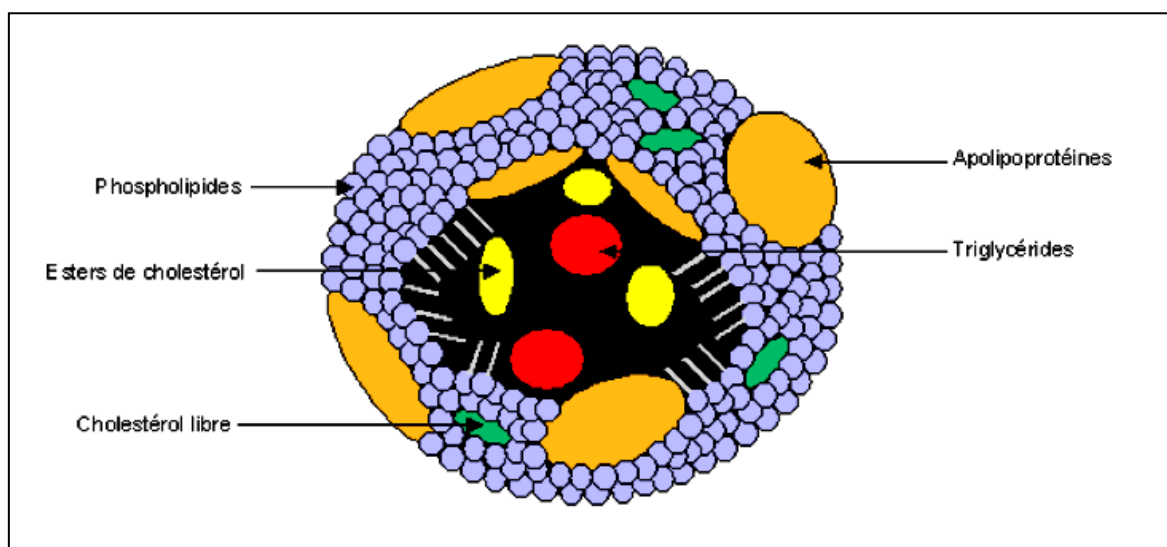


Figure 11 : Représentation de la composition d'une lipoprotéine (Heuillet, 2013).

La structure de ses lipoprotéines est sphérique dans laquelle le noyau est constitué de lipides (TG et esters de cholestérol) entourée par une couche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 11).

➤ Classification et composition des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité, leur taille et leur composition en cinq types (Heuillet, 2013). Leur densité augmente des chylomicrons (la plus basse densité ; CM) en passant par les lipoprotéines de très basse densité (very low density lipoprotein ; VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (intermediate density

lipoprotein ; IDL) et de basse densité (low density lipoprotein ; LDL), jusqu'aux lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein ; HDL) (**Figure 12**).

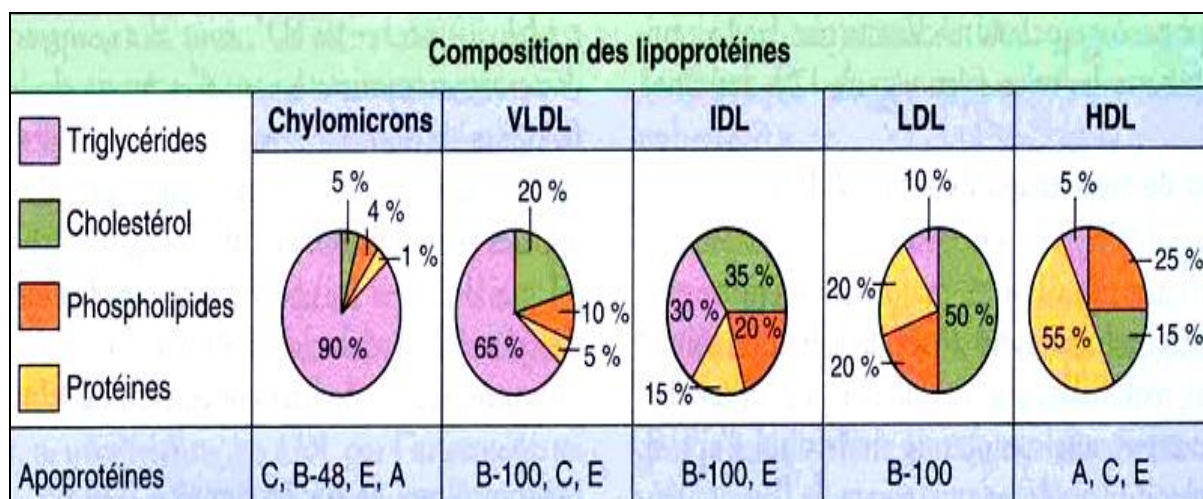


Figure 12 : Composition des lipoprotéines ([Marshall et al., 2005](#)).

➤ Métabolisme des lipoprotéines

Lorsqu'on considère le métabolisme des lipoprotéines, il est classique de différencier trois voies de transport des lipides. La première est la voie entéro-hépatique, qui concerne le transport et la distribution des lipides absorbés par l'intestin via les CM, vers le foie et les tissus périphériques. La deuxième voie est celle du transport centrifuge des lipides via la cascade VLDL-IDL-LDL, du foie vers les tissus périphériques. Enfin, la troisième voie est celle du transport reverse qui correspond au retour du cholestérol en excès, via les HDL, des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé dans la bile et les fèces (**Figure 13**).

➤ Biomarqueurs du bilan lipidique

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les MCV représentent la principale cause de décès dans le monde, ce qui représente 30% de tous ces décès ([Martínez-Fernández et al., 2015](#)). La dyslipidémie, y compris un taux sérique élevé du cholestérol total (CT) et/ou de cholestérol des LDL (LDL-C) et/ou un taux sérique bas de cholestérol des HDL (HDL-C), est un facteur de risque majeur d'athérosclérose. En plus de l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie (un taux élevé de TG) peut être un autre biomarqueur de MCV ([Króliczewska et al., 2018](#)).

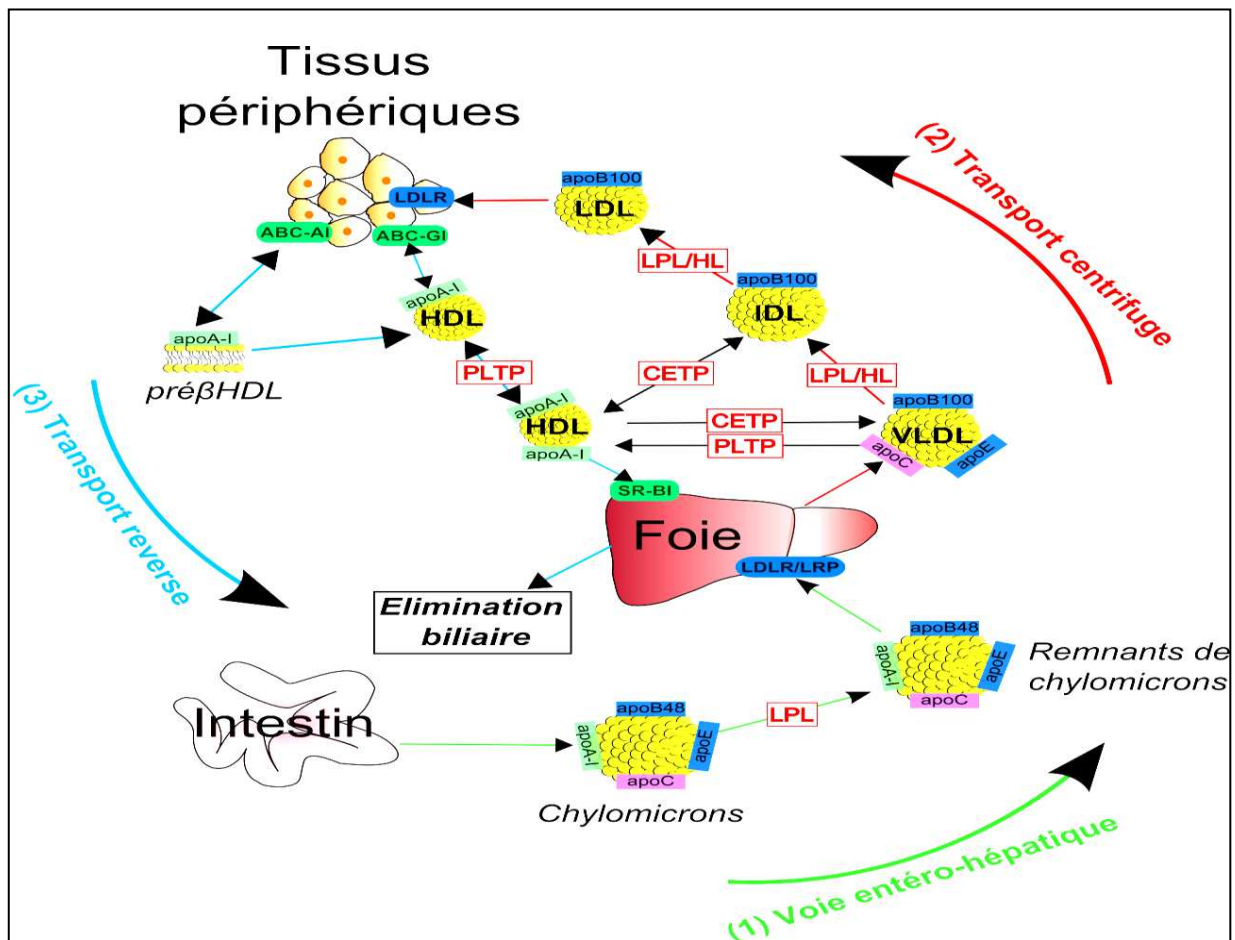


Figure 13 : Métabolisme des lipoprotéines (Heuillet, 2013).

- (1) Le cholestérol et les acides gras alimentaires absorbés sont incorporés dans les CM. La lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les TG des CM. Les remnants de CM formés sont captés par le foie.
- (2) Le cholestérol est apporté aux tissus périphériques via la voie de transport centrifuge. Les hépatocytes synthétisent puis sécrètent les VLDL riches en TG. La LPL et la HL hydrolysent une partie des TG contenues dans les VLDL les transformant en IDL puis LDL. Les VLDL, IDL et LDL sont reconnues grâce l'interaction entre l'apoB100 (LDL) ou l'apoE (VLDL/IDL) et les récepteurs de la famille LDLR des cellules périphériques.
- (3) Le cholestérol excédentaire présent dans les tissus périphériques est transporté vers le foie via la voie de transport reverse du cholestérol. Les pré-βHDL (ou HDL naissantes) interagissent avec les récepteurs ABC-A1 et ABC-G1 de la famille ATP-binding cassette puis se chargent en cholestérol. Les HDL subissent alors un remodelage par la PLTP et la CETP avant d'être captées par le foie via le récepteur SR-BI de la famille des scavenger receptors.

CHAPITRE 2
MEDICAMENTS
ANTIPARASITAIRES
& IVERMECTINE

CHAPITRE 2

MEDICAMENTS ANTIPARASITAIRES & IVERMECTINE

Généralités

Les antiparasitaires sont des médicaments qui réduisent la charge parasitaire à un niveau tolérable en tuant les parasites ou en inhibant leur croissance. L'antiparasitaire idéal a un large index thérapeutique (c.-à-d. Que la dose toxique est au moins trois fois la dose thérapeutique), il est efficace après une dose unique, facile à administrer, peu coûteux et ne laisse pas de résidus (une considération importante aux animaux de rente) (Walter, 2008).

En 2009, Les antiparasitaires, toutes espèces confondues, représentent le segment le plus important (28%) du marché mondial des médicaments vétérinaires (Figure 14).

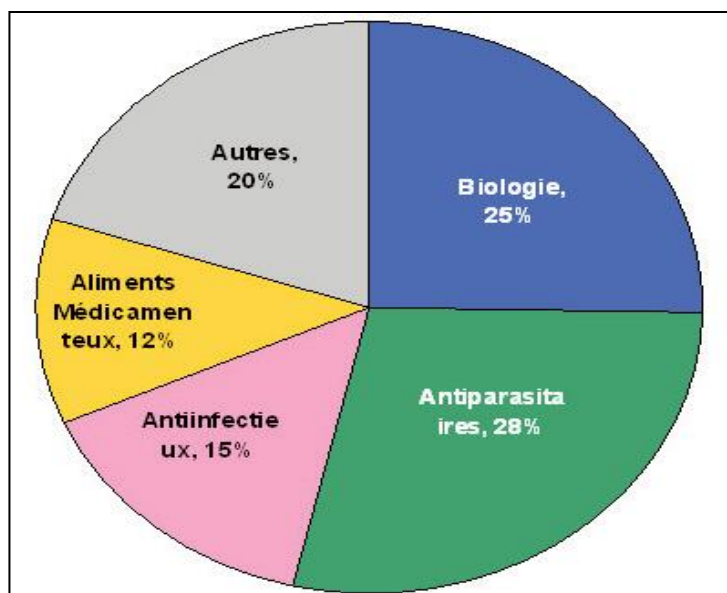


Figure 14 : Structure du marché mondial du médicament vétérinaire en 2009, en fonction des produits (Crosia, 2011).

Cette utilisation accrue des médicaments antiparasitaires constitue un risque majeur pour la santé animale et humaine. Ce risque est une conséquence d'une accumulation des résidus dans les différentes matrices biologiques, d'une résistance parasitaire possible liée à l'utilisation fréquente et anarchique de ces produits et/ou d'une toxicité élevée pour l'environnement.

Actuellement, l'utilisation des médicaments à large spectre et la thérapie combinée sont très utiles pour augmenter l'efficacité des antiparasitaires. Parmi ces produits, on

distingue une famille thérapeutique très efficace à faible dose et de faible toxicité, les lactones macrocycliques.

1. Lactones macrocycliques et Avermectines

1.1. Lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques (LMs) représentent une famille des médicaments antiparasitaires largement utilisés pour la lutte contre plusieurs parasites. Ils sont caractérisés par une marge de sécurité élevée. Les LMs sont des produits endectocides (activité contre les parasites internes et externes), qui sont utilisés pour la première fois en médecine vétérinaire. Ils ont d'abord été introduits comme agents anthelminthiques et sont actifs contre un large éventail de nématodes.

Cependant, ils sont également actifs contre un certain nombre d'arthropodes parasites des bovins et des ovins. Leur utilisation a été plus tard élargie à la thérapeutique humaine. Ils peuvent être administrés par voie orale, par injection sous-cutanée ou sous forme des formulations pour-on pour application topique (Marrs, 2012).

1.1.1. Classification

Les LMs sont des produits de fermentation d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. Les espèces *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces cyaneogriseus* produisent de nombreux composés au cours de leur croissance, qui se divisent en deux familles (Figure 15) : les avermectines et les milbémycines (Kiki-Mvouaka et al., 2010).

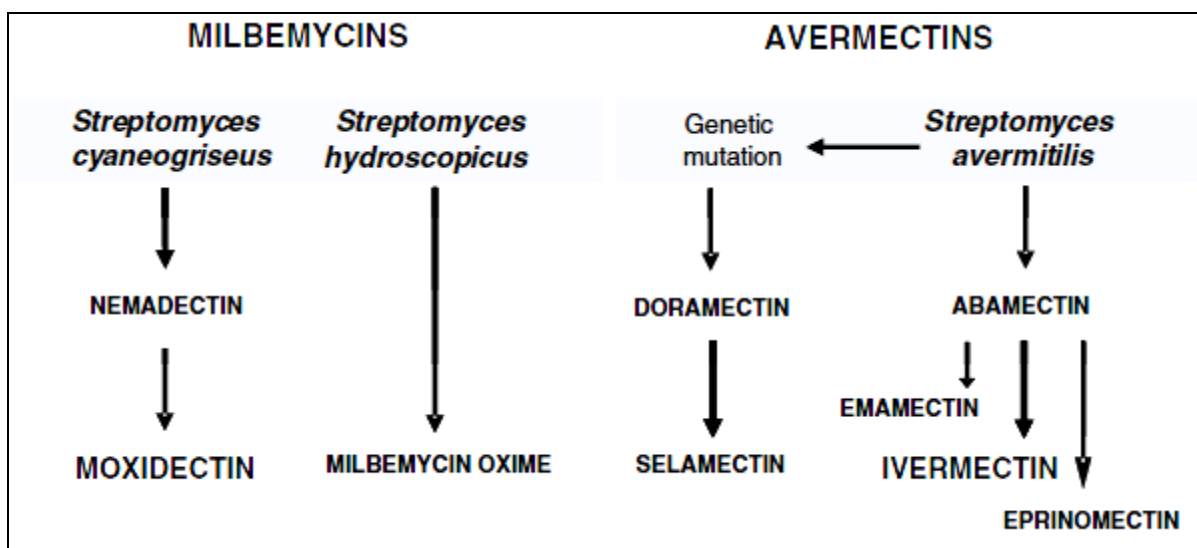


Figure 15 : Filiations schématisques des lactones macrocycliques : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques (Pitchard et al., 2012).

2. Avermectines

2.1. Propriétés générales

Le terme avermectines (AVMs) signifie : *a* : anti, *ver*m : ver, *ect* : ectoparasites et *in* : produit pharmaceutique. L'innovation découle de la capacité des composés de cette famille à traiter et a éliminé les endoparasites et ectoparasites (Burg *et al.*, 1979 ; McKellar et Benchaoui, 1996).

Les AVMs sont une classe de substances antiparasitaires (anthelminthiques) utilisées à grande échelle pour lutter contre les ectoparasites et les endoparasites chez l'homme, les animaux de rente, les animaux domestiques, ainsi que les ectoparasites chez les poissons d'aquaculture. La puissance et l'efficacité des AVMs pour lutter contre une grande variété de parasites les ont propulsées au premier rang des anthelminthiques.

Les AVMs se produisent naturellement en tant que produit de fermentation de *Streptomyces avermitilis*, un actinomycète isolé du sol. Huit structures différentes ont été isolées et divisées en quatre composés majeurs (A1a, A2a, B1a et B2a) et quatre composés mineurs (A1b, A2b, B1b et B2b) (Shoop *et al.*, 1995).

Ce groupe d'AVMs comprend principalement l'abamectine et le benzoate d'émamectine, qui sont utilisés comme insecticides, et l'ivermectine (IVM), qui est largement utilisé comme un médicament antiparasitaire en médecine vétérinaire et humaine (Krieger, 2010).

2.2. Dérivés des avermectines

La famille des AVMs comporte 6 molécules : l'abamectine, l'émamectine, l'IVM, la doramectine, l'eprinomectine et la selamectine. Le mélange d'avermectine B1a (> 90 %) et d'avermectine B1b (< 10 %) constitue l'abamectine. L'IVM, qui est la molécule star de cette famille, est une molécule semi-synthétique. La doramectine, l'eprinomectine et la selamectine sont trois molécules biosynthétiques (Albérich, 2014).

3. Médicament ciblé par l'étude « Ivermectine »

L'IVM est commercialisée pour la première fois pour l'usage animal en 1981 par les laboratoires MERIAL sous la forme d'IVOMEC Bovin®. Puis elle obtient son autorisation de mise sur le marché (AMM) en médecine humaine en 1999 sous forme de comprimés STROMEKTOL® par les laboratoires MSD (Carrere, 2016).

3.1. Structure chimique

Les avermectines sont produites sous forme d'un mélange de 8 composés : A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a et B2b (Figure 16) où :

A : groupe méthoxy en 5 (CH₃)

B : groupe hydroxy en 5 (OH)

- 1 : double liaison entre 22 et 23

- 2 : pas de double liaison entre 22 et 23 et un OH en 23

- a : une chaîne secondaire butyle en 25

- b : une chaîne isopropyle en 25

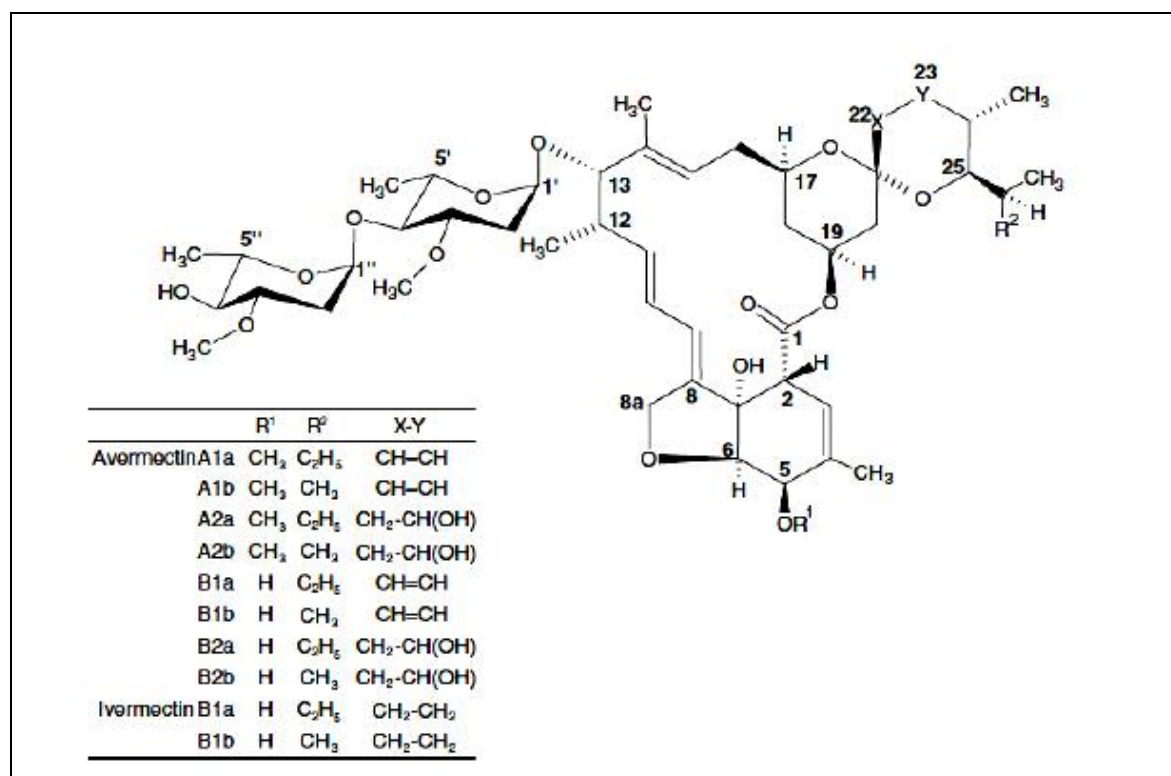


Figure 16 : structure chimique des avermectines (Fischer et Mrozik, 2012).

L'IVM a été obtenue par hydrogénation sélective de la double liaison C 22-23, d'où son nom chimique : 22,23-dihydro-avermectine B1 (Figure 17). Elle est précisément formée de deux composés homologues et contient au moins 80% de 22,23- dihydro-avermectine B1a

et plus de 20% de 22,23-dihydro-avermectine B1b. ces deux composés sont inséparables et possèdent une activité quasi identique.

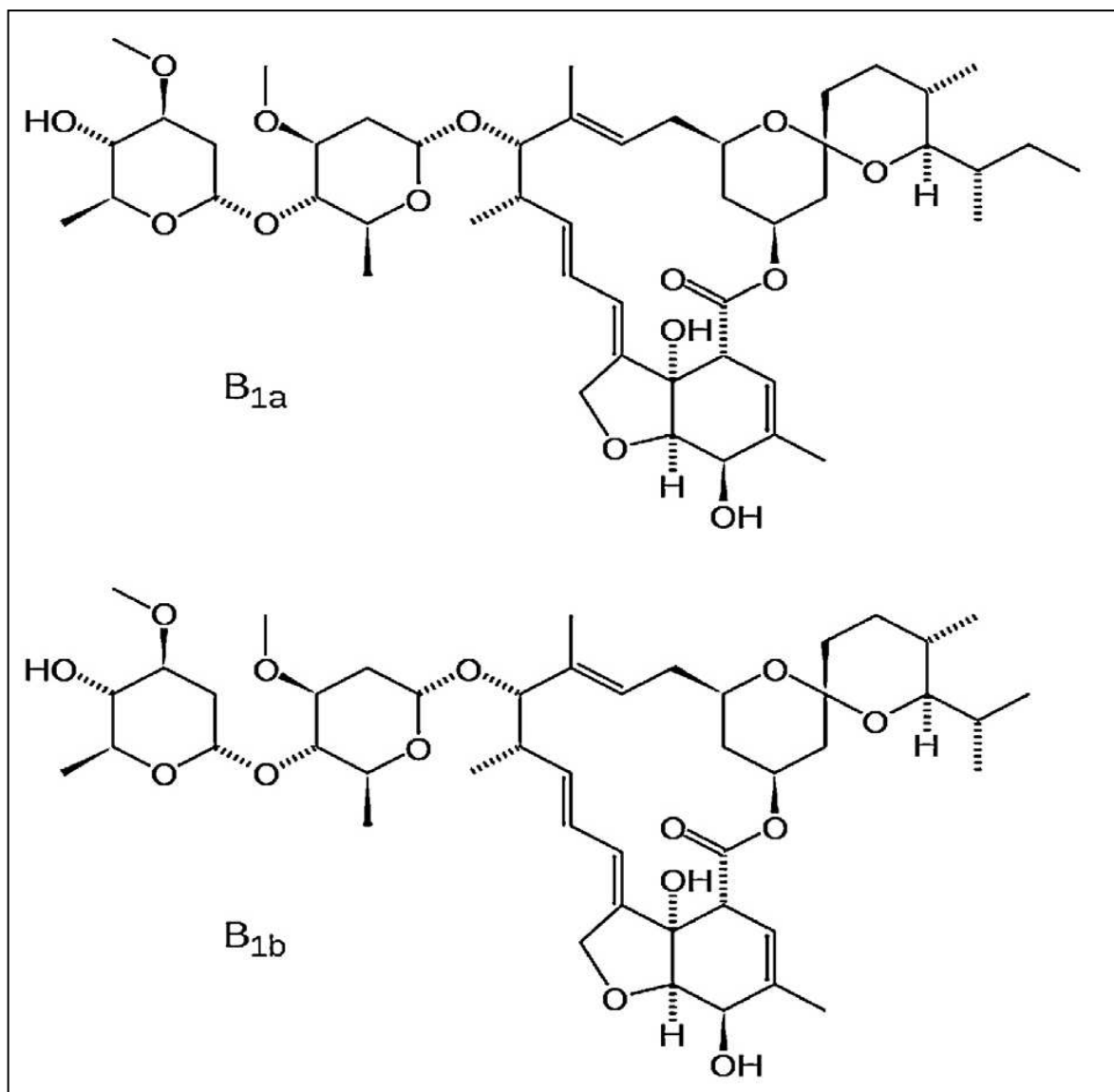


Figure 17 : Structure chimique de l'ivermectine (Bruyère *et al.*, 2013).

3.2. Propriétés physico-chimiques

À l'état pur, l'IVM se présente sous forme d'une poudre cristalline, non hygroscopique, de couleur blanche-jaune (Pharmacopée Européenne, 1996).

C'est un produit lipophile insoluble dans l'eau mais soluble dans la plupart des solvants organiques comme le méthanol et l'éthanol à 95°. Sa masse molaire est de 875,10 g/mol et son point de fusion se situe autour de 150°C. Elle est dégradée par la lumière solaire, une exposition aux ultra-violets isomérisse les doubles liaisons (Gonzalez-Canga *et al.*, 2009).

3.3. Propriétés Pharmacologiques

3.3.1. Mécanisme d'action

L'IVM possède une activité neurotoxique sur les différents parasites internes et externes. Après pénétration dans l'organisme, l'IVM se fixe sur la sous-unité α des canaux chlorure glutamate-dépendants des cellules nerveuses et musculaires du parasite. Ceci entraîne une ouverture de ces canaux, ils deviennent perméables aux ions chlorures entraînant une hyperpolarisation, une paralysie musculaire flasque et un blocage de la transmission nerveuse (**Figure 18**).

Alors que les canaux chlorure glutamate-dépendants semblent être la cible principale, l'IVM interagit également avec d'autres canaux chlorure ligand-dépendants, tels que les canaux d'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Contrairement aux canaux chlorure glutamate-dépendants, les canaux GABA sont présents dans le SNC des vertébrés mais l'affinité de l'IVM pour les sites de liaison chez les invertébrés est environ 100 fois supérieure à celle observée chez les vertébrés. De plus, Ainsi, les vertébrés sont protégés des effets neurotoxiques de l'IVM par la barrière hémato-encéphalique, qui est médiée par la P glycoprotéine (P-gp). Cette barrière explique la grande marge de sécurité (ou index thérapeutique) de l'IVM chez animaux vertébrés ([Grayson et al., 2017](#)).

La P-gp est un transporteur d'efflux-ATP dépendant et qui a été initialement découvert par sa capacité à conférer une résistance à plusieurs médicaments dans les cellules tumorales des mammifères ([Juliano et Ling, 1976](#)). Elle est codé par le gène de résistance multiple aux médicaments ou Multi Drug Resistance (MDR1).

La P-gp est fortement exprimée au niveau de la barrière hémato-encéphalique où elle limite l'entrée de nombreux médicaments et xénobiotiques dans le SNC. De plus, la P-gp protège l'organisme en limitant l'absorption de ces composés par le tractus gastro-intestinal et en favorisant leur excrétion dans le foie, les reins et l'intestin ([Fromm, 2000](#)).

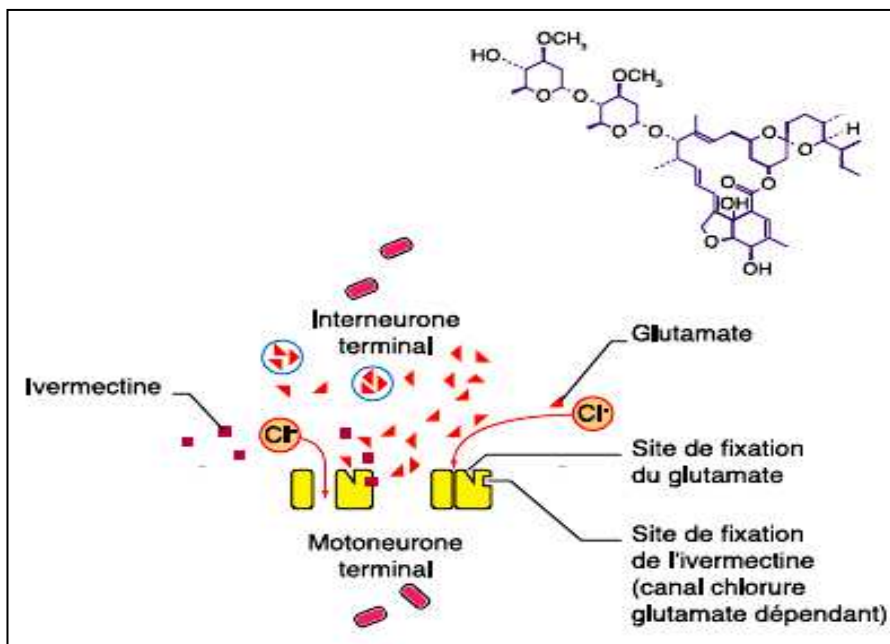


Figure 18 : Schéma représentant le mécanisme d'action de l'IVM sur les canaux chlorures glutamate-dépendants chez les invertébrés (Bruyère *et al.*, 2013).

3.3.2. Effets pharmacologiques

L'IVM est utilisée dans une large variété d'animaux pour lutter contre les parasites internes et externes. Elle est utilisée à différentes doses comme traitement préventif du ver cardiaque, traitement des ectoparasites et microfilaricide (Papich, 2015).

En médecine humaine, l'IVM a été très efficace dans le traitement de l'onchocercose (Crump et Omura, 2011), la strongyloïdose, la gale, la gnathostomiase, la pédiculose, la myiase, la leishmaniose (Dos Santos *et al.*, 2009; Geary, 2005), des poux de tête des enfants et de la gale (Bockarie *et al.*, 2000), elle s'est également avérée efficace contre le paludisme et son vecteur (Azevedo *et al.*, 2019 ; Mekuriaw *et al.*, 2019) et la rosacée papulopustuleuse (De Ménonville *et al.*, 2017).

De plus, l'utilisation de l'IVM dans un modèle de souris était associée à une diminution de la consommation d'alcool (Yardley *et al.*, 2012). L'activité anticancéreuse et antivirale de l'IVM sont bien connues. Ainsi, récemment, l'IVM s'est avérée avoir un effet anticancéreux sur le cancer du côlon humain et le carcinome du poumon (Diao *et al.*, 2019). Compte tenu de la pandémie généralisée de **COVID-19** causée par le coronavirus 2 (SARS-CoV-2), les chercheurs s'efforcent constamment de trouver un médicament approprié pour traiter cette maladie. Gonçalves *et al.* (2020) a conclu à partir de l'examen de nombreux travaux réalisés que l'IVM est capable d'inhiber la réplication virale du SRAS-CoV-2 (Caly *et al.*, 2020).

3.3.3. Formes galéniques

Il existe un grand degré de flexibilité dans la formulation de l'ivermectine. Par exemple, l'IVM est disponible sous forme de comprimé à usage humain (Mectizan®) ou de produit à croquer pour les chiens (par exemple, Heartgard®). De solution orale pour l'homme (Stromectol®) et de trempage pour les petits ruminants (par exemple, Ivomec® Drench). De solution injectable (par exemple, Ivomec® Injection pour bovins et porcs), y compris les formulations injectables à action prolongée disponibles dans certains marchés (par exemple, Ivomec Gold®). De forme pour-on (Ivomec® Pour-on) et de forme bolus à action prolongée pour le bétail et de pâtes pour les chevaux (par exemple, Eqvalan®) (Prichard *et al.*, 2012).

3.3.4. Les génériques de l'ivermectine homologués dans le marché national des médicaments vétérinaires

En Algérie, plusieurs génériques ont été utilisés en médecine vétérinaire pour le traitement et la prévention des maladies parasitaires causées par des endo ou ectoparasites (Tableau 1, Synthèse originale).

Tableau 1 : liste des différentes formulations d'IVM à usage vétérinaire enregistrées en Algérie (MADRP, 2018)

Nom commercial	Forme pharmaceutique	Présentation	Laboratoire
ALVOMECH F	Solution injectable	Flacons de 20ml, 50 ml et 100 ml	AAHP
ALVOMECH 1%	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	AAHP
IVEEN	Solution injectable	Flacons de 50 ml et 100 ml	ADWIA
IVOSPEIN 1%	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	ASPI
AVIMECH	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	AVICO
AVIMECH LIQUID	Solution orale	Flacon de 500 ml. Flacon de 1 litre.	AVICO
BAYMECH 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 200 ml Boîte d'un flacon de 50 ml	BAYER
BIMECTIN injection	Solution injectable	Flacons de 50ml, 100 ml et 250 ml	BIMEDA
IVERTIN	Solution injectable	Flacons de 50 ml et 100 ml	CALIER
IVERMECTINE 1 % EAF	Solution injectable	Flacon de 50 ml Flacon de 200 ml Flacon de 250 ml	CEVA
IVODAD 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml flacon de 100 ml	DADVET
IVERIPRA-I	Solution injectable	Flacons de 50ml et 500 ml	HIPRA
PANDEX 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml Boîte d'un flacon de 10 ml	HUVEPHARM A
PROMECHTINE	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml Boîte d'un flacon de 100 ml Boîte d'un flacon de 250 ml Boîte d'un flacon de 500 ml	INVESA
EQVALAN PÂTE	Pâte orale	seringue de 6,42 g de pâte	MERIAL
IVOMECH injectable	Solution injectable	Flacons de 50ml, 100 ml et 250 ml	MERIAL
IVOMECH liquide	Solution orale	Bidon de 1L et de 5L	MERIAL
IVERMIC	Solution injectable	Flacons de 50 ml, 100 ml et 250 ml	MICROSULES URUGUAY
IVERMIC 3,15% Prémium	Solution injectable	Flacon de 50 ml	MICROSULES URUGUAY
TECTIN	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 100 ml Boîte d'un flacon de 50 ml	MOBEDCO
NOROMECHTIN MULTI INJECTION	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml	NORBROOK
NOROMECHTIN DRENCH	Solution buvable	Jerricans de 1L, 2,5 L, et 5L	NORBROOK
ZOOMECHTIN	Solution injectable	Flacons de 10 ml, 50 ml et 100 ml	SYVA

Nom commercial	Forme pharmaceutique	Présentation	Laboratoire
ZOOMECTIN	Solution buvable	Flacon en polypropylène de 250 ml, flacon en polypropylène de 10 ml, flacon en polypropylène de 50 ml et flacon en polypropylène de 100 ml.	SYVA
FRONTEIRA	Solution injectable	Flacon de 10 ml , flacon de 25 ml , falcon de 50 ml ,flacon de 100 ml , flacon de 250 ml , flacon de 500 ml	VABRIELLA
IVORAL	Solution orale	Flacon de 500 ml Flacon de 1 litre	VETOPHARM PRO
IVECTIN1%	Solution injectable	Flacon de 50 ml Flacon de 200 ml	VETOPHARM PRO
BIOMECTIN 1%	Solution injectable	Boite d'un flacon de 50 ml	VETOQUINOL
VIRBAMEC	Solution injectable	Flacons de 10 ml, 50 ml et 200 ml	VIRBAC
VIRBAMEC pour-on	Solution pour-on	Flacon de 500 ml + doseur Flacon de 1 litre + doseur Flacon de 2,5 litres + bec Flacon de 5 litres + bec	VIRBAC

(Tableau 1). Suite

3.4. Propriétés Pharmacocinétiques

La pharmacocinétique permet d'étudier le devenir d'un médicament à partir de son site d'administration à son site d'élimination dans l'organisme. Il en existe une très grande variabilité entre les espèces et les individus d'une même espèce en fonction notamment de l'âge et de l'état général ([Gonzalez-Canga et al., 2009](#)).

3.4.1. Absorption et la distribution

La pharmacocinétique de l'IVM est conditionnée par ses caractères physico-chimiques tels que la polarité et le caractère lipophile. Puisque l'IVM est un médicament lipophile, elle est caractérisée par une bonne absorption, une forte distribution et une longue rémanence dans l'organisme ([Hennessy et Alvinerie, 2002](#)).

La voie d'administration et la forme pharmaceutique de l'IVM influencent son absorption. Beaucoup d'études mettent en évidence une meilleure biodisponibilité des LMs lorsqu'elles sont administrées par voies sous-cutanées ([Gonzalez-Canga et al., 2009](#)).

La biodisponibilité de l'IVM augmente de façon proportionnelle à la dose administrée. Une concentration plasmatique maximale survient 6 à 12 heures après administration de la dose initiale, suggérant un recyclage entérohépatique. La liaison aux protéines plasmatiques

est de 93%, principalement à l'albumine (Klotz *et al.*, 1990). Puisqu'il s'agit d'un médicament hautement lipophile, l'IVM est largement distribuée dans tout le corps, y compris le tissu adipeux et la peau. Comme prévu, les taux les plus élevés ont été trouvés dans le tissu adipeux et une faible accumulation dans le cerveau en raison de l'action du transporteur d'efflux, P-gp, dans la barrière hémato-encéphalique (Edwards, 2003). Le volume de distribution dans le compartiment central a été mesuré à 3,5 l/kg après une administration orale de 12 mg d'IVM (Krishna et Klotz, 1993).

3.4.2. Métabolisme

On observe un métabolisme principalement hépatique par le cytochrome P450 3A4 en une dizaine de métabolites. Une augmentation secondaire des concentrations plasmatiques, 6 à 12 heures après la prise orale, est possible suite au cycle entéro-hépatique. La demi-vie plasmatique est très variable entre 12 et 24 heures pour l'IVM et jusqu'à 3 jours pour ses métabolites (Canga *et al.*, 2009).

3.4.3. Elimination

La demi-vie d'élimination des métabolites de l'IVM est plus longue que celle de la molécule mère, à environ 3 jours. Moins de 1% du médicament est excrété dans l'urine sous forme de 3'-O-déméthyl-22, 23-dihydroavermectine B1a et 23-dihydroavermectine B1a. Le reste est excrété sous forme de métabolites dans les fèces, principalement sous forme de dérivés monosaccharidiques (Gonzalez-Canga *et al.*, 2009).

3.5. Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : rôle majeur de détoxification

Les xénobiotiques sont des molécules de basse masse moléculaire étrangère à l'organisme. Il s'agit par exemple des médicaments, des polluants de l'eau ou de l'atmosphère, des additifs alimentaires mais également de certains composés naturels des aliments (Beaune et Loriot, 2000).

La membrane cellulaire représente une barrière efficace protégeant la cellule envers les molécules toxiques et des xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, les molécules liposolubles ayant la capacité de franchir facilement la membrane, le cas de l'IVM, peuvent s'accumuler dans la cellule et atteindre immédiatement un seuil de toxicité. (Guéguen *et al.*, 2006), mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telles la P-gp, produit du gène MDR.

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques exercent un rôle central dans les phénomènes de biotransformation, du métabolisme et/ou de la détoxification de ces composés étrangers à l'organisme.

Compte tenu de la grande variété et de la nature imprévisible de la structure chimique de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes (et d'isoenzymes) pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses. Ces EMTX ont été classés selon le schéma de la **Figure 19**.

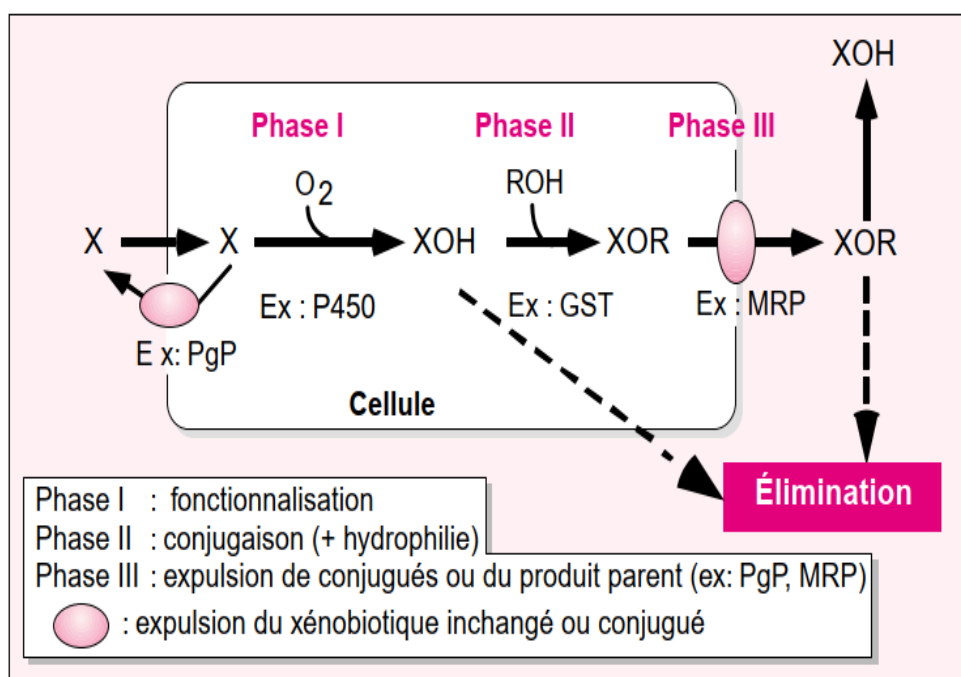


Figure 19 : Schéma du métabolisme des xénobiotiques (Beaune et Lorient, 2000).

Le métabolisme des xénobiotiques se divise en 3 phases qui aboutissent au final à l'élimination des substances étrangères dans la bile et l'urine.

- Les enzymes de la phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse (Destreicher *et al.*, 1999);
- Les enzymes de la phase II (glutathion-s-transférases ou GST, UDP-glucuronosyltransférases...), dites de conjugaison, conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyle, acétyl...), dont la fonction est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, Amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de favoriser son élimination par l'organisme (Rendic *et al.*, 2002);

- Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté via la membrane cellulaire par des protéines de phase III, telles que le transporteur MRP (Multidrug Related Protein) et la P-gp, transportent au travers des membranes des xénobiotiques, et surtout des dérivés conjugués (Gerloff *et al.*, 2004). Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'EMTX (phase IV) (Badawi *et al.*, 1996).

➤ **Cytochrome P 450 et la P-gp**

La protéine P-gp est habituellement associée à la présence de cytochromes P450 et plus spécifiquement du CYP 3A4. Cette liaison présente un intérêt stratégique pour l'excrétion des xénobiotiques, par une activité complémentaire, la P-gp éliminant les produits non métabolisés par le cytochrome P 450. Cette association P-gp-cytochrome P 450 contribue à l'élimination de plusieurs médicaments : les inhibiteurs des canaux calciques, Ciclosporine, Macrolides... (Picard, 2002).

3.6. Effets secondaires

Comme tout médicament, l'IVM a également des effets indésirables, en particulier lorsqu'elle est administrée aléatoirement. L'IVM est bien tolérée et les effets indésirables sont peu fréquents, comme le montre son utilisation continue dans les campagnes de traitement de masse pendant près de 30 ans.

Bien que l'IVM ne traverse normalement pas la barrière hémato-encéphalique chez les vertébrés, des signes et des symptômes de neurotoxicité, notamment des vomissements, une mydriase et une ataxie, ont été signalés durant les études de surdosage de l'IVM chez les animaux et l'homme (Edwards, 2003). Les principaux effets indésirables sont liés à la mort du parasite et à la réaction immunitaire consécutive aux antigènes libérés, ces effets sont appelés les réactions de Mazzotti (Grayson *et al.*, 2017).

3.7. Toxicité

Il a été rapporté que la toxicité liée à l'utilisation de l'IVM est rare et que la plupart des effets secondaires sont souvent transitoires et légers. Aucune toxicité significative n'a été observée après une administration d'IVM jusqu'à dix fois (2 mg/kg) de la dose thérapeutique recommandée (Guzzo *et al.*, 2002), ce qui démontre une large marge de sécurité. Une certaine toxicité observée peut également être causée par l'utilisation d'ivermectine à des fins non

étiquetées. Cependant, un surdosage ou une administration incontrôlée peut entraîner le développement d'une toxicité sévère.

Pour illustrer le rôle des différences espèces dans l'expression du transporteur d'efflux, [Stevens et al. \(2010\)](#) ont étudié l'effet de la barrière placentaire sur l'effet toxique de l'IVM chez les rongeurs. Ils ont conclu que l'utilisation de modèles animaux dans la recherche toxicologique et l'extrapolation à l'homme est nécessaire pour noter la variation de la constitution génétique entre les organismes et entre les animaux et l'homme.

Les principaux effets neurotoxiques de l'IVM observés dans les études animales sur des rats sont l'ataxie, la paresse et le prolapsus, tandis que chez le chien, l'hypersalivation, l'ataxie, la cécité, le coma, les troubles respiratoires, les tremblements, la mydriase, l'anorexie et la mort ([Campbell, 2012 b](#)).

Il a été également noté que les jeunes rats sont sensibles à l'IVM, car des concentrations élevées d'IVM sont trouvées dans le cerveau en raison d'une tendre barrière hémato-méningée et d'un manque de la P-gp. La plupart des chiens qui sont sensibles à la neurotoxicité d'IVM présentent une mutation du gène MDR1 qui conduit à une synthèse incomplète de la P-gp ([Mealey et al., 2001](#)).

Le rôle de la P-gp est critique dans la neurotoxicité potentielle de l'IVM. La P-gp fait partie du composant important de la barrière hémato-méningée et il est important dans le processus par lequel cette barrière régule l'entrée et la sortie des médicaments dans le cerveau.

Par conséquent, toute activité qui régule la fonction de la P-gp peut affecter la concentration d'IVM dans le cerveau, en particulier l'efflux d'IVM du cerveau. Certains des processus qui affectent la fonction de la P-gp comprennent la mutation et l'administration de médicaments qui inhibent sa capacité à transporter des médicaments hors du cerveau ([El-Saber Batiha et al., 2020](#)).

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'antidote spécifique contre la toxicité de l'IVM. Pour cela, le traitement symptomatique reste la meilleure solution pour améliorer la toxicité de l'IVM chez l'homme et l'animal ([Jadhav et Bhikane, 2020](#)).

Actuellement, l'utilisation des antioxydants naturels pour améliorer les différentes altérations induites par les xénobiotiques chez les vertébrés devient un domaine d'intérêt de nombreuses recherches récentes. Parmi les molécules les plus fréquemment étudiées, on distingue les vitamines et les oligoéléments.

CHAPITRE 3
ANTIOXYDANTS
&
VITAMINE C

CHAPITRE 3

ANTIOXYDANTS

&

VITAMINE C

1. Définition des Antioxydants

Le stress oxydatif est un facteur clé de la cytotoxicité induite par les avermectines (Zhu *et al.*, 2013). Par conséquent, l'utilisation d'antioxydants pour améliorer leur toxicité est une approche logique.

Un antioxydant est défini comme une substance qui, additionnée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de retarder ou réprimer le phénomène d'oxydation. Le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets néfastes potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation exagérée (Halliwell, 1999).

Les antioxydants peuvent être classés en fonction de leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine. Il existe différents types de molécules antioxydants, naturelles ou synthétiques, dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non enzymatiques (molécules piègeuses d'électrons). Actuellement, parmi les antioxydants non enzymatiques les plus utilisés, on distingue les vitamines et les oligoéléments (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

2. Définition et classification des vitamines

Les vitamines sont des substances organiques essentielles à l'organisme et sans valeur énergétique propre. Puisque l'homme ne peut pas les produire en quantité suffisante, elles doivent être apportées par l'alimentation. Elles représentent un groupe de produits chimiques très hétérogène.

Le terme « vitamine » vient du latin « vita » qui signifie vie, et du suffixe « amine » ; les chimistes croyant pouvoir classer ce type de substance parmi les amines, ce qui s'avéra faux par la suite. Treize substances répondent à cette définition : vitamine A ou rétinol, vitamine D ou calciférol, vitamine E ou tocophérol, vitamine K, **vitamine C**, vitamine B1 ou thiamine, vitamine B2 ou riboflavine, vitamine B3 ou PP ou niacine, vitamine B5 ou acide

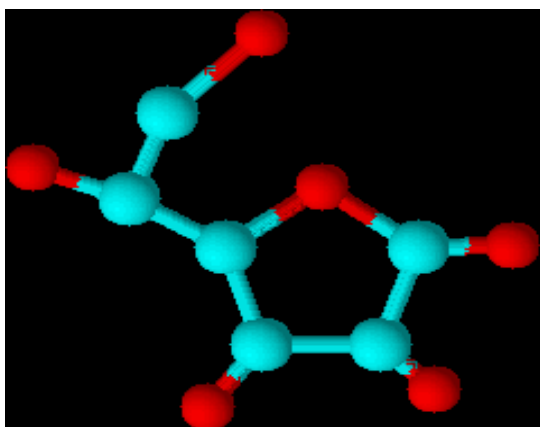
pantothénique, vitamine B6 ou pyridoxine, vitamine B8 ou biotine, vitamine B9 ou acide folique et Vitamine B12 ou cobalamine (Sperte, 2016).

Les vitamines sont divisées selon leur solubilité en deux groupes. On distingue les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B1, B2, B3, B5, B-, B8 B9, B12 et C). Cette différence de solubilité a des impacts sur le métabolisme des vitamines, spécifiquement sur leur absorption et leur stockage (Sperte, 2016).

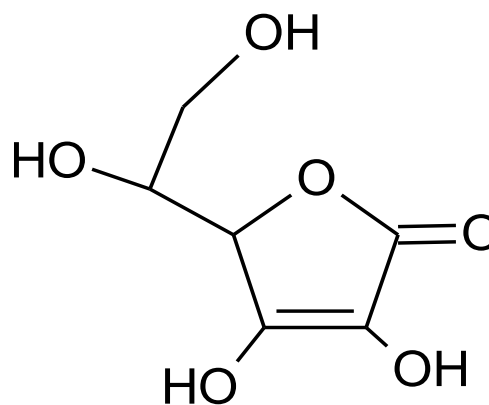
3. Vitamine C ou Acide ascorbique

3.1. Structure chimique

La vitamine C ou acide ascorbique (AA) a été isolée pour la première fois en 1928, par le biochimiste hongrois, Szent Györgyi (Burns, 1959). Son nom chimique est 2,3-didehydro-L-threohexano-1,4-lactone. La structure chimique de l'acide ascorbique (Figure 20) fut établie par Haworth en 1932. Sa formule chimique brute est $C_6H_8O_6$. Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui lie les carbones C_1 et C_4 . Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique, de formule chimique $C_6H_6O_6$ (Figure 21) (Dupin, 1992).



(A)



(B)

Figure 20 : Structure chimique tridimensionnelle (A) et cyclique (B) de la vitamine C (acide ascorbique) (Combs, 2008).

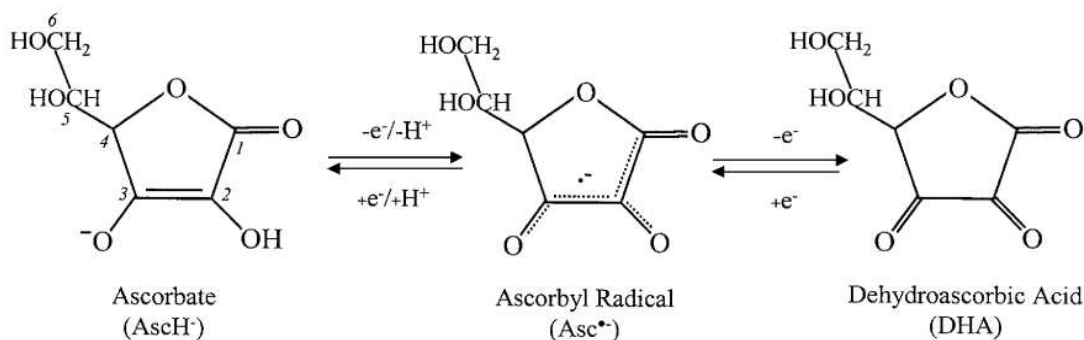


Figure 21 : Oxydation de l'ascorbate (AscH⁻) par deux étapes successives d'oxydation à un électron pour donner respectivement le radical ascorbyle (Asc^{•-}) et l'acide déhydroascorbique (DHA) (Packer, 2002).

3.2. Propriétés physico-chimiques

La vitamine C est une substance hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux rayonnements ultraviolets et à l'oxygène, sa masse molaire est de 176,13 g.mol⁻¹. Elle se présente sous forme de poudre cristalline de couleur blanche ou jaunâtre avec une température de fusion de 190°C. Très fragile en solution, l'AA est oxydé au contact de l'air, par contre il est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité (Colombo, 2001).

3.3. Biosynthèse de la vitamine C

Dans le règne animal, il existe une seule voie de biosynthèse de l'acide ascorbique. Chez les mammifères, sa synthèse s'effectue au niveau du foie. L'étude de cette voie de biosynthèse a pu être faite grâce à l'utilisation de molécules radio-marquées chez le rat. A partir d'UDP-D-glucose, de l'UDP-Dglucuronate est formé par l'action de l'UDP-glucose pyrophosphorylase.

L'UDP-glucose déshydrogénase catalyse la réaction suivante qui va avoir pour produire le D-glucuronate qui sera alors réduit en L-gulonate par la glucuronate réductase. Ceci conduit à une inversion de configuration étant donné que la fonction aldéhyde du D-glucuronate devient un groupe hydroxyméthyl dans le L-gulonate. Ce dernier est converti en L-gulono-1,4-lactone par la gulonolactonase. La dernière réaction fait intervenir la L-gulonolactone oxydase, enzyme liée à la membrane du réticulum endoplasmique, qui va oxyder le L-gulono-1,4-lactone pour donner l'acide L-ascorbique (Figure 22) (Linster et Van Schaftingen, 2006).

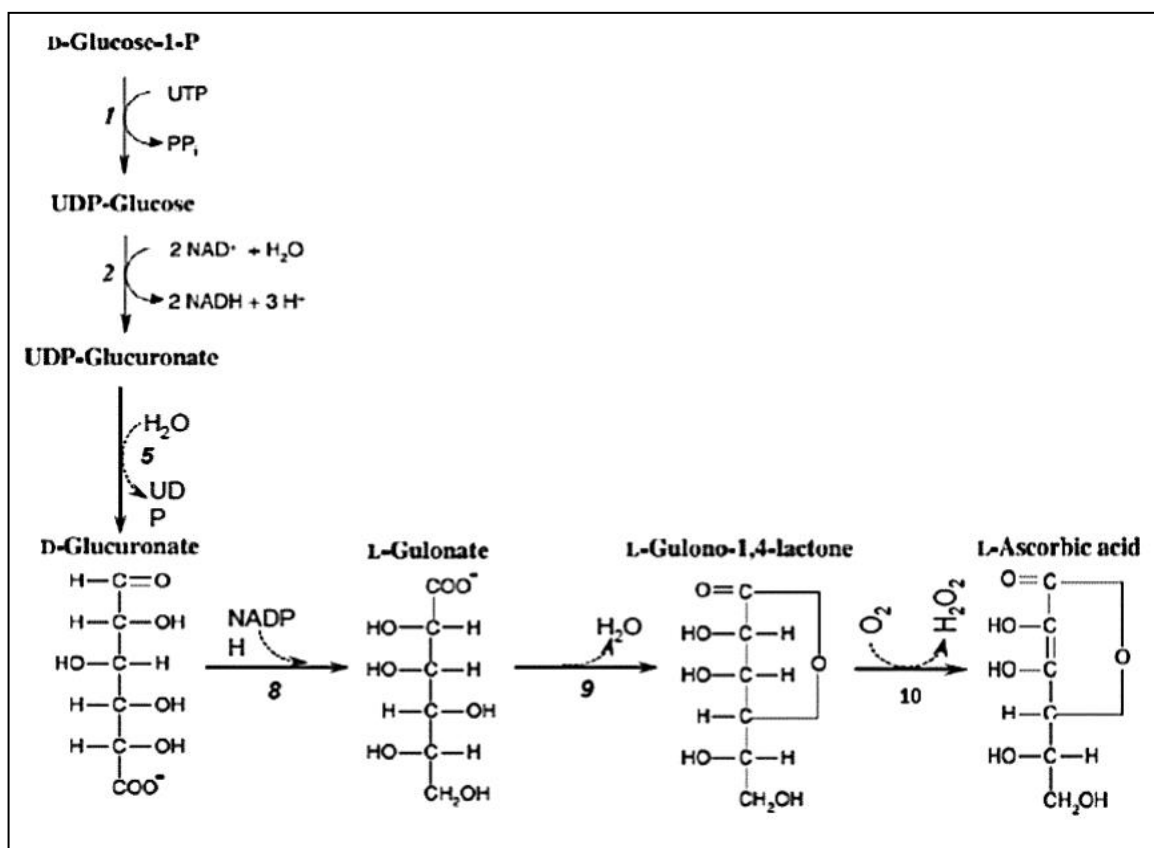


Figure 22 : Biosynthèses de l'acide ascorbique chez les animaux (Linster et Schaftigen, 2006).

3.4. Source de vitamine C

Un apport quotidien en vitamine C d'au moins 200 mg est facilement obtenu en consommant 5 portions de fruits et légumes. L'augmentation de l'apport en fruits et légumes a toujours été associée à une diminution du risque de maladies chroniques (Van't Veer, 2000).

En effet, la plupart des preuves épidémiologiques associant une augmentation de l'apport en vitamine C à une diminution du risque de maladie chronique sont basées sur la consommation de vitamine C des fruits et légumes. Les légumes frais, les fruits et les jus sont les sources les plus riches de vitamine C. La teneur en vitamine C des aliments peut être diminuée par un stockage prolongé et certaines pratiques de cuisson.

IL a été constaté que la cuisson des légumes entraînait des pertes de vitamine C de 50 à 80%. Faire cuire des légumes à la vapeur dans des quantités minimales d'eau ou les cuire dans un four à micro-ondes réduit considérablement la perte de vitamine C par la cuisson (Rumm-Kreuter et Demmel, 1990).

3.5. Fonctions physiologiques

3.5.1. Agent antioxydant

A des taux physiologiques, l'AA est un puissant antioxydant, et un capteur des radicaux libres dans le plasma d'où, une préservation de la cellule contre les dommages oxydatifs. Par conséquent elle est capable de réduire les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azotes citant : le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le radical peroxyde, l'oxygène singulet, le radical nitroxyde et l'acide hypochlorique (Carr et frei, 1999).

3.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

La majorité des mammifères y-compris le lapin sont capables de synthétiser la vitamine C au niveau hépatique ou rénal. Cette synthèse est absente chez l'homme, qui doit assurer un apport quotidien d'environ 100 mg par une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (Haleng et al., 2007).

3.5.3. Agent d'oxydo-réduction

Le rôle biologique de la vitamine C est associé à son efficacité comme un agent réducteur ou un donneur d'électrons. La vitamine C intervient à la réduction des acides foliques en coenzymes actifs, elle participe aussi dans des processus de détoxification en bloquant la formation des nitrosamines, elle réduit les effets toxiques des mycotoxines, des métaux lourds et des polluants sur la santé. L'AA a en effet un rôle détoxifiant vis-à-vis d'un grand nombre de métaux lourds (plomb, mercure, cadmium), car elle facilite leur élimination ou réduit l'absorption intestinale de certains d'entre eux (Layachi, 2013).

3.5.4. Agent d'hydroxylation

La vitamine C, du fait de ses caractéristiques réductrices, joue un rôle principal dans de plusieurs réactions d'hydroxylation telles que la synthèse du collagène, de plusieurs neuromédiateurs, de la carnitine et le catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine (Padayatty et al., 2003).

3.5.5. Agent neuroprotecteur

La vitamine C est largement concentrée dans le cerveau et certaines hypothèses soulignent son rôle dans le maintien des fonctions cognitives, qu'elle soit apportée par alimentation ou sous forme de supplément. La vitamine C peut exercer son effet neuroprotecteur après pénétration dans le cerveau.

Selon [Agus et al., \(1997\)](#), la vitamine C peut traverser la barrière hémato-méningée sous sa forme oxydée. Il pénètre facilement dans le cerveau et elle est retenue dans le tissu cérébral sous forme d'AA. Ce transport est probablement mis en œuvre via le transporteur de glucose dans la barrière hémato-encéphalique.

3.6. Toxicité de la vitamine C

Chez les sujets sains, la vitamine C ne présente aucune toxicité puisqu'elle est hydrosoluble et régulièrement excrétée par l'organisme, mais l'excès d'acide ascorbique excrété dans l'urine donne un faux positif pour la glycosurie.

Les concentrations élevées de vitamine C interfèrent aussi avec l'absorption du cuivre. Par contre, la vitamine C doit être évitée par ceux qui souffrent de calculs rénaux, car elle peut se convertir en oxalate. Cependant, certaines recherches suggèrent que la vitamine C ne subit cette transformation dans l'urine qu'après que l'urine a quitté le corps ([Iqbal et al., 2004](#)).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Présentation de l'étude

Les AVMs font partie des biocides énormément utilisés en Algérie, dont « l'ivermectine » occupe la première place en médecine vétérinaire. Dans ce projet de thèse, nous souhaitons explorer l'impact d'une utilisation répétée à forte dose de l'IVM (2mg/kg p.c.) par voie sous-cutanée sur la santé humaine et animale et les effets protecteurs d'une association de la vitamine C, à travers des tests de toxicité chez le lapin de souche (*Oryctolagus cuniculus*).

Pour cela, les effets de l'IVM sur le comportement du lapin, l'évolution pondérale, la consommation d'aliment et de l'eau de boisson, la variation du poids des organes étudiés, les paramètres biochimiques de la fonction hépatique, rénale et le bilan lipidique, ainsi que les effets histopathologiques sur le foie, les reins, les poumons et le cerveau ont été évaluées.

Egalement, les effets bénéfiques d'une coadministration de la vitamine C par voie orale sur les différentes altérations causées par l'IVM ont été étudiés.

Pour atteindre nos objectifs, une seule expérimentation a été réalisée. Dans ce chapitre, on va présenter le matériel utilisé à savoir : le modèle animal ; les produits et les réactifs chimiques, le protocole expérimental et les méthodes suivies pour l'analyse biochimique, et l'étude histologique.

CHAPITRE 1

MATRIEL &

METHODES

CHAPITRE 1

MATERIEL & METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel biologique (modèle animal)

Notre expérimentation animale a été effectuée conformément aux principes des lignes directrices relatives à l'utilisation des modèles animaux en Toxicologie (Derelanko et Auletta, 2014 ; Gad, 2006).

Le lapin constitue un modèle animal très utilisé dans de nombreuses études toxicologiques car il est relativement peu coûteux, robuste, propre et facile à loger et à manipuler.

Dans cette étude, on a utilisé 20 lapins mâles sains de jeunes âges (4 à 5 semaines) avec un poids corporel moyen qui varie entre 850 et 950 g. Ces lapins sont issus de l'animalerie de l'Institut Technique des Elevages (ITELV), Baba Ali- Alger.

1.1.1. Systématique

Règne : Animal

Phylum : Vertébrés

Sous-phylum : Gnathostomes

Super-classe : Tétrapodes

Classe : Mammifères

Sous-classe : Euthériens

Ordre : Lagomorphes

Famille : Léporidés

Genre : *Oryctolagus*

Espèce : *Oryctolagus cuniculus*

Le lapin de notre expérimentation appartient à la population synthétique de la kabyliestation Djebba (Tizi Ouzou). Cette souche synthétique est caractérisée par une diversité de la couleur de sa robe (**Annexe 1**) qui est due à une contribution de plusieurs races importées à savoir ; le lapin blanc Néozélandais, fauve de Bourgogne et Californien (Berchiche et Kadi, 2002). Selon Zerrouki *et al.* (2004), cette souche cunicole est marquée par un poids adulte moyen de 2800 g, ce qui permet de la classer dans le groupe des races légères. Elle présente une bonne adaptation aux conditions climatiques locales mais sa prolificité et son poids adulte

sont trop faibles pour permettre son utilisation telle quelle, dans des élevages producteurs de viande (Zerrouki *et al.*, 2005).

Les animaux utilisés dans cette étude sont élevés dans l'unité de Pharmacotoxicologie du CRD-Saidal, Média, Algérie); hébergés dans des cages métalliques collectives dans une animalerie avec des conditions bien définies : une température ambiante de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, alternance des cycles 12h jour/ 12h nuit et une hygrométrie de 50-60 %.

Les lapins ont été nourris *ad-libitum*. Leur alimentation est constituée de granulés commerciaux spécifiques aux lapins, qui sont stockés dans un endroit sec et donnés aux animaux quotidiennement avec de l'eau de robinet qui est régulièrement renouvelée.

La quantité d'aliment et l'eau à consommer est déterminée selon les normes spécifiques utilisées par l'animalerie de Saidal pour les lapins jeunes à l'engraissement (4 à 11 semaines d'âge) comme suivant :

L'aliment : 110 à 130 g d'aliment / jour / lapin.

L'eau : 150 à 200 ml / jour / lapin.

1.2. Matériel non biologique

Les produits testés dans le cadre de cette thèse sont :

- L'AVIMEC® 1% dont la matière active est l'ivermectine (10 mg/ml), c'est un médicament anthelminthique largement utilisé pour le traitement des parasites internes et externes chez les bovins, buffles, ovins, caprins, chameaux et lapins. Ce médicament est importé à partir la firme AVICO et commercialisé en Algérie par la firme PHARMALEAD (annexe d'El Biar, Alger), à partir du quelle l'AVIMEC® a été acheté.
- La vitamine C (acide ascorbique), avec une pureté de 99%, a été achetée auprès de Sigma-Aldrich A92902 - 500G Product of United Kingdom.

Les réactifs (**Annexe 2**) et les kits de dosage biochimiques proviennent de sources commerciales ; Bisolve chimie (Valkenswaard, Pays-Bas) et BIOLABO SA. (France).

2. Méthodes

2.1. Protocole expérimental

Vingt lapins mâles sont répartis en quatre lots de cinq lapins ($n = 5$) chacun, en fonction de leur poids corporel moyen homogène, comme suivant :

- **Groupe 1** : groupe témoin.
- **Groupe 2** : groupe traité par l'AVIMEC®.

- **Groupe 3** : groupe traité par l'AVIMEC® et la vitamine C par gavage.
- **Groupe 4** : groupe traité par l'AVIMEC® et la vitamine C supplémenté en aliment.

Les lapins sont identifiés par une marque spécifique à l'aide d'un marqueur indélébile, chaque lapin est caractérisé par un numéro individuel au niveau de son oreille. Chaque groupe est placé dans une cage métallique avec une fiche de renseignements qui indique le type de traitement, le numéro, le sexe et la date.

Avant l'expérimentation proprement dite, les lapins sont soumis à une période d'acclimatation de 14 jours (OCDE, 2008), 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.

Durant la période d'acclimatation et la période expérimentale, tous les lapins sont pesés quotidiennement le matin pour suivre l'évolution de leurs poids corporels chez les différents lots étudiés, ainsi la consommation de l'eau de boisson et celle des aliments ont été mesurés.

- **Calcul du pourcentage de la prise du poids (% PP) corporel, la prise d'aliment (% PA) et la prise de boisson (%PB)**

$$\% = \frac{\text{Valeur finale} - \text{Valeur initiale}}{\text{Valeur initiale}} \times 100$$

Avant chaque traitement, les lapins sont aussi pesés pour calculer la dose convenable pour chacun.

Notre expérimentation a duré 21 jours dans laquelle les différents lots sont traités comme suivant :

Lot 1 (Témoin) :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de 1 ml de la solution physiologique Na Cl 0,9%.
- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée.

Lot 2 (AVIMEC®) :

- **1^{er} jour** : chaque lapin a reçu une dose de 2mg/kg p.c d'AVIMEC® par voie sous-cutanée (Lu et al, 2017), 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours. La dose administrée est calculée par rapport au poids corporel moyen du groupe. La technique de l'injection sous-cutanée consiste à bien tenir les pattes et la tête de lapin avec les mains pour l'immobiliser, couvrir ses yeux afin d'éviter de le stresser et tirer sa peau

vers le haut jusqu'à ressentir un vide entre le derme et l'épiderme, c'est là où on doit introduire la seringue.

- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée.

Lot 3 (AVIMEC®+ vitamine C par gavage) :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de la même dose de l'AVIMEC®.
- **Après 12h** : gavage d'1 ml d'une solution de la vitamine C (20 mg/ml), 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours. La dose administrée est calculée par rapport au poids corporel moyen du groupe. La technique de gavage consiste à tenir le lapin debout, immobiliser sa tête et ses pattes, couvrir ses yeux et introduire la seringue ou la sonde de gavage dans sa bouche.

Lot 4 : AVIMEC®+ vitamine C supplémentée en aliment :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de la même dose de l'AVIMEC®.
- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée plus une dose de 200 mg/kg (Fetoui et al., 2010) d'aliment de la vitamine C, 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours.

2.2. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués chez les lapins mis à jeun depuis la veille en deux temps différents : pendant l'expérimentation (au 14^{ème} jour) et le dernier jour de l'expérimentation (au 21^{ème} jour). L'échantillonnage du sang a été fait à partir de la veine marginale et centrale de l'oreille.

Le sang est récupéré dans des tubes héparinés, le volume collecté est d'environ 3ml. Les prélèvements obtenus sont immédiatement centrifugés à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Le plasma obtenu est recueilli dans des tubes eppendorfs et il est transporté dans une glacière au laboratoire d'analyses médicales pour le dosage des paramètres biochimiques.

2.3. Analyses biochimiques

Les prélèvements sanguins obtenus sont destinés au dosage des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique : glycémie ; ASAT ; ALAT ; γ -GT, la fonction rénale : urémie ; créatinémie ; acide urique et les paramètres de bilan lipidique : CT ; TG ; HDL-C et LDL-C. le dosage de ces paramètres a été effectué à l'aide des kits enzymatiques spectrophotométriques disponibles dans Biolabo (France) par un auto-analyseur (Hitachi 912 ; Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Le taux de VLDL-C est déterminé par la formule suivante :

$$\text{VLDL-C} = \text{CT} - (\text{HDL-C} + \text{LDL-C}) \text{ (Króliczewska et al., 2018).}$$

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 valeurs des triglycérides aux taux de HDL-C a été calculé selon la formule suivante :

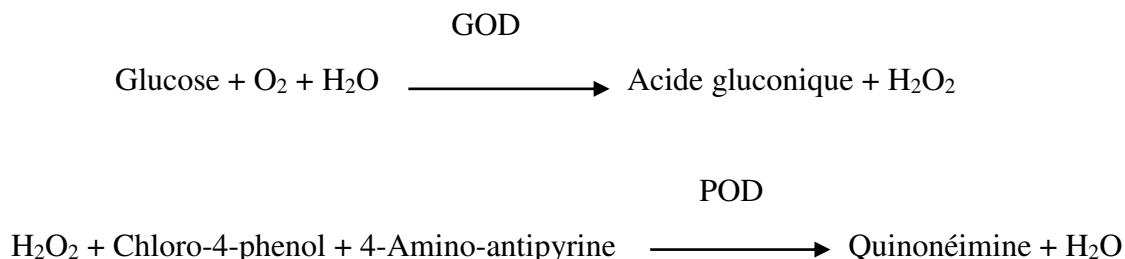
$$\text{IAP} = \text{Log} [\text{TG}] / [\text{HDL-C}]$$

où les deux taux sont mesurés dans le plasma (Króliczewska et al., 2018). D'autres facteurs athérogènes (FA) ont été aussi utilisés et calculés comme le rapport entre Cholestérol total et HDL-C, LDL-C et HDL-C (Millán et al., 2009).

➤ Dosage de la glycémie

Principe

Le glucose est oxydé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). 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) (Trinder, 1969). 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 se fait à une longueur d'onde de 500 nm.

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

Calcul des concentrations

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

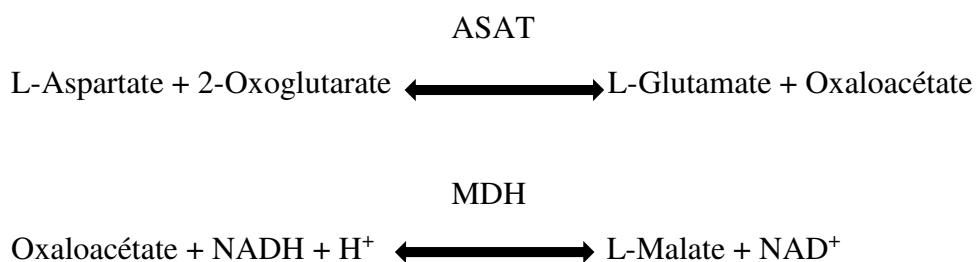
$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (100 mg/l)}$$

➤ Dosage des transaminases plasmatiques

❖ Aspartate Amino-Transférase (ASAT)

Principe

L'aspartate amino-transférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate transaminase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au 2-oxoglutarate formant le L-glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate deshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Henry *et al.*, 1960), selon le schéma réactionnel suivant :



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

Calcul des concentrations : Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

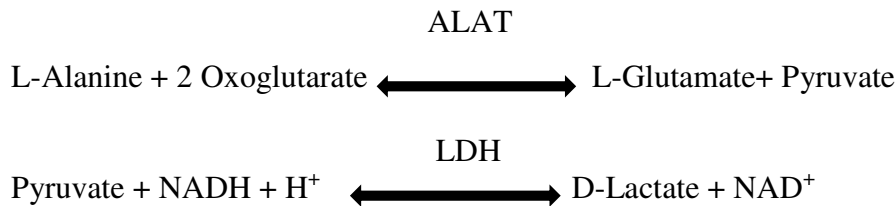
$$\text{ASAT (UI/l)} = \Delta \text{DO/min} \times 1746$$

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 le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au 2-oxoglutarate formant la L-glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH, H⁺ (Benmenyer *et al.*, 1978 ; Henry *et al.*, 1960), selon le schéma réactionnel suivant :



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

Calcul des concentrations :

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

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

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 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 peut se mesurer cinétiquement à 405 nm.

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

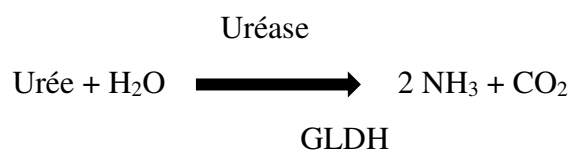
$$\gamma\text{-GT (UI/l)} = \Delta \text{DO/min} \times 2121$$

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

➤ Dosage de l'urée

Principe

L'urée est hydrolysée en ions ammoniacque (NH_3) et le dioxyde de carbone (CO_2). L'ammoniacque réagit avec l'oxoglutarate et NADH dans une réaction catalysée par glutamate déshydrogénase (GLDH) pour donner le glutamate, selon le schéma de la réactionnel suivant (Schubert, 1965 ; Tiffany *et al.*, 1972) :



La concentration en urée est proportionnelle à la variation d'absorbance mesurée à 340 nm pendant un temps donné.

Calcul des concentrations : Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

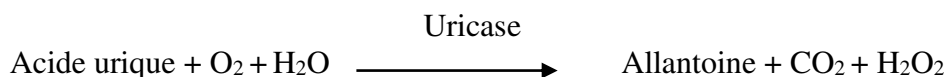
$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{Abs (A1-A2) Dosage}}{\text{Abs (A1-A2) Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (40 mg/l)}$$

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

➤ 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 amino-antipyrine) 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 quantité d'acide urique dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

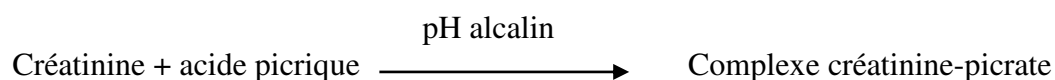
$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Dosage}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (100 mg/l)}$$

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

➤ 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 est réalisé par une réaction colorimétrique (réaction de Jaffé). En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe coloré rouge-orange. Le schéma réactionnel du dosage de la créatinine se résume comme suit ([Fabiny et Ertingshausen, 1971](#)) :



La vitesse de formation du colorant (intensité de la couleur) est directement proportionnelle à la concentration de créatinine de l'échantillon. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 490 nm (490 – 510nm)

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

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

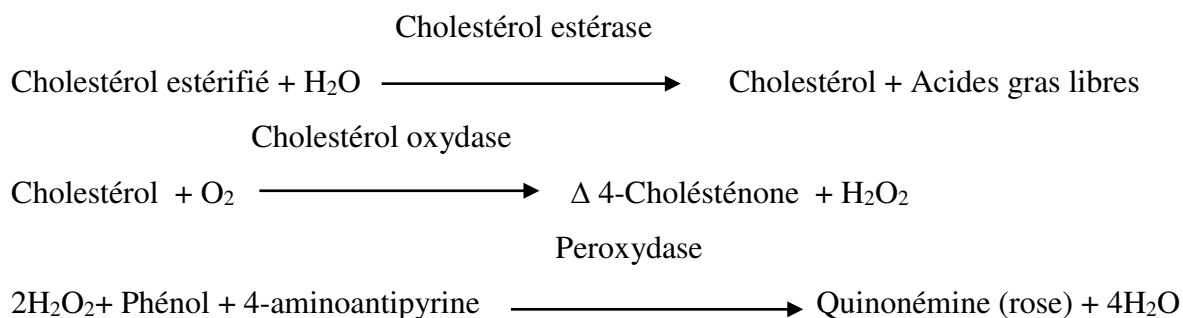
NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

➤ Dosage des paramètres lipidiques

❖ Dosage du cholestérol total (CT)

Principe

La détermination colorimétrique enzymatique du cholestérol suit les réactions suivantes (Allain *et al.*, 1974) :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

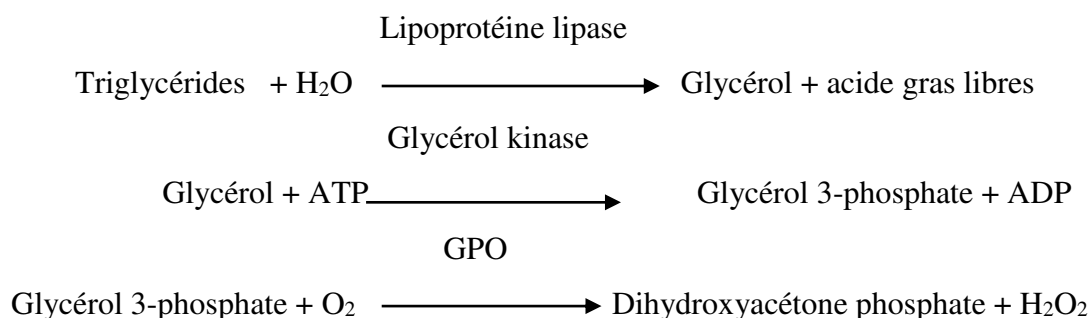
$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Dosage}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200 mg/l)}$

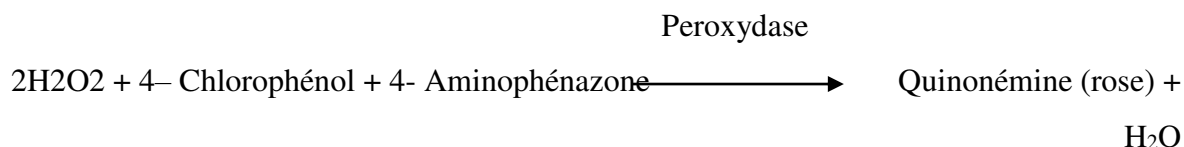
NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

❖ Dosage des triglycérides

Principe

Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré selon la réaction suivante (Fossati et Prencipe, 1982) :





L'intensité de la couleur mesurée à 500 nm est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

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

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

❖ Dosage du HDL-cholestérol

Principe

Les chylomicrons, lipoprotéines de très haute densité (HDL), et lipoprotéine de faible densité (LDL) sont précipité par l'addition d'acide phosphotungstique et de magnésium. Le surnageant obtenu après centrifugation contient les lipoprotéines de hautes densité (HDL) qui sont dosé à l'aide de réactif du dosage de cholestérol. Leur concentration en cholestérol est donnée en suivant les mêmes étapes que ceux pour le dosage de cholestérol.

❖ 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).

2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

A la fin de la période d'expérimentation, tous les lapins sont sacrifiés le matin pour éviter les perturbations liées au rythme cardiaque et dans les mêmes conditions d'élevage. Les lapins sont mis à jeun depuis la veille et ils sont euthanasiés par décapitation cervicale. Après dissection, les organes : foie, rein, poumon et cerveau sont immédiatement prélevés, pesés et mis dans des piluliers contenant du formol à 10%.

- **Calcul du poids relatif des organes**

$$\text{Poids relatif de l'organe} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe}}{\text{Poids de l'animal}} \times 100$$

2.5. Etude histologique des organes

Au terme de l'expérimentation, les organes de chaque animal sont coupés en fragments, mis dans des cassettes en plastique, fixés dans le formol à 10% puis soumis aux techniques histologiques constantes. Nous avons utilisé les étapes classiques de l'histologie (Gabe, 1961 ; Marjota et Marjota, 1967) à savoir :

- **Fixation** : Cette étape est indispensable à la bonne conservation des constitutions cellulaires et tissulaires qui doivent rester dans un état aussi proche que possible de celui de l'organisme vivant. Chaque organe est coupé, mis dans des cassettes puis plongé dans une solution de formol à 10%.
- **Circulation** : La déshydratation permet d'éliminer graduellement l'eau contenue dans les tissus afin de le remplacer par un solvant de paraffine. 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. Ils subissent par la suite l'éclaircissement dans deux bains de xylène.
- **Inclusion et coupe au microtome** : 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. L'épaisseur de coupes réalisées par le microtome est de 3 µm.
- **Coloration** : Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'hématoxyline éosine (H&E), comportant un bain de 5 min d'hématoxyline (MERCK), qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux), un bain de HCl 1% pour différencier les coupes et obtenir une coloration rose, un bain de 3 min en milieu carbonate du lithium pour colorer en bleu les coupes et un bain de 5 min dans l'éosine pour colorer

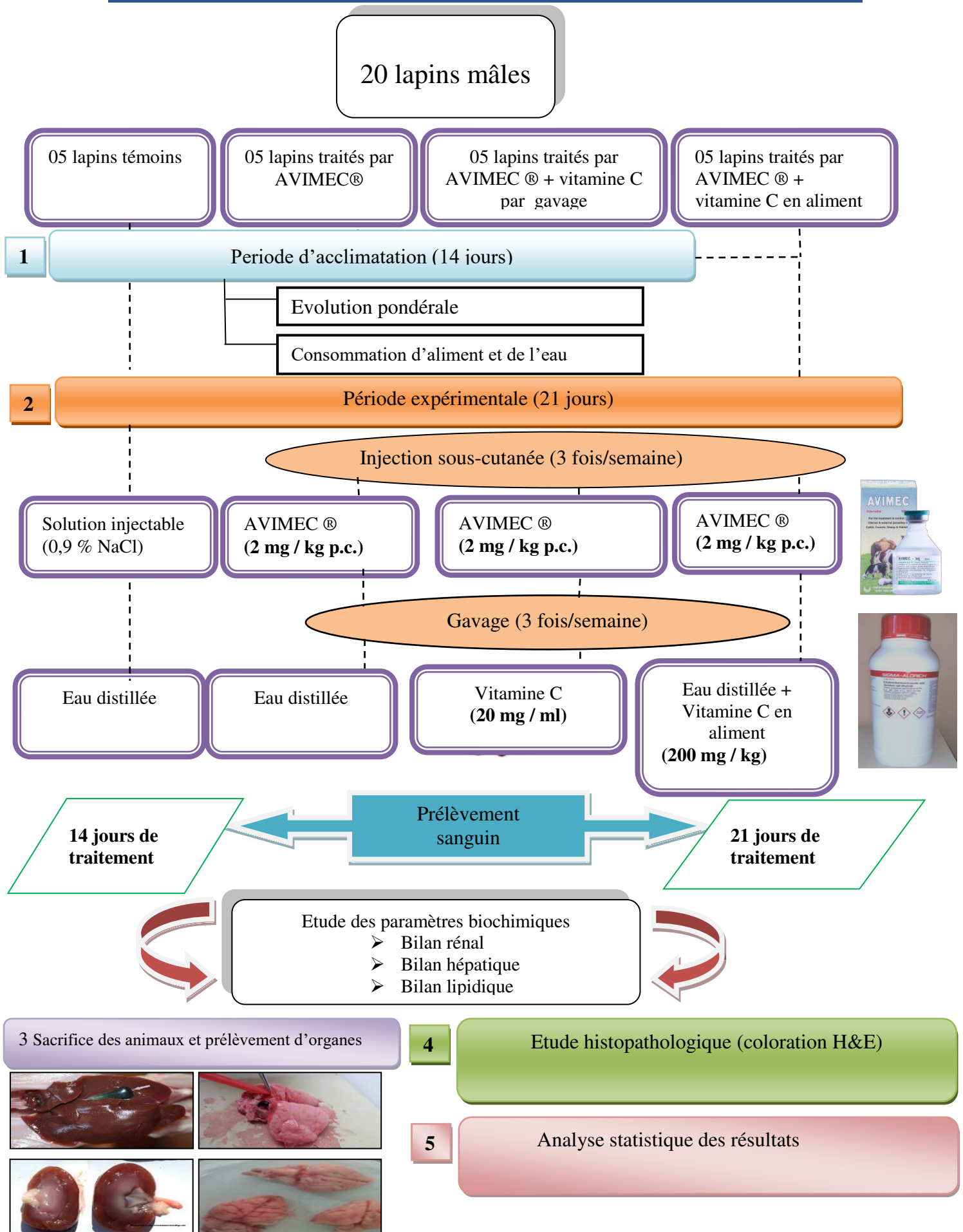
les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet.

Les coupes obtenues sont observées au microscope photonique (Viola MC2Oi version 19.12.17) qui est attaché à un appareil photo.

2.6. Traitement des données et analyse statistique

La représentation des données, ainsi que les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de logiciels STATISTICA version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, États-Unis). Les différents paramètres étudiés sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart type (SD), la comparaison des moyennes de chaque paramètre entre les différents groupes étudiés dans la présente étude a été effectuée par l'analyse unidirectionnelle de variance (one way ANOVA) suivi d'un test post-hoc « Duncan's post-hoc test ». Un résultat est considéré comme statistiquement significatif avec un taux de $p \leq 0.05$.

La représentation graphique des données a été fait par le biais de logiciels SPSS (version 20, IBM Co., Armonk, NY).



CHAPITRE 2
RESULTATS &
DISCUSSION
GENERALE

CHAPITRE 2**RESULTAT & DISCUSSION GENERALE****1. RESULTATS**

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats de notre étude suivis d'une interprétation et une discussion globale de l'ensemble des résultats.

1.1. Effet du traitement sur le comportement du lapin

Durant l'expérimentation, quelques troubles de comportement ont été observés chez le groupe traité par l'IVM à savoir :

- Des signes neurologiques (tremblements et agitation)
- Diarrhée
- Chute des poils
- Baisse d'activité

1.2. Variation du poids corporel et pourcentage de prise de poids

Le poids des lapins est mesuré quotidiennement le matin pendant la période d'acclimatation (15 jours) et d'expérimentation (21 jours).

Le **Tableau 2** récapitule l'évolution du poids corporel des lapins témoins et traités pendant l'acclimatation et l'expérimentation.

Pendant la période d'acclimatation, le poids corporel et le pourcentage de prise de poids corporel (% PP) sont homogènes dans les quatre groupes inclus dans cette étude.

Alors que pendant la période expérimentale, le poids corporel final (PF ; $1587 \pm 71,6$ g) et le % PP ($19,3 \pm 0,8$ %) sont significativement ($p < 0,05$) diminués chez le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin ($1806,4 \pm 63,2$ g et $34,1 \pm 0,5$ %, respectivement). A l'inverse, le PF et le % PP sont significativement augmentés chez les groupes co-traités par l'IVM et la vitamine C par gavage ($1693 \pm 47,1$ g et $25,3 \pm 0,7$ %, respectivement) et supplémentée en aliment ($1678,1 \pm 48$ g et $26,4 \pm 0,8$ %, respectivement) relativement au groupe traité uniquement par l'IVM.

Tableau 2 : Variation du poids corporel et le pourcentage de prise de poids (% PP) des lapins témoins et traités. PI : poids initial, PF : poids final.

Période	Paramètre / groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	PI (g)	862,1± 9,8	914,8 ± 22,7	946,7 ±25,6	932,2 ±27,8
	PF (g)	1085,7±18,9	1147,7±21,9	1156,8±26,2	1149,1±30,8
	% PP	25,9 ± 0.9	25,5±0.9	22,23±0.7	23,31± 0.8
expérimentation	PI (g)	1347,1±21,1	1330,6±19,8	1351,0±26,6	1328,3±36,4
	PF (g)	1806,4±63,2	1587,0±71,6 ^a	1693,0±47,1 ^b	1678,1±48,0 ^c
	% PP	34,1 ± 0.5	19,3 ± 0,8 ^a	25,3 ± 0,7 ^b	26,4 ± 0,8 ^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.3. Variation de la consommation de l'aliment et de boisson

La quantité d'aliment et le volume de boisson (l'eau) consommés sont évalués quotidiennement pour chaque lapin au cours de l'acclimatation et l'expérimentation.

1.3.1. Variation de la consommation de l'aliment et le pourcentage de prise alimentaire

D'après le **Tableau 3**, au cours de l'acclimatation, il n'existe aucune différence significative de la quantité d'aliment consommée et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) entre le groupe témoin et les groupes traités. Par contre, au moment de la période expérimentale, le % PA est significativement diminué chez le groupe traité par l'IVM ($21,01 \pm 0,9 \%$) en comparaison avec le groupe témoin ($33,03 \pm 0,1 \%$). Ce pourcentage a augmenté d'une manière significative chez le lot traité par l'IVM + vitamine C par gavage ($27,5 \pm 0,2 \%$) et celui traité par l'IVM + vitamine C en aliment ($35,2 \pm 0,5 \%$) par rapport au groupe traité uniquement par l'IVM.

Tableau 3 : Variation de la consommation d'aliment et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) chez les lapins témoins et traités. PIA : poids initial d'aliment, PFA : poids final d'aliment.

Période	Paramètre / groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	PIA (g)	60,6 ± 6,3	69,2 ± 5,2	73,7 ± 5,1	68,7 ± 2,9
	PFA (g)	77,6 ± 2,7	90,2 ± 0,9	92,9 ± 1,1	84,5 ± 1,9
	% PA	28,01 ± 0,1	30,3 ± 0,2	26,01 ± 0,1	23 ± 0,4
expérimentation	PIA (g)	93,3 ± 1,6	79,2 ± 2,2	74,1 ± 2,2	79,5 ± 1,7
	PFA (g)	124,1 ± 0,4	95,8 ± 3,5	94,5 ± 4,9	107,5 ± 2,4
	% PA	33,03 ± 0,1	21,01 ± 0,9^a	27,5 ± 0,2^b	35,2 ± 0,5^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.3.2. Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson

Les résultats de variation de consommation de boisson (l'eau) et le pourcentage de prise de boisson (% PB) sont représentés dans le **Tableau 4**.

Au cours de l'acclimatation, la consommation de l'eau et le % PB varient de la même façon dans tous les lots étudiés. Contrairement au cours de l'expérimentation, nous avons noté une réduction importante et significative du % PB dans le lot traité par l'IVM ($7,3 \pm 0,3$ %) par rapport au lot témoin ($70,72 \pm 0,8$ %). La co-administration de la vitamine C est responsable d'une élévation significative du % PB dans les groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage ($21,26 \pm 0,4$ %) et l'IVM + vitamine C en aliment ($64,21 \pm 0,7$ %) par rapport au groupe traité seulement par l'IVM.

Tableau 4 : Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson (% PB) chez les lapins témoins et traités. VBI : volume de boisson initial, VBF : volume de boisson final.

Période	Paramètre/ groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	VIB (ml)	100,5 ± 10,9	109,9 ± 3,4	106,1 ± 2,6	103,5 ± 4,1
	VFB (ml)	113,1 ± 5,5	126,5 ± 7,8	126 ± 6,3	117,4 ± 9,7
	% PB	12,5 ± 0,6	13,1 ± 0,3	15,8 ± 0,2	11,83 ± 0,5
expérimentation	VIB (ml)	119,2 ± 4,8	109 ± 5,2	111 ± 1,7	104,8 ± 3,3
	VFB (ml)	203,5 ± 8,8	116,9 ± 3,9	134,6 ± 7,3	172,1 ± 5,5
	% PB	70,72 ± 0,8	7,3 ± 0,3^a	21,26 ± 0,4^b	64,21 ± 0,7^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.4. Variation du poids absolu et relatif des organes

Les valeurs absolues et relatives du poids moyen des organes obtenues à la fin de la période expérimentale pour les différents lots étudiés sont montrées dans le **Tableau 5**.

Les poids absolus et relatifs du foie, poumon, surrénale et rate n'ont pas changé significativement chez les lapins traités par l'IVM par rapport aux lapins témoins. Par contre, uniquement les poids absolus et relatifs du poumon et le poids absolu de la surrénale sont augmentés d'une façon significative chez les deux lots traités par l'IVM + vitamine C comparativement au groupe témoin et le groupe traité uniquement par l'IVM. Autrement, nos résultats ont révélé une augmentation significative du poids absolu et relatif des deux reins et du cœur et seulement le poids absolu des testicules chez les lapins traités par l'IVM relativement au groupe témoin, et une diminution significative du poids absolu et relatif du cerveau et le poids absolu du thymus chez le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. la co-administration de la vitamine C par gavage avec l'IVM a permis une augmentation significative du poids absolu de la surrénale et le thymus par rapport au groupe traité par l'IVM seule.

Tableau 5 : Poids absolu et relative des organes des lapins témoins et traités pendant 21 jours.

Poids des organes (g)/ groupes		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
Foie	Absolu	76.5 ± 9,2	75,8 ± 6,5	77,7 ± 8,7	77,3 ± 9,5
	Relatif	4,1 ± 1,0	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,5 ± 1,2
Poumon	Absolu	8,8 ± 0,9	8,0 ± 1,0	9,8 ± 0,8^{a, b}	11,7 ± 0,7^{a, c}
	Relatif	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,03^{a, b}	0,7 ± 0,2^{a, c}
Rein droit	Absolu	5,7 ± 0,9	6,8 ± 1,3^a	5,9 ± 0,7	6,0 ± 0,8
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,1^a	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Rein gauche	Absolu	6,0 ± 0,7	6,7 ± 1,4^a	6,1 ± 0,7	6,1 ± 1,8
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,1^a	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,1
Cerveau	Absolu	8,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3^a	8,3 ± 0,3	8,3 ± 2,4
	Relatif	0,4 ± 0,01	0,35 ± 0,03^a	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,1
Surrénale (x 10⁻²)	Absolu	197 ± 5,3	20,8 ± 3,9	22,7 ± 5,4^b	20,4 ± 4,6
	Relatif	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3
Cœur	Absolu	4,8 ± 1,01	6,01 ± 0,8^a	4,9 ± 0,6	4,7 ± 1,3
	Relatif	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,01^a	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Thymus	Absolu	4,8 ± 0,5	3,2 ± 0,4^a	3,9 ± 0,6^b	4,1 ± 1,4
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,1
Rate	Absolu	0,53 ± 0,1	0,72 ± 0,05	0,66 ± 0,08	0,72 ± 0,19
	Relatif	0,02 ± 0,001	0,04 ± 0,002	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,01
Testicule	Absolu	2,87 ± 0,02	4,34 ± 0,12^a	3,25 ± 0,14	3,31 ± 1,02
	Relatif	0,15 ± 0,002	0,26 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,06

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.5. Paramètres biochimiques

1.5.1. Paramètres biochimiques de la fonction hépatique

Les valeurs plasmatiques des marqueurs de la fonction hépatique sont montrées dans le **Tableau 6 (Annexe 3)**.

Au 14^{ème} jour du traitement, les taux plasmatiques des transaminases hépatiques (ALAT (**Figure 23**) et ASAT (**Figure 24**)) et γ -GT (**Figure 25**) sont significativement augmentés chez le groupe qui a reçu l'IVM seul en comparaison avec le groupe témoin. Par contre, le taux de glucose ne semble pas influencé d'une façon significative par le traitement (**Figure 26**). Les taux plasmatiques de ces mêmes paramètres sont relativement corrigés après une co-administration de la vitamine C par gavage ou supplémenté dans l'aliment par rapport au groupe traité par l'IVM.

Au 21^{ème} jour de l'expérimentation, les teneurs plasmatiques des ALAT, ASAT et γ -GT restent significativement élevées par rapport au groupe témoin. Egalement, la concentration du glucose a augmenté significativement chez le groupe injecté par l'IVM comparativement au groupe témoin. L'association de l'acide ascorbique a permis une amélioration des taux plasmatiques des marqueurs de la fonction hépatique avec une diminution significative de taux de glycémie chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage ($1,20 \pm 0,09$ g/l) par rapport celle des lapins traités par l'IVM ($1,64 \pm 0,13$ g/l) et l'IVM + vitamine C supplémenté en aliment ($1,34 \pm 0,17$ g/l).

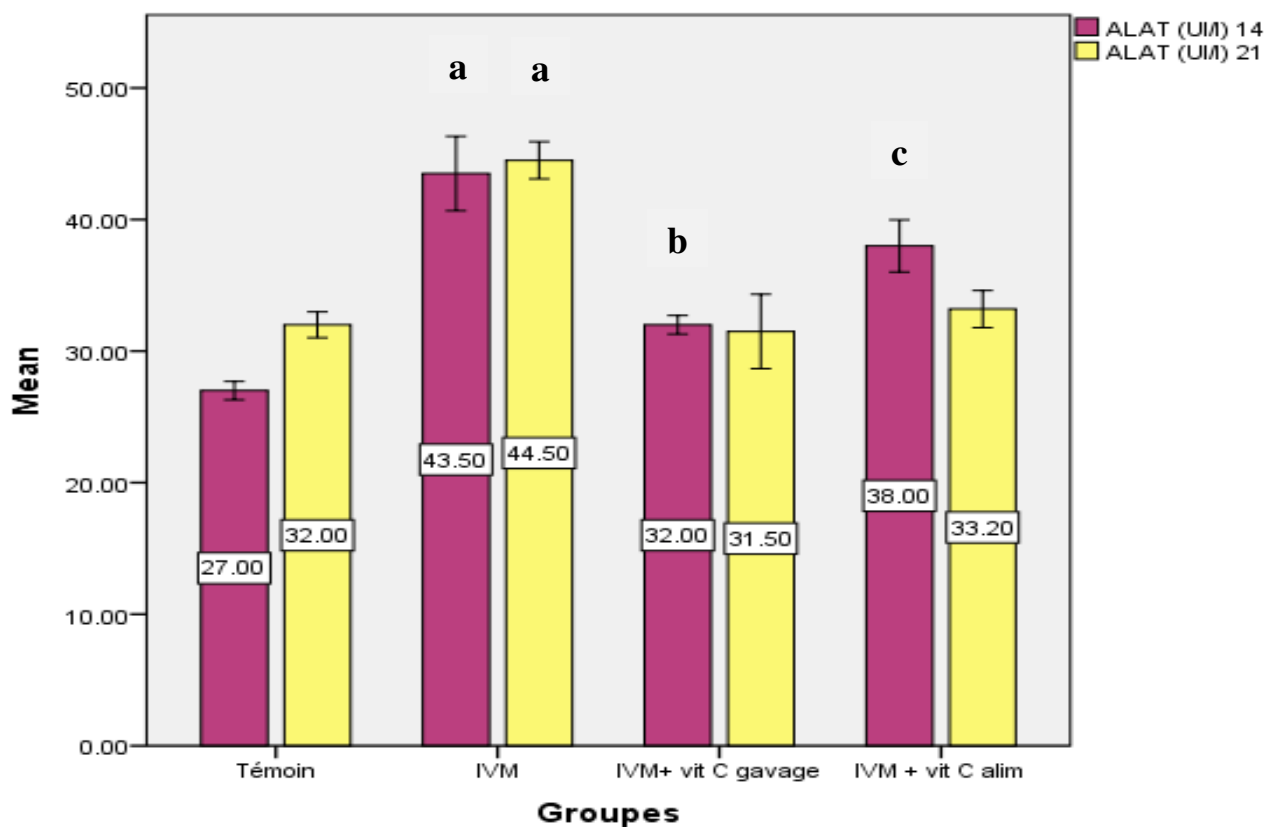


Figure 23 : Variation des taux plasmatiques d'ALAT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

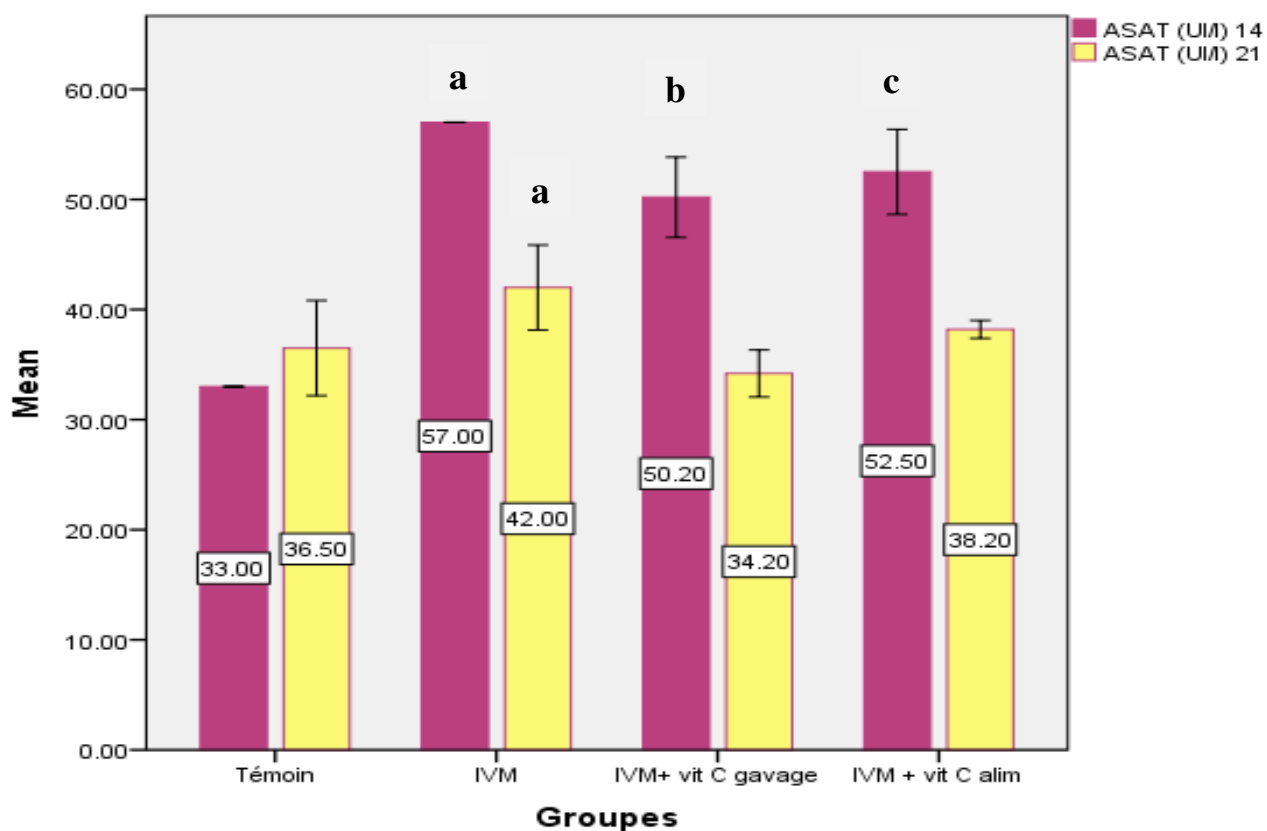


Figure 24 : Variation des taux plasmatiques d'ASAT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

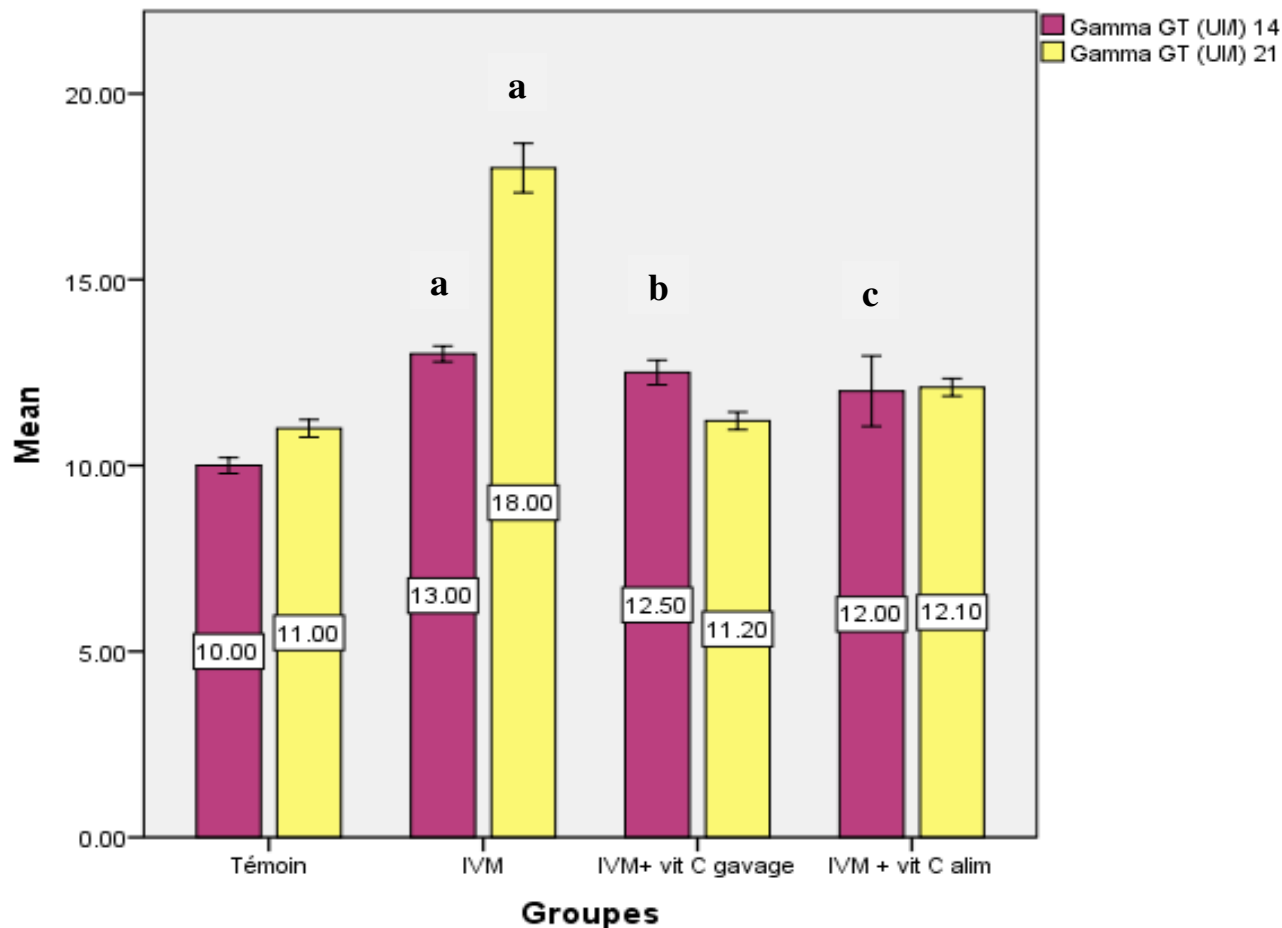


Figure 25 : Variation des taux plasmatiques de γ -GT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

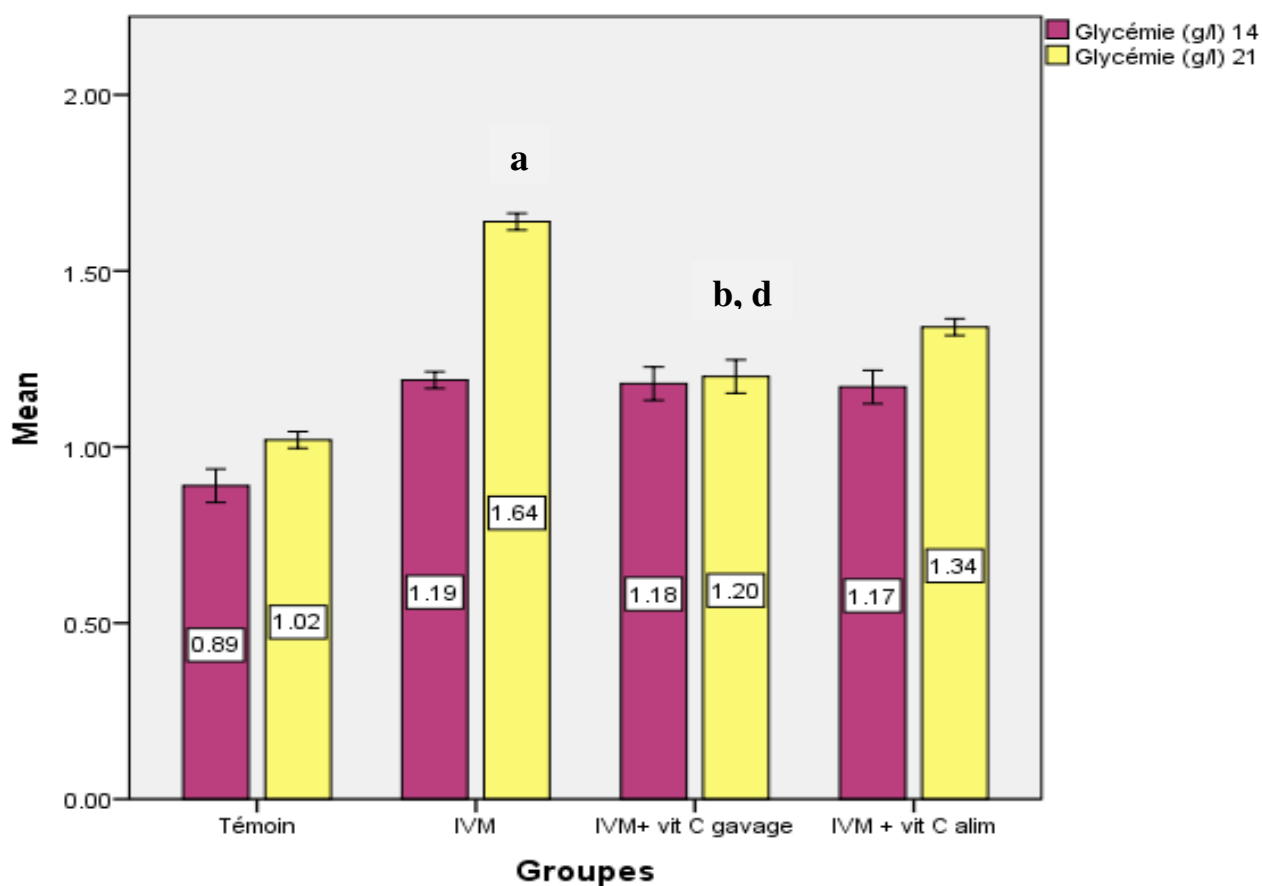


Figure 26 : Variation des taux plasmatiques du glucose au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et d : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **d** : différence significative entre le groupe IVM + vitamine C (par gavage) et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.5.2. Paramètres biochimiques de la fonction rénale

Les résultats de l'analyse biochimique de la fonction rénale (créatinine, urée et acide urique) sont montrés dans le **Tableau 7 (Annexe 3)**.

L'analyse plasmatique des biomarqueurs rénaux au 14^{ème} jour de l'expérimentation a montré une augmentation significative du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au témoin (**Figure 27**). Ce taux continue d'être augmenté au 21^{ème} jour de la période expérimentale. Cependant, les concentrations d'acide urique (**Figure 28**) et d'urée (**Figure 29**) ont révélé une augmentation non significative dans le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin aux 14^{ème} et 21^{ème} jours de la période expérimentale. Uniquement le taux de créatinine plasmatique a été significativement diminué dans le groupe traité par l'IVM + Vitamine C par gavage par rapport au groupe traité par l'IVM.

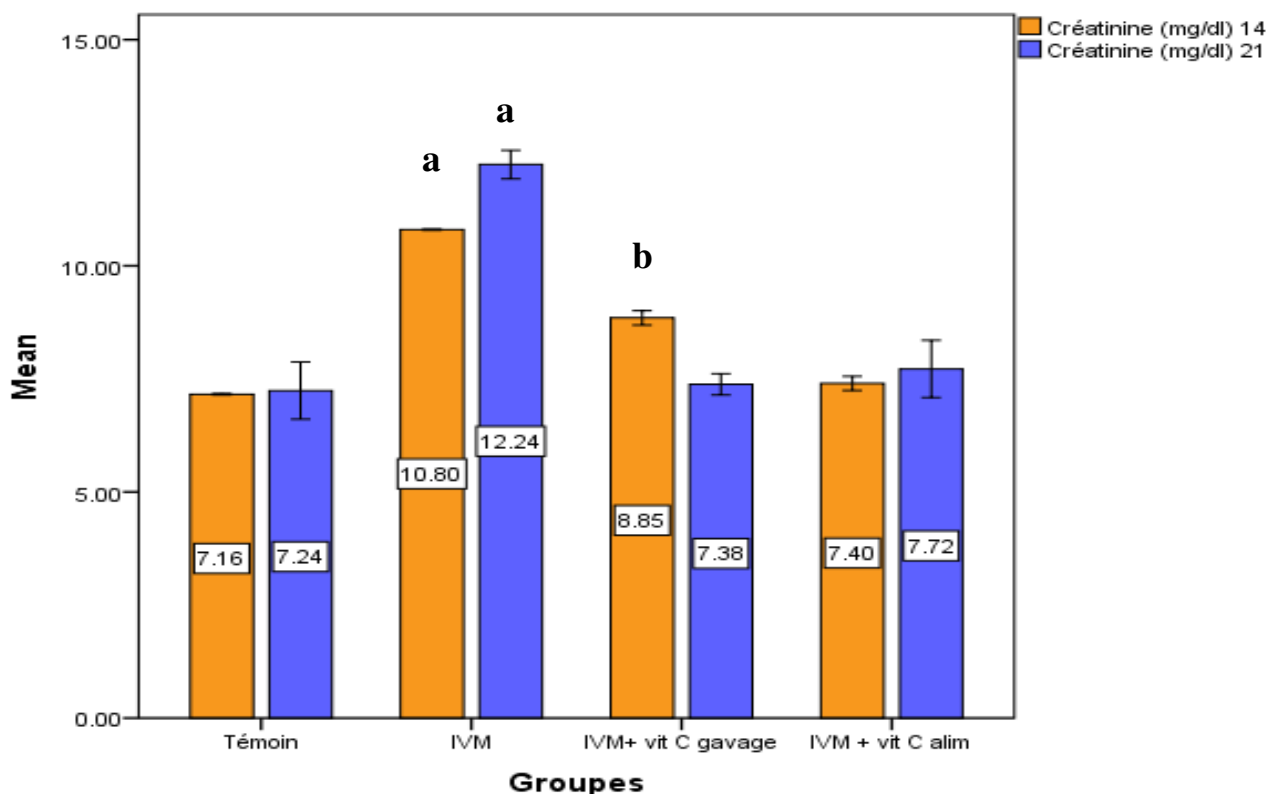


Figure 27 : Variation des taux plasmatiques de créatinine au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a** et **b** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).

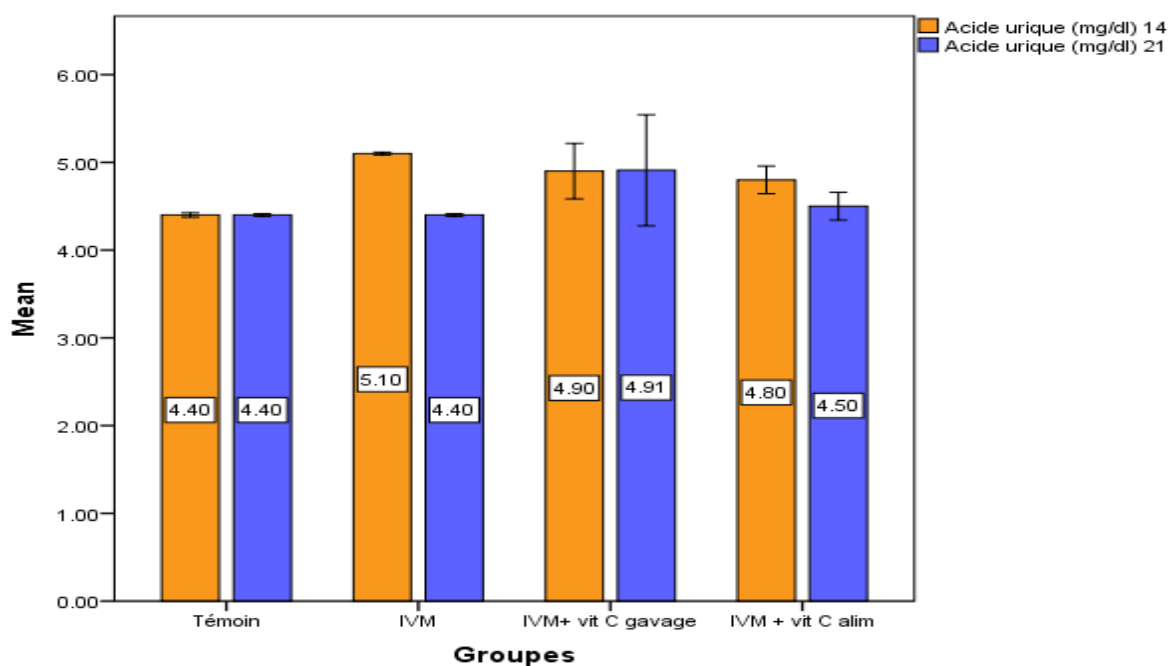


Figure 28 : Variation des taux plasmatiques d'acide urique au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. $p > 0,05$

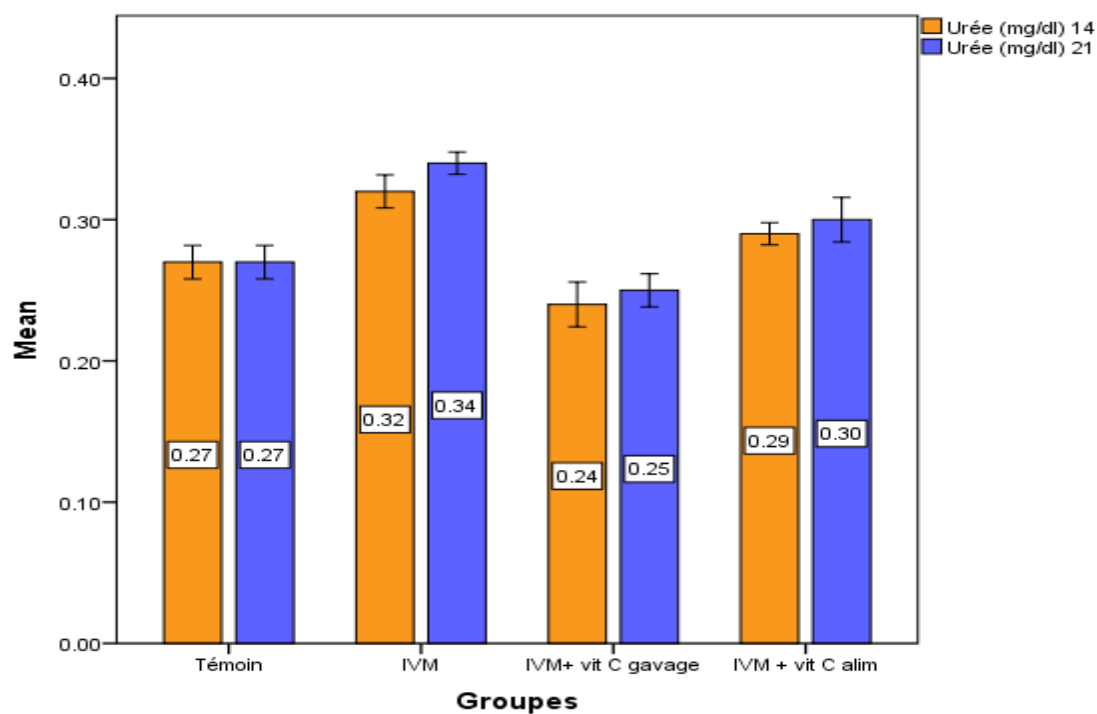


Figure 29 : Variation des taux plasmatiques de l'urée au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. $p > 0,05$

1.5.3. Paramètres biochimiques du bilan lipidique

Comme représenté dans le **Tableau 8**, notre étude a démontré que l'administration de l'IVM a provoqué au 14^{ème} jour du traitement une diminution significative de tous les marqueurs biochimiques de la dyslipidémie (CT (**Figure 30**), TG (**Figure 31**), LDL-C (**Figure 32**) et VLDL-C (**Figure 33**)) et les deux facteurs athérogènes LDL-C / HDL-C et CT / HDL-C, à l'exception du taux plasmatique de HDL-C (**Figure 34**) qui est significativement augmenté par rapport au groupe témoin. Egalement, l'indice athérogène du plasma (IAP) a diminué chez le lapin traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. Cependant la co-administration de la vitamine C par gavage ou additionné à l'aliment a entraîné une correction significative de tous les paramètres lipidiques hormis les taux plasmatiques de HDL-C et l'IAP.

Au 21^{ème} jour de l'expérimentation, uniquement les concentrations de TG, LDL-C et le facteur LDL-C / HDL-C restent diminués d'une manière significative chez le groupe injecté par l'IVM comparativement au groupe témoin. Les valeurs des teneurs plasmatiques des différents paramètres lipidiques chez les lapins co-traités par l'IVM + vitamine C sont proches de celles des lapins témoins, ce qui explique l'effet amélioratif continué de la vitamine C jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Tableau 8 : Paramètres biochimiques du bilan lipidique des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	CT (g/l)	1,05 ± 0,001	0,78 ± 0,001^a	0,86 ± 0,24^b	0,66 ± 0,10
	TG (g/l)	1,75 ± 0,004	0,11 ± 0,002^a	1,17 ± 0,16^b	0,94 ± 0,24^c
	HDL-C (g/l)	0,29 ± 0,003	0,39 ± 0,001^a	0,34 ± 0,07	0,27 ± 0,03
	LDL-C (g/l)	0,41 ± 0,002	0,21 ± 0,003^a	0,30 ± 0,12^b	0,19 ± 0,10^c
	VLDL-C (g/l)	0,35 ± 0,01	0,23 ± 0,04^a	0,24 ± 0,03^b	0,17 ± 0,08^c
	TC/HDL-C	3,62 ± 0,001	2,22 ± 0,003^a	2,49 ± 0,23^b	2,32 ± 0,27^c
	LDL-C/HDL-C	1,41 ± 0,002	0,58 ± 0,001^a	0,82 ± 0,33^b	0,70 ± 0,29^c
	IAP	0,83 ± 0,001	-2,66 ± 0,002	-0,15 ± 0,17	0,15 ± 0,09
21^{ème} jour	CT (g/l)	0,93 ± 0,05	0,83 ± 0,10	0,85 ± 0,17	0,73 ± 0,08
	TG (g/l)	1,10 ± 0,17	0,87 ± 0,12^a	0,90 ± 0,24^b	0,84 ± 0,18
	HDL-C (g/l)	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,06
	LDL-C (g/l)	0,37 ± 0,03	0,28 ± 0,07^a	0,27 ± 0,08^b	0,21 ± 0,07^c
	VLDL-C (g/l)	0,21 ± 0,07	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01
	TC/HDL-C	2,53 ± 0,19	2,34 ± 0,20	2,19 ± 0,37^b	1,82 ± 0,12^c
	LDL-C/HDL-C	1,0 ± 0,11	0,79 ± 0,15^a	0,71 ± 0,23^b	0,47 ± 0,11^c
	IAP	0,11 ± 0,08	-0,17 ± 0,06	-0,20 ± 0,11	-0,17 ± 0,15

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

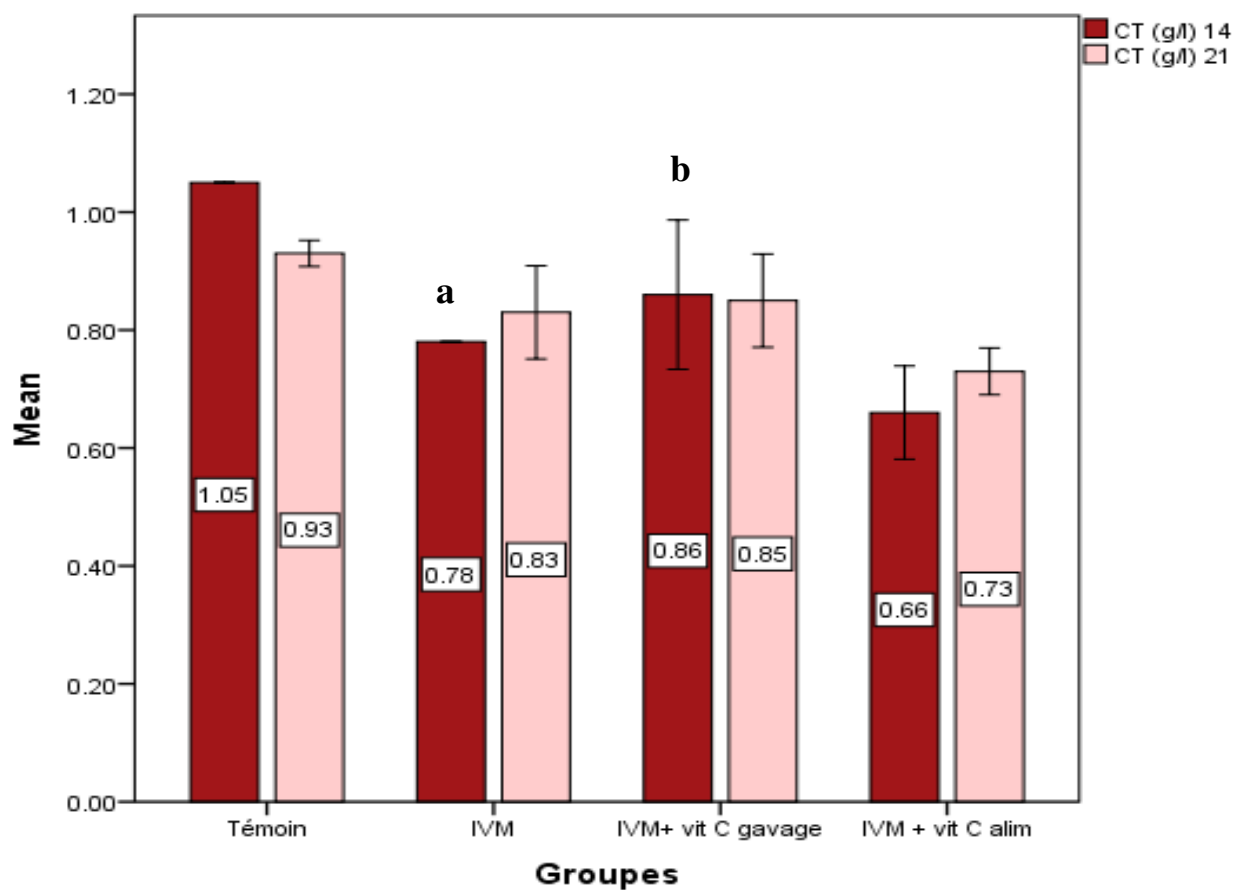


Figure 30 : Variation des taux plasmatiques du cholestérol total (CT) au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a** et **b** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).

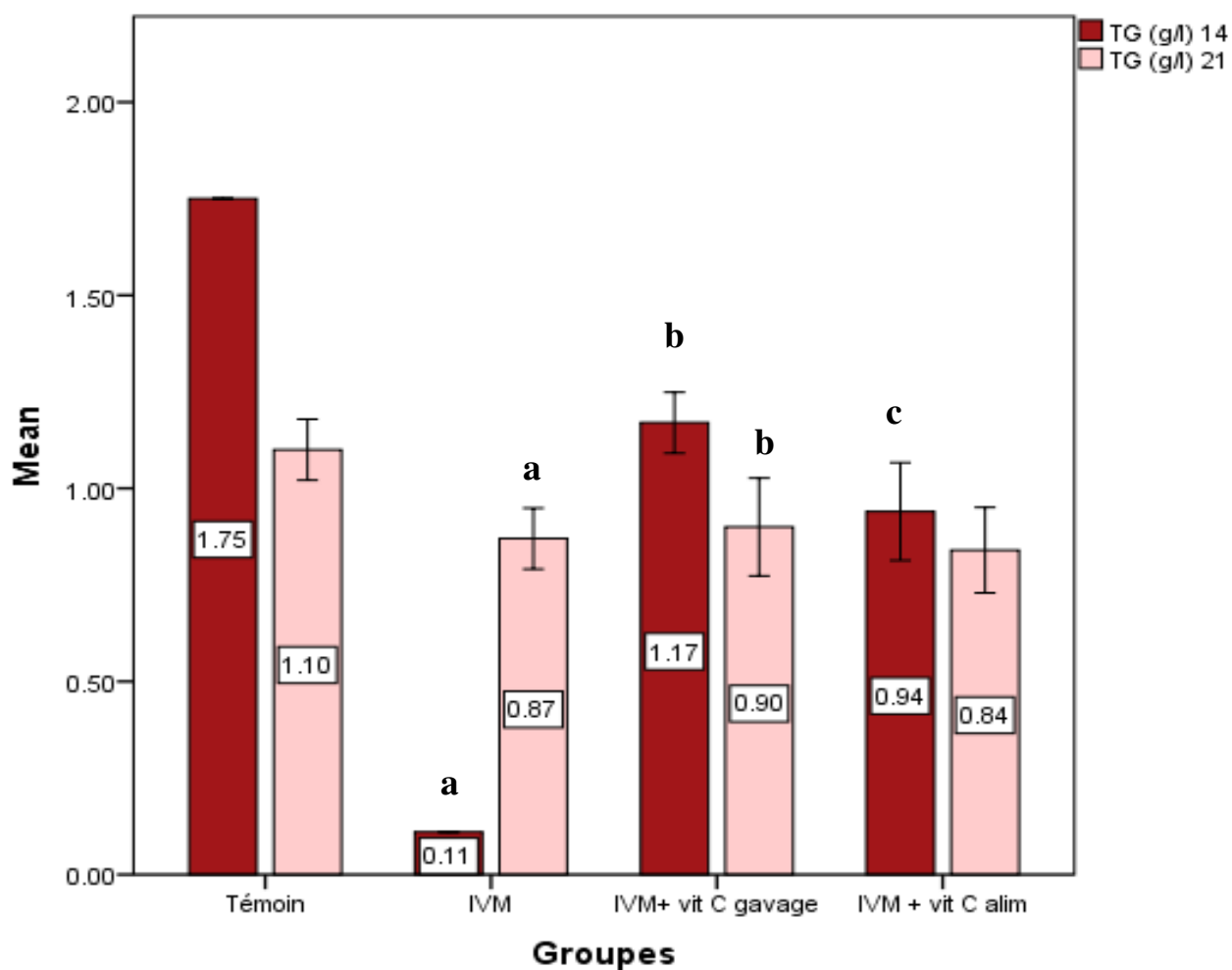


Figure 31 : Variation des taux plasmatiques des triglycérides (TG) au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

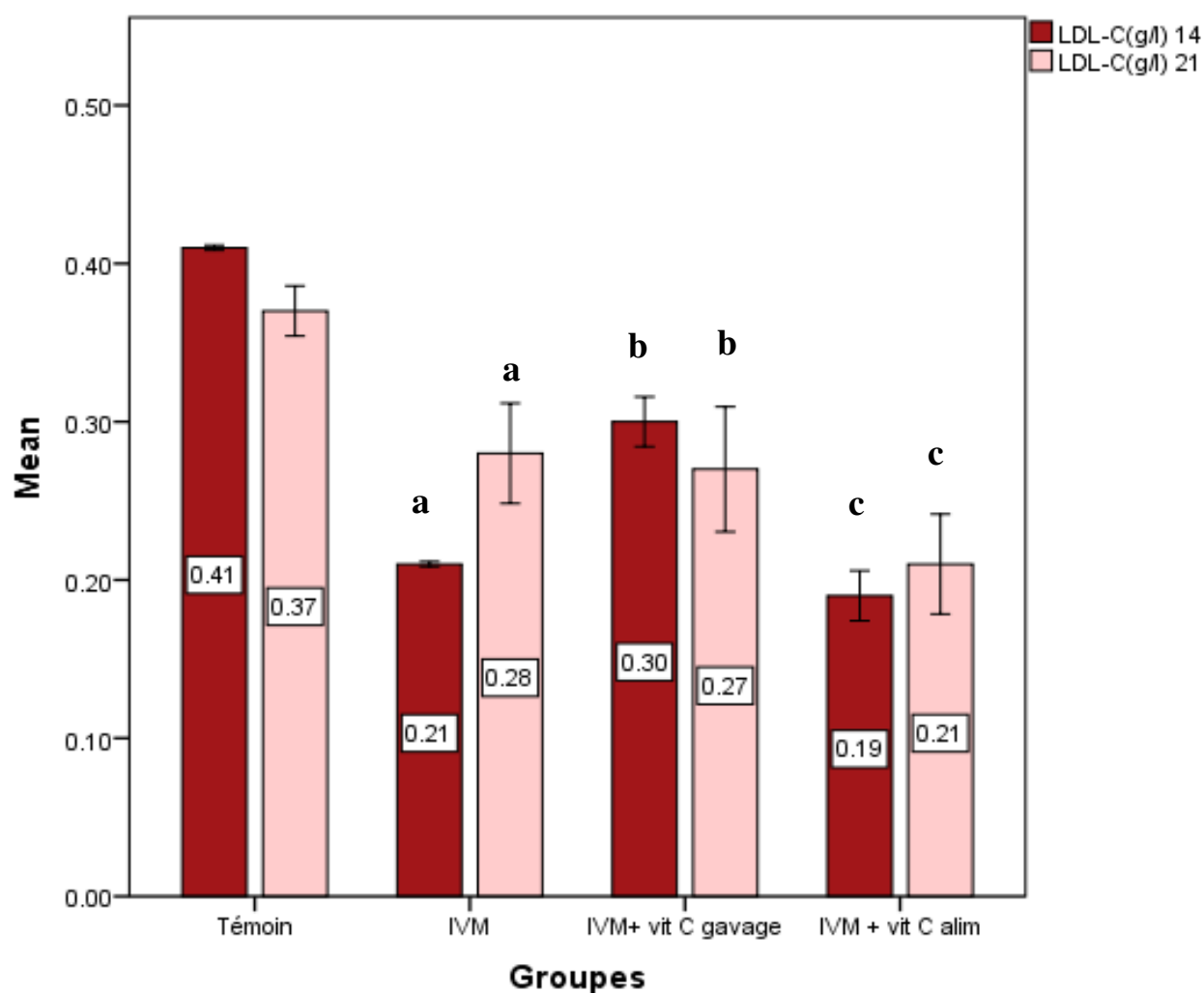


Figure 32 : Variation des taux plasmatiques de LDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

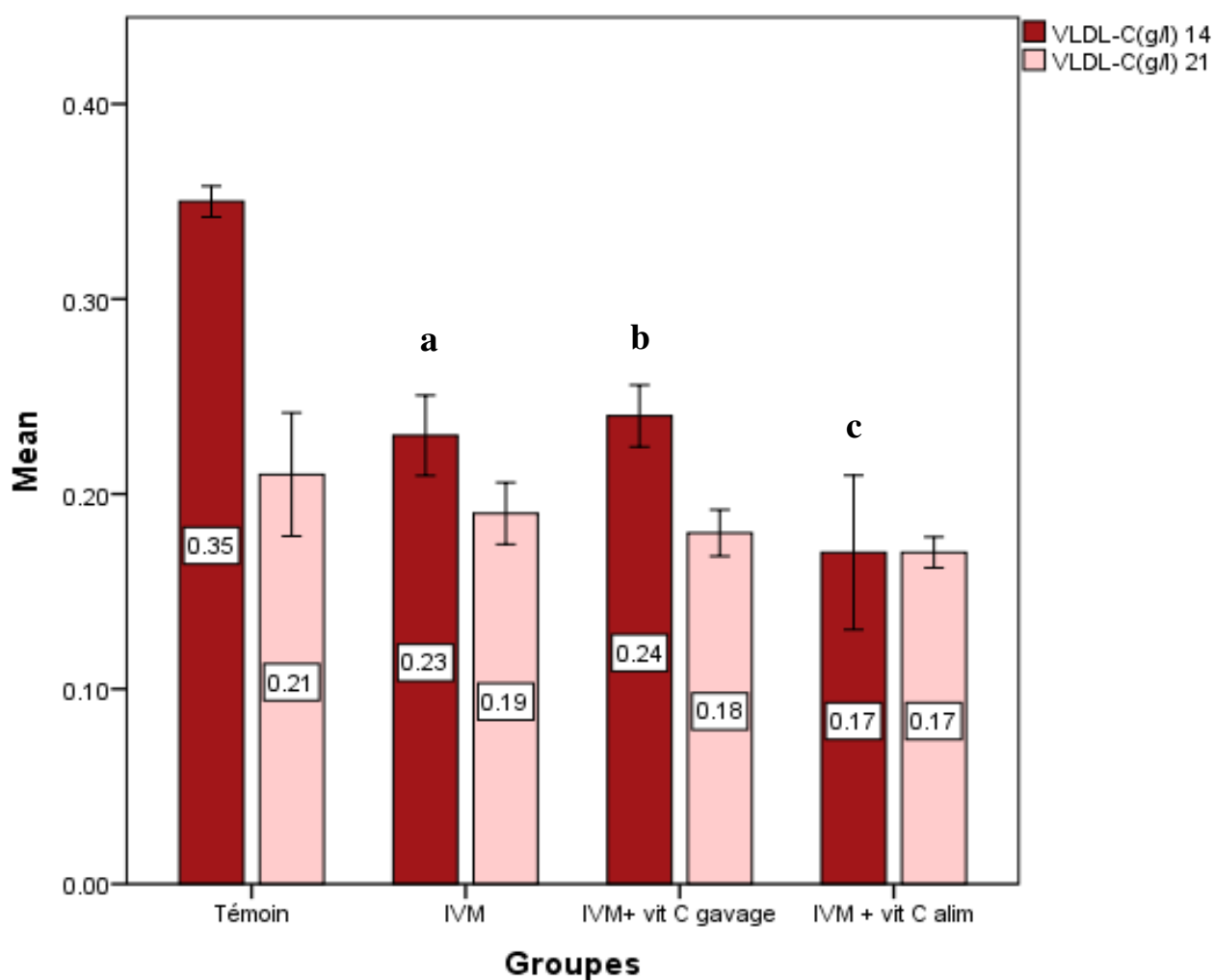


Figure 33 : Variation des taux plasmatiques de VLDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

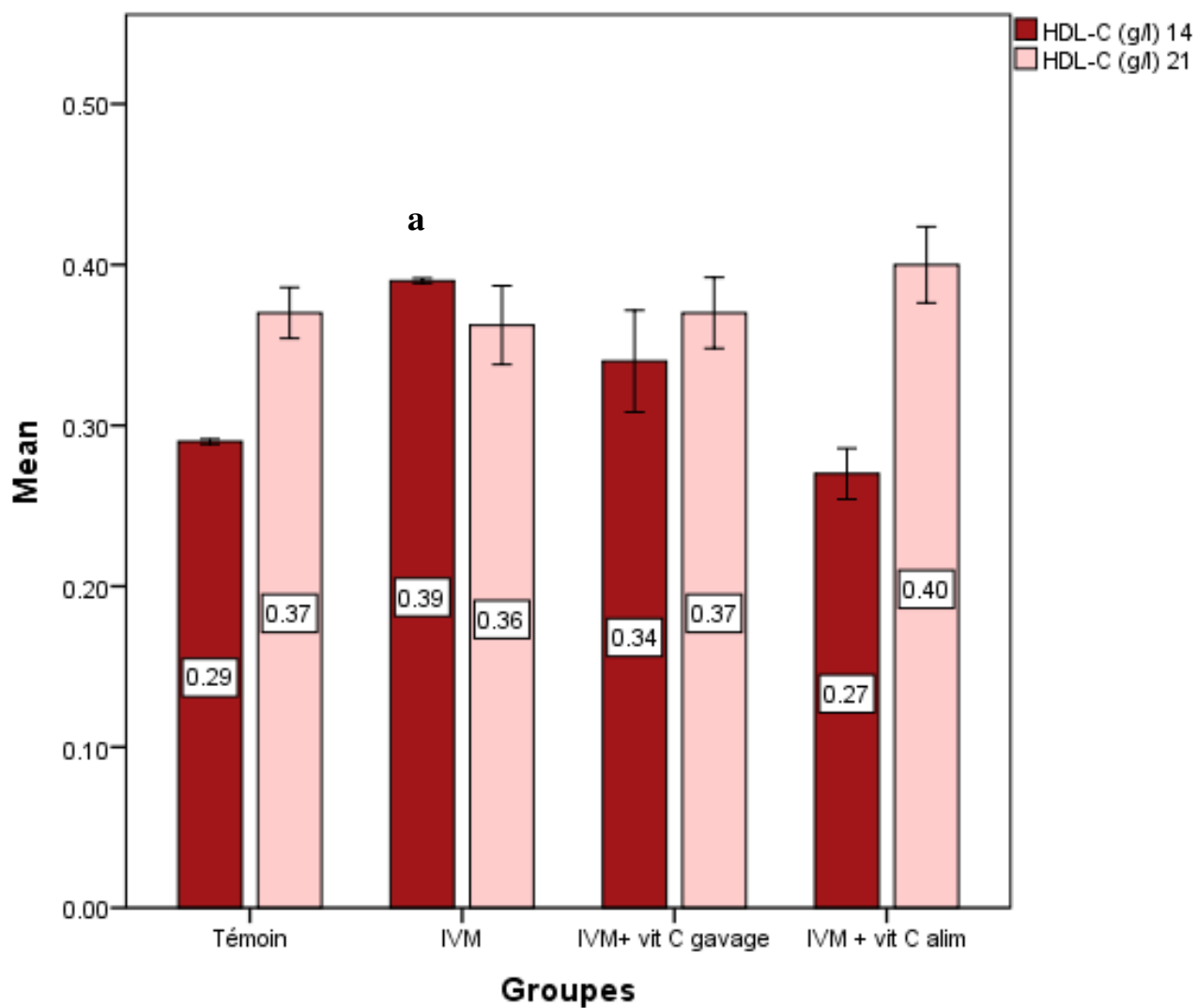


Figure 34 : Variation des taux plasmatiques d'HDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a: $p < 0,05$** (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin).

1.6. Résultats histologiques

1.6.1. Histopathologie du foie

❖ Histopathologie du foie chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du foie chez les lapins témoins ont montré une architecture hépatique normale.

Le parenchyme hépatique des lapins est composé de plusieurs lobules hépatiques, chaque lobule est de forme polygonale, au centre duquel se trouve la veine centrolobulaire (VCL) et il est limité par plusieurs espaces portes (P) (**Planche 1A**).

A partir de chaque VCL rayonnent des travées d'hépatocytes (H), de forme polygonale avec un noyau central, séparées par de larges canaux vasculaires appelés sinusoides (S) (**Planche 1B**).

❖ Histopathologie du foie chez les lapins traités par l'AVIMEC®

L'examen histologique du foie a révélé chez les animaux traités par l'IVM pendant 21 jours une architecture lobulaire désorganisée (**Planche 2**) par rapport au structure lobulaire des lapins témoins. Cette désorganisation est représentée par :

- Dilatation de la veine centrolobulaire (VCL).
- Dilatation des espaces portes.
- Congestion vasculaire (CV).
- Dilatation des sinusoides (S).
- Altération de la structure des hépatocytes (H).
- Infiltration des cellules inflammatoires (I).

❖ Histopathologie du foie chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

D'après les planches 3 et 4, on a noté que les lapins mâles traités par l'IVM + vitamine C présentent un parenchyme hépatique semblable à celui du groupe témoin.

La **Planche 3** montre une restauration de la structure hépatique chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage comparativement au lot traité par l'IVM.

Selon la **Planche 4**, l'histologie du foie a montré aussi une amélioration remarquable de la structure lobulaire avec une veine centrolobulaire (VCL) et des espaces portes (P) moins dilatés et une faible congestion vasculaire (CV) chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C en aliment.

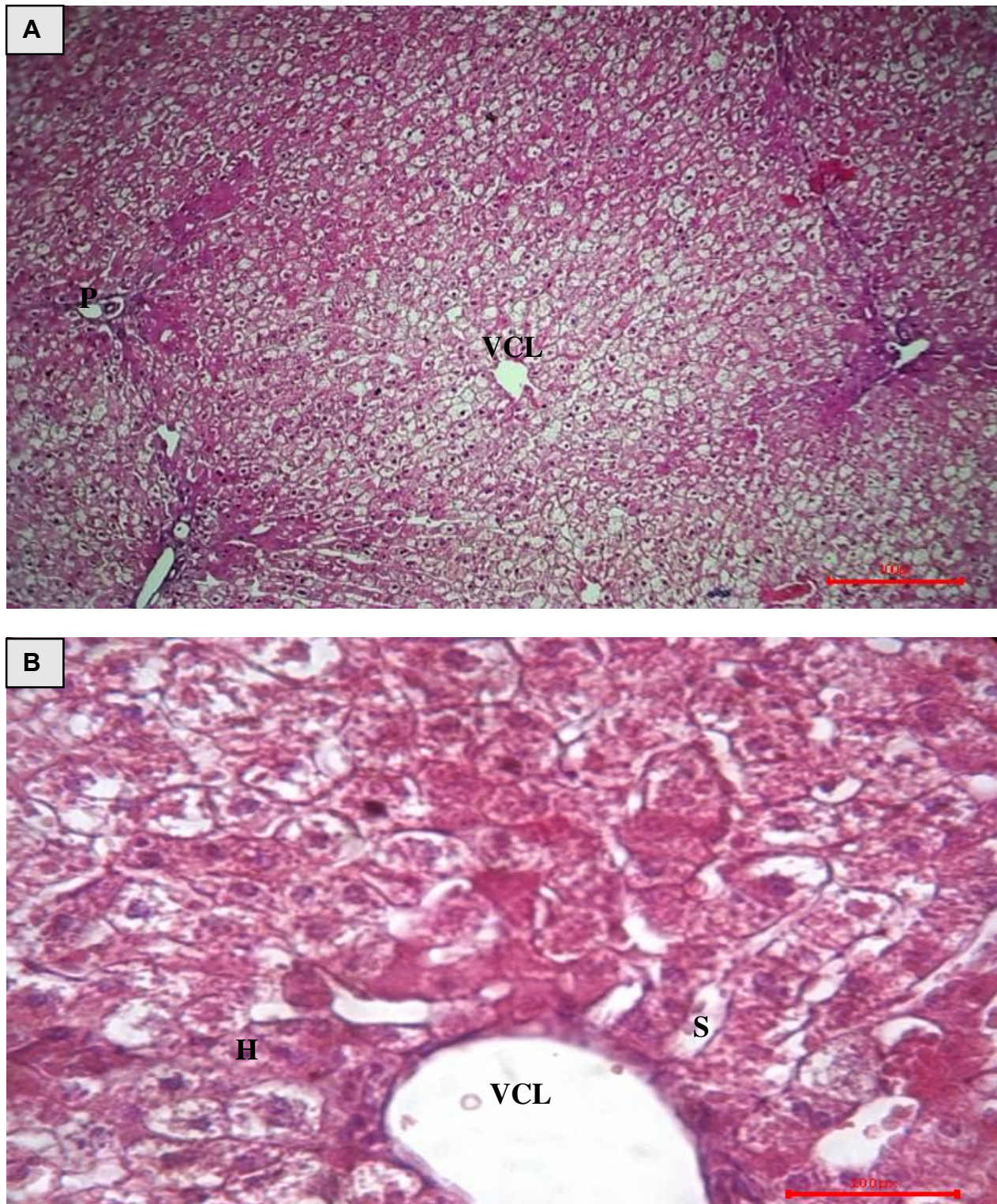


Planche 1 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : structure régulière du lobule hépatique, au centre duquel se trouve la veine centrolobulaire (VCL) et il est limité par les espaces portes (P). le lobule est formé par des travées d'hépatocytes (H) et des sinusoides (S).

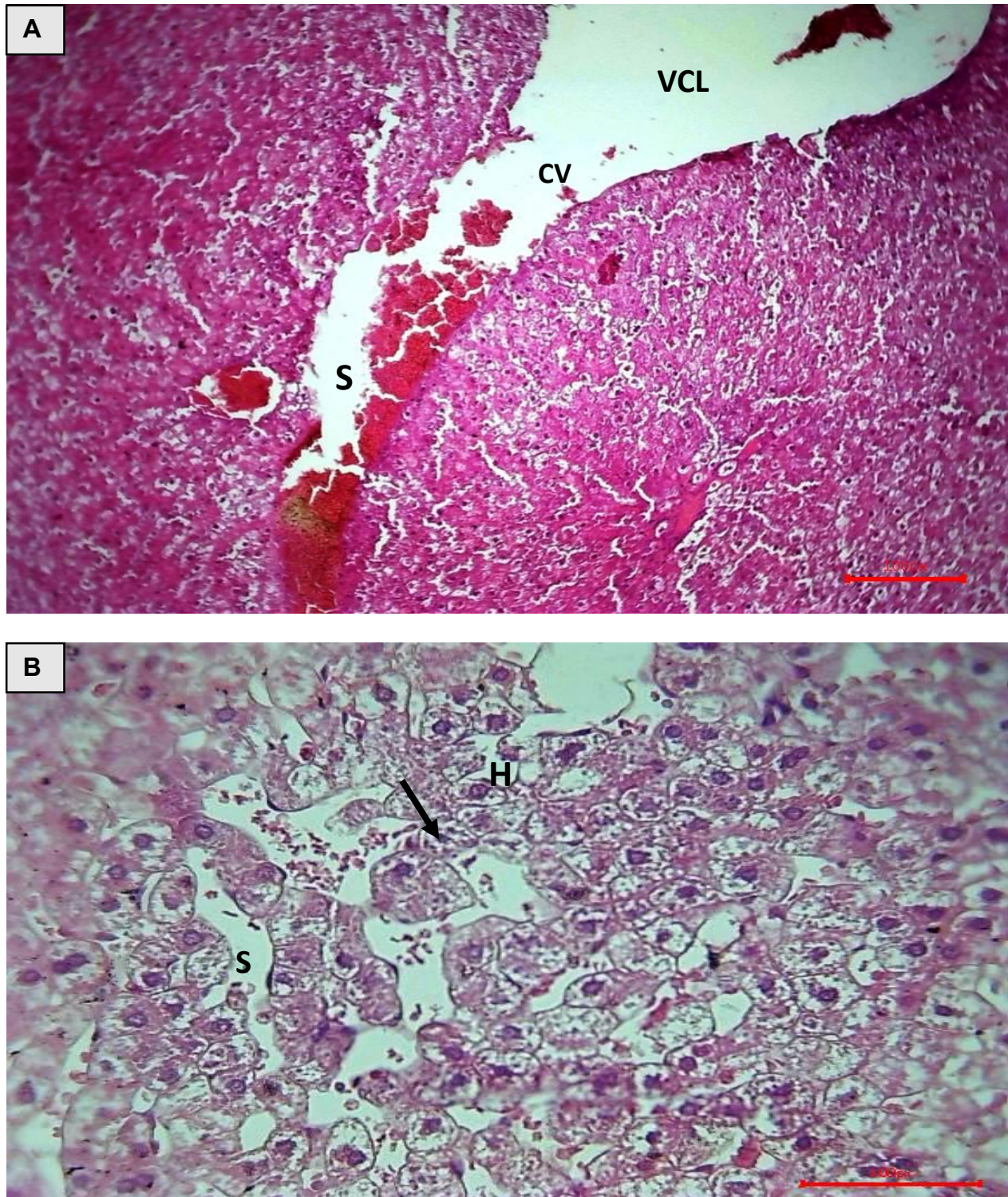


Planche 2 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM (2mg/kg p.c.) . Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : Veine centrolobulaire dilatée (VCL), élargissement des espaces porte et congestion vasculaire (CV). Dilatation des sinusoides (S), désorganisation des hépatocytes (H) et infiltration des cellules inflammatoires (flèche).

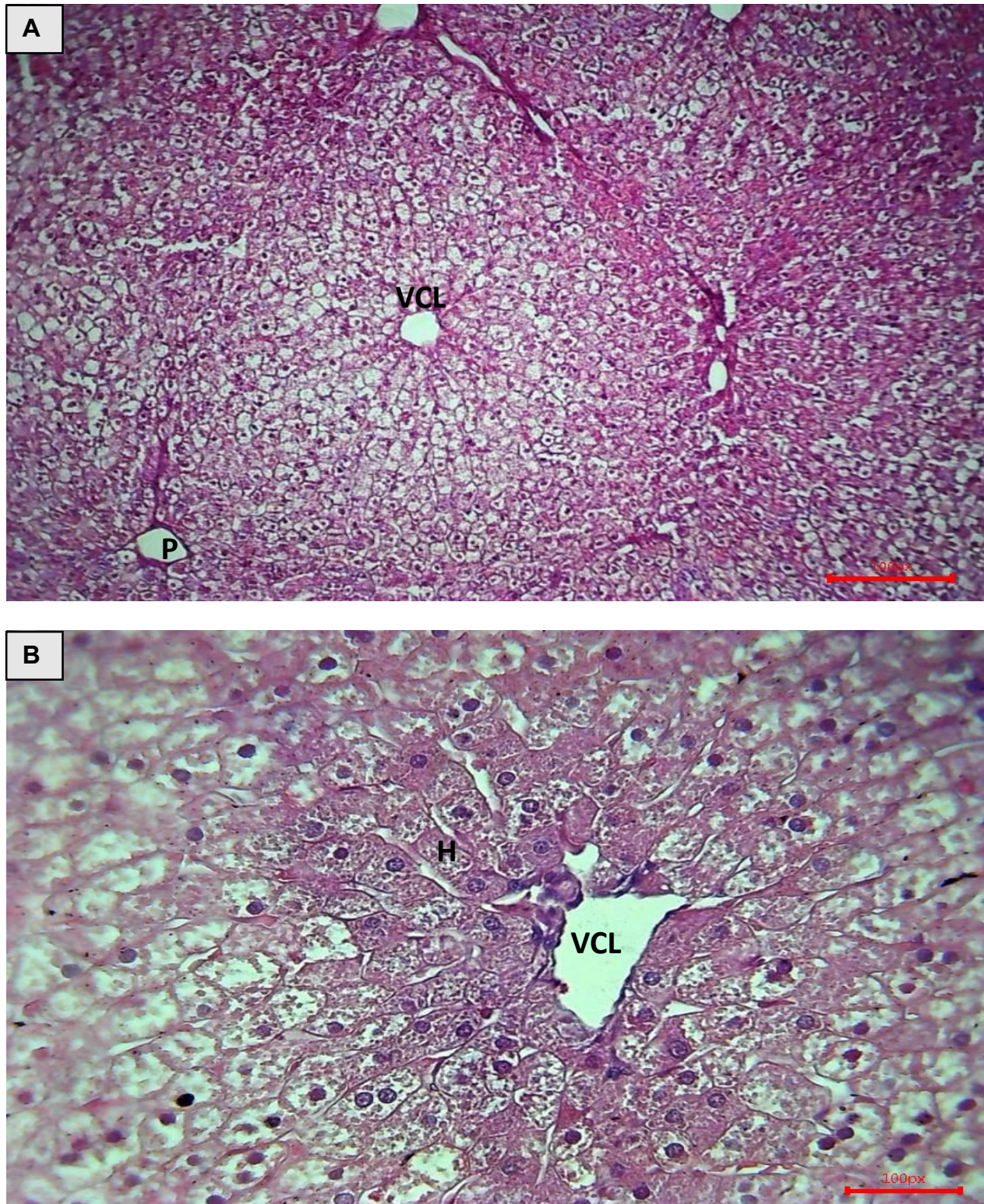


Planche 3 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : amélioration de la structure lobulaire avec une veine centrolobulaire (VCL) moins dilatée et structure normale des travées hépatocytaires (H).

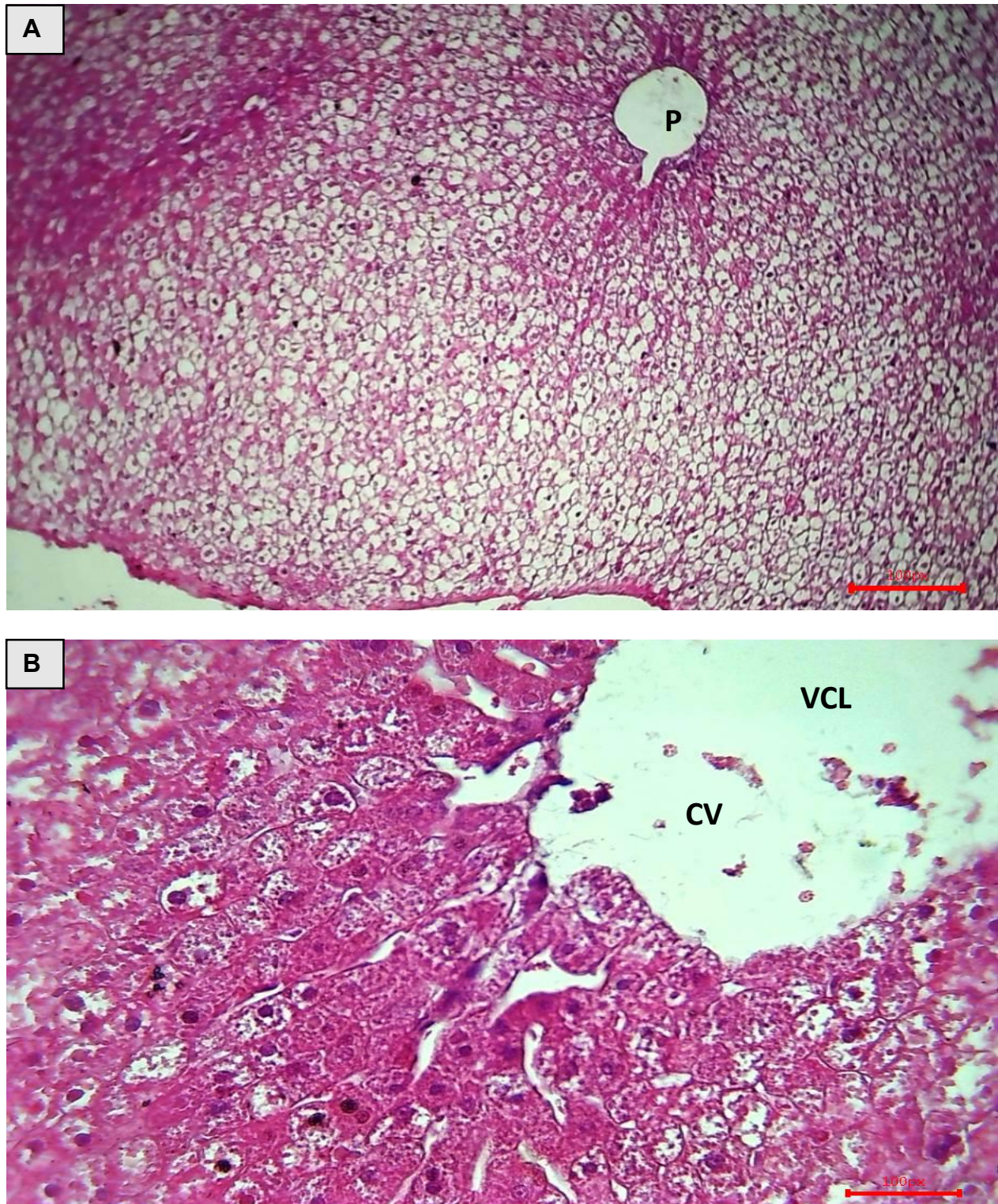


Planche 4 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : restauration de l'architecture du lobule hépatique avec une veine centrolobulaire (VCL) et des espaces portes (P) moins dilatées et une faible congestion vasculaire (CV).

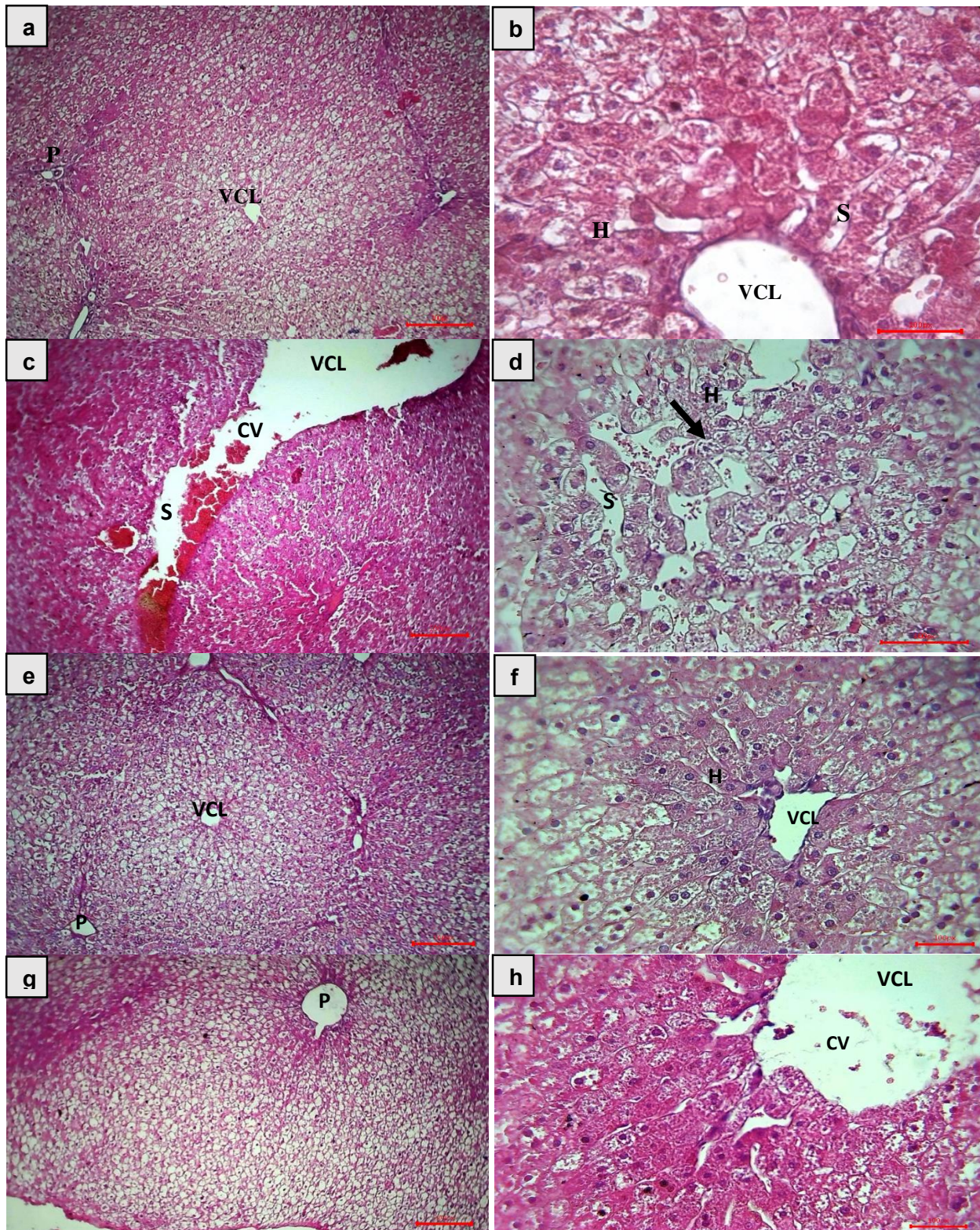


Planche 5 : Aspect histologique du foie des lapins témoins (a et b) montrant une architecture lobulaire normale avec une veine centrolobulaire (CV) et une structure normale des hépatocytes (H) et des sinusoides hépatiques (S). Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant une perte de l'architecture normale des hépatocytes, une veine centrolobulaire dilatée et congestionnée (CV), des sinusoides hépatiques dilatés (S) et un infiltrat des cellules inflammatoires (flèche). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e et f) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (g et h) montrant une veine centrolobulaire (CV) et un espace porte (P) normales avec restauration de la structure des hépatocytes (H). Coloration H&E : (a, c, e et g) $\times 100$ et (b, d, f et h) $\times 400$.

1.6.2. Histopathologie du rein

❖ Histopathologie du rein chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du rein chez les lapins témoins ont illustré une structure typique du cortex rénal (**Planche 6**) qui est caractérisée par :

- Le cortex rénal est limité par la capsule rénale (C).
- Histologie normale des glomérules (G) ou corpuscules rénaux qui tendent à se disposer perpendiculairement à la capsule rénale. La capsule de Bowman est une paroi périphérique composée de deux feuillets avec la chambre glomérulaire (CG) au milieu.
- La plus grande partie du tissu qui entoure les glomérules (G) est constituée de tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).

❖ Histopathologie du rein chez les lapins traités par l'AVIMEC®

Selon la **Planche 7**, le cortex rénal des lapins traités par l'AVIMEC® pendant 3 semaines, a révélé une altération du parenchyme rénal à savoir :

- Vacuolisation dans les cellules tubulaires.
- Dilatation de la chambre glomérulaire (DCG).
- Dilatation des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).
- Congestion vasculaire (CV).
- Dilatation des vaisseaux sanguins.
- Hémorragies (H).
- Infiltration des cellules inflammatoires (I).

❖ Histopathologie du rein chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

Comme illustré dans la **Planche 8**, la structure du cortex rénal chez les animaux traités par l'IVM + vitamine C (par gavage ou dans l'aliment) a montré une architecture moins altérée.

Dans ces deux groupes, la chambre glomérulaire (CG) et les tubules rénaux sont moins dilatés, la congestion vasculaire (CV) est faible en comparaison avec le parenchyme rénal des animaux traités seulement par l'IVM.

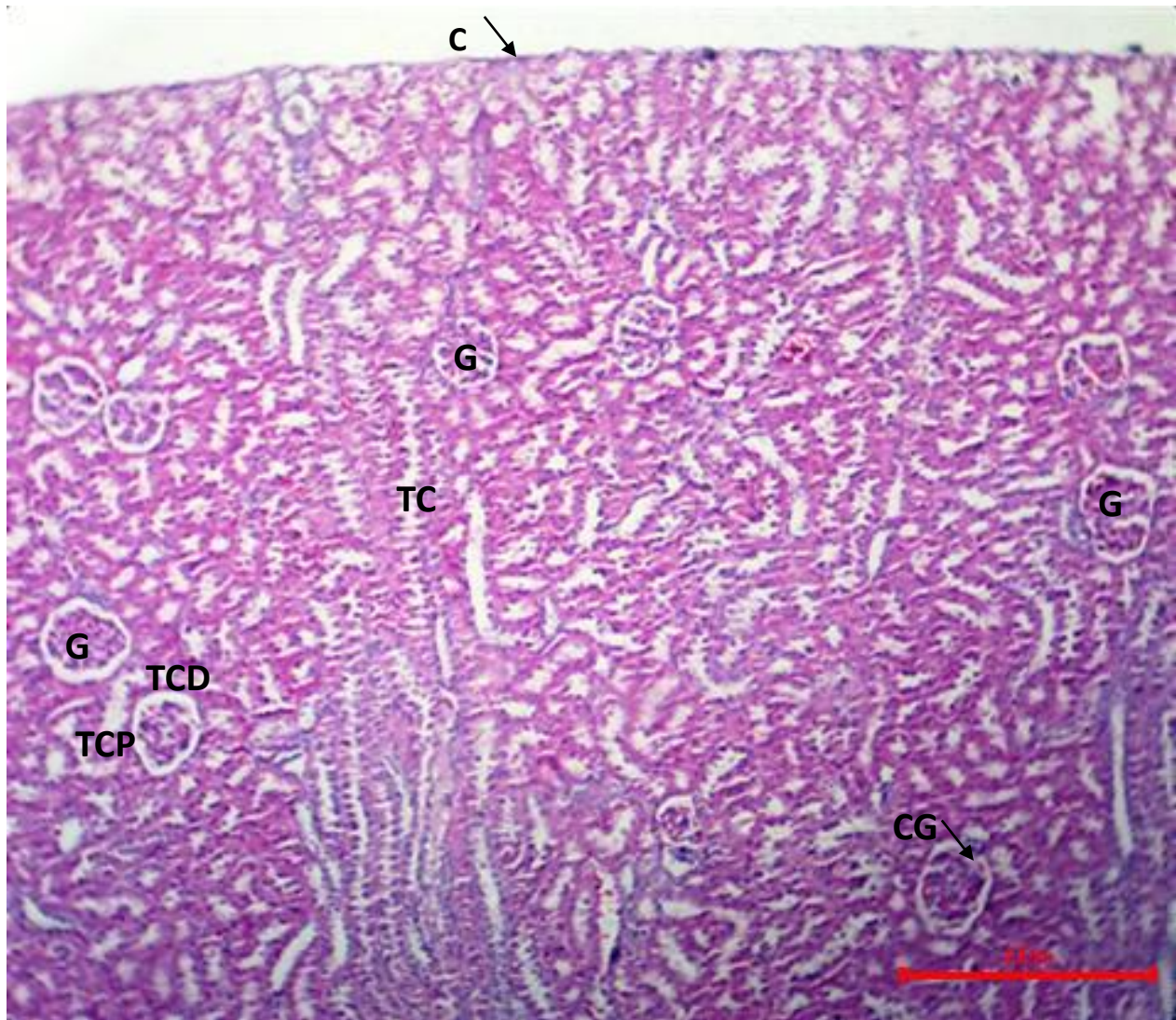


Planche 6 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100. Coloration H&E. légende : un aspect normal du cortex rénal limité par la capsule rénale (C). Une architecture typique des glomérules (G), de la chambre glomérulaire (CG), des tubes collecteurs (TC) et des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).

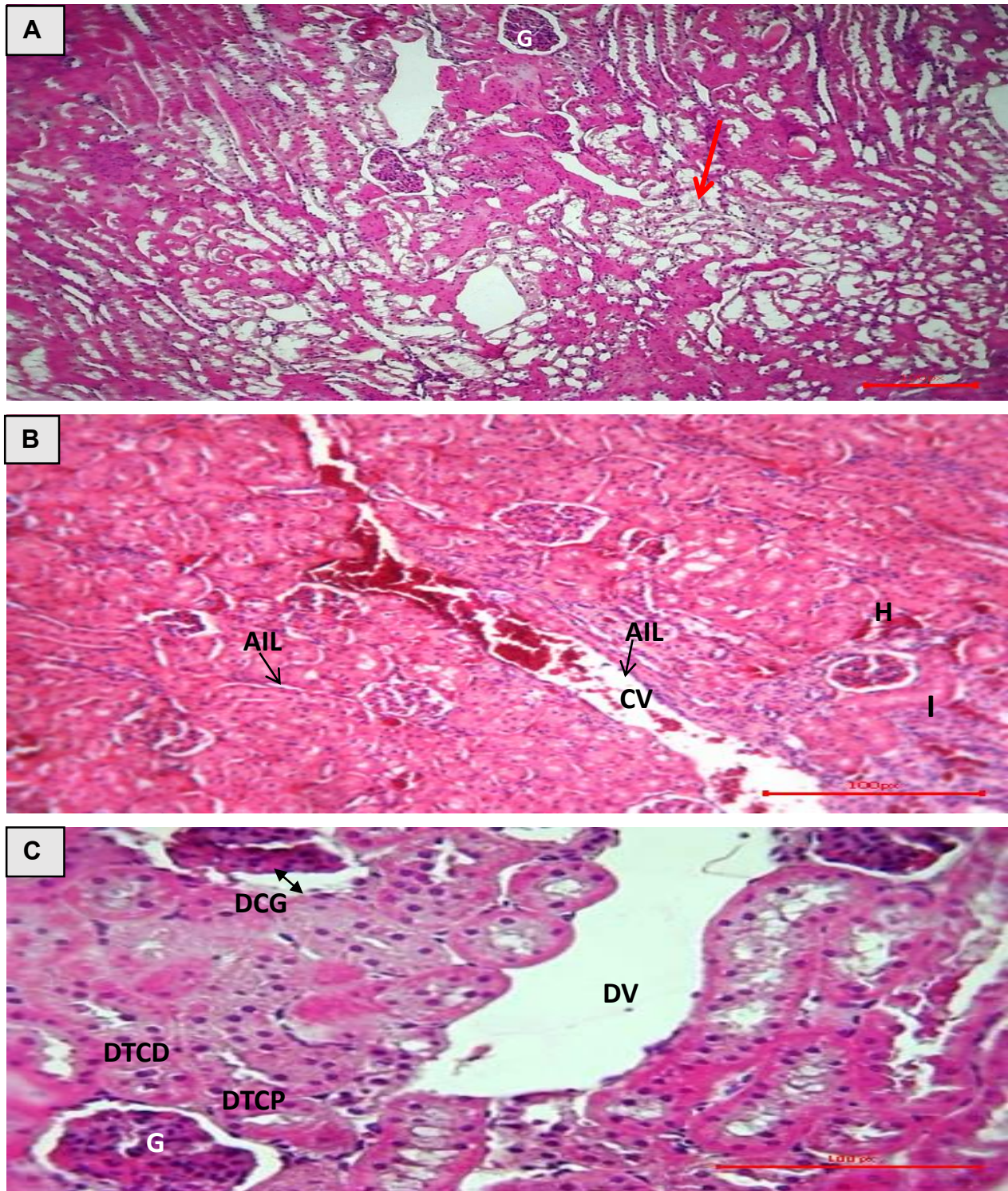


Planche 7 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B), Gx400 (C). Coloration H&E. légende : un cortex rénal présentant des lésions graves avec vacuolisation dans les cellules tubulaires (flèche). Congestion vasculaire (CV) de l'artère interlobaire (AIL), hémorragies (H) et infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires (I). Dilatation vasculaire (DV), dilatation de la chambre glomérulaire (DCG) qui limite le glomérule (G), dilatation des tubules contournés proximaux (DTCP) et distaux (DTCD).

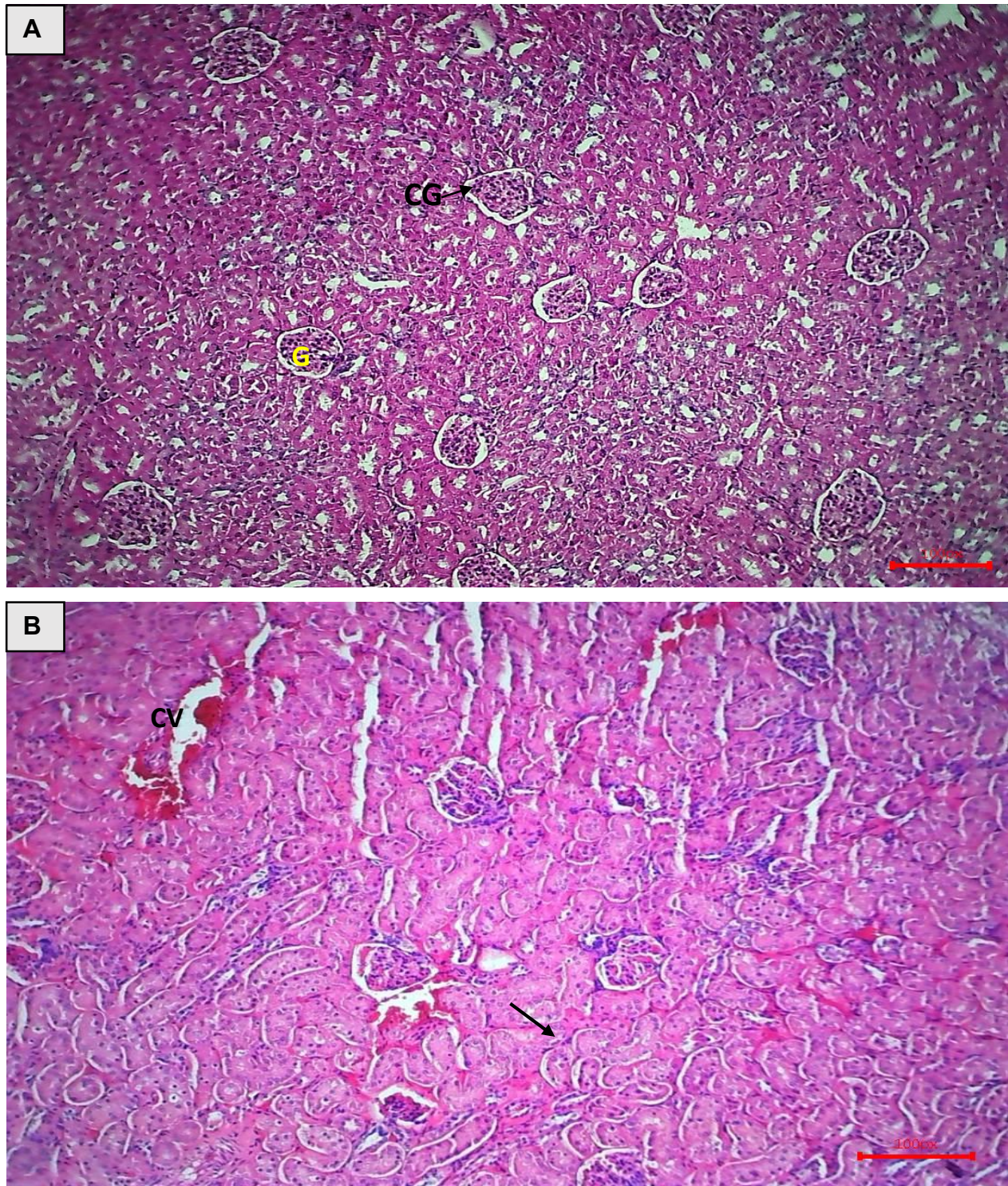


Planche 8 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A: par gavage, B : supplémentée en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. légende : Aspect normal des glomérules avec une chambre glomérulaire (CG) moins dilatée. Une congestion vasculaire (CV) faible et des tubules rénaux moins dilatés (flèche).

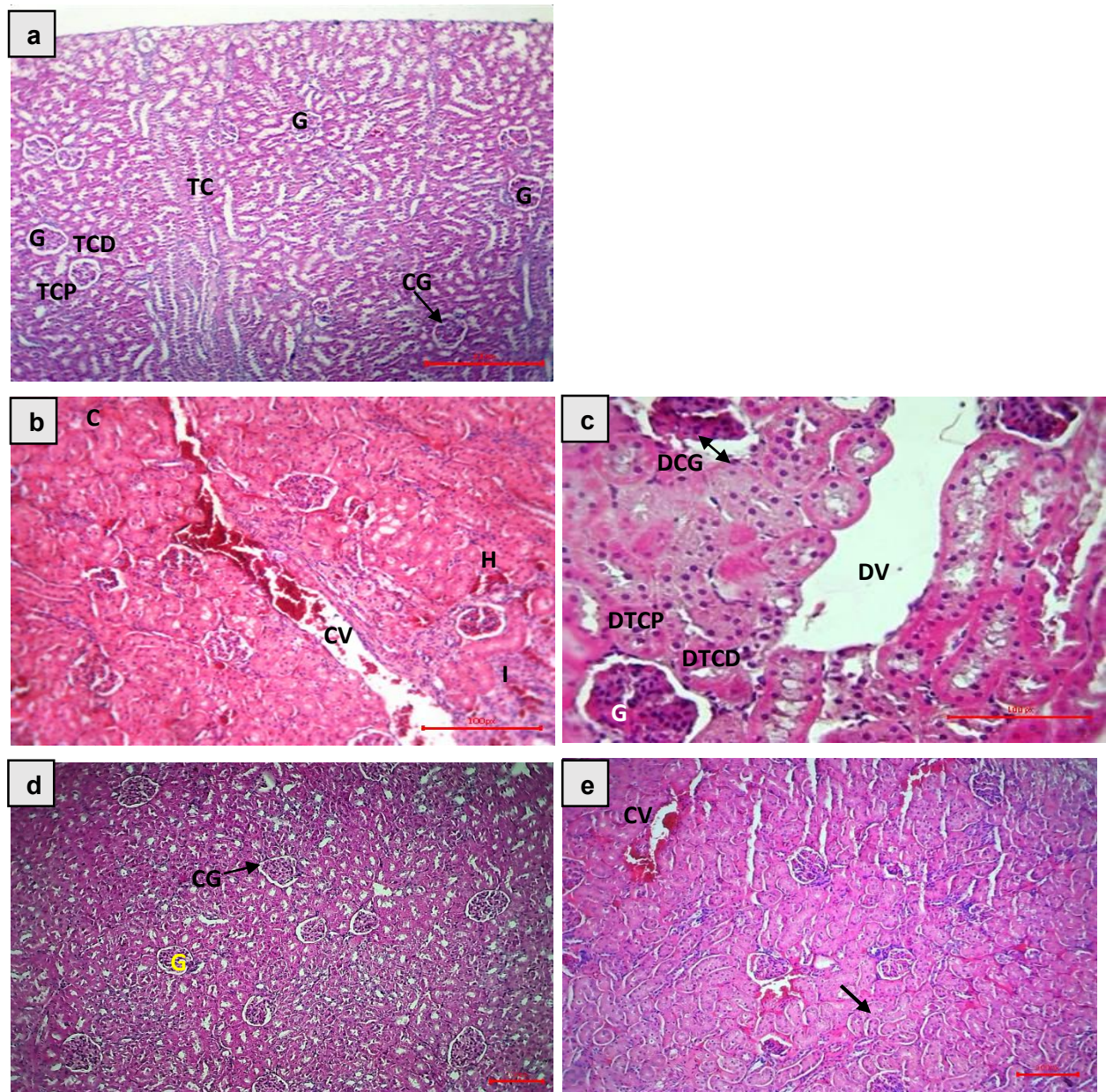


Planche 9 : Aspect histologique du cortex rénal des lapins témoins (a) montrant un aspect normal du cortex rénal limité par la capsule rénale. Une architecture typique des glomérules (G), de la chambre glomérulaire (CG), des tubes collecteurs (TC) et des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD). Du groupe traité par l'IVM (b et c), montrant une congestion vasculaire (CV) de l'artère interlobaire, hémorragies (H), infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires (I), dilatation vasculaire (DV), dilatation de la chambre glomérulaire (DCG) qui limite le glomérule (G) et dilatation des tubules contournés proximaux (DTCP) et distaux (DTCD). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (d) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (e) montrant un aspect normal des glomérules avec une chambre glomérulaire (CG) moins dilatée. Une congestion vasculaire (CV) faible et des tubules rénaux moins dilatés (flèche). Coloration H&E : (a, b, d et e) $\times 100$ et (c) $\times 400$.

1.6.3. Histopathologie du poumon

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins témoins

Selon les coupes histologiques montrées dans la **Planche 10**, le poumon des lapins témoins est caractérisé par une architecture normale de ses différents composants comme suivant :

- La bronche intrapulmonaire (BI) est identifiée par les plaques environnantes du cartilage hyalin (C) et elle est tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudo-stratifié dont la lumière montre des plis muqueux.
- La bronchiole (B) est caractérisée par sa lumière tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudo-stratifié avec des plis muqueux. Par contre les plaques du cartilage hyalin sont absentes.
- La bronchiole respiratoire (BR) est directement liée aux canaux alvéolaires qui se terminent par des sacs d'alvéoles pulmonaires (A).

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins traités par l'AVIMEC®

Chez le groupe traité par l'IVM, le tissu pulmonaire a révélé une modification sévère des différentes structures pulmonaires (**Planche 11**) dont les plus marquées sont :

- Une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux et une altération des plaques du cartilage hyalin.
- Dilatation des bronches (B) et épaississement de leurs épithéliums.
- Dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaississement de leurs parois
- Dilatation et épaississement des bronchioles respiratoires (BR).
- Hémorragies pulmonaires (H)
- Congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

Après co-administration de la vitamine C avec l'IVM, l'histologie pulmonaire a montré une amélioration importante des différentes lésions pulmonaires causées par l'IVM injecté seul. Ces modifications sont représentées par les **Planches 12 et 13**.

Selon la **Planche 12**, le poumon des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage a montré :

- une BI semblable à celle du lapin témoin qui est entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers.
- Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP).
- Une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B).

D'après la **Planche 13**, la structure des différents tissus composant le poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (en aliment) a illustré un rétablissement de l'histologie pulmonaire qui est caractérisée par des bronchioles respiratoires (BR), des sacs alvéolaires et des alvéoles (A) moins dilatés avec une paroi moins épaisse par rapport au groupe traité par l'IVM seul.

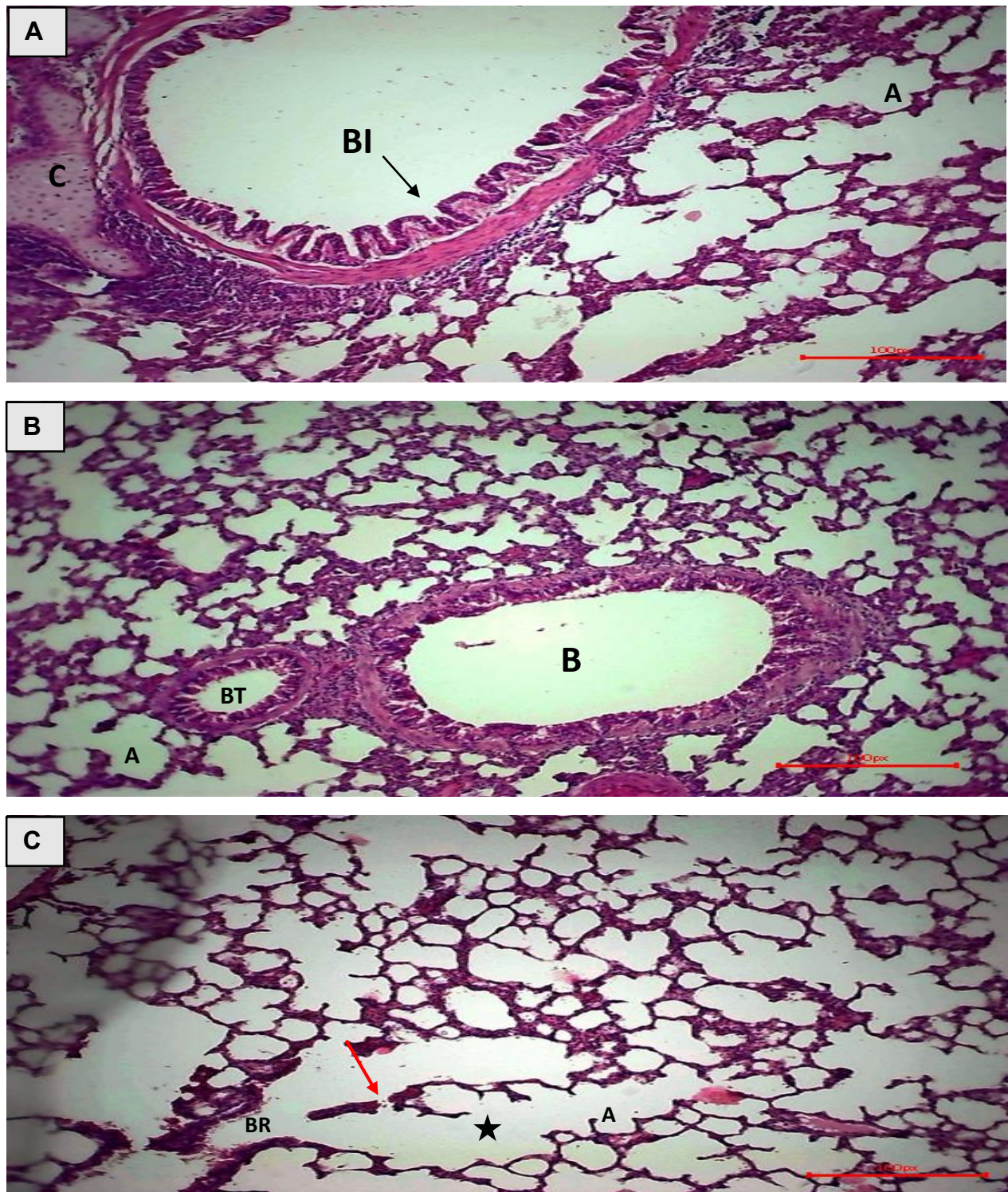


Planche 10 : Aspect histologique du poumon chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (B et C), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : Architecture normale : de l'épithélium de la branche intrapulmonaire (BI) avec des plis muqueux (flèche noire) et des plaques environnantes de cartilage hyalin (C), de bronchiole pulmonaire (B), de bronchiole terminale (BT), de bronchiole respiratoire (BR), des canaux alvéolaires (flèche rouge), des sacs alvéolaires (étoile) et des alvéoles (A).

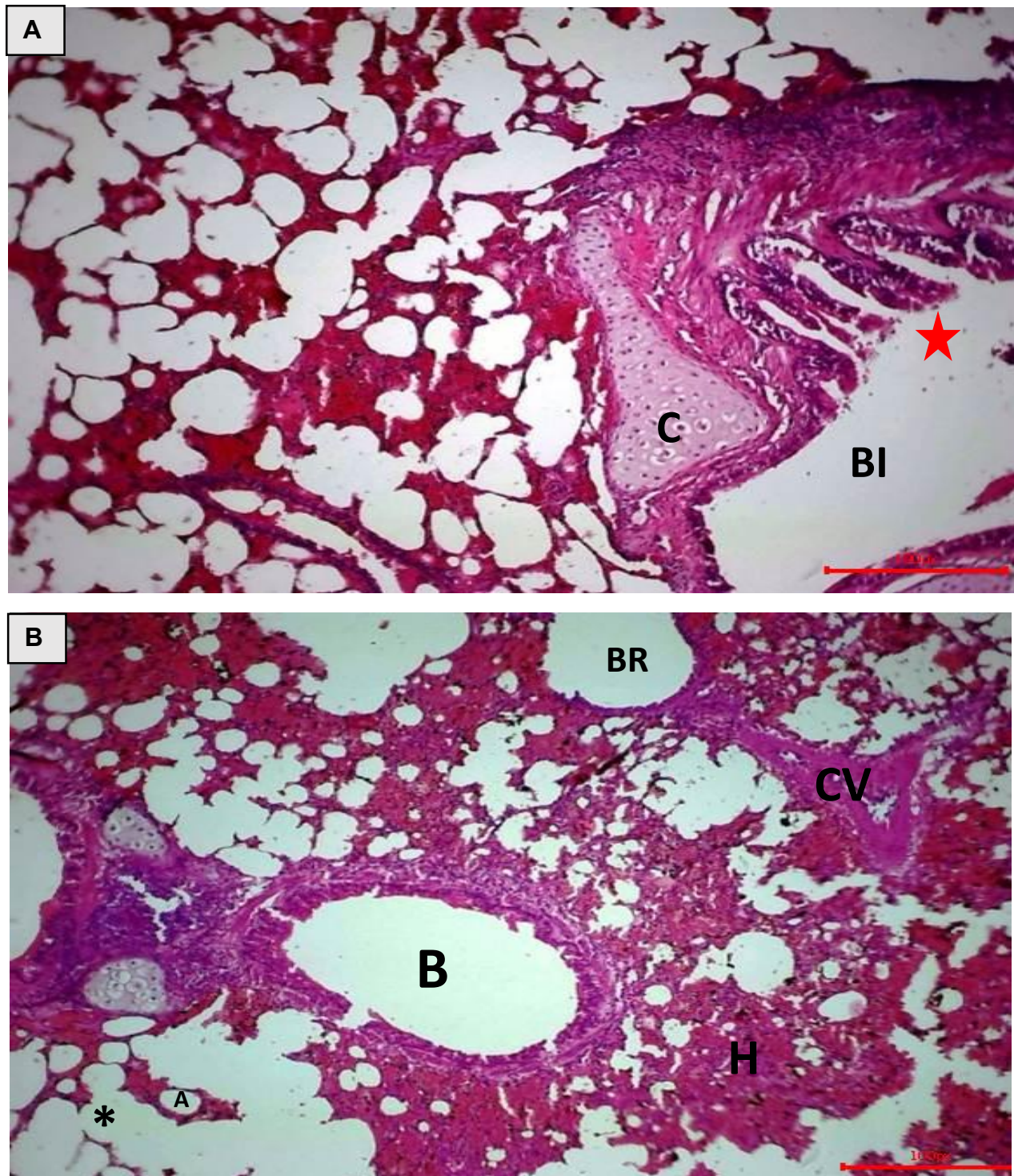


Planche 11 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : Une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux (étoile) et une altération des plaques du cartilage hyalin (C). Dilatation des bronches (B) et épaissement de leurs épithéliums. Dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaissement de leurs parois. Dilatation et épaissement des bronchioles respiratoires (BR). Hémorragies pulmonaires (H). Congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire.

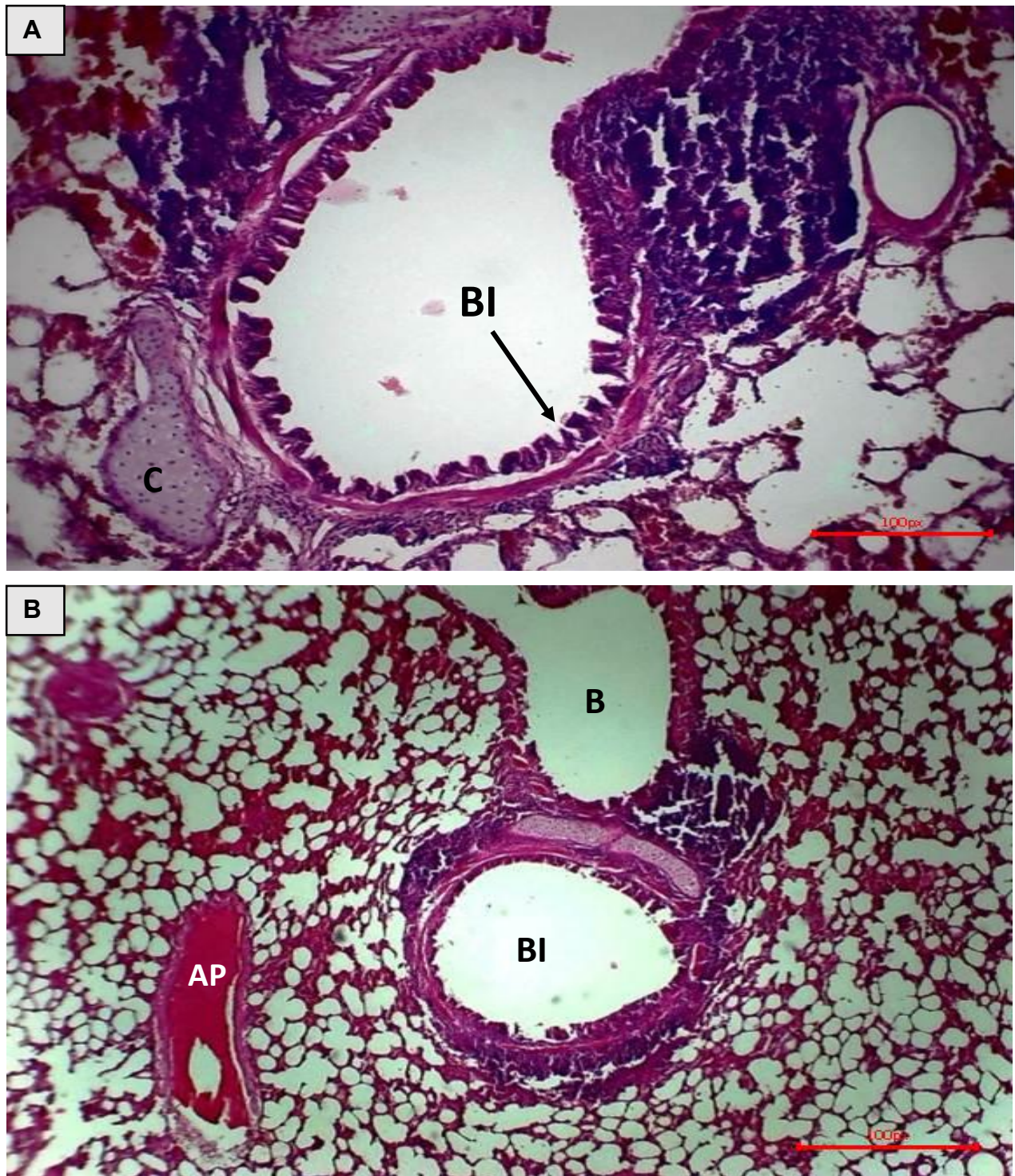


Planche 12: Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : une bronche intrapulmonaire (BI) entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers. Une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B). Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP) et une faible hémorragie pulmonaire.

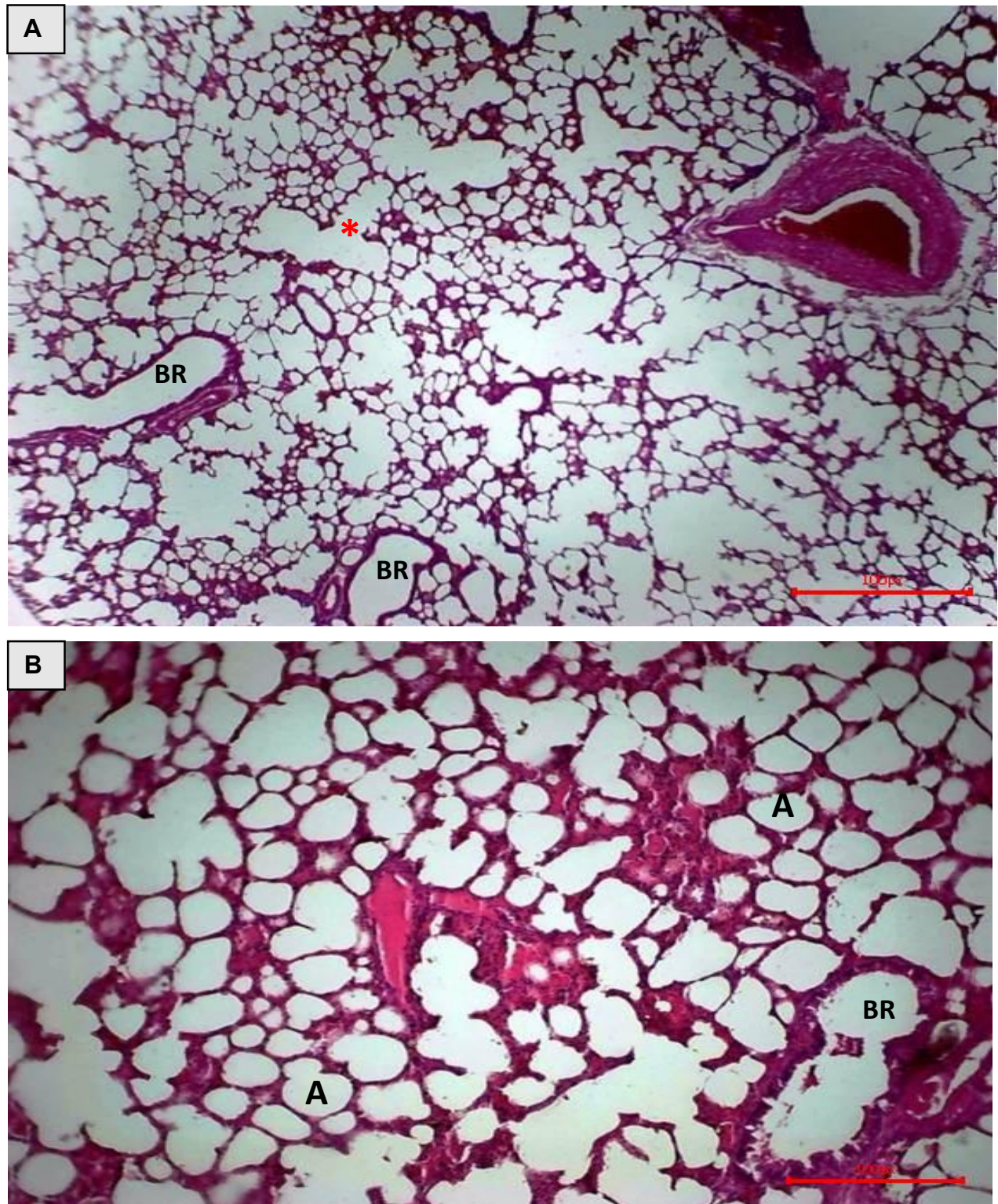


Planche 13 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : des bronchioles respiratoires (BR), des sacs alvéolaires (astérisque) et des alvéoles (A) moins dilatés avec une paroi moins épaisse par rapport au groupe traité par l'IVM seul.

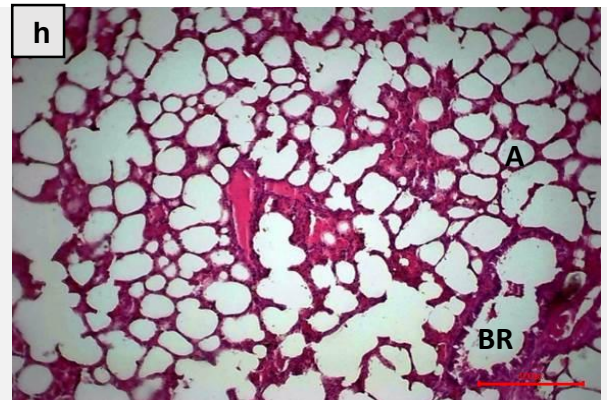
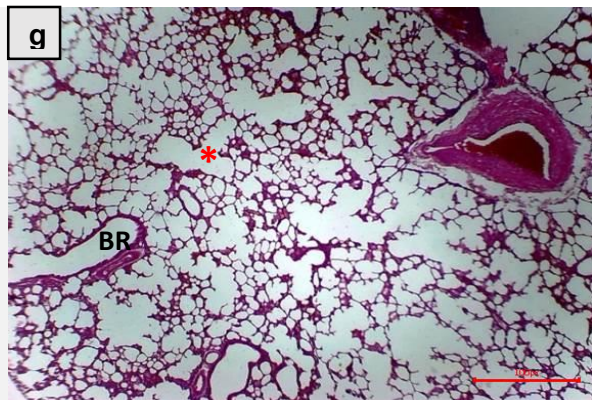
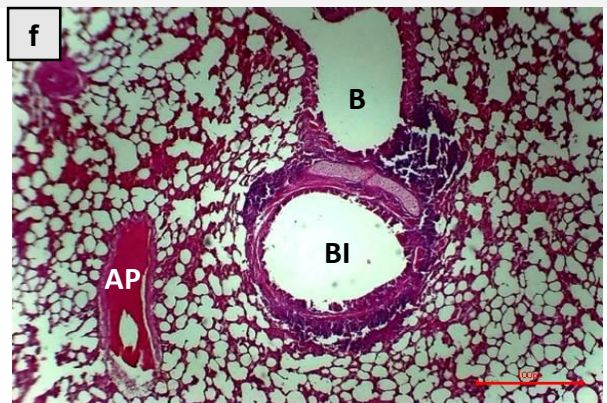
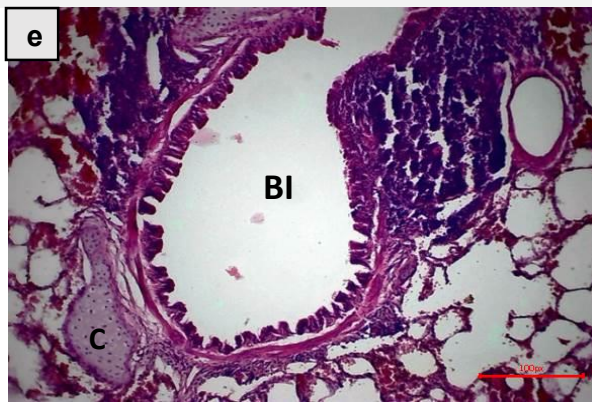
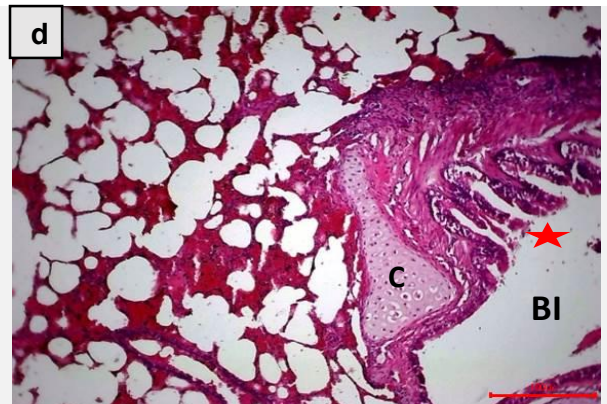
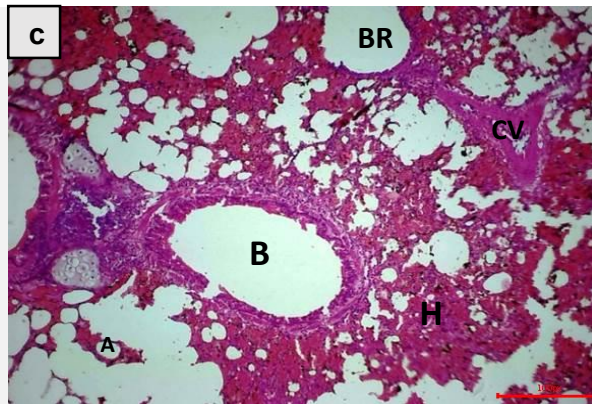
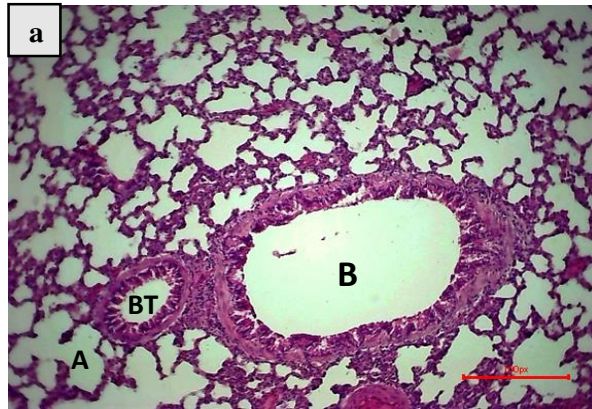


Planche 14 : Aspect histologique du poumon des lapins témoins (a et b) montrant une architecture normale : de l'épithélium de la branche intrapulmonaire (BI) avec des plis muqueux et des plaques environnantes de cartilage hyalin (C), de bronchiole pulmonaires (B), de bronchiole terminale (BT), des sacs alvéolaires et des alvéoles (A). Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux (étoile) et une altération des plaques du cartilage hyalin (C), dilatation des bronches (B) et épaississement de leurs épithéliums, dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaississement de leurs parois, dilatation et épaississement des bronchioles respiratoires (BR), hémorragies pulmonaires (H) et congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e et f) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (g et h) montrant une bronche intrapulmonaire (BI) entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers, une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B) et respiratoire (BR). Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP) et une faible hémorragie pulmonaire. Coloration H&E : (a, c, f et g) $\times 100$ et (b, d, e et h) $\times 400$.

1.6.4. Histopathologie du système nerveux centrale

➤ Histopathologie du cortex cérébral

❖ Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du cortex cérébral chez les lapins témoins ont révélé une architecture typique des différentes cellules nerveuses (neurones) constituant les 6 couches du cortex cérébral (matière grise du cerveau). La **Planche 15** représente l'aspect histologique du cortex cérébral chez le groupe témoin qui est marqué par :

- Le cortex cérébral est constitué par 6 couches dont la structure des cellules nerveuses qui les composent est typique :
 1. La couche moléculaire (recouverte par la pie mère).
 2. La couche granulaire externe.
 3. La couche pyramidale externe.
 4. La couche granulaire interne.
 5. La couche pyramidale interne.
 6. La couche multiforme.
- La couche granulaire interne (4) est composée par des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de structure normale.

❖ **Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins traités par l'AVIMEC®**

La **Planche 16** montre l'aspect histologique du cortex cérébral après un traitement de 21 jours par l'AVIMEC®, cette structure histologique est caractérisée par :

- Un neuropile (tissu glial du soutien) vacuolisé au niveau des différentes couches du cortex cérébral.
- La couche granulaire interne (4) est très dense et chargée avec des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée.
- La couche pyramidale interne (5) a montré des cellules pyramidales (Py) de forme irrégulière entourées d'un halo.
- Congestion vasculaire (CV).
- Une nécrose (N) des cellules nerveuses.

❖ **Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C**

Les aspects histologiques du cortex cérébral des lapins traités par l'IVM + vitamine C (par gavage et supplémentée dans l'aliment) sont comparables et sont illustrés par la **Planche 17** dont ils sont caractérisés par :

- Un neuropile (tissu glial du soutien) moins vacuolisé du cortex cérébral.
- Une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.

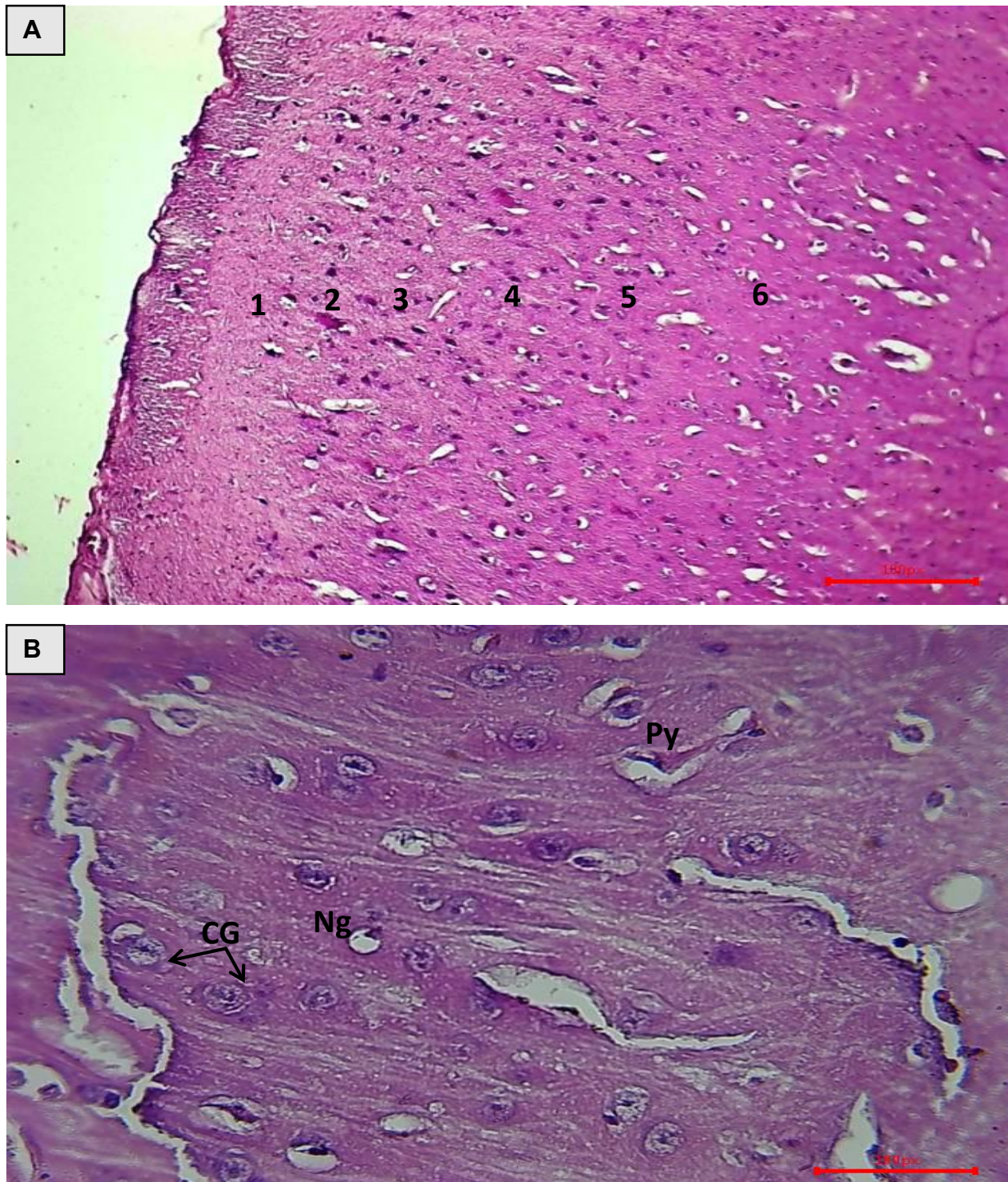


Planche 15 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : une architecture normale des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral (1: couche moléculaire; 2: couche granulaire externe; 3: couche pyramidale externe; 4: couche granulaire interne; 5: couche pyramidale interne; 6: couche multiforme). Structure typique des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de la couche granulaire interne.

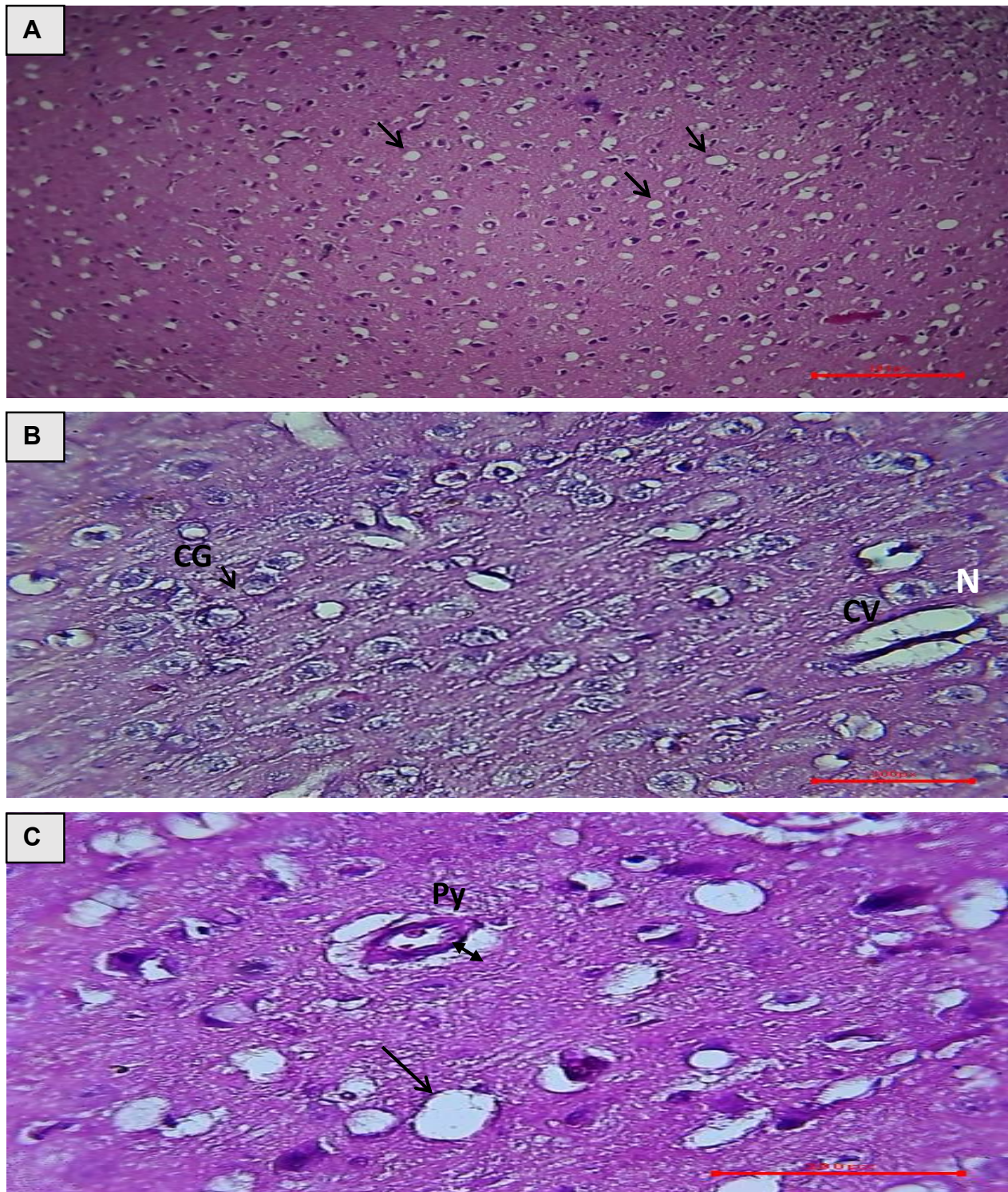


Planche 16 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B et C). Coloration H&E. Légende : Un neuropile vacuolisé (flèche) au niveau des différentes couches du cortex cérébral. La couche granulaire interne est très dense et chargée avec des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée. Une congestion vasculaire (CV) et une nécrose (N) des cellules nerveuses. La couche pyramidale interne a montré des cellules pyramidales (Py) de forme irrégulière entourées d'un halo.

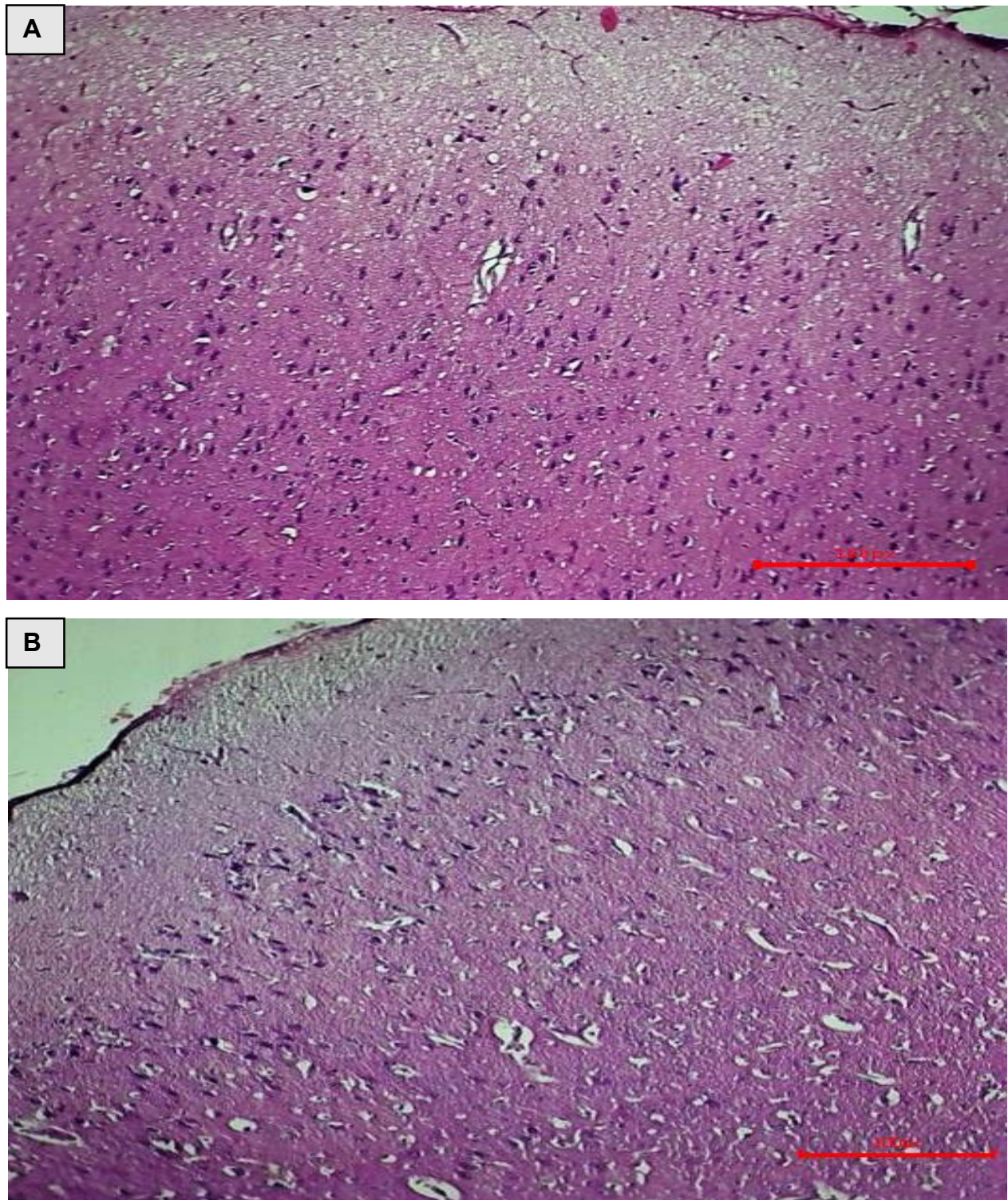


Planche 17 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Un neuropile moins vacuolisé du cortex cérébral. Une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.

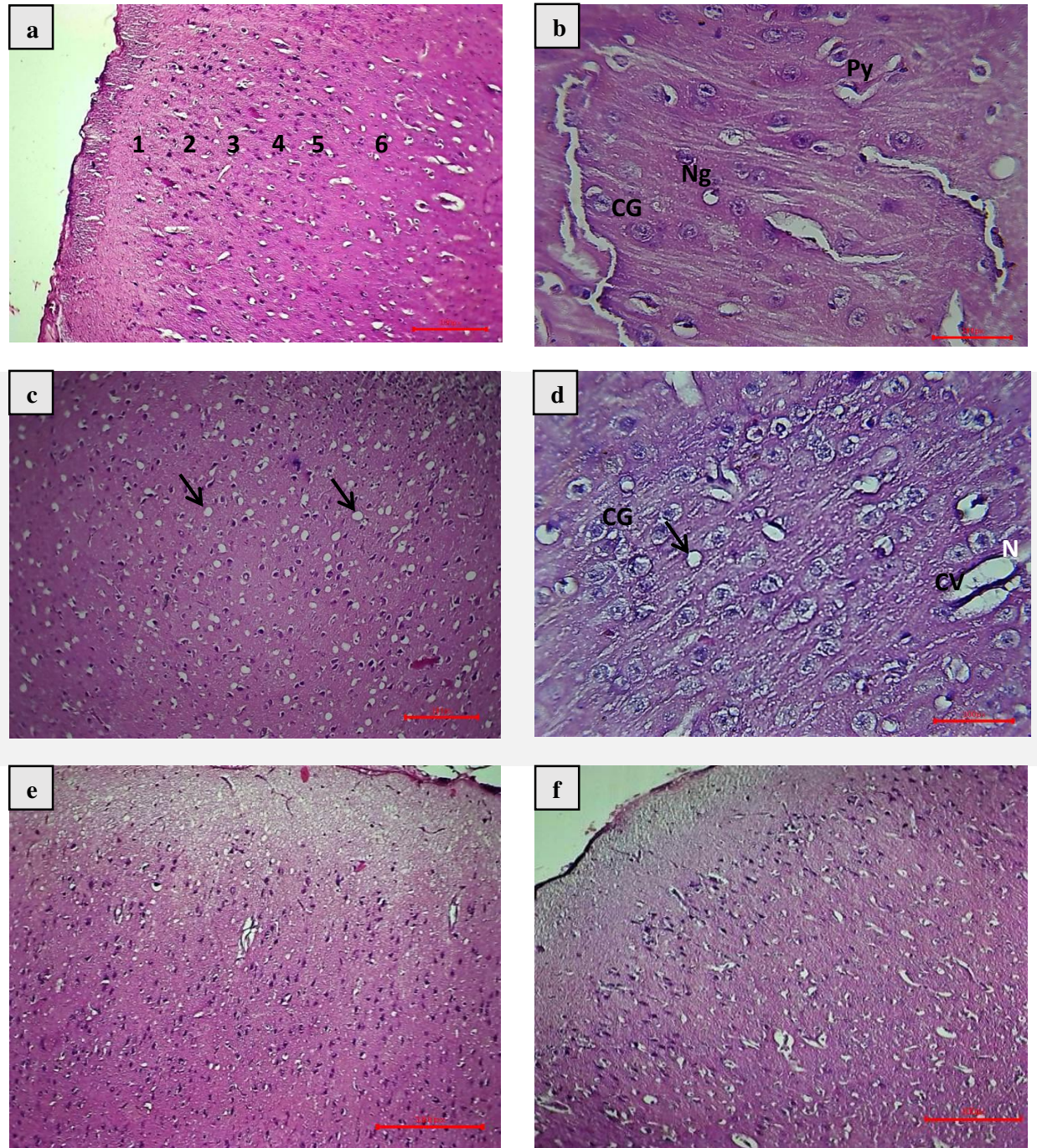


Planche 18 : Aspect histologique du cortex cérébral des lapins témoins (a et b) montrant une architecture normale des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral (1: couche moléculaire; 2: couche granulaire externe; 3: couche pyramidale externe; 4: couche granulaire interne; 5: couche pyramidale interne; 6: couche multiforme) et une structure typique des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de la couche granulaire interne. Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant Un neuropile vacuolisé (flèche) au niveau des différentes couches du cortex cérébral, des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée, une congestion vasculaire (CV) et une nécrose (N) des cellules nerveuses. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (f) montrant un neuropile moins vacuolisé du cortex cérébral et une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times 100$ et (b et d) $\times 400$.

➤ **Histopathologie de l'hippocampe**

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins témoins**

La **Planche 19** représente l'aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins.

L'hippocampe de ces lapins est constitué par :

- La présence de deux régions neurales en forme d'U inversé : la corne d'Ammon (CA) composée par 4 régions (CA1, CA2, CA3 et CA4) et le gyrus denté (GD).
- Une structure normale des cellules pyramidales (Py) au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2).
- Une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du gyrus denté (GD).
- Une cytologie typique des cellules neurogliales (Ng) et cellules pyramidales (Py) de la couche moléculaire du gyrus denté (GD).

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins traités par l'AVIMEC®**

L'administration de l'IVM seul pendant 3 semaines a causé des lésions sévères au niveau de l'hippocampe des lapins. Ces lésions sont montrées dans la **Planche 20** :

- Le neuropile (tissu glial du soutien) est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD).
- Formation des vacuoles intracellulaires donnant naissance à des cellules en mousse dans la corne d'Ammon (CA) et le gyrus denté (GD).
- Une désorganisation des cellules nerveuses avec des noyaux sombres.

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C**

La **Planche 21** montre les résultats de l'aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par une co-administration de l'IVM + vitamine C.

La structure histologique de l'hippocampe dans les deux lots a montré une structure qui ressemble à celui des lapins témoins qui est caractérisé par un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale par rapport au groupe traité uniquement par l'IVM.

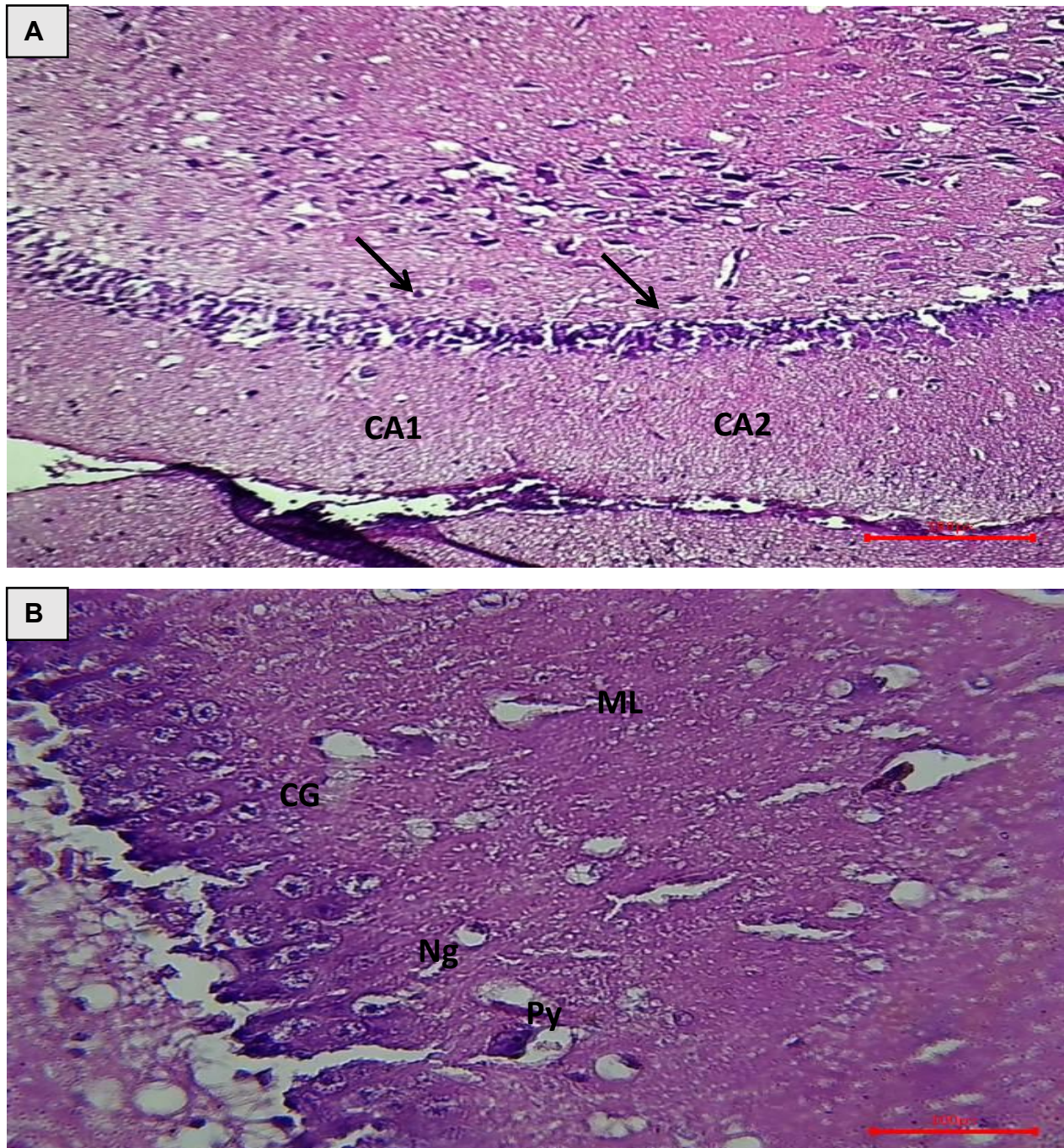


Planche 19 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : Une structure normale des cellules pyramidales (Py) avec des noyaux clairs au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2). Une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du Gyrus denté (GD). Une cytologie typique des cellules neurogliales (Ng) et cellules pyramidales (Py) de la couche moléculaire (ML) du Gyrus denté (GD).

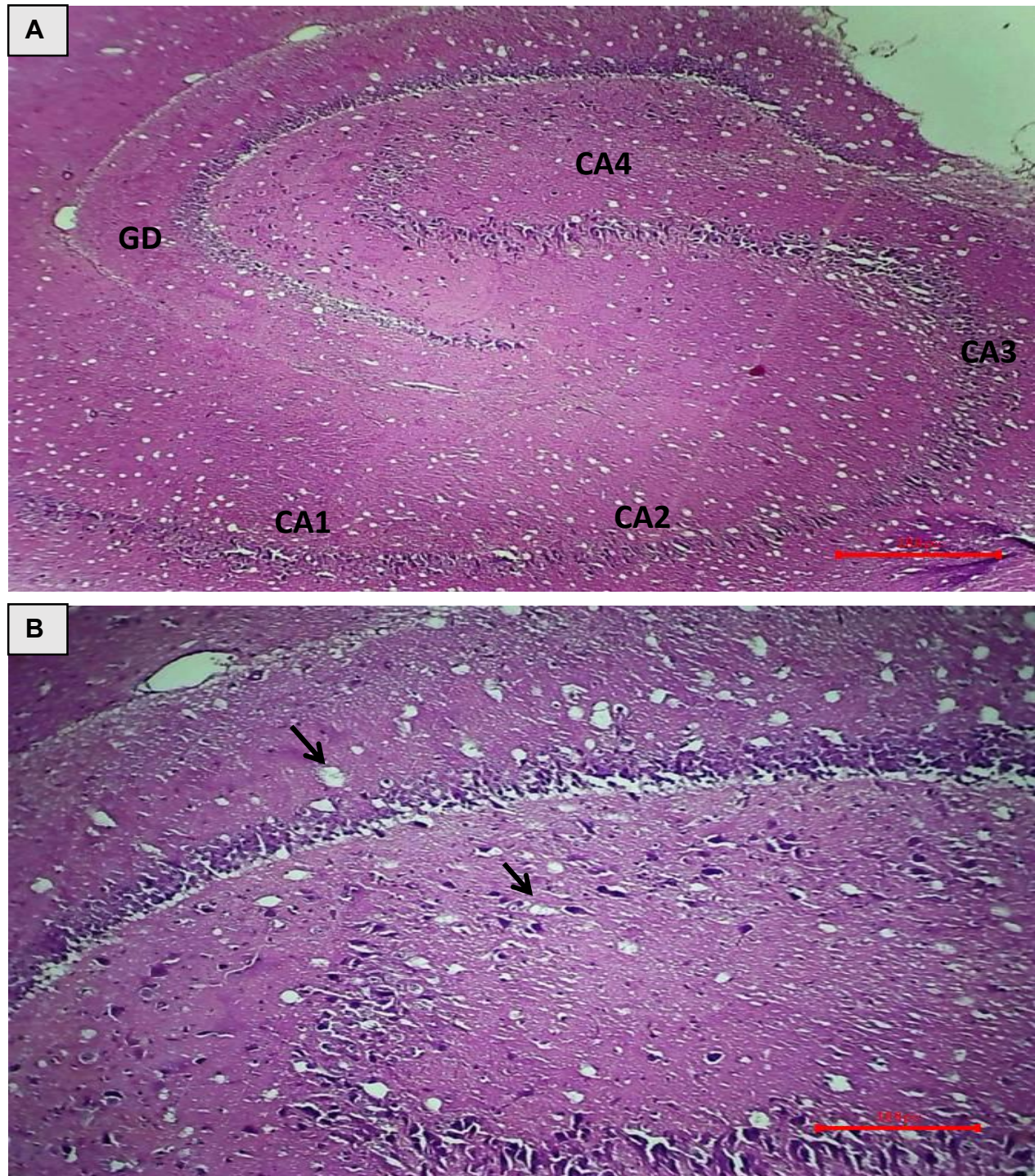


Planche 20 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Le neuropile est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD). Formation des vacuoles intracellulaires donnant naissance à des cellules en mousse dans la corne d'Ammon (CA) et le Gyrus denté (GD). Une désorganisation des cellules nerveuses avec des noyaux sombres.

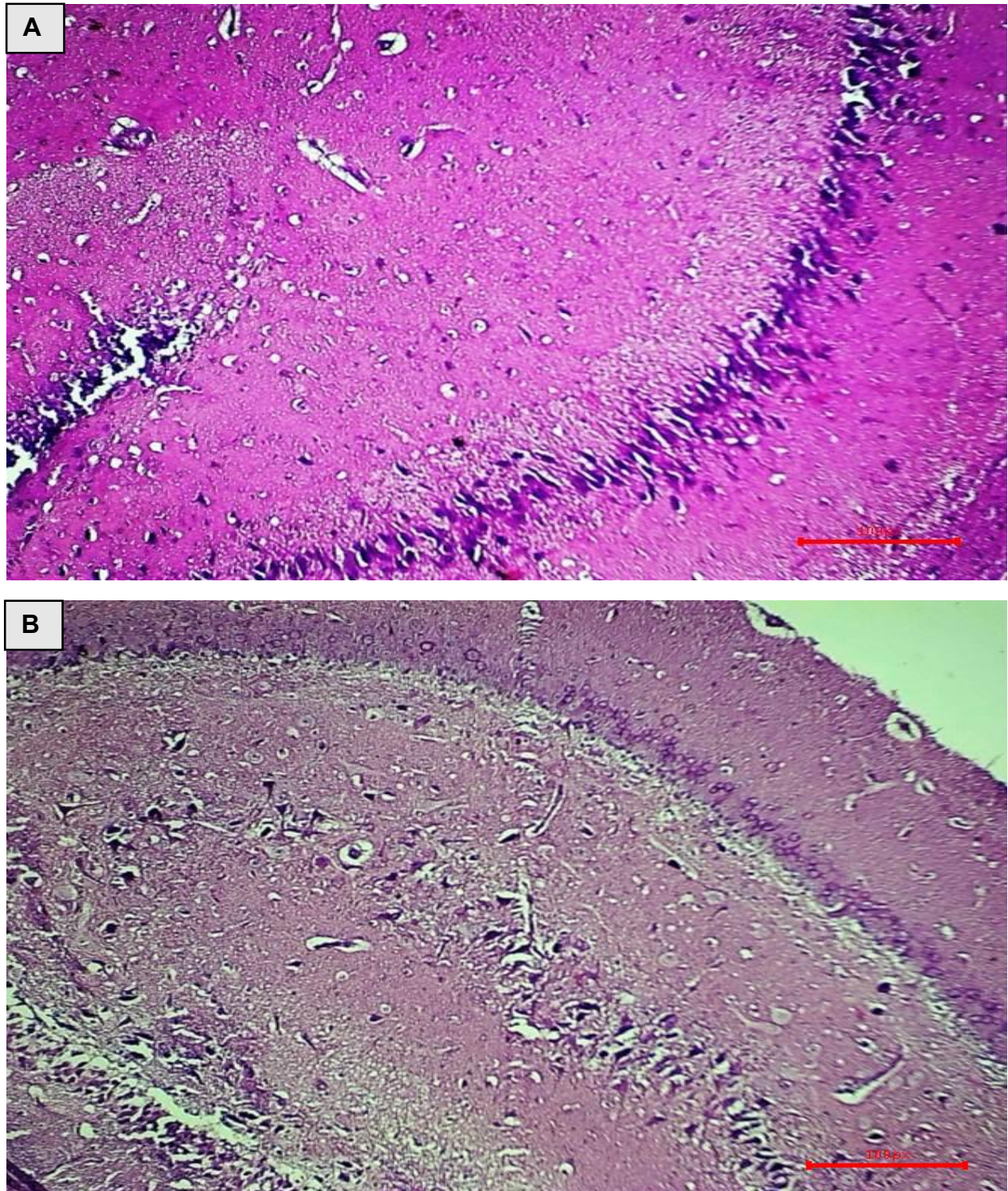


Planche 21 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale.

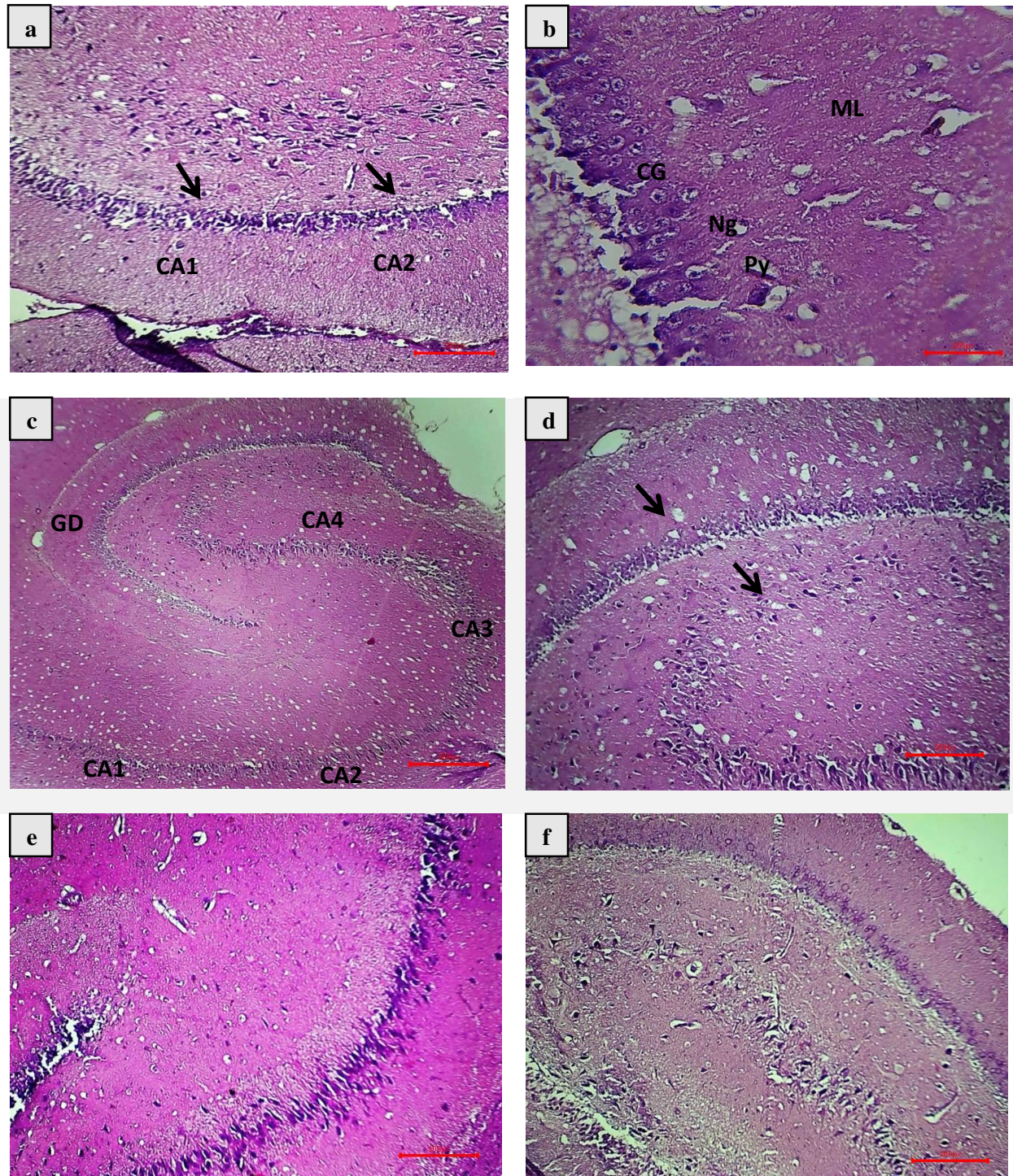


Planche 22 : Aspect histologique de l'hippocampe des lapins témoins (a et b) montrant une structure normale des cellules pyramidales (Py) avec des noyaux clairs au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2) et une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du Gyrus denté (GD) avec une cytologie typique des cellules nerveuses du Gyrus denté (GD).. Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant un neuropile est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (f) montrant un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times 100$ et (b et d) $\times 400$.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4116306>

Beneficial effects of ascorbic acid on ivermectin repeated high-dose therapy in rabbits: biochemical and histopathological investigations

Makhlouf Chahrazed^{1,2*}, Khaldoun Oularbi Hassina^{1,2}, Bokreta Soumya^{1,2}, Tarzali Dalila¹, Boukrid Asma¹, Boulahia Meriem¹, Daoudi Zerrouki Nacira²

¹ Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Blida 1, BP 270, Soumaa, Blida, Algeria

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

* Corresponding author: E-mail: chahrazedmakhlouf@yahoo.com

Received: 23 August 2020; Revised submission: 05 October 2020; Accepted: 21 October 2020



<http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/ejbr>

Copyright: © The Author(s) 2021. Licensee Joanna Bródka, Poland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ABSTRACT: Ivermectin (IVM) is a lipophilic anthelmintic drug widely used for the control of internal and external parasites in both human and veterinary medicine. Conversely, overdoses of IVM are associated with resistance and efficacy problems. The present study aimed to evaluate the effects of repeated administration of a high dose of IVM alone or with combination of ascorbic acid (AA) in male young rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histological investigations. Twenty rabbits were divided into four groups (n=5) and treated for three consecutive weeks: Control group; IVM group (2 mg/kg of body weight subcutaneously, 3 times a week); IVM + AA_g (20 mg/mL) group and IVM + AA_f (200 mg/kg of diet) group. IVM induced a disruption of hepatic biochemical parameters and lipid profile with a statistically significant ($p < 0.05$) increase in glucose, ALT, AST, GGT, HDL-C and a significant decrease of TC, TG, LDL-C, VLDL-C in IVM group compared to control group. Co-administration of AA moderately improved those biochemical parameters. Histopathological changes following IVM treatment in liver comprised loss of normal hepatocytes structure, central vein dilation and portal vein congestion. The lung showed abnormal structure of intrapulmonary bronchus, dilated bronchioles and alveoli and congested pulmonary artery. Nevertheless, the AA treatment groups revealed significant improvement when co-administered orally with IVM. This study suggested that AA has a beneficial ameliorative role against toxic effects induced by repeated high-dose of IVM.

Keywords: Ivermectin; Ascorbic acid; Biochemical parameters; Histopathology; Rabbit.

1. INTRODUCTION

In veterinary medicine, macrocyclic lactones (MLs) has a position of prominence in the control of parasites and are probably the most widely used anti-parasitic agents in the treatment of food producing animals, poultry, aquaculture and crops. Ivermectin (IVM) was the first commercially available endectocide macrocyclic lactone (ML), discovered in the mid-1970s and used in veterinary and humans clinical medicine [1, 2]. IVM is a chemical derivative of avermectin. Since its discovery, a number of alternative products such

abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, moxidectin, milbemycin and selamectin, have been marketed [3, 4]. The antiparasitic effect of IVM is said to be due to its interaction with glutamate and GABA-gated chloride channels, which cause influx of chloride ions across the cell membranes and lead to paralysis in many types of parasites [5].

In addition to its efficacy in the control of endo and ectoparasites [6], IVM a '*Splendid gift from microorganisms*' has been demonstrated to have anticancer activities on various types of cancer, including glioblastoma [7], chronic myelogenous leukemia [8], breast cancer [9], ovarian cancer [10] and renal cancer [11]. Recently, it was reported that IVM is also an inhibitor of the replication of SARS-CoV-2 (COVID-19) *in vitro* [12].

The use of endectocide drugs for the treatment of parasitic diseases in rabbits has been increasing recently. Lu et al. [13] revealed that treatment of female rabbits naturally infected with *Psoroptes cuniculi* with a commercial IVM injection (Ivomec® at 0.2 mg/kg) showed rapid and high efficacy against ear-mite. Gokbulut et al. [14] indicated that subcutaneous administration of two doses of IVM (0.3 mg/kg) with a 15- 20 day interval in-between could be necessary for treatment of ectoparasites.

Guzzo et al. [15] reported that IVM at doses up to 10 times the highest FDA (Food and Drug Administration), approved dose of 200 µg/kg is generally well tolerated, with no indication of associated central nervous system toxicity. Nonetheless, at higher concentrations IVM has a broad range of effects in many different organisms [16, 17] and repeated administration of different doses of IVM induced histopathological alterations in liver [18], kidneys and lungs [19] of rabbit; testis [20] of rat and brain tissues [21] of pigeon.

Recently, the protective effects of natural antioxidants against the toxicity of various xenobiotic are the focus of interest. As have been approved by the study of Abdeldaim and Abdellatief [22], Caffeic Acid Phenethyl ester and Betaine have a protective effect against Abamectin induced toxicity. Also, some antioxidant can be administered with IVM to improve its side effects such as vitamin A [23], vitamin K [24], Selenium and vitamin E [25] and some phenols and flavonoids [26].

Ascorbic acid (AA) or vitamin C is a water-soluble antioxidant which efficiently scavenges free radicals, protecting cell membranes from oxidative damage [27, 28]. Previous animal studies suggested that vitamin C treatment may have potential protective effects on oxidative stress and environmental toxicities [29, 18]. Recently we demonstrated the beneficial effects of Vitamin C in attenuating emamectin benzoate toxicity, an avermectin insecticide formulation [30].

Accordingly, this study has two stages of demonstration, first to describe the toxic effect of repeated subcutaneous injections of IVM on the hepatic biochemical parameters, lipid profile and the liver and lung histology in male young rabbits of (*Oryctolagus cuniculus*) strain. Secondly, to investigate the beneficial effects of AA on IVM repeated high-dose therapy in rabbits.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Ivermectin (AVIMEC®, 10 mg/ml) was purchased from the Arab Veterinary Industrial Company (AVICO, Jordan). This formula is used by subcutaneous injection for rabbits: 0.15 ml per 1 kg of body weight (1.5 mg/kg). Vitamin C of purity 99%, was purchased from Sigma–Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, USA). All other reagents used were obtained from commercial sources: Biosolve Chimie (Valkenswaard, Netherlands) and BIOLABO SA. (France).

2.2. Animals

Healthy male young Algerian rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (aged 4–5 weeks; 850 to 950 g) were used in this study. Rabbits were obtained from a state breeding unit of Djebba (Tizi-Ouzou) and kept for experimentation in the CRD of Saidal, Algeria. All animals were housed in temperature-controlled rooms with 12-h light/dark cycle. Animal experimentation was consistent with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology [31]. Rabbits were acclimated to the laboratory conditions for 2 weeks before treatment and had free access to a commercial pellet diet and water *ad libitum*.

2.2.1. Experimental design

Twenty rabbits were divided into four groups (n=5). A control group, received distilled water by gavage and three groups treated with a high dose of IVM (2 mg/kg of body weight subcutaneously, 3 times/week) [13] for three consecutive weeks including; a group was treated only with IVM (IVM group); a group was co-treated orally with ascorbic acid by gavage (IVM + AAg group; 20 mg/ml, 3 times/week) and a group was co-treated with ascorbic acid enriched diet (IVM + AAd group; 200 mg/kg of food, 3 times/week) [32]. AA is administered with a mean interval of 12 h after IVM injection. Animals were weighed daily throughout the acclimation (2 weeks) and experimentation (3 weeks) periods in order to follow their weight evolution. At 14 and 21 days of the experiment, blood samples were collected with heparinized syringes from the ear vein for biochemical analysis.

2.2.2. Samples collection

At the end of the experiments, the rabbits were euthanized by cervical decapitation, and liver and lung were carefully dissected out and weighed. Blood samples were collected after a fasting period of 12 hours and plasma was separated by centrifugation at 4000 r/min for 15 min.

2.3. Biochemical analysis

To assess the effect of vitamin C on IVM toxicity, the following hepatic parameters; alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT) and glucose and lipid profile tests; triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were assessed in plasma using a commercially available spectrophotometric enzymatic kit (Biolabo, France) and analyzed by an auto-analyzer (Hitachi 912) instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The plasma level of very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) was evaluated using the following formula: $VLDL-C = TC - (HDL-C + LDL-C)$. In addition, for better expression of the rapport between triglycerides and HDL-C, atherogenic index of plasma (AIP) factor based on the ratio of the values of triglycerides to high-density lipoprotein (HDL-C) levels was calculated according to the following formula: $AIP = \log [TGs] / [HDL-C]$, where both of them are measured in the plasma [33]. Otherwise, other atherogenic factors (AF) were calculated as the ratio between; total Cholesterol and HDL-C, LDL-C and HDL-C [34].

2.4. Histopathological examinations

For histopathological examination, the liver and lung were excised from all rabbits and fixed in 10% neutral formalin buffer, processed through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin blocks. Organ sections (2–3 µm thick) were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for histopathological studies.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Data were calculated using one-way analysis of variance followed by the Duncan's post hoc tests. Data were expressed as the mean $\pm$ SD. A p-value < 0.05 was considered as a level of significance.

3. RESULTS

3.1. Effect on general body health condition, body weight and weight gain

No deaths occurred in any group throughout the experiment. Some signs of general toxicity (hair loss and diarrhea) and decreased food intake were apparent in male rabbits treated with IVM alone. As shown in the Table 1, the body weight as well as the percentage of body weight gain (% BWG) and the food intake of the rabbits in the control, IVM, IVM + AAg and IVM + AAF groups during the acclimation period (2 weeks) are normal. However, during the experimental period (3 weeks), in the IVM treated group, the food intake (21.01 ± 0.9) was significantly ($p < 0.05$) decreased compared to control group (33.03 ± 0.1), also the final body weight and the % BWG (1587.0 ± 71.6 and 19.3 ± 0.8) was significantly decreased compared to control (1806.4 ± 63.2 and 34.1 ± 0.5), respectively. Conversely, the food intake (27.5 ± 0.2 ; 35.2 ± 0.5), the final body weight (1693.0 ± 47.1 ; 1678.1 ± 48.0) and the % BWG (25.3 ± 0.7 ; 26.4 ± 0.8) in the IVM + AAg and IVM + AAF groups, respectively were significantly increased compared to the food intake, the final body weight and % BWG of rabbits treated with IVM alone.

Table 1. Effect of IVM and/or AA on body weight and weight gain for the acclimation and experimental periods.

Body weight / groups		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
Acclimation	Initial BW (g)	862.1 $\pm$ 9.8	914.8 $\pm$ 22.7	946.7 $\pm$ 25.6	932.2 $\pm$ 27.8
	Final BW (g)	1085.7 $\pm$ 18.9	1147.7 $\pm$ 21.9	1156.8 $\pm$ 26.2	1149.1 $\pm$ 30.8
	% BWG	25.9 $\pm$ 0.9	25.5 $\pm$ 0.9	22.23 $\pm$ 0.7	23.31 $\pm$ 0.8
	Food intake %	28.1 $\pm$ 0.1	30.3 $\pm$ 0.2	26.01 $\pm$ 0.1	23 $\pm$ 0.4
Experimentation	Initial BW (g)	1347.1 $\pm$ 21.1	1330.6 $\pm$ 19.8	1351.0 $\pm$ 26.6	1328.3 $\pm$ 36.4
	Final BW (g)	1806.4 $\pm$ 63.2	1587.0 $\pm$ 71.6 ^a	1693.0 $\pm$ 47.1 ^b	1678.1 $\pm$ 48.0 ^c
	% BWG	34.1 $\pm$ 0.5	19.3 $\pm$ 0.8 ^a	25.3 $\pm$ 0.7 ^b	26.4 $\pm$ 0.8 ^c
	Food intake %	33.03 $\pm$ 0.1	21.01 $\pm$ 0.9 ^a	27.5 $\pm$ 0.2 ^b	35.2 $\pm$ 0.5 ^c

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food; BW: body weight; BWG: body weight gain. Results are given as a mean $\pm$ SD for five rabbits in each group. a, b and c: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.2. Effect on absolute and relative organ weights

According to table 2, the absolute and relative weight of lung showed no significant change in the IVM group compared to control group, but these weights were significantly ($p < 0.05$) increased in the IVM + AA-treated groups (9.8 ± 0.8 g and 11.7 ± 0.7 g) compared to IVM group (8.0 ± 1.0 g) and the control group (8.8 ± 0.9 g) and with no significant difference between IVM + AAg and IVM + AAF groups. However, the absolute and relative weight of liver showed no significant change in the IVM group when compared to control and IVM + AA-treated groups.

Table 2. Effect of IVM and/or AA on absolute and relative liver and lung weights, 21 days after treatment.

Organ weight (g) / groups		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
Liver	Absolute	76.5 ± 9.2	75.8 ± 6.5	77.7 ± 8.7	77.3 ± 9.5
	Relative	4.1 ± 1.0	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.5	4.5 ± 1.2
Lung	Absolute	8.8 ± 0.9	8.0 ± 1.0	9.8 ± 0.8 ^{a, b}	11.7 ± 0.7 ^{a, c}
	Relative	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.03 ^{a, b}	0.7 ± 0.2 ^{a, c}

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b and c: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.3. Effect on serum biochemical parameters

As shown in Table 3, IVM induced hepatic disorders as demonstrated by the elevation of liver biomarkers in plasma. The glucose plasma level didn't change significantly in different treated groups at day 14 of experimentation but at day 21, the glucose level was significantly ($p < 0.05$) increased in the IVM group compared to control group. However, this level was significantly decreased in the IVM + AAg group compared to IVM and IVM + AAF groups. At day 14 of experimentation, the plasma levels of GGT, ALT and AST were significantly increased in the IVM group compared to control group. These levels were significantly decreased in both IVM + AA-cotreated groups compared to IVM group. In the same manner, the levels of GGT, ALT and AST continue to be significantly increased in IVM group compared to control group at day 21 of the experimentation. These levels didn't change significantly in both IVM + AA-cotreated groups.

Table 3. Effect of IVM and/or AA on liver biomarkers at 14 and 21 day of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
14 day	Glucose (g/L)	0.89 ± 0.01	1.19 ± 0.11	1.18 ± 0.02	1.17 ± 0.01
	Gamma GT (U/L)	10.0 ± 0.02	13.0 ± 0.01 ^a	12.5 ± 2.1 ^b	12.0 ± 6.4 ^c
	ALT (U/L)	27.0 ± 0.2	43.5 ± 7.9 ^a	32.0 ± 0.1 ^b	38.0 ± 4.8 ^c
	AST (U/L)	33.0 ± 0.05	57.0 ± 0.02 ^a	50.2 ± 7.2 ^b	52.5 ± 6.4 ^c
21 day	Glucose (g/L)	1.02 ± 0.19	1.64 ± 0.13 ^a	1.20 ± 0.09 ^{b, d}	1.34 ± 0.17
	Gamma GT (U/L)	11.0 ± 0.03	18.0 ± 4.6 ^a	11.2 ± 0.6	12.1 ± 0.8
	ALT (U/L)	32.0 ± 2.7	44.5 ± 3.7 ^a	31.5 ± 7.9	33.2 ± 3.8
	AST (U/L)	36.5 ± 8.7	42.0 ± 6.7 ^a	34.2 ± 3.2	38.2 ± 1.9

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b, c and d: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups and d: significant difference between IVM + AAg and IVM + AAF groups).

As indicated in Table 4, all lipid parameters were significantly decreased in the IVM group compared to control group at day 14 of experimentation, except the HDL-C level which was significantly increased in the same group. The co-administration of vitamin C to the IVM treated rabbits, especially in the IVM + AAg group, resulted in a significant recovery of all lipid parameters compared to IVM group except the level of HDL-C. At day 21, only LDL-C and TG levels and the LDL-C/HDL-C ratio were still significantly

decreased in the IVM group compared to control group. In addition to the total cholesterol/ HDL-C ratio, the above mentioned parameters were significantly better corrected in the IVM + AAg group compared to IVM group. The AIP was increased in the IVM group compared to the control and decreased in the IVM + AA-cotreated groups compared to IVM group at 14 day of experimental period. However, at 21 day of experimentation, the AIP was still increased in the IVM group and both IVM + AA-cotreated groups compared to control group.

Table 4: Effect of IVM and/or AA on lipid profile at 14 and 21 day of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
14 day	TC (g/l)	1.05 ± 0.001	0.78 ± 0.001 ^a	0.86 ± 0.24 ^b	0.66 ± 0.10
	TG (g/l)	1.75 ± 0.004	0.11 ± 0.002 ^a	1.17 ± 0.16 ^b	0.94 ± 0.24 ^c
	HDL-C (g/l)	0.29 ± 0.003	0.39 ± 0.001 ^a	0.34 ± 0.07	0.27 ± 0.03
	LDL-C (g/l)	0.41 ± 0.002	0.21 ± 0.003 ^a	0.30 ± 0.12 ^b	0.19 ± 0.10 ^c
	VLDL-C (g/l)	0.35 ± 0.01	0.23 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.03 ^b	0.17 ± 0.08 ^c
	TC/HDL-C	3.62 ± 0.001	2.22 ± 0.003 ^a	2.49 ± 0.23 ^b	2.32 ± 0.27 ^c
	LDL-C/HDL-C	1.41 ± 0.002	0.58 ± 0.001 ^a	0.82 ± 0.33 ^b	0.70 ± 0.29 ^c
	AIP	0.83 ± 0.001	-2.66 ± 0.002	-0.15 ± 0.17	0.15 ± 0.09
21 day	TC (g/l)	0.93 ± 0.05	0.83 ± 0.10	0.85 ± 0.17	0.73 ± 0.08
	TG (g/l)	1.10 ± 0.17	0.87 ± 0.12 ^a	0.90 ± 0.24 ^b	0.84 ± 0.18
	HDL-C (g/l)	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.06
	LDL-C (g/l)	0.37 ± 0.03	0.28 ± 0.07 ^a	0.27 ± 0.08 ^b	0.21 ± 0.07 ^c
	VLDL-C (g/l)	0.21 ± 0.07	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01
	TC/HDL-C	2.53 ± 0.19	2.34 ± 0.20	2.19 ± 0.37 ^b	1.82 ± 0.12 ^c
	LDL-C/HDL-C	1.00 ± 0.11	0.79 ± 0.15 ^a	0.71 ± 0.23 ^b	0.47 ± 0.11 ^c
	AIP	0.11 ± 0.08	-0.17 ± 0.06	-0.20 ± 0.11	-0.17 ± 0.15

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b and c: p < 0.05 (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.4. Histopathological findings

Histological examination of the control liver sections showed a normal histological architecture with normal hepatocytes arranged in cords that are separated from each other by sinusoids (Figure 1 a, b). H&E-stained sections of the liver of rabbits treated with IVM revealed severe hepatic damage, including, loss of normal hepatocytes architecture, sinusoidal dilation, central vein dilation, congested branches of portal vein (Figure 1 c, d). These changes were reduced in the liver of (IVM + AAg) (Figure 1 e, f) and (IVM + AAF) (Figure 1 g, h) groups of rabbit.

In the control group, the lung sections showed normal limits of intrapulmonary bronchus, bronchiole and alveoli (Figure 2 a, b). However, in the IVM group, the rabbit lung sections showed an irregular intrapulmonary bronchus limit with altered proliferation of mucosal epithelium, dilated bronchiole with a thick epithelium, dilated alveoli with thickening of their septa, pulmonary hemorrhage and pulmonary artery congestion (Figure 2 c, d). These histopathological modifications were less apparent in the lung of (IVM + AAg) (Figure 2 e, f) and (IVM + AAF) (Figure 2 g, h) groups of rabbit.

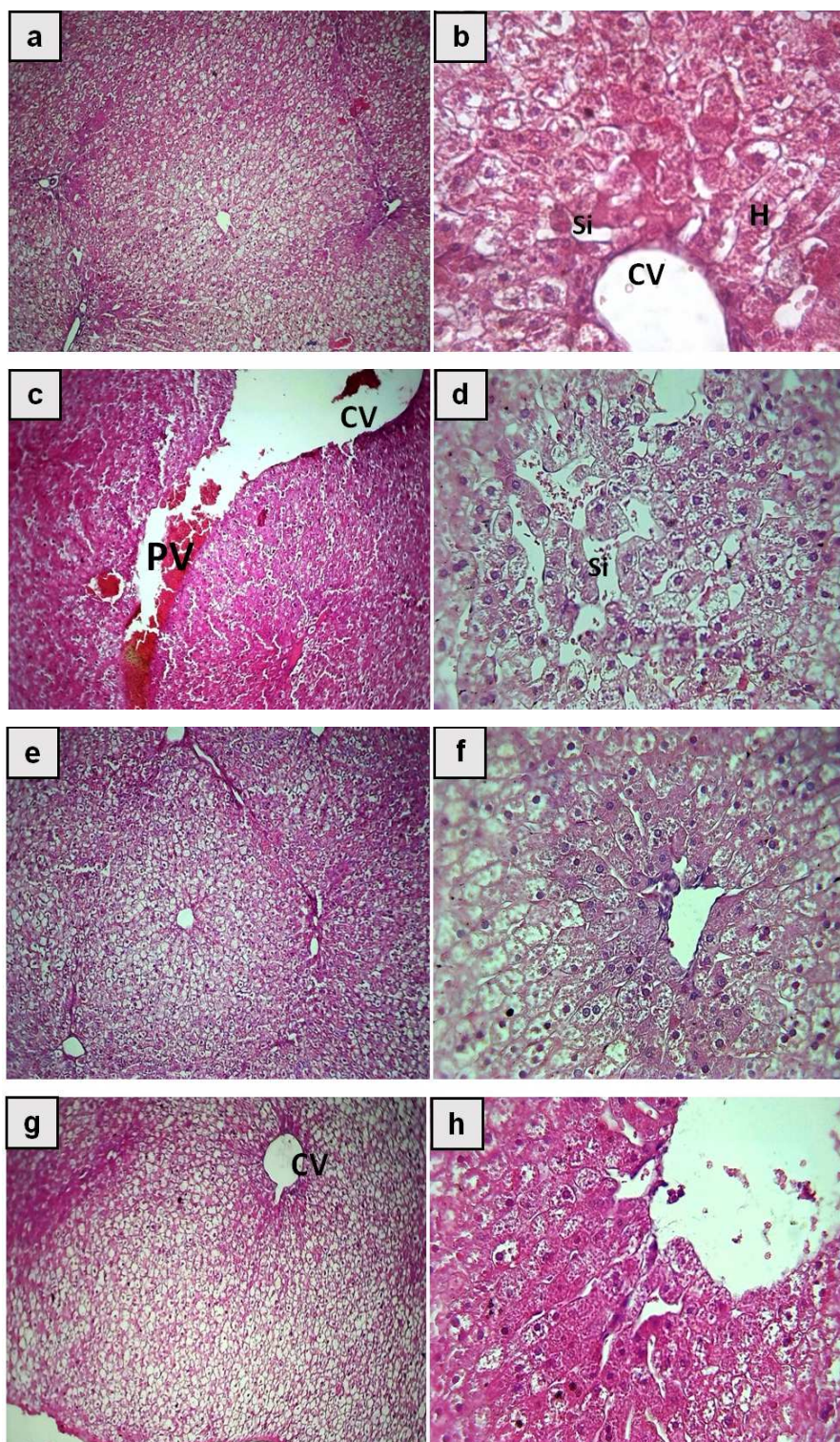


Figure 1. Photographs of liver sections from control rabbits (a and b) showing normal lobular architecture with a central vein (CV) and normal structure of hepatocytes (H) and hepatic sinusoids (Si). From IVM group (c and d), showing a loss of normal hepatocytes architecture, dilated and congested central vein (CV), dilated and congested portal vein (PV), dilated hepatic sinusoids (Si). From IVM + AAg (e and f) and IVM + AAF (g and h) showing normal central vein (CV) and portal vein (PV) with restoration of hepatocytes (H) structure. H&E: (a, c, e and g) $\times 100$ and (b, d, f and h) $\times 400$.

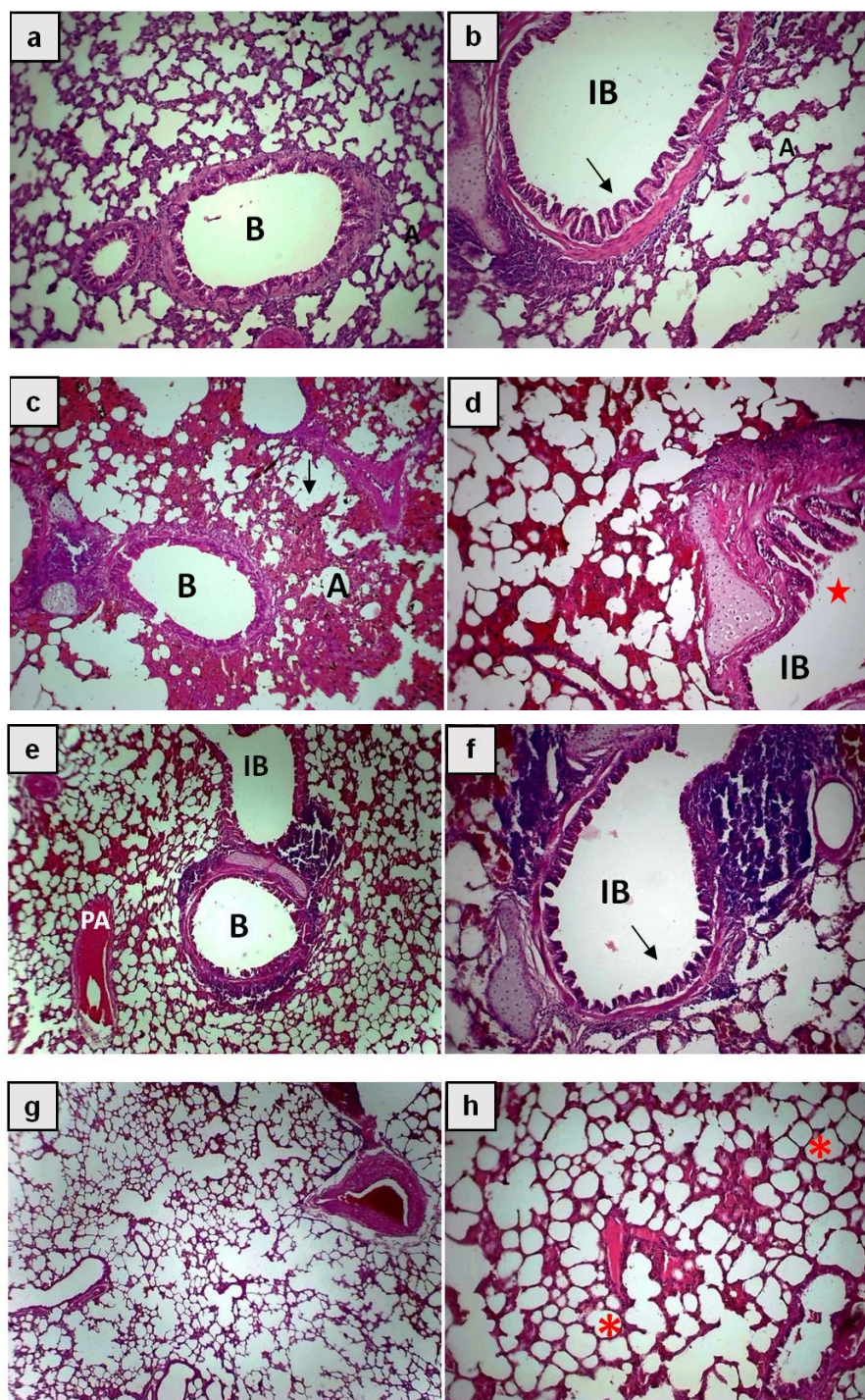


Figure 2. Photographs of lung sections from control rabbits (a and b) showing normal limit of intrapulmonary bronchus (IB) with folded mucosa (arrow), bronchiole (B) and alveoli (A). From IVM group (c and d) showing dilated alveoli (A) with thickening of their septa and pulmonary hemorrhage (arrow), irregular intrapulmonary bronchus (IB) limit with altered proliferation of mucosal epithelium (star), dilated bronchiole (B) with a thick epithelium and congested pulmonary artery. From IVM + AA (e and f) and IVM + AAF (g and h) showing intrapulmonary bronchus (IB) with normal limit and folded mucosal epithelium (arrow), restoration of pulmonary artery congestion (PA) and mild dilation of bronchiole (B) and alveoli (asterisk). H&E: (a, c, e and g) $\times 100$ and (b, d, f and h) $\times 400$.

4. DISCUSSION

MLs resistance has become a problem in human and veterinary medicine thus threatening the sustainable efficacy of antiparasitic drugs [35]. IVM is one of the most important drugs for the control of parasitic infection and was the joint focus of the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine, after 35 years of its remarkable discovery [16]. In Algeria, Many generic preparations of IVM drugs are used for the treatment and prevention of major parasitic diseases in animal, caused by both endo and ectoparasites [36]. However, increases in the use of these compounds are associated with resistance and efficacy problems [37].

Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis [38]. Omshi et al. [23] revealed that treatment with IVM at a concentration of 0.4 mg/kg of body weight orally once a week for three consecutive weeks resulted in insignificant oxidative degradation in the drug-treated group.

In the present study, IVM was given at a dose up to 10 times the highest FDA-approved dose of 200 µg/kg (0.2 mg/kg) [13, 15] for which no death was observed during the experiment. However, a decrease in the body weight and the % BWG of rabbits were observed after IVM treatment. This decrease might be due to the reduced food intake as a result of loss of appetite of the young male rabbits. Our results are similar to those of Khaldoun et al. [30]. The results showed a significant increase in absolute and relative weight of lung in ascorbic acid co-treated groups compared to control group. These findings may be explained by oxidative stress generation due to repeat administration of IVM and its accumulation in lung tissue [19]. For the liver weight, it was found no change in the absolute and relative weight of the liver in all treated groups. These results are not in agreement with previous studies showing a significant increase in liver weight after avermectin administration [20, 30, 39]. Interestingly, the co-administration of AA orally by gavage or in food to IVM rabbits was capable of protecting against the lowered body and organ weight and overall health of rabbits.

Liver damage is caused by excessive exposure to drugs and toxins, which overwhelm the detoxifying power of the liver leading to enzyme leakage, lipid peroxidation, and oxidative stress [40, 41]. The current study showed significant increase in glucose level after 21 day of experimentation and significant increase of GGT, ALT and AST at 14 and 21 of experimental period in rabbits treated with IVM alone which correlated with liver histopathological results. Many reports have stated that avermectins exposure has a significant potential to induce damages in rat liver by increasing plasma transaminases and/or glycemia [30, 39, 41, 42].

In contrast, these parameters were reduced when IVM treated-rabbits were co-administered AA compared to rabbits administered with IVM alone. The IVM + AAg treatment was found to better decrease the level of plasma glucose compared to IVM + AAf. The effects of IVM and its combination with vitamin C on hepatic biomarkers in rabbits indicate that vitamin C provides better protection against IVM-induced hepatic damage. Our results are in agreement with those found by Khaldoun Oularbi et al. [30] that confirmed the ameliorative effect of vitamin C on glucose, AST and ALT plasma level when co-administered to emamectin benzoate during 28 days.

Miyajima et al. [43] demonstrated a significant correlation between the increases of total cholesterol (TC) and IVM concentrations in rabbit's plasma. The authors proposed that the pharmacokinetic profile of IVM is influenced not only by the promotion of IVM dissolution in gastrointestinal tract but also the change of plasma cholesterol concentration. Conversely, our study demonstrated that IVM administration provoked a decrease in all lipid parameters except the HDL-C level which was increased at 14 day. However, the co-administration of vitamin C to the IVM-treated rabbits resulted in a partial recovery of TC, HDL-C and

VLDL-C, as well as TG levels. Moreover, the LDL-C and TG levels were still significantly inferior to those of the control rabbits at 21 day.

Our results are in line with those of Jin et al. [44] who demonstrated that ivermectin decreased serum cholesterol, including high-density lipoprotein and low-density lipoprotein (LDL)/very LDL levels in mice. They established that the antiparasitic drug, IVM, is a Farnesoid X receptor (FXR) ligand that maintain bile acid and cholesterol homeostasis and can effectively improve hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice model by regulating genes expression. According to Al-Jassim et al. [18], the level of TC did not change significantly in IVM and IVM + vitamin C treated groups of rabbits compared to control group while this study showed a significant decrease in plasma level of TG in two groups exposed to IVM + vitamin C orally (0.5 mg/kg + 50 mg/kg and 2 mg/kg + 50 mg/kg; respectively).

Atherogenic indexes are considered as a better indicator of coronary heart disease risk than individual lipoprotein concentration [33]. The most important finding of our study is that the atherogenic index of plasma (AIP) was found to be augmented in IVM group compared to that of the control group. Thus, the co-administration of AA into a diet or by gavage to rabbits had statistically significant effects on the lipid profile compared to IVM group, and corrected the atherogenic index of plasma. In our study, the two atherogenic factors (total cholesterol/HDL-C and LDL-C/HDL-C) were found to be significantly decreased in IVM group compared to the control rabbits. Thus, the co-administration of AA into a diet or by gavage to rabbits had statistically significant effects on the lipid profile compared to IVM group, and corrected the atherogenic indexes.

The aforementioned results revealed that IVM administration 3 times/week for three consecutive weeks in young rabbits displayed histological alterations in liver and lung of male rabbits. Liver histological damage's consist essentially in loss of normal hepatocytes architecture, sinusoidal dilation, central vein dilation and congested branches of portal vein. These results explained the significant high level of liver biochemical parameters and are in accordance with many work's which demonstrated that the repeated administration of either therapeutic or double therapeutic doses of IVM induced severe degenerative changes and necrosis in some parenchymatous organs [20].

The histological testing of lung in IVM group revealed irregular intrapulmonary bronchus limit with altered proliferation of mucosal epithelium, dilated bronchiole with a thick epithelium, dilated alveoli with thickening of their septa, pulmonary hemorrhage and pulmonary artery congestion. These results are in line with those obtained by AL-Jassim et al. [19] and Abd-Elhady and Abou-Elghar [45] who observed interstitial pneumonia with congestion and edema in the lung section of rat exposed to abamectin for 30 days, while local hemorrhages associated with atelectasis was observed in the lung of animals exposed to abamectin for 210 days.

Vitamin C prevents the subsequent histological damage induced in liver and lung tissues. From our results we can assume that liver and pulmonary histological damages of ivermectin are mainly attributed to oxidative stress increase since the effects were largely prevented by ascorbic acid supplementation especially when this later was administered by gavage. Previously, studies have also shown the curative and antioxidative efficiency of orally administered AA and other vitamins against avermectin toxicity [19, 23, 25, 30].

5. CONCLUSION

The findings presented from this study have revealed that IVM repeat high-dose therapy in rabbits may cause toxic effect on liver function, lipid profile and several changes of the liver and lung histological structure. AA co-treatment could reduce the level of IVM toxicity. In the light of these results, vitamin C by

gavage is recommended over that supplemented in the food. Careful application should be considered when using IVM on a wide scale in rabbits and others farm animals.

Abbreviations

IVM: ivermectin; AA: ascorbic acid; AAg: ascorbic acid by gavage; AAF: ascorbic acid supplemented in food; AST: alanine aminotransferase; ALT: aspartate amino transferase; GGT: gamma-glutamyltransferase; MLs: macrocyclic lactones; ML: macrocyclic lactones; BW: body weight; BWG: body weight gain; H&E: haematoxylin and eosin; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol; AF: atherogenic factor; AIP: atherogenic index of plasma; FDA: Food and Drug Administration; SD: standard deviation; DNA: deoxyribonucleic acid; GABA: Gama-aminobutyric acid.

Authors' Contributions: MC and KH performed experiments and statistical analysis, interpreted the results and prepared the manuscript. BS revised the manuscript and provided valuable advices. TD, BA and BM participate in the experimental design, biochemical analysis and histopathological studies. ZN and KH supervised the study and revised the study for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest: The author has no conflict of interest to declare.

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).

Availability of data and materials: The datasets used and/or analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Omondi EO, Nyabadza F, Bonyah E, Badu K. Modeling the infection dynamics of onchocerciasis and its treatment. *J Biol Systems*. 2017; 25(02): 247-277.
2. Campbell WC. Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel lecture). *Angewandte Chemie Int Edn*. 2016; 55(35): 10184-10189.
3. Danaher M, Howells LC, Crooks SR, Cerkenik-Flajs V, O'Keeffe M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J Chromatogr B*. 2006; 844(2): 175-203.
4. Campbell CW. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharmac Biotechnol*. 2012; 13(6): 853-865.
5. Qureshi S. Biochemical toxicity of ivermectin in Wistar albino rats. *Am-Euras J Toxicol Sci*. 2013; 5(1): 15-19.
6. Batiha GE, El-Far AH, El-Mleeh AA, Alsenosy AA, Abdelsamei EK, Abdel-Daim MM, et al. In vitro study of ivermectin efficiency against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, among cattle herds in El-Beheira, Egypt. *Vet World*. 2019; 12(8): 1319-1326.
7. Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu B. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 480(3): 415-421.
8. Wang J, Xu Y, Wan H, Hu J. Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 497(1): 241-247.
9. Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, et al. Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res*. 2016; 76(15): 4457-4469.

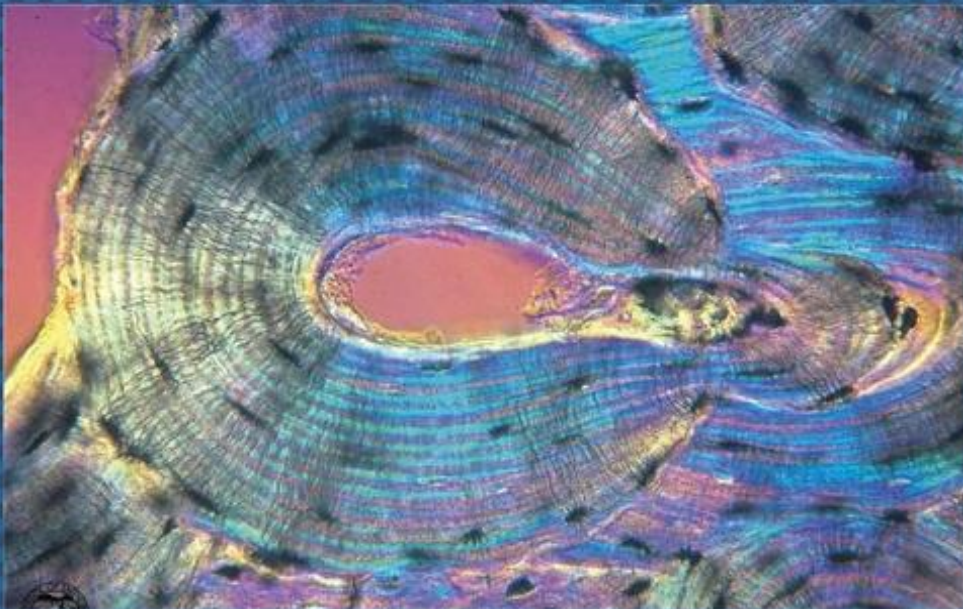
10. Hansen JM, Coleman RL, Sood AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016; 56: 131-143.
11. Zhu M, Li Y, Zhou Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 492(3): 373-378.
12. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res*. 2020; 104787.
13. Lu M, Xiong D, Sun W, Yu T, Hu Z, Ding J, et al. Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery*. 2017; 24(1): 622-631.
14. Gokbulut C, Biligili A, Kart A, Turgut C. Plasma dispositions of ivermectin, doramectin and moxidectin following subcutaneous administration in rabbits. *Lab Animals*. 2010; 44(2): 138-142.
15. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol*. 2002; 42(10): 1122-1133.
16. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends Parasitol*. 2017; 33(6): 463-472.
17. Merola VM, Paul AE. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Vet Clinics Small Animal Practice*. 2018; 48(6): 991-1012.
18. Al-Jassim KB, Jawad AADH, Al-Masoudi EA. Effects of ivermectin on lipid profiles, antioxidant enzymes and proteins with the beneficial effects of vitamin C in rabbits. *Int J Sci Technol*. 2015; 143(2495): 1-13.
19. Al-Jassim KB, Jawad AADH, Al-Masoudi EA, Majeed SK. Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (*Lupus cuniculus*). *Basrah J Vet Res*. 2016; 14: 110-24.
20. El Zoghby RR, Amin A, Hamouda AF, Ali AF. Toxicological and pathological studies of ivermectin on male albino rats. *J Am Sci*. 2015; 11(3): 73- 83.
21. Li M, You TZ, Zhu WJ, Qu JP, Liu C, Zhao B, et al. Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicol*. 2013; 22(8): 1241-1254.
22. Abdel-Daim MM, Abdellatif SA. Attenuating effects of caffeic acid phenethyl ester and betaine on abamectin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25(16): 15909-15917.
23. Omshi FS, Abbasalipourkabir R, Abbasalipourkabir M, Nabyan S, Bashiri A, Ghafourikhosroshahi A. Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25(29): 29408-29417.
24. Ali BH. The effect of ivermectin on some haematological indices in rabbits: influence of vitamin K treatment. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1990; 17(10): 735-738.
25. Behera SK, Dimri U, Singh SK, Mohanta RK. The curative and antioxidative efficiency of ivermectin and ivermectin+ vitamin E-selenium treatment on canine *Sarcoptes scabiei* infestation. *Vet Res Commun*. 2011; 35(4): 237-244.
26. Singh R, Verma PK, Singh G. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *J Complem Med Res*. 2012; 1(2): 101-104.
27. Jurczuk M, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(8): 1478-1486.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA; 2015.

29. Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British J Pharmacol.* 2009; 157(7): 1097-1110.
30. Khaldoun Oularbi H, Richeval C, Lebaili N, Zerrouki-Daoudi N, Baha M, Djennas N, et al. Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human Exp Toxicol.* 2017; 36(7): 709-717.
31. Derelanko MJ, Auletta CS, eds. *Handbook of toxicology.* CRC Press, 2014.
32. Fetoui H, Makni M, Garoui EM, Zeghal N. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroids pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62: 593-599.
33. Króliczewska B, Miśta D, Ziarnik A, Żuk M, Szopa J, Pecka-Kiełb E, et al. The effects of seed from *Linum usitatissimum* cultivar with increased phenylpropanoid compounds and hydrolysable tannin in a high cholesterol-fed rabbit. *Lipids Health Disease.* 2018; 17(1): 76.
34. Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF, et al. Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular Health Risk Manag.* 2009; 5: 757.
35. Gonzalez-Canga A, Fernandez-Martinez N, Sahagun-Prieto A, Diez-Liébana MJ, Sierra-Vega M, Garcia-Vieitez JJ. A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. *Curr Drug Metab.* 2009; 10(4): 359-368.
36. Bentounsi B, Ouksel M, Kachtarzi B. Compared efficacy of twelve registered preparations of ivermectin on the digestive and respiratory nematodes in Algerian sheep. *Revue Méd Vét.* 2009; 160(7): 329-334.
37. Kaplan RM, Vidyashankar AN. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol.* 2012; 186(1-2):70-78.
38. Zhang Y, Luo M, Xu W, Yang M, Wang B, Gao J, et al. Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. *J Agricult Food Chem.* 2016; 64(36): 6895-6902.
39. Khaldoun-Oularbi H, Richeval C, Djenas N, Lhermitte M, Humbert L, Baz A. Effect of sub-acute exposure to abamectin “insecticide” on liver rats (*Rattus norvegicus*). *Ann Toxicol Anal.* 2013; 25(2): 63-70.
40. Arise RO, Malomo SO. Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *Afr J Biochem Res.* 2009; 3(5): 190-197.
41. El-Far AH. Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *Am J Animal Vet Sci.* 2013; 8(3): 128-133.
42. Hsu DZ, Hsu CH, Huang BM, Liu MY. Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. *Toxicology.* 2001; 165(2-3):189-193.
43. Miyajima A, Komoda M, Akagi K, Yuzawa K, Yoshimasu T, Yamamoto Y, et al. Experimental study of pharmacokinetics of external, whole body bathing application of ivermectin. *J Dermatol.* 2015; 42(1): 87-89.
44. Jin L, Feng X, Rong H, Pan Z, Inaba Y, Qiu L, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature Commun.* 2013; 4(1): 1-8.
45. Abd-Elhady HK, Abou-Elghar GE. Abamectin induced biochemical and histopathological changes in the albino rat, *Rattus norvegicus*. *J Plant Protect Res.* 2013; 53(3): 263-270.



EGYPTIAN ACADEMIC JOURNAL OF
BIOLOGICAL SCIENCES
HISTOLOGY & HISTOCHEMISTRY

D



ISSN
2090-0775

WWW.EAJBS.EG.NET

Vol. 13 No. 1 (2021)



Protective Effects of Vitamin C on Ivermectin Induced Toxicity on Kidney Functions and Brain Tissue in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Makhlouf Chahrazed^{1, 2, *}, Khaldoun Oularbi Hassina^{1, 2}, Bokreta Soumya^{1, 2},
Oularbi Yasmine³, Zerrouke Houda¹ and Daoudi Zerrouki Nacira²

1- Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Blida 1, BP 270.
Soumaa, Blida, Algeria

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

3- National Higher School of Agronomy, El-Harrach, 16200, Algiers, Algeria

E.Mail : chahrazedmakhlouf@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article History

Received:28/2/2021

Accepted:17/4/2021

Keywords:

Ivermectin,
Vitamin C,
Biochemical
parameters,
Histopathology,
Rabbit.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of repeated intake of a high dose of Ivermectin (IVM) alone or with co-administration of Vitamin C on kidney biochemical parameters and histological structure of kidney and brain of male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Male rabbits were distributed into four groups (5 rabbits/group) and treated for three consecutive weeks: receiving distilled water; IVM 2 mg/kg b.w. subcutaneously, 3 times a week; IVM + Vitamin C 20 mg/1mL by gavage and IVM + Vitamin C 200mg /kg of diet in food. IVM significantly ($p < 0.05$) increased the plasma level of creatinine compared to the control group. Co-treatment with vitamin C orally by gavage ameliorated this level compared to IVM group. The histopathological examination of kidney sections in IVM alone treated group showed dilated Bowmans' spaces, dilated renal tubules, vascular congestion and cell infiltration. The brain tissues demonstrated vacuolated neuropil and degenerative changes in nerve cells in both the cerebral cortex and hippocampus of IVM-treated rabbits. However, these histological changes were moderate in both vitamin C co-treated groups. In conclusion, vitamin C has a protective effect against nephrotoxicity and neurotoxicity induced by subacute administration of a high dose of IVM.

INTRODUCTION

Macrocyclic lactones (MLs) represent a wide family of antiparasitic drugs of a broad spectrum (McKellar and Benchaoui 1996). MLs are divided into two groups of molecules: avermectins (AVMs) and milbimycins. AVMs were firstly discovered in the fermentation bouillon of *Streptomyces avermitilis*, a soil microorganism (GabAllh *et al.*, 2017). After performing many bioassays, eight natural components, specifically A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b, were found. AVMs molecules of B series were extremely effective over helminthes and arthropods. Ivermectin (IVM; 22, 23-dihydro-avermectin B1) was commercialized for animal and clinical use in 1981 (Shoop *et al.*, 1995).

Based on its high efficacy and tolerability, IVM is a miraculous endectocide drug widely used as an antiparasitic agent in veterinary and human therapy (Trailović and Nedeljković 2010).

IVM is utilized in a large range of animals for internal and external parasites, it is used with different doses as heartworm prophylaxis, ectoparasite treatment and a microfilaricide (Papich 2015). In human medicine, IVM was very effective in treating onchocerciasis (Crump and Omura 2011), strongyloidiasis, scabies, gnathostomiasis, pediculosis, myiasis, leishmaniasis (Dos Santos *et al.*, 2009; Geary, 2005), children head lice and scabies (Bockarie *et al.*, 2000), it was also found efficient against malaria parasite and vector (Azevedo *et al.*, 2019; Mekuriaw *et al.*, 2019) and *Papulopustular rosacea* (De Ménonville *et al.*, 2017). As well, the use of IVM in a mice model was associated with a decrease in alcohol intake (Yardley *et al.*, 2012). The anticancer and the antiviral activity of IVM are well known. Thus recently, IVM was found to have an anti-cancer effect on human colon cancer and lung carcinoma (Diao *et al.*, 2019). Given the widespread of COVID-19 pandemic caused by Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), researchers are constantly striving to find a suitable drug to treat this malady. (Gonçalves *et al.*, 2020) has concluded from the review of many realized works that IVM can inhibit the viral replication of SARS-CoV-2.

IVM is a lipophilic drug that acts by preserving the transmission of electrical impulses in nerves and muscles by intensifying the glutamate-gated chloride ions channels (GluCIs) in parasites. This leads to cell penetration of more chloride ions resulting in hyperpolarization and paralysis of the neuromuscular systems of invertebrates (Bloomquist 2003).

The GluCIs are entirely absent in the nervous system of vertebrates.

However, MLs are well known to link to other transmembrane receptors that are existing in Mammals as well as γ -aminobutyric acid type A (GABA_A), glycine, neuronal α_7 -nicotinic and purinergic P_{2x4} receptors. AVMs are well tolerated in vertebrates and characterized with few to no side effects. This can be explained by their low affinity to the aforementioned receptors compared to GLuCIs (Spampanato *et al.*, 2018). On the other hand, the most common adverse effects of AVMs are related to GABA_A receptor activation (Moreira *et al.*, 2017). According to (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010), this lack of side effects can be due to the presence of a P-glycoprotein pump in the blood-brain barrier that limits the AVMs penetration in the central nervous system (CNS). Even the wide safety of MLs in both animals and human, they can be toxic and even mortal in mammals with P-glycoprotein deficiencies (Menez *et al.*, 2012). In another way, whereas the proper mechanism is unclear, MLs administered at high doses may penetrate through the blood-brain barrier and cause GABA-mimetic toxic effects in mammals. This toxicity starts with hyper-excitability, incoordination, tremors and hypotension and later expands into ataxia, coma and respiratory failure and may lead to death (Yang 2012).

IVM when taken orally or in other routes is well diffused to all tissue compartments via blood circulation, the widest quantity is found in the liver, while the smallest one is found in the brain tissue because of the blood-brain barrier limitation. IVM is almost metabolized in the liver by the cytochrome P450; it is mainly eliminated in the feces while only < 5% is excreted via the kidneys. This unequal distribution of IVM in different organs can explain the diverse toxicity of IVM between invertebrates and their vertebrate hosts (Kudzi *et al.*, 2010).

In addition to the clinical signs of IVM neurotoxicity, actually many studies have detected the effect of Therapeutic and double therapeutic doses of IVM on kidney function in rats (Arise and Malomo 2009; El Sawy *et al.*, 2015; Elzoghby *et al.*, 2015; Omshi *et al.*, 2018) and brain tissue especially the cerebral cortex in rabbits (GabAllh *et al.*, 2017). Conversely, few studies were conducted on the functional and histopathological effects of IVM on the hippocampus. The hippocampus which is fully developed only in mammals is located under the cerebral cortex and form a key brain zone for many forms of learning and memory (Amin *et al.*, 2013). While there are various studies on the toxic effect of IVM, there is a need to study this effect at repeated high-dose therapy.

The toxic effects of AVMs are mainly attributed to oxidative stress (Zhu *et al.*, 2017), which explains the need to use antioxidant products to alleviate their harmful effects in mammals. The utilization of natural antioxidants to ameliorate different xenobiotic-induced alterations in vertebrates becomes a field of interest for many recent researchers. Amongst natural antioxidants, vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble vitamin that protects cellular compartments in the face of reactive oxygen species (Jurczuk *et al.*, 2007). It is one of the main important elements in the biological system (Magdy *et al.*, 2016). This vitamin must be incorporated into the diet for the reason that it cannot be produced in mammals' organisms (Radi *et al.*, 2020). It has been demonstrated that vitamin C ameliorates AVMs induced biochemical; histopathological and/or oxidative stress parameters alterations in kidneys (Omshi *et al.*, 2018; Magdy *et al.*, 2016; Al-Jassim *et al.*, 2016), brain tissues (Radi *et al.*, 2020) and other organs (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017).

The objectives of this study were to examine the impact of sub-acute

exposure to a high dose of IVM (Avimec®) on the renal biochemical parameters and histopathological modifications in kidneys and brain tissues of male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Moreover, the ameliorative effect of vitamin C against IVM toxicity was also tested in this experiment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals:

The injectable solution of IVM (AVIMEC®, 10 mg/ml) and Vitamin C (the content of which was more than 99%) were purchased from the Arab Veterinary Industrial Company, Jordan and Sigma–Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, USA), respectively.

Animals:

To perform this study, young male rabbits of the local breed (*Oryctolagus cuniculus*) with an initial weight of 0.85 to 0.95 kg were used in this work. Rabbits were supplied from a breeding barn of Djebba (Tizi-Ouzou) and maintained for experimentation in the Saidal CRD, Algiers. All animals were lodged in temperature and hygrometry-controlled rooms with a 12 h light/dark cycle. Animal experimentation was consistent with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology (Derelanko and Auletta 2014). Before any treatment, the rabbits were subjected to a 14-day acclimation period and were fed with a commercial pellet diet and water *ad libitum*.

Experimental Design:

The experiment was carried out on 20 male rabbits divided into four groups (n=5) according to their homogeneous mean weight in each group. A control group was given distilled water by gavage; IVM group, treated subcutaneously with a high dose of IVM (2 mg/kg of body weight, three times/week) for 21 days (Lu *et al.*, 2017); IVM + Vit C_g group; treated with the same dose of IVM and Vitamin C by gavage (20 mg / 1ml, three times/week) and IVM + Vit C_f group, treated with the same dose of IVM and Vitamin C supplemented in food (200

mg/kg of food, three times/week) (Fetoui *et al.*, 2010). Vitamin C was administered 24 h after IVM injection. During the acclimation (2 weeks) and experimentation (3 weeks) periods, all animals were weighed daily. While the blood samples were collected at 14 and 21 days of the experiment in heparin tubes from the lateral marginal vein of the ear for renal biomarkers analysis. After 21 days of treatment, all rabbits were sacrificed by cervical decapitation, and kidneys and brain were carefully removed and weighed.

Biochemical Analysis:

To evaluate the effect of ascorbic acid on IVM toxicity, Blood samples were gathered after a fasting period of 12 hours and plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 20 min. The following renal parameters; creatinine, uric acid and urea were evaluated in plasma using a commercially available spectrophotometric enzymatic kit (Biolabo, France) and analyzed by an auto-analyzer (Hitachi 912) instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Histopathological Examinations:

For the histopathological study, the kidneys and the brain were dissected out from all rabbits and fixed in 10% neutral formalin buffer, processed through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin blocks. Organ sections were cut and stained with

haematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examinations.

Statistical Analysis:

Statistical analysis was carried out using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc tests. Data were expressed as the mean $\pm$ SD. A p-value < 0.05 was considered as a level of significance.

RESULTS

No deaths occurred in any group during the experiment. However, severe physical signs (tremor and commotion), hair loss, diarrhea and reduced activity were observed in IVM group rabbits compared to the control group.

Effect on Absolute and Relative Organ Weights:

As mentioned in **Table 1**, the absolute and relative weight of both right and left kidneys showed a significant ($p < 0.05$) increase in the IVM group compared to control group. On the other hand, these weights were not significantly changed in the IVM + Vit C-treated groups compared to control group. However, the absolute and relative weights of the brain were significantly decreased in the IVM group compared to control group without a significant modification of the brain weight in both IVM + Vit C-treated groups compared to control.

Table 1: Effect of IVM and/or Vitamin C on absolute and relative kidneys' and brain weights, 21 days after treatment.

Organ weight (g) / groups			Control	IVM	IVM + VitC _g	IVM + VitC _f
Kidneys	RK	Absolute	5.7 $\pm$ 0.9	6.8 $\pm$ 1.3*	5.9 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 0.8
		Relative	0.3 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.1*	0.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1
	LK	Absolute	6.0 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 1.4*	6.1 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 1.8
		Relative	0.3 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.1*	0.3 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.1
Brain	Absolute		8.4 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.3*	8.3 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 2.4
	Relative		0.4 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.03*	0.5 $\pm$ 0.01	0.5 $\pm$ 0.1

IVM: Ivermectin; VitC: Vitamin C; VitC_g: Vitamin C by gavage; VitC_f: Vitamin C supplemented in food; RK: right kidney; LK: left kidney. Results are given as a mean $\pm$ SD for five rabbits in each group.

*: $p < 0.05$ (significant difference between IVM group and control).

Effect on Serum Biochemical

Parameters:

The results of renal biochemical parameters are shown in Table 2. IVM induced nephrotoxicity as proved by the elevation of kidneys' biomarkers in plasma. On day 14 of experimentation, only the creatinine level increased significantly ($p < 0.05$) in the IVM group compared to the control group. This level was significantly decreased in

IVM + VitC_g group compared to IVM group. On day 21 of experimentation, the plasma level of creatinine continues to be increased significantly in the IVM group compared to control without any significant change in the same level in IVM + VitC-treated groups. However, the levels of uric acid and urea didn't change significantly between the four studied groups on days 14 and 21 of the experimental period.

Table 2: Effect of IVM and/or Vitamin C on renal biomarkers at 14 and 21 days of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + VitC _g	IVM + VitC _f
14 day	Creatinine (mg/dl)	7.16 ± 0.01	10.8 ± 0.01 ^a	8.85 ± 0.13 ^b	7.4 ± 0.36
	Uric acid (mg/dl)	4.4 ± 0.02	5.1 ± 0.01	4.9 ± 0.6	4.8 ± 0.4
	Urea (mg/dl)	0.27 ± 0.2	0.32 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.29 ± 0.01
21 day	Creatinine (mg/dl)	7.24 ± 1.69	12.24 ± 0.88 ^a	7.38 ± 0.51	7.72 ± 1.3
	Uric acid (mg/dl)	4.4 ± 0.03	4.4 ± 0.01	4.91 ± 1.4	4.5 ± 0.3
	Urea (mg/dl)	0.27 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03

IVM: Ivermectin; VitC: Vitamin C; VitC_g: Vitamin C by gavage; VitC_f: Vitamin C supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group.

A and b: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + VitC_g groups).

Histopathological Results:

In the control group, the kidney showed normal morphology with a normal appearance of renal corpuscles, glomeruli, surrounded by Bowman's spaces and cortical tubules with proximal and distal convoluted tubules (Fig. 1: A). In IVM alone treated group, the kidney cortex showed severe pathological alterations, including vascular congestion, mononuclear infiltrating cells, dilation of the Bowmans' spaces, vacuolization in tubular cells and dilated proximal and distal convoluted tubules (Fig. 1: B & C). These pathological changes were ameliorated in IVM + Vitamin C groups (Fig. 1: D).

The cerebral cortex of control (Fig. 2: A & B) rabbits exhibited normal cellular architecture. However,

IVM group (Fig. 2: C, D & E) showed abnormal cellular morphology of granule cells and pyramidal cells in granular and pyramidal layers, respectively accompanied by severe vacuolation of neuropil and necrosis of neurons in the brain cortex. In Vitamin C-treated group's (Fig. 2: F & G) modulation of the abnormalities in brain cortex histopathology as compared to IVM group are shown.

The histological structure of the hippocampus of IVM alone treated group (Fig. 3: C & D) showed degenerative changes mainly neuropil vacuolation and intracellular vacuoles, which result in foam structure cells as compared to control (Fig. 3: A & B) and Vitamin C exposed rabbits (Fig. 3: E & F).

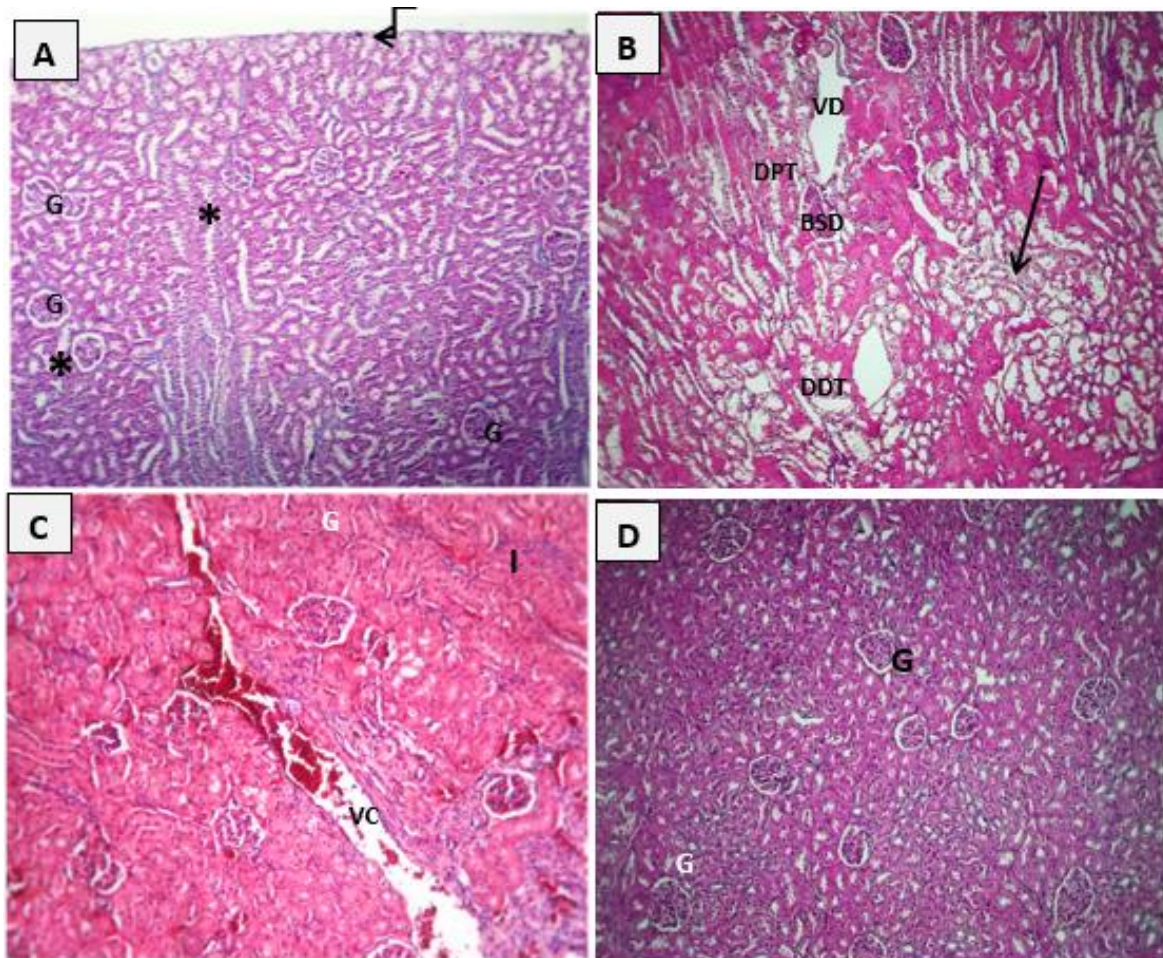


Fig. 1: Photomicrographs of rabbit kidney sections (hematoxylin-eosin) showing (A): the normal appearance of renal cortex limited with renal capsule (arrow) and normal histology of glomeruli (G); surrounded with Bowmans' spaces and distal and proximal convoluted tubules (astirisks) in the control group. (B and C): vacuolation in tubular cells (arrow), vascular dilation (VD), glomeruli with Bowmans' spaces dilation (BSD), dilated distal and proximal convoluted tubules (DDT and DPT, respectively), vascular congestion (VC) and mononuclear cells' infiltrations in IVM group (I). (D): ameliorated architecture of renal cortex in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups, respectively. (Magnification A, B, C and D: Gr × 100).

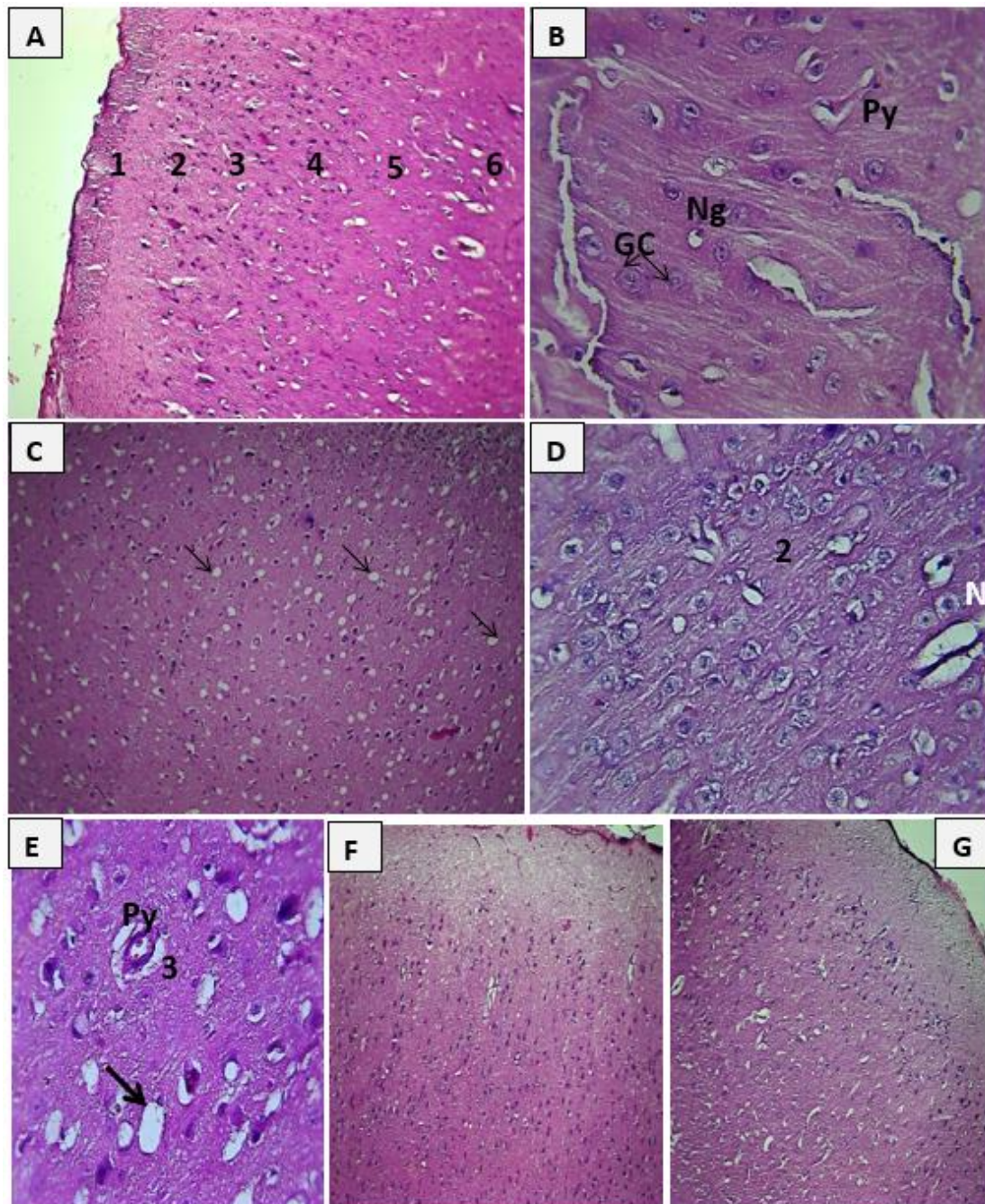


Fig. 2: Photomicrographs of rabbit cerebral cortex sections (hematoxylin-eosin) showing (A and B): the normal architecture of cells (GC: granule cells; Py: pyramidal cell; Ng: neuroglial cell) in cerebral cortex layers (1: molecular layer; 2: outer granular layer; 3: outer pyramidal layer; 4: inner granular layer; 5: inner pyramidal layer; 6: multiform layer). (C, D and E): vacuolated neuropil of the cerebral cortex (arrows), the outer granular layer becomes more cellular with abnormal granule cells (2), irregular shaped pyramidal cells (Py) surrounded by pericellular halos in the outer pyramidal layer and neurons necrosis (N) in IVM group. (F and G): Apparently normal architecture of cerebral cortex layers and cells with less vacuolated neuropil in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups. Magnification: A, C, F and G $\times 100$; B, D and E $\times 400$.

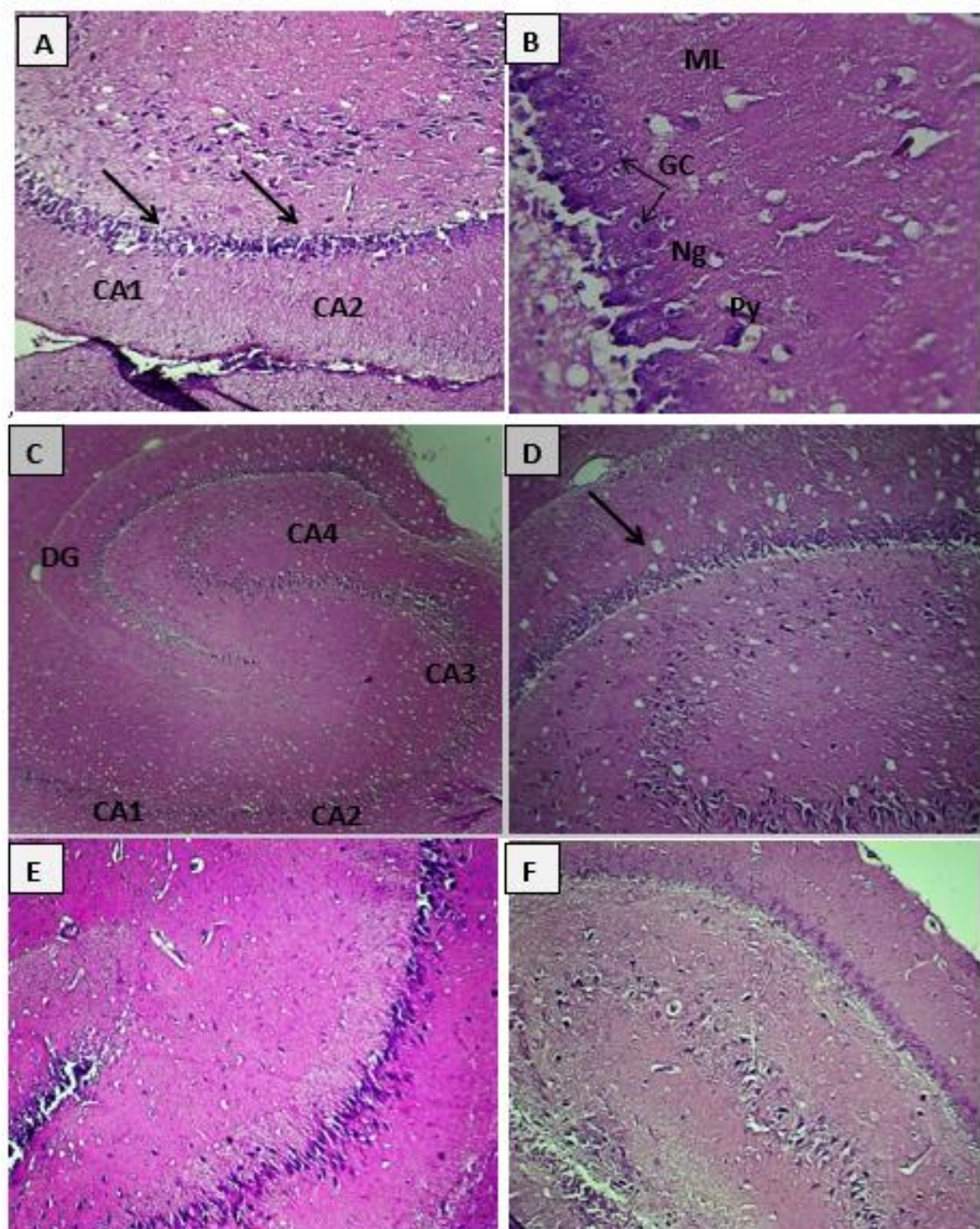


Fig. 3: Photomicrographs of rabbit hippocampus sections (hematoxylin-eosin) showing (A): the normal appearance of pyramidal cells of Cornu Ammonis (CA1 and CA2) region, (B): granular layer with normal granule cells (CG) and normal neuroglial cells (Ng) and pyramidal cells (Py) of the molecular layer in Dentate Gyrus region in the control group. (C and D): vacuolated neuropil of all layers of both Cornu Ammonis (CA1, CA2, CA3, CA4) and Dentate Gyrus (DG) regions and intracellular vacuoles with the formation of foam cells (arrow) in IVM group. (E and F): corrected pathological changes of hippocampus in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups. Magnification: A, C, D, E and F $\times 100$; B $\times 400$.

DISCUSSION

AVMs are the largest marketed anthelmintic drugs in the world. AVMs are potent antiparasitic used for the treatment of both internal and external parasites in animals, they are lipophilic compounds known by a broad spectrum of activity with noticed long-lasting efficacy (GabAllh *et al.*, 2017). The wide range of use of IVM in the treatment of many conditions in animals and humans explains the need of studying its effects on vertebrates especially mammals (Omshi *et al.*, 2018). IVM is considered a very safe drug when therapeutic doses are respected. However, several toxic effects were reported in sensitive populations or are related to involuntary overdoses. The dose and dosage of IVM for animals and humans are changing depending on the clinical case and the type of parasites (Ahmed *et al.*, 2020). According to (Barrett *et al.*, 2016), parenteral IVM is better tolerated compared to oral administration which is associated with embarrassing gastrointestinal side effects.

The present work evaluated the ameliorative and protective effect of vitamin C administered either orally by gavage or supplemented in food on the toxic effects associated with the administration of a high dose of an antiparasitic drug, AVIMEC® (2 mg/kg b.w) given at a dose up to 10 times the highest therapeutic dose of 0.2 mg/kg (0.2 mg/kg b.w) (Barrett *et al.*, 2016) subcutaneously for 21 days in a male rabbit. To achieve this goal, the animals' behaviors, as well as the evolution of the organs' weights, the analysis of renal biochemical parameters and the histopathological changes of the kidney and brain were evaluated.

In the present study, no death was marked in all rabbit groups throughout the acclimation or experimental period. At therapeutic doses, IVM is well tolerated with fewer adverse effects (Grayson *et al.*, 2017). During

experimentation, some behavioral changes were reported in rabbits treated with IVM alone: tremor, commotion, decreased animal activity, hair loss and diarrhea. The observed tremors and commotion are probably related to the IVM neurotoxicity. Despite the fact that IVM does not normally traverse the blood-brain barrier invertebrates due to the expression of P-glycoprotein which restrict the passage of many drugs in the CNS, high-dose animal studies have noticed signs and symptoms of central nervous system toxicity, including emesis, mydriasis, and ataxia (Edwards 2003). Severe signs of neurotoxicosis (depression, ataxia, somnolence, mydriasis, salivation, and tremor) are also provoked by the use of IVM therapeutic dose of 0.2 mg/kg in P-glycoprotein lacking dogs (Hopper *et al.*, 2002). From (Trailovic and Nedejkovic 2010), IVM at 2.5, 5, 7 and 10 mg/kg b.w didn't cause visible CNS depression but at 15 mg/kg b.w produced CNS depression similar to general anesthesia in rats. In the opposite of our results, sub-chronic administration of the oral high dose of emamectine benzoate, an avermectin insecticide, was associated only with decreased activity and increasing weakness (Khaldoun-Oulabi *et al.*, 2015).

The results revealed a significant ($p < 0.05$) increase in the absolute and relative weight of both right and left kidneys in the IVM group compared to control group. Our results are in disagreement with those of (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015) who found a non-significant change in the kidney weight in the emamectin-benzoate treated rat. In contrast, the absolute and relative weights of the brain were significantly decreased in the IVM group compared to control group. This can be explained by the possible penetration and accumulation of IVM in the brain when administered at high doses (Menez *et al.*, 2012). The kidneys' and brain weights were not significantly changed

in the IVM + Vit C-treated groups compared to the control group. These results are in line with other studies that proved the protective effects of vitamin C co-administration on body weight in rats (Omshi *et al.*, 2018; Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2017).

Renal dysfunction can be assessed by plasma levels of creatinine, urea and uric acid (Omshi *et al.*, 2018). In our study, the plasma analysis of renal biomarkers at day 14 of experimentation showed a significant increase in creatinine level in IVM group compared to the control. This level continues to be significantly increased at day 21 of the experiment. However, both uric acid and urea concentrations showed a non-significant increase in the IVM group compared to the control group on both days 14 and 21 of the experimental period. Depending on (Arise and Malomo 2009), these high levels of renal plasma parameters may be attributed to the impairment of the glomerular filtration that produces the retention of creatinine and urea. Our results were matched with the findings of several studies that determine the effects of therapeutic and/or double therapeutic doses of IVM on the variation of renal biomarkers (Arise and Malomo 2009 ; El Sawy *et al.*, 2015 ; Elzoghby *et al.*, 2015 ; Al-Jassim *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2020). In the other hand, our results are in disagreement with those of (Omshi *et al.*, 2018) who determined a non-significant change of creatinine level in IVM treated group compared to the control. For the levels of renal biochemical parameters in the IVM + Vitamin C co-treated groups, only the plasma creatinine level was significantly decreased in the IVM + VitC_g group compared to IVM group. These findings are in agreement with those found by a previous study (Omshi *et al.*, 2018). Conversely, (Aljassim *et al.*, 2016) detected a significant increase of creatinine level even in the vitamin C co-treated groups and a significant decrease of urea in IVM + vitamin C

groups compared to IVM group in rabbits. (Magdy *et al.*, 2016) concluded that vitamin C was able to preserve the kidney tissues against the abamectin-induced oxidative stress that resulted in the abnormal levels of renal biomarkers.

In the current study, all these modifications in plasma renal markers were confirmed by the histopathological alterations found in the IVM treated group including vascular congestion, hemorrhages, mononuclear cell infiltration, dilation of Bowmans' spaces, vacuolization in tubular cells and dilated renal tubules. The same results are found in therapeutic and double therapeutic doses of IVM treated groups in rats (El Sawy *et al.*, 2015; Elzoghby *et al.*, 2015) and rabbits (GabAllh *et al.*, 2017). Vitamin C co-administration orally by gavage or supplemented in food showed less histopathological changes compared to IVM group. According to (Omshi *et al.*, 2018), vitamin C was effective in reducing the level of serum oxidative stress parameters when co-administered to IVM. Similarly, vitamin C was found to have protective effects against renal histology damage when taken orally with IVM (Al-Jassim *et al.*, 2016) and abamectin (Magdy *et al.*, 2016) and intraperitoneally with emamectin benzoate in rats ((Khaldoun-Oulabi *et al.*, 2017).

As mentioned in (Menez *et al.*, 2012), IVM is very safe in mammals. In fact, the P-glycoprotein limits their passage in the brain, thereby preserving their binding to GABA_A receptors. In contrast, IVM neurotoxicity has been stated in mammals in cases of P-glycoprotein failure (Geyer *et al.*, 2009) or overdoses (Trailovic and Nedejkovic 2010). As another finding of the present study, the cerebral cortex histological examination showed severe vacuolated neuropil, abnormal structure of granule cells, the irregular shape of pyramidal cells surrounded with pericellular halos and neurons necrosis in the IVM group compared to the control group. In the same manner, the hippocampal sections

demonstrated vacuolated neuropil and intracellular neuropil with the appearance of foam cells in IVM group compared to control. According to the literature research, few studies were performed on the histopathological effects of IVM on the brain tissues of mammals. Compared to our results, severe alterations of the brain tissues were found in rabbits when administered a therapeutic dose of IVM (degenerative changes in neurons) for 8 weeks and a double therapeutic dose (vesiculation of brain structure) for the same period. In the aforementioned study, it was conducted that the brain lesions were related to the dose and frequency of use of IVM. Identical results were observed in the brain tissue of pigeon when exposed to avermectin (Li *et al.*, 2013). Accordingly, this neurotoxicity was induced by oxidative damage of P-glycoprotein. Recently, the effects of abamectin, an AVM insecticide, on brain oxidative stress parameters and histopathological changes were evaluated in rats (Radi *et al.*, 2020). In this study, the cerebral cortex of the abamectin-treated group showed vacuolated neuropil and hemorrhages, the hippocampus of the same group displayed pyknosis and degenerative changes in pyramidal layers. These results are in line with our findings. In the present work, all treated groups with IVM + VitC orally or in food showed an ameliorated architecture of both cerebral cortex and hippocampus with less vacuolated neuropil. According to (Radi *et al.*, 2020), the histopathological alterations of the cerebral cortex and hippocampus were accompanied by a significant increase in MDA concentration and a significant decrease in GSH and CAT activity in brain tissues. All these oxidant/antioxidant markers were significantly corrected in abamectin + vitamin C treated groups; this finding confirms the antioxidant activity of vitamin C against AVMs neurotoxicity. The neuroprotective effect of vitamin C was confirmed in previous studies in

vivo (Shokouhi *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007).

CONCLUSION

The repeated administration of a high dose of IVM for three consecutive weeks in male rabbits may disturb the renal function and alter the histological structure of kidneys and brain tissue. Vitamin C co-treatment could ameliorate the IVM produced nephrotoxic and neurotoxic effects.

Acknowledgement

The authors express their thanks to the General Directorate of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) for the financing of this research.

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

- Ahmed, A. E.; Alshehri, A.; Al-Kahtani, M. A.; Elbehairi, S. E. I.; Alshehri, M. A.; Shati, A. A.; Alfaifi, M. Y.; Al-Doais, A.A.; Taha R., Morsy, K. and El-Mansi, A. A. (2020). Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124 109841.
- Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., Al-Masoudi, E. A., & Majeed, S. K. (2016). Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). *Basrah Journal of Veterinary Research*, 14, 110-24.
- Amin, S. N.; Younan, S. M.; Youssef, M. F.; Rashed, L. A. and Mohamady, I. (2013). A

- histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research* 2.
- Arise, R. O. and Malomo, S. O. (2009). Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5) 190-197.
- Azevedo, R.; Mendes, A. M. and Prudêncio, M. (2019). Inhibition of Plasmodium sporogonic stages by ivermectin and other avermectins. *Parasites & vectors*, 12(1) 549.
- Barrett, J.; Broderick, C.; Soulsby, H.; Wade, P. and Newsholme, W. (2016). Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe Strongyloides stercoralis infection: two case reports and a discussion of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1) 220-225.
- Bloomquist, J. R. (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(4) 145-156.
- Bockarie, M. J.; Alexander, N. D. E.; Kazura, J. W.; Bockarie, F.; Griffin, L. and Alpers, M. P. (2000). Treatment with ivermectin reduces the high prevalence of scabies in a village in Papua New Guinea. *Acta Tropica*, 75(1) 127-130.
- Crump, A. and Omura, S. (2011). Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 87(2) 13-28.
- De Ménonville, S. T.; Rosignoli, C.; Soares, E.; Roquet, M.; Bertino, B.; Chappuis, J. P.; Chaussade, C. D. P. and Piwnica, D. (2017). Topical treatment of rosacea with ivermectin inhibits gene expression of cathelicidin innate immune mediators, LL-37 and KLK5, in reconstructed and ex vivo skin models. *Dermatology and Therapy*, 7(2) 213-225.
- Derelanko, M. J. and Auletta, C. S. (2014). *Handbook of Toxicology*. CRC Press, New York, USA.
- Diao, H.; Cheng, N.; Zhao, Y.; Xu, H.; Dong, H.; Thamm, D. H.; Zhang, D. and Lin, D. (2019). Ivermectin inhibits canine mammary tumor growth by regulating cell cycle progression and WNT signaling. *BMC veterinary research*, 15(1) 1-10.
- Dos Santos, A. R.; Falcão, C. A. B.; Muzitano, M. F.; Kaiser, C. R.; Rossi-Bergmann, B. and Férézou, J. P. (2009). Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 17(2) 496-502.
- Edwards, G. (2003). Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, 2(S1) S8.
- El-Sawy, A. E. S. F.; El-Maddawy, Z. K. and Seed, S. A. (2015). Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, (47) 119-128.
- ElZoghby, R.R.; Amin, A.; Hamouda, A.F. and Ali, A.F. (2015). Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. *The Journal of American Science*, 11(3) 73-83.
- Fetoui, H.; Makni, M.; Garoui, E. M. and Zeghal, N. (2010). Toxic

- effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6) 593-599.
- GabAllh, M. S.; El-mashad, A. B. E.; Amin, A. A.; Darweish, M. M. (2017). Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal*, 32(1) 104-112.
- Geary, T. G. (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in parasitology*, 21(11) 530-532.
- Geyer, J.; Gavrilova, O. and Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdrla, b P-glycoprotein-and bcrp-deficient knockout mice. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1) 87-96.
- Gonçalves, K.; Vasconcelos, A.; Barbirato, D.; Vasconcelos, C. and Vasconcelos, B. (2020). Therapeutic potential of ivermectin for COVID-19. Authorea Preprints.
- Grayson, M. L.; Cosgrove, S. E.; Crowe, S.; Hope, W.; McCarthy, J. S.; Mills, J.; Mouton, J. W. and Paterson, D. L. (Eds.). (2017). *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs*, -Three Volume Set. CRC Press, New York, USA.
- Han, J. M.; Chang, B. J.; Li, T. Z.; Choe, N. H.; Quan, F. S.; Jang, B. J.; Cho, I. H.; Hong, H. N. and Lee, J. H. (2007). Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain research*, 1185 68-74.
- Hopper, K.; Aldrich, J. and Haskins, S. C. (2002). Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1) 89-94.
- Jurczuk, M.; Brzóska, M. M. and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2007). Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 45(8) 1478-1486.
- Khaldoun Oularbi, H.; Richeval, C.; Lebaili, N.; Zerrouki-Daoudi, N.; Baha, M.; Djennas, N. and Allorge, D. (2017). Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human & experimental toxicology*, 36(7) 709-717.
- 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.
- Kiki-Mvouaka, S.; Menez, C.; Borin, C.; Lyazrhi, F.; Foucaud-Vignault, M.; Dupuy, J.; Collet, X.; Alvinerie, M. and Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug metabolism and disposition*, 38(4) 573-580.
- Kudzi, W.; Dodoo, A. N. and Mills, J. J. (2010). Genetic

- polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC medical genetics*, 11(1) 1-8.
- Li, M.; You, T. Z.; Zhu, W. J.; Qu, J. P.; Liu, C.; Zhao, B.; Xu, S. W. and Li, S. (2013), Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicology*, 22(8) 1241-1254.
- Lu, M.; Xiong, D.; Sun, W.; Yu, T.; Hu, Z.; Ding, J. and B. (2017), Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug delivery*, 24(1) 622-631.
- Magdy, B. W.; Mohamed, F. E.; 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.
- McKellar, Q. A. and Benchaoui, H. A. (1996) Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5) 331-351.
- Mekuriaw, W.; Balkew, M.; Messenger, L. A.; Yewhalaw, D.; Woyessa, A. and Massebo, F. (2019). The effect of ivermectin® on fertility, fecundity and mortality of *Anopheles arabiensis* fed on treated men in Ethiopia. *Malaria journal*, 18(1) 1-10.
- Menez, C.; Sutra, J. F.; Prichard, R. and Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in Mdr1ab (-/-) mice and effects on mammalian GABA (A) channel activity. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(11) e1883.
- Moreira, N.; Sandini, T. M.; Reis-Silva, T. M.; Navas-Suárez, P.; Auada, A. V. V.; Lebrun, I.; Flório, J. C.; Bernardi, M. M. and Spinosa, H. S. (2017). Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reproductive Toxicology*, 74 195-203.
- Omshi, F. S. H.; Abbasalipourkabir, R.; Abbasalipourkabir, M.; Nabyan, S.; Bashiri, A. and Ghafourikhosroshahi, A. (2018). Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29) 29408-29417.
- Papich, M. G. (2015). Saunders handbook of veterinary drugs-e-book: small and large animal. Elsevier Health Sciences, North Carolina, USA.
- Radi, A. M.; Mohammed, E. T.; Abushouk, A. I.; Aleya, L. and 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.
- Shokouhi, G.; Hadidchi, S.; Ghorbanihaghjo, A.; Rahbani-Noubar, M.; Panahi, S.; Forouzanfar, M.; Rashtchizadeh, N. and Mesgari, M. (2005). Neuroprotective effect of ascorbic acid in experimental blunt sciatic nerve injury in

- rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1(2) 1-5.
- Shoop, W. L.; Mrozik, H.; and Fisher, M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology*, 59(2) 139-156.
- Spampanato, J.; Gibson, A. and Dudek, F. E. (2018). The antihelminthic moxidectin enhances tonic GABA currents in rodent hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 119(5) 1693-1698.
- Trailović, S. M. and Nedeljković, J. T. (2010). Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1012080409-1012080409.
- Yang, C. C. (2012). Acute human toxicity of macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6) 999-1003.
- Yardley, M. M.; Wyatt, L.; Khoja, S.; Asatryan, L.; Ramaker, M. J.; Finn, D. A.; Alkana, R. L.; Huynh, N.; Louie, S. G.; Petasis, N. A.; Bortolato, M. and Davies, D. L. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology*, 63(2) 190-201.
- Zhu, M.; Li, Y. and Zhou, Z. (2017). Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(3) 373-378.

DISCUSSION
GENERALE

2. DISCUSSION GENERALE

Les AVMs représentent une classe des antiparasitaires les plus largement commercialisés dans le monde. Les AVMs sont des puissants endectocides utilisés pour le traitement des parasites internes et externes chez les animaux, ce sont des composés lipophiles connus par un large spectre d'activité et une efficacité durable remarquée (GabAllh *et al.*, 2017).

L'IVM est l'un des médicaments de la famille des AVMs les plus utilisés pour le contrôle des maladies parasitaires et a fait l'objet du prix Nobel 2015 de physiologie et/ou médecine, après 35 ans de sa remarquable découverte (Laing *et al.*, 2017). En Algérie, de nombreuses préparations génériques de l'IVM sont utilisées pour le traitement et la prévention des principales parasitoses chez les animaux, causées à la fois par des endo et des ectoparasites (Bentounsi *et al.*, 2009).

L'utilisation des médicaments endectocides pour le traitement des maladies parasitaires chez les lapins a augmenté récemment. Lu *et al.* (2017) ont révélé que le traitement de lapines naturellement infectées par *Psoroptes cuniculi* avec une injection sous-cutanée de l'IVM (Ivomec® à 0,2 mg / kg) a montré une efficacité rapide et élevée contre ces acariens. Gokbulut *et al.* (2010) ont indiqué que l'administration sous-cutanée de deux doses d'IVM (0,3 mg / kg) avec un intervalle de 15 à 20 jours entre les deux pourrait être nécessaire pour le traitement des ectoparasites chez les lapins.

L'utilisation intensive de l'IVM dans le traitement de nombreuses affections chez l'homme et les animaux est associée à des problèmes de résistance et d'efficacité (Kaplan et Vidyashankar, 2012), ce qui explique la nécessité d'étudier les effets liés à une telle utilisation chez les mammifères (Omshi *et al.*, 2018). La dose et la posologie de l'IVM pour les animaux et les hommes changent en fonction du cas clinique et du type de parasites (Ahmed *et al.*, 2020). L'IVM est considérée comme un médicament très sûr lorsque ses doses thérapeutiques sont respectées. Omshi *et al.* (2018) ont révélé que le traitement par l'IVM à une dose de 0,4 mg / kg de poids corporel par voie orale une fois par semaine pendant trois semaines consécutives a entraîné une dégradation oxydative non significative dans le groupe traité par l'IVM par rapport aux autres groupes.

Cependant, plusieurs effets toxiques de ce produit ont été rapportés chez les populations sensibles ou sont liés à des surdosages involontaires (Trailović et Nedeljković, 2010).

Les effets toxiques des AVMs sont principalement attribués au stress oxydatif (Zhu *et al.*, 2017), ce qui explique la nécessité d'utiliser des produits antioxydants pour atténuer leurs effets néfastes chez les mammifères. Récemment, l'évaluation des effets protecteurs des antioxydants naturels contre la toxicité de divers xénobiotiques constitue un domaine de recherche très intéressant. Comme il a été prouvé par l'étude d'Abdeldaim et Abdellatif (2018), l'ester phénéthylrique d'acide caféique et la bétaine ont un effet protecteur contre la toxicité induite par l'abamectine. En outre, certains antioxydants peuvent être administrés avec l'IVM pour améliorer ses effets secondaires tels que la vitamine A (Omshi *et al.*, 2018), le sélénium et la vitamine E (Behera *et al.*, 2011 ; Ahmed *et al.*, 2020) et certains phénols et flavonoïdes (Singh *et al.*, 2012).

La vitamine C ou l'acide ascorbique (AA) est un antioxydant hydrosoluble qui élimine efficacement les radicaux libres, protégeant les membranes cellulaires des dommages oxydatifs (Jurczuk *et al.*, 2007 ; Halliwell et Gutteridge, 2015).

Le présent travail a évalué l'effet amélioratif et protecteur de la vitamine C administrée par gavage ou supplémentée dans l'aliment sur les effets toxiques associés à l'administration répétée d'une dose élevée d'un médicament vétérinaire antiparasitaire, l'AVIMEC® (2 mg / kg p.c.) administré à une dose jusqu'à 10 fois plus élevée que la dose thérapeutique (0,2 mg / kg p.c.) par voie sous-cutanée pendant 21 jours chez le lapin mâle (*Oryctolagus cuniculus*). Selon Barrett *et al.* (2016), l'IVM par voie parentérale est mieux tolérée par rapport à la voie orale qui est associée à des effets secondaires gastro-intestinaux embarrassants.

Pour atteindre cet objectif, le comportement des animaux, la variation du poids corporel et la prise d'aliment et l'eau de boisson, la variation du poids absolu et relatif des organes (foie, rein, poumon et cerveau), ainsi que l'analyse des paramètres biochimiques (hépatiques, rénaux et bilan lipidique) et les modifications histopathologiques du foie, rein, poumon et du cerveau ont été évalués par la réalisation d'une seule expérimentation.

Dans la présente étude, aucun décès n'a été marqué dans tous les groupes de lapins pendant l'acclimatation ou la période expérimentale. Selon la littérature, l'IVM administrée à des doses thérapeutiques est bien tolérée avec moins d'effets indésirables (Grayson *et al.*, 2017). Pendant la période expérimentale, certains changements de comportement ont été rapportés chez des lapins traités par l'IVM seule : tremblements, agitation, baisse de l'activité animale, perte de poils et diarrhée. Les signes neurologiques (tremblements et agitation) observés sont probablement liés à

la neurotoxicité de l'IVM. Chez les animaux vertébrés, tous les LMs possèdent le même mécanisme de toxicité par fixation sur les canaux chlorure- GABA dépendants, qui sont spécifiques au SNC. D'une manière générale, les LMs ont une marge de sécurité élevée chez les mammifères à cause de la présence de la P glycoprotéine (P-gp), un transporteur d'efflux des xénobiotiques fortement exprimée à la barrière hémato-encéphalique et codée par le gène de multirésistance aux médicaments (MDR1), qui limite efficacement leur pénétration dans le SNC (Geyer *et al.*, 2009). Tandis que l'IVM ne traverse normalement pas la barrière hémato-encéphalique chez les vertébrés en raison de l'expression de la P-gp, son administration à des fortes doses chez les mammifères est associée avec des signes et des symptômes de toxicité pour le SNC, y compris vomissements, mydriase et ataxie (Edwards, 2003). Cependant, des signes sévères de neurotoxicose (dépression, ataxie, somnolence, mydriase, salivation et tremblements) sont également provoqués par l'utilisation d'une dose thérapeutique de l'IVM (0,2 mg/kg p.c.) chez les chiens dépourvus de la P-gp (Hopper *et al.*, 2002). D'après l'étude réalisée par Trailovic et Nedekovic (2010), l'IVM administrée à des doses de 2,5, 5, 7 et 10 mg/kg p.c. n'a pas provoqué une dépression apparente du SNC, mais à 15 mg/kg p.c., elle a produit une dépression du SNC similaire à l'anesthésie générale chez le rat. À l'opposé de nos résultats, l'administration sub-chronique d'une dose élevée par voie orale de benzoate d'émamectine, un insecticide à base d'ivermectine, n'a été associée qu'à une baisse de l'activité et à une faiblesse dose dépendante (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015). La diarrhée observée lors de notre expérimentation est peut-être expliquée par le fait que les risques de troubles digestifs (diarrhées) sont élevés chez le jeune lapin, surtout dans les 2 à 4 semaines qui suivent le sevrage, et c'est une source majeure de morbidité et de mortalité. Ces risques sont réduits en respectant un apport minimum de fibres dans l'aliment (Giedenne *et al.*, 2015). Dans le même sens, l'administration sous-cutanée de l'IVM (2mg/kg p.c.) chez les chèvres, a pu provoquer des signes cliniques comme l'ataxie (apparition 12h après l'injection durant 4 jours), tremblements et dépression (apparition 20h après l'injection durant 2 jours) et la diarrhée (apparition 6h après l'injection durant 3 jours) (Abdou et Sharkawy, 2004).

La variation du poids corporel est un signe de l'aggravation de l'état de santé générale de l'animal. Nos résultats montrent une diminution significative du poids corporel et le % PP chez les lapins traités par l'IVM par rapport au groupe témoin. nos résultats sont en ligne avec ceux trouvés durant les études de la toxicité d'autres AVMs (abamectine et benzoate d'émamectine) chez les rats (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2013 ; Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015 et Khaldoun-Oularbi *et*

al., 2017). Par contre, nos résultats ne concordent pas à ceux trouvés par *Omshi et al.* (2018), qui n'ont trouvé aucune différence significative du poids corporel entre le groupe témoin et celui traité par une dose thérapeutique de l'IVM par voie orale chez les lapins mâles.

Une baisse du pourcentage de l'aliment (% PA) et le pourcentage de prise de l'eau de boisson (% PB) ont été également notées chez le groupe traité par l'IVM. Ce résultat peut expliquer clairement la baisse du poids corporel dans ce même groupe. Cette baisse de la prise d'aliment est peut-être expliquée par le mécanisme d'action des AVMs qui sont capables d'inhiber la motilité du muscle pharyngien bloquant ainsi le transit de l'aliment chez les nématodes (*Trichostrongylus colubriformis*) (*Sheriff et al.*, 2002). Une telle diminution de la consommation de l'aliment peut entraîner chez les lapins un déséquilibre énergétique qui est caractérisé par une baisse des apports alimentaires par rapport aux besoins énergétiques. L'un des mécanismes de compensation de ce déséquilibre est l'utilisation des réserves du tissu adipeux comme une source d'énergie ce qui peut entraîner une diminution de la masse grasse corporelle qui peut justifier la diminution du poids corporel chez les lapins traités par l'IVM.

Nous avons noté chez les groupes traités par l'IVM + vitamine C, une augmentation significative du poids corporel final, % PP, % PA et % PB relativement au groupe traité par l'IVM seule. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par *Khaldoun-Oularbi, et al.* (2017) et *Omshi et al.* (2018) qui ont montré chez les animaux traités par le benzoate d'émamectine + vitamine C (200 mg/kg) et l'IVM + vitamine C (1.25 mg/kg), respectivement, aucune différence significative du poids corporel, la prise d'aliment et de boisson par rapport au groupe témoin. Ce qui prouve l'effet protecteur de la vitamine C lorsqu'elle est associée à l'IVM.

Les résultats de la variation des poids des organes étudiés ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids absolu et relatif du poumon dans les deux groupes co-traités par l'IVM + vitamine C par rapport au groupe témoin. Ces résultats peuvent être expliqués par la génération du stress oxydatif dû à l'administration répétée d'IVM et à son accumulation dans les tissus pulmonaires (*Aljassim et al.*, 2016). Pour le foie, aucun changement n'a été observé dans ses poids absolu et relatif dans tous les groupes traités. Ces résultats ne sont pas en accord avec les études précédentes montrant une augmentation significative du poids du foie après l'administration des AVMs (*Elzoghby et al.*, 2015 ; *Khaldoun-Oularbi, et al.* 2013 ; *Khaldoun-Oularbi, et al.* 2017). Nos résultats ont révélé aussi une augmentation significative du poids absolu et relatif des

reins droits et gauches dans le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin. Cette élévation est peut-être due à l'augmentation des demandes accrues de détoxification des composés toxiques (Hayes et Laws, 1990). Notre résultat est en désaccord avec ceux de Khaldoun-Oularbi *et al.* (2015) qui ont trouvé un changement non significatif du poids des reins chez le rat traité à l'émamectine-benzoate. En revanche, les poids absolus et relatifs du cerveau étaient significativement diminués dans le groupe IVM par rapport au groupe témoin. Cela peut s'expliquer par la destruction du tissu cérébral lié à la pénétration de l'IVM dans le cerveau après son administration à forte dose (Elzoghby *et al.*, 2015). Les poids des reins et du cerveau n'ont pas été modifiés de manière significative dans les groupes traités par l'IVM + Vitamine C par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en ligne avec d'autres études qui ont prouvé les effets protecteurs de la co-administration de vitamine C sur le poids corporel chez le rat (Omshi *et al.*, 2018 ; Khaldoun-Oularbi *et al.* 2017).

L'IVM administrée par voie orale ou par d'autres voies est bien diffusée dans tous les compartiments tissulaires via la circulation sanguine, la plus grande quantité se trouve dans le foie, tandis que la plus petite se trouve dans le tissu cérébral en raison de la restriction de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique. L'IVM est presque totalement métabolisée dans le foie par le cytochrome P450 ; il est principalement éliminé dans les fèces alors que seulement (<5%) est excrété dans les urines (El-Saber Batiha *et al.*, 2020). Cette répartition inégale de l'IVM dans différents organes peut expliquer la toxicité diversifiée de l'IVM entre les invertébrés et leurs hôtes vertébrés (Kudzi *et al.*, 2010).

En plus des signes cliniques de neurotoxicité de l'IVM, de nombreuses études ont détecté l'effet des doses thérapeutiques et thérapeutiques doubles de l'IVM sur la fonction rénale chez le rat (Arise et Malomo, 2009 ; El Sawy *et al.*, 2015 ; Elzoghby *et al.*, 2015 ; Omshi *et al.*, 2018, Al-Jassim *et al.*, 2016) et les tissus cérébraux chez le lapin (GabAllh *et al.*, 2017) et les pigeons (Li *et al.*, 2013).

Néanmoins, à des concentrations plus élevées, l'IVM a un large éventail d'effets dans de nombreux organismes (Laing *et al.*, 2017 ; Merola et Paul, 2018) et l'administration répétée de différentes doses d'IVM a induit des altérations histopathologiques dans le foie (Al-Jassim *et al.*, 2015) et les poumons (Al-Jassim *et al.*, 2016) chez le lapin et le testicule (Elzoghby *et al.*, 2015) chez le rat.

Nos résultats montrent que l'administration répétée d'une forte dose de l'AVIMEC® cause des troubles des paramètres biochimiques de la fonction hépatique, rénale et bilan lipidique et des altérations tissulaires du foie, rein, poumon et cerveau chez le lapin mâle. Ces résultats sont récapitulés ci-après.

Le foie et les reins jouent un rôle fondamental dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, ce qui implique leur prédisposition aux différents dommages cellulaires et tissulaires, lors d'une exposition excessive, favorisant ainsi une défaillance de ces organes par une fuite des enzymes, une peroxydation lipidique et un stress oxydatif (Arise et Malomo, 2009 ; El-Far, 2013). D'après la littérature, les études de la toxicité biochimique et histologique des xénobiotiques pour la fonction hépatique et rénale sont les plus fréquemment accomplies (Zhu et al., 2013 ; Eissa et Zidan, 2010).

La présente étude a révélé une augmentation significative du taux de glucose chez le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin, après 21 jours d'expérimentation. Cette hyperglycémie est éventuellement due à une perturbation du métabolisme glucidique sous l'effet d'une administration d'une forte dose de l'IVM. Selon Bergmeyer, (1980), en cas des lésions hépatiques, le métabolisme des protéines est obligatoirement modifié vers la néoglucogénèse. L'exploration de la fonction hépatique a montré aussi une élévation significative des transaminases hépatiques (l'ALAT et l'ASAT) et γ -GT aux 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période expérimentale chez les lapins traités par IVM seule, ce qui était en corrélation avec les résultats histopathologiques du foie. Les transaminases sont des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique et leurs taux plasmatiques élevés indiquent une altération du tissu hépatique. L'augmentation des concentrations plasmatiques d'ASAT témoigne une lésion cellulaire au niveau des différents tissus à savoir le tissu hépatique, rénal, cardiaque ou musculaire. par contre, l'ALAT est une enzyme spécifique au tissu hépatique (Khaldoun-Oularbi, 2015). Un taux élevé de la γ -GT est enregistré dans les maladies hépatobiliaires (Khaldoun-Oularbi et al., 2013). De nombreuses études ont déclaré que l'exposition aux AVMs a un potentiel significatif pour induire des lésions dans le foie du rat en augmentant les transaminases plasmatiques et / ou la glycémie (Khaldoun-Oularbi et al., 2013 ; Khaldoun-Oularbi et al., 2017 ; El-Far, 2013 ; Hsu et al., 2001).

En revanche, ces paramètres ont été réduits lorsque les lapins ont été co-traités par l'IVM et la vitamine C par rapport aux lapins administrés par l'IVM seule. Le traitement IVM + vitamine

C par gavage a permis de mieux diminuer le taux de glycémie par rapport à l'IVM + vitamine C supplémenté en aliment. Les effets de l'IVM et de sa combinaison avec la vitamine C sur les biomarqueurs hépatiques chez le lapin indiquent que la vitamine C offre une meilleure protection contre les lésions hépatiques induites par l'IVM par son activité antioxydante. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par [Khaldoun Oularbi et al. \(2017\)](#) et [Magdy et al. \(2016\)](#) qui ont confirmé l'effet d'amélioration de la vitamine C sur les taux plasmatiques de glucose, d'ASAT, d'ALAT et la γ -GT lorsqu'elle était co-administrée au benzoate d'émamectine pendant 28 jours et à l'abamectine pendant 45 jours.

Le dysfonctionnement rénal peut être évalué par les taux plasmatiques de créatinine, d'urée et d'acide urique ([Omshi et al., 2018](#)). Dans notre étude, l'analyse plasmatique des biomarqueurs rénaux au 14^{ème} jour de l'expérimentation a montré une augmentation significative du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au témoin. Ce niveau continue d'être considérablement augmenté au 21^{ème} jour de l'expérience. Cependant, les concentrations d'acide urique et d'urée ont montré une augmentation non significative dans le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin aux 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période expérimentale. Selon [Arise et Malomo \(2009\)](#), ces taux élevés de paramètres plasmatiques rénaux peuvent être attribués à l'altération de la filtration glomérulaire qui produit la rétention de la créatinine et de l'urée. La décomposition des protéines hépatiques peut expliquer l'augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique chez les rats traités par les AVMs, où les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine ([Khaldoun et al., 2015](#)). Nos résultats ont été en accord avec les conclusions de plusieurs études qui déterminent les effets des doses thérapeutiques et / ou thérapeutiques doubles d'IVM sur la variation des biomarqueurs rénaux ([Arise et Malomo, 2009](#) ; [El Sawy et al., 2015](#) ; [Elzoghby et al., 2015](#) ; [Al-Jassim et al., 2016](#); [Ahmed et al., 2020](#)). En revanche, nos résultats sont en désaccord avec ceux d'[Omshi et al. \(2018\)](#) qui ont déterminé un changement non significatif du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. Pour les niveaux de paramètres biochimiques rénaux dans les groupes co-traités par l'IVM + Vitamine C, seulement le taux de créatinine plasmatique a été significativement diminué dans le groupe IVM + Vitamine C par gavage par rapport au groupe administré par l'IVM. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédemment citée ([Omshi et al., 2018](#)). À l'inverse, [Aljassim et al. \(2016\)](#) ont détecté une augmentation significative du taux de créatinine même dans les groupes co-traités par la vitamine C et une diminution significative de l'urée dans

les groupes traités par l'IVM + vitamine C par rapport au groupe injecté par l'IVM chez les lapins. [Magdy et al. \(2016\)](#) ont conclu que la vitamine C en comparaison avec la vitamine E était capable de préserver les tissus rénaux contre le stress oxydatif induit par l'abamectine qui entraînait des niveaux anormaux de biomarqueurs rénaux.

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la cause d'un tiers des décès dans le monde et cette situation progressera en raison de l'augmentation des facteurs de risque de MCV ([Deaton et al., 2011](#)). Le bilan lipidique est le principal facteur de risque prédictif des MCV ([Kanthé et al., 2012](#)). Des preuves scientifiques solides indiquent qu'il existe une forte liaison entre l'incidence des MCV et un taux élevé de LDL-C et également un faible taux de HDL-C ([Igweh et al., 2005](#)). Par conséquent, les rapports LDL-C / HDL-C et CT/ HDL-C sont souvent calculés pour estimer le risque cardiovasculaire ([Millàn et al., 2009](#)). D'un autre côté, un niveau élevé de TG a été associé à une augmentation de LDL-C et à un risque cardiovasculaire accru ([Nwagha et al., 2010](#)). Sur ce fondement, la dyslipidémie athérogène, définie comme un rapport de LDL-C / HDL-C élevé et une hypertriglycémie, est associée à un risque cardiovasculaire élevé.

Un autre marqueur puissant pour prédire le risque d'athérosclérose et de maladie coronarienne, est représenté par l'indice athérogène du plasma (IAP) ([Króliczewska et al., 2018](#)). L'IAP reflète la véritable relation entre les lipoprotéines protectrices et athérogènes et est lié à la taille des particules de lipoprotéines pré- et antiathérogènes ([Dobiášová et al., 2011](#)). Il a été suggéré qu'une valeur d'IAP qui varie entre -0,3 et 0,11 est associée à un faible risque de MCV ; les valeurs comprises entre 0,11 et 0,24 et supérieures à 0,24 sont associées respectivement à des risques intermédiaires et élevés ([Dobiasova et al., 2006](#)).

[Miyajima et al. \(2015\)](#) ont démontré une corrélation significative entre l'augmentation des concentrations de cholestérol total (CT) et celles de l'IVM dans le plasma de lapin. Ces auteurs ont proposé que le profil pharmacocinétique de l'IVM soit influencé non seulement par la promotion de la dissolution de l'IVM dans le tractus gastro-intestinal, mais également par le changement de la concentration plasmatique de cholestérol. À l'inverse, notre étude a démontré que l'administration IVM provoque une diminution des taux plasmatiques de tous les paramètres lipidiques à l'exception du taux de HDL-C qui est augmenté au 14ème jour de l'expérimentation. Cependant, la co-administration de la vitamine C aux lapins traités par IVM a entraîné une amélioration partielle des

taux de CT, HDL-C et VLDL-C, ainsi que des taux de TG. De plus, les taux de LDL-C et de TG ont été encore significativement inférieurs à ceux des lapins témoins au 21^{ème} jour.

Nos résultats sont en ligne avec ceux de [Jin *et al.* \(2013\)](#) qui ont démontré que l'ivermectine diminuait le cholestérol sérique, y compris les taux LDL et HDL chez la souris. Ils ont établi que le médicament antiparasitaire, IVM, est considéré comme un ligand du récepteur farnésoïde X (FXR) qui maintient l'homéostasie des acides biliaires et du cholestérol et peut améliorer efficacement l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie chez les souris diabétiques en régulant l'expression de leurs gènes. Selon [Al-Jassim *et al.* \(2015\)](#), le niveau de CT n'a pas changé significativement dans les groupes de lapins traités par IVM et IVM + vitamine C par rapport au groupe témoin alors que cette étude a montré une diminution significative du taux plasmatique de TG dans deux groupes exposés à IVM + vitamine C par voie orale (0,5 mg / kg + 50 mg / kg et 2 mg / kg + 50 mg / kg; respectivement).

La découverte la plus importante de notre étude est que l'indice athérogène du plasma (IAP) et les deux facteurs athérogènes (cholestérol total / HDL-C et LDL-C / HDL-C) se sont avérés diminués dans le groupe traité par l'AVIMEC[®] par rapport à celui du groupe témoin. Ce qui explique l'effet antiathérogène de l'IVM. Par contre, la co-administration de la vitamine C dans l'aliment ou par gavage a causé une élévation des valeurs de l'IAP et les facteurs athérogènes chez les lapins mais qui sont semblables à celles du groupe témoin.

Les résultats mentionnés ci-dessus ont révélé que l'administration d'une dose élevée de l'IVM 3 fois / semaine pendant trois semaines consécutives chez de jeunes lapins présentait des altérations histologiques dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau des lapins mâles. Les lésions histologiques hépatiques consistent essentiellement en une perte de l'architecture normale des hépatocytes, une dilatation sinusoïdale, une dilatation de la veine centrolobulaire, une nécrose des hépatocytes, une congestion vasculaire et une infiltration des cellules inflammatoires. Ces résultats expliquent le taux élevé significatif des paramètres biochimiques hépatiques et sont conformes à de nombreux travaux qui ont démontré que l'administration répétée de doses thérapeutiques ou thérapeutiques doubles de l'IVM induisait de graves modifications dégénératives et une nécrose dans le parenchyme hépatique ([Elzoghby *et al.*, 2015](#) ; [Omshi *et al.*, 2018](#) ; [Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2013](#)).

Les tests histologiques du poumon dans le groupe traité par l'IVM ont révélé une bronche intrapulmonaire irrégulière avec une prolifération altérée de l'épithélium muqueux, des bronchioles dilatées avec un épithélium épais, des alvéoles dilatées avec un épaississement de leurs septa, une hémorragie pulmonaire et une congestion des artères pulmonaires. Ces lésions tissulaires constituent des signes de toxicité pulmonaire de l'IVM. Ces résultats sont en ligne avec ceux obtenus par [AL-Jassim et al. \(2016\)](#) et [Abd-Elhady et Abou-Elghar \(2013\)](#) qui ont observé une pneumonie interstitielle avec congestion et œdème dans la coupe histologique pulmonaire de rat exposé à l'abamectine pendant 30 jours, tandis que des hémorragies locales associées à une atelectasie ont été observées dans les poumons des animaux exposés à abamectine pendant 210 jours.

La vitamine C prévient les dommages histologiques ultérieurs induits dans les tissus hépatiques et pulmonaires. D'après nos résultats, nous pouvons supposer que les dommages histologiques hépatiques et pulmonaires de l'ivermectine sont principalement attribués à une augmentation du stress oxydatif puisque les effets ont été largement évités par une supplémentation en acide ascorbique, en particulier lorsque celui-ci a été administré ultérieurement par gavage. Auparavant, de nombreuses études ont également montré l'efficacité curative et antioxydante de la vitamine C ([Al-Jassim et al., 2016](#) ; [Omshi et al., 2018](#) ; [Khaldoun-Oularbi et al., 2017](#)) et d'autres vitamines comme la vitamine E et sélénium ([Behera et al., 2011](#)) contre la toxicité des AVMs.

Dans la présente étude, toutes les modifications des marqueurs rénaux plasmatiques ont été confirmées par les altérations histopathologiques trouvées dans le groupe traité par IVM, y compris la congestion vasculaire, les hémorragies, l'infiltration du parenchyme rénal par des cellules inflammatoires, la dilatation des chambres glomérulaires, la vacuolisation dans les cellules tubulaires et les tubules rénaux dilatés. Les mêmes résultats sont trouvés après une administration des doses thérapeutiques et thérapeutiques doubles de l'IVM chez le rat ([El Sawy et al., 2015](#) ; [Elzoghby et al., 2015](#)) et le lapin ([GabAllh et al., 2017](#)). La co-administration de vitamine C par voie orale par gavage ou en supplément alimentaire a montré moins de lésions histopathologiques par rapport au groupe qui a reçu l'IVM. Selon [Omshi et al. \(2018\)](#), la vitamine C a été efficace pour réduire le taux des paramètres de stress oxydatif sérique lorsqu'elle a été co-administrée à l'IVM. De même, la vitamine C s'est avérée avoir des effets protecteurs contre les dommages histologiques rénaux lorsqu'elle est prise par voie orale avec l'IVM ([Al-Jassim et al.,](#)

2016) et l'abamectine (Magdy *et al.*, 2016) et par voie intrapéritonéale avec le benzoate d'émamectine chez le rat (Khalidoun-Oularbi *et al.*, 2017).

Comme mentionné par Menez *et al.* (2012), l'IVM est très sécuritaire chez les mammifères. En effet, la P-gp limite leur passage dans le cerveau, préservant ainsi leur liaison aux récepteurs GABA_A. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la neurotoxicité de l'IVM ne sont pas complètement compris et peuvent être dus à de nombreuses théories. Selon Guzzo *et al.* (2002), l'IVM administrée à des doses élevées jusqu'à 10 fois plus la dose approuvée par la FDA (Food and Drug Administration), 200 µg / kg, est généralement bien tolérée, sans indication de toxicité associée au SNC. En revanche, la neurotoxicité de l'IVM a été rapportée chez les mammifères en cas de dysfonctionnement de la P-gp (Geyer *et al.*, 2009) ou en cas de surdosage (Trailovic et Nedeljkovic, 2010).

Comme un autre résultat de la présente étude, l'examen histologique du cortex cérébral a montré une vacuolisation sévère du neuropile, une structure anormale des cellules granulaires, une forme irrégulière des cellules pyramidales entourées des halos péricellulaires et une nécrose des neurones chez le groupe traité uniquement par l'IVM par rapport au groupe témoin. De la même manière, les coupes histologiques de l'hippocampe ont démontré un neuropile vacuolé et une vacuolisation intracellulaire avec apparition de cellules en mousse. Selon la littérature, peu d'études ont été menées sur les effets fonctionnels et histopathologiques de l'IVM sur les tissus cérébraux des mammifères, spécifiquement l'hippocampe qui n'est totalement développé que chez les mammifères et situé sous le cortex cérébral et forme une zone cérébrale clé pour de nombreuses formes d'apprentissage et de mémoire (Amin *et al.*, 2013). La vacuolisation dans le neuropile des tissus cérébraux pourrait être attribuée au rétrécissement des cellules nerveuses suite à une affection cytosquelettique laissant des espaces péri-cellulaires (halos). ces espaces indiquent une mort neuronale et sont compatibles avec la nécrose neuronale observée aux stades précoces des états ischémiques (Auer et Sutherland, 2002). Par rapport à nos résultats, des altérations sévères des tissus cérébraux ont été retrouvées chez le lapin lors de l'administration d'une dose thérapeutique d'IVM (modifications dégénératives des neurones) pendant 8 semaines et d'une double dose thérapeutique (vésiculation de la structure cérébrale) pendant la même période (GabAllh *et al.*, 2017). Dans l'étude susmentionnée, il a été réalisé que les lésions cérébrales étaient liées à la dose et à la fréquence d'utilisation de l'IVM. Des résultats identiques ont été observés dans le tissu cérébral du pigeon exposé à l'ivermectine (Li *et al.*, 2013). En conséquence, cette neurotoxicité a

été induite par des dommages oxydatifs de la P-glycoprotéine. Les tissus cérébraux sont très sensibles aux dommages oxydatifs en raison de leur forte utilisation d'oxygène et de leur mécanisme de défense antioxydant peu développé (Afifi et Embaby, 2016). Récemment, les effets de l'abamectine, un insecticide de la famille des AVMs, sur les paramètres du stress oxydatif des tissus cérébraux et les changements histopathologiques ont été évalués chez le rat (Radi et al., 2020). Dans cette étude, le cortex cérébral du groupe traité par l'abamectine a montré un neuropile vacuolé et des hémorragies, l'hippocampe du même groupe présentait une pycnose et des changements dégénératifs dans les couches pyramidales. Ces résultats sont conformes à nos résultats. Dans le présent travail, tous les groupes traités par IVM + Vitamine C par voie orale ou alimentaire ont montré une architecture améliorée du cortex cérébral et de l'hippocampe avec un neuropile moins vacuolé. Selon Radi et al. (2020), les altérations histopathologiques du cortex cérébral et de l'hippocampe ont été accompagnées d'une augmentation significative de la concentration de MDA (Malondialdéhyde) et d'une diminution significative de l'activité GSH (Glutathione réduit) et CAT (Catalase) dans les tissus cérébraux. Tous ces marqueurs oxydants / antioxydants ont été significativement corrigés dans les groupes traités par abamectine + vitamine C. Cette découverte confirme l'activité antioxydante de la vitamine C contre la neurotoxicité des AVMs. L'effet neuroprotecteur de la vitamine C a été confirmé dans des études antérieures in vivo (Shokouhi et al., 2005 ; Han et al., 2007). D'après Naseer et al. (2010), la vitamine C a pu réduire efficacement la gravité des lésions cérébrales induites par l'éthanol en tant que puissant piègeur de radicaux libres d'oxygène. Cette vitamine a restauré aussi l'expression d'importants marqueurs neuronaux, et elle a pu également interagir avec l'éthanol au niveau extracellulaire et ainsi atténuer l'effet tératogène global de l'éthanol chez le rat.

CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Actuellement, les risques sanitaires liés à l'administration et à l'utilisation des médicaments vétérinaires constituent une inquiétude majeure pour les éleveurs, les vétérinaires et leurs assistants qui sont amenés à être exposés chroniquement à ses produits.

Dans ce contexte, nous avons contribué à la recherche des effets de l'administration répétée d'une forte dose de l'IVM (AVIMEC®) pendant 21 jours chez le lapin de souche (*Oryctolagus cuniculus*) et les effets protecteurs d'une coadministration de la vitamine C par deux voies différentes.

La présente étude est réalisée en utilisant des analyses biochimiques et des examens histologiques afin de rechercher l'impact toxicologique de ce médicament. D'après les résultats de notre étude, l'IVM administré à une dose de 2 mg/kg p.c. a pu affecter significativement les variations du poids corporel, la consommation d'aliment et le poids absolu et relatif des différents organes.

Selon les résultats d'analyse des échantillons plasmatiques, l'IVM a montré clairement un effet hyperglycémiant et hypolipidémiant chez le lapin. Les autres marqueurs biochimiques du bilan hépatique, rénal et lipidique sont aussi perturbés.

Nous avons prouvé par le biais de l'examen histopathologique du foie, du rein, du poumon et cerveau que l'IVM possède une hépatotoxicité, une néphrotoxicité, une toxicité pulmonaire et une neurotoxicité chez les mammifères.

Les effets toxiques de l'IVM sont trouvés contrôlables après une coadministration de la vitamine C par gavage ou supplémenté dans l'alimentation du lapin. Cet antioxydant d'origine naturelle a permis d'atténuer toutes les anomalies causées par l'IVM. D'où la nécessité de sa supplémentation avec le traitement par IVM comme solution efficace contre la toxicité de l'IVM.

Pour conclure, une application prudente doit être envisagée lors de l'utilisation de l'IVM à grande échelle chez les lapins et autres animaux d'élevage.

La sensibilisation des éleveurs et des manipulateurs vis-à-vis des effets néfastes causés par l'utilisation aléatoire et excessive des endectocides et spécifiquement l'IVM, devient une démarche obligatoire. De ce fait, nous recommandons une co-administration de la vitamine C avec l'IVM pour éliminer ses effets toxiques. Cette étape va proportionnellement contribuer à la réduction de la formation des résidus médicamenteux dans les denrées alimentaires d'origine animale pour la consommation humaine. La vitamine C par gavage est recommandée par rapport à celle apportée dans l'aliment.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos observations nous permettent de proposer plusieurs pistes à explorer dorénavant :

- Renforcer cette étude par la réalisation d'une étude histomorphométrique.
- La réalisation d'une coloration histochimique par le PAS serait un complément plus que nécessaire afin de mettre en évidence les différents dommages engendrés par ce médicament sur les différents tissus.
- Estimer l'effet du stress oxydatif sur les différents tissus en déterminant les éventuelles variations des marqueurs biologiques spécifiques à chaque tissu afin de démontrer le rôle antioxydant de la vitamine C.
- Etudier l'impact de l'IVM sur d'autres organes en utilisant des biomarqueurs plus spécifiques.
- Vérifier l'effet toxique des avermectines par des dosages des résidus B1a et B1b dans les différents organes en utilisant les méthodes analytiques les plus modernes.
- Etudier les mécanismes cellulaire et moléculaire des effets protecteurs des antioxydants en général et de la coadministration des vitamines C en particulier sur la toxicité induite par l'IVM.
- Il serait intéressant de reprendre l'étude sur une période plus longue (toxicité Subaiguë et toxicité chronique), pour rechercher un éventuel effet mutagène et/ou cancérogène de ce médicament.
- Tester l'activité antioxydante d'autres vitamines et oligoéléments comme la vitamine E, sélénium, ...
- Enfin, et afin de pouvoir évaluer précisément le risque lié à l'exposition des avermectines, il est indispensable de faire appel à des méthodes alternatives de biologie moléculaires qui peuvent apporter des éléments d'interprétation sur le mode d'action des avermectines en ciblant la famille des protéines ABC et spécifiquement la P glycoprotéine P (P-gp) substrat des avermectines. Sachant que la P-gp a un rôle d'efflux des xénobiotiques au niveau de nombreuses barrières tissulaires de l'organisme, en particulier de la barrière hémato-méningée et l'absence de cette protéine résulte en une accumulation de certains xénobiotiques pouvant conduire à l'intoxication.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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.
2. 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), 263-270.
3. Abdou, K. A., & Sharkawy, A. A. (2004, February). Some toxicological studies on ivermectin in goats. In Proceeding of the 20 Annual meeting of the Egyptian Society of toxicology. Bibliotheca Alexandria, Alexandria University, Alexandria, Egypt (pp. 18-19).
4. Afifi, O. K., & Embaby, A. S. (2016). Histological study on the protective role of ascorbic acid on cadmium induced cerebral cortical neurotoxicity in adult male albino rats. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 4(1), 36-45.
5. Agus, D. B., Gambhir, S. S., Pardridge, W. M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J. C., & Golde, D. W. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *The Journal of clinical investigation*, 100(11), 2842-2848.
6. Ahmed, A. E., Alshehri, A., Al-Kahtani, M. A., Elbehairi, S. E. I., Alshehri, M. A., Shati, A. A., ... & El-Mansi, A. A. (2020). Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109841.
7. Albérich, M. (2014). *Impact de l'ivermectine sur les systèmes de détoxification des xénobiotiques: régulations chez l'hôte et chez le nématode* (Doctoral dissertation).
8. Ali, B. H. (1990). The effect of ivermectin on some haematological indices in rabbits: influence of vitamin K treatment. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 17(10), 735-738.
9. Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., & Al-Masoudi, E. A. (2015). Effects of ivermectin on lipid profiles, antioxidant enzymes and proteins with the beneficial effects of vitamin C in rabbits. *International Journal for Sciences and Technology*, 143(2495), 1-13.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

10. Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., Al-Masoudi, E. A., & Majeed, S. K. (2016). Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). *Basrah J Vet Res*, 14, 110-24.
11. 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.
12. Amin, S. N., Younan, S. M., Youssef, M. F., Rashed, L. A., & Mohamady, I. (2013). A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research*, 2.
13. Anonyme,..2018. Algérie - Importation de médicaments vétérinaires Mercredi 5 Décembre,2018.<https://lesoirdalgerie.com/articles/2018/01/27/article.php?sid=1127&c id=2;>
14. Arise, R. O., & Malomo, S. O. (2009). Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), 190-197.
15. Auer, R. N., & Sutherland, G. R. (2002). Hypoxia and related conditions. *Greenfield's neuropathology*, 1, 233-80.
16. Azevedo, R., Mendes, A. M., & Prudêncio, M. (2019). Inhibition of Plasmodium sporogonic stages by ivermectin and other avermectins. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-8.
17. Badawi, A. F., Stern, S. J., Lang, N. P., & Kadlubar, F. F. (1996). Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Progress in clinical and biological research*, 395, 109-140.
18. Barrett, J., Broderick, C., Soulsby, H., Wade, P., & Newsholme, W. (2016). Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe Strongyloides stercoralis infection: two case reports and a discussion of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 220-225.
19. Batiha, G. E., Ali, H., El-Mleeh, A. A., Alsenosy, A. A., Abdelsamei, E. K., Abdel-Daim, M. M., ... & Shaheen, H. M. (2019). In vitro study of ivermectin efficiency against the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) annulatus, among cattle herds in El-Beheira, Egypt. *Veterinary world*, 12(8), 1319.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

20. Beaune, P. H., & Lorient, M. A. (2000). Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. *Médecine/sciences*, 16, 1051-1056.
21. Behera, S. K., Dimri, U., Singh, S. K., & Mohanta, R. K. (2011). The curative and antioxidative efficiency of ivermectin and ivermectin+ vitamin E-selenium treatment on canine *Sarcoptes scabiei* infestation. *Veterinary Research Communications*, 35(4), 237-244.
22. Bentounsi, B., Ouksel, M., & Kachtarzi, B. (2009). Compared efficacy of twelve registered preparations of ivermectin on the digestive and respiratory nematodes in Algerian sheep. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160(7), 329-334.
23. Berchiche, M., Kadi, S. A., 2002. The kabyle rabbits (Algeria). Rabbit Genetic Resources in Mediterranean Countries.
24. Bergmeyer, H. (1980). Dietary nitrate in man: friend or foe. *Clin Chim Acta.*, 105, 147-152.
25. Bergmeyer, H. U., Scheibe, P., & Wahlefeld, A. W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical chemistry*, 24(1), 58-73..
26. Bloomquist, J. R. (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(4), 145-156.
27. Bockarie, M. J., Alexander, N. D. E., Kazura, J. W., Bockarie, F., Griffin, L., Alpers, M. P. (2000). Treatment with ivermectin reduces the high prevalence of scabies in a village in Papua New Guinea. *Acta Tropica*, 75(1), 127-130.
28. Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. Biochimie Pathologique. *Aspects Moléculaires et Cellulaires*, 59-81.
29. Bruyère, F., Desoubreaux, G., Malavaud, S., Fourcade, C., Chandenier, J., Lachaud, L., ... & Sotto, A. (2013). Les médicaments anti-infectieux non antibiotiques en urologie. *Progrès en urologie*, 23(15), 1342-1356.
30. Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., ... & Ōmura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 15(3), 361-367.
31. Burns, J. J. (1959). Biosynthesis of L-ascorbic acid; basic defect in scurvy. *The American journal of medicine*, 26(5), 740-748.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

32. Caly, L., Druce, J.D., Catton, M.G., Jans, D.A., Wagstaff, K.M. (2020). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral research*, 104787.
33. Campbell, C.W. (2012 a). History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 853-865.
34. Campbell, W.C. (2012 b). Ivermectin and Abamectin; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany.
35. Campbell, W.C. (2016). Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 55(35), 10184-10189.
36. Campbell, W.C. Ivermectin and Abamectin. *Springer Verlag*; 1989.
37. Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Liébana, M. J. D., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, 179(1), 25-37.
38. Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *The FASEB journal*, 13(9), 1007-1024.
39. Carrère, L. (2016). *Étude pharmacocinétique de l'ivermectine administrée par voies orale et intramusculaire à la dose de 400 µg/kg, chez les Callithricidés, réalisée au Zoo de La Palmyre en Charente Maritime* (Doctoral dissertation).
40. Colombo, R. (2001). *Etude de la carence en vitamine C dans une population gériatrique hospitalisée* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
41. Combs, G.F. 2008. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health, 3rd Ed. Elsevier Press Academic.
42. CROSIA, J. L. (2011). Marché mondial du médicament vétérinaire: analyse des tendances des dix dernières années et perspectives d'évolution. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
43. Crump, A., Omura, S. (2011). Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(2), 13-28.
44. Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Paress, P. S., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M., & Arena, J. P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371(6499), 707-711.
45. Danaher, M., Howells, L.C., Crooks, S.R., Cerkvénik-Flajs, V., O'Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 844(2): 175-203.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

46. De Ménonville, S. T., Rosignoli, C., Soares, E., Roquet, M., Bertino, B., Chappuis, J. P., Chaussade, C. D. P., Piwnica, D. (2017). Topical treatment of rosacea with ivermectin inhibits gene expression of cathelicidin innate immune mediators, LL-37 and KLK5, in reconstructed and ex vivo skin models. *Dermatology and Therapy*, 7(2), 213-225.
47. Deaton, C., Froelicher, E. S., Wu, L. H., Ho, C., Shishani, K., & Jaarsma, T. (2011). The global burden of cardiovascular disease. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, 10(2_suppl), S5-S13.
48. Derelanko, M. J., Auletta, C. S. (2014): Handbook of Toxicology. CRC Press, New York, USA.
49. Destreicher, M., Desmeules, J., Piguet, V., & Dayer, P. (1999). Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Médecine et hygiène*, 57(2251), 793-800.
50. Diao, H., Cheng, N., Zhao, Y., Xu, H., Dong, H., Thamm, D. H., Zhang, D., Lin, D. (2019), Ivermectin inhibits canine mammary tumor growth by regulating cell cycle progression and WNT signaling. *BMC veterinary research*, 15(1), 1-10.
51. Dimitrov, R., Kostov, D., Stamatova, K., & Yordanova, V. (2012). Anatomotopographical and morphological analysis of normal kidneys of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Trakia Journal of Sciences*, 10(2), 79-84.
52. Djerrou, Z. (2011). *Etude des effets pharmaco-toxicologique de plante médicinales d'Algérie: l'activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de Pistacia lentiscus L* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en sciences. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine).
53. Dobiasova, M. (2006). AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. *Vnitřní lékařství*, 52(1), 64-71.
54. 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.
55. Dos Santos, A. R., Falcão, C. A. B., Muzitano, M. F., Kaiser, C. R., Rossi-Bergmann, B., Férézou, J. P. (2009). Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(2), 496-502.
56. Dou, Q., Chen, H.N., Wang, K., Yuan, K., Lei, Y., Li, K., et al. (2016). Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer research*, 76(15): 4457-4469.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

57. Dupin, H. (1992). *Alimentation et nutrition humaines*. ESF éditeur.
58. Edwards, G. (2003). Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, 2(S1), S8.
59. 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.
60. El-Far, A.H. (2013). Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 8(3): 128-133.
61. 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.
62. El-Sawy, A. E. S. F., El-Maddawy, Z. K., & Seed, S. A. (2015): Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 47(1).
63. ElZoghby, R.R., Amin, A., Hamouda, A.F., Ali, A.F. (2015). Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. *J. Am. Sci*, 11(3), 73- 83.
64. Eroschenko, V. P. (2008). DiFiore's atlas of histology with functional correlations. Lippincott Williams & Wilkins. 11th edition.
65. Fabiny, D. L., & Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical chemistry*, 17(8), 696-700.
66. Fetoui, H., Makni, M., Garoui, E. M., Zeghal, N. (2010), Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593-599.
67. Fischer, M.H., Mrozik, H. (2012). Chapter I : Chemistry. In : Campbell W.C. Ivermectin and Abamectin, New-York, Springer Science and Business Media ed. New-York.
68. Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

69. Fossati, P., Prencipe, L., & Berti, G. (1980). Use of 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical chemistry*, 26(2), 227-231.
70. Fromm, M. F. (2000). P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 38(2), 69-74.
71. GabAllh, M. S., El-mashad, A. B. E., Amin, A. A., Darweish, M. M. (2017). Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal*, 32(1), 104-112.
72. GABE, M. (1968). Techniques Histologiques. Paris, Masson et Cie.
73. Gad, S. C. (Ed.). (2006). Animal models in toxicology. CRC press. 2nd edition.
74. Gartner, L. P. (2018). Color atlas and text of histology. Lippincott Williams & Wilkins. 7th edition.
75. Geary, T. G. (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in parasitology*, 21(11), 530-532.
76. Gerloff, T. (2004). Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(1), 69-77.
77. Geyer, J., Gavrilova, O., Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdrla, b P-glycoprotein-and bcrp-deficient knockout mice. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1), 87-96.
78. Gidenne, T., Lebas, F., Savietto, D., Dorchies, P., Duperray, J., Davoust, C., & Fortun-Lamothe, L. (2015). Nutrition et alimentation. *Le lapin: de la biologie à l'élevage* (Gidenne T., ed.), Quae publ. 137, 182.
79. Gokbulut, C., Biligili, A., Kart, A., Turgut, C. (2010). Plasma dispositions of ivermectin, doramectin and moxidectin following subcutaneous administration in rabbits. *Laboratory animals*, 44(2), 138-142.
80. Gonçalves, K., Vasconcelos, A., Barbirato, D., Vasconcelos, C., Vasconcelos, B. (2020). Therapeutic potential of ivermectin for COVID-19. *Authorea Preprints*.
81. Gonzalez-Canga, A., Fernandez-Martinez, N., Sahagun-Prieto, A., Diez-Liébana, M.J., Sierra-Vega, M., Garcia-Vieitez, J.J. (2009). A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. *Curr Drug Metab*, 10(4), 359-368.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

82. Grayson, M. L., Cosgrove, S. E., Crowe, S., Hope, W., McCarthy, J. S., Mills, J., Mouton, J. W., Paterson, D. L. (Eds.). (2017). Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, - Three Volume Set. CRC Press, New York, USA.
83. Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., ... & Souidi, M. (2006). Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann Biol Clin*, 64(6), 535-48.
84. Guzzo, C. A., Furtek, C. I., Porras, A. G., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C. M., ... & Lasseter, K. C. (2002). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(10), 1122-1133.
85. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
86. Halliwell, B. (1999). gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine.
87. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M., 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.
88. Han, J. M., Chang, B. J., Li, T. Z., Choe, N. H., Quan, F. S., Jang, B. J., Cho, I. H., Hong, H. N., Lee, J. H. (2007). Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain research*, 1185, 68-74.
89. Hansen, J.M., Coleman, R.L., Sood, A.K. (2016). Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 56, 131-143.
90. Hayes, W.J., & Laws, E.R. (1990). Handbook of Pesticide Toxicology, Classes of Pesticides, vol. 2. Academic Press Inc., NY, p. 3."
91. Hennessy, D. R., & Alvinerie, M. R. (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, 97, 124.
92. 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.
93. Heuillet, M. (2013). *Développement de méthodes de référence pour les biomarqueurs du bilan lipidique: application au contrôle qualité en biologie clinique* (Doctoral dissertation, Dijon).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

94. Hopper, K., Aldrich, J., Haskins, S. C. (2002). Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), 89-94.
95. 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.
96. Igweh, J. C., Nwagha, I. U., & Okaro, J. M. (2005). The effects of menopause on the serum lipid profile of normal females of South East Nigeria. *Nigerian journal of physiological sciences*, 20(1), 48-53.
97. Iqbal, K., Khan, A., & Khattak, M. M. A. K. (2004). Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(1), 5-13.
98. Jadhav, R. K., & Bhikane, A. U. (2020). Ivermectin toxicity in American Pit Bull Terrier bitch and its therapeutic management. *Indian J. Vet. Med. Vol*, 40(1), 48-51.
99. Jin, L., Feng, X., Rong, H., Pan, Z., Inaba, Y., Qiu, L., et al. (2013). The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature communications*, 4(1), 1-8.
100. Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.
101. Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J. (2007). Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and chemical toxicology*, 45(8), 1478-1486.
102. Kanthe, P. S., Patil, B. S., Bagali, S., Shaikh, G. B., & Aithala, M. (2012). Atherogenic index as a predictor of cardiovascular risk among women with different grades of obesity. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*, 4(10), 0-0.
103. Kaplan, R.M., & Vidyashankar, A.N. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*, 186(1-2), 70-78.
104. 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

105. Khaldoun-Oularbi, H. (2015). *Etude des variations biochimiques et histologiques hépatique et rénale chez le rat traité par deux biopesticides l'emamectine benzoate et l'abamectine*. (Doctoral dissertation, Algeria).
106. 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.
107. 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*). *Annales de toxicologie analytique*, 25(2), 63-70.
108. Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug metabolism and disposition*, 38(4), 573-580.
109. Klotz, U., Ogbuokiri, J. E., & Okonkwo, P. O. (1990). Ivermectin binds avidly to plasma proteins. *European journal of clinical pharmacology*, 39(6), 607-608.
110. König, H. E., Hans-Georg, H. G., & Bragulla, H. (2007). *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas*. Schattauer Verlag. 3rd edition.
111. Krieger, R. (2010). *Hayes' handbook of pesticide toxicology* (Vol. 1). Academic press. 3rd ed. USA, Elsevier.
112. Krishna, D. R., & Klotz, U. (1993). Determination of ivermectin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Arzneimittel-forschung*, 43(5), 609-611.
113. Króliczewska, B., Miśta, D., Ziarnik, A., Żuk, 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), 76.
114. Kudzi, W., Dodoo, A. N., & Mills, J. J. (2010). Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC medical genetics*, 11(1), 1-8.
115. Lacour, B. (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue francophone des laboratoires*, (451), 25-37.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

116. Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends in parasitology*, 33(6), 463-472.
117. Layachi, N. (2013). *L'effet combiné des vitamines c (acide ascorbique) et e (α-tocophérol) sur la toxicité du cadmium chez les rats wistar*. (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
118. Li, M., You, T. Z., Zhu, W. J., Qu, J. P., Liu, C., Zhao, B., Xu, S. W., Li, S. (2013): Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicology*, 22(8), 1241-1254.
119. Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. (2006). Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver. *The FEBS journal*, 273(7), 1516-1527.
120. Liu, Y., Fang, S., Sun, Q., Liu, B. (2016). Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 480(3), 415-421.
121. Lu, M., Xiong, D., Sun, W., Yu, T., Hu, Z., Ding, J., et al. (2017). Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug delivery*, 24(1), 622-631.
122. MADRP.,2018.http://madrp.gov.dz/wpcontent/uploads/2019/02/Liste_des_AM_M_24_10_2018.pdf
123. 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.
124. Mandl, J., Szarka, A., Banhegyi, G. (2012). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1097-1110.
125. Marrs, T. C. (Ed.). (2012). Mammalian toxicology of insecticides (No. 12). *Royal Society of Chemistry*.
126. Marshall, W. J., Bangert, S. K., & Raynaud, E. (2005). *Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic*. 5ème éd. Paris, Elsevier.
127. Martínez-Fernández, L., Pons, Z., Margalef, M., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2015). Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(3), 277-284.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

128. Martoja, R. et Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Edition Masson et Cie, Paris-VI.
129. Mayer, P. (2000). The relevance of P-glycoprotein in drug transport to the brain: the use of knockout mice as a model system. In Bradbury M, Begley D, Kreuter J, eds. *The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS*. New York: Marcel Dekker.
130. McKellar, Q. A., & Benchaoui, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5), 331-351.
131. Mealey, K. L., Bentjen, S. A., Gay, J. M., & Cantor, G. H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(8), 727-733.
132. Mekuriaw, W., Balkew, M., Messenger, L. A., Yewhalaw, D., Woyessa, A., Massebo, F. (2019). The effect of ivermectin® on fertility, fecundity and mortality of *Anopheles arabiensis* fed on treated men in Ethiopia. *Malaria journal*, 18(1), 1-10.
133. Menez, C., Sutra, J. F., Prichard, R., Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in *Mdr1ab* ($-/-$) mice and effects on mammalian GABA (A) channel activity. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(11), e1883.
134. Merola, V.M., & Paul, A.E. (2018). Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(6), 991-1012.
135. Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L.F., et al. (2009). Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health and risk management*, 5, 757.
136. Miyajima, A., Komoda, M., Akagi, K., Yuzawa, K., Yoshimasu, T., Yamamoto, Y., et al. (2015). Experimental study of pharmacokinetics of external, whole body bathing application of ivermectin. *The Journal of Dermatology*, 42(1), 87-89.
137. Moreira, N., Sandini, T. M., Reis-Silva, T. M., Navas-Suárez, P., Auada, A. V. V., Lebrun, I., Flório, J. C., Bernardi, M. M., Spinoso, H. S. (2017). Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reproductive Toxicology*, 74, 195-203.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

138. Naseer, M. I., Lee, H. Y., & Kim, M. O. (2010). Neuroprotective effect of vitamin C against the ethanol and nicotine modulation of GABAB receptor and PKA- α expression in prenatal rat brain. *Synapse*, 64(6), 467-477.
139. Nwagha, U. I., Ikekpezazu, E. J., Ejezie, F. E., Neboh, E. E., & Maduka, I. (2010). Atherogenic index of plasma as useful predictor of cardiovascular risk among postmenopausal women in Enugu, Nigeria. *African health sciences*, 10(3).
140. 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.
141. Omondi, E.O., Nyabadza, F., Bonyah, E., Badu, K. (2017). Modeling the infection dynamics of onchocerciasis and its treatment. *Journal of Biological Systems*, 25(02), 247-277.
142. Omshi, F. S. H., Abbasalipourkabir, R., Abbasalipourkabir, M., Nabyan, S., Bashiri, A., Ghafourikhosroshahi, A. (2018). Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29408-29417.
143. Packer, L. (Ed.). (2002). Antioxidants: Vitamins C and E for health. *The American Oil Chemists Society*.
144. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.
145. Papich, M. G. (2015). Saunders handbook of veterinary drugs-e-book: small and large animal. Elsevier Health Sciences, North Carolina, USA.
146. Pernot, F. (2009). *Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires* (Doctoral dissertation).
147. Peterson, B. S., Rauh, V. A., Bansal, R., Hao, X., Toth, Z., Nati, G., ... & Perera, F. (2015). Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *JAMA psychiatry*, 72(6), 531-540.
148. Pharmacopée européenne. (1996). Sainte Ruffine: Conseil de l'Europe Maisonneuve SA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

149. Picard, N. (2002). *Métabolisme des xénobiotiques, modèles in vitro et outils analytiques: application à l'étude du métabolisme de l'acide mycophénolique* (Doctoral dissertation).
150. Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134-153.
151. Qureshi S. (2013). Biochemical toxicity of Ivermectin in Wistar albino rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 5(1), 15-19.
152. 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.
153. Rajender, K. , Fauste, T., (2006). Liver Disease. SLACK Incorporated.USA. P 331-332.
154. Raoul, W. (2005). *Effets des facteurs angiogéniques et des cellules progénitrices dans la réparation de la barrière alvéolo-capillaire au cours des agressions pulmonaires aiguës* (Doctoral dissertation, Paris 12).
155. Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*, 34(1-2), 83-448.
156. Ringler, D. H., & Newcomer, C. E. (2014). The biology of the laboratory rabbit. Academic Press.
157. Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J. F., Drag, M., Soll, M., ... & 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.
158. Rumm-Kreuter, D., & Demmel, I. (1990). Comparison of vitamin losses in vegetables due to various cooking methods. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 36(4-SupplementI), S7-S15.
159. Schubert, GE. (1965). Enzymatic urea determination in the blood and serum in the Warburg optical test. *Klinische Wochenschrift*, 43, 174-175.
160. Sheriff, J. C., Kotze, A. C., Sangster, N. C., & Martin, R. J. (2002). Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Parasitology*, 125(5), 477-484.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

161. Shokouhi, G., Hadidchi, S., Ghorbanihaghjo, A., Rahbani-Noubar, M., Panahi, S., Forouzanfar, M., Rashtchizadeh, N., Mesgari, M. (2005). Neuroprotective effect of ascorbic acid in experimental blunt sciatic nerve injury in rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1(2), 1-5.
162. Shoop, W. L., Mrozik, H., & Fisher, M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology*, 59(2), 139-156.
163. Silbernagl, S., Despopoulos, A., & Laurent, D. (2001). Atlas de poche de physiologie. Médecine-sciences.
164. Singh, R., Verma, P.K., Singh, G. (2012). Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *Journal of Complementary Medicine Research*. 1(2), 101-104.
165. Spampinato, J., Gibson, A., Dudek, F. E. (2018). The antihelminthic moxidectin enhances tonic GABA currents in rodent hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 119(5), 1693-1698.
166. Sperte, M. (2016). *Vitamines et oligoéléments: manifestations buccales des déficits et implications thérapeutiques en chirurgie dentaire*. (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
167. Stamatova-Yovcheva, K., Dimitrov, R., Kostov, D., & Yovchev, D. (2012). Anatomical macromorphological features of the liver in domestic rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Trakia Journal of Sciences*, 10(2), 85-90.
168. Stevens, J., Breckenridge, C. B., & Wright, J. (2010). The Role of P-glycoprotein in Preventing Developmental and Neurotoxicity: Avermectins—A Case Study. In Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (pp. 2093-2110). Academic Press.
169. Szasz, G. (1969). A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clinical chemistry*, 15(2), 124-136.
170. Tiffany, T. O., Jansen, J. M., Burtis, C. A., Overton, J. B., & Scott, C. D. (1972). Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clinical Chemistry*, 18(8), 829-840.
171. Trailović, S. M., Nedeljković, J. T. (2010). Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1012080409-1012080409.
172. Trinder, P. (1969). Enzymatic methods for glucose determination. *Ann Clin Biochem*, 6, 24-26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

173. Van Praag, E. (2014). Maladies des voies respiratoires profondes. Medirabbit.com.http://www.medirabbit.com/FR/Respiration/Diff/Domes_lungs_fr.pdf. DOI: 10.13140/2.1.4947.8401.
174. Van't Veer, P., Jansen, M. C., Klerk, M., & Kok, F. J. (2000). Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public health nutrition*, 3(1), 103-107.
175. Vercruysse, J., & Rew, R. S. (Eds.). (2002). Macrocytic lactones in antiparasitic therapy. CABI.
176. Walter, H. H. (2008). Handbook of Veterinary Pharmacology. Antiparasitic agents. Wiley-Blackwell. IOWA, 379-416.
177. Wang, J., Xu, Y., Wan, H., Hu, J. (2018). Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 497(1), 241-247.
178. Wheater, P. R., Young, B., & Heath, J. W. (2001). Histologie fonctionnelle. De Boeck Supérieur. 4ème édition.
179. Yang, C. C. (2012). Acute human toxicity of macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 999-1003.
180. Yardley, M. M., Wyatt, L., Khoja, S., Asatryan, L., Ramaker, M. J., Finn, D. A., Alkana, R. L., Huynh, N., Louie, S. G., Petasis, N. A., Bortolato, M., Davies, D. L. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology*, 63(2), 190-201.
181. Zerrouki, N., Bolet, G., Berchiche, M., & Lebas, F. (2005). Evaluation of breeding performance of a local Algerian rabbit population raised in the Tizi-Ouzou area (Kabylia). *World Rabbit Science*, 13, 29-37.
182. Zerrouki, N., Bolet, G., Berchiche, M.1., Lebas, F., 2004. Breeding performance of local kabylian rabbits does in Algeria. 8th World Rabbit Congress (accepted communication), 371-377. 1.
183. Zhang, Y., Luo, M., Xu, W., Yang, M., Wang, B., Gao, J., et al. (2016). Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(36), 6895-6902.
184. Zhu, M., Li, Y., Zhou, Z. (2017). Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(3), 373-378.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

185. Zhu, W. J., Li, M., Liu, C., Qu, J. P., Min, Y. H., Xu, S. W., & Li, S. (2013). Avermectin induced liver injury in pigeon: mechanisms of apoptosis and oxidative stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 74-81.

ANNEXES



1. Répartition des lots des lapins dans des cages métalliques



2. Couleurs variables de la robe de la souche synthétique



3. Aliment granulé du lapin

3. Aliment granulé du lapin



4. Pesée du lapin

4. Pesée du lapin



AVIMEC 1% Composition: Each 1 ml contains:

Ivermectin 10 mg.

Properties

AVIMEC Injection is effectively control and treatment of internal and external parasites that impair livestock health and productivity. Ivermectin has a broad spectrum efficacy and wide safety margin. Ivermectin is derived from the family avermectins, which are isolated from fermentation of the soil organism streptomyces avermitilis. Ivermectin paralyzes and ultimately kills parasitic nematodes, arachnoids, and insects by a unique effect on the nervous systems of these parasites. Ivermectin action is due to a neurotransmitter chemical that serves as a signal from one nerve cell to another or from a nerve cell to a muscle cell and is called gamma amino butyric acid (GABA). In round worms Ivermectin stimulates the release of GABA from nerve endings and enhances binding of GABA to special receptors at nerve junctions, thus interrupting nerve the same effect occurs in mites & lice. Ivermectin has no effect on acetylcholine which is the principal peripheral neurotransmitter in mammals and does not readily penetrate the central nervous system of mammals were GABA functions as neurotransmitter.

Indications

For the control and treatment of the following parasites:

Dosage and administration

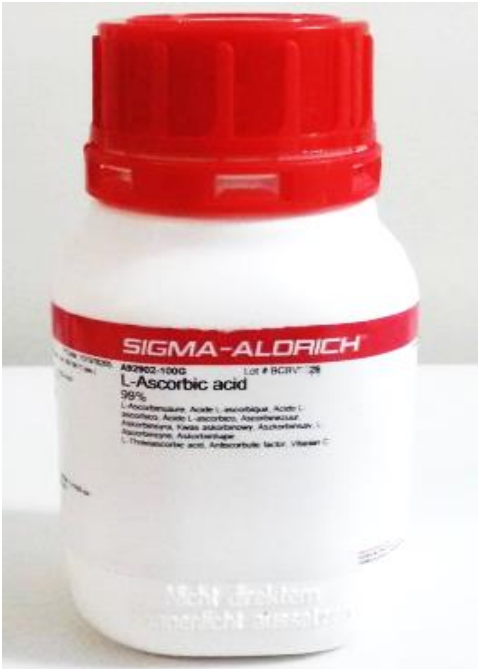
(single dose) By subcutaneously injection.
Cattle, Buffaloes and Camels: 1 ml per 50 kg b. wt.
Sheep and Goats: 0.5 ml per 25 kg b. wt.
Rabbits: 0.15 ml per 1 kg b. wt.

Withdrawal period

Meat: Cattle, Sheep, Goats and Rabbits: 21 days.
Camels: 28 days.
Milk: 28 days.

Precautions

AVIMEC Injection is not for intravenous or intramuscular use.

	Don't smoke or eat during handling the product. Wash hands after use. N.B.: Transitory discomforts in some cattle may occur after subcutaneously injection. These reactions disappear without treatment. Divide the large dose in different sites. Storage: Store in a dark place at a temperature below 30°C. Packing: 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml and 250 ml amber glass. 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml , 250 ml and 500ml clear plastic injection bottles. FOR VETERINARY USE ONLY
	Description General description Pharmaceutical secondary standards for application in quality control, provide pharma laboratories and manufacturers with a convenient and cost-effective alternative to the preparation of in-house working standards. Ascorbic acid is a powerful antioxidant and is widely used in pharmaceutical formulations.[2][3] It has proven to have a beneficial effect on age-related diseases such as cancer, atherosclerosis, ocular, neurodegenerative diseases, etc. It is mainly involved in the formation and maintenance of collagen.[1] The prolonged deficiency of ascorbic acid in diet may result in scurvy.[3] Application Ascorbic Acid may be used as a pharmaceutical reference standard for the quantification of the analyte in pharmaceutical formulations using hydrophilic interaction chromatography.[2] Biochem/physiol Actions Ascorbic Acid, also known as Vitamin C, is a six-carbon lactone produced by plants and some animal species but not by humans and other primates. Ascorbic acid functions as an enzymatic cofactor

	for multiple enzymes, serving as an electron donor for monooxygenases and dioxygenases. Ascorbic acid also functions as a powerful antioxidant, particularly in regards to reactive oxygen species. Analysis Note These secondary standards offer multi-traceability to the USP, EP (PhEur) and BP primary standards, where they are available.

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)	REACTIFS flacon R1 REACTIF DE TRAVAIL 2-Oxoglutarate 15 mmol/L L-Alanine 500 mmol/L LDH ≥ 1600 UI/L NADH $\leq 0,18$ mmol/L Tampon Tris 100 mmol/L pH à 30°C $7,50 \pm 0.1$ Conservateur
1. Réactifs du dosage de glucose	2. Réactifs du dosage d'ALAT
REACTIFS R1 REACTIF DE TRAVAIL Danger EDTA 5 mmol/L 2-Oxoglutarate 12 mmol/L L-Aspartate 200 mmol/L MDH 495 UI/L LDH 820 UI/L NADH $\leq 0,18$ mmol/L Tampon Tris 80 mmol/L pH à 30°C $7,80 \pm 0.1$ Conservateur	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
3. Réactifs du dosage d'ASAT	4. Réactifs du dosage de γ -GT
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
5. Réactifs du dosage de créatinine	6. Réactifs du dosage de l'acide urique

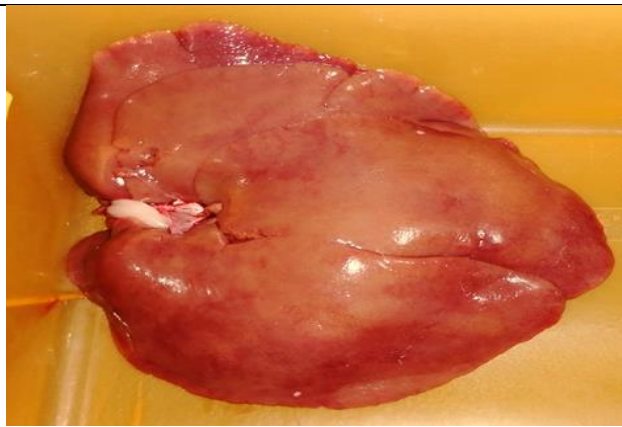
REACTIFS R1 TAMPON ENZYME BUF ENZ UREA Tris pH 7,9 ± 0,1 à 30°C100 mmol/L Uréase≥ 17000 UI/L GLDH≥ 700 UI/L Oxoglutarate6,5 mmol/L Conservateur R2 COENZYME COENZ UREA NADH≥ 1,5 mmol/L Conservateur R3 STANDARD STD Urée40 mg/dL	REACTIFS R1 CHO Réactif Tampon phosphate100 mmol/L Chloro-4-phénol5 mmol/L Sodium Cholate2,3 mmol/L Triton x1001,5 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 6000167 µmol/L Conformément à la réglementation 1272/2008, ce réactif n'est pas classé comme dangereux.
7. Réactifs du dosage de l'urée	8. Réactifs du dosage de CT
REACTIFS R1 REAGENT REAG TRI PIPES100 mmol/L Chlorure de magnésium9,8 mmol/L Chloro-4-phénol3,5 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 clarifiant1,5 mmol/L R2 ETALON STD Triglycérides2 g/L	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 % EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande EUH208 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 TG	10. Réactifs du dosage de HDL-C
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	• Formol à 10% • Alcool 70°, 90°, 95° et 100° • Xylène • Paraffine • Eukitt • HCl 1% • Carbonate de lithium • Hématoxyline • Eosine
11. Réactifs du dosage de LDL-C	12. Autres réactifs



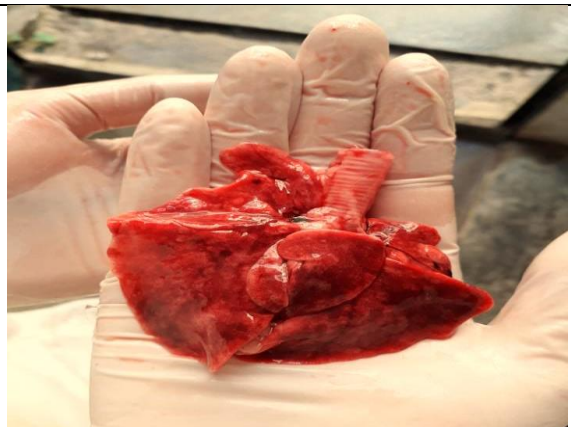
13. Dissection de lapin



14. Prélèvement des organes



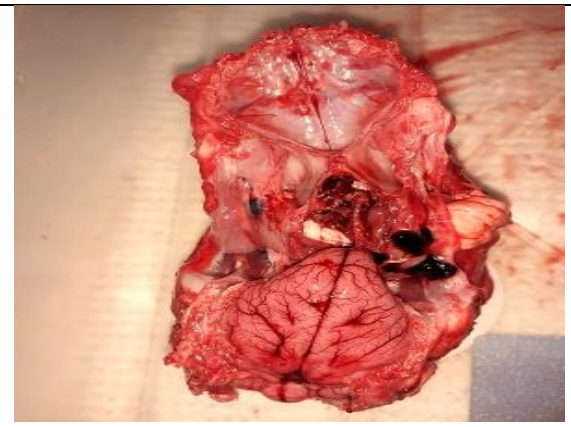
15. foie polylobé du lapin



16. Appareil respiratoire du lapin traité



17. Rein du lapin



18. Cerveau du lapin

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



THESE

Présentée par :

M^{me} MAKHLOUF Chahrazed Epouse KRABI

En vue de l'obtention du titre de

DOCTORAT

EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Biologiques

THEME

**ETUDE DE LA TOXICITE DE L'IVERMECTINE CHEZ LE LAPIN
D'UNE SOUCHE LOCALE EN ALGERIE**

Soutenue publiquement le **16/09/2021**.

Devant le jury composé de :

M^{me} BENABDESSALEM R.	Professeur	UMMTO	Présidente
M^{me} KHALDOUN-OULARBI H.	MCA	USDB1	Directrice
M^{me} ZERROUKI-DAOUDI N.	Professeur	UMMTO	Co-directrice
M^{me} BOUMEHDI-MERAD Z.	Professeur	USDB1	Examinatrice
M^r LAMARA A.	Professeur	ENSV	Examineur
M^r BOUAZZA B.	MCA	UMMTO	Examineur

2020 / 2021

Tableau 6 : Paramètres biochimiques de la fonction hépatique (glucose, γ -GT, ALAT, ASAT) des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14^{ème} et au 21^{ème} jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	Glucose (g/l)	0,89 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,01
	γ -GT (UI/l)	10,0 $\pm$ 0,02	13,0 $\pm$ 0,01^a	12,5 $\pm$ 2,1^b	12,0 $\pm$ 6,4^c
	ALAT (UI/l)	27,0 $\pm$ 0,2	43,5 $\pm$ 7,9^a	32,0$\pm$0,1^b	38,0$\pm$4,8^c
	ASAT (UI/l)	33,0 $\pm$ 0,05	57,0 $\pm$ 0,02^a	50,2$\pm$7,2^b	52,5$\pm$6,4^c
21^{ème} jour	Glucose (g/l)	1,02 $\pm$ 0,19	1,64 $\pm$ 0,13^a	1,20$\pm$0,09^{b,d}	1,34 $\pm$ 0,17
	γ -GT (UI/l)	11,0 $\pm$ 0,03	18,0 $\pm$ 4,6^a	11,2 $\pm$ 0,6	12,1 $\pm$ 0,8
	ALAT (UI/l)	32,0 $\pm$ 2,7	44,5 $\pm$ 3,7^a	31,5 $\pm$ 7,9	33,2 $\pm$ 3,8
	ASAT (UI/l)	36,5 $\pm$ 8,7	42,0 $\pm$ 6,7^a	34,2 $\pm$ 3,2	38,2 $\pm$ 1,9

Les Résultats sont donnés par la moyenne $\pm$ SD (n=5). a, b, c et d : p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groups traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment), d : différence significative entre le groupe IVM + vitamine C (par gavage) et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

Tableau 7 : Paramètres biochimiques de la fonction rénale des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	Créatinine (mg/dl)	7,16 ± 0,01	10,8 ± 0,01^a	8,85 ± 0,13^b	7,4 ± 0,36
	Acide urique (mg/dl)	4,4 ± 0,02	5,1 ± 0,01	4,9 ± 0,6	4,8 ± 0,4
	Urée (mg/dl)	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,01
21^{ème} jour	Créatinine (mg/dl)	7,24 ± 1,69	12,24 ± 0,88^a	7,38 ± 0,51	7,72 ± 1,3
	Acide urique (mg/dl)	4,4 ± 0,03	4,4 ± 0,01	4,91 ± 1,4	4,5 ± 0,3
	Urée (mg/dl)	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,03

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a et b : p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).

A

*La Présidente de thèse Mme BENABDESSALEM R.,
Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce
travail.*

*Je vous prie de trouver ici L'expression de mon profond respect
Et de mon entière reconnaissance.*

A

*Ma Directrice de thèse Madame, KHALDOUN-OULARBI H., je
vous remercie vivement d'avoir dirigé ce travail, d'avoir facilité
mon intégration au sein de votre équipe,
Pour le temps que vous m'avez consacré,
Pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos orientations et vos
remarques fructueuses.*

*Je vous prie de retrouver ici l'expression de
Ma respectueuse et profonde reconnaissance.*

A

*Ma Co-Directrice de thèse Madame ZERROUKI DAOUDI N.,
Je vous remercie vivement pour votre confiance que vous
m'avez témoigné en m'accueillant au sein de votre laboratoire
de recherche.*

*Pour votre soutien moral, votre gentillesse, votre disponibilité et
vos conseils scientifiques.*

A

Mes examinateurs

Madame BOUMEHDI-MERRAD Z.

Monsieur LAMARA A.

Monsieur BOUAZZA B.

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites

*En acceptant de juger ce travail.
Soyez remerciés de votre présence dans ce jury et
Soyez assurés de tout mon respect*

À

*Mes parents adorés, qui m'ont toujours soutenu, qui m'ont gardé
toute leur confiance et leur amour pendant les périodes difficiles
de mon cursus. Je suis heureuse de leur offrir cette thèse.
Je voudrais dire : vous êtes pour moi les meilleurs parents du
monde.*

Merci à mes

*Frères Kader, Moussa et Islam, à leurs conjoints, à mon neveu et
Ma nièce pour ces grains que nous partageons, qui ont un
pouvoir de germination infini et qui se transmettent avec les
générations.*

À

*Mes adorables enfants : Wail et ADEM Pardon pour tout le
stress que je vous ai fait subir*

À mes beaux parents

*A **SMAIL** mon accompagnant permanent de vie, tu as été une
source continue d'encouragement pendant toutes les phases de ce
doctorat.*

*Je te remercie de m'avoir rendu ma vie plus belle tous les
Jours, de m'avoir soutenue, épaulé, encouragé et aidé chaque fois
que tu le pouvais.*

*Tu as contribué à l'aboutissement de ce travail car tu l'as vécu
au Quotidien.*

Merci pour tout.

PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A LA THESE

Makhlouf, C., Khaldoun Oularbi, H., Bokreta, S., Tarzali, D., Boukrid, A., Boulahia, M., Daoudi Zerrouki, N. (2021). Beneficial effects of ascorbic acid on Ivermectin repeated high-dose therapy in rabbits: biochemical and histopathological investigations. *European Journal of Biological Research*, 11(1): 1-13.

Makhlouf, C., Khaldoun Oularbi, H., Bokreta, S., Oularbi, Y., Zerrouke, H., Daoudi Zerrouki, N. (2021). Protective effects of vitamin C on Ivermectin induced toxicity on kidney functions and brain tissue in rabbits (*oryctolagus cuniculus*). *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (D-Histology and histochemistry)*, 13(1): 63- 76.

AUTRES PUBLICATIONS

Bokreta, S., Khaldoun-Oularbi, H., Ferhat, M. A., **Makhlouf, C.**, Daoudi-Zerrouki, N. (2021). Protective Effects of Thymus vulgaris Essential Oil Against Voliam Targo® Induced Kidney and Brain Toxicity in Male Rabbits. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (D-Histology and histochemistry)*, 13(1) : 79- 95.

Khaldoun-Oularbi, H., Bouzid, N., Boukreta, S., **Makhlouf, C.**, Derriche, F., Djennas, N. (2017). Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats. *Journal of xenobiotics*, 7(1) : 25-30.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

MAKHLLOUF C., **KHALDOUN-OULARBI H.**, **BOKRETA S.**, **SETTAR A.**, **OULARBI Y.**, **DAOUDI-ZERROUKI N.** " Effet amélioratif de l'acide ascorbique contre l'hépatotoxicité induite par L'AVIMEC chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Étude biochimique et histopathologique". 1er Séminaire International PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ENVIRONNEMENT & REPRODUCTION (PEER 2021), Université Blida 1, Blida, Algérie. 07 au 08 juillet 2021.

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., SETTAR A., OULARBI Y., DAOUDI-ZERROUKI N. " Toxicité pulmonaire de l'AVIMEC® et effet amélioratif de la vitamine C chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Etude histopathologique". 1er Séminaire International PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ENVIRONNEMENT & REPRODUCTION (PEER 2021), Université Blida 1, Blida, Algérie. 07 au 08 juillet 2021.

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N. "Efficacité de l'ivermectine dans le traitement du COVID-19". The first international seminar: Impact of Covid19 on the environment, University Saad Dahlab-Blida1, Blida, Algeria, '30th & 31st December 2020'.

KHALDOUN-OULARBI H., BOUZID N., BOKRETA S., **MAKHLOUF C.**, DJENNAS N., DAOUDI-ZERROUKI N. "Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney, liver, cerebellum and hippocampus of male rats". Colloque international Biosciences "Génie enzymatiques et production de métabolites", Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), Oran, Algérie, 28-29 octobre 2018.

KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N., BENDJABOU Z., ZOUAOU S., **MAKHLOUF C.**, FARHAT M.A. "Contribution à la recherche de l'effet amélioratif de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) chez le lapin d'une souche locale (*Oryctolagus cuniculus*) traité par l'insecticide « Voliam Targo 063SCe »". Colloque international Biosciences "Génie enzymatiques et production de métabolites", Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), Oran, Algérie, 28-29 octobre 2018.

COMMUNICATIONS NATIONALES

MAKHLOUF C., KHALDOUN-OULARBI H., BOKRETA S., DAOUDI-ZERROUKI N. 2020. "Impact neurotoxique de l'Avimec® et effet amélioratif de l'acide ascorbique chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*). Etude histopathologique". 1^{er} Symposium National Biomolécules & Biotechnologies, Blida, 18-19 Décembre 2019.







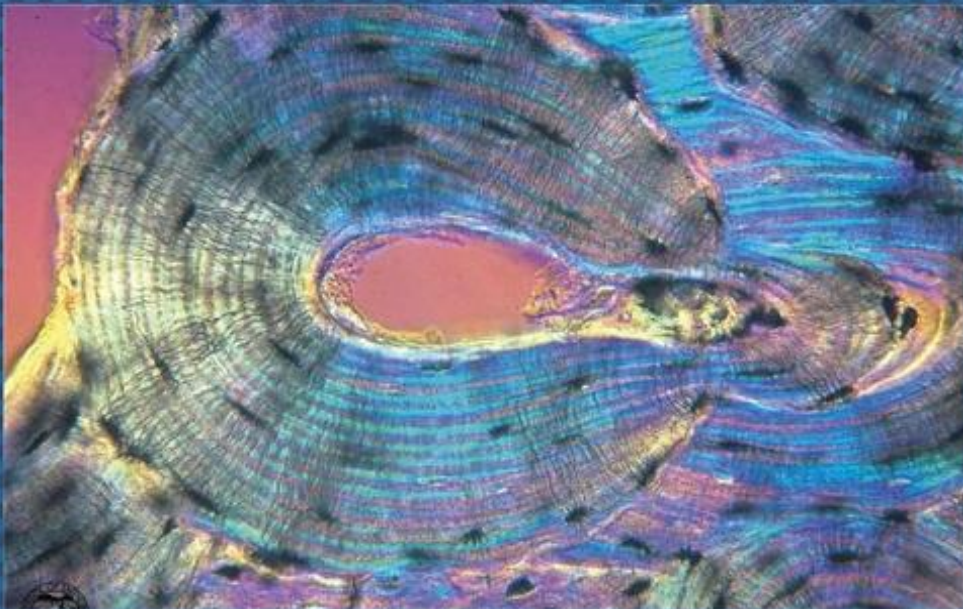
LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : liste des différentes formulations d'IVM à usage vétérinaire enregistrées en Algérie (MADRP, 2018)	33
Tableau 2 : Variation du poids corporel et le pourcentage de prise de poids (% PP) des lapins témoins et traités. PI : poids initial, PF : poids final.....	61
Tableau 3 : Variation de la consommation d'aliment et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) chez les lapins témoins et traités. PIA : poids initial d'aliment, PFA : poids final d'aliment	62
Tableau 4 : Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson (% PB) chez les lapins témoins et traités. VBI : volume de boisson initial, VBF : volume de boisson final.....	63
Tableau 5 : Poids absolu et relative des organes des lapins témoins et traités pendant 21 jours.....	64
Tableau 6 : Paramètres biochimiques de la fonction hépatique (glucose, γ -GT, ALAT, ASAT) des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	65
Tableau 7 : Paramètres biochimiques de la fonction rénale des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	68
Tableau 8 : Paramètres biochimiques du bilan lipidique des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.....	73



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 µm 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^{**}	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).

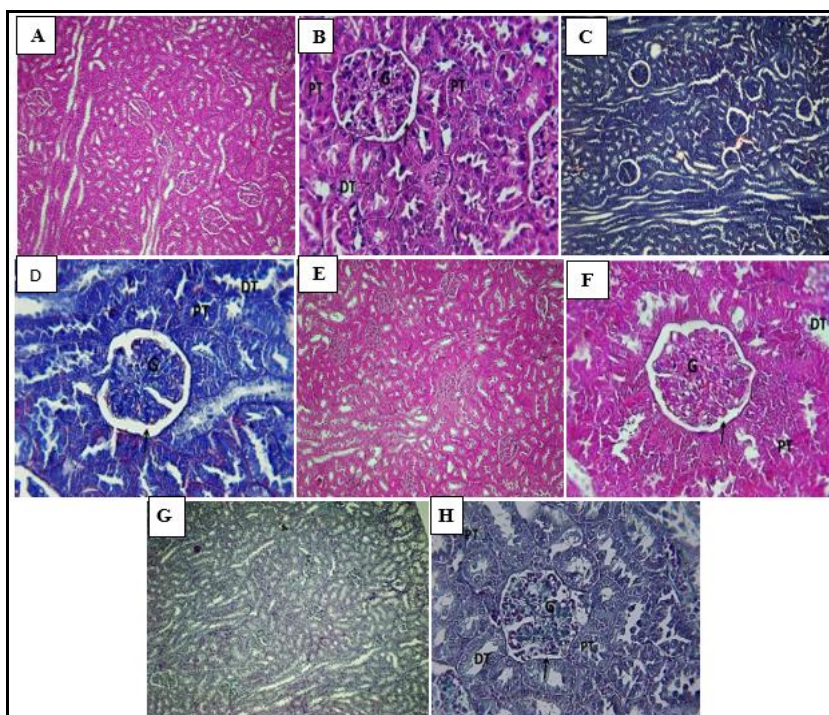


Fig. 1: Photomicrographs of rabbit kidney sections of control and TEO groups. A, B, C and D: Control group; E, F, G and H: TEO group. Kidney sections from control and TEO-treated rabbits showed normal morphology of renal tissue, proximal and distal tubules and glomerular capsule are intact and no tissue 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: $\times 100$; $\times 400$.

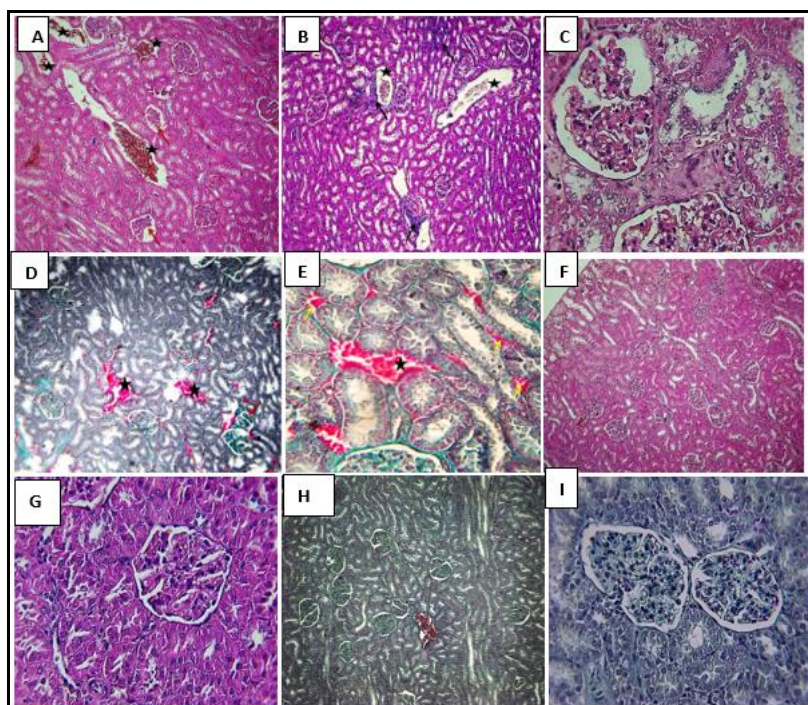


Fig. 2: Photomicrographs of kidney sections of VT-treated group and VT+ TEO group. A, B, C, D and E: VT group; F, G, H and I: (VT+ TEO) group. VT group sections showed dilatation and congestion of blood vessels (asterisk), leucocytes infiltration (black arrow), dilatation of proximal and distal tubules, 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: $\times 100$; $\times 400$.

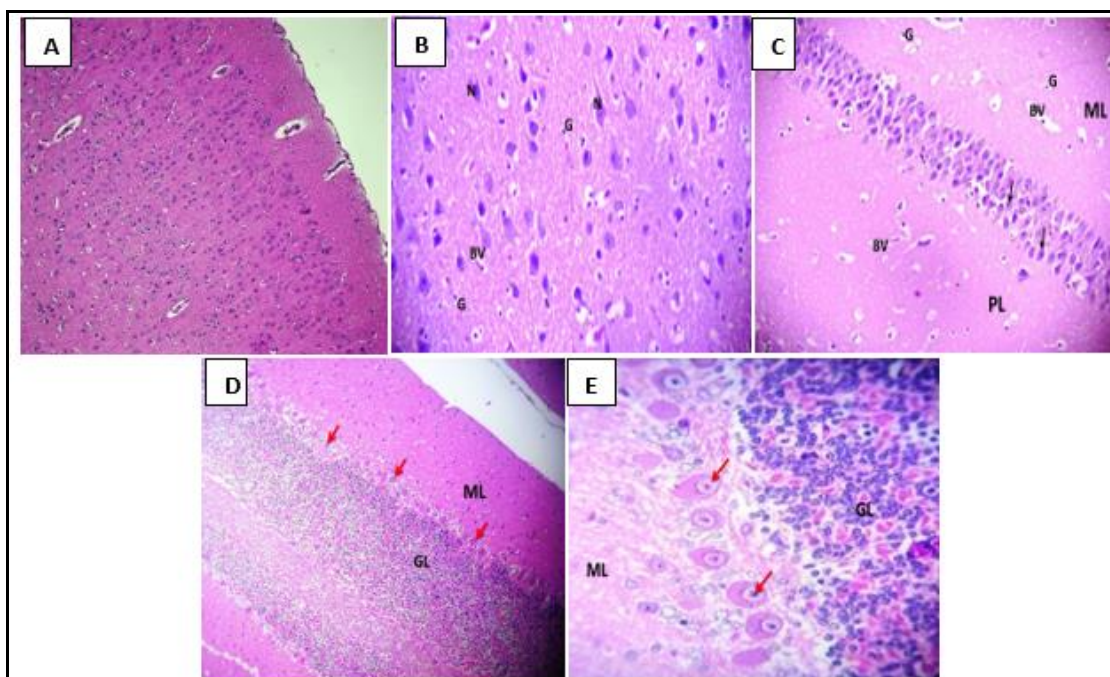


Fig. 3: Photomicrographs of brain sections of control rabbits stained with H&E. Sections of cerebral cortex (A and B), Hippocampus (C) and cerebellum (D and E) from Control rabbits showing normal histological structure. N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 , x400.

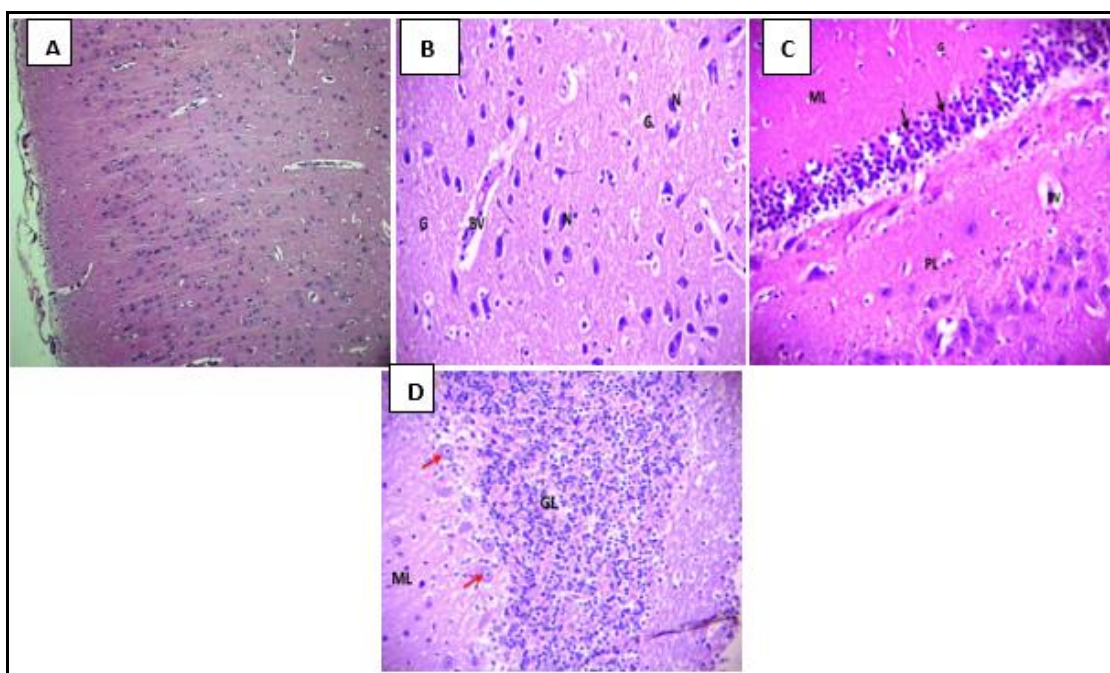


Fig. 4: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with TEO alone, stained with H&E. TEO group showing nearly normal histological architecture of the cerebral cortex (A and B), the hippocampus (C) and the cerebellum (D). N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 and x 400.

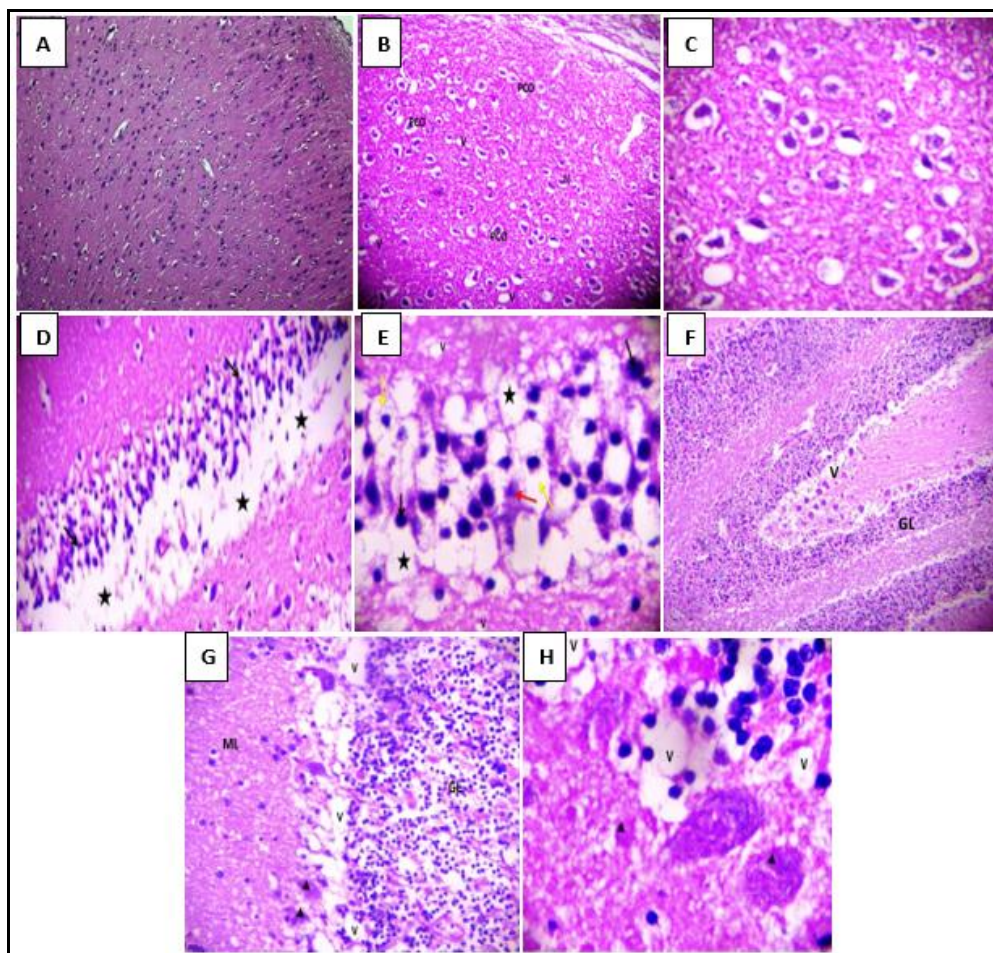


Fig. 5: Photomicrographs of brain sections of VT-treated rabbits stained with H&E. VT-treated group showing neuronal degenerative changes; pericellular oedema (PCO) and neuropil vacuolation (V) in the cerebral cortex (A, B and C). The hippocampal tissue was the site of significant oedema (asterisk) and 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

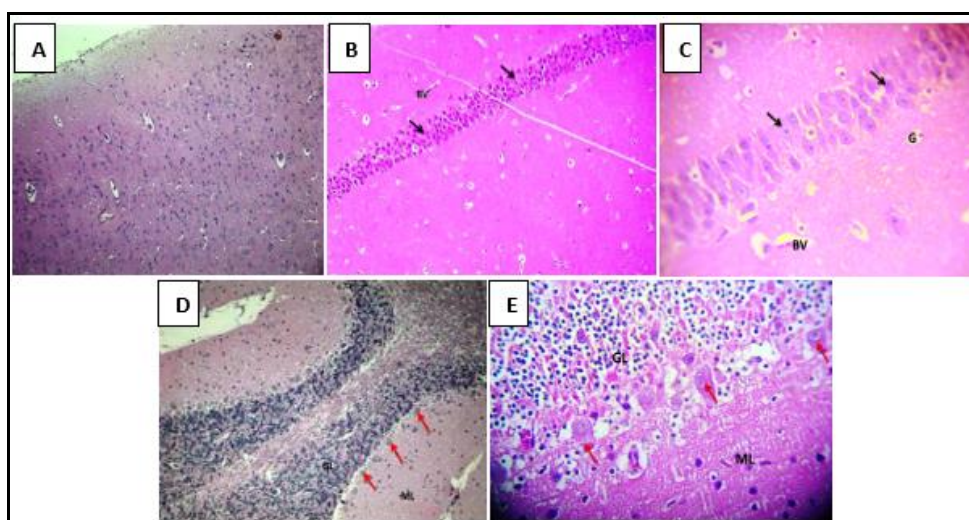


Fig. 6: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with (VT+TEO) stained with H&E. (VT+TEO)-treated rabbits showing a more preserved architecture of the cerebral cortex (A), the hippocampus (B and C) and the cerebellum (D and E). G: glial cells; BV: blood vessel; Black arrows: pyramidal cells; 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 (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015; Khaldoun-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.; Quinten, 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. *Toxicon*, 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 Cerkevnik-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.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Foie polylobé chez le lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) (Stamatova-Yovcheva <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figure 2 : Schéma représentant la structure et l’histologie du foie (Gartner, 2018).....	7
Figure 3 : Schéma d’une coupe longitudinale de rein chez l’homme (Lacour, 2013).....	9
Figure 4 : Schéma de la structure d’un néphron avec une coupe du corpuscule rénal (Lacour, 2013).....	10
Figure 5 : Schéma d’une coupe histologique du rein (cortex et medulla). Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	12
Figure 6 : Schéma représentant les voies aériennes inférieurs du système respiratoire (König <i>et al.</i> , 2007).....	14
Figure 7 : Anatomie des poumons chez le lapin (Van Praag, 2014).....	15
Figure 8 : Schéma d’une coupe histologique de poumon. Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	17
Figure 9 : Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise). Imprégnation argentique, faible grossissement (Eroschenko, 2008).....	19
Figure 10 : Coupe histologique de l’hippocampe chez le rat. Hématoxyline-éosine, Gx40 (Amin <i>et al.</i> , 2013).....	20
Figure 11 : Représentation de la composition d'une lipoprotéine (Heuillet, 2013).....	22
Figure 12 : Composition des lipoprotéines (Marshall <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figure 13 : Métabolisme des lipoprotéines (Heuillet, 2013).....	24
Figure 14 : Structure du marché mondial du médicament vétérinaire en 2009, en fonction des produits (Crosia, 2011).....	25
Figure 15 : Filiations schématiques des lactones macrocycliques : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques (Pitchard <i>et al.</i> , 2012).....	26
Figure 16 : structure chimique des avermectines (Fischer et Mrozik, 2012).....	28
Figure 17 : Structure chimique de l'ivermectine (Bruyère <i>et al.</i> , 2013).....	29

Figure 18: Schéma représentant le mécanisme d'action de l'IVM sur les canaux chlorures glutamate-dépendants chez les invertébrés (Bruyère <i>et al.</i> , 2013)	31
Figure 29 : Schéma du métabolisme des xénobiotiques (Beaune et Lorient, 2000).....	36
Figure 20 : Structure chimique tridimensionnelle (A) et cyclique (B) de la vitamine C (acide ascorbique) (Combs, 2008).....	40
Figure 21: Oxydation de l'ascorbate (AscH-) par deux étapes successives d'oxydation à un électron pour donner respectivement le radical ascorbyle (Asc • -) et l'acide déhydroascorbique (DHA) (Packer, 2002).....	41
Figure 22: Biosynthèses de l'acide ascorbique chez les animaux (Linster et Schaftigen, 2006)	42
Figure 23 : Variation des taux plasmatiques d'ALAT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	66
Figure 24 : Variation des taux plasmatiques d'ASAT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	67
Figure 25 : Variation des taux plasmatiques de γ -GT au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	68
Figure 26 : Variation des taux plasmatiques du glucose au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	69
Figure 27 : Variation des taux plasmatiques de créatinine au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	70
Figure 28 : Variation des taux plasmatiques d'acide urique au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	71
Figure 29 : Variation des taux plasmatiques de l'urée au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	71
Figure 30 : Variation des taux plasmatiques du Cholestérol total (CT) au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	74

Figure 31 : Variation des taux plasmatiques des triglycérides (TG) au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	75
Figure 32 : Variation des taux plasmatiques de LDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	76
Figure 33 : Variation des taux plasmatiques de VLDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	77
Figure 34 : Variation des taux plasmatiques d'HDL-C au 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités.....	78

LISTE DES PLANCHES

Planche 1 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	80
Planche 2 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM (2mg/kg p.c.) . Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	81
Planche 3 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	82
Planche 4 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	83
Planche 5 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. coloration H&E : (a, c, e et g) × 100 et (b, d, f et h) × 400.....	84
Planche 6 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100. Coloration H&E.....	86
Planche 7 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et C), Gx400 (B). Coloration H&E.....	87
Planche 8 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A: par gavage, B : supplémentée en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E....	88
Planche 9 : Aspect histologique du cortex rénal des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, b, d et e) × 100 et (c) × 400.....	89
Planche 10: Aspect histologique du poumon chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (B et C), Gx400 (A). Coloration H&E.....	92
Planche 11 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E.....	93
Planche 12 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E.....	94
Planche 13 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	95

Planche 14 : Aspect histologique du poumon des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, f et g) $\times$ 100 et (b, d, e et h) $\times$ 400.....	96
Planche 15 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	99
Planche 16 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B et C).....	100
Planche 17 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....	101
Planche 18 : Aspect histologique du cortex cérébral des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times$ 100 et (b et d) $\times$ 400.....	102
Planche 19 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E.....	104
Planche 20 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....	105
Planche 21 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E.....	106
Planche 22 : Aspect histologique de l'hippocampe des lapins témoins. Du groupe traité par l'IVM. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage et IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times$ 100 et (b et d) $\times$ 400.....	107

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Ascorbique
ABC: ATP-Binding Cassette
Abs: Absorbance
ALAT : Alanine Amino-Transférase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APO : Apolipoprotéines
ASAT : Aspartate Amino-Transférase
ATP : Adénosine Triphosphate
AVM : Avermectine
AVMs : Avermectines
CA : Corne d'Ammon
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein
CM : Chylomicron
CRD : Centre de Recherche et de Développement
CT: Cholestérol Total
CYP 3A4: Cytochrome P450 3A4
DO : Densité Optique
EMTX : Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques
ERO : Espèces Réactivés d'Oxygène
FA : Facteurs Athérogènes
GABA : Acide Gamma-Amino-Butyrique
GD : Gyrus Denté
GGT ou γ -GT : Gamma-Glutamyl Transférase
GLDH : Glutamate Déshydrogénase
GOD : Glucose Oxydase
GPO : Glycérol-Phosphate Déshydrogénase
H&E: Hématoxyline-Eosine
HDL-C: High Density Lipoprotein-Cholesterol

HL : Lipase Hépatique
IAP : Indice Athérogène du Plasma
IDL-C: Intermediate Density Lipoprotein-Cholesterol
IgA : Immunoglobuline A
IVM : Ivermectine
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LDH: Lactate Déshydrogénase
LDL-C: Low Density Lipoprotein-Cholesterol
LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor
LMs: Lactones Macrocycliques
LPL : LipoProtéine Lipase
MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MCV : Maladies Cardiovasculaire
MDA : Malondialdéhyde
MDH : Malate Déshydrogénase
MDR1: Multi-Drug-Resistance
MRP: Multidrug Related Protein
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène
% PA : Pourcentage de Prise d'Aliment
% PB : Pourcentage de Prise de Boisson
p.c. : poids corporel
PF: Poids Final
PFA: Poids Final d'Aliment
P-gp: P glycoprotéine
PI: Poids Initial
PIA: Poids Initial d'Aliment
PLTP: Phospholipid Transfer Protein
POD: Peroxydase
% PP : Pourcentage de Prise de Poids
REL : Réticulum Endoplasmique Lisse
SD : Standard Deviation ou l'écart type

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SR : Scavenger Receptor

TG : Triglycérides

TGO : Oxaloacétate de Glutamate Transaminase

TGP : Pyruvate de Glutamate Transaminase

UDP Glucuronosyl-Tranfêrases : Uridines Di-Phospho Glucuronosyl-Transfêrases

VFB : Volume Final de Boisson

VIB : Volume Initial de Boisson

VLDL-C: Very Low Density Lipoprotein-Cholesterol

Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats

Hassina Khaldoun-Oularbi,¹
Noura Bouzid,² Soumia Boukreta,¹
Chahrazed Makhoul,¹
Fariza Derriche,¹ Nadia Djennas²

¹Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, Blida; ²Laboratory of Anatomy-Pathology, CHRU Parnet, Alger, Algeria

Abstract

Thiamethoxam (TMX), a second-generation neonicotinoid insecticide, is one of the most widely used insecticides in Algeria. The present study assessed the effects of repeated subchronic exposure to the commercial formulation of thiamethoxam (Actara®, 25% WG) in albino male rats. The toxic effects of thiamethoxam (TMX) were studied biochemically and histopathologically. Twenty-eight male albino rats weighing between 226 and 243 g were randomly assigned to four groups. One group served as control, and the other three were served as experimental groups administered a neonicotinoid thiamethoxam (TMX; 26, 39 and 78 mg/kg/day) for 6 weeks. The effects of the insecticide on various biochemical parameters were evaluated at 2, 4 and 6 weeks. Histopathological studies were carried out in the liver, kidney, cerebellum and hippocampus at the end of the experiment. Changes in biochemical parameters glucose, ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), γ GT (gamma-glutamyltransferase) ALP (alkaline phosphatase) urea and creatinine were observed in treated-groups in a dose dependent manner when compared to the control. Histopathological alterations were more intense in male rats from the TMX high dose group than those from group 2 and 3. Based on these results, subchronic oral administration of thiamethoxam altered the biochemical parameters, which correlated with histopathological changes in the liver kidney and brain.

Introduction

Nowadays, acute pesticide poisoning is an important public health problem worldwide and inappropriate use of those chemical products can lead to adverse effects to humans and the environment. The research

on the risk of diseases associated with occupational and environmental exposures are primarily drawing on studies in human populations, along with supportive findings from experimental studies. Lifelong cumulative exposure to pesticides may produce lasting toxic effects on various organs including the central nervous system and contribute to the development of pathologies like systemic lupus erythematosus¹ and Alzheimer's disease.²

Neonicotinoids insecticides have been registered globally in more than 120 countries,³ in major markets acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid, clothianidin, thiamethoxam, and dinotefuran.⁴ These six neonicotinoids have distinct structural features compared with nicotine and at high doses were associated with evidence of systemic toxicity.⁵ Animal studies indicate relatively low toxicity of neonicotinoids to birds, fish and mammals^{6,7} because they have resistant nicotinic receptor subtypes compared to insects, as well as the protection of the central nervous system (CNS) by the blood-/brain barrier.⁸ However, Rodrigues *et al.* (2010)⁹ demonstrate that administration of the neonicotinoid insecticide may provoke alterations on the cholinergic system of rats, producing biochemical and behavioral effects that can be correlated to the toxicity produced by other kinds of pesticides that are linked to the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's type dementia.

Thiamethoxam (TMX), a second-generation neonicotinoid insecticide, developed both for foliar/soil applications and as a seed treatment for use in most agricultural crops all over the world.¹⁰ Clothianidin and thiamethoxam are extremely toxic to winter worker honey bees, they act like endocrine disrupting chemicals.¹¹ It has been shown that TMX is a much better substrate for mouse liver microsomal CYPs than the corresponding rat or human enzymes in forming desmethyl-TMX (dm-TMX), which is also hepatotoxic, and clothianidin (CLO), which is not hepatotoxic or hepatocarcinogenic.¹² Systemic administration of 20 mg/kg/b.w./TMX in mice has shown that at least 44% of this substance is metabolized and that its metabolites are found in the brain.¹³ Comparisons of the major metabolic pathways of thiamethoxam in vitro using mouse, rat, and human liver fractions has shown that metabolic rates in humans are lower than those in the rat. Though, the insecticide, thiamethoxam, has been found to cause a reduction in serum cholesterol an earlier sign of liver dysfunction that may be causally associated with the later pathological changes, and eventually cell death, increased cell proliferation and tumor for-

Correspondence: Hassina Khaldoun-Oularbi, Department of Biology and Cellular Physiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, BP 270, Route Soumaa, Blida, Algeria.
E-mail: khaldounhassina@hotmail.fr

Key words: Thiamethoxam; subchronic toxicity; biochemical parameters; histopathology; Albino rat.

Received for publication: 19 October 2017.

Revision received: 15 December 2017.

Accepted for publication: 15 December 2017.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright H. Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2017
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2017; 7:7149
doi:10.4081/xeno.2017.7149

mation¹⁴ suggesting that thiamethoxam is unlikely to pose a hazard to humans exposed to this chemical at the low concentrations found in the environment or during its use as an insecticide.

In Algeria, the two formulations of Thiamethoxam Actara® for foliar application and Cruiser® for seed treatment are largely commercialized. The aim of this study was to determine the potential effects of the commercial formulation of thiamethoxam named Actara® in multiple organs of rats. For this purpose, biochemical and histopathological analysis were investigated in this setting.

Materials and Methods

A commercial formulation of thiamethoxam [3-2-Chloro 1,3-tiazol-5-ylmetil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamine], named Actara® (25 WG) 25% purity of active compound was purchased from Syngenta Crop Protection Agrochemicals, Greensboro, USA. All other biochemical reagents used were obtained from commercial sources (BIO-LABO SA, France).

Experimental animals and research design

Male Wistar rats, weighing 226-243 g, were housed in four groups of seven animals under controlled conditions of temperature and photoperiod of 12 h light/dark, with free access to food and water. Treated animals received, by gavage three different doses of TMX dissolved in distilled water,

1/60, 1/40 and 1/20 TMX-LD50 respectively 26, 39 and 78 mg/kg/b.w. The oral LD50 value of thiamethoxam was 1563 mg/kg/b.w.¹⁰ Control animals received vehicle (H₂O) in the same volume as treated animals. All rats were allowed to acclimate to their home cages for a week prior to the initiation of experiments.

The experiment was performed in accordance with the OCDE guidelines.¹⁵ The research design involves treatment of the rats with the chemicals for 6 weeks. At the end of the 6 weeks experiment, the overnight-fasted rats were anesthetized using anesthetic ether than sacrificed by cervical dislocation.¹⁶ The following organs liver, kidney, brain, testes, thymus and adrenal glands were collected. All these organs were weighed individually and organ body weight ratio was calculated (Figure 1).

Biochemical measurements

At 2, 4 and 6 weeks after treatment, blood was collected by retro-orbital bleeding. Plasma samples were separated from blood cells by centrifugation at 3000 g for 10 min. Subsequently, plasma samples were used to determine creatinine, urea, ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), γ GT (gamma-glutamyl-transferase) ALP (alkaline phosphatase) and glucose levels using standard kits marketed by BIOLABO SA, France.

Histopathological examination

For selective investigation, the *liver*, *kidney*, *brain* were quickly excised and fixed in 10% normal buffered formalin. The samples were afterward paraffin-embedded, sectioned and stained with haematoxylin and eosin for microscopic examination.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA) to compare the experimental groups followed by Duncan's post-hoc test to identify significantly different groups

(Statistica version 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Body weight

No deaths occurred in any group throughout the experiment. The body weight of the control and the TMX-treated rats during the experiment are summarized in Table 1.

Body weight of rats significantly decreases after TMX exposure for 6 weeks in a dose dependent manner. Comparison of the final body weight with the initial body weight revealed a significant difference and hence the increase of about 22 %, 18% and 15% was considerable in the control and TMX low and middle dose-groups respec-

tively compared with an increase of about 10% in the TMX high dose group.

Absolute and relative organ weights

The relative and absolute organ weights are shown in Table 2. The organs like adrenals, kidneys and thymus of rats did not illustrate any significant change in their weights at any doses as compared to controls. However, relative weight of liver and testicles were significantly reduced ($P < 0.05$) at 78 mg/kg/b.w.

Biochemical parameters

Plasma biochemical data after sub-chronic toxicity in rats, treated with three doses of thiamethoxam 26, 39, 78 mg/Kg/b.w at 2, 4 and 6 weeks, are presented on Table 3.

After six weeks of treatment, TMX at higher dose caused significant increase ($P < 0.05$) in plasma glucose, urea and crea-

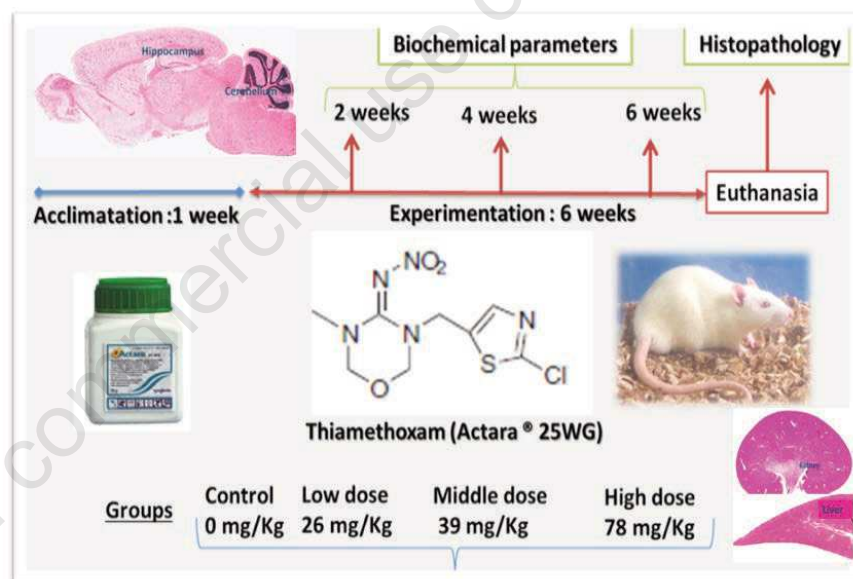


Figure 1. Experimental animals and research design.

Table 1. Body weight gain in rats after oral administration of thiamethoxam (26, 39 and 78 mg/Kg/b.w. of TMX) for 6 weeks.

Period	Dose (mg/kg/d)	Bodyweight (g)			
		Control	TMX Low 26 mg/kg	TMX Middle 39 mg/kg	TMX High 78 mg/kg
Acclimation	1 week	239.73 $\pm$ 4.44	238.26 $\pm$ 4.60	241.46 $\pm$ 5.46	243.13 $\pm$ 5.26
Experimentation (6 weeks)	1 week	246.00 $\pm$ 2.53	244.13 $\pm$ 5.74	248.06 $\pm$ 7.50	252.73 $\pm$ 6.87
	2 week	252.57 $\pm$ 1.85	254.57 $\pm$ 6.58	257.14 $\pm$ 5.47	260.07 $\pm$ 7.08
	3 week	256.42 $\pm$ 1.98	252.92 $\pm$ 6.68	257.21 $\pm$ 7.54	259.78 $\pm$ 7.58
	4 week	260.40 $\pm$ 2.43	247.85 $\pm$ 5.74*	257.45 $\pm$ 6.87*	253.65 $\pm$ 9.04*
	5 week	286.29 $\pm$ 4.99	269.09 $\pm$ 7.83*	274.50 $\pm$ 9.28*	267.81 $\pm$ 9.27*
	6 week	301.75 $\pm$ 3.58	289.60 $\pm$ 7.60	287.79 $\pm$ 4.52*	279.30 $\pm$ 8.45*

Values represent the mean $\pm$ SE of 7 animals in each group. *Significant at the level of $P < 0.05$.

tinine levels as compared with control group. While, AST, ALT, PAL and γ -GT levels significantly increased ($P < 0.05$) in dose dependent manner.

Histopathological finding

The results of microscopic examination of the organs are summarized as follows. The liver, kidney, cerebellum and hippocampus of control rats appeared structurally and functionally normal without any visible lesion. However, pathological changes were observed in all cited organs of rats exposed to TMX at 26, 39 and 78 mg/kg/d in a dose dependent manner (Figures 2-5).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the liver

In the liver, TMX lower dose (26 mg/kg/d) treatment for 6 weeks resulted in congestion of vessels and mild periportal infiltration by inflammatory cells. While, hepatocytes of liver at middle and high doses 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively showed mild focal necrosis with swollen cellular nuclei and cytoplasmic lesions as compared to control (Figure 2).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the kidneys

There were no pathological changes in the kidney of rats exposed to TMX at 26 mg/Kg/b.w. as compared with control. However, administration of TMX at 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively caused renal necrosis, congestion of renal vessels and degeneration of the tubular cells (Figure 3).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the cerebellum

The histological structure of the cerebellum in TMX exposed rats at low (Figure 4B) and middle (Figure 4C) doses showed congestion in cerebrum and degenerative changes in Purkinje cells as compared to control (Figure 4A). Whereas, repeated

exposure of thiamethoxam at higher (Figure 4D) dose for 6 weeks, produced necrosed Purkinje cells with loss of dendrites and granules in the granular layer of cerebellum.

Effect of thiamethoxam on histological structure of the hippocampus

Histological structure of the hippocampus of the control group show normal pyramidal and multilateral cells forming the

molecular layer (Figure 5A). In hippocampus of rats treated with TMX a decrease of degenerative changes can be observed (Figure 5B, 5C and 5D). It concerns all hippocampus zones of pyramidal cells as well as cells of granular and molecular layers. Degenerative changes in the structure of the hippocampus layers consist principally in various degree of cytoplasmic vacuolation, which result in foam structure.

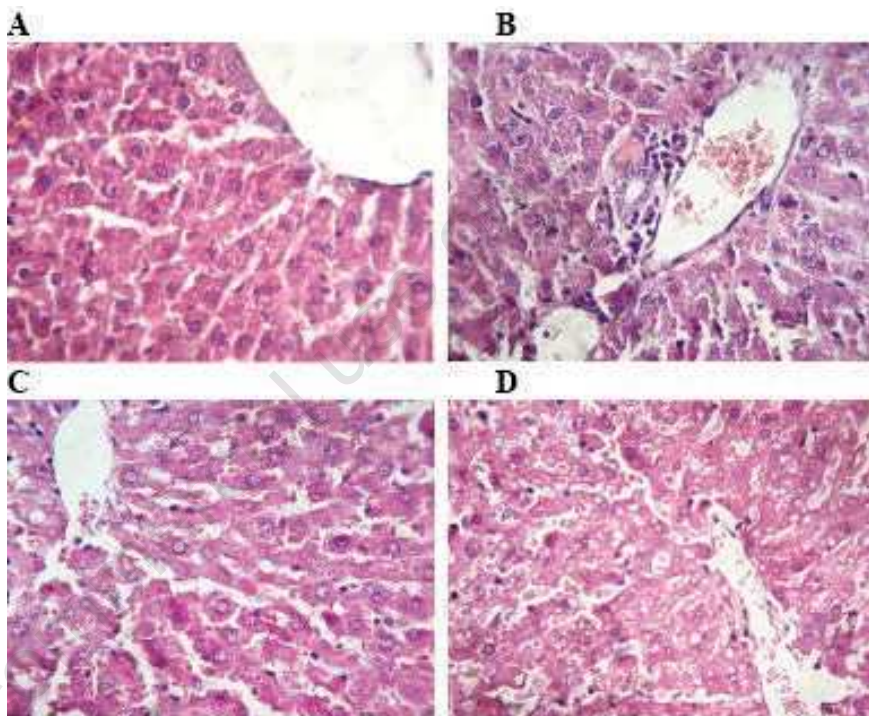


Figure 2. Photomicrograph of rat liver stained with hematoxylin and eosin: A) the histo-architecture of the liver is intact in control rats. B) Rats treated with TMX at 26 mg/Kg/b.w show few inflammatory cells infiltration and congestion. C and D) Rats treated with TMX 39 mg/Kg/b.w and 78 mg/Kg/b.w respectively shows disorganization of hepatic cords and degeneration of the hepatocytes with swollen cellular nuclei (A, B, C and D: H&E; Gr x400).

Table 2. Effects of thiamethoxam (TMX) on absolute and relative organ weights in the control and TMX-treated groups.

	Control		Thiamethoxam Organs weight (g)							
	A	R	Low		Mid		High			
	A	R	A	R	A	R	A	R		
Liver	12.32±0.48	4.54±0.18	14.28±0.32*	4.05±0.09	12.22±0.54	3.64±0.15	10.86±0.43*	3.62±0.16*		
Kidney (Right)	1.21±0.04	0.44±0.01	1.40±0.02	0.39±0.06	1.40±0.05	0.40±0.01	1.19 ± 0.06	1.39±0.02		
Kidney (Left)	1.15±0.03	0.42±0.01	1.45±0.03	0.41±0.01	1.40±0.03	0.42±0.01	1.23 ± 0.07	0.41 ± 0.02		
Adrenal (Right)	0.05±0.07	0.08±0.03	0.11±0.02	0.03±0.04	0.12±0.03	0.03±0.04	0.04 ± 0.07	0.04±0.01		
Adrenal (Left)	0.04±0.01	0.27±0.01	0.11±0.01	0.03±0.01	0.12±0.03	0.03±0.01	0.04 ± 0.03	0.03±0.01		
Testicle (Right)	1.45±0.15	0.53±0.06	1.74±0.03*	0.49±0.01	1.78±0.04*	0.53±0.01	1.23±0.11*	0.21±0.04*		
Testicle (Left)	1.47±0.14	0.54±0.05	1.70±0.04*	0.48±0.01	1.80±0.03*	0.53±0.01	1.38±0.17*	0.26±0.05*		
Thymus	0.45±0.02	0.17±0.01	0.50 ± 0.05	0.14±0.01	0.52±0.09	0.16±0.06	0.45±0.05	0.15±0.02		

A, absolute; R, relative; the relative organ weight is expressed as (organ weight (g)/body weight (g) x 100) of rat. Results are given as a mean±SD (n=7). *Statistically different from the control group ($P < 0.05$).

Discussion and Conclusions

There is epidemiological and experimental evidence that environmental factors, like pesticides, influence a diverse array of molecular mechanisms and consequently alter disease risk not only for metabolic syndrome and cardiovascular diseases, insulin resistance, diabetes mellitus and immune system diseases but also for psychiatric and neurobehavioral disorders.^{1,2,17}

In the present study, we examined the toxic effects of three doses of thiamethoxam 26, 39 and 78 mg/Kg/b.w. respectively for six weeks on hepatotoxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity by using biochemical and histological techniques in rat.

Exposure to TMX caused a significant decrease in the body weight gain. This result is in agreement with the findings of Arfat *et al.* (2014),¹⁸ who indicate that exposure to imidacloprid a neonicotinoide insecticide decreased body weight in male albino mice at 15 mg/kg/day together with significant toxicity symptoms.

The organ weights are important criteria for evaluation the toxicity of xenobiotics. Our results showed insignificant changes in the relative weights of kidney and thymus of rats. But, treatment with high dose TMX

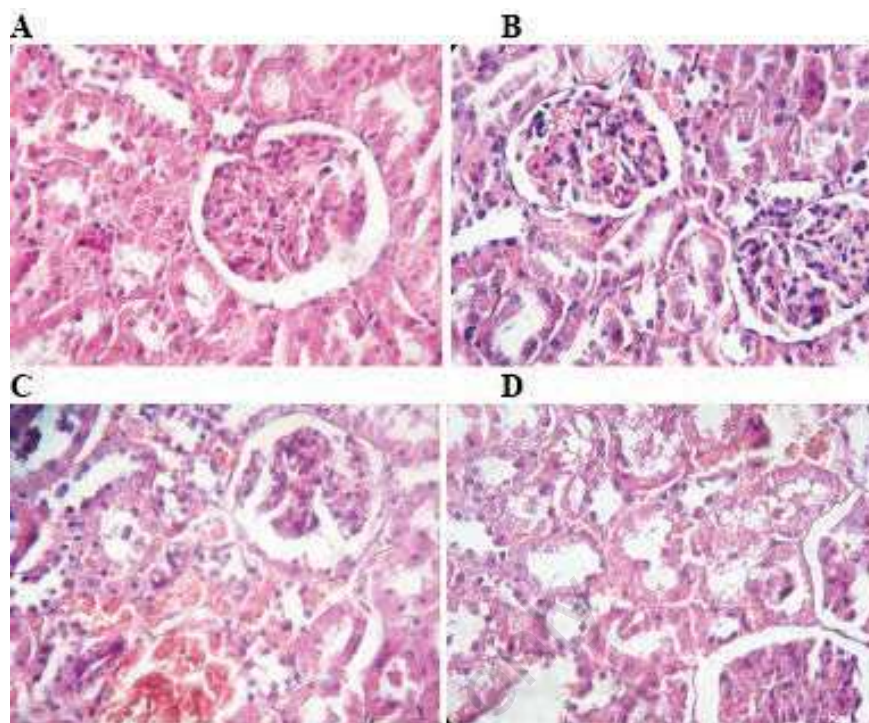


Figure 3. Photomicrograph of rat kidney stained with hematoxylin and eosin: The histological structure of the renal cortex is intact in control rats and TMX low dose (A and B). Rats treated with TMX at 39 mg/Kg/b.w and 78 mg/Kg/b.w respectively (C and D) shows mild congestion in the glomeruli, and vacuolar degeneration of tubular cells (A, B, C and D H&E; 400).

Table 3. Biochemical data of male rats orally administered thiamethoxam for 6 weeks.

Blood chemistry parameters	Period	Thiamethoxam/Doses			
		Control 0 mg/kg	TMX Low 26 mg/kg	TMX Middle 39 mg/kg	TMX High 78 mg/kg
Glucose (mg/dL)	2 Week	0.91±0.15	1.06±0.17	1.01±0.14	1.59±0.08*
	4 Week	1.20±0.03	1.48±0.14	1.43±0.09	1.51±0.11*
	6 Week	1.23±0.14	1.44±0.20	1.31±0.16	1.52±0.04*
Urea (mg/dL)	2 Week	0.60±0.02	0.58±0.03	0.53±0.04	0.52±0.02
	4 Week	0.62±0.02	0.56±0.05	0.53±0.03	0.51±0.03
	6 Week	0.63±0.00	0.59±0.05	0.52±0.03	0.30±0.05*
Creatinine (mg/dL)	2 Week	5.67±0.21	5.67±0.49	5.50±0.22	5.33±0.21
	4 Week	6.00±0.52	6.33±0.42	6.33±0.21	6.17±0.40
	6 Week	6.33±0.21	5.83±0.17	5.50±0.34*	4.83±0.60*
AST (U/L)	2 Week	85.28±1.53	85.17±2.73	106.5±7.71*	110.6±11.10*
	4 Week	88.17±2.26	88.95±5.65	99.96±8.64*	109.83±9.25*
	6 Week	83.67±1.65	93.67±8.94*	99.17±11.22*	118.50±6.03*
ALT (U/L)	2 Week	44.58±2.34	43.83±1.70	42.13±2.59	45.02±2.44
	4 Week	43.63±1.92	40.33±3.84	41.80±8.47	45.03±2.45
	6 Week	44.33±4.62	40.50±3.37	41.67±3.83	49.67±3.80*
ALP (UI/l)	2 Week	139.0±3.79	140.83±10.87	145.5±13.6*	173.5±18.14*
	4 Week	135.0±4.99	140.67±10.41	174.2±9.36*	168.83±8.95*
	6 Week	142.0±2.63	163.8±11.0*	167.33±9.40*	169.00±11.24*
γ-Gt (UI/l)	2 Week	7.33±0.95	8.84±1.87*	9.17±1.25*	13.50±3.06*
	4 Week	7.15±0.91	8.67±1.84*	11.67±1.45*	12.33±3.02*
	6 Week	7.67±1.69	8.00±1.18*	12.67±1.45*	17.59±3.45*

Results are given as a mean±SD (n=7). *Statistically different from the control group (P<0.05).

induced a significant reduction in relative liver and testes weights compared to respective control. Considering that thiamethoxam is metabolized to clothianidin in mammals, these findings agree with other several previous studies.^{19,20}

The liver and kidney play an important role in the detoxification and elimination of numerous xenobiotics and are prone to various disorders as a consequence of exposure to environmental pollutants. Conventional liver biochemical parameters provide information about the integrity of hepatocytes, such as serum transaminases ALT and AST, with ALT being considered as the gold standard clinical chemistry marker of liver injury. In addition, the integrity of the biliary system is commonly assessed by measuring gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase.²¹⁻²³

Our result shows that six weeks oral exposure of high dose of thiamethoxam to rat has produced significant toxic effects. The activities of AST, ALT, ALP, γ GT and glucose levels in the plasma of TMX exposed rats were significantly elevated, and the activity of creatinine and uric acid was significantly decreased, indicating that TMX disturbs the hepatic and renal functions. This effect was more pronounced in the TMX mild and high dose-groups. TMX provoke an increase in glucose levels those results are in agreement with the study of Khalil *et al.* (2017)²⁴ who show that imidacloprid perturbed the glucose regulation through hyperglycemic activity in both developing and adult rats.

The present study shows that subchronic oral administration of thiamethoxam lead to systemic biochemical but also histopathological damages of kidney, liver and brain. The renal tissue showed in TMX-treated groups glomerular and tubular lesions both in proximal and distal parts. Besides, the hepatic tissue showed mild focal necrosis with swollen cellular nuclei and cytoplasmic lesions in the TMX-treated groups. Consequently, thiamethoxam like imidacloprid disturb liver and kidney functions. Similar results have been found in animals exposed to neonicotinoid compound imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin who demonstrate oxidative stress and inflammation in organs like liver, kidney and brain in mice and rats.^{13,18,25,26}

The hippocampus is importantly and directly involved in the mediation of untrained anxiety reactions in animals.²¹ Numerous works show that Alzheimer's disease is a consequence of neuron loss, decrease of choline acetyltransferase (ChAT), sodium- dependent choline transporter, and AChE activities, and a decreased level of acetylcholine in the hippocampal

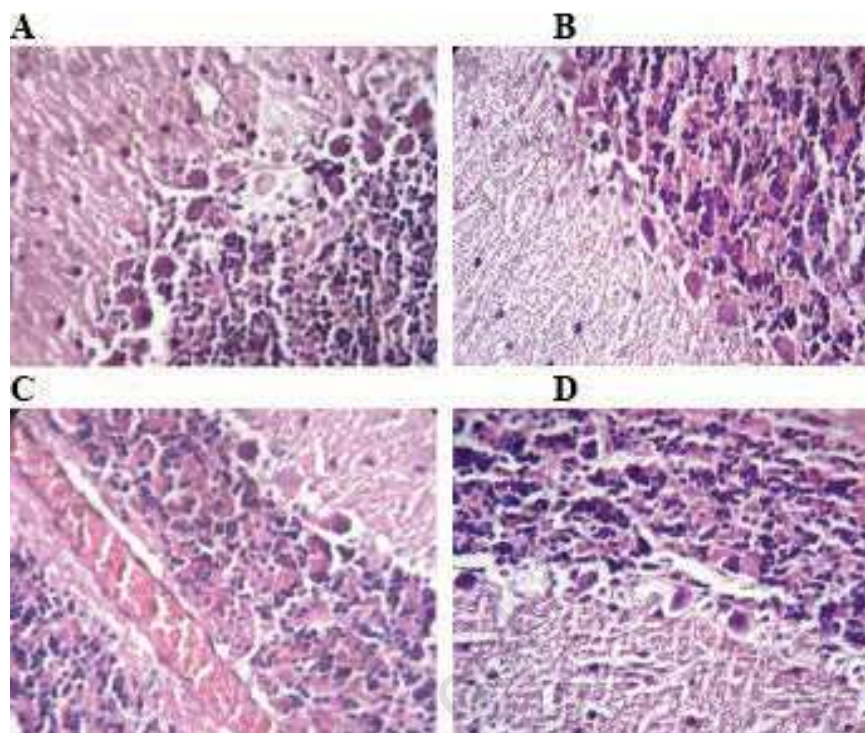


Figure 4. Histological architecture of the cerebellum in the control and TMX-treated groups. In control group (A) normal histological architecture of cerebellum shows intact Purkinje layer, molecular layer, granular layer and gray matter. Rats treated with TMX at 26 mg/Kg/b.w shows Purkinje layer with few necrotic Purkinje cells (B). Cerebellum of TMX-treated rats at 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively (C and D) showing congestion severe vacuolation in the molecular layer with degeneration and detachment of pyramidal cell layer degeneration of Purkinje cell layer (A, B, C and D H&E; 400).

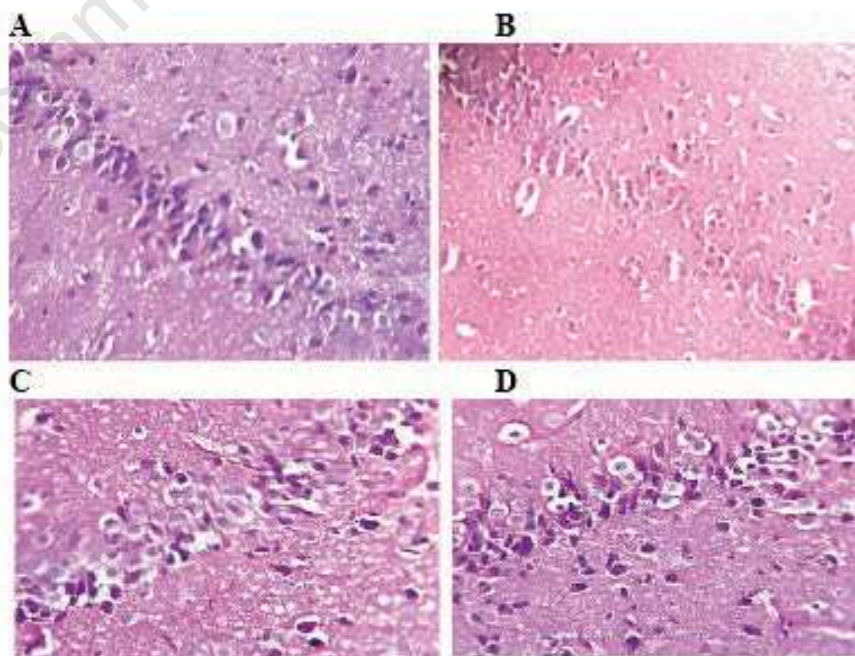


Figure 5. Histological architecture of the hippocampus in the control and TMX-treated groups (H&E; 400). In control group (A), normal histological architecture of hippocampus. Rats treated with TMX shows neurodegradation states of pyramidal neurons and granule cells and foam structure between neurons (B, C and D) (A, B, C and D H&E; 400).

and cortical regions of the brain.^{2,27,28} Potential concern that the neonicotinoid insecticides could affect the developing nervous system is associated with their nicotinic mode of insecticidal action and recognition of nicotine as a likely developmental neurotoxicant in humans and laboratory animals.⁵ Nicotine is believed to interfere with neuronal development, with adverse effects on various brain regions, including cortex, hippocampus, cerebellum, and/or the limbic system.²⁸

Rodrigues *et al.* (2010)⁹ indicate that mice 7 days exposure to high doses of thiamethoxam 100 mg/Kg/b.w. produces AChE inhibition in three cerebral regions, the hippocampus, striatum and cortex, that persists some days after exposure ceases and that it is accompanied by deficits in behavioral performance. According to the histopathological findings in this study, exposure to thiamethoxam led to destructive effects on the hippocampus and cerebellum of rat showing neuro-degradation states of pyramidal neurons and granule cells, foam structure between neurons of the hippocampus, degeneration and detachment of pyramidal cell layer and degeneration of Purkinje cell layer in the cerebellum of rats treated with TMX at middle and high doses.

Kimura-Kuroda *et al.* (2012)²⁹ show that acetamiprid and imidacloprid (two insecticides neonicotinoids), and nicotine exert similar excitatory effects on mammalian nAChRs at concentrations greater than 1 μ M. Therefore, the neonicotinoids may adversely affect human health, especially the developing brain. The present investigation is the first to assess the impact of the TMX on the brain hippocampus and cerebellum, kidney and liver of male rats, and thus, contributes to the existing literature on the potential correlation between neonicotinoids and neurodegenerative disease and neurotoxicity.

References

1. Parks CG, De Roos AJ. Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:527-36.
2. Yan D, Zhang Y, Liu L, Yana H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:322-22.
3. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Ann Rev Entomol* 2003;48:339-64.
4. Ensley SM. Chapter 48: Neonicotinoids. *Veterinary Toxicology* (Second Edition); 2012. pp 596-598.
5. Sheets LPAA, Lib DJ, Minnema RH, Colliard MR, Creeke RC, Peffer A. Critical review of neonicotinoids insecticides for developmental neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2016;46:153-90.
6. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:247-68.
7. David D, George IA, Peter JV. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clin Toxicol* 2007;45:485-6.
8. Hung YM, Meier KH. Acute Confidor® (imidacloprid-N-methyl pyrrolidone) insecticides intoxication with mimicking cholinergic syndrome. *Toxicol Ind Health* 2005;21:137-40.
9. Rodrigues KJ, Santana MB, Do Nascimento JL, Picanço-Diniz DL, Maués LA, Santos SN, et al. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:101-7.
10. Maienfisch P, Huerlimann H, Rindlisbacher A, Gsell L, Dettwiler H, Haettenschwiler J, et al. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manage Science* 2001;57:165-76.
11. Baines D, Wilton E, Pawluk A, Gorter Md, Chomistek N. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Sci Rep* 2017;7:109-79.
12. Tami L, Swenson J, Casida E. Neonicotinoid formaldehyde generators: possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicol Lett* 2013;216:139-45.
13. Ford KA, Casida JE. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res Toxicol* 2006;19:1549-56.
14. Green T, Toghill A, Lee R, Waechter F, Weber E, Peffer R, et al. Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol Sci* 2005;86:48-55.
15. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents. Guideline No. 408.; 2010.
16. Directive 2010/63/EU of The European Parliament And Of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union.
17. Dubovický M. Neurobehavioral manifestations of developmental impairment of the brain. *Interdisc Toxicol* 2010;3:59-67.
18. Arfat Y, Mahmood N, Tahir MU, Rashid M, Fan Zhao SA, Li D-J, et al. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicol Rep* 2014;1:554-61.
19. Hirano T, Yanai S, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Kubota N, et al. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J Vet Med Sci* 2015;77:1207-15.
20. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Baydaş G, et al. Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. *Drug Chem Toxicol* 2013;36:421-9.
21. Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol* 2007;18:365-74.
22. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomarker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008;245:194-205.
23. Hernández A, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Tsatsakis A, Tesifón Parrón MR, et al. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food Chem Toxicol* 2013;61:144-51.
24. Khalil SR, Hesham AA, AbdoNassan HM. Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;55:165-74.
25. Duzguner V, Erdogan S. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pestic Biochem Physiol* 2010;97:13-8.
26. Kapoor U, Srivastava MK, Bhardwaj S, Srivastava LP. Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats. *J Toxicol Sci* 2010;35:577-81.
27. Phua DH, Lin CC, Wu ML, Deng JF, Yang CC. Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clin Toxicol* 2009;47:4.
28. Dwyer JB, Mcquown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* 2009;122:125-39.
29. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal Rats. *PLoS One* 2012;7:e32432.

Résumé

Actuellement, la mise sur le marché de nouveaux médicaments antiparasitaires à usage vétérinaire a permis une meilleure gestion thérapeutique de différentes parasitoses. Cependant, leur utilisation excessive occasionne des effets toxiques sur la santé animale et humaine. L'ivermectine (IVM), un médicament antiparasitaire d'efficacité élevée et d'utilisation très fréquente spécifiquement en médecine vétérinaire. La présente étude vise dans un premier temps à évaluer les effets toxiques d'une administration répétée d'une forte dose d'IVM et dans un deuxième temps de déterminer un éventuel effet amélioratif d'une coadministration d'un antioxydant puissant la vitamine C (acide ascorbique) chez les lapins (*Oryctolagus cuniculus*) biochimiquement et histopathologiquement. Vingt lapins mâles ont été divisés en quatre groupes (n = 5) et traités pendant trois semaines consécutives : Groupe témoin ; Groupe traité par l'IVM (2 mg / kg p.c. par voie sous-cutanée, 3 fois par semaine); Groupe traité par IVM + vitamine C par gavage (20 mg/ml) et groupe traité par IVM + vitamine C supplémenté en aliment (200 mg / kg d'aliment). Au 14^{ème} et au 21^{ème} jour de l'expérimentation, des échantillons de sang ont été collectés pour l'analyse biochimique et à la fin de l'expérimentation, les lapins ont été euthanasiés et les organes foie, rein, poumon et cerveau ont été soigneusement pesés et fixés pour l'étude histologique. Nos résultats ont montré des troubles du comportement, une diminution du poids corporel, de la prise d'aliment et l'eau de boisson, des variations du poids absolu et relatifs des organes étudiés chez le lot IVM en comparaison avec les témoins et les coadministrés par la vitamine C. L'IVM a induit une perturbation des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique et rénale et des paramètres du bilan lipidique avec une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux plasmatique de glucose, ALAT, ASAT, γ -GT, créatinine et HDL-C et une diminution significative du taux de TC, TG, LDL-C et VLDL-C chez le lot IVM par rapport au groupe témoin. La coadministration de la vitamine C a significativement amélioré ces paramètres biochimiques. L'examen histopathologique du foie, des reins du cerveau et des poumons montre une désorganisation tissulaire chez le lot IVM. Toutefois, on a noté que les animaux traités par l'IVM + vitamine C (par gavage ou en alimentation) présentent une architecture tissulaire moins altérée et semblable à ceux du groupe témoin. A l'issus de ces résultats, la coadministration de la vitamine C s'avère une solution efficace pour atténuer les effets toxiques induits par l'IVM sur les différents systèmes biologiques du lapin. D'où, on recommande l'association de la vitamine C par gavage chez l'animal traité par l'IVM pour éliminer ses effets nocifs.

Mots clés : Ivermectine, Vitamine C (acide ascorbique), Analyse biochimique, Histopathologie, Lapin.

Abstract

Currently, the marketing of new antiparasitic drugs for veterinary use has enabled better therapeutic management of various parasitoses. However, their excessive use causes toxic effects on animal and human health. Ivermectin (IVM), an antiparasitic drug of high efficacy and very frequent use specifically in veterinary medicine. The present study aims firstly to assess the toxic effects of repeated administration of a high dose of IVM and secondly to determine a possible ameliorative effect of a co-administration of a powerful antioxidant, vitamin C (ascorbic acid) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histopathological investigations. Twenty male rabbits were divided into four groups (n = 5) and treated for three consecutive weeks: control group; Group treated with IVM (2 mg / kg bw subcutaneously, 3 times per week); Group treated with IVM + vitamin C by gavage (20 mg / mL) and group treated with IVM + vitamin C supplemented with food (200 mg / kg of food). On the 14th and 21st day of the experiment, blood samples were collected for biochemical analysis and at the end of the experiment, the rabbits were euthanized and the liver, kidney, lung and brain organs were carefully weighed and fixed for histological study. Our results showed behavioral disorders, a decrease in body weight, food and water intake, variations in the absolute and relative weight of the organs studied in the IVM group compared to control and vitamin C co-treated groups. IVM induced a disruption of biochemical markers of hepatic and renal function and parameters of the lipid profile with a significant ($p < 0.05$) increase in the plasma level of glucose, ALT, AST, γ -GT, creatinine and HDL-C and a significant decrease of the level of TC, TG, LDL-C and VLDL-C in the IVM batch compared to the control group. Co-administration of vitamin C significantly improved these biochemical parameters. Histopathological examination of the liver, kidneys, brain and lungs shows tissue disruption in the IVM group. However, it was noted that the animals treated with IVM + vitamin C (by gavage or food) show less altered tissue architecture, which are similar to those in the control group. Following these results, the co-administration of vitamin C has proved to be an effective solution to attenuate the IVM induced toxic effects on the various biological systems of the rabbit. Hence, it is recommended to combine vitamin C by gavage with IVM treatment in animals to eliminate its harmful effects.

Keywords: Ivermectin, Vitamin C (ascorbic acid), Biochemical analysis, Histopathology, Rabbit.

Abstract

Currently, the marketing of new antiparasitic drugs for veterinary use has enabled better therapeutic management of various parasitoses. However, their excessive use causes toxic effects on animal and human health. Ivermectin (IVM), an antiparasitic drug of high efficacy and very frequent use specifically in veterinary medicine. The present study aims firstly to assess the toxic effects of repeated administration of a high dose of IVM and secondly to determine a possible ameliorative effect of a co-administration of a powerful antioxidant, vitamin C (ascorbic acid) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histopathological investigations. Twenty male rabbits were divided into four groups (n = 5) and treated for three consecutive weeks: control group; Group treated with IVM (2 mg / kg bw subcutaneously, 3 times per week); Group treated with IVM + vitamin C by gavage (20 mg / mL) and group treated with IVM + vitamin C supplemented with food (200 mg / kg of food). On the 14th and 21st day of the experiment, blood samples were collected for biochemical analysis and at the end of the experiment, the rabbits were euthanized and the liver, kidney, lung and brain organs were carefully weighed and fixed for histological study. Our results showed behavioral disorders, a decrease in body weight, food and water intake, variations in the absolute and relative weight of the organs studied in the IVM group compared to control and vitamin C co-treated groups. IVM induced a disruption of biochemical markers of hepatic and renal function and parameters of the lipid profile with a significant ($p < 0.05$) increase in the plasma level of glucose, ALT, AST, γ -GT, creatinine and HDL-C and a significant decrease of the level of TC, TG, LDL-C and VLDL-C in the IVM batch compared to the control group. Co-administration of vitamin C significantly improved these biochemical parameters. Histopathological examination of the liver, kidneys, brain and lungs shows tissue disruption in the IVM group. However, it was noted that the animals treated with IVM + vitamin C (by gavage or food) show less altered tissue architecture, which are similar to those in the control group. Following these results, the co-administration of vitamin C has proved to be an effective solution to attenuate the IVM induced toxic effects on the various biological systems of the rabbit. Hence, it is recommended to combine vitamin C by gavage with IVM treatment in animals to eliminate its harmful effects.

Keywords: Ivermectin, Vitamin C (ascorbic acid), Biochemical analysis, Histopathology, Rabbit.

ملخص

حاليًا، أتاح تسويق الأدوية الجديدة المضادة للطفيليات للاستخدام البيطري تحكم علاجي أفضل للطفيليات المختلفة. ومع ذلك، فإن استخدامها المفرط يسبب آثارًا سامة على صحة الحيوان والإنسان. الأيفرمكتين (Ivermectin)، دواء مضاد للطفيليات ذو فعالية عالية واستخدام كثيف للغاية خاصة في مجال الطب البيطري. تهدف الدراسة الحالية أولاً إلى تقييم الآثار السامة الناتجة عن تناول المكرر لجرعة عالية من الأيفرمكتين وثانيًا للتأكد من فعالية التناول المشترك لمضاد الأكسدة القوي، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك) لدى الأرانب (*Oryctolagus cuniculus*) عن طريق الدراسات البيوكيميائية والنسجية. تم تقسيم عشرين أرنبًا ذكرًا إلى أربع مجموعات (ن = 5) وعولجوا لمدة ثلاثة أسابيع متتالية: المجموعة الشاهدة؛ المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين (2 مغ / كغ من وزن الجسم تحت الجلد، 3 مرات في الأسبوع)؛ المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين + فيتامين ج بالتزقيم (20 مغ / مل) والمجموعة المعالجة بالأيفرميكتين + فيتامين ج المضاف إلى الطعام (200 مغ / كغ من الطعام). في اليومين الرابع عشر والحادي والعشرين من التجربة، تم جمع عينات الدم للتحليل الكيميائي الحيوي، وفي نهاية التجربة، تم ذبح الأرانب ووزن الكبد والكلى والرئة والدماغ بعناية وثبتتها للدراسة النسجية. أظهرت نتائجنا اضطرابات سلوكية، وانخفاض في وزن الجسم، وتناول الطعام والماء، واختلافات في الوزن المطلق والنسبي للأعضاء المدروسة لدى المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعتين المعالجتين بالأيفرميكتين مع الفيتامين ج. تسبب الأيفرميكتين في اختلال العلامات البيوكيميائية لوظائف الكبد والكلى ومعلّات توازن الدهون مع زيادة كبيرة ($p < 0.05$) في مستويات البلازما من الجلوكوز، ALAT، ASAT، γ -GT، الكرياتينين و HDL-C وانخفاض ملحوظ في مستوى كل من TC و TG و LDL-C و VLDL-C في المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى تناول المشترك لفيتامين ج إلى تحسن كبير في هذه المعلّات البيوكيميائية. أظهر الفحص التشريحي المرضي للكبد والكلى والدماغ والرئتين اضطرابًا في الأنسجة في مجموعة المعالجة بالأيفرميكتين. ومع ذلك، لوحظ أن الحيوانات التي عولجت بالأيفرميكتين + فيتامين ج (بالتزقيم أو الطعام) تظهر بنية نسيجية أقل تغيرًا ومثابها للبنية الخاصة بالمجموعة الشاهدة. على ضوء هذه النتائج، أثبتت دراستنا أن الاستعمال المشترك لفيتامين ج يعتبر حل فعال للتخفيف من الآثار السامة التي يسببها الأيفرميكتين على الأنظمة البيولوجية المختلفة للأرانب. لذلك، يوصى بدمج الفيتامين ج عن طريق التزقيم لدى الحيوانات المعالجة بالأيفرميكتين للتخلص من آثاره الضارة.

الكلمات المفتاحية: أيفرميكتين، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك)، التحليل البيوكيميائي، التشريح المرضي، الأرنب

ملخص

حاليًا، أتاح تسويق الأدوية الجديدة المضادة للطفيليات للاستخدام البيطري تحكم علاجي أفضل للطفيليات المختلفة. ومع ذلك، فإن استخدامها المفرط يسبب آثارًا سامة على صحة الحيوان والإنسان. الأيفرمكتين (Ivermectin)، دواء مضاد للطفيليات ذو فعالية عالية واستخدام كثيف للغاية خاصة في مجال الطب البيطري. تهدف الدراسة الحالية أولاً إلى تقييم الآثار السامة الناتجة عن التناول المتكرر لجرعة عالية من الأيفرمكتين وثانيًا للتأكد من فعالية التناول المشترك لمضاد الأكسدة القوي، فيتامين ج (حمض الاسكوربيك) لدى الأرانب (*Oryctolagus cuniculus*) عن طريق الدراسات البيوكيميائية والنسجية. تم تقسيم عشرين أرنبًا ذكرًا إلى أربع مجموعات (ن = 5) وعولجوا لمدة ثلاثة أسابيع متتالية: المجموعة الشاهدة؛ المجموعة المعالجة بالآيفرميكتين (2 مغ / كغ من وزن الجسم تحت الجلد، 3 مرات في الأسبوع)؛ المجموعة المعالجة بالآيفرميكتين + فيتامين ج بالتزقيم (20 مغ / مل) والمجموعة المعالجة بالآيفرميكتين + فيتامين ج المضاف إلى الطعام (200 مغ / كغ من الطعام). في اليومين الرابع عشر والحادي والعشرين من التجربة، تم جمع عينات الدم للتحليل الكيميائي الحيوي، وفي نهاية التجربة، تم ذبح الأرانب ووزن الكبد والكلى والرئة والدماغ بعناية وثبيتها للدراسة النسجية. أظهرت نتائجنا اضطرابات سلوكية، وانخفاض في وزن الجسم، وتناول الطعام والماء، واختلافات في الوزن المطلق والنسبي للأعضاء المدروسة لدى المجموعة المعالجة بالآيفرميكتين مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعتين المعالجتين بالآيفرميكتين مع الفيتامين ج. تسبب الأيفرميكتين في اختلال العلامات البيوكيميائية لوظائف الكبد والكلى ومعلّات توازن الدهون مع زيادة كبيرة ($p < 0.05$) في مستويات البلازما من الجلوكوز، ALAT، ASAT، γ -GT، الكرياتينين و HDL-C وانخفاض ملحوظ في مستوى كل من TC و TG و LDL-C و VLDL-C في المجموعة المعالجة بالآيفرميكتين مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى التناول المشترك لفيتامين ج إلى تحسن كبير في هذه المعلامات البيوكيميائية. أظهر الفحص التشريحي المرضي للكبد والكلى والدماغ والرئتين اضطرابًا في الأنسجة في مجموعة المعالجة بالآيفرميكتين. ومع ذلك، لوحظ أن الحيوانات التي عولجت بالآيفرميكتين + فيتامين ج (بالتزقيم أو الطعام) تظهر بنية نسيجية أقل تغيرًا ومثابة للبنية الخاصة بالمجموعة الشاهدة. على ضوء هذه النتائج، أثبتت دراستنا أن الاستعمال المشترك لفيتامين ج يعتبر حل فعال للتخفيف من الآثار السامة التي يسببها الأيفرميكتين على الأنظمة البيولوجية المختلفة للأرانب. لذلك، يوصى بدمج الفيتامين ج عن طريق التزقيم لدى الحيوانات المعالجة بالآيفرميكتين للتخلص من آثاره الضارة.

الكلمات المفتاحية: آيفرميكتين، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك)، التحليل البيوكيميائي، التشريح المرضي، الأرنب.

*TABLE DES
MATIERES*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES PLANCHES	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
RESUME	XIV
ABSTRACT	XV
ملخص	XVI

INTRODUCTION GENERALE	1

PARTIE BIBIOGRAHIQUE

**CHAPITRE 1 ORGANES CIBLES & MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE
L'ETUDE**

1.FOIE : ORGANE DE METABOLISATION	4
1.1.Rappels anatomiques.....	4
1.2.Rappels histologiques.....	5
1.3.Fonctions métaboliques du foie	8
1.3.1.Fonction exocrine du foie.....	8
1.3.2.Fonction endocrine du foie.....	8
2.REIN : ORGANE D'EPURATION	9
2.1.Présentation du rein.....	9
2.2.Rappels anatomiques.....	9
2.3.Rappels histologiques.....	11
2.4.Fonctions physiologiques du rein.....	13
2.4.1.Fonction de détoxification rénale.....	13

3.POUMON	14
3.1.Présentation du poumon.....	14
3.2.Rappels anatomiques.....	15
3.3.Rappels histologiques.....	16
3.4.Fonctions physiologiques du poumon.....	17
4.Système nerveux central (SNC)	18
4.1.Structure générale du cerveau	18
4.2.Anatomie et histologie du cortex cérébral	18
4.3.Anatomie et histologie de l'hippocampe.....	20
5.MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE	21
5.1.Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique	21
5.2.Marqueurs biochimiques de la fonction rénale	21
5.3.Marqueurs biochimiques du bilan lipidique.....	22

CHAPITRE 2 MEDICAMENTS ANTIPARASITAIRES & IVERMECTINE

1.Lactones macrocycliques et Avermectines.....	26
1.1.Lactones macrocycliques	26
1.1.1.Classification	26
2.Avermectines	27
2.1.Propriétés générales	27
2.2.Dérivés des avermectines.....	27
3.Médicament ciblé par l'étude « Ivermectine »	28
3.1.Structure chimique.....	28
3.2.Propriétés physico-chimiques	29
3.Propriétés Pharmacologiques.....	30
3.3.1.Mécanisme d'action.....	30
3.3.2.Effets pharmacologiques.....	31
3.3.3.Formes galéniques	32
3.3.4.Les génériques de l'ivermectine homologués dans le marché national des médicaments vétérinaires.....	32
3.4.Propriétés Pharmacocinétiques	34
3.4.1.Absorption et la distribution	34
3.4.2.Métabolisme.....	35
3.4.3.Elimination.....	35
3.5.Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : rôle majeur de détoxification	35
3.6.Effets secondaires	37
3.7.Toxicité	37

CHAPITRE 3 ANTIOXYDANTS & VITAMINE

1. Définition des Antioxydants	39
2. Définition et classification des vitamines	39
3. Vitamine C ou Acide ascorbique	40
3.1. Structure chimique	40
3.2. Propriétés physico-chimiques	41
3.3. Biosynthèse de la vitamine C	41
3.4. Source de vitamine C	42
3.5. Fonctions physiologiques	43
3.5.1. Agent antioxydant	43
3.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	43
3.5.3. Agent d'oxydo-réduction	43
3.5.4. Agent d'hydroxylation	43
3.5.5. Agent neuroprotecteur	44
4. Toxicité de la vitamine C	44

PARTIE EXPERIMENTALE

Présentation de l'étude	45

CHAPITRE 1 MATERIEL & METHODES

1. Matériel	46
1.1. Matériel biologique (modèle animal)	46
1.1.1. Systématique	46
1.2. Matériel non biologique	47
2. Méthodes	47
2.1. Protocole expérimental	47
2.2. Prélèvement sanguin	49
2.3. Analyses biochimiques	49
2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes	57
2.5. Etude histologique des organes	57
2.6. Traitement des données et analyse statistique	58

CHAPITRE 2 RESULTATS & DISCUSSION.....	60
1. RESULTATS.....	60
1.1.Effet du traitement sur le comportement du lapin	60
1.2.Variation du poids corporel et pourcentage de prise de poids	60
1.3.Variation de la consommation de l'aliment et de boisson	61
1.3.1.Variation de la consommation de l'aliment et le pourcentage de prise alimentaire	61
1.3.2.Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson	62
1.4.Variation du poids absolu et relatif des organes	63
1.5.Paramètres biochimiques	65
1.5.1.Paramètres biochimiques de la fonction hépatique.....	65
1.5.2.Paramètres biochimiques de la fonction rénale	70
1.5.3.Paramètres biochimiques du bilan lipidique	72
1.6.Résultats histologiques	79
1.6.1.Histopathologie du foie.....	79
1.6.2.Histopathologie du rein.....	85
1.6.3.Histopathologie du poumon.....	90
1.6.4.Histopathologie du système nerveux centrale	97
2. DISCUSSION GENERALE.....	108
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122
ANNEXES	

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Actuellement, l'élevage des animaux de rente fait face à de nombreuses restrictions, dont les plus dominantes sont les pathologies animales. Effectivement les maladies infectieuses et plus spécifiquement les parasitoses sont les plus prédominantes, causant ainsi une défaillance dans la production animale et des taux de mortalité élevés. En Algérie, les pertes économiques annuelles causées par ces maladies s'estimeraient à des dizaines de millions de dinars.

Pour confronter à ces problèmes sanitaires, notre pays importe une quantité considérable de médicament vétérinaire pour préserver la santé des animaux producteurs des denrées alimentaires et celle de l'homme comme consommateur principal (MADRP, 2018). En 2018, le marché national du médicament vétérinaire est estimé à 40 millions d'euros. Au sein de ce marché, les agents antimicrobiens, les vaccins et les vitamines occupent une place prédominante (Anonyme, 2018). Parmi les médicaments antimicrobiens disponibles sur ce marché, les molécules antiparasitaires occupent une place considérable (15,3 % des médicaments vétérinaires).

Un antiparasitaire idéal est un médicament à large index thérapeutique, efficace après une dose unique, facile à administrer, peu coûteux et ne laisse pas de résidus (Walter, 2008). La majorité de ses critères sont répondues dans une famille particulière, les endectocides, ensemble de produits agissant à la fois sur les parasites internes (end-) et les parasites externes (-ecto-), qui représente 32% de part de marché local des médicaments vétérinaires antiparasitaires. L'ivermectine (IVM), un dérivé semi-synthétique d'avermectines (AVMs), représente la première molécule endectocide mise sur le marché en 1981 en tant que médicament vétérinaire. Il est depuis devenu l'un des médicaments les plus réussis en raison de son large spectre d'activité contre les nématodes et les ectoparasites, sa forte rémanence et son excellente sécurité chez les vertébrés (Grayson *et al.*, 2017).

Dans le marché national des médicaments à usage vétérinaire, plusieurs formulations médicamenteuses à base d'AVMs ont été homologuées, dont la majorité est représentée par l'IVM. Notre synthèse sur le nombre des génériques d'IVM enregistrés en médecine vétérinaire a fait ressortir 30 formulations utilisées actuellement en Algérie. La disponibilité d'une telle molécule efficace en dose unique et moins toxique, constitue une utilisation aisée pour les éleveurs. Cependant, malgré sa marge de sécurité élevée, l'emploi excessif de l'IVM

peut présenter un risque majeur sur la santé animale et humaine, d'où l'intérêt de choix d'étude de cette molécule.

L'efficacité de l'IVM dans le traitement des parasitoses humaines est attesté par l'attribution du prix Nobel de médecine en 2016 (Laing *et al.*, 2017). L'IVM est bien transporté dans le sang, où elle se lie aux protéines plasmatiques, la plus grande quantité se trouve dans le foie, tandis que la plus faible quantité se trouve dans le cerveau en raison de la restriction par la barrière hémato-encéphalique. L'IVM est métabolisé par le cytochrome P450 dans le foie et excrété presque entièrement dans les selles (Kudzi *et al.*, 2010). Par conséquent, sa persistance sous forme inchangée dans les fèces après traitement a rapidement conduit à des préoccupations sur la faune non ciblée (en particulier les insectes coprophages) qui dépendent de ce milieu et sur l'éventuelle durée prolongée de dégradation de ces fèces.

L'IVM, comme tous les AVMs, interagit avec les canaux chlorures glutamate-dépendants présents dans les cellules nerveuses et musculaires des invertébrés induisant ainsi leurs paralysies (Cully *et al.*, 1994). L'IVM peut interagir avec d'autres canaux chlorures ligand-dépendants à savoir celui-ci faisant intervenir le GABA (acide gamma-amino-butérique). Ce système GABA est présent aussi chez les vertébrés mais uniquement au niveau du système nerveux où il est protégé par la barrière hémato-méningée par l'intermédiaire de la glycoprotéine P (P-gp), cette dernière joue un rôle essentiel dans la protection contre l'accumulation des AVMs dans le cerveau (Mayer, 2000). Des nouvelles recherches indiquent que tous les AVMs sont capables de perturber l'activité du transport par la P-gp, pouvant ainsi causer leurs accumulations dans le système nerveux et bien d'autres tissus (Radi *et al.*, 2020).

Le risque de défaillance des endectocides dans l'avenir prendra pour origine un emploi excessif et/ ou un choix erroné dans les doses ou les voies d'administration utilisées. Ainsi, l'utilisation exagérée des AVMs est associée aux problèmes d'efficacité et de résistance. Dans ce contexte, l'étude de la toxicité des AVMs en appliquant des protocoles spécifiques sur des modèles animaux de laboratoire permet d'apprécier les risques et effets toxiques liés à l'administration excessive de ces médicaments vétérinaires.

L'usage des antioxydants naturels pour améliorer les différentes altérations induites par les xénobiotiques chez les vertébrés devient un domaine d'intérêt de nombreuses recherches récentes. Parmi les antioxydants les plus puissants, la vitamine C (acide ascorbique), vitamine hydrosoluble, qui protège les compartiments cellulaires face aux espèces réactives de

l'oxygène (ERO). C'est l'un des principaux éléments importants du système biologique. Cette vitamine doit être incorporée dans l'alimentation car elle ne peut pas être produite dans les organismes de mammifères.

C'est dans ce contexte, que s'inscrit le présent travail de thèse qui a comme objectifs d'une part de donner un aperçu sur l'effet toxique d'une forte dose d'une formulation médicamenteuse antiparasitaire « l'AVIMEC ® » sur les paramètres biochimiques et histologiques. D'autre part de rechercher l'effet protecteur et amélioratif d'une co-administration d'un antioxydant puissant, l'acide ascorbique, soit par gavage soit supplémenté dans l'alimentation du lapin en se focalisant sur les changements du comportement, l'évolution pondérale, la variation des poids des organes, la consommation d'aliment et l'eau de boisson et l'examen histologique des organes vitaux à savoir le foie, les reins, les poumons et le cerveau suite à une toxicité subaiguë chez le lapin mâle de souche (*Oryctolagus cuniculus*).

Ce manuscrit s'articule en deux grandes parties :

- ❖ Une première partie expose une synthèse des données bibliographiques relatives aux organes étudiés (foie, rein, poumon et cerveau) ; aux médicaments antiparasitaires, et particulièrement les anthelminthiques de la famille des avermectines ; leur impact sur la santé humaine et les différents tests de toxicité. Également, nous présentons l'importance de l'utilisation des antioxydants naturels pour améliorer les effets toxiques liés à l'exposition aux xénobiotiques chez les mammifères, spécifiquement la vitamine C ou acide ascorbique.
- ❖ La seconde partie est initiée par une présentation du dispositif expérimental mis en œuvre dans le cadre de ce projet de thèse et qui concerne l'analyse biochimique et histologique chez le lapin mâle. Cette partie est dédiée à nos travaux de recherche et se présente par une seule expérimentation qui étudie la toxicité subaiguë de l'IVM. Ce chapitre étudie les effets hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques et la toxicité pulmonaire d'un médicament vétérinaire (ivermectine ; AVIMEC®) et l'effet amélioratif de la vitamine C après une toxicité subaiguë de 21 jours chez le lapin mâle (*Oryctolagus cuniculus*).

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

ORGANES CIBLES

&

MARQUEURS

BIOCHIMIQUES DE

L'ETUDE

CHAPITRE 1
ORGANES CIBLES
&
MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE

1. FOIE : ORGANE DE METABOLISATION

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme après la peau, ses fonctions sont à la fois exocrines et endocrines. Par sa fonction exocrine, le foie produit la bile qui est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire avant d'être excrétée dans le duodénum. Les sécrétions biliaires sont responsables de l'émulsification des lipides avant leur absorption intestinale. Par sa fonction endocrine, le foie joue un rôle important dans le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines (König *et al.*, 2007).

1.1. Rappels anatomiques

Chez le lapin, le foie est situé dans la région épigastrique, entre les deux arcades costales, atteignant le niveau de la 7^{ème} côte droite et de la 9^{ème} côte gauche (Stamatova-Yovcheva *et al.*, 2012). Le foie est entouré d'une capsule de tissu conjonctif formé de collagène dense et irrégulier (la capsule de Glisson), les éléments du tissu conjonctif dérivés de la capsule de Glisson pénètrent dans le parenchyme hépatique et subdivisant ce dernier en lobes et lobules (Gartner, 2018). Il s'agit d'un organe polylobé, composé de cinq lobes, à savoir ; le lobe hépatique droit, le lobe caudé, le lobe quadrant et le lobe hépatique gauche qui est séparé en deux parties latérale et médiale (Figure 1).

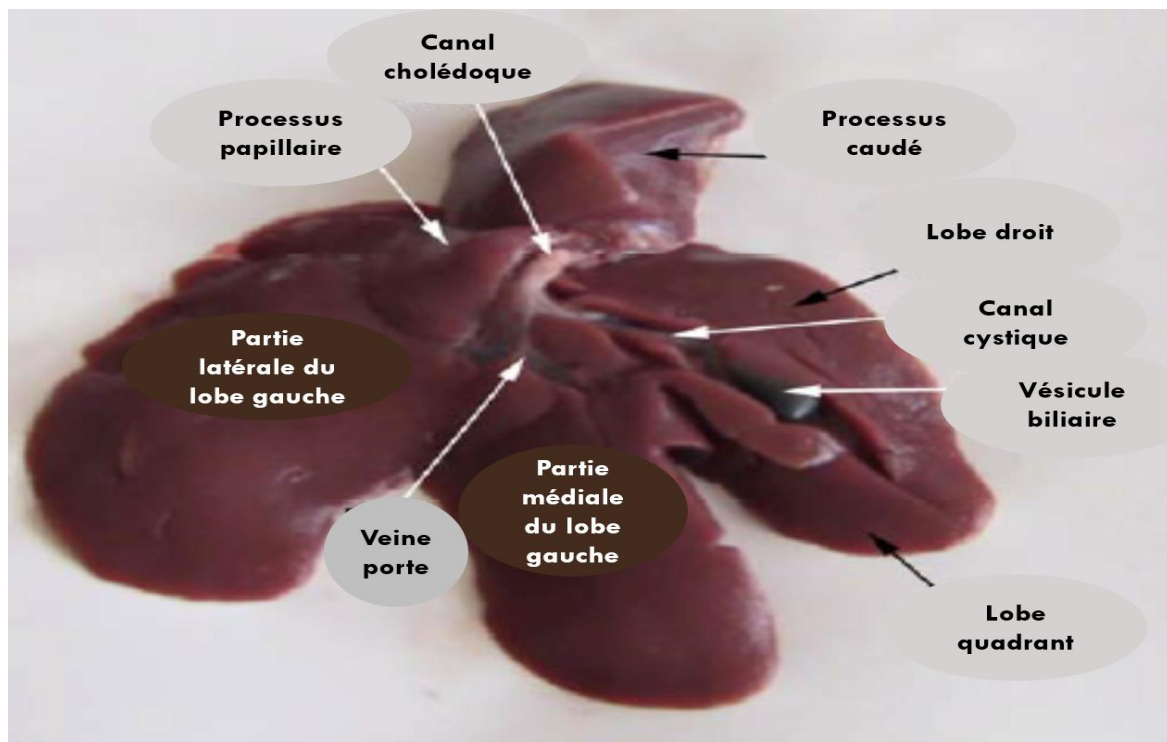


Figure 1 : Foie polylobé chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) (Stamatova-Yovcheva *et al.*, 2012).

1.2. Rappels histologiques

L'unité structurelle et fonctionnelle du foie est le **lobule hépatique**. Au centre de chaque lobule se trouve la **veine centrolobulaire**, à partir de laquelle rayonnent des travées de cellules hépatiques (**hépatocytes**) séparées par de larges canaux vasculaires appelés **sinusoïdes** (Figure 2). Au niveau des angles de chaque lobule, se répartissent les espaces portes où sont groupées les branches de l'**artère hépatique**, de la **veine porte** hépatique, du **canal biliaire** et des **vaisseaux lymphatiques**. Le sang veineux et artériel des espaces portales périphériques se mélange d'abord dans les sinusoïdes hépatiques et s'écoule vers la veine centrolobulaire. De là, le sang pénètre dans la circulation générale par les veines hépatiques qui quittent le foie et pénètrent dans la veine cave inférieure (Eroschenko, 2008).

Les sinusoïdes hépatiques sont des canaux sanguins sinueux et dilatés bordés d'une couche discontinue de cellules endothéliales fenêtrées qui présentent également des fenestrations et une lame basale discontinue. Les sinusoïdes hépatiques sont séparées des hépatocytes sous-jacents par un espace péri-sinusoïdal sous-endothélial (espace de **Disse**). En conséquence, le matériel ingéré transporté dans le sang sinusoïdal a un accès direct à travers la paroi endothéliale discontinue avec les hépatocytes.

En plus des **cellules endothéliales**, les sinusoides hépatiques contiennent également des macrophages, appelés **cellules de Kupffer**, situés du côté luminale des cellules endothéliales ([Eroschenko, 2008](#)). Les cellules de stockage de lipide (**cellules Ito**) sont situées dans l'espace de Disse. Les cellules Ito ont pour rôle le stockage de la vitamine A, mais dans le cas de la cirrhose alcoolique, ces cellules fabriquent également du collagène du type I, responsable de la fibrose hépatique ([Gartner, 2018](#)).

Les hépatocytes sécrètent la bile dans des petits canaux appelés **canalicules biliaires** intercellulaires situés entre les hépatocytes individuels. Les canalicules convergent à la périphérie des lobules hépatiques dans les espaces portes sous forme de canaux biliaires interlobulaires. À l'intérieur des lobules hépatiques, la bile s'écoule dans les canalicules biliaires vers le canal biliaire interlobulaire dans l'espace porte dans le sens inverse du courant sanguin, tandis que le sang s'écoule dans les sinusoides vers la veine centro-lobulaire. En conséquence, la bile et le sang ne se mélangent pas ([Eroschenko, 2008](#)).

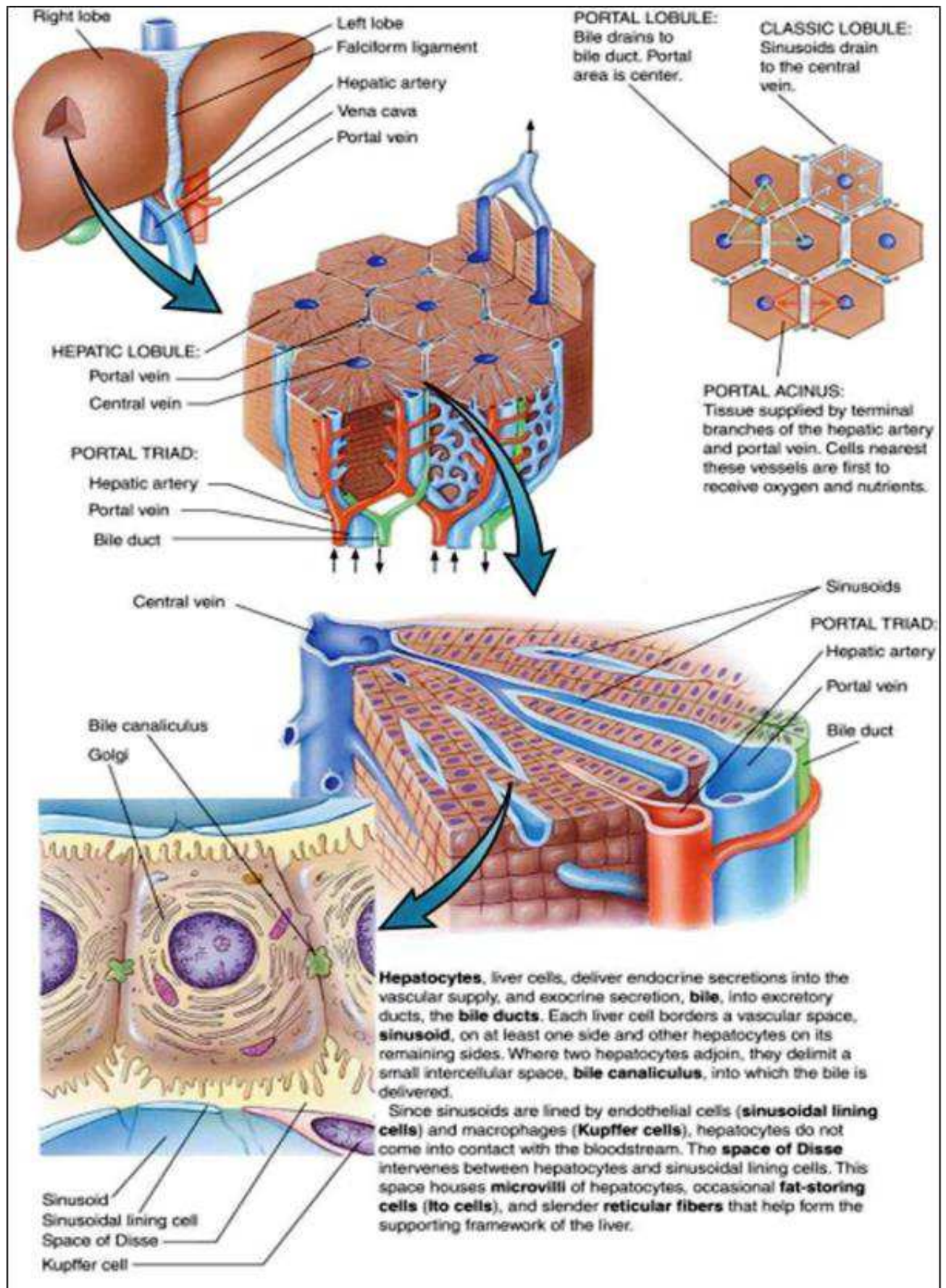


Figure 2 : Schéma représentant la structure et l'histologie du foie (Gartner, 2018).

1.3. Fonctions métaboliques du foie**1.3.1. Fonction exocrine du foie**

Le foie forme environ 1,2 L de bile par jour, qui représente sa sécrétion exocrine (Gartner, 2018). La bile est délivrée dans un système de conduits « canalicules biliaires ; cholangioles ; passage de Hering; canaux biliaires interlobulaires; canaux hépatiques droit et gauche», qui dirigent ensuite la bile dans le canal hépatique commun; et de là, via le canal cystique dans la vésicule biliaire, un organe de stockage associé au foie.

La bile est un liquide vert un peu visqueux composé d'eau, d'ions, de cholestérol, de phospholipides, de glucuronide de bilirubine, d'IgA sécrétoire et d'acides biliaires.

1.3.2. Fonction endocrine du foie

Le foie est l'organe principal de synthèse, de stockage et du métabolisme de nombreux produits (Gartner, 2018) :

- Le foie synthétise et libère de nombreuses protéines plasmatiques et d'autres composants plasmatiques, tels que le fibrinogène, l'urée, l'albumine, la prothrombine, l'angiotensine et les lipoprotéines.
- Il fabrique également des protéines qui régulent le transfert et le métabolisme du fer.
- Il stocke également les lipides et le glucose et, si nécessaire, synthétise le glucose à partir de sources non glucidiques, un processus connu sous le nom de néoglucogenèse.
- Le foie synthétise également les cinq classes de lipoprotéines.
- Le foie est également responsable de la désintoxication de divers médicaments, toxines, sous-produits métaboliques et produits chimiques.

2. REIN : ORGANE D'EPURATION

2.1. Présentation du rein

Le système urinaire se compose de deux reins, deux uretères menant à une seule vessie et d'un seul urètre. Les reins sont en forme d'haricot et situés dans la zone rétro-péritonéale adjacente à la paroi postérieure de l'abdomen. Sur chaque rein se trouve la glande surrénale intégrée dans la graisse rénale et le tissu conjonctif (Eroschenko, 2008). Le rein joue un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme, la formation de l'urine, la régulation de la pression artérielle, l'équilibre acido-basique et la formation et la libération de certaines hormones.

2.2. Rappels anatomiques

Chez les mammifères, le bord médial concave du rein est le hile, qui contient trois grandes structures, l'artère rénale, la veine rénale et le bassinet rénal en forme d'entonnoir. Autour de ces structures se trouve le sinus rénal. Chaque rein est recouvert d'une capsule rénale. Une coupe longitudinale du rein (Figure 3) montre un cortex externe plus sombre et une médulla interne plus claire, qui se compose de nombreuses pyramides rénales (pyramides de Malpighi) en forme de cône.

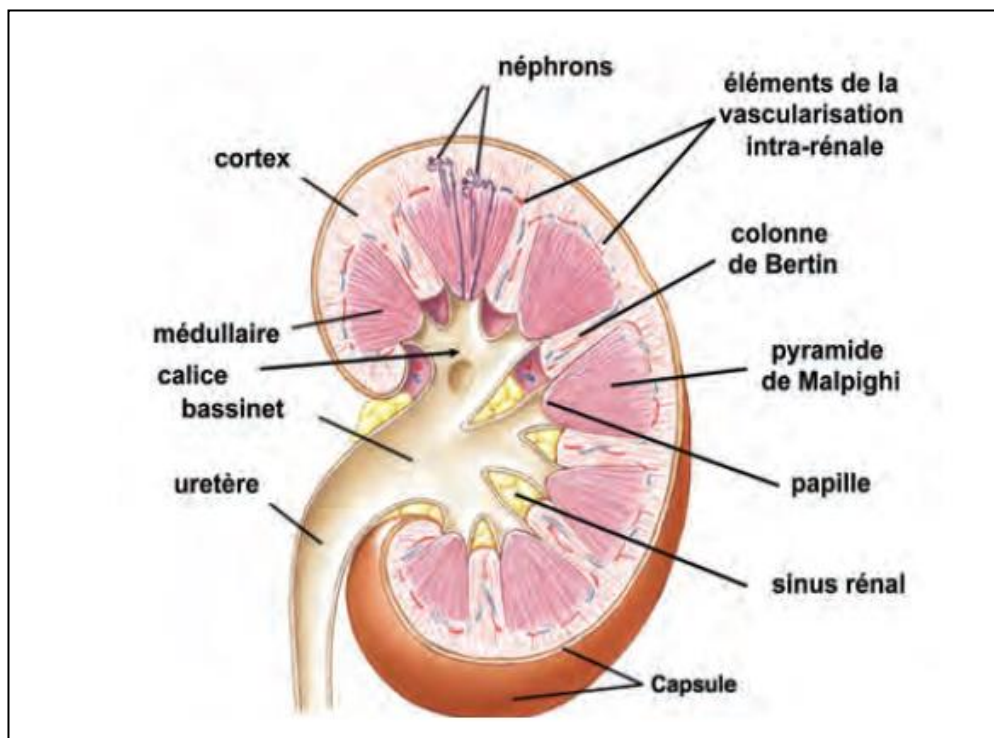


Figure 3 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein chez l'homme (Lacour, 2013).

La base de chaque pyramide fait face au cortex et forme la limite cortico-médullaire. Le sommet rond de chaque pyramide s'étend vers le bas jusqu'au bassinet rénal pour former la papille rénale. Chaque papille rénale est entourée d'un calice mineur en forme d'entonnoir, qui

recueille l'urine de la papille. Les calices mineurs se rejoignent dans le sinus rénal pour former un calice majeur. Les calices majeurs, à leur tour, se rejoignent pour former le bassinet rénal plus grand en forme d'entonnoir. Le bassinet rénal quitte chaque rein à travers le hile, il se rétrécit pour devenir un uretère musculaire et descend vers la vessie de chaque côté de la paroi postérieure de l'abdomen (Eroschenko, 2008).

Le rein des lapins est assez primitif par rapport à celui d'autres mammifères. Cependant, il a fait l'objet de recherches approfondies car ses tubules rénaux peuvent être facilement retirés avec leur membrane basale intacte, ce qui facilite l'étude rénale (Dimitrov *et al.*, 2012).

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron constitué d'un corpuscule rénal et d'un long tubule rénal coudé (Figure 4). Le rein humain contient environ un million de néphron (Wheater *et al.*, 2001). Le corpuscule rénal est composé d'un glomérule rénal entouré d'une capsule de Bowman. Le tubule est divisé par un étranglement ou anse de Henlé en deux parties, le tubule contourné proximal faisant suite aux cellules pariétales du glomérule et le tubule contourné distal qui s'abouche dans un canal collecteur. Les canaux collecteurs aboutissent dans le bassinet rénal (Eroschenko, 2008).

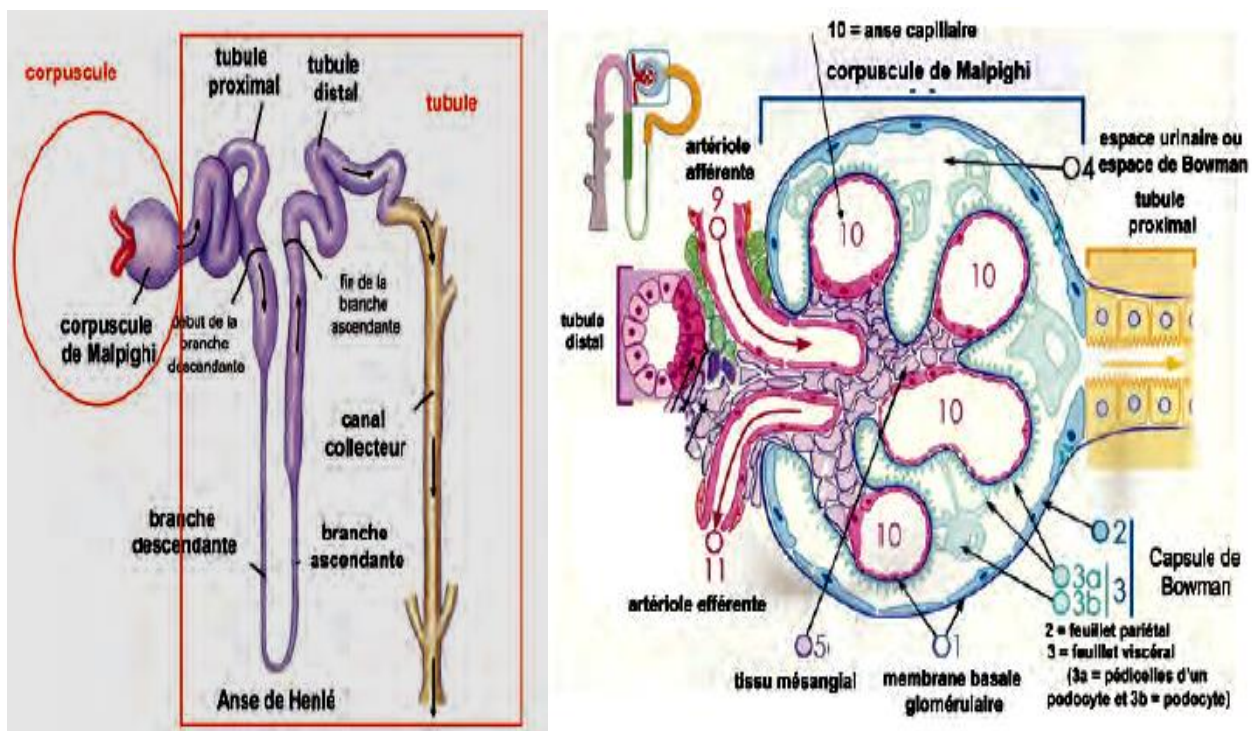


Figure 4 : Schéma de la structure d'un néphron avec une coupe du corpuscule rénal (Lacour, 2013).

2.3. Rappels histologiques

Le rein est subdivisé en un cortex externe de coloration plus sombre et d'une médulla interne de coloration plus claire (**Figure 5**). Le cortex rénal est recouvert d'une capsule rénale constituée d'un tissu conjonctif dense et irrégulier (1).

Le cortex rénal contient des tubules contournés distaux et proximaux (4, 11), des glomérules (2) et des rayons médullaires (3). Les artères interlobulaires (12) et les veines interlobulaires (13) sont également présentes dans ce cortex. Les rayons médullaires (3) sont formés par les portions droites de néphrons, les vaisseaux sanguins, et les tubules collecteurs qui se rejoignent dans la médulla pour former les plus grands canaux collecteurs (6). Les rayons médullaires ne s'étendent pas jusqu'à la capsule rénale (1) à cause des tubules contournés sous capsulaires (10).

La médulla comprend les pyramides de Malpighi. La base de chaque pyramide (5) est adjacente au cortex et son sommet forme la papille rénale pointue (7) qui fait saillie le petit calice (16), ce dernier représente la partie dilatée de l'uretère. La zone cribrosa (9) est percée de petits trous, qui représentent les ouvertures des tubes collecteurs (6) dans le petit calice (16).

La pointe de la papille rénale (7) est généralement recouverte d'un simple épithélium cylindrique (8). Lorsque l'épithélium cylindrique de la papille rénale (7) se réfléchit sur la paroi externe du calice mineur (16), il devient un épithélium de transition (16). Une fine couche de tissu conjonctif et de muscle lisse (non illustré) sous cet épithélium se confond alors avec le tissu conjonctif du sinus rénal (15).

Les branches de l'artère et de la veine rénales appelées artères interlobaires (17) et veines interlobaires (18) sont présentes dans le sinus rénal (15). Les vaisseaux interlobaires (17, 18) pénètrent dans le rein et se cambrent au-dessus de la base de la pyramide (5) à la jonction cortico-médullaire en tant qu'artère et veine arquées (14). Les vaisseaux arqués (14) donnent naissance à des artères interlobulaires plus petites (12) et des veines interlobulaires (13) qui passent radialement dans le cortex rénal et donnent naissance aux artères glomérulaires afférentes qui donnent naissance aux capillaires des glomérules (3).

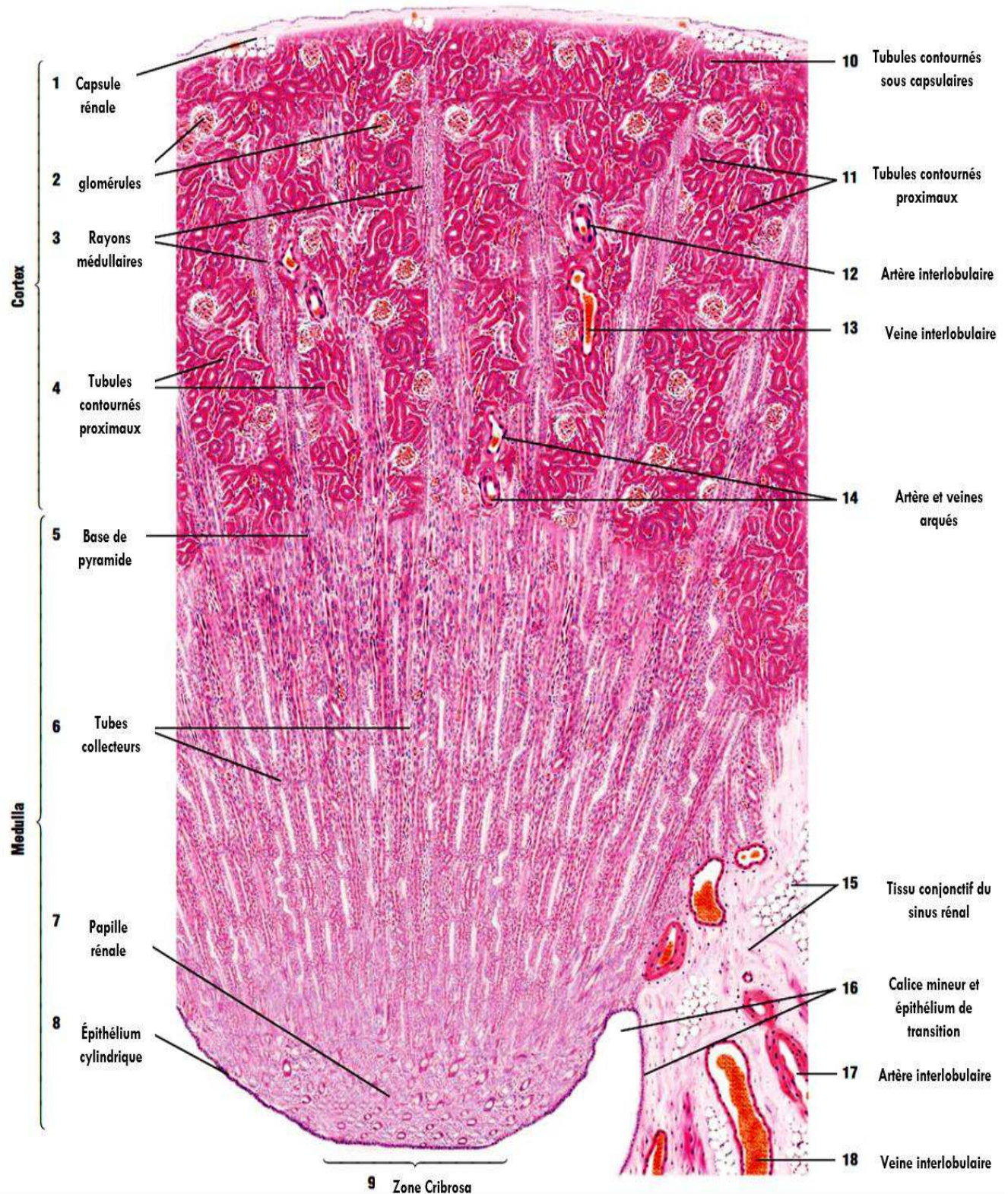


Figure 5 : Schéma d'une coupe histologique du rein (cortex et medulla). Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).

2.4. Fonctions physiologiques du rein

Les reins sont des organes vitaux qui maintiennent l'homéostasie de l'organisme vivant. Cette fonction est réalisée en régulant la pression artérielle, la composition sanguine, le pH, le volume des fluides et l'équilibre acido-basique dans l'organisme. Les reins produisent également de l'urine, qui se fait en trois étapes principales : la filtration glomérulaire du sang, la réabsorption des nutriments et autres substances du filtrat qui pénètre dans les tubules contournés proximaux et distaux, et la sécrétion ou excrétion des déchets métaboliques, des produits chimiques indésirables ou des substances du filtrat. Environ 99% du filtrat glomérulaire produit par les reins est réabsorbé au niveau tubulaire vers le sang; le 1% restant pénètre dans la vessie pour être évacué sous forme d'urine.

De plus, les cellules rénales produisent deux substances importantes, une enzyme « rénine » et une hormone glycoprotéine « l'érythropoïétine ». La rénine régule la pression artérielle pour maintenir une pression de filtration adéquate dans les glomérules rénaux. L'érythropoïétine, que l'on pense être produite et libérée par les cellules endothéliales du réseau capillaire péri-tubulaire, stimule la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse rouge ([Eroschenko, 2008](#)).

2.4.1. Fonction de détoxification rénale

Le rein est un organe cible majeur de la toxicité induite par les xénobiotiques, en raison de ses fonctions de filtration, de transport, de réabsorption et de métabolisme des produits chimiques. Le rein purifie l'organisme de ses déchets endogènes (produits de dégradation métaboliques: urée, ammoniac, etc.) ou exogènes en détoxifiant et en éliminant les xénobiotiques (toxines, médicaments, pesticides, etc.) ([khaldoun-Oularbi, 2015](#)).

3. POUMON

3.1. Présentation du poumon

Le système respiratoire représente le lieu privilégié des échanges avec le milieu extérieur, dans lequel on peut distinguer les voies aériennes de conduction (nez, pharynx, larynx, trachée et bronches) et les voies aériennes inférieures (la partie respiratoire proprement dite) (**Figure 6**), qui forment la plus grande surface des échanges gazeux (majeure partie des poumons : bronchioles, canaux alvéolaires et alvéoles). Toutes ces parties de l'appareil respiratoires sont en continuité (**Raoul, 2005**).

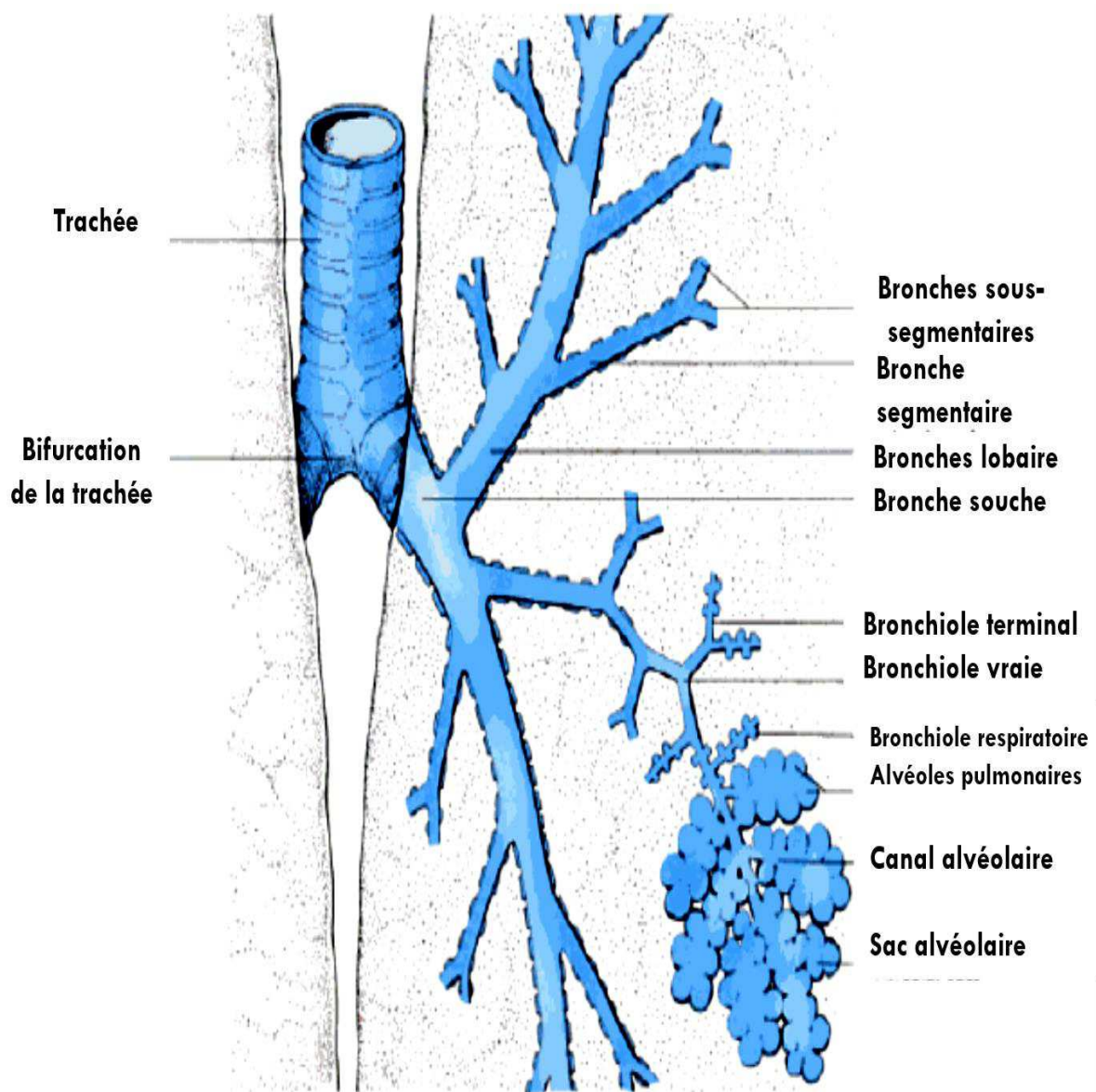


Figure 6 : Schéma représentant les voies aériennes inférieures du système respiratoire (**König et al., 2007**).

3.2. Rappels anatomiques

Chez le lapin, les deux poumons reposent sur le diaphragme, un muscle situé à la limite inférieure du thorax. Chaque poumon est enveloppé par une membrane séreuse composée de deux couches séparées par la cavité pleurale. Le poumon droit est plus volumineux que le poumon gauche, car l'apex et les ventricles du cœur sont dirigés vers la gauche. Les poumons sont divisés en lobes qui sont libres dans la cavité thoracique et ils sont rattachés au diaphragme par le ligament pulmonaire, aux différents vaisseaux sanguins, à la trachée et aux bronches (**Figure 7**). La position haute du cœur dans le médiastin entraîne une réduction des lobes pulmonaires supérieurs chez le lapin.

Les lapins ont une plèvre très fine et, contrairement aux autres mammifères domestiques, il n'y a pas de cloisons divisant le poumon en lobules ([Ringler et Newcomer, 2014](#)).

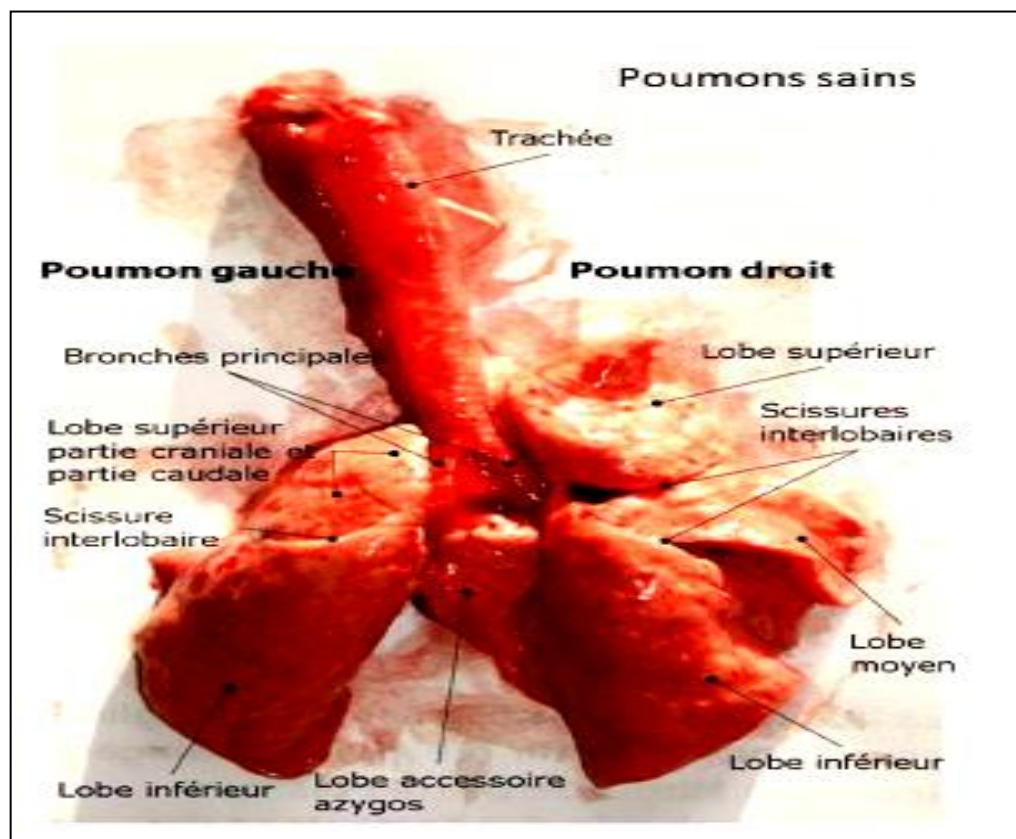


Figure 7 : Anatomie des poumons chez le lapin ([Van Praag, 2014](#)).

3.3. Rappels histologiques

La **Figure 8** montre les principales structures pulmonaires pour la conduction aérienne et les échanges gazeux (respiration) :

La paroi d'une bronche intrapulmonaire (5) est identifiée par les plaques environnantes de cartilage hyalin (7). La bronche (5) est également tapissée d'épithélium cilié cylindrique pseudostratifié. La paroi de la bronche intrapulmonaire (5) est constituée d'une fine lamina propria (4), d'une fine couche de muscle lisse (3), d'une sous-muqueuse (2) avec des glandes bronchiques (6), de plaques de cartilage hyalin (7) et de l'adventice (1).

Dans la bronchiole (17), la lumière est tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudostratifié. La lumière montre aussi des plis muqueux (18) provoqués par les contractions de la couche environnante de muscle lisse (19). Les glandes bronchiques et les plaques cartilagineuses ne sont plus présentes et la bronchiole (17) est entourée par l'adventice (16). Dans cette illustration, un nodule lymphatique (15) et une veine (15) adjacente à l'adventice (16) accompagnent la bronchiole (17). Les bronchioles terminales (8, 10) présentent des plis muqueux (10) et sont bordées par un épithélium cilié cylindrique dépourvu de cellules caliciformes. Ces bronchioles sont entourées par une fine couche de lamina propria, un muscle lisse (11) et une adventice.

Les bronchioles respiratoires (12, 22) sont directement reliées aux canaux alvéolaires (13, 20) et aux alvéoles (23). Les bronchioles respiratoires (12, 22) sont constituées d'un épithélium cuboïde et cilié dans leur partie proximale. Ces bronchioles sont entourées d'une fine couche de tissu conjonctif soutenant le muscle lisse, des fibres élastiques de la lamina propria et des vaisseaux sanguins (21). Les alvéoles (12) des parois des bronchioles respiratoires (12, 22) se présentent sous forme de petites évaginations ou out-pockets.

Chaque bronchiole respiratoire (12, 22) se divise en plusieurs canaux alvéolaires (13, 20). Les parois de ces canaux sont garnies d'alvéoles (23) qui débouchent directement dans le canal alvéolaire. Les amas d'alvéoles (23) qui entourent et s'ouvrent dans les canaux alvéolaires (13, 20) sont appelés sacs alvéolaires (24).

La veine (9) et l'artère pulmonaire (9) accompagnent les bronches et les bronchioles dans le poumon. Des petits vaisseaux sanguins sont également observés dans les trabécules du tissu conjonctif (25) qui sépare les poumons en différents segments.

Les poumons sont entourés d'une séreuse (14) ou plèvre viscérale. Cette plèvre (14) se compose d'une fine couche de tissu conjonctif pleural (14a) et d'une simple couche squameuse de mésothélium pleural (14b).

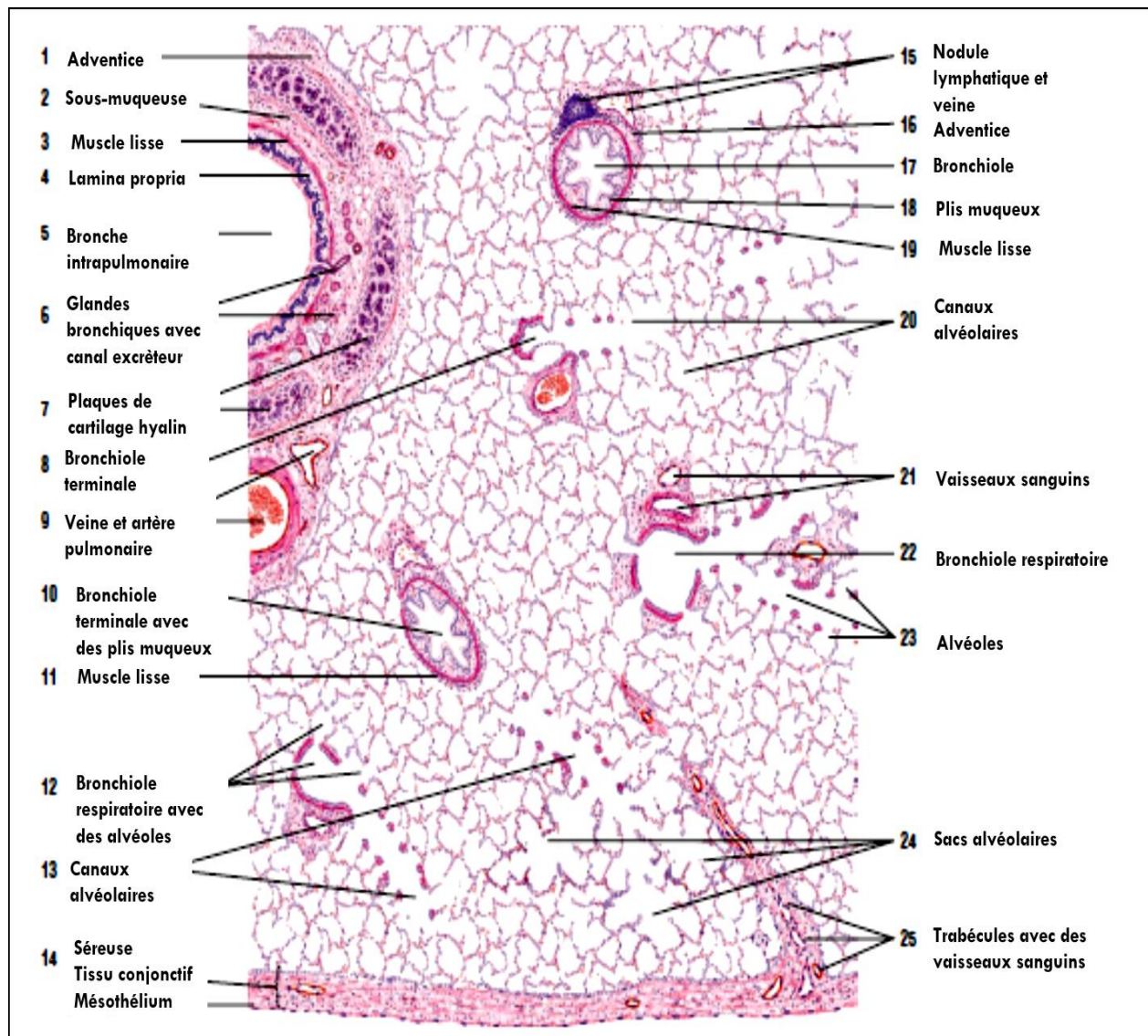


Figure 8 : Schéma d'une coupe histologique de poumon. Hématoxyline-éosine, faible grossissement (Eroschenko, 2008).

3.4. Fonctions physiologiques du poumon

La principale fonction des poumons est la *respiration*. Cependant, les poumons remplissent d'autres fonctions métaboliques. Ils transforment par exemple l'angiotensine I en angiotensine II et éliminent certaines molécules (comme la sérotonine) du compartiment sanguin. La circulation pulmonaire joue en outre un rôle de tampon pour le volume sanguin et intercepte les petits caillots dans le sang veineux avant que ceux-ci ne causent des dégâts dans les voies artérielles (cœur, cerveau) (Silbernagl *et al.*, 2001).

4. Système nerveux central (SNC)

Le système nerveux des mammifères est divisé en deux parties principales : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC se compose du cerveau et de la moelle épinière. Les composants du SNP, les nerfs crâniens et rachidiens, sont situés à l'extérieur du SNC (Eroschenko, 2008).

Le SNC est protégé par un boîtier osseux, constitué du crâne et de la colonne vertébrale, ainsi que par les méninges, une gaine de tissu conjonctif à trois couches (Gartner, 2018) :

- La méninge la plus externe est la dure-mère fibreuse épaisse.
- L'arachnoïde, une gaine de tissu conjonctif non vasculaire, se trouve profondément dans la dure-mère.
- La pie-mère, une gaine vasculaire la plus interne, est le revêtement le plus intime du SNC.
- Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est situé entre l'arachnoïde et la pie-mère.

4.1. Structure générale du cerveau

Le cerveau est divisé en deux parties : l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche. 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 neurogenèse 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.

4.2. Anatomie et histologie du cortex cérébral

Les différents types de cellules qui constituent la matière grise du cortex cérébral sont répartis en six couches, avec un ou plusieurs types de cellules prédominant dans chaque couche. Les axones horizontaux et radiaux associés aux cellules neuronales dans les différentes couches donnent au cortex cérébral un aspect stratifié. Les différentes couches sont marquées avec des chiffres romains sur le côté droit de la **Figure 9**.

La couche la plus superficielle du cortex est la couche moléculaire (I), cette couche est recouverte par la pie-mère (1). La partie périphérique de la couche moléculaire (I) est composée principalement par des cellules neurogliales (2) et des cellules horizontales de *Cajal*. La couche granulaire externe (II) contient principalement différents types de cellules neurogliales et des cellules pyramidales de petite taille (3). Les dendrites apicales des cellules pyramidales (4, 7) sont dirigées vers la périphérie du cortex, tandis que leurs axones s'étendent à partir de leurs bases cellulaires.

La couche pyramidale externe (III) est composée principalement par les cellules pyramidales de taille moyenne (5). La couche granulaire interne (IV) est une couche mince et contient principalement de petites cellules granulaires (6), des cellules pyramidales et différentes cellules neurogliales qui forment des connexions complexes avec les cellules pyramidales. La couche pyramidale interne (V) contient de nombreuses cellules neurogliales et des cellules pyramidales de grande taille (8), en particulier dans la zone motrice du cortex cérébral. La couche la plus profonde est la couche multiforme (VI). Cette couche est adjacente à la substance blanche (10) du cortex cérébral. La couche multiforme (VI) contient des cellules mélangées de différentes formes et tailles, telles que les cellules fusiformes, les cellules granulaires, les cellules étoilées et les cellules de Martinotti. Des paquets d'axones (9) entrent et sortent de la substance blanche (10).

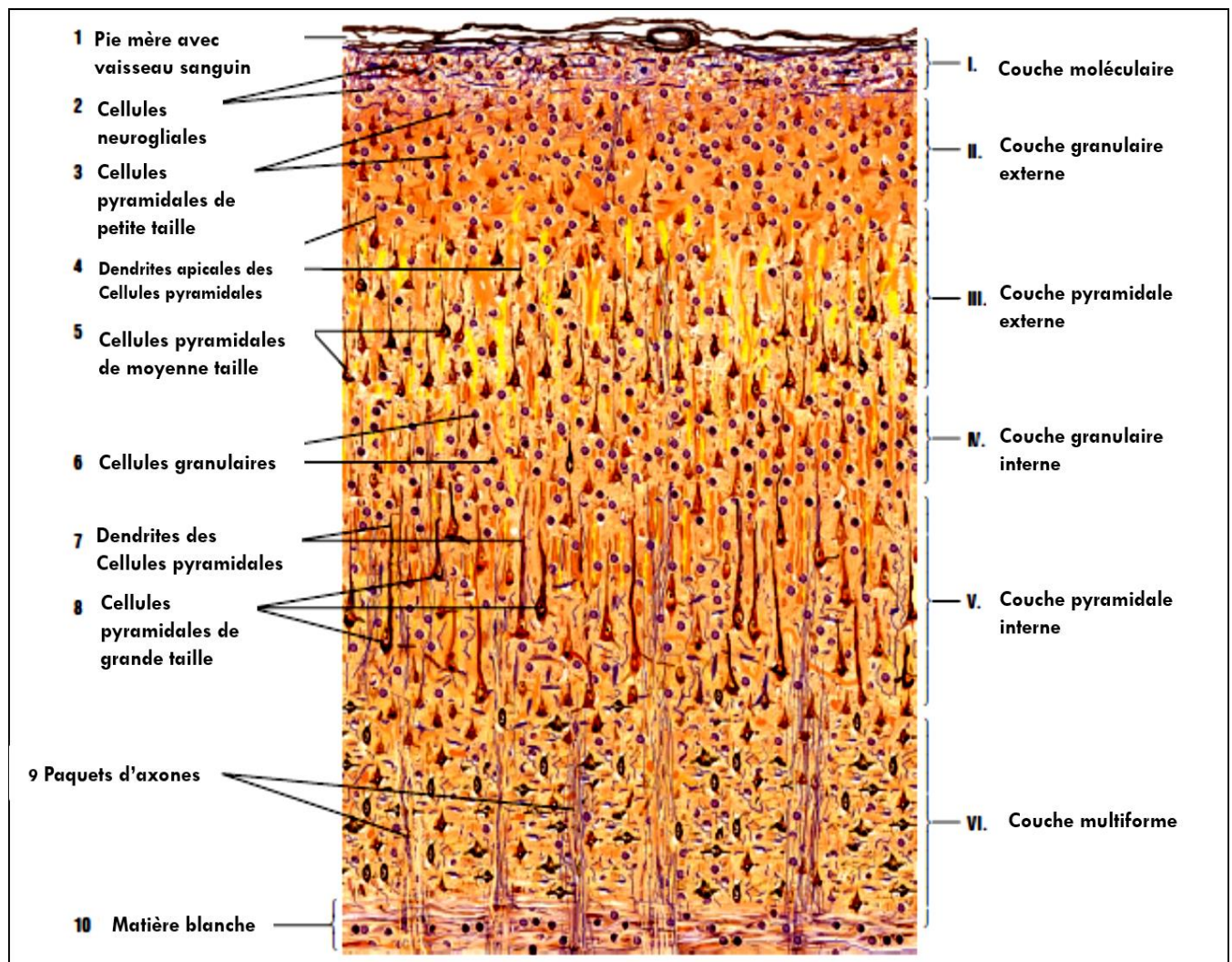


Figure 9 : Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise). Imprégnation argentique, faible grossissement (Eroschenko, 2008).

4.3. Anatomie et histologie de l'hippocampe

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite formation allongée, 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 limbique. 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 d'U inversé, le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA), subdivisée-elle même en quatre régions (CA1, CA2, CA3 et CA4) (**Figure 10**).

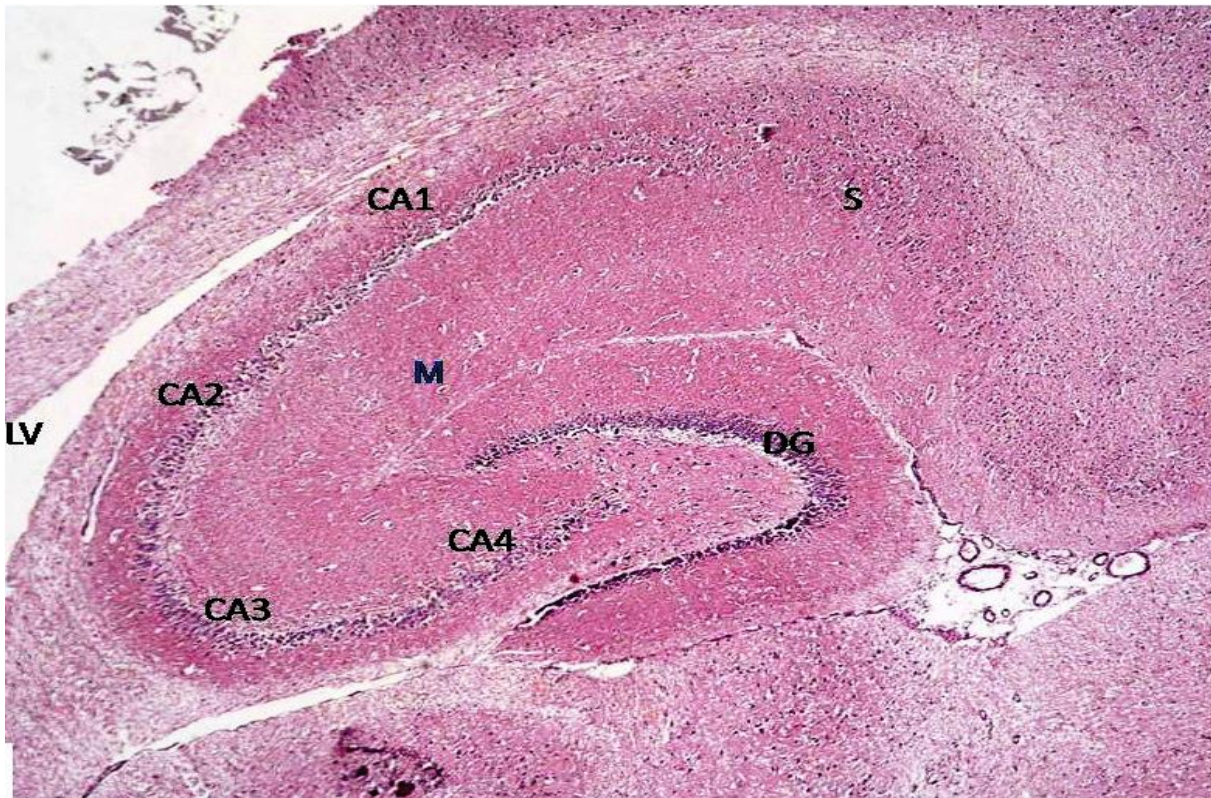


Figure 10 : Coupe histologique de l'hippocampe chez le rat. Hémalun-éosine, Gx40 ([Amin et al., 2013](#)).

CA1, CA2, CA3 & CA4 : les quatre régions de corne d'ammon, DG : gyrus denté
S : subiculum, LV : ventricule latéral, M : couche moléculaire.

5. MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE L'ETUDE**5.1. Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique**

Pour évaluer l'état du foie, un examen complet doit être mis en place, il comporte des tests biochimiques (enzymatiques et protéines plasmatiques) et histologiques ([Rajender et Faust, 2006](#)). Les paramètres biochimiques et fonctionnels utilisés dans l'évaluation de la fonction hépatique sont :

ALAT : Alanine Amino-Transférase, est une enzyme produite par les hépatocytes. Le taux plasmatique d'ALAT augmente lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus supérieur qu'à la normale. Les élévations sont souvent exprimées en nombre de fois la normale.

ASAT : Aspartate Amino-Transférase, est une autre enzyme liée aux cellules parenchymateuses du foie. Son taux est élevé lors des hépatites aiguës, mais elle est présente également dans les hématies ainsi que dans les muscles cardiaques et squelettiques ; ce qui diminue sa spécificité au foie.

γ -GT : Gamma glutamyltranspeptidase, est une enzyme spécifique du foie, et représente un biomarqueur plus sensible, pour les troubles cholestatiques. Les taux de cette enzyme peuvent être élevés, même légèrement, suite à un dysfonctionnement hépatique sub-clinique.

Glycémie : La propriété glucogénique du foie est habituellement la dernière fonction qui pourrait être perdue suite à un dysfonctionnement hépatique ([Djerrou, 2011](#)).

5.2. Marqueurs biochimiques de la fonction rénale

Les anomalies touchant le rein peuvent entraîner des atteintes spécifiques de la fonction glomérulaire et rarement de la fonction tubulaire. La fonction principale de glomérule est de filtrer l'eau et les composés de faible poids moléculaire du sang. Tandis que les molécules de hauts poids moléculaires sont retenues ([Marshall et al., 2005](#)).

Actuellement, les concentrations plasmiqes d'urée et de créatinine sont les marqueurs les plus utilisés pour déterminer l'état de la fonction glomérulaire du rein, malgré leur faible sensibilité et de spécificité ([Omshi et al., 2018](#)).

5.3. Marqueurs biochimiques du bilan lipidique

Les principaux lipides du plasma sont : les acides gras, les triglycérides (TG), le cholestérol et les phospholipides. Des concentrations plasmatiques élevées en lipides, particulièrement en cholestérol, sont associées par un lien de causalité à la pathogenèse de l'athérosclérose qui est responsable de la plupart des maladies cardiovasculaires (MCV ; maladies coronariennes, cérébrovasculaires et vasculaire périphériques) (Marshall *et al.*, 2005).

➤ Structure des lipoprotéines

Les lipides sont des molécules insolubles dans les compartiments biologiques aqueux, ils sont transportés à travers les différents milieux extracellulaires de l'organisme par l'intermédiaire des complexes solubles comportant une partie protéique et lipidique : les lipoprotéines.

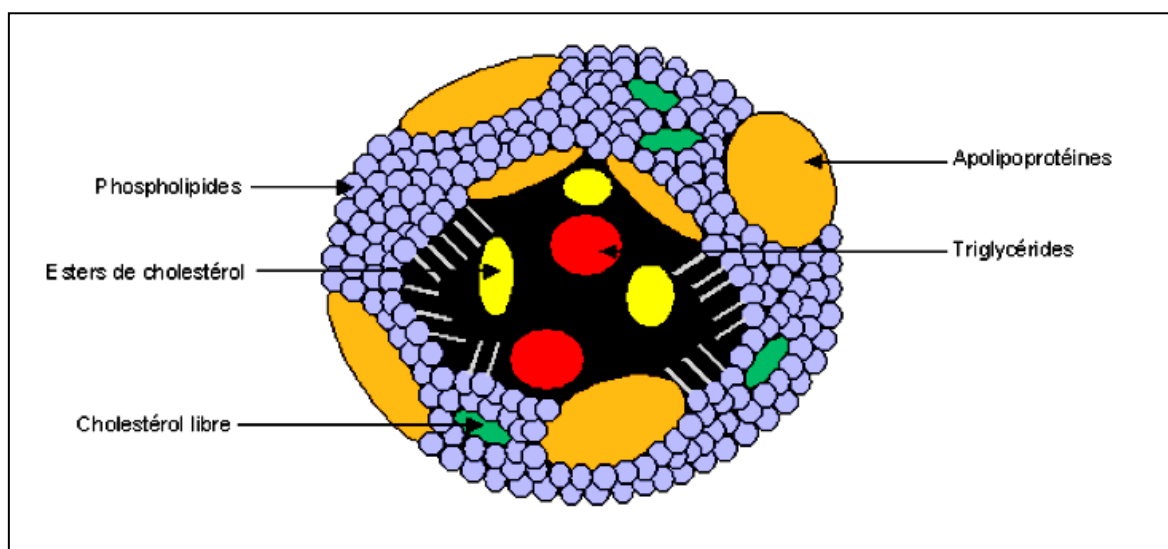


Figure 11 : Représentation de la composition d'une lipoprotéine (Heuillet, 2013).

La structure de ses lipoprotéines est sphérique dans laquelle le noyau est constitué de lipides (TG et esters de cholestérol) entourée par une couche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 11).

➤ Classification et composition des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité, leur taille et leur composition en cinq types (Heuillet, 2013). Leur densité augmente des chylomicrons (la plus basse densité ; CM) en passant par les lipoprotéines de très basse densité (very low density lipoprotein ; VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (intermediate density

lipoprotein ; IDL) et de basse densité (low density lipoprotein ; LDL), jusqu'aux lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein ; HDL) (**Figure 12**).

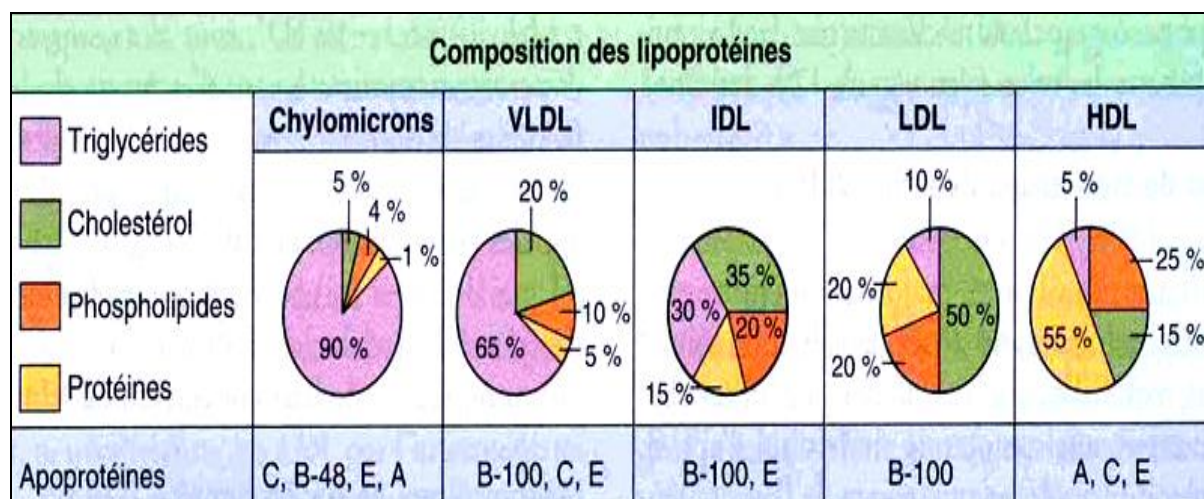


Figure 12 : Composition des lipoprotéines ([Marshall et al., 2005](#)).

➤ Métabolisme des lipoprotéines

Lorsqu'on considère le métabolisme des lipoprotéines, il est classique de différencier trois voies de transport des lipides. La première est la voie entéro-hépatique, qui concerne le transport et la distribution des lipides absorbés par l'intestin via les CM, vers le foie et les tissus périphériques. La deuxième voie est celle du transport centrifuge des lipides via la cascade VLDL-IDL-LDL, du foie vers les tissus périphériques. Enfin, la troisième voie est celle du transport reverse qui correspond au retour du cholestérol en excès, via les HDL, des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé dans la bile et les fèces (**Figure 13**).

➤ Biomarqueurs du bilan lipidique

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les MCV représentent la principale cause de décès dans le monde, ce qui représente 30% de tous ces décès ([Martínez-Fernández et al., 2015](#)). La dyslipidémie, y compris un taux sérique élevé du cholestérol total (CT) et/ou de cholestérol des LDL (LDL-C) et/ou un taux sérique bas de cholestérol des HDL (HDL-C), est un facteur de risque majeur d'athérosclérose. En plus de l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie (un taux élevé de TG) peut être un autre biomarqueur de MCV ([Króliczewska et al., 2018](#)).

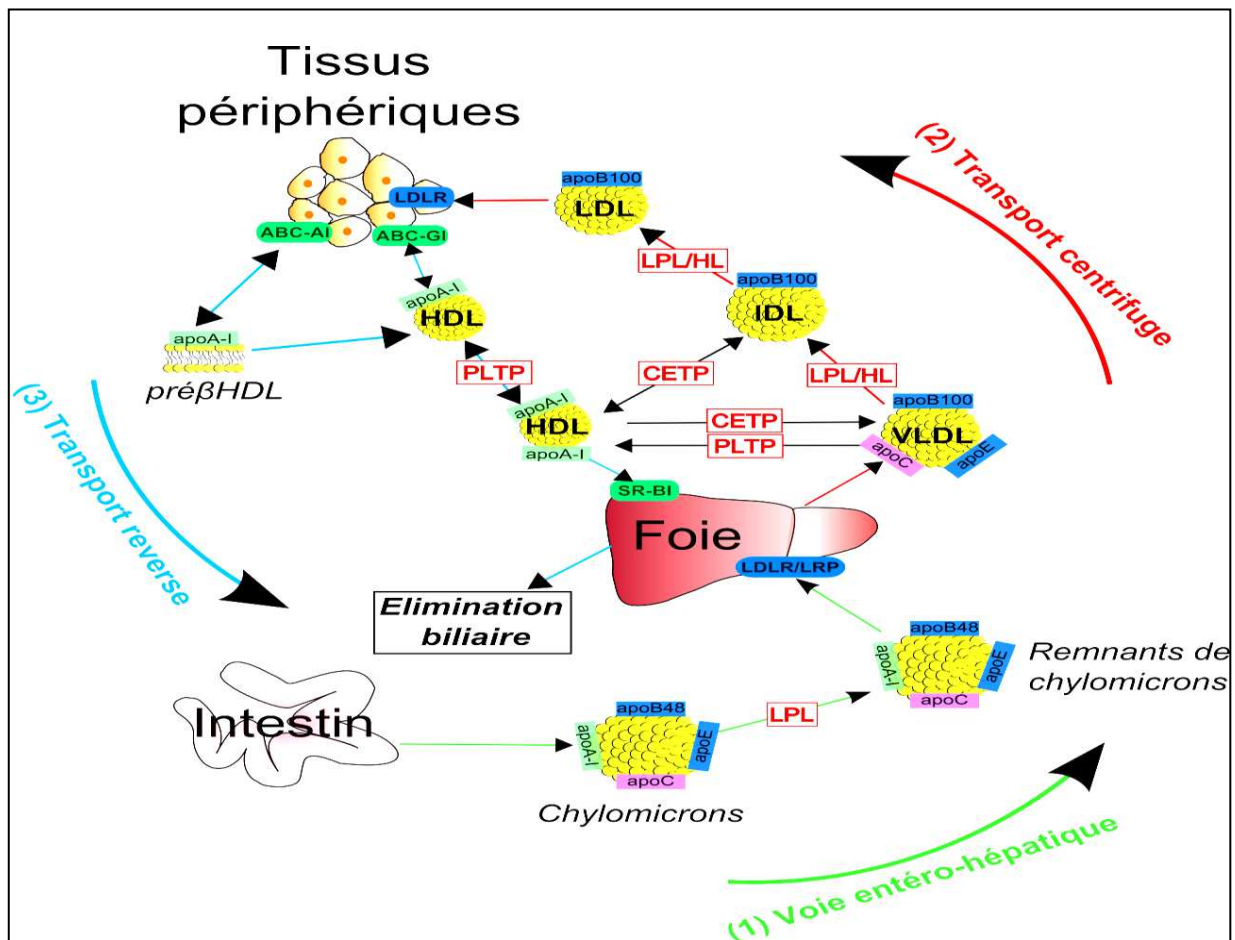


Figure 13 : Métabolisme des lipoprotéines (Heuillet, 2013).

- (1) Le cholestérol et les acides gras alimentaires absorbés sont incorporés dans les CM. La lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les TG des CM. Les remnants de CM formés sont captés par le foie.
- (2) Le cholestérol est apporté aux tissus périphériques via la voie de transport centrifuge. Les hépatocytes synthétisent puis sécrètent les VLDL riches en TG. La LPL et la HL hydrolysent une partie des TG contenues dans les VLDL les transformant en IDL puis LDL. Les VLDL, IDL et LDL sont reconnues grâce l'interaction entre l'apoB100 (LDL) ou l'apoE (VLDL/IDL) et les récepteurs de la famille LDLR des cellules périphériques.
- (3) Le cholestérol excédentaire présent dans les tissus périphériques est transporté vers le foie via la voie de transport reverse du cholestérol. Les pré-βHDL (ou HDL naissantes) interagissent avec les récepteurs ABC-A1 et ABC-G1 de la famille ATP-binding cassette puis se chargent en cholestérol. Les HDL subissent alors un remodelage par la PLTP et la CETP avant d'être captées par le foie via le récepteur SR-BI de la famille des scavenger receptors.

CHAPITRE 2
MEDICAMENTS
ANTIPARASITAIRES
& IVERMECTINE

CHAPITRE 2

MEDICAMENTS ANTIPARASITAIRES & IVERMECTINE

Généralités

Les antiparasitaires sont des médicaments qui réduisent la charge parasitaire à un niveau tolérable en tuant les parasites ou en inhibant leur croissance. L'antiparasitaire idéal a un large index thérapeutique (c.-à-d. Que la dose toxique est au moins trois fois la dose thérapeutique), il est efficace après une dose unique, facile à administrer, peu coûteux et ne laisse pas de résidus (une considération importante aux animaux de rente) (Walter, 2008).

En 2009, Les antiparasitaires, toutes espèces confondues, représentent le segment le plus important (28%) du marché mondial des médicaments vétérinaires (Figure 14).

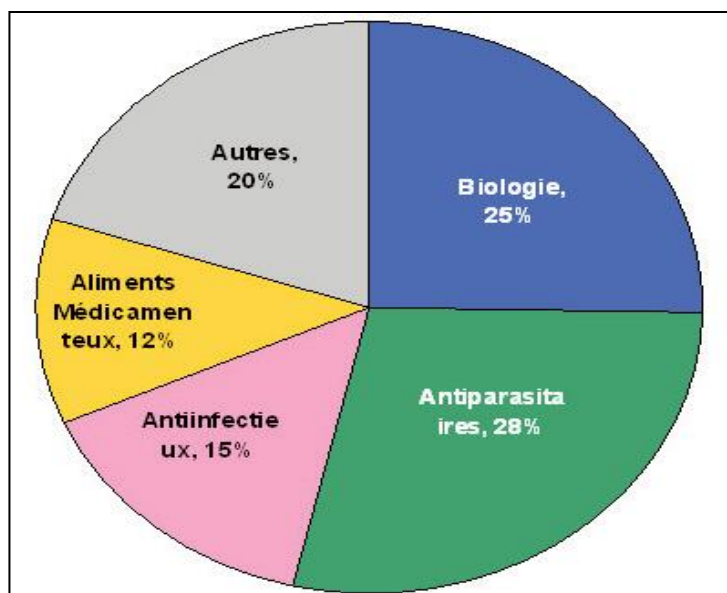


Figure 14 : Structure du marché mondial du médicament vétérinaire en 2009, en fonction des produits (Crosia, 2011).

Cette utilisation accrue des médicaments antiparasitaires constitue un risque majeur pour la santé animale et humaine. Ce risque est une conséquence d'une accumulation des résidus dans les différentes matrices biologiques, d'une résistance parasitaire possible liée à l'utilisation fréquente et anarchique de ces produits et/ou d'une toxicité élevée pour l'environnement.

Actuellement, l'utilisation des médicaments à large spectre et la thérapie combinée sont très utiles pour augmenter l'efficacité des antiparasitaires. Parmi ces produits, on

distingue une famille thérapeutique très efficace à faible dose et de faible toxicité, les lactones macrocycliques.

1. Lactones macrocycliques et Avermectines

1.1. Lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques (LMs) représentent une famille des médicaments antiparasitaires largement utilisés pour la lutte contre plusieurs parasites. Ils sont caractérisés par une marge de sécurité élevée. Les LMs sont des produits endectocides (activité contre les parasites internes et externes), qui sont utilisés pour la première fois en médecine vétérinaire. Ils ont d'abord été introduits comme agents anthelminthiques et sont actifs contre un large éventail de nématodes.

Cependant, ils sont également actifs contre un certain nombre d'arthropodes parasites des bovins et des ovins. Leur utilisation a été plus tard élargie à la thérapeutique humaine. Ils peuvent être administrés par voie orale, par injection sous-cutanée ou sous forme des formulations pour-on pour application topique (Marrs, 2012).

1.1.1. Classification

Les LMs sont des produits de fermentation d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. Les espèces *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces cyaneogriseus* produisent de nombreux composés au cours de leur croissance, qui se divisent en deux familles (Figure 15) : les avermectines et les milbémycines (Kiki-Mvouaka et al., 2010).

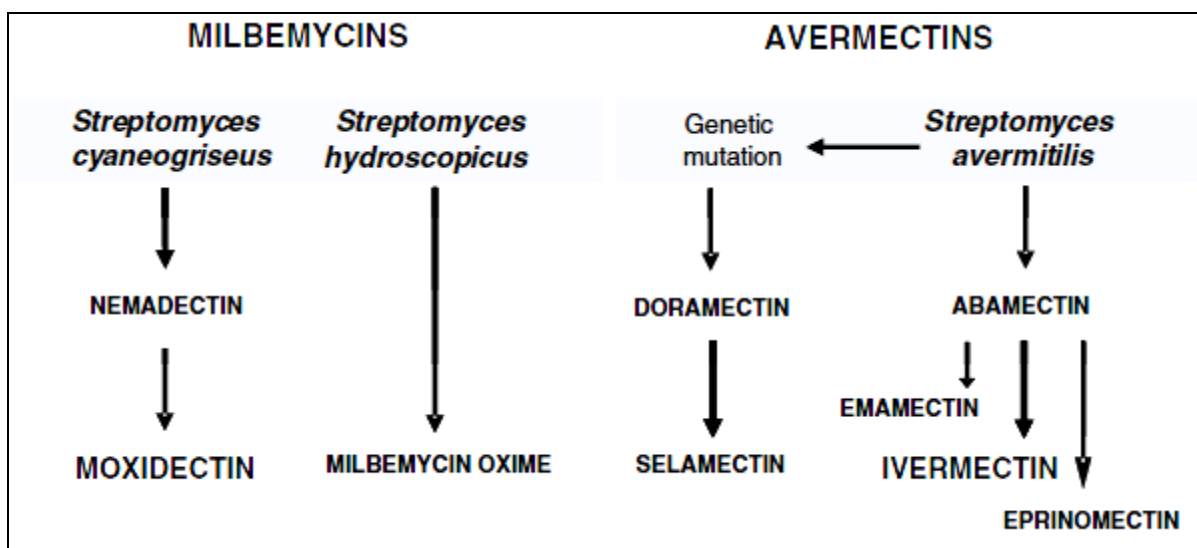


Figure 15 : Filiations schématiques des lactones macrocycliques : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques (Pitchard et al., 2012).

2. Avermectines

2.1. Propriétés générales

Le terme avermectines (AVMs) signifie : *a* : anti, *verm* : ver, *ect* : ectoparasites et *in* : produit pharmaceutique. L'innovation découle de la capacité des composés de cette famille à traiter et a éliminé les endoparasites et ectoparasites (Burg *et al.*, 1979 ; McKellar et Benchaoui, 1996).

Les AVMs sont une classe de substances antiparasitaires (anthelminthiques) utilisées à grande échelle pour lutter contre les ectoparasites et les endoparasites chez l'homme, les animaux de rente, les animaux domestiques, ainsi que les ectoparasites chez les poissons d'aquaculture. La puissance et l'efficacité des AVMs pour lutter contre une grande variété de parasites les ont propulsées au premier rang des anthelminthiques.

Les AVMs se produisent naturellement en tant que produit de fermentation de *Streptomyces avermitilis*, un actinomycète isolé du sol. Huit structures différentes ont été isolées et divisées en quatre composés majeurs (A1a, A2a, B1a et B2a) et quatre composés mineurs (A1b, A2b, B1b et B2b) (Shoop *et al.*, 1995).

Ce groupe d'AVMs comprend principalement l'abamectine et le benzoate d'émamectine, qui sont utilisés comme insecticides, et l'ivermectine (IVM), qui est largement utilisé comme un médicament antiparasitaire en médecine vétérinaire et humaine (Krieger, 2010).

2.2. Dérivés des avermectines

La famille des AVMs comporte 6 molécules : l'abamectine, l'émamectine, l'IVM, la doramectine, l'eprinomectine et la selamectine. Le mélange d'ivermectine B1a (> 90 %) et d'ivermectine B1b (< 10 %) constitue l'abamectine. L'IVM, qui est la molécule star de cette famille, est une molécule semi-synthétique. La doramectine, l'eprinomectine et la selamectine sont trois molécules biosynthétiques (Albérich, 2014).

3. Médicament ciblé par l'étude « Ivermectine »

L'IVM est commercialisée pour la première fois pour l'usage animal en 1981 par les laboratoires MERIAL sous la forme d'IVOMEC Bovin®. Puis elle obtient son autorisation de mise sur le marché (AMM) en médecine humaine en 1999 sous forme de comprimés STROMEKTOL® par les laboratoires MSD (Carrere, 2016).

3.1. Structure chimique

Les avermectines sont produites sous forme d'un mélange de 8 composés : A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a et B2b (Figure 16) où :

A : groupe méthoxy en 5 (CH₃)

B : groupe hydroxy en 5 (OH)

- 1 : double liaison entre 22 et 23

- 2 : pas de double liaison entre 22 et 23 et un OH en 23

- a : une chaîne secondaire butyle en 25

- b : une chaîne isopropyle en 25

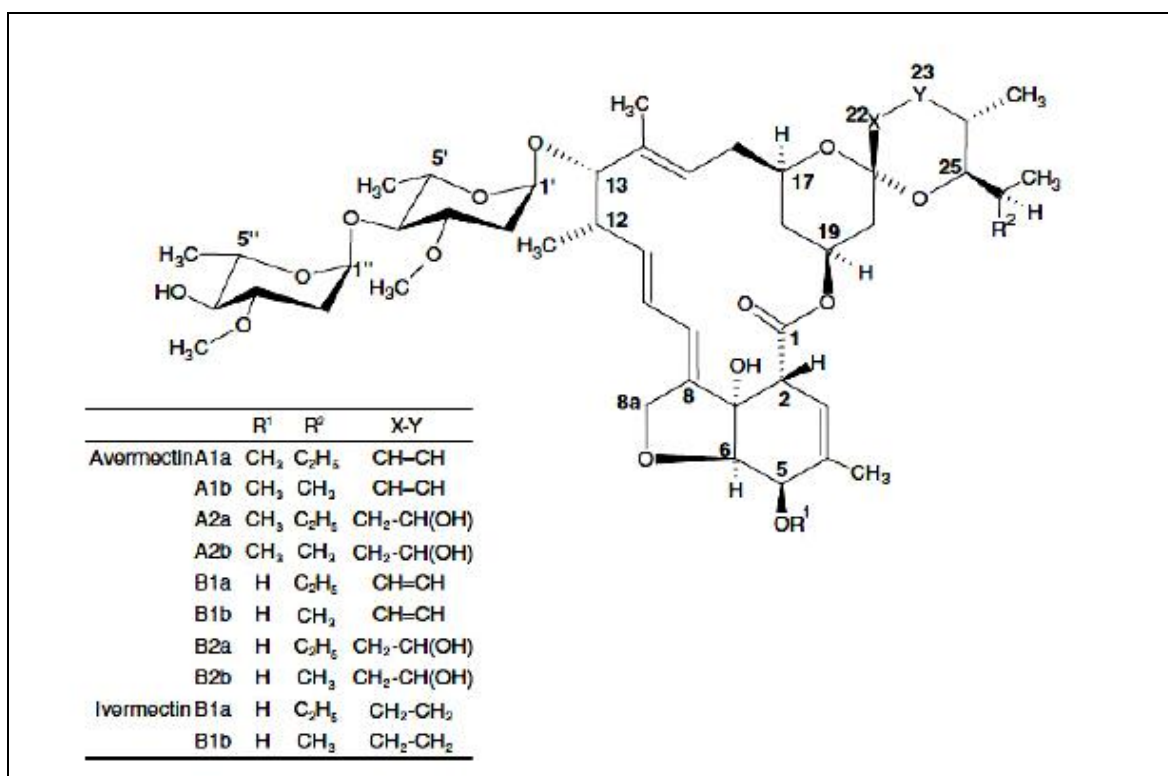


Figure 16 : structure chimique des avermectines (Fischer et Mrozik, 2012).

L'IVM a été obtenue par hydrogénation sélective de la double liaison C 22-23, d'où son nom chimique : 22,23-dihydro-avermectine B1 (Figure 17). Elle est précisément formée de deux composés homologues et contient au moins 80% de 22,23- dihydro-avermectine B1a

et plus de 20% de 22,23-dihydro-avermectine B1b. ces deux composés sont inséparables et possèdent une activité quasi identique.

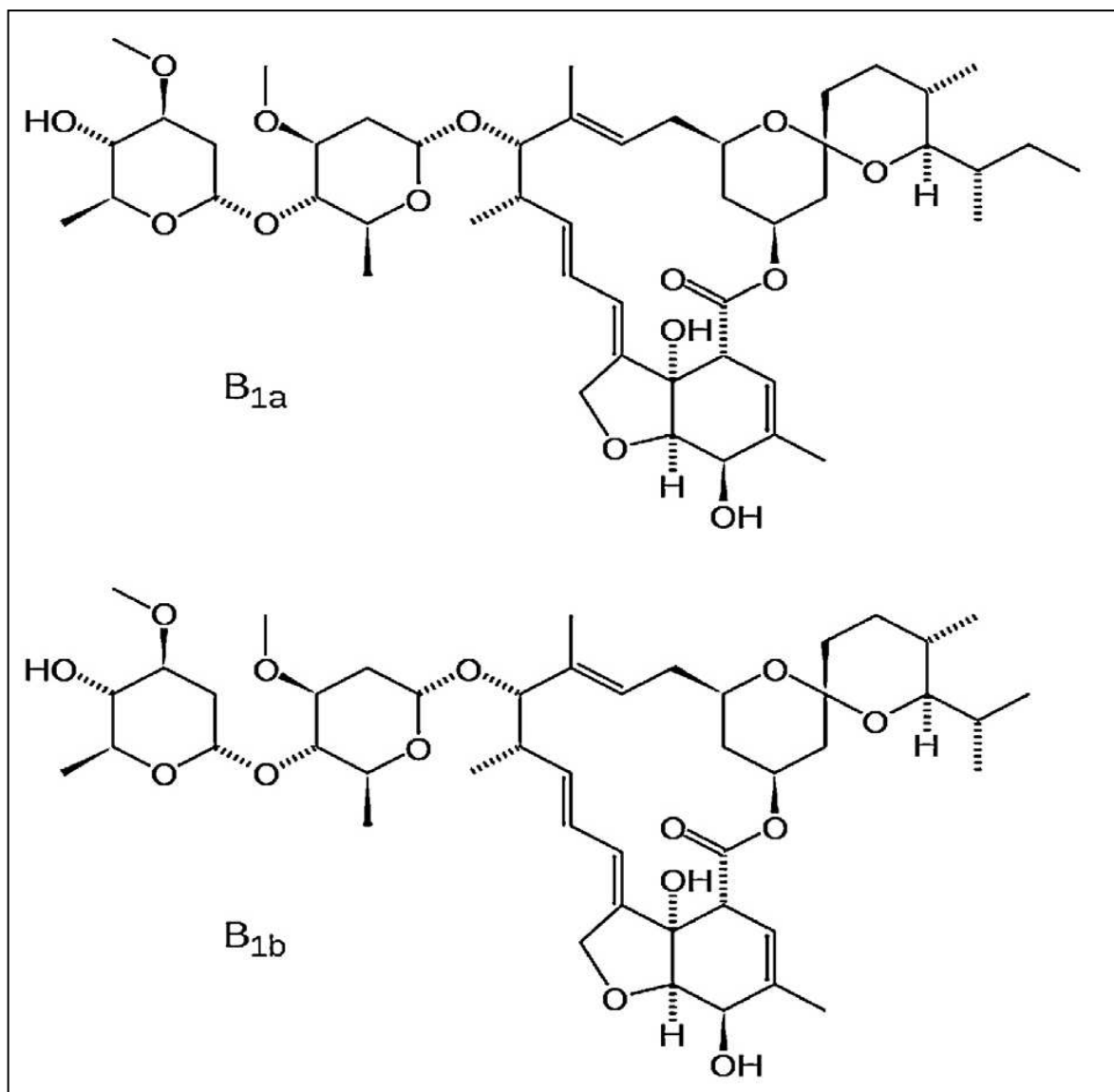


Figure 17 : Structure chimique de l'ivermectine (Bruyère *et al.*, 2013).

3.2. Propriétés physico-chimiques

À l'état pur, l'IVM se présente sous forme d'une poudre cristalline, non hygroscopique, de couleur blanche-jaune (Pharmacopée Européenne, 1996).

C'est un produit lipophile insoluble dans l'eau mais soluble dans la plupart des solvants organiques comme le méthanol et l'éthanol à 95°. Sa masse molaire est de 875,10 g/mol et son point de fusion se situe autour de 150°C. Elle est dégradée par la lumière solaire, une exposition aux ultra-violets isomérisse les doubles liaisons (Gonzalez-Canga *et al.*, 2009).

3.3. Propriétés Pharmacologiques

3.3.1. Mécanisme d'action

L'IVM possède une activité neurotoxique sur les différents parasites internes et externes. Après pénétration dans l'organisme, l'IVM se fixe sur la sous-unité α des canaux chlorure glutamate-dépendants des cellules nerveuses et musculaires du parasite. Ceci entraîne une ouverture de ces canaux, ils deviennent perméables aux ions chlorures entraînant une hyperpolarisation, une paralysie musculaire flasque et un blocage de la transmission nerveuse (**Figure 18**).

Alors que les canaux chlorure glutamate-dépendants semblent être la cible principale, l'IVM interagit également avec d'autres canaux chlorure ligand-dépendants, tels que les canaux d'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Contrairement aux canaux chlorure glutamate-dépendants, les canaux GABA sont présents dans le SNC des vertébrés mais l'affinité de l'IVM pour les sites de liaison chez les invertébrés est environ 100 fois supérieure à celle observée chez les vertébrés. De plus, Ainsi, les vertébrés sont protégés des effets neurotoxiques de l'IVM par la barrière hémato-encéphalique, qui est médiée par la P glycoprotéine (P-gp). Cette barrière explique la grande marge de sécurité (ou index thérapeutique) de l'IVM chez animaux vertébrés ([Grayson et al., 2017](#)).

La P-gp est un transporteur d'efflux-ATP dépendant et qui a été initialement découvert par sa capacité à conférer une résistance à plusieurs médicaments dans les cellules tumorales des mammifères ([Juliano et Ling, 1976](#)). Elle est codé par le gène de résistance multiple aux médicaments ou Multi Drug Resistance (MDR1).

La P-gp est fortement exprimée au niveau de la barrière hémato-encéphalique où elle limite l'entrée de nombreux médicaments et xénobiotiques dans le SNC. De plus, la P-gp protège l'organisme en limitant l'absorption de ces composés par le tractus gastro-intestinal et en favorisant leur excrétion dans le foie, les reins et l'intestin ([Fromm, 2000](#)).

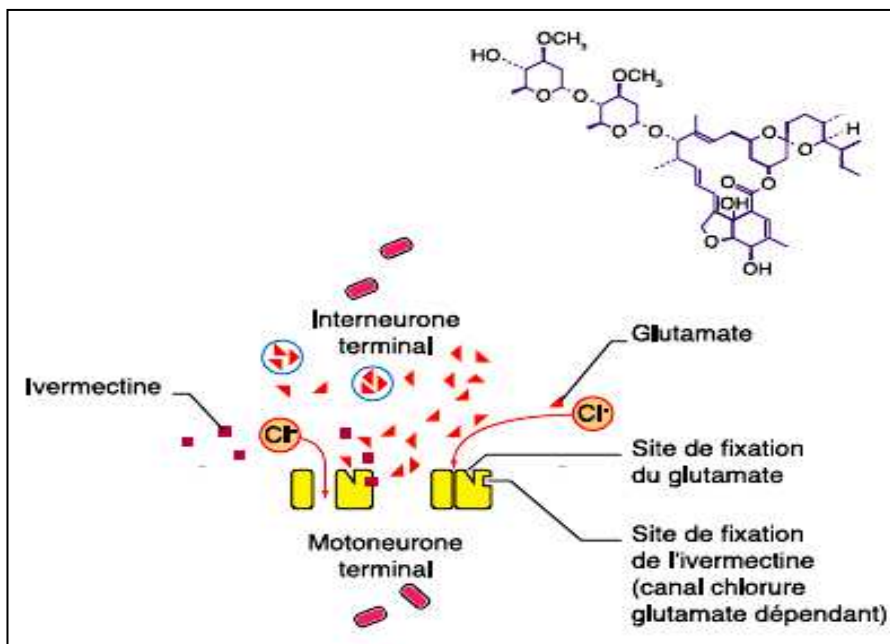


Figure 18 : Schéma représentant le mécanisme d'action de l'IVM sur les canaux chlorures glutamate-dépendants chez les invertébrés (Bruyère *et al.*, 2013).

3.3.2. Effets pharmacologiques

L'IVM est utilisée dans une large variété d'animaux pour lutter contre les parasites internes et externes. Elle est utilisée à différentes doses comme traitement préventif du ver cardiaque, traitement des ectoparasites et microfilaricide (Papich, 2015).

En médecine humaine, l'IVM a été très efficace dans le traitement de l'onchocercose (Crump et Omura, 2011), la strongyloïdose, la gale, la gnathostomiase, la pédiculose, la myiase, la leishmaniose (Dos Santos *et al.*, 2009; Geary, 2005), des poux de tête des enfants et de la gale (Bockarie *et al.*, 2000), elle s'est également avérée efficace contre le paludisme et son vecteur (Azevedo *et al.*, 2019 ; Mekuriaw *et al.*, 2019) et la rosacée papulopustuleuse (De Ménonville *et al.*, 2017).

De plus, l'utilisation de l'IVM dans un modèle de souris était associée à une diminution de la consommation d'alcool (Yardley *et al.*, 2012). L'activité anticancéreuse et antivirale de l'IVM sont bien connues. Ainsi, récemment, l'IVM s'est avérée avoir un effet anticancéreux sur le cancer du côlon humain et le carcinome du poumon (Diao *et al.*, 2019). Compte tenu de la pandémie généralisée de **COVID-19** causée par le coronavirus 2 (SARS-CoV-2), les chercheurs s'efforcent constamment de trouver un médicament approprié pour traiter cette maladie. Gonçalves *et al.* (2020) a conclu à partir de l'examen de nombreux travaux réalisés que l'IVM est capable d'inhiber la réplication virale du SRAS-CoV-2 (Caly *et al.*, 2020).

3.3.3. Formes galéniques

Il existe un grand degré de flexibilité dans la formulation de l'ivermectine. Par exemple, l'IVM est disponible sous forme de comprimé à usage humain (Mectizan®) ou de produit à croquer pour les chiens (par exemple, Heartgard®). De solution orale pour l'homme (Stromectol®) et de trempage pour les petits ruminants (par exemple, Ivomec® Drench). De solution injectable (par exemple, Ivomec® Injection pour bovins et porcs), y compris les formulations injectables à action prolongée disponibles dans certains marchés (par exemple, Ivomec Gold®). De forme pour-on (Ivomec® Pour-on) et de forme bolus à action prolongée pour le bétail et de pâtes pour les chevaux (par exemple, Eqvalan®) (Prichard *et al.*, 2012).

3.3.4. Les génériques de l'ivermectine homologués dans le marché national des médicaments vétérinaires

En Algérie, plusieurs génériques ont été utilisés en médecine vétérinaire pour le traitement et la prévention des maladies parasitaires causées par des endo ou ectoparasites (Tableau 1, Synthèse originale).

Tableau 1 : liste des différentes formulations d'IVM à usage vétérinaire enregistrées en Algérie (MADRP, 2018)

Nom commercial	Forme pharmaceutique	Présentation	Laboratoire
ALVOMECH F	Solution injectable	Flacons de 20ml, 50 ml et 100 ml	AAHP
ALVOMECH 1%	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	AAHP
IVEEN	Solution injectable	Flacons de 50 ml et 100 ml	ADWIA
IVOSPEIN 1%	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	ASPI
AVIMECH	Solution injectable	Flacons de 10ml, 50 ml, 100 ml, 20 ml et 250 ml	AVICO
AVIMECH LIQUID	Solution orale	Flacon de 500 ml. Flacon de 1 litre.	AVICO
BAYMECH 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 200 ml Boîte d'un flacon de 50 ml	BAYER
BIMECTIN injection	Solution injectable	Flacons de 50ml, 100 ml et 250 ml	BIMEDA
IVERTIN	Solution injectable	Flacons de 50 ml et 100 ml	CALIER
IVERMECTINE 1 % EAF	Solution injectable	Flacon de 50 ml Flacon de 200 ml Flacon de 250 ml	CEVA
IVODAD 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml flacon de 100 ml	DADVET
IVERIPRA-I	Solution injectable	Flacons de 50ml et 500 ml	HIPRA
PANDEX 1%	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml Boîte d'un flacon de 10 ml	HUVEPHARM A
PROMECHTINE	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml Boîte d'un flacon de 100 ml Boîte d'un flacon de 250 ml Boîte d'un flacon de 500 ml	INVESA
EQVALAN PÂTE	Pâte orale	seringue de 6,42 g de pâte	MERIAL
IVOMECH injectable	Solution injectable	Flacons de 50ml, 100 ml et 250 ml	MERIAL
IVOMECH liquide	Solution orale	Bidon de 1L et de 5L	MERIAL
IVERMIC	Solution injectable	Flacons de 50 ml, 100 ml et 250 ml	MICROSULES URUGUAY
IVERMIC 3,15% Prémium	Solution injectable	Flacon de 50 ml	MICROSULES URUGUAY
TECTIN	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 100 ml Boîte d'un flacon de 50 ml	MOBEDCO
NOROMECHTIN MULTI INJECTION	Solution injectable	Boîte d'un flacon de 50 ml	NORBROOK
NOROMECHTIN DRENCH	Solution buvable	Jerricans de 1L, 2,5 L, et 5L	NORBROOK
ZOOMECHTIN	Solution injectable	Flacons de 10 ml, 50 ml et 100 ml	SYVA

Nom commercial	Forme pharmaceutique	Présentation	Laboratoire
ZOOMECTIN	Solution buvable	Flacon en polypropylène de 250 ml, flacon en polypropylène de 10 ml, flacon en polypropylène de 50 ml et flacon en polypropylène de 100 ml.	SYVA
FRONTEIRA	Solution injectable	Flacon de 10 ml , flacon de 25 ml , falcon de 50 ml ,flacon de 100 ml , flacon de 250 ml , flacon de 500 ml	VABRIELLA
IVORAL	Solution orale	Flacon de 500 ml Flacon de 1 litre	VETOPHARM PRO
IVECTIN1%	Solution injectable	Flacon de 50 ml Flacon de 200 ml	VETOPHARM PRO
BIOMECTIN 1%	Solution injectable	Boite d'un flacon de 50 ml	VETOQUINOL
VIRBAMEC	Solution injectable	Flacons de 10 ml, 50 ml et 200 ml	VIRBAC
VIRBAMEC pour-on	Solution pour-on	Flacon de 500 ml + doseur Flacon de 1 litre + doseur Flacon de 2,5 litres + bec Flacon de 5 litres + bec	VIRBAC

(Tableau 1). Suite

3.4. Propriétés Pharmacocinétiques

La pharmacocinétique permet d'étudier le devenir d'un médicament à partir de son site d'administration à son site d'élimination dans l'organisme. Il en existe une très grande variabilité entre les espèces et les individus d'une même espèce en fonction notamment de l'âge et de l'état général ([Gonzalez-Canga et al., 2009](#)).

3.4.1. Absorption et la distribution

La pharmacocinétique de l'IVM est conditionnée par ses caractères physico-chimiques tels que la polarité et le caractère lipophile. Puisque l'IVM est un médicament lipophile, elle est caractérisée par une bonne absorption, une forte distribution et une longue rémanence dans l'organisme ([Hennessy et Alvinerie, 2002](#)).

La voie d'administration et la forme pharmaceutique de l'IVM influencent son absorption. Beaucoup d'études mettent en évidence une meilleure biodisponibilité des LMs lorsqu'elles sont administrées par voies sous-cutanées ([Gonzalez-Canga et al., 2009](#)).

La biodisponibilité de l'IVM augmente de façon proportionnelle à la dose administrée. Une concentration plasmatique maximale survient 6 à 12 heures après administration de la dose initiale, suggérant un recyclage entérohépatique. La liaison aux protéines plasmatiques

est de 93%, principalement à l'albumine (Klotz *et al.*, 1990). Puisqu'il s'agit d'un médicament hautement lipophile, l'IVM est largement distribuée dans tout le corps, y compris le tissu adipeux et la peau. Comme prévu, les taux les plus élevés ont été trouvés dans le tissu adipeux et une faible accumulation dans le cerveau en raison de l'action du transporteur d'efflux, P-gp, dans la barrière hémato-encéphalique (Edwards, 2003). Le volume de distribution dans le compartiment central a été mesuré à 3,5 l/kg après une administration orale de 12 mg d'IVM (Krishna et Klotz, 1993).

3.4.2. Métabolisme

On observe un métabolisme principalement hépatique par le cytochrome P450 3A4 en une dizaine de métabolites. Une augmentation secondaire des concentrations plasmatiques, 6 à 12 heures après la prise orale, est possible suite au cycle entéro-hépatique. La demi-vie plasmatique est très variable entre 12 et 24 heures pour l'IVM et jusqu'à 3 jours pour ses métabolites (Canga *et al.*, 2009).

3.4.3. Elimination

La demi-vie d'élimination des métabolites de l'IVM est plus longue que celle de la molécule mère, à environ 3 jours. Moins de 1% du médicament est excrété dans l'urine sous forme de 3'-O-déméthyl-22, 23-dihydroavermectine B1a et 23-dihydroavermectine B1a. Le reste est excrété sous forme de métabolites dans les fèces, principalement sous forme de dérivés monosaccharidiques (Gonzalez-Canga *et al.*, 2009).

3.5. Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : rôle majeur de détoxification

Les xénobiotiques sont des molécules de basse masse moléculaire étrangère à l'organisme. Il s'agit par exemple des médicaments, des polluants de l'eau ou de l'atmosphère, des additifs alimentaires mais également de certains composés naturels des aliments (Beaune et Loriot, 2000).

La membrane cellulaire représente une barrière efficace protégeant la cellule envers les molécules toxiques et des xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, les molécules liposolubles ayant la capacité de franchir facilement la membrane, le cas de l'IVM, peuvent s'accumuler dans la cellule et atteindre immédiatement un seuil de toxicité. (Guéguen *et al.*, 2006), mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telles la P-gp, produit du gène MDR.

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques exercent un rôle central dans les phénomènes de biotransformation, du métabolisme et/ou de la détoxification de ces composés étrangers à l'organisme.

Compte tenu de la grande variété et de la nature imprévisible de la structure chimique de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes (et d'isoenzymes) pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses. Ces EMTX ont été classés selon le schéma de la **Figure 19**.

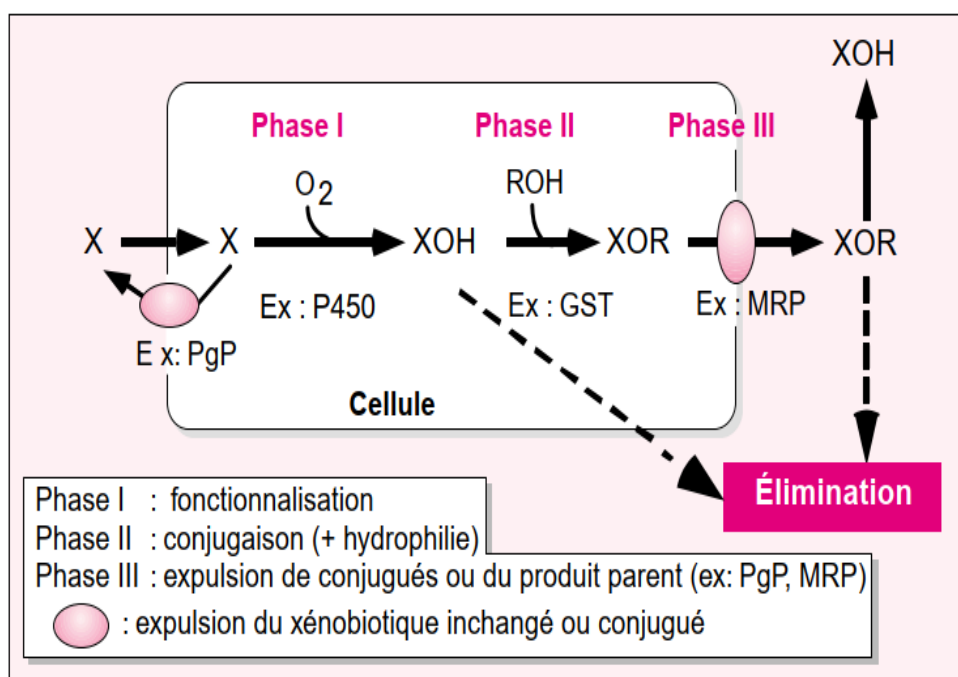


Figure 19 : Schéma du métabolisme des xénobiotiques (Beaune et Lorient, 2000).

Le métabolisme des xénobiotiques se divise en 3 phases qui aboutissent au final à l'élimination des substances étrangères dans la bile et l'urine.

- Les enzymes de la phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse (Destreicher *et al.*, 1999);
- Les enzymes de la phase II (glutathion-s-transférases ou GST, UDP-glucuronosyltransférases...), dites de conjugaison, conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyle, acétyl...), dont la fonction est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, Amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de favoriser son élimination par l'organisme (Rendic *et al.*, 2002);

- Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté via la membrane cellulaire par des protéines de phase III, telles que le transporteur MRP (Multidrug Related Protein) et la P-gp, transportent au travers des membranes des xénobiotiques, et surtout des dérivés conjugués (Gerloff *et al.*, 2004). Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'EMTX (phase IV) (Badawi *et al.*, 1996).

➤ **Cytochrome P 450 et la P-gp**

La protéine P-gp est habituellement associée à la présence de cytochromes P450 et plus spécifiquement du CYP 3A4. Cette liaison présente un intérêt stratégique pour l'excrétion des xénobiotiques, par une activité complémentaire, la P-gp éliminant les produits non métabolisés par le cytochrome P 450. Cette association P-gp-cytochrome P 450 contribue à l'élimination de plusieurs médicaments : les inhibiteurs des canaux calciques, Ciclosporine, Macrolides... (Picard, 2002).

3.6. Effets secondaires

Comme tout médicament, l'IVM a également des effets indésirables, en particulier lorsqu'elle est administrée aléatoirement. L'IVM est bien tolérée et les effets indésirables sont peu fréquents, comme le montre son utilisation continue dans les campagnes de traitement de masse pendant près de 30 ans.

Bien que l'IVM ne traverse normalement pas la barrière hémato-encéphalique chez les vertébrés, des signes et des symptômes de neurotoxicité, notamment des vomissements, une mydriase et une ataxie, ont été signalés durant les études de surdosage de l'IVM chez les animaux et l'homme (Edwards, 2003). Les principaux effets indésirables sont liés à la mort du parasite et à la réaction immunitaire consécutive aux antigènes libérés, ces effets sont appelés les réactions de Mazzotti (Grayson *et al.*, 2017).

3.7. Toxicité

Il a été rapporté que la toxicité liée à l'utilisation de l'IVM est rare et que la plupart des effets secondaires sont souvent transitoires et légers. Aucune toxicité significative n'a été observée après une administration d'IVM jusqu'à dix fois (2 mg/kg) de la dose thérapeutique recommandée (Guzzo *et al.*, 2002), ce qui démontre une large marge de sécurité. Une certaine toxicité observée peut également être causée par l'utilisation d'ivermectine à des fins non

étiquetées. Cependant, un surdosage ou une administration incontrôlée peut entraîner le développement d'une toxicité sévère.

Pour illustrer le rôle des différences espèces dans l'expression du transporteur d'efflux, [Stevens et al. \(2010\)](#) ont étudié l'effet de la barrière placentaire sur l'effet toxique de l'IVM chez les rongeurs. Ils ont conclu que l'utilisation de modèles animaux dans la recherche toxicologique et l'extrapolation à l'homme est nécessaire pour noter la variation de la constitution génétique entre les organismes et entre les animaux et l'homme.

Les principaux effets neurotoxiques de l'IVM observés dans les études animales sur des rats sont l'ataxie, la paresse et le prolapsus, tandis que chez le chien, l'hypersalivation, l'ataxie, la cécité, le coma, les troubles respiratoires, les tremblements, la mydriase, l'anorexie et la mort ([Campbell, 2012 b](#)).

Il a été également noté que les jeunes rats sont sensibles à l'IVM, car des concentrations élevées d'IVM sont trouvées dans le cerveau en raison d'une tendre barrière hémato-méningée et d'un manque de la P-gp. La plupart des chiens qui sont sensibles à la neurotoxicité d'IVM présentent une mutation du gène MDR1 qui conduit à une synthèse incomplète de la P-gp ([Mealey et al., 2001](#)).

Le rôle de la P-gp est critique dans la neurotoxicité potentielle de l'IVM. La P-gp fait partie du composant important de la barrière hémato-méningée et il est important dans le processus par lequel cette barrière régule l'entrée et la sortie des médicaments dans le cerveau.

Par conséquent, toute activité qui régule la fonction de la P-gp peut affecter la concentration d'IVM dans le cerveau, en particulier l'efflux d'IVM du cerveau. Certains des processus qui affectent la fonction de la P-gp comprennent la mutation et l'administration de médicaments qui inhibent sa capacité à transporter des médicaments hors du cerveau ([El-Saber Batiha et al., 2020](#)).

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'antidote spécifique contre la toxicité de l'IVM. Pour cela, le traitement symptomatique reste la meilleure solution pour améliorer la toxicité de l'IVM chez l'homme et l'animal ([Jadhav et Bhikane, 2020](#)).

Actuellement, l'utilisation des antioxydants naturels pour améliorer les différentes altérations induites par les xénobiotiques chez les vertébrés devient un domaine d'intérêt de nombreuses recherches récentes. Parmi les molécules les plus fréquemment étudiées, on distingue les vitamines et les oligoéléments.

CHAPITRE 3
ANTIOXYDANTS
&
VITAMINE C

CHAPITRE 3

ANTIOXYDANTS

&

VITAMINE C

1. Définition des Antioxydants

Le stress oxydatif est un facteur clé de la cytotoxicité induite par les avermectines ([Zhu et al., 2013](#)). Par conséquent, l'utilisation d'antioxydants pour améliorer leur toxicité est une approche logique.

Un antioxydant est défini comme une substance qui, additionnée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de retarder ou réprimer le phénomène d'oxydation. Le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets néfastes potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation exagérée ([Halliwell, 1999](#)).

Les antioxydants peuvent être classés en fonction de leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine. Il existe différents types de molécules antioxydants, naturelles ou synthétiques, dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non enzymatiques (molécules piègeuses d'électrons). Actuellement, parmi les antioxydants non enzymatiques les plus utilisés, on distingue les vitamines et les oligoéléments ([Bonnefont-Rousselot et al., 2003](#)).

2. Définition et classification des vitamines

Les vitamines sont des substances organiques essentielles à l'organisme et sans valeur énergétique propre. Puisque l'homme ne peut pas les produire en quantité suffisante, elles doivent être apportées par l'alimentation. Elles représentent un groupe de produits chimiques très hétérogène.

Le terme « vitamine » vient du latin « vita » qui signifie vie, et du suffixe « amine » ; les chimistes croyant pouvoir classer ce type de substance parmi les amines, ce qui s'avéra faux par la suite. Treize substances répondent à cette définition : vitamine A ou rétinol, vitamine D ou calciférol, vitamine E ou tocophérol, vitamine K, **vitamine C**, vitamine B1 ou thiamine, vitamine B2 ou riboflavine, vitamine B3 ou PP ou niacine, vitamine B5 ou acide

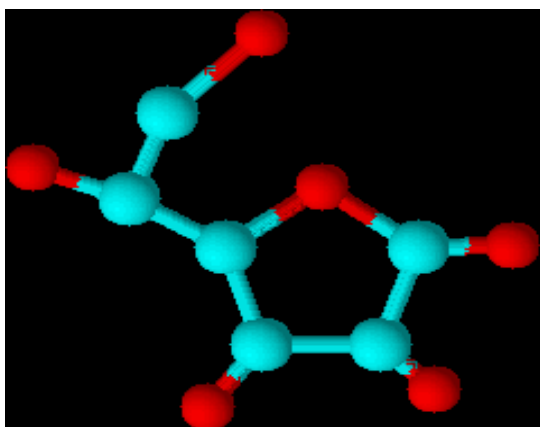
pantothénique, vitamine B6 ou pyridoxine, vitamine B8 ou biotine, vitamine B9 ou acide folique et Vitamine B12 ou cobalamine (Sperte, 2016).

Les vitamines sont divisées selon leur solubilité en deux groupes. On distingue les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B1, B2, B3, B5, B-, B8 B9, B12 et C). Cette différence de solubilité a des impacts sur le métabolisme des vitamines, spécifiquement sur leur absorption et leur stockage (Sperte, 2016).

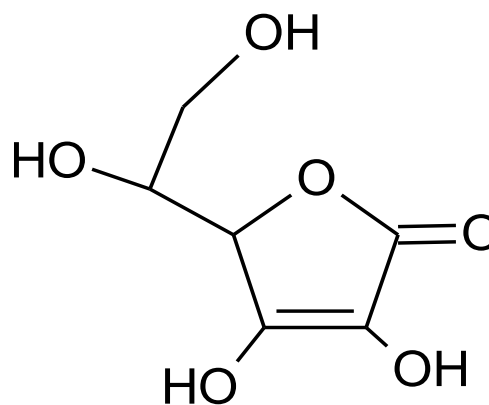
3. Vitamine C ou Acide ascorbique

3.1. Structure chimique

La vitamine C ou acide ascorbique (AA) a été isolée pour la première fois en 1928, par le biochimiste hongrois, Szent Györgyi (Burns, 1959). Son nom chimique est 2,3-didehydro-L-threohexano-1,4-lactone. La structure chimique de l'acide ascorbique (Figure 20) fut établie par Haworth en 1932. Sa formule chimique brute est $C_6H_8O_6$. Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui lie les carbones C_1 et C_4 . Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique, de formule chimique $C_6H_6O_6$ (Figure 21) (Dupin, 1992).



(A)



(B)

Figure 20 : Structure chimique tridimensionnelle (A) et cyclique (B) de la vitamine C (acide ascorbique) (Combs, 2008).

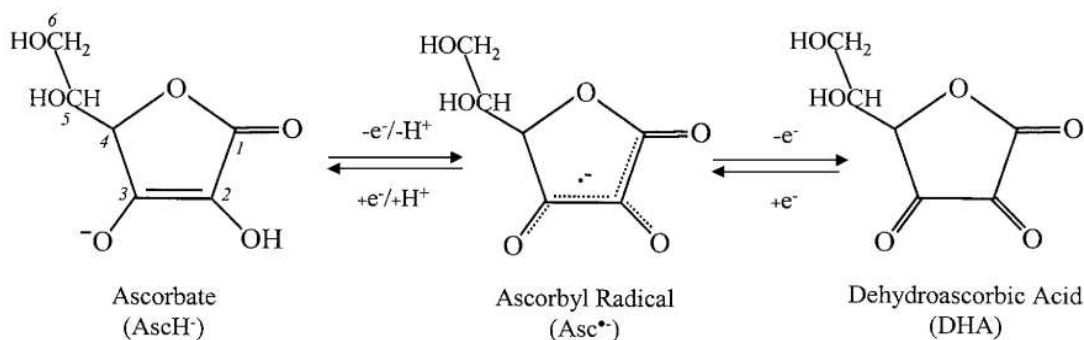


Figure 21 : Oxydation de l'ascorbate (AscH⁻) par deux étapes successives d'oxydation à un électron pour donner respectivement le radical ascorbyle (Asc^{•-}) et l'acide déhydroascorbique (DHA) (Packer, 2002).

3.2. Propriétés physico-chimiques

La vitamine C est une substance hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux rayonnements ultraviolets et à l'oxygène, sa masse molaire est de 176,13 g.mol⁻¹. Elle se présente sous forme de poudre cristalline de couleur blanche ou jaunâtre avec une température de fusion de 190°C. Très fragile en solution, l'AA est oxydé au contact de l'air, par contre il est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité (Colombo, 2001).

3.3. Biosynthèse de la vitamine C

Dans le règne animal, il existe une seule voie de biosynthèse de l'acide ascorbique. Chez les mammifères, sa synthèse s'effectue au niveau du foie. L'étude de cette voie de biosynthèse a pu être faite grâce à l'utilisation de molécules radio-marquées chez le rat. A partir d'UDP-D-glucose, de l'UDP-Dglucuronate est formé par l'action de l'UDP-glucose pyrophosphorylase.

L'UDP-glucose déshydrogénase catalyse la réaction suivante qui va avoir pour produire le D-glucuronate qui sera alors réduit en L-gulonate par la glucuronate réductase. Ceci conduit à une inversion de configuration étant donné que la fonction aldéhyde du D-glucuronate devient un groupe hydroxyméthyl dans le L-gulonate. Ce dernier est converti en L-gulono-1,4-lactone par la gulonolactonase. La dernière réaction fait intervenir la L-gulonolactone oxydase, enzyme liée à la membrane du réticulum endoplasmique, qui va oxyder le L-gulono-1,4-lactone pour donner l'acide L-ascorbique (Figure 22) (Linster et Van Schaftingen, 2006).

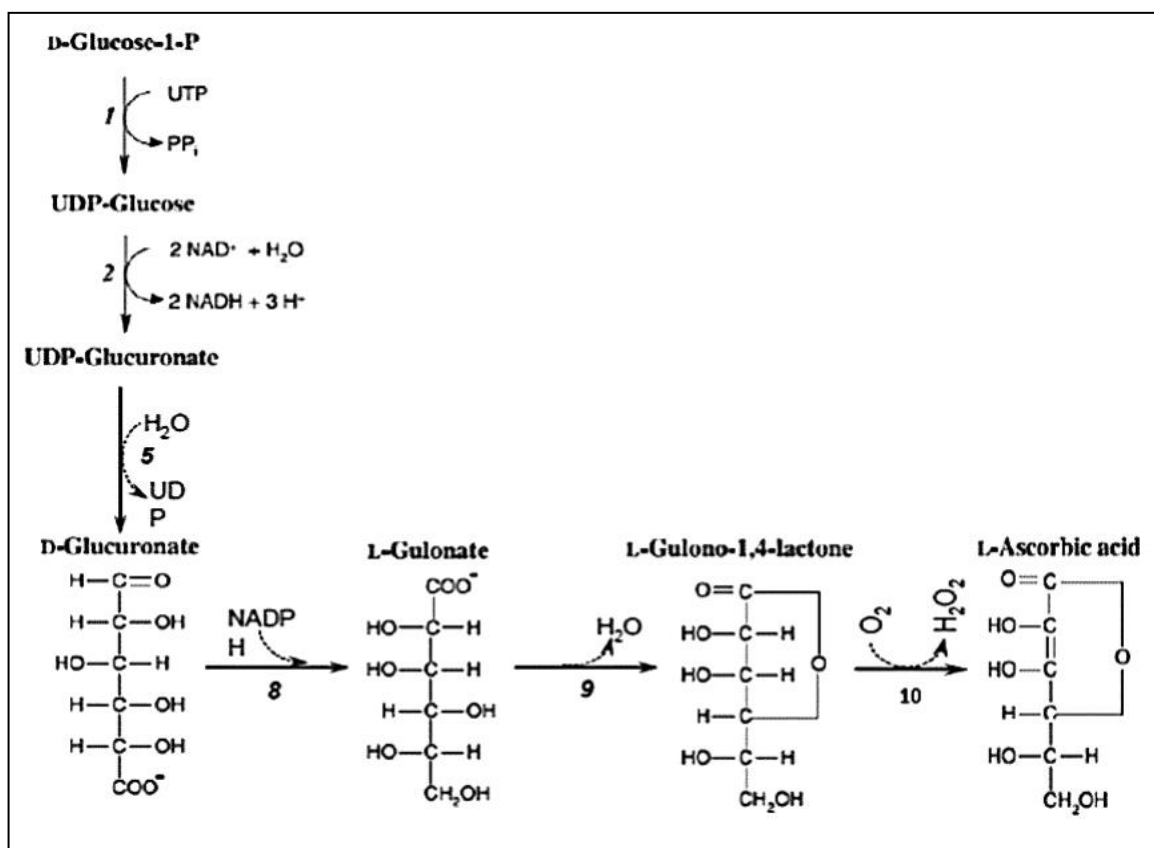


Figure 22 : Biosynthèses de l'acide ascorbique chez les animaux (Linster et Schaftigen, 2006).

3.4. Source de vitamine C

Un apport quotidien en vitamine C d'au moins 200 mg est facilement obtenu en consommant 5 portions de fruits et légumes. L'augmentation de l'apport en fruits et légumes a toujours été associée à une diminution du risque de maladies chroniques (Van't Veer, 2000).

En effet, la plupart des preuves épidémiologiques associant une augmentation de l'apport en vitamine C à une diminution du risque de maladie chronique sont basées sur la consommation de vitamine C des fruits et légumes. Les légumes frais, les fruits et les jus sont les sources les plus riches de vitamine C. La teneur en vitamine C des aliments peut être diminuée par un stockage prolongé et certaines pratiques de cuisson.

IL a été constaté que la cuisson des légumes entraînait des pertes de vitamine C de 50 à 80%. Faire cuire des légumes à la vapeur dans des quantités minimales d'eau ou les cuire dans un four à micro-ondes réduit considérablement la perte de vitamine C par la cuisson (Rumm-Kreuter et Demmel, 1990).

3.5. Fonctions physiologiques

3.5.1. Agent antioxydant

A des taux physiologiques, l'AA est un puissant antioxydant, et un capteur des radicaux libres dans le plasma d'où, une préservation de la cellule contre les dommages oxydatifs. Par conséquent elle est capable de réduire les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azotes citant : le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le radical peroxyde, l'oxygène singulet, le radical nitroxyde et l'acide hypochlorique (Carr et frei, 1999).

3.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

La majorité des mammifères y-compris le lapin sont capables de synthétiser la vitamine C au niveau hépatique ou rénal. Cette synthèse est absente chez l'homme, qui doit assurer un apport quotidien d'environ 100 mg par une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (Haleng et al., 2007).

3.5.3. Agent d'oxydo-réduction

Le rôle biologique de la vitamine C est associé à son efficacité comme un agent réducteur ou un donneur d'électrons. La vitamine C intervient à la réduction des acides foliques en coenzymes actifs, elle participe aussi dans des processus de détoxification en bloquant la formation des nitrosamines, elle réduit les effets toxiques des mycotoxines, des métaux lourds et des polluants sur la santé. L'AA a en effet un rôle détoxifiant vis-à-vis d'un grand nombre de métaux lourds (plomb, mercure, cadmium), car elle facilite leur élimination ou réduit l'absorption intestinale de certains d'entre eux (Layachi, 2013).

3.5.4. Agent d'hydroxylation

La vitamine C, du fait de ses caractéristiques réductrices, joue un rôle principal dans de plusieurs réactions d'hydroxylation telles que la synthèse du collagène, de plusieurs neuromédiateurs, de la carnitine et le catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine (Padayatty et al., 2003).

3.5.5. Agent neuroprotecteur

La vitamine C est largement concentrée dans le cerveau et certaines hypothèses soulignent son rôle dans le maintien des fonctions cognitives, qu'elle soit apportée par alimentation ou sous forme de supplément. La vitamine C peut exercer son effet neuroprotecteur après pénétration dans le cerveau.

Selon [Agus et al., \(1997\)](#), la vitamine C peut traverser la barrière hémato-méningée sous sa forme oxydée. Il pénètre facilement dans le cerveau et elle est retenue dans le tissu cérébral sous forme d'AA. Ce transport est probablement mis en œuvre via le transporteur de glucose dans la barrière hémato-encéphalique.

3.6. Toxicité de la vitamine C

Chez les sujets sains, la vitamine C ne présente aucune toxicité puisqu'elle est hydrosoluble et régulièrement excrétée par l'organisme, mais l'excès d'acide ascorbique excrété dans l'urine donne un faux positif pour la glycosurie.

Les concentrations élevées de vitamine C interfèrent aussi avec l'absorption du cuivre. Par contre, la vitamine C doit être évitée par ceux qui souffrent de calculs rénaux, car elle peut se convertir en oxalate. Cependant, certaines recherches suggèrent que la vitamine C ne subit cette transformation dans l'urine qu'après que l'urine a quitté le corps ([Iqbal et al., 2004](#)).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Présentation de l'étude

Les AVMs font partie des biocides énormément utilisés en Algérie, dont « l'ivermectine » occupe la première place en médecine vétérinaire. Dans ce projet de thèse, nous souhaitons explorer l'impact d'une utilisation répétée à forte dose de l'IVM (2mg/kg p.c.) par voie sous-cutanée sur la santé humaine et animale et les effets protecteurs d'une association de la vitamine C, à travers des tests de toxicité chez le lapin de souche (*Oryctolagus cuniculus*).

Pour cela, les effets de l'IVM sur le comportement du lapin, l'évolution pondérale, la consommation d'aliment et de l'eau de boisson, la variation du poids des organes étudiés, les paramètres biochimiques de la fonction hépatique, rénale et le bilan lipidique, ainsi que les effets histopathologiques sur le foie, les reins, les poumons et le cerveau ont été évaluées.

Egalement, les effets bénéfiques d'une coadministration de la vitamine C par voie orale sur les différentes altérations causées par l'IVM ont été étudiés.

Pour atteindre nos objectifs, une seule expérimentation a été réalisée. Dans ce chapitre, on va présenter le matériel utilisé à savoir : le modèle animal ; les produits et les réactifs chimiques, le protocole expérimental et les méthodes suivies pour l'analyse biochimique, et l'étude histologique.

CHAPITRE 1

MATIERES &

METHODS

CHAPITRE 1

MATERIEL & METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel biologique (modèle animal)

Notre expérimentation animale a été effectuée conformément aux principes des lignes directrices relatives à l'utilisation des modèles animaux en Toxicologie (Derelanko et Auletta, 2014 ; Gad, 2006).

Le lapin constitue un modèle animal très utilisé dans de nombreuses études toxicologiques car il est relativement peu coûteux, robuste, propre et facile à loger et à manipuler.

Dans cette étude, on a utilisé 20 lapins mâles sains de jeunes âges (4 à 5 semaines) avec un poids corporel moyen qui varie entre 850 et 950 g. Ces lapins sont issus de l'animalerie de l'Institut Technique des Elevages (ITELV), Baba Ali- Alger.

1.1.1. Systématique

Règne : Animal

Phylum : Vertébrés

Sous-phylum : Gnathostomes

Super-classe : Tétrapodes

Classe : Mammifères

Sous-classe : Euthériens

Ordre : Lagomorphes

Famille : Léporidés

Genre : *Oryctolagus*

Espèce : *Oryctolagus cuniculus*

Le lapin de notre expérimentation appartient à la population synthétique de la kabyliestation Djebba (Tizi Ouzou). Cette souche synthétique est caractérisée par une diversité de la couleur de sa robe (**Annexe 1**) qui est due à une contribution de plusieurs races importées à savoir ; le lapin blanc Néozélandais, fauve de Bourgogne et Californien (Berchiche et Kadi, 2002). Selon Zerrouki *et al.* (2004), cette souche cunicole est marquée par un poids adulte moyen de 2800 g, ce qui permet de la classer dans le groupe des races légères. Elle présente une bonne adaptation aux conditions climatiques locales mais sa prolificité et son poids adulte

sont trop faibles pour permettre son utilisation telle quelle, dans des élevages producteurs de viande (Zerrouki *et al.*, 2005).

Les animaux utilisés dans cette étude sont élevés dans l'unité de Pharmacotoxicologie du CRD-Saidal, Média, Algérie); hébergés dans des cages métalliques collectives dans une animalerie avec des conditions bien définies : une température ambiante de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, alternance des cycles 12h jour/ 12h nuit et une hygrométrie de 50-60 %.

Les lapins ont été nourris *ad-libitum*. Leur alimentation est constituée de granulés commerciaux spécifiques aux lapins, qui sont stockés dans un endroit sec et donnés aux animaux quotidiennement avec de l'eau de robinet qui est régulièrement renouvelée.

La quantité d'aliment et l'eau à consommer est déterminée selon les normes spécifiques utilisées par l'animalerie de Saidal pour les lapins jeunes à l'engraissement (4 à 11 semaines d'âge) comme suivant :

L'aliment : 110 à 130 g d'aliment / jour / lapin.

L'eau : 150 à 200 ml / jour / lapin.

1.2. Matériel non biologique

Les produits testés dans le cadre de cette thèse sont :

- L'AVIMEC® 1% dont la matière active est l'ivermectine (10 mg/ml), c'est un médicament anthelminthique largement utilisé pour le traitement des parasites internes et externes chez les bovins, buffles, ovins, caprins, chameaux et lapins. Ce médicament est importé à partir la firme AVICO et commercialisé en Algérie par la firme PHARMALEAD (annexe d'El Biar, Alger), à partir du quelle l'AVIMEC® a été acheté.
- La vitamine C (acide ascorbique), avec une pureté de 99%, a été achetée auprès de Sigma-Aldrich A92902 - 500G Product of United Kingdom.

Les réactifs (**Annexe 2**) et les kits de dosage biochimiques proviennent de sources commerciales ; Bisolve chimie (Valkenswaard, Pays-Bas) et BIOLABO SA. (France).

2. Méthodes

2.1. Protocole expérimental

Vingt lapins mâles sont répartis en quatre lots de cinq lapins ($n = 5$) chacun, en fonction de leur poids corporel moyen homogène, comme suivant :

- **Groupe 1** : groupe témoin.
- **Groupe 2** : groupe traité par l'AVIMEC®.

- **Groupe 3** : groupe traité par l'AVIMEC® et la vitamine C par gavage.
- **Groupe 4** : groupe traité par l'AVIMEC® et la vitamine C supplémenté en aliment.

Les lapins sont identifiés par une marque spécifique à l'aide d'un marqueur indélébile, chaque lapin est caractérisé par un numéro individuel au niveau de son oreille. Chaque groupe est placé dans une cage métallique avec une fiche de renseignements qui indique le type de traitement, le numéro, le sexe et la date.

Avant l'expérimentation proprement dite, les lapins sont soumis à une période d'acclimatation de 14 jours (OCDE, 2008), 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.

Durant la période d'acclimatation et la période expérimentale, tous les lapins sont pesés quotidiennement le matin pour suivre l'évolution de leurs poids corporels chez les différents lots étudiés, ainsi la consommation de l'eau de boisson et celle des aliments ont été mesurés.

- **Calcul du pourcentage de la prise du poids (% PP) corporel, la prise d'aliment (% PA) et la prise de boisson (%PB)**

$$\% = \frac{\text{Valeur finale} - \text{Valeur initiale}}{\text{Valeur initiale}} \times 100$$

Avant chaque traitement, les lapins sont aussi pesés pour calculer la dose convenable pour chacun.

Notre expérimentation a duré 21 jours dans laquelle les différents lots sont traités comme suivant :

Lot 1 (Témoin) :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de 1 ml de la solution physiologique Na Cl 0,9%.
- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée.

Lot 2 (AVIMEC®) :

- **1^{er} jour** : chaque lapin a reçu une dose de 2mg/kg p.c d'AVIMEC® par voie sous-cutanée (Lu et al, 2017), 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours. La dose administrée est calculée par rapport au poids corporel moyen du groupe. La technique de l'injection sous-cutanée consiste à bien tenir les pattes et la tête de lapin avec les mains pour l'immobiliser, couvrir ses yeux afin d'éviter de le stresser et tirer sa peau

vers le haut jusqu'à ressentir un vide entre le derme et l'épiderme, c'est là où on doit introduire la seringue.

- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée.

Lot 3 (AVIMEC®+ vitamine C par gavage) :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de la même dose de l'AVIMEC®.
- **Après 12h** : gavage d'1 ml d'une solution de la vitamine C (20 mg/ml), 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours. La dose administrée est calculée par rapport au poids corporel moyen du groupe. La technique de gavage consiste à tenir le lapin debout, immobiliser sa tête et ses pattes, couvrir ses yeux et introduire la seringue ou la sonde de gavage dans sa bouche.

Lot 4 : AVIMEC®+ vitamine C supplémentée en aliment :

- **1^{er} jour** : injection sous-cutanée de la même dose de l'AVIMEC®.
- **Après 12h** : gavage de 1 ml de l'eau distillée plus une dose de 200 mg/kg (Fetoui *et al.*, 2010) d'aliment de la vitamine C, 3 fois par semaine (1/2 jours) pendant 21 jours.

2.2. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués chez les lapins mis à jeun depuis la veille en deux temps différents : pendant l'expérimentation (au 14^{ème} jour) et le dernier jour de l'expérimentation (au 21^{ème} jour). L'échantillonnage du sang a été fait à partir de la veine marginale et centrale de l'oreille.

Le sang est récupéré dans des tubes héparinés, le volume collecté est d'environ 3ml. Les prélèvements obtenus sont immédiatement centrifugés à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Le plasma obtenu est recueilli dans des tubes eppendorfs et il est transporté dans une glacière au laboratoire d'analyses médicales pour le dosage des paramètres biochimiques.

2.3. Analyses biochimiques

Les prélèvements sanguins obtenus sont destinés au dosage des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique : glycémie ; ASAT ; ALAT ; γ -GT, la fonction rénale : urémie ; créatinémie ; acide urique et les paramètres de bilan lipidique : CT ; TG ; HDL-C et LDL-C. le dosage de ces paramètres a été effectué à l'aide des kits enzymatiques spectrophotométriques disponibles dans Biolabo (France) par un auto-analyseur (Hitachi 912 ; Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Le taux de VLDL-C est déterminé par la formule suivante :

$$\text{VLDL-C} = \text{CT} - (\text{HDL-C} + \text{LDL-C}) \text{ (Króliczewska et al., 2018).}$$

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 valeurs des triglycérides aux taux de HDL-C a été calculé selon la formule suivante :

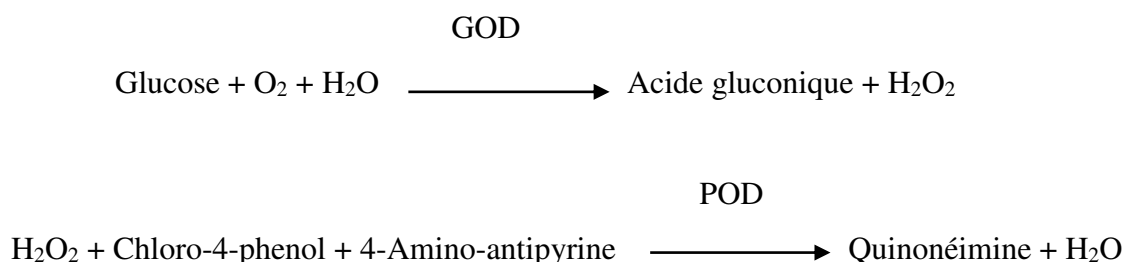
$$\text{IAP} = \text{Log} [\text{TG}] / [\text{HDL-C}]$$

où les deux taux sont mesurés dans le plasma (Króliczewska *et al.*, 2018). D'autres facteurs athérogènes (FA) ont été aussi utilisés et calculés comme le rapport entre Cholestérol total et HDL-C, LDL-C et HDL-C (Millán *et al.*, 2009).

➤ Dosage de la glycémie

Principe

Le glucose est oxydé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). 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) (Trinder, 1969). 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 se fait à une longueur d'onde de 500 nm.

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

Calcul des concentrations

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

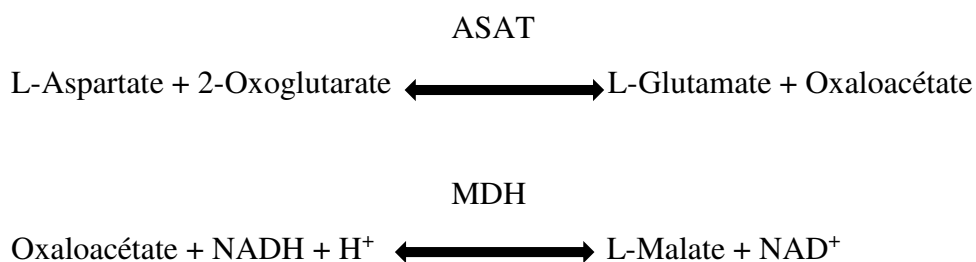
$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (100 mg/l)}$$

➤ Dosage des transaminases plasmatiques

❖ Aspartate Amino-Transférase (ASAT)

Principe

L'aspartate amino-transférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate transaminase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au 2-oxoglutarate formant le L-glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate deshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Henry *et al.*, 1960), selon le schéma réactionnel suivant :



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

Calcul des concentrations : Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

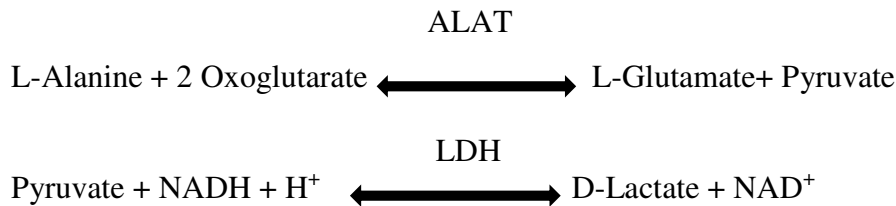
$$\text{ASAT (UI/l)} = \Delta \text{DO/min} \times 1746$$

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 le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au 2-oxoglutarate formant la L-glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH, H⁺ (Benmenyer *et al.*, 1978 ; Henry *et al.*, 1960), selon le schéma réactionnel suivant :



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

Calcul des concentrations :

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

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

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 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 peut se mesurer cinétiquement à 405 nm.

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

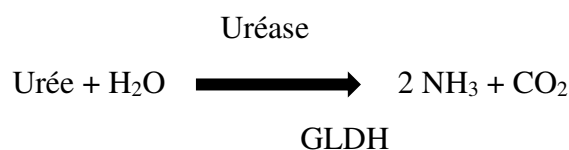
$$\gamma\text{-GT (UI/l)} = \Delta \text{DO/min} \times 2121$$

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

➤ Dosage de l'urée

Principe

L'urée est hydrolysée en ions ammoniacque (NH_3) et le dioxyde de carbone (CO_2). L'ammoniacque réagit avec l'oxoglutarate et NADH dans une réaction catalysée par glutamate déshydrogénase (GLDH) pour donner le glutamate, selon le schéma de la réactionnel suivant (Schubert, 1965 ; Tiffany *et al.*, 1972) :



La concentration en urée est proportionnelle à la variation d'absorbance mesurée à 340 nm pendant un temps donné.

Calcul des concentrations : Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

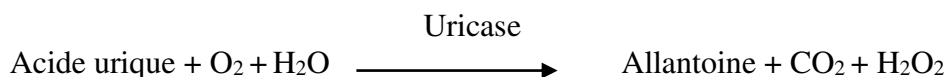
$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{Abs (A1-A2) Dosage}}{\text{Abs (A1-A2) Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (40 mg/l)}$$

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

➤ 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 amino-antipyrine) 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 quantité d'acide urique dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

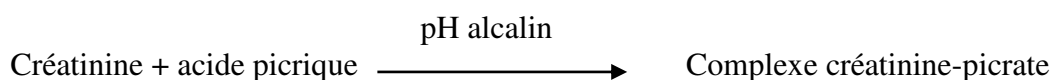
$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Dosage}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (100 mg/l)}$$

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

➤ 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 est réalisé par une réaction colorimétrique (réaction de Jaffé). En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe coloré rouge-orange. Le schéma réactionnel du dosage de la créatinine se résume comme suit ([Fabiny et Ertingshausen, 1971](#)) :



La vitesse de formation du colorant (intensité de la couleur) est directement proportionnelle à la concentration de créatinine de l'échantillon. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 490 nm (490 – 510nm)

Calcul des concentrations

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

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

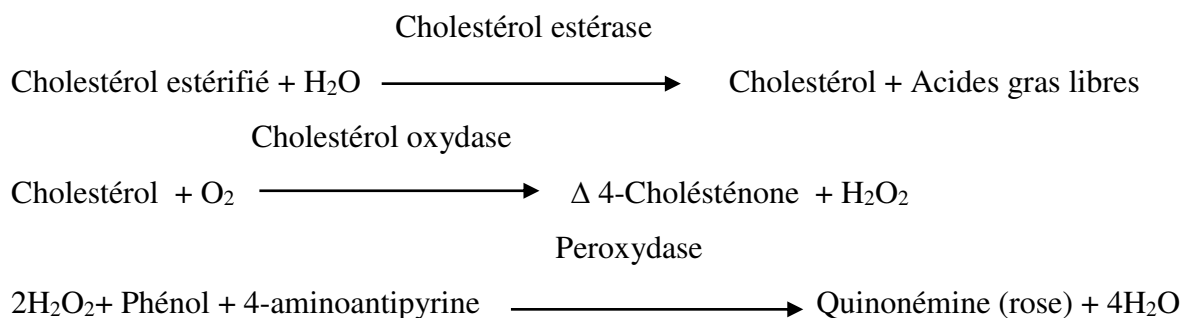
NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

➤ Dosage des paramètres lipidiques

❖ Dosage du cholestérol total (CT)

Principe

La détermination colorimétrique enzymatique du cholestérol suit les réactions suivantes (Allain *et al.*, 1974) :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

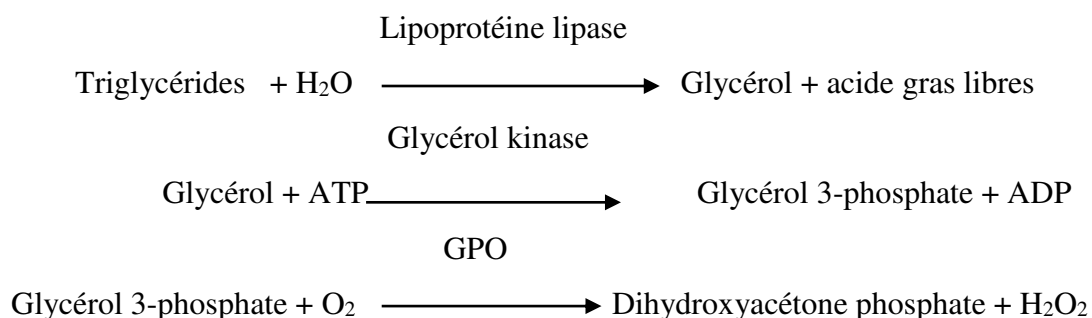
$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Dosage}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200 mg/l)}$

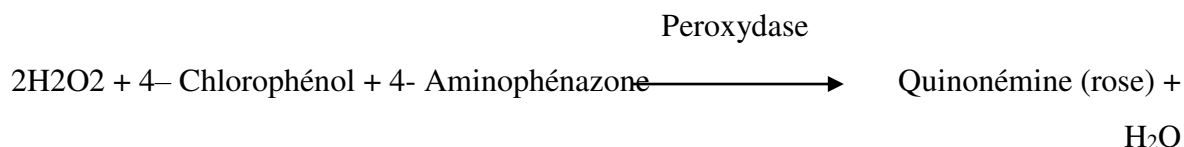
NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

❖ Dosage des triglycérides

Principe

Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré selon la réaction suivante (Fossati et Prencipe, 1982) :





L'intensité de la couleur mesurée à 500 nm est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

Calcul des concentrations

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

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

❖ Dosage du HDL-cholestérol

Principe

Les chylomicrons, lipoprotéines de très haute densité (HDL), et lipoprotéine de faible densité (LDL) sont précipité par l'addition d'acide phosphotungstique et de magnésium. Le surnageant obtenu après centrifugation contient les lipoprotéines de hautes densité (HDL) qui sont dosé à l'aide de réactif du dosage de cholestérol. Leur concentration en cholestérol est donnée en suivant les mêmes étapes que ceux pour le dosage de cholestérol.

❖ 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).

2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

A la fin de la période d'expérimentation, tous les lapins sont sacrifiés le matin pour éviter les perturbations liées au rythme cardiaque et dans les mêmes conditions d'élevage. Les lapins sont mis à jeun depuis la veille et ils sont euthanasiés par décapitation cervicale. Après dissection, les organes : foie, rein, poumon et cerveau sont immédiatement prélevés, pesés et mis dans des piluliers contenant du formol à 10%.

- **Calcul du poids relatif des organes**

$$\text{Poids relatif de l'organe} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe}}{\text{Poids de l'animal}} \times 100$$

2.5. Etude histologique des organes

Au terme de l'expérimentation, les organes de chaque animal sont coupés en fragments, mis dans des cassettes en plastique, fixés dans le formol à 10% puis soumis aux techniques histologiques constantes. Nous avons utilisé les étapes classiques de l'histologie (Gabe, 1961 ; Marjota et Marjota, 1967) à savoir :

- **Fixation** : Cette étape est indispensable à la bonne conservation des constitutions cellulaires et tissulaires qui doivent rester dans un état aussi proche que possible de celui de l'organisme vivant. Chaque organe est coupé, mis dans des cassettes puis plongé dans une solution de formol à 10%.
- **Circulation** : La déshydratation permet d'éliminer graduellement l'eau contenue dans les tissus afin de le remplacer par un solvant de paraffine. 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. Ils subissent par la suite l'éclaircissement dans deux bains de xylène.
- **Inclusion et coupe au microtome** : 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. L'épaisseur de coupes réalisées par le microtome est de 3 µm.
- **Coloration** : Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'hématoxyline éosine (H&E), comportant un bain de 5 min d'hématoxyline (MERCK), qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux), un bain de HCl 1% pour différencier les coupes et obtenir une coloration rose, un bain de 3 min en milieu carbonate du lithium pour colorer en bleu les coupes et un bain de 5 min dans l'éosine pour colorer

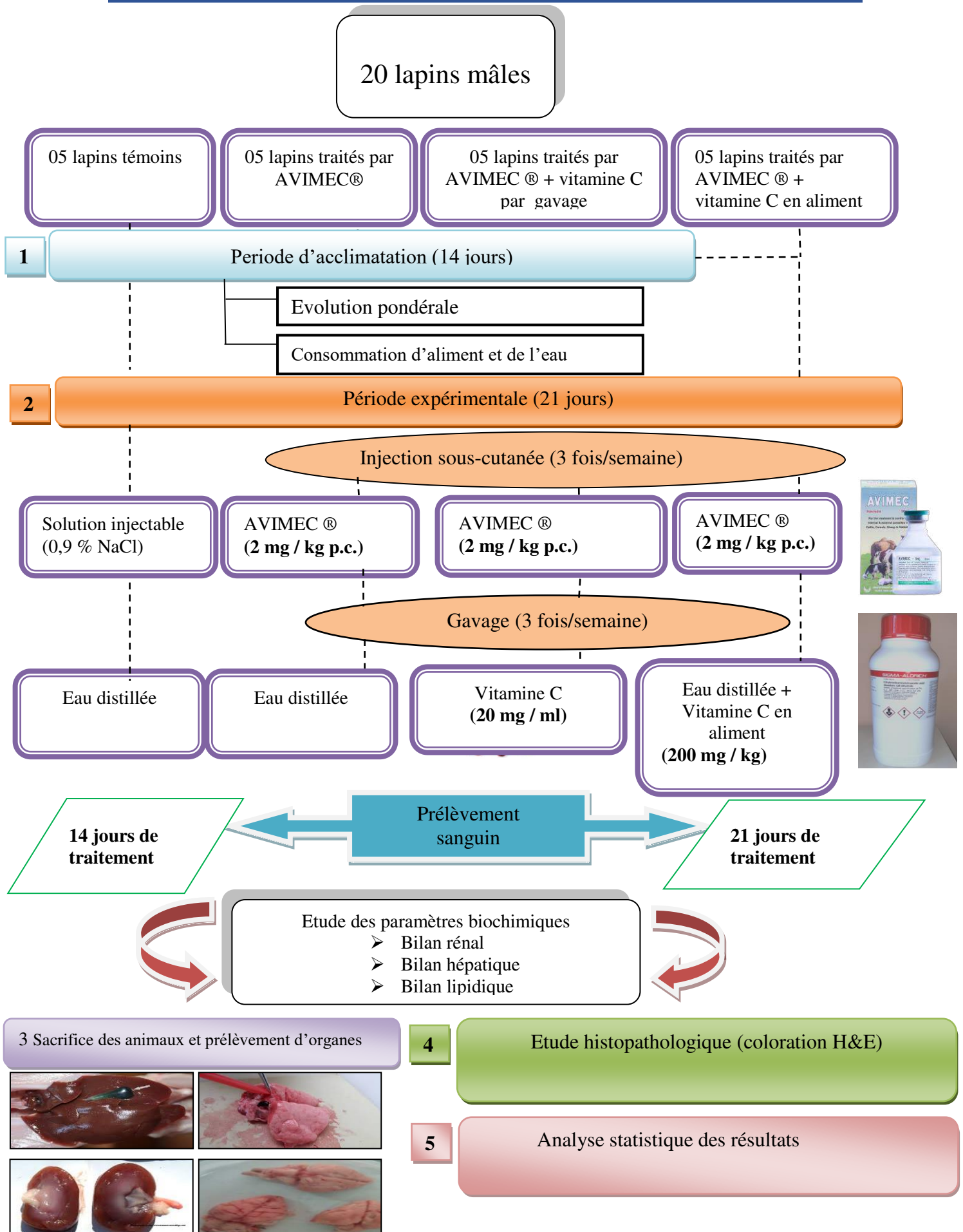
les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau de robinet.

Les coupes obtenues sont observées au microscope photonique (Viola MC2Oi version 19.12.17) qui est attaché à un appareil photo.

2.6. Traitement des données et analyse statistique

La représentation des données, ainsi que les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de logiciels STATISTICA version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, États-Unis). Les différents paramètres étudiés sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart type (SD), la comparaison des moyennes de chaque paramètre entre les différents groupes étudiés dans la présente étude a été effectuée par l'analyse unidirectionnelle de variance (one way ANOVA) suivi d'un test post-hoc « Duncan's post-hoc test ». Un résultat est considéré comme statistiquement significatif avec un taux de $p \leq 0.05$.

La représentation graphique des données a été fait par le biais de logiciels SPSS (version 20, IBM Co., Armonk, NY).



CHAPITRE 2
RESULTATS &
DISCUSSION
GENERALE

CHAPITRE 2**RESULTAT & DISCUSSION GENERALE****1. RESULTATS**

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats de notre étude suivis d'une interprétation et une discussion globale de l'ensemble des résultats.

1.1. Effet du traitement sur le comportement du lapin

Durant l'expérimentation, quelques troubles de comportement ont été observés chez le groupe traité par l'IVM à savoir :

- Des signes neurologiques (tremblements et agitation)
- Diarrhée
- Chute des poils
- Baisse d'activité

1.2. Variation du poids corporel et pourcentage de prise de poids

Le poids des lapins est mesuré quotidiennement le matin pendant la période d'acclimatation (15 jours) et d'expérimentation (21 jours).

Le **Tableau 2** récapitule l'évolution du poids corporel des lapins témoins et traités pendant l'acclimatation et l'expérimentation.

Pendant la période d'acclimatation, le poids corporel et le pourcentage de prise de poids corporel (% PP) sont homogènes dans les quatre groupes inclus dans cette étude.

Alors que pendant la période expérimentale, le poids corporel final (PF ; $1587 \pm 71,6$ g) et le % PP ($19,3 \pm 0,8$ %) sont significativement ($p < 0,05$) diminués chez le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin ($1806,4 \pm 63,2$ g et $34,1 \pm 0,5$ %, respectivement). A l'inverse, le PF et le % PP sont significativement augmentés chez les groupes co-traités par l'IVM et la vitamine C par gavage ($1693 \pm 47,1$ g et $25,3 \pm 0,7$ %, respectivement) et supplémentée en aliment ($1678,1 \pm 48$ g et $26,4 \pm 0,8$ %, respectivement) relativement au groupe traité uniquement par l'IVM.

Tableau 2 : Variation du poids corporel et le pourcentage de prise de poids (% PP) des lapins témoins et traités. PI : poids initial, PF : poids final.

Période	Paramètre / groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	PI (g)	862,1± 9,8	914,8 ± 22,7	946,7 ±25,6	932,2 ±27,8
	PF (g)	1085,7±18,9	1147,7±21,9	1156,8±26,2	1149,1±30,8
	% PP	25,9 ± 0.9	25,5±0.9	22,23±0.7	23,31± 0.8
expérimentation	PI (g)	1347,1±21,1	1330,6±19,8	1351,0±26,6	1328,3±36,4
	PF (g)	1806,4±63,2	1587,0±71,6 ^a	1693,0±47,1 ^b	1678,1±48,0 ^c
	% PP	34,1 ± 0.5	19,3 ± 0,8 ^a	25,3 ± 0,7 ^b	26,4 ± 0,8 ^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.3. Variation de la consommation de l'aliment et de boisson

La quantité d'aliment et le volume de boisson (l'eau) consommés sont évalués quotidiennement pour chaque lapin au cours de l'acclimatation et l'expérimentation.

1.3.1. Variation de la consommation de l'aliment et le pourcentage de prise alimentaire

D'après le **Tableau 3**, au cours de l'acclimatation, il n'existe aucune différence significative de la quantité d'aliment consommée et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) entre le groupe témoin et les groupes traités. Par contre, au moment de la période expérimentale, le % PA est significativement diminué chez le groupe traité par l'IVM ($21,01 \pm 0,9 \%$) en comparaison avec le groupe témoin ($33,03 \pm 0,1 \%$). Ce pourcentage a augmenté d'une manière significative chez le lot traité par l'IVM + vitamine C par gavage ($27,5 \pm 0,2 \%$) et celui traité par l'IVM + vitamine C en aliment ($35,2 \pm 0,5 \%$) par rapport au groupe traité uniquement par l'IVM.

Tableau 3 : Variation de la consommation d'aliment et le pourcentage de prise d'aliment (% PA) chez les lapins témoins et traités. PIA : poids initial d'aliment, PFA : poids final d'aliment.

Période	Paramètre / groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	PIA (g)	60,6 ± 6,3	69,2 ± 5,2	73,7 ± 5,1	68,7 ± 2,9
	PFA (g)	77,6 ± 2,7	90,2 ± 0,9	92,9 ± 1,1	84,5 ± 1,9
	% PA	28,01 ± 0,1	30,3 ± 0,2	26,01 ± 0,1	23 ± 0,4
expérimentation	PIA (g)	93,3 ± 1,6	79,2 ± 2,2	74,1 ± 2,2	79,5 ± 1,7
	PFA (g)	124,1 ± 0,4	95,8 ± 3,5	94,5 ± 4,9	107,5 ± 2,4
	% PA	33,03 ± 0,1	21,01 ± 0,9^a	27,5 ± 0,2^b	35,2 ± 0,5^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.3.2. Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson

Les résultats de variation de consommation de boisson (l'eau) et le pourcentage de prise de boisson (% PB) sont représentés dans le **Tableau 4**.

Au cours de l'acclimatation, la consommation de l'eau et le % PB varient de la même façon dans tous les lots étudiés. Contrairement au cours de l'expérimentation, nous avons noté une réduction importante et significative du % PB dans le lot traité par l'IVM ($7,3 \pm 0,3$ %) par rapport au lot témoin ($70,72 \pm 0,8$ %). La co-administration de la vitamine C est responsable d'une élévation significative du % PB dans les groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage ($21,26 \pm 0,4$ %) et l'IVM + vitamine C en aliment ($64,21 \pm 0,7$ %) par rapport au groupe traité seulement par l'IVM.

Tableau 4 : Variation de la consommation de boisson et le pourcentage de prise de boisson (% PB) chez les lapins témoins et traités. VBI : volume de boisson initial, VBF : volume de boisson final.

Période	Paramètre/ groupes	Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
acclimatation	VIB (ml)	100,5 ± 10,9	109,9 ± 3,4	106,1 ± 2,6	103,5 ± 4,1
	VFB (ml)	113,1 ± 5,5	126,5 ± 7,8	126 ± 6,3	117,4 ± 9,7
	% PB	12,5 ± 0,6	13,1 ± 0,3	15,8 ± 0,2	11,83 ± 0,5
expérimentation	VIB (ml)	119,2 ± 4,8	109 ± 5,2	111 ± 1,7	104,8 ± 3,3
	VFB (ml)	203,5 ± 8,8	116,9 ± 3,9	134,6 ± 7,3	172,1 ± 5,5
	% PB	70,72 ± 0,8	7,3 ± 0,3^a	21,26 ± 0,4^b	64,21 ± 0,7^c

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: $p < 0,05$ (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.4. Variation du poids absolu et relatif des organes

Les valeurs absolues et relatives du poids moyen des organes obtenues à la fin de la période expérimentale pour les différents lots étudiés sont montrées dans le **Tableau 5**.

Les poids absolus et relatifs du foie, poumon, surrénale et rate n'ont pas changé significativement chez les lapins traités par l'IVM par rapport aux lapins témoins. Par contre, uniquement les poids absolus et relatifs du poumon et le poids absolu de la surrénale sont augmentés d'une façon significative chez les deux lots traités par l'IVM + vitamine C comparativement au groupe témoin et le groupe traité uniquement par l'IVM. Autrement, nos résultats ont révélé une augmentation significative du poids absolu et relatif des deux reins et du cœur et seulement le poids absolu des testicules chez les lapins traités par l'IVM relativement au groupe témoin, et une diminution significative du poids absolu et relatif du cerveau et le poids absolu du thymus chez le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. la co-administration de la vitamine C par gavage avec l'IVM a permis une augmentation significative du poids absolu de la surrénale et le thymus par rapport au groupe traité par l'IVM seule.

Tableau 5 : Poids absolu et relative des organes des lapins témoins et traités pendant 21 jours.

Poids des organes (g)/ groupes		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
Foie	Absolu	76.5 ± 9,2	75,8 ± 6,5	77,7 ± 8,7	77,3 ± 9,5
	Relatif	4,1 ± 1,0	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,5 ± 1,2
Poumon	Absolu	8,8 ± 0,9	8,0 ± 1,0	9,8 ± 0,8^{a, b}	11,7 ± 0,7^{a, c}
	Relatif	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,03^{a, b}	0,7 ± 0,2^{a, c}
Rein droit	Absolu	5,7 ± 0,9	6,8 ± 1,3^a	5,9 ± 0,7	6,0 ± 0,8
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,1^a	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Rein gauche	Absolu	6,0 ± 0,7	6,7 ± 1,4^a	6,1 ± 0,7	6,1 ± 1,8
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,1^a	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,1
Cerveau	Absolu	8,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3^a	8,3 ± 0,3	8,3 ± 2,4
	Relatif	0,4 ± 0,01	0,35 ± 0,03^a	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,1
Surrénale (x 10⁻²)	Absolu	197 ± 5,3	20,8 ± 3,9	22,7 ± 5,4^b	20,4 ± 4,6
	Relatif	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3
Cœur	Absolu	4,8 ± 1,01	6,01 ± 0,8^a	4,9 ± 0,6	4,7 ± 1,3
	Relatif	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,01^a	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Thymus	Absolu	4,8 ± 0,5	3,2 ± 0,4^a	3,9 ± 0,6^b	4,1 ± 1,4
	Relatif	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,1
Rate	Absolu	0,53 ± 0,1	0,72 ± 0,05	0,66 ± 0,08	0,72 ± 0,19
	Relatif	0,02 ± 0,001	0,04 ± 0,002	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,01
Testicule	Absolu	2,87 ± 0,02	4,34 ± 0,12^a	3,25 ± 0,14	3,31 ± 1,02
	Relatif	0,15 ± 0,002	0,26 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,06

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.5. Paramètres biochimiques

1.5.1. Paramètres biochimiques de la fonction hépatique

Les valeurs plasmatiques des marqueurs de la fonction hépatique sont montrées dans le **Tableau 6 (Annexe 3)**.

Au 14^{ème} jour du traitement, les taux plasmatiques des transaminases hépatiques (ALAT (**Figure 23**) et ASAT (**Figure 24**)) et γ -GT (**Figure 25**) sont significativement augmentés chez le groupe qui a reçu l'IVM seul en comparaison avec le groupe témoin. Par contre, le taux de glucose ne semble pas influencé d'une façon significative par le traitement (**Figure 26**). Les taux plasmatiques de ces mêmes paramètres sont relativement corrigés après une co-administration de la vitamine C par gavage ou supplémenté dans l'aliment par rapport au groupe traité par l'IVM.

Au 21^{ème} jour de l'expérimentation, les teneurs plasmatiques des ALAT, ASAT et γ -GT restent significativement élevées par rapport au groupe témoin. Egalement, la concentration du glucose a augmenté significativement chez le groupe injecté par l'IVM comparativement au groupe témoin. L'association de l'acide ascorbique a permis une amélioration des taux plasmatiques des marqueurs de la fonction hépatique avec une diminution significative de taux de glycémie chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage ($1,20 \pm 0,09$ g/l) par rapport celle des lapins traités par l'IVM ($1,64 \pm 0,13$ g/l) et l'IVM + vitamine C supplémenté en aliment ($1,34 \pm 0,17$ g/l).

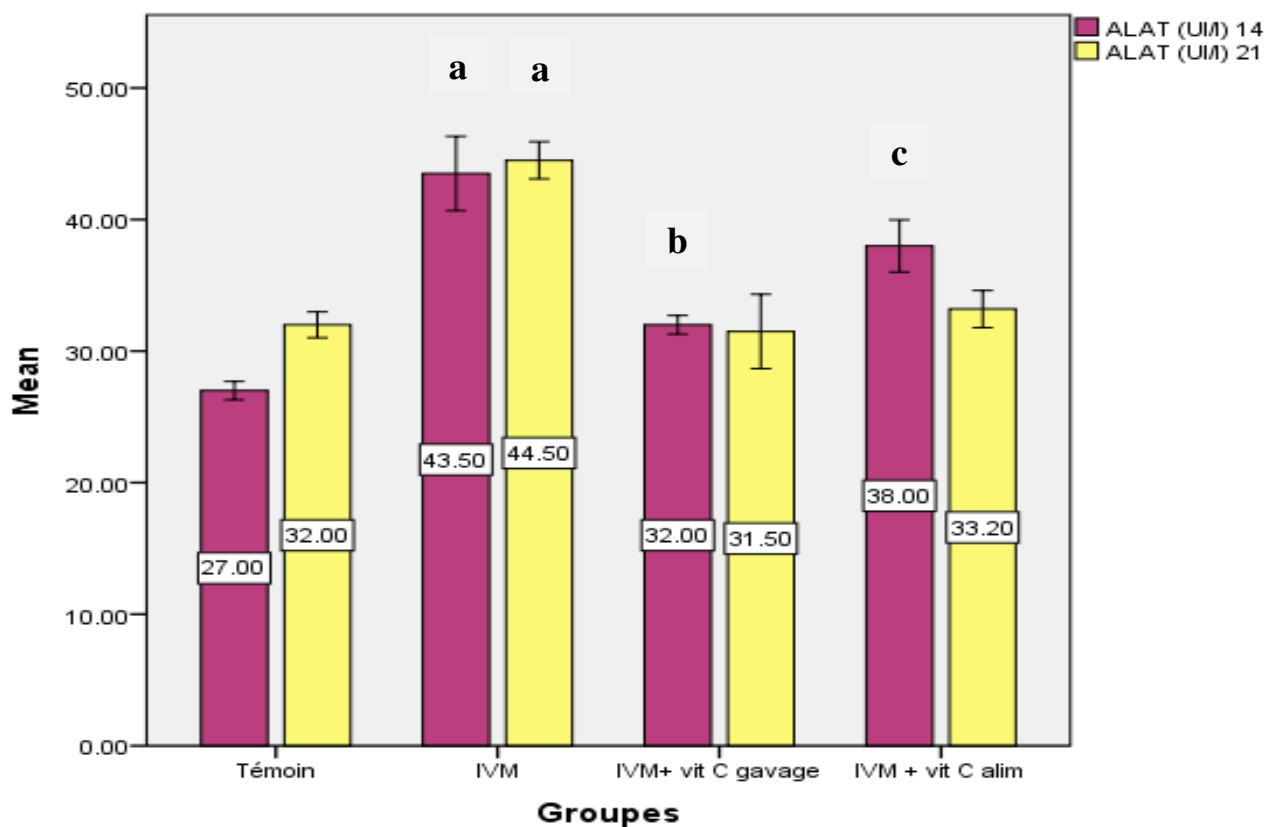


Figure 23 : Variation des taux plasmatiques d'ALAT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

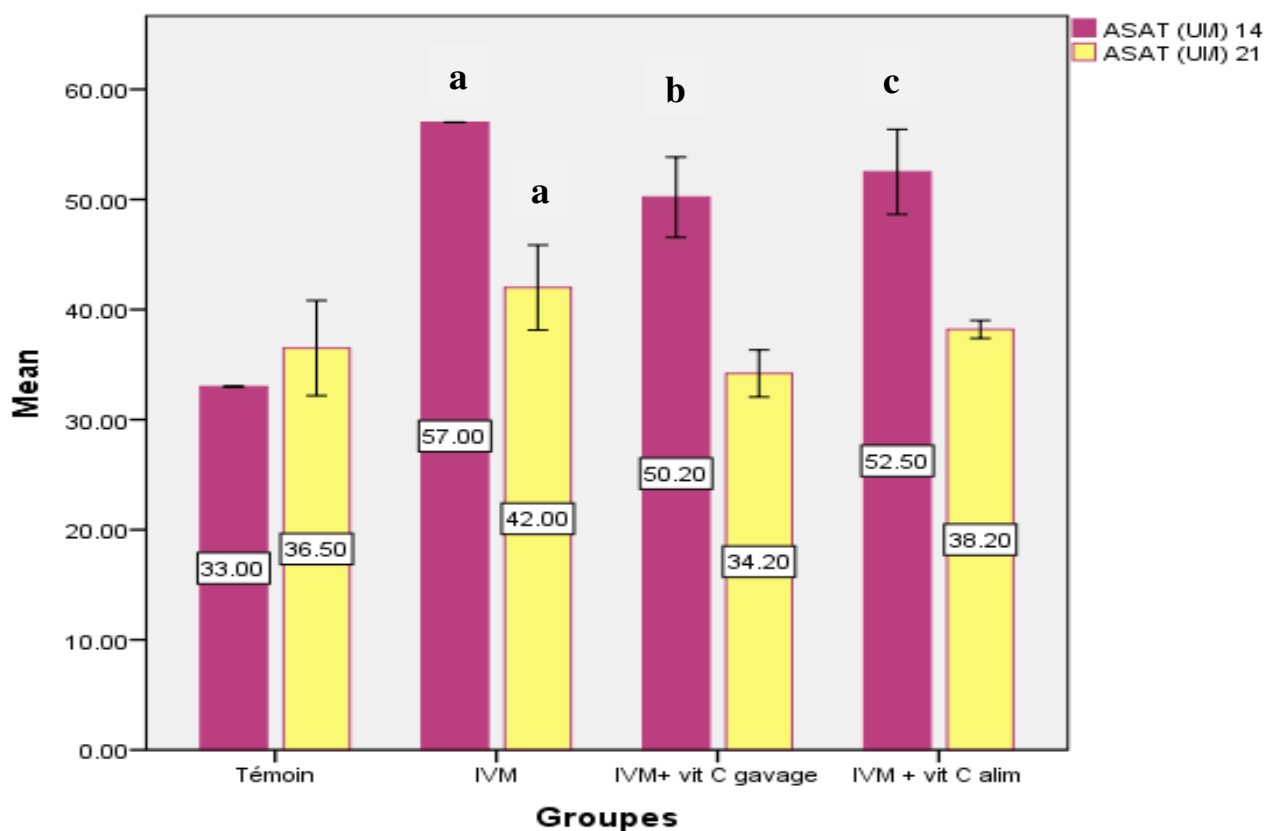


Figure 24 : Variation des taux plasmatiques d'ASAT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

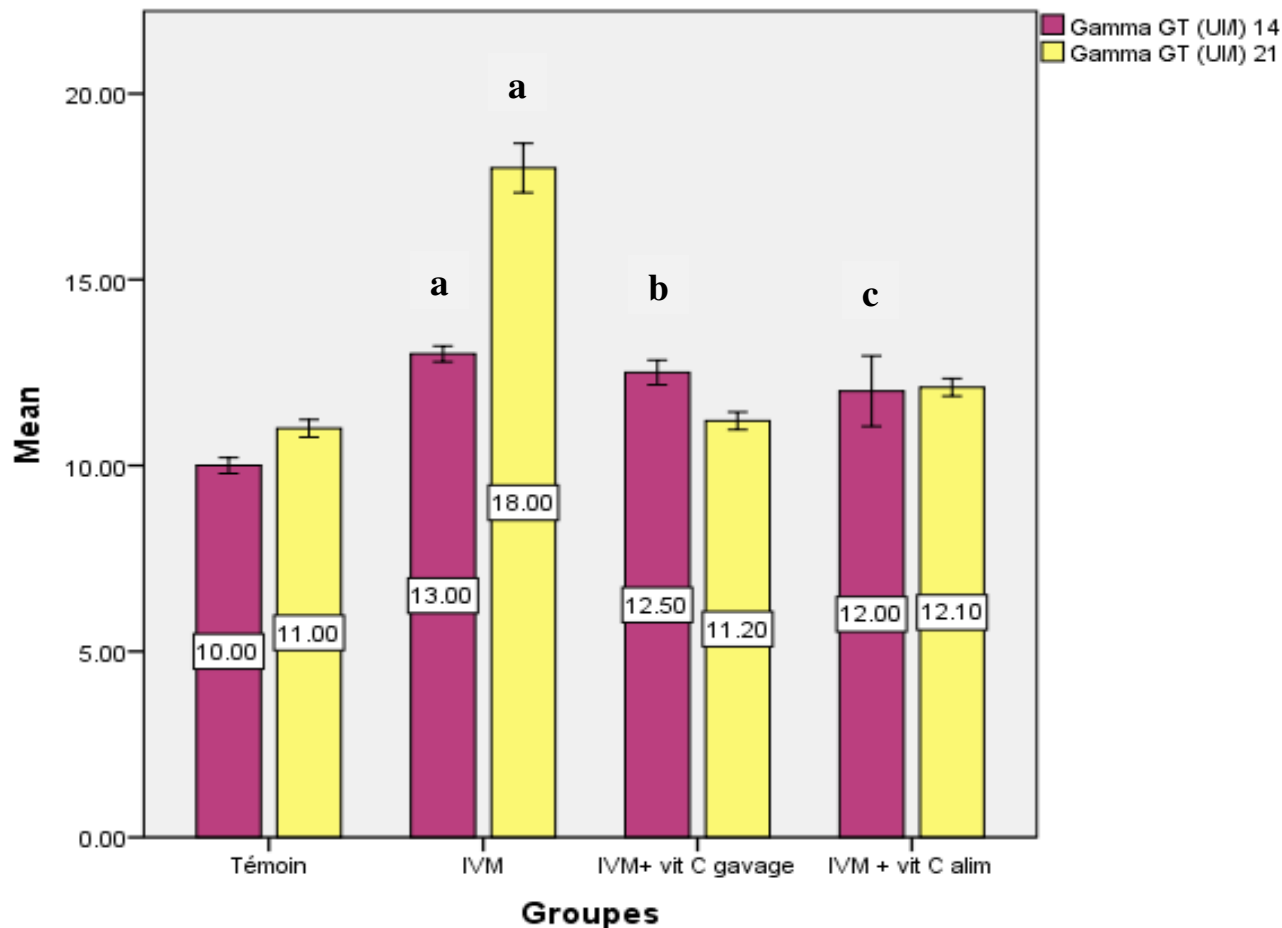


Figure 25 : Variation des taux plasmatiques de γ -GT au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

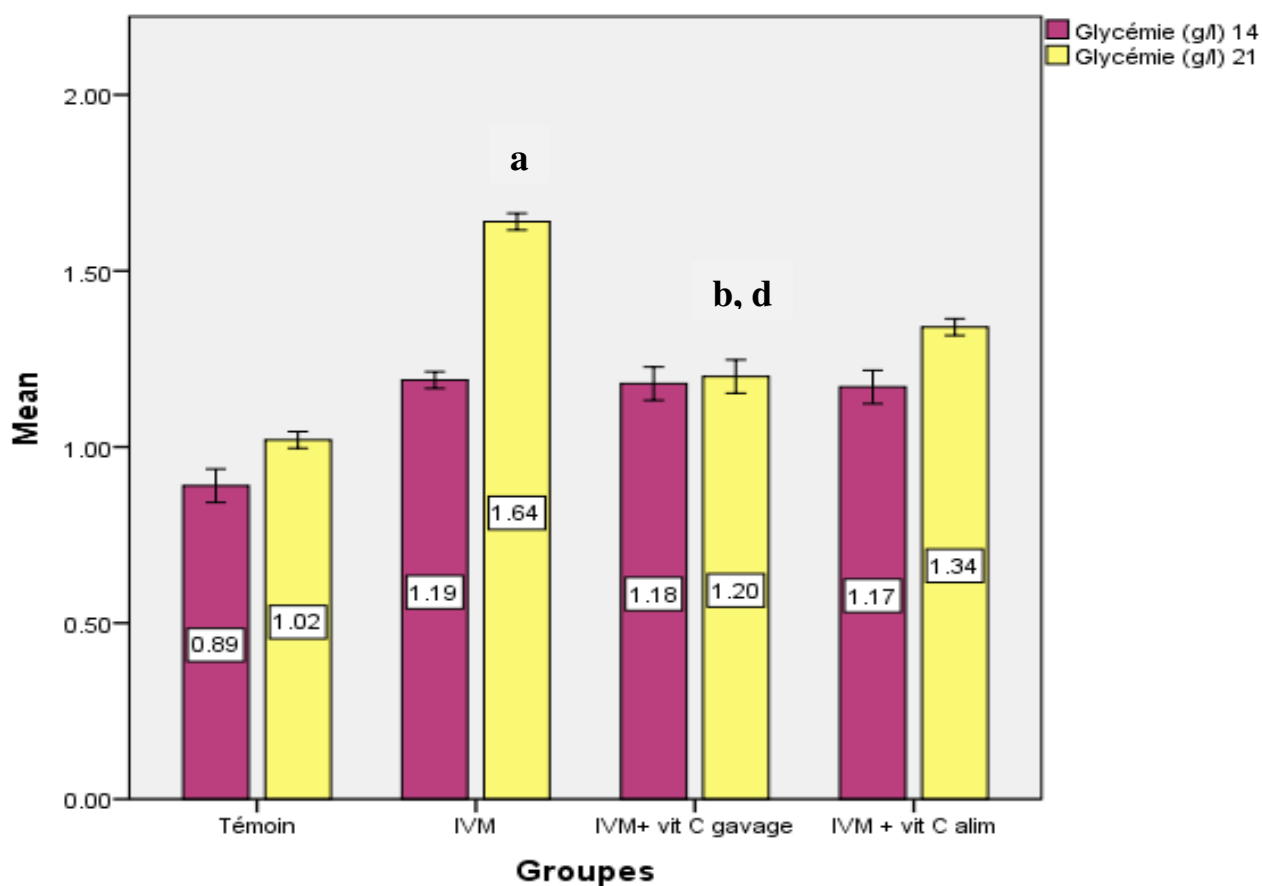


Figure 26 : Variation des taux plasmatiques du glucose au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et d : $p < 0,05$** (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **d** : différence significative entre le groupe IVM + vitamine C (par gavage) et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

1.5.2. Paramètres biochimiques de la fonction rénale

Les résultats de l'analyse biochimique de la fonction rénale (créatinine, urée et acide urique) sont montrés dans le **Tableau 7 (Annexe 3)**.

L'analyse plasmatique des biomarqueurs rénaux au 14^{ème} jour de l'expérimentation a montré une augmentation significative du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au témoin (**Figure 27**). Ce taux continue d'être augmenté au 21^{ème} jour de la période expérimentale. Cependant, les concentrations d'acide urique (**Figure 28**) et d'urée (**Figure 29**) ont révélé une augmentation non significative dans le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin aux 14^{ème} et 21^{ème} jours de la période expérimentale. Uniquement le taux de créatinine plasmatique a été significativement diminué dans le groupe traité par l'IVM + Vitamine C par gavage par rapport au groupe traité par l'IVM.

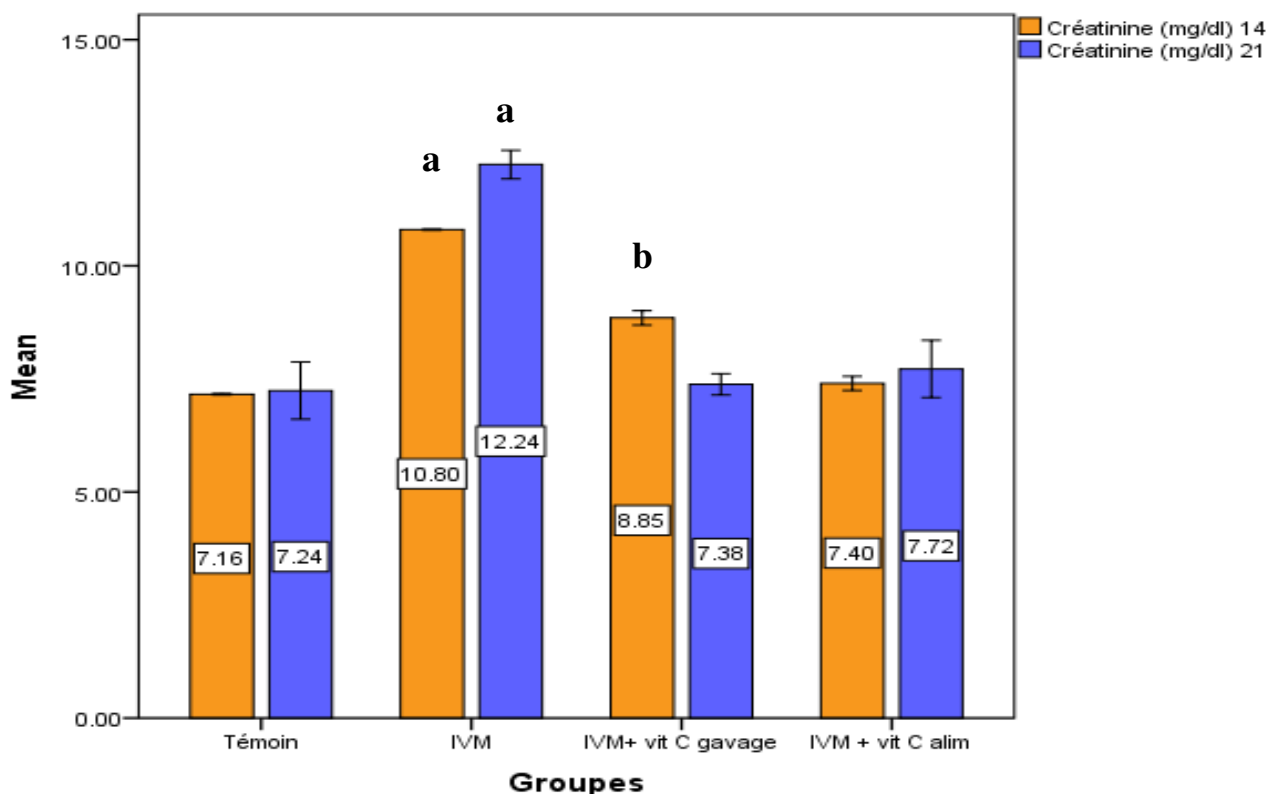


Figure 27 : Variation des taux plasmatiques de créatinine au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a** et **b** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).

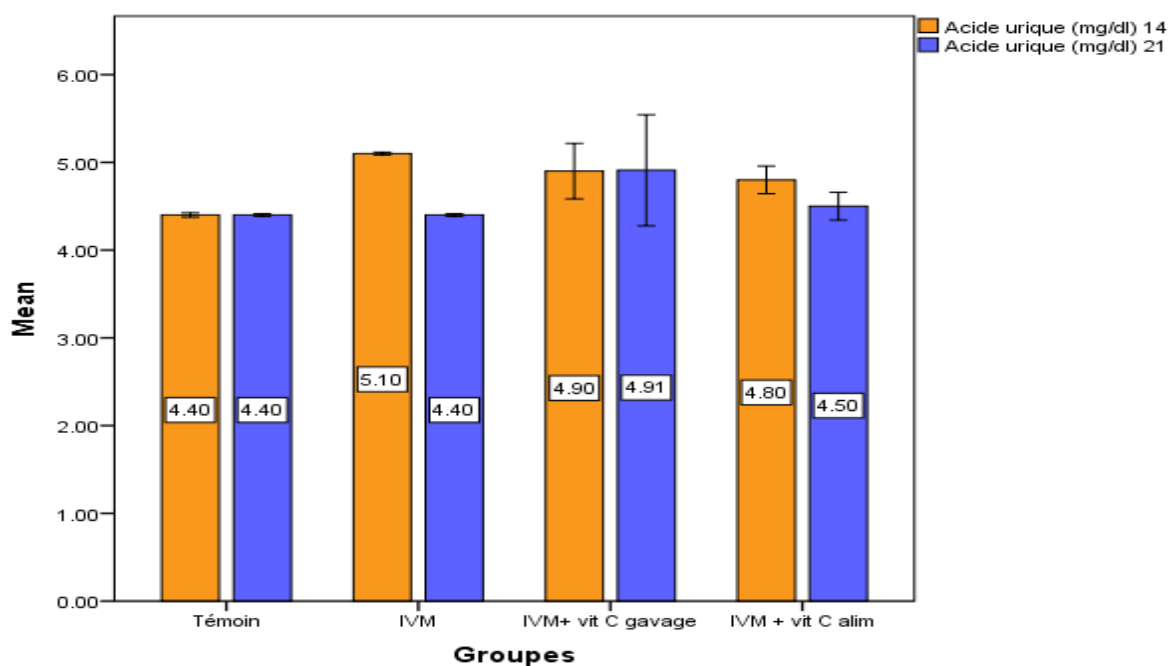


Figure 28 : Variation des taux plasmatiques d'acide urique au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. $p > 0,05$

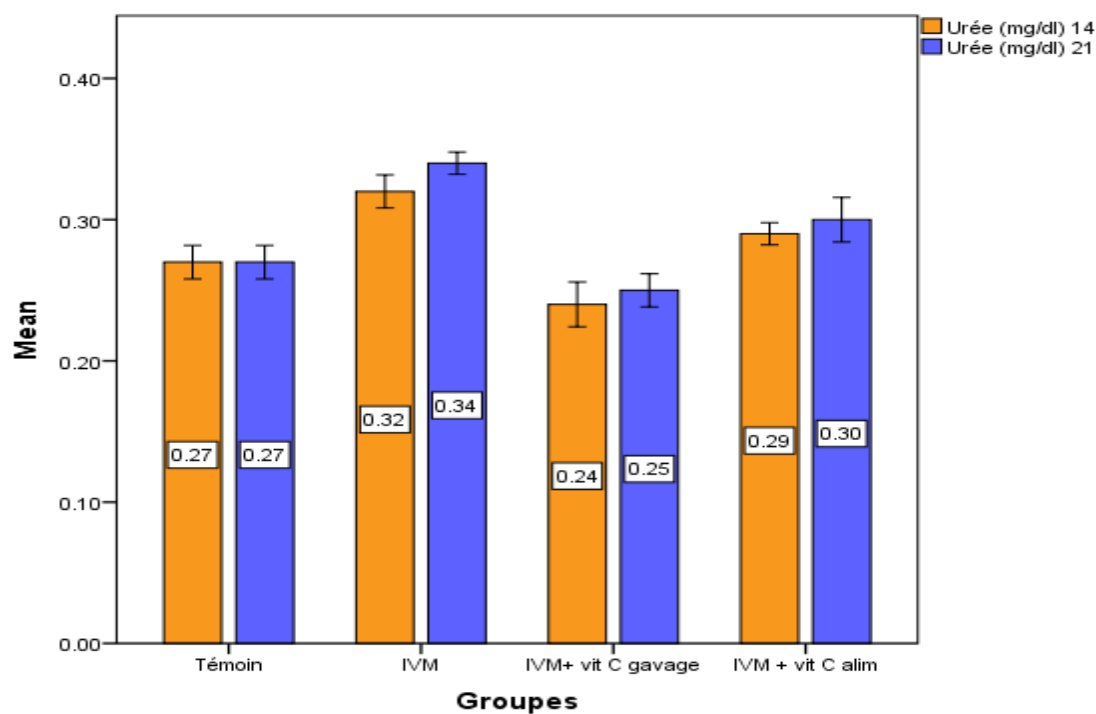


Figure 29 : Variation des taux plasmatiques de l'urée au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. $p > 0,05$

1.5.3. Paramètres biochimiques du bilan lipidique

Comme représenté dans le **Tableau 8**, notre étude a démontré que l'administration de l'IVM a provoqué au 14^{ème} jour du traitement une diminution significative de tous les marqueurs biochimiques de la dyslipidémie (CT (**Figure 30**), TG (**Figure 31**), LDL-C (**Figure 32**) et VLDL-C (**Figure 33**)) et les deux facteurs athérogènes LDL-C / HDL-C et CT / HDL-C, à l'exception du taux plasmatique de HDL-C (**Figure 34**) qui est significativement augmenté par rapport au groupe témoin. Egalement, l'indice athérogène du plasma (IAP) a diminué chez le lapin traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. Cependant la co-administration de la vitamine C par gavage ou additionné à l'aliment a entraîné une correction significative de tous les paramètres lipidiques hormis les taux plasmatiques de HDL-C et l'IAP.

Au 21^{ème} jour de l'expérimentation, uniquement les concentrations de TG, LDL-C et le facteur LDL-C / HDL-C restent diminués d'une manière significative chez le groupe injecté par l'IVM comparativement au groupe témoin. Les valeurs des teneurs plasmatiques des différents paramètres lipidiques chez les lapins co-traités par l'IVM + vitamine C sont proches de celles des lapins témoins, ce qui explique l'effet amélioratif continué de la vitamine C jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Tableau 8 : Paramètres biochimiques du bilan lipidique des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	CT (g/l)	1,05 ± 0,001	0,78 ± 0,001^a	0,86 ± 0,24^b	0,66 ± 0,10
	TG (g/l)	1,75 ± 0,004	0,11 ± 0,002^a	1,17 ± 0,16^b	0,94 ± 0,24^c
	HDL-C (g/l)	0,29 ± 0,003	0,39 ± 0,001^a	0,34 ± 0,07	0,27 ± 0,03
	LDL-C (g/l)	0,41 ± 0,002	0,21 ± 0,003^a	0,30 ± 0,12^b	0,19 ± 0,10^c
	VLDL-C (g/l)	0,35 ± 0,01	0,23 ± 0,04^a	0,24 ± 0,03^b	0,17 ± 0,08^c
	TC/HDL-C	3,62 ± 0,001	2,22 ± 0,003^a	2,49 ± 0,23^b	2,32 ± 0,27^c
	LDL-C/HDL-C	1,41 ± 0,002	0,58 ± 0,001^a	0,82 ± 0,33^b	0,70 ± 0,29^c
	IAP	0,83 ± 0,001	-2,66 ± 0,002	-0,15 ± 0,17	0,15 ± 0,09
21^{ème} jour	CT (g/l)	0,93 ± 0,05	0,83 ± 0,10	0,85 ± 0,17	0,73 ± 0,08
	TG (g/l)	1,10 ± 0,17	0,87 ± 0,12^a	0,90 ± 0,24^b	0,84 ± 0,18
	HDL-C (g/l)	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,06
	LDL-C (g/l)	0,37 ± 0,03	0,28 ± 0,07^a	0,27 ± 0,08^b	0,21 ± 0,07^c
	VLDL-C (g/l)	0,21 ± 0,07	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01
	TC/HDL-C	2,53 ± 0,19	2,34 ± 0,20	2,19 ± 0,37^b	1,82 ± 0,12^c
	LDL-C/HDL-C	1,0 ± 0,11	0,79 ± 0,15^a	0,71 ± 0,23^b	0,47 ± 0,11^c
	IAP	0,11 ± 0,08	-0,17 ± 0,06	-0,20 ± 0,11	-0,17 ± 0,15

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a, b et c: p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

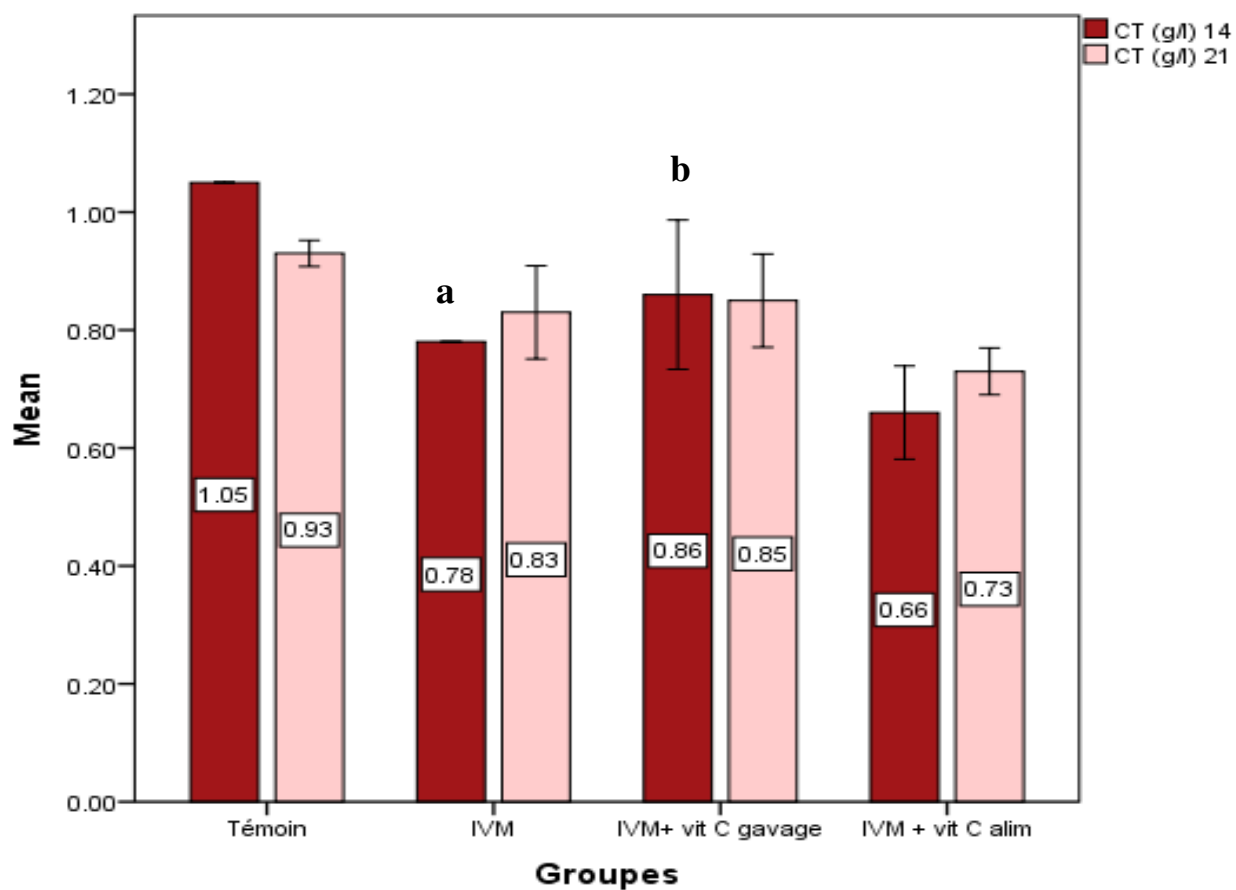


Figure 30 : Variation des taux plasmatiques du cholestérol total (CT) au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a** et **b** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).

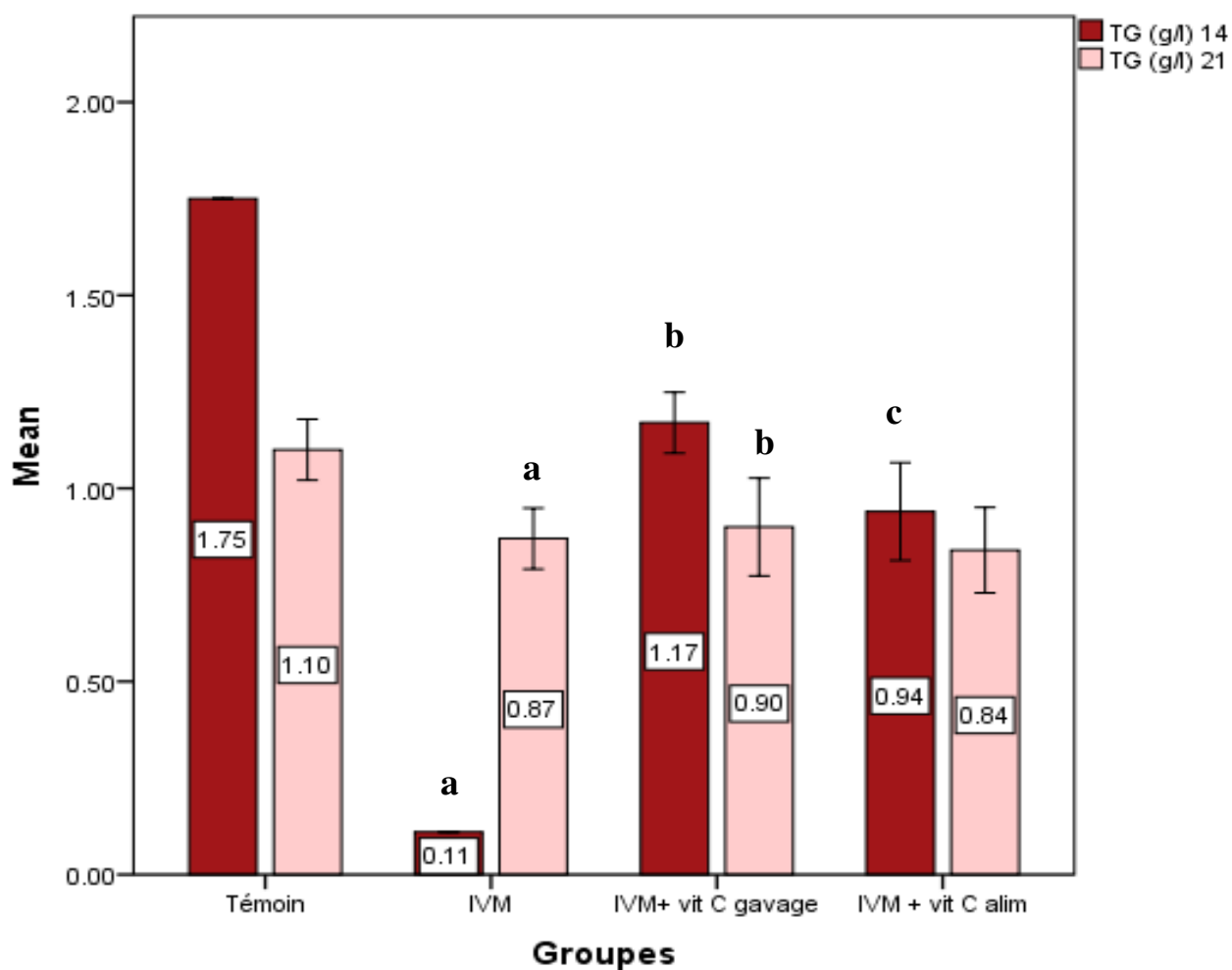


Figure 31 : Variation des taux plasmatiques des triglycérides (TG) au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

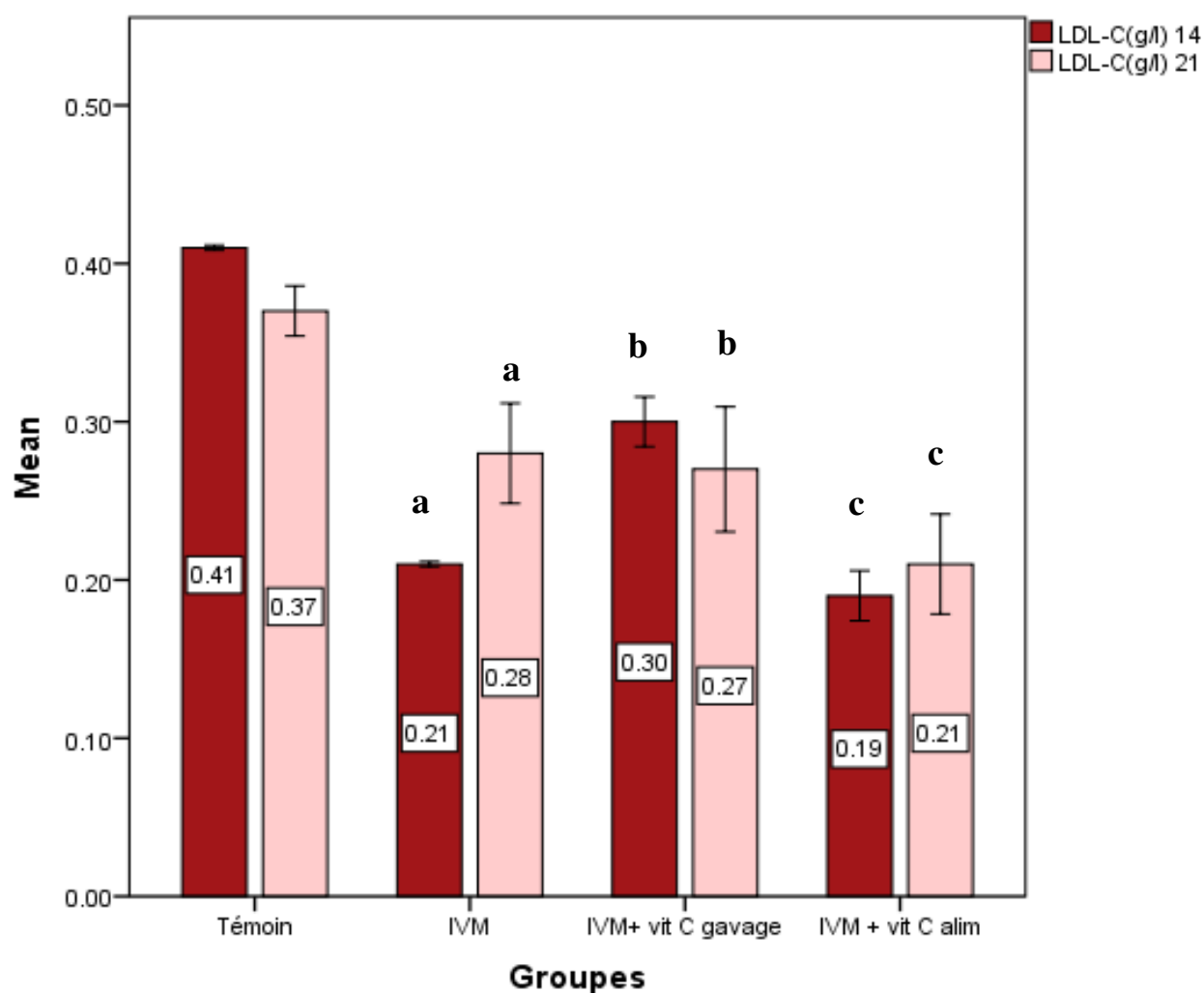


Figure 32 : Variation des taux plasmatiques de LDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

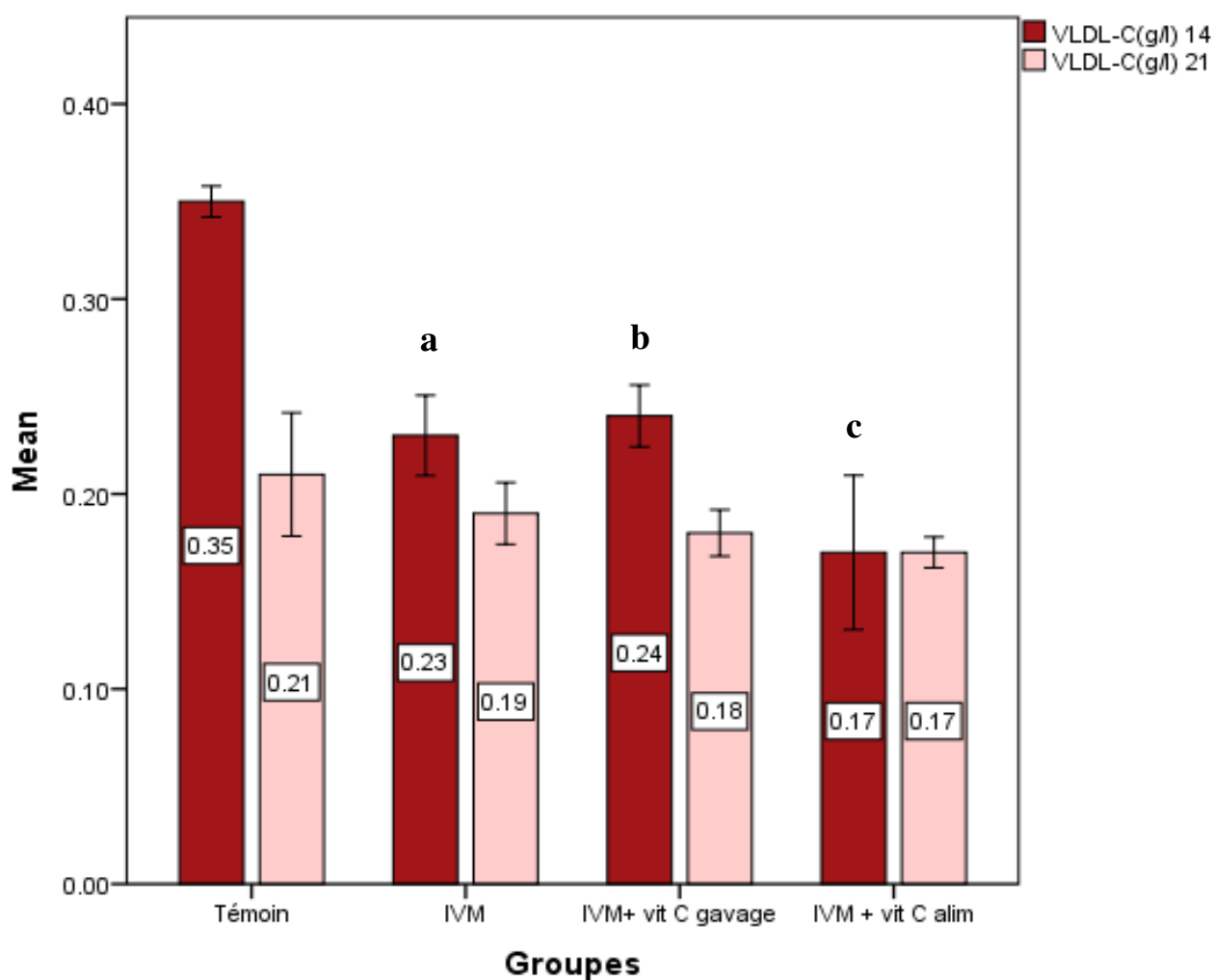


Figure 33 : Variation des taux plasmatiques de VLDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a, b et c** : $p < 0,05$ (**a**: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, **b**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), **c**: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

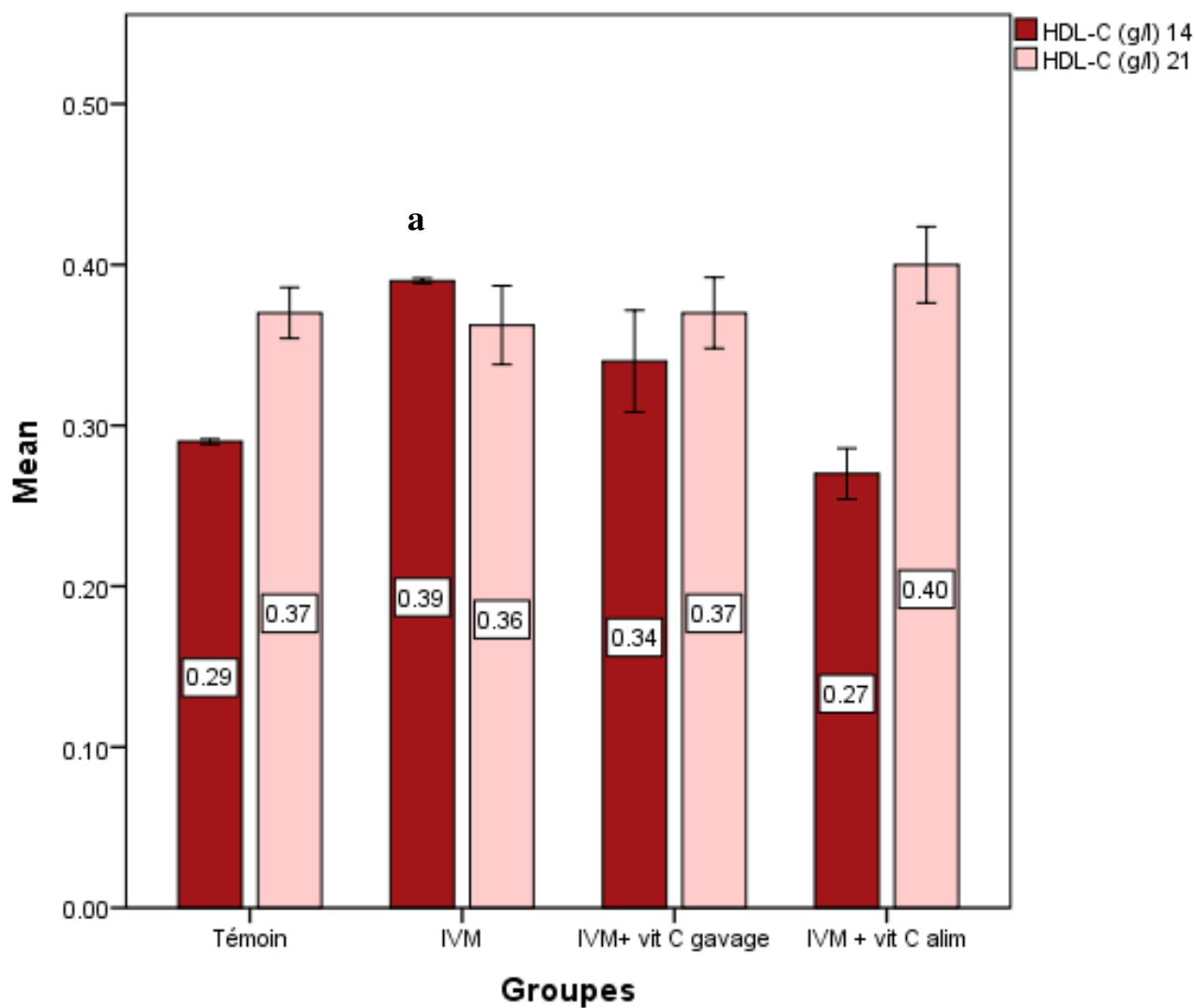


Figure 34 : Variation des taux plasmatiques d'HDL-C au 14^{ème} et 21^{ème} jour de l'expérimentation, chez les lapins témoins et traités. **a: $p < 0,05$** (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin).

1.6. Résultats histologiques

1.6.1. Histopathologie du foie

❖ Histopathologie du foie chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du foie chez les lapins témoins ont montré une architecture hépatique normale.

Le parenchyme hépatique des lapins est composé de plusieurs lobules hépatiques, chaque lobule est de forme polygonale, au centre duquel se trouve la veine centrolobulaire (VCL) et il est limité par plusieurs espaces portes (P) (**Planche 1A**).

A partir de chaque VCL rayonnent des travées d'hépatocytes (H), de forme polygonale avec un noyau central, séparées par de larges canaux vasculaires appelés sinusoides (S) (**Planche 1B**).

❖ Histopathologie du foie chez les lapins traités par l'AVIMEC®

L'examen histologique du foie a révélé chez les animaux traités par l'IVM pendant 21 jours une architecture lobulaire désorganisée (**Planche 2**) par rapport au structure lobulaire des lapins témoins. Cette désorganisation est représentée par :

- Dilatation de la veine centrolobulaire (VCL).
- Dilatation des espaces portes.
- Congestion vasculaire (CV).
- Dilatation des sinusoides (S).
- Altération de la structure des hépatocytes (H).
- Infiltration des cellules inflammatoires (I).

❖ Histopathologie du foie chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

D'après les planches 3 et 4, on a noté que les lapins mâles traités par l'IVM + vitamine C présentent un parenchyme hépatique semblable à celui du groupe témoin.

La **Planche 3** montre une restauration de la structure hépatique chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage comparativement au lot traité par l'IVM.

Selon la **Planche 4**, l'histologie du foie a montré aussi une amélioration remarquable de la structure lobulaire avec une veine centrolobulaire (VCL) et des espaces portes (P) moins dilatés et une faible congestion vasculaire (CV) chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C en aliment.

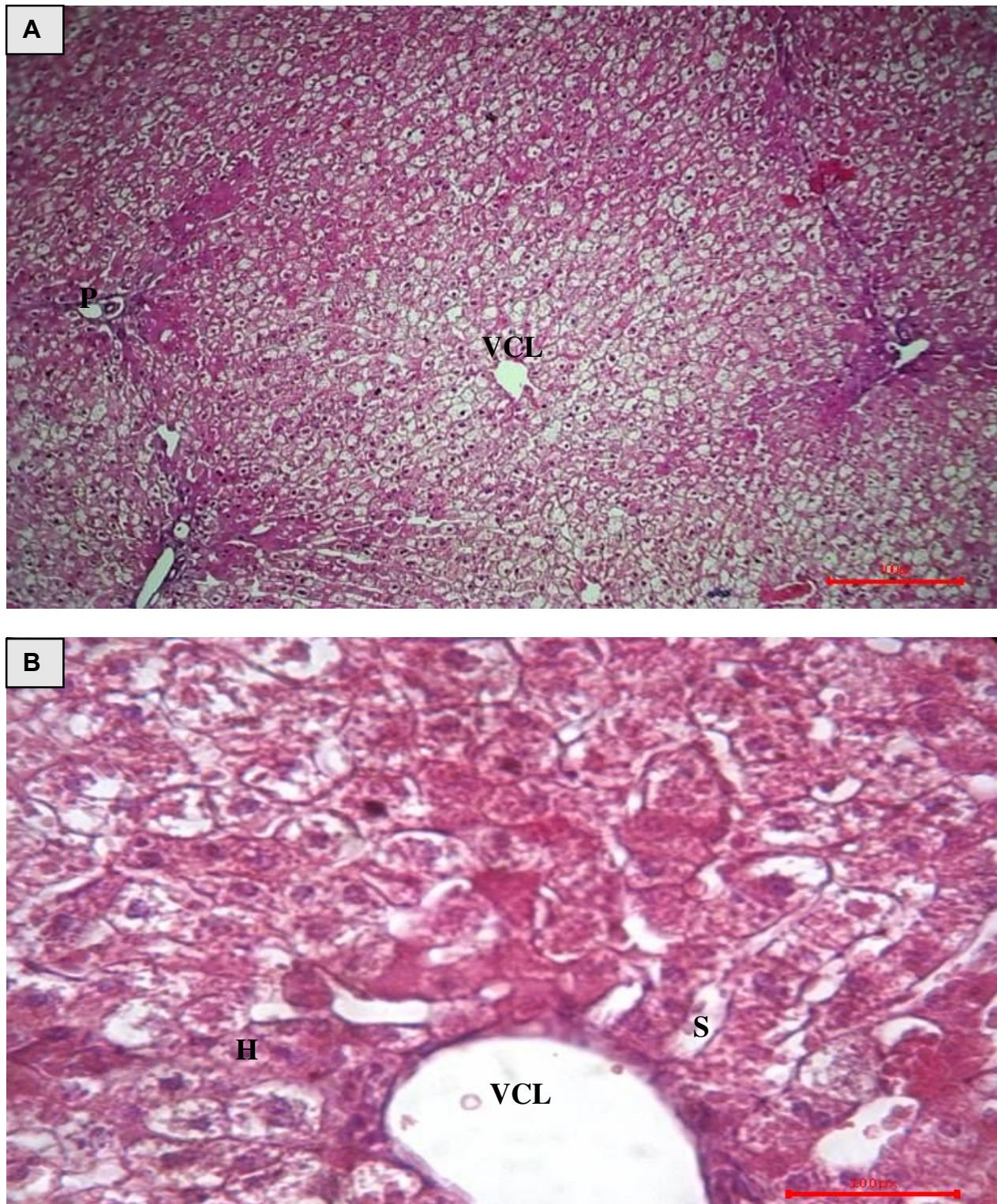


Planche 1 : Aspect histologique du foie des lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : structure régulière du lobule hépatique, au centre duquel se trouve la veine centrolobulaire (VCL) et il est limité par les espaces portes (P). le lobule est formé par des travées d'hépatocytes (H) et des sinusoides (S).

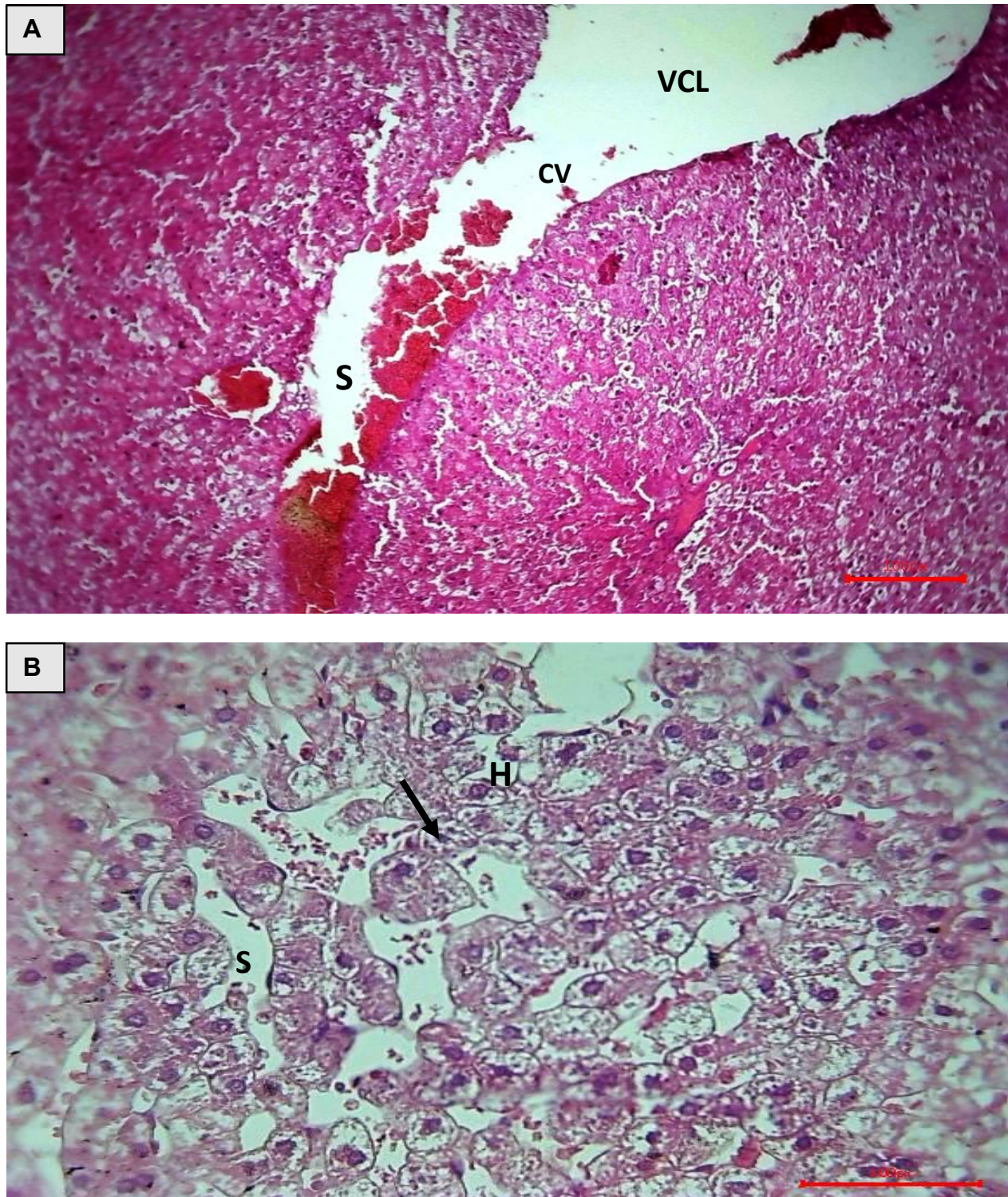


Planche 2 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM (2mg/kg p.c.) . Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : Veine centrolobulaire dilatée (VCL), élargissement des espaces porte et congestion vasculaire (CV). Dilatation des sinusoides (S), désorganisation des hépatocytes (H) et infiltration des cellules inflammatoires (flèche).

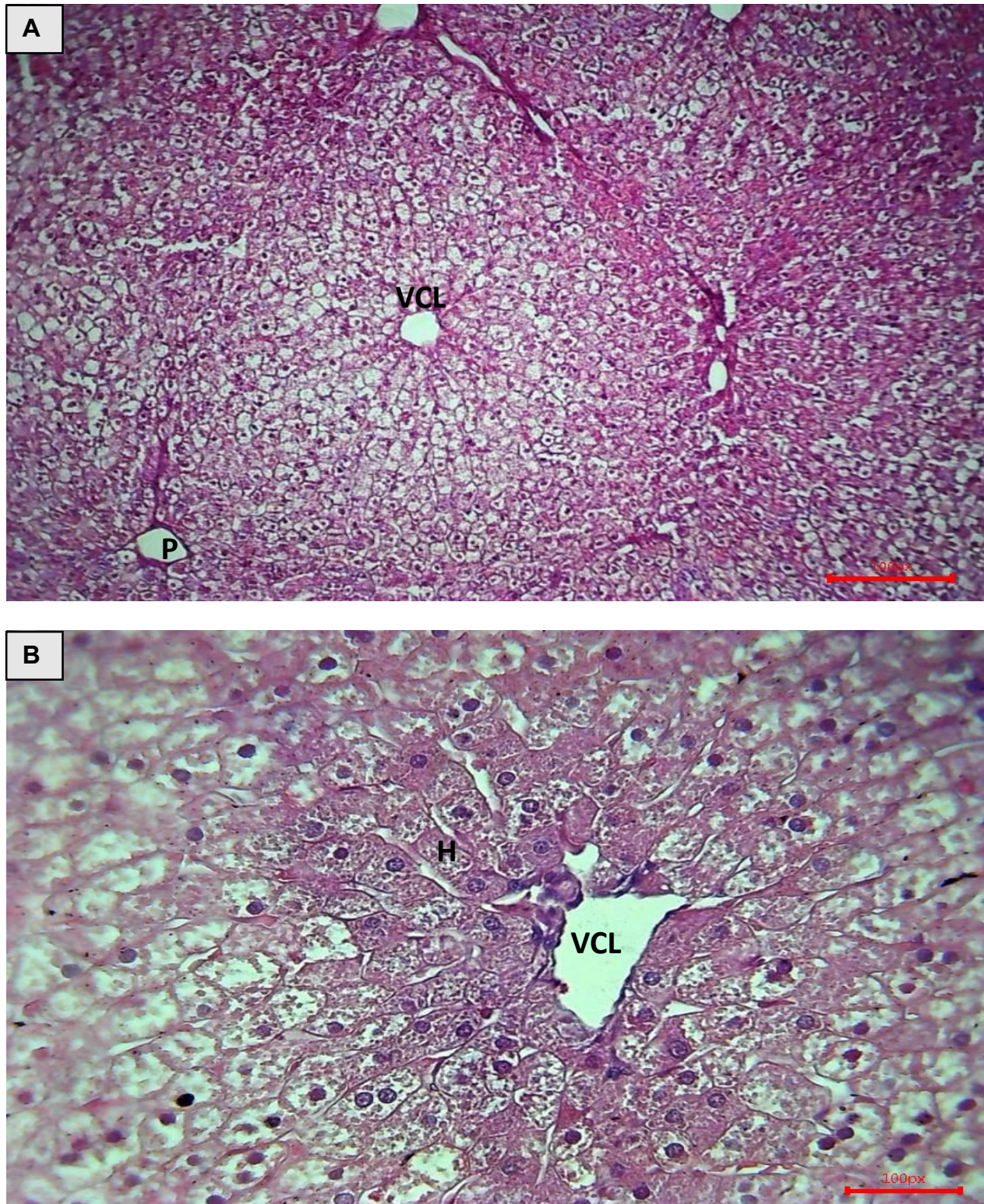


Planche 3 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : amélioration de la structure lobulaire avec une veine centrolobulaire (VCL) moins dilatée et structure normale des travées hépatocytaires (H).

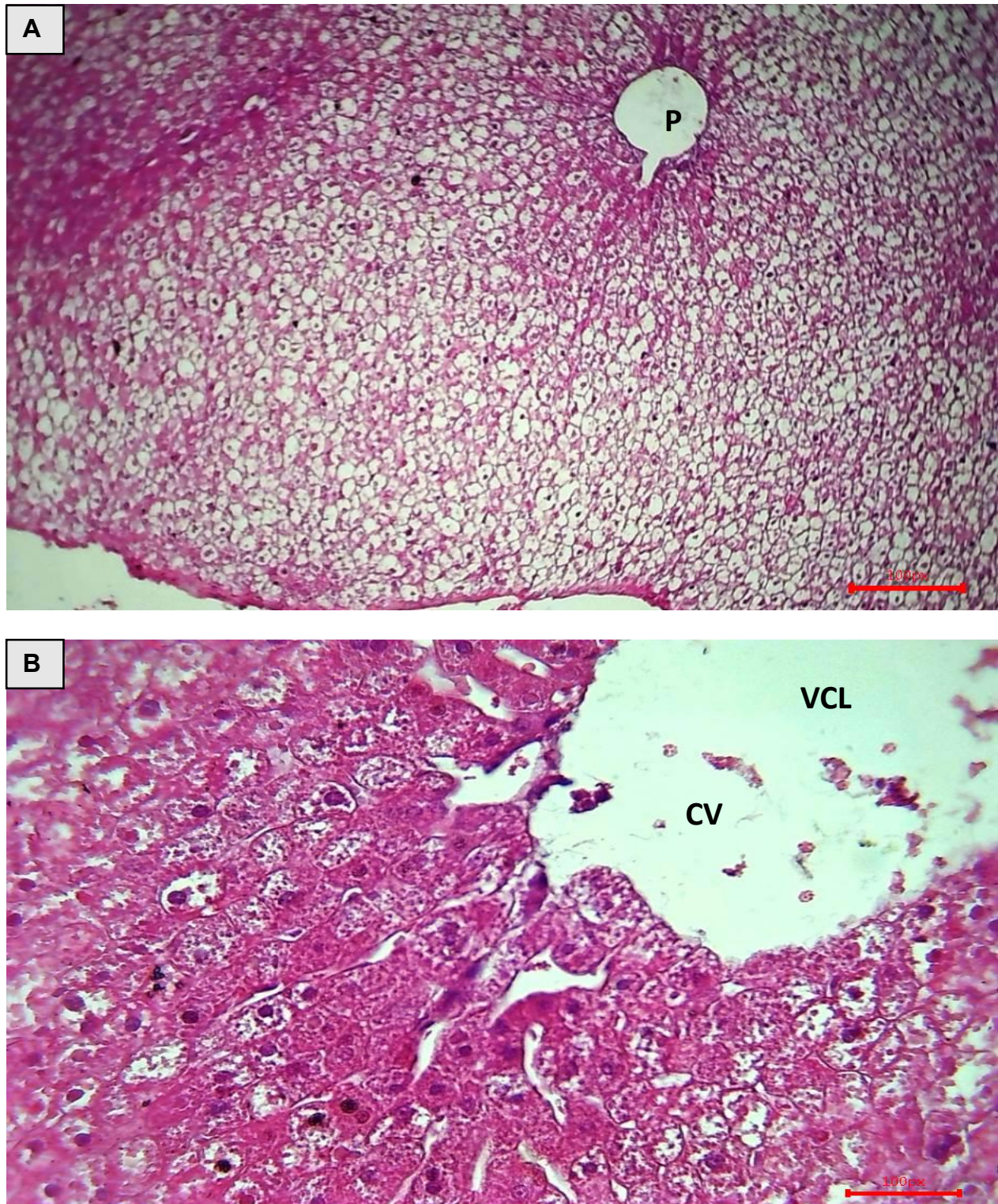


Planche 4 : Aspect histologique du foie des lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : restauration de l'architecture du lobule hépatique avec une veine centrolobulaire (VCL) et des espaces portes (P) moins dilatées et une faible congestion vasculaire (CV).

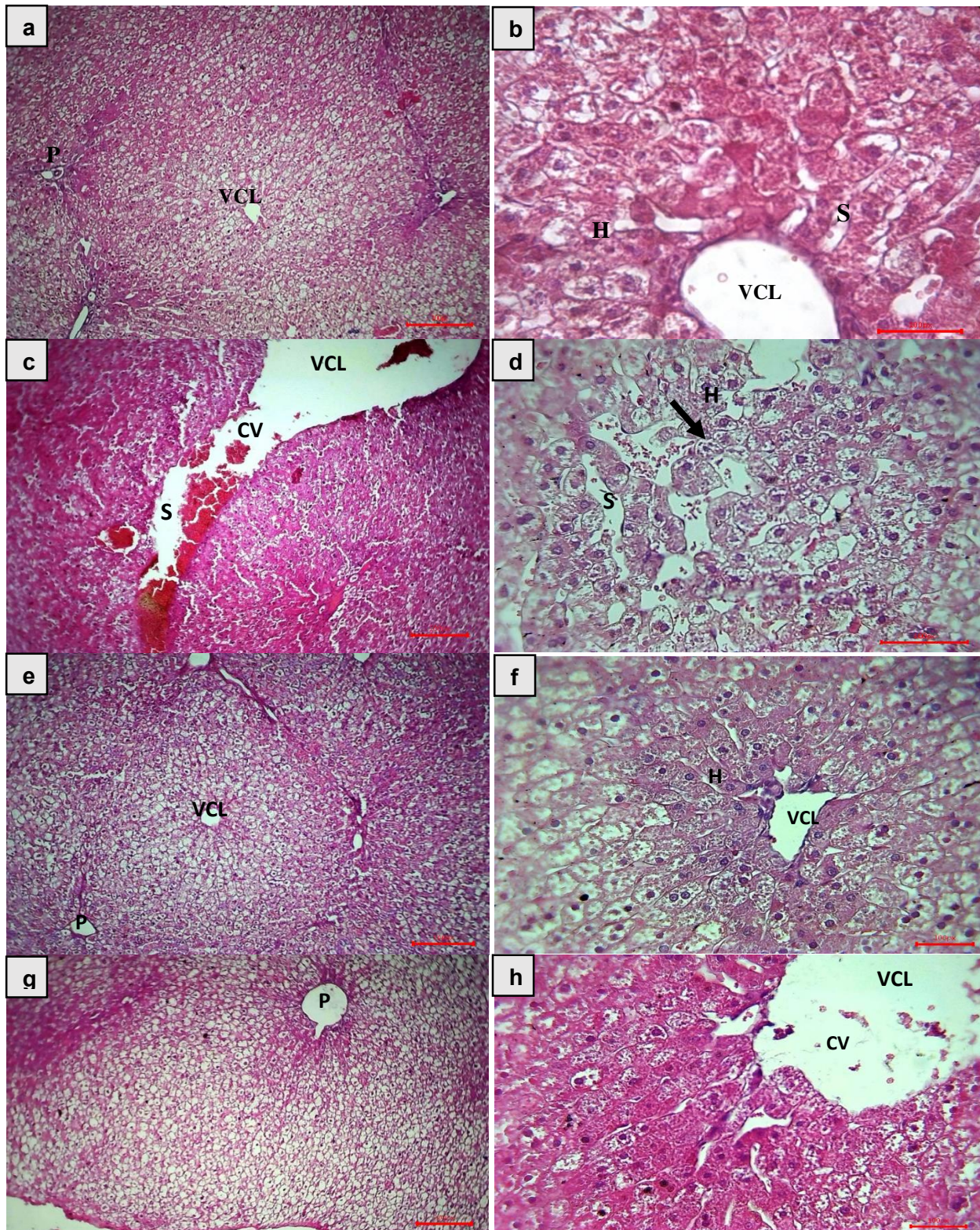


Planche 5 : Aspect histologique du foie des lapins témoins (a et b) montrant une architecture lobulaire normale avec une veine centrolobulaire (CV) et une structure normale des hépatocytes (H) et des sinusoides hépatiques (S). Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant une perte de l'architecture normale des hépatocytes, une veine centrolobulaire dilatée et congestionnée (CV), des sinusoides hépatiques dilatés (S) et un infiltrat des cellules inflammatoires (flèche). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e et f) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (g et h) montrant une veine centrolobulaire (CV) et un espace porte (P) normales avec restauration de la structure des hépatocytes (H). Coloration H&E : (a, c, e et g) $\times 100$ et (b, d, f et h) $\times 400$.

1.6.2. Histopathologie du rein

❖ Histopathologie du rein chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du rein chez les lapins témoins ont illustré une structure typique du cortex rénal (**Planche 6**) qui est caractérisée par :

- Le cortex rénal est limité par la capsule rénale (C).
- Histologie normale des glomérules (G) ou corpuscules rénaux qui tendent à se disposer perpendiculairement à la capsule rénale. La capsule de Bowman est une paroi périphérique composée de deux feuillets avec la chambre glomérulaire (CG) au milieu.
- La plus grande partie du tissu qui entoure les glomérules (G) est constituée de tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).

❖ Histopathologie du rein chez les lapins traités par l'AVIMEC®

Selon la **Planche 7**, le cortex rénal des lapins traités par l'AVIMEC® pendant 3 semaines, a révélé une altération du parenchyme rénal à savoir :

- Vacuolisation dans les cellules tubulaires.
- Dilatation de la chambre glomérulaire (DCG).
- Dilatation des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).
- Congestion vasculaire (CV).
- Dilatation des vaisseaux sanguins.
- Hémorragies (H).
- Infiltration des cellules inflammatoires (I).

❖ Histopathologie du rein chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

Comme illustré dans la **Planche 8**, la structure du cortex rénal chez les animaux traités par l'IVM + vitamine C (par gavage ou dans l'aliment) a montré une architecture moins altérée.

Dans ces deux groupes, la chambre glomérulaire (CG) et les tubules rénaux sont moins dilatés, la congestion vasculaire (CV) est faible en comparaison avec le parenchyme rénal des animaux traités seulement par l'IVM.

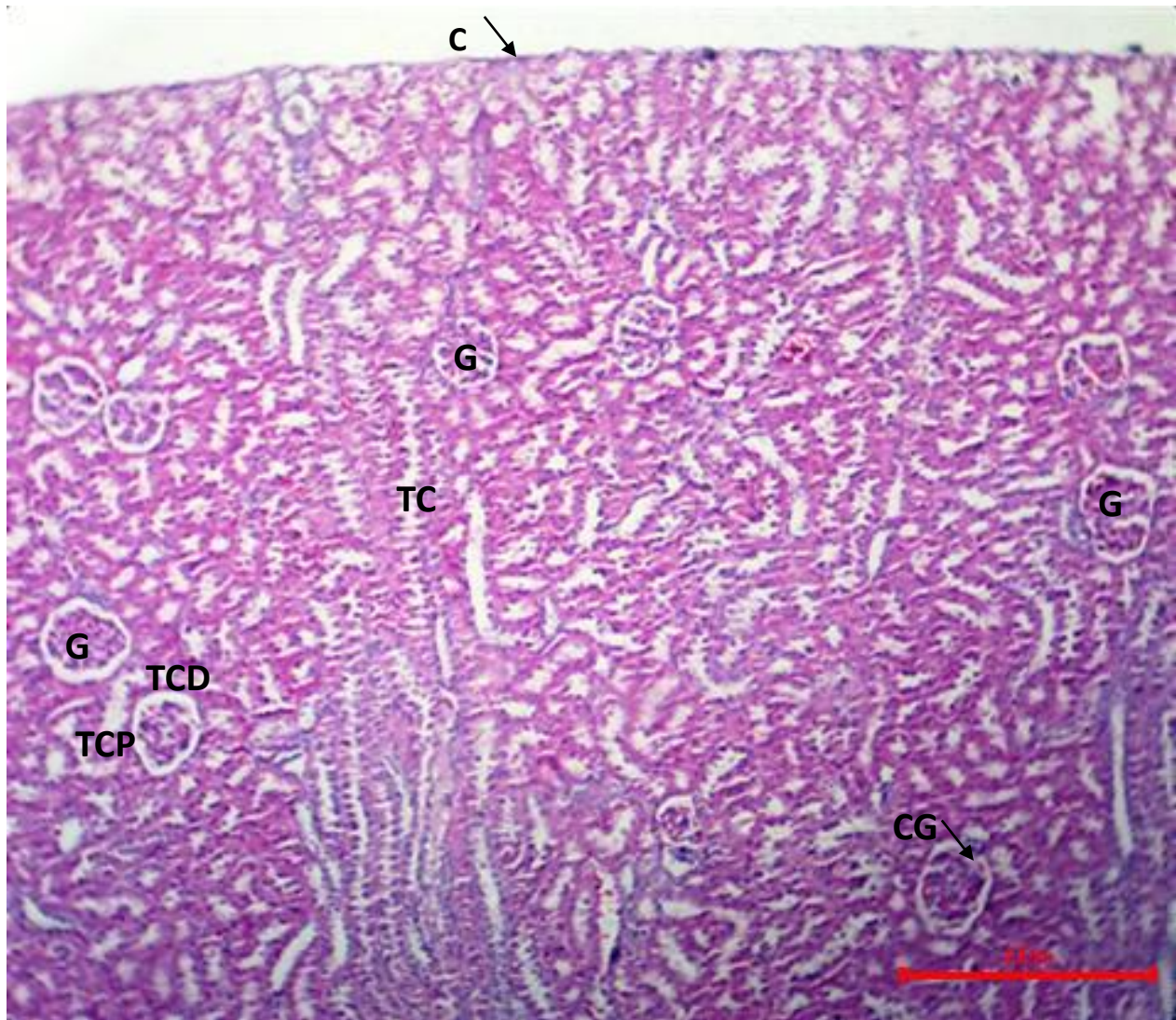


Planche 6 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100. Coloration H&E. légende : un aspect normal du cortex rénal limité par la capsule rénale (C). Une architecture typique des glomérules (G), de la chambre glomérulaire (CG), des tubes collecteurs (TC) et des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD).

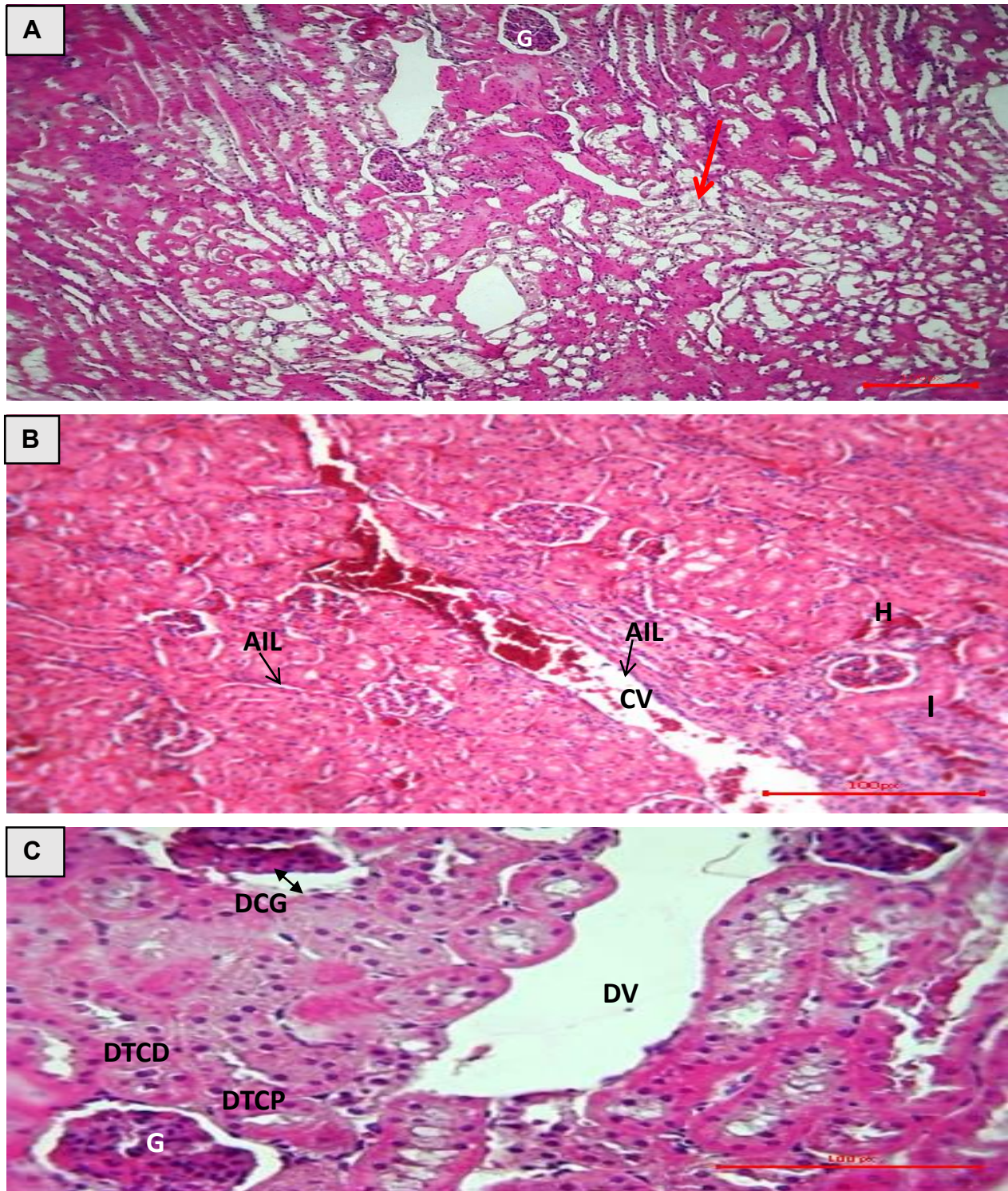


Planche 7 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B), Gx400 (C). Coloration H&E. légende : un cortex rénal présentant des lésions graves avec vacuolisation dans les cellules tubulaires (flèche). Congestion vasculaire (CV) de l'artère interlobaire (AIL), hémorragies (H) et infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires (I). Dilatation vasculaire (DV), dilatation de la chambre glomérulaire (DCG) qui limite le glomérule (G), dilatation des tubules contournés proximaux (DTCP) et distaux (DTCD).

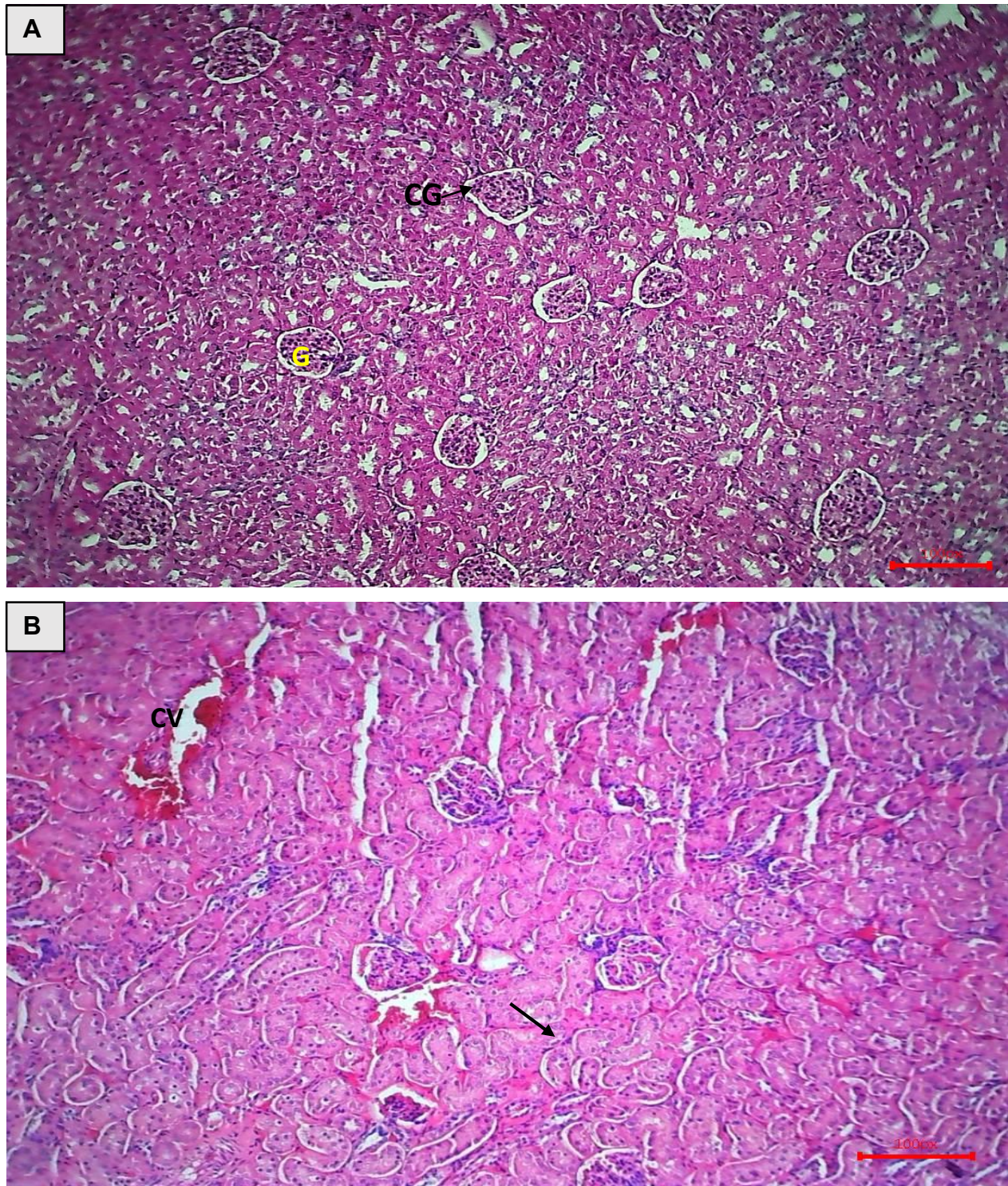


Planche 8 : Aspect histologique du cortex rénal chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A: par gavage, B : supplémentée en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. légende : Aspect normal des glomérules avec une chambre glomérulaire (CG) moins dilatée. Une congestion vasculaire (CV) faible et des tubules rénaux moins dilatés (flèche).

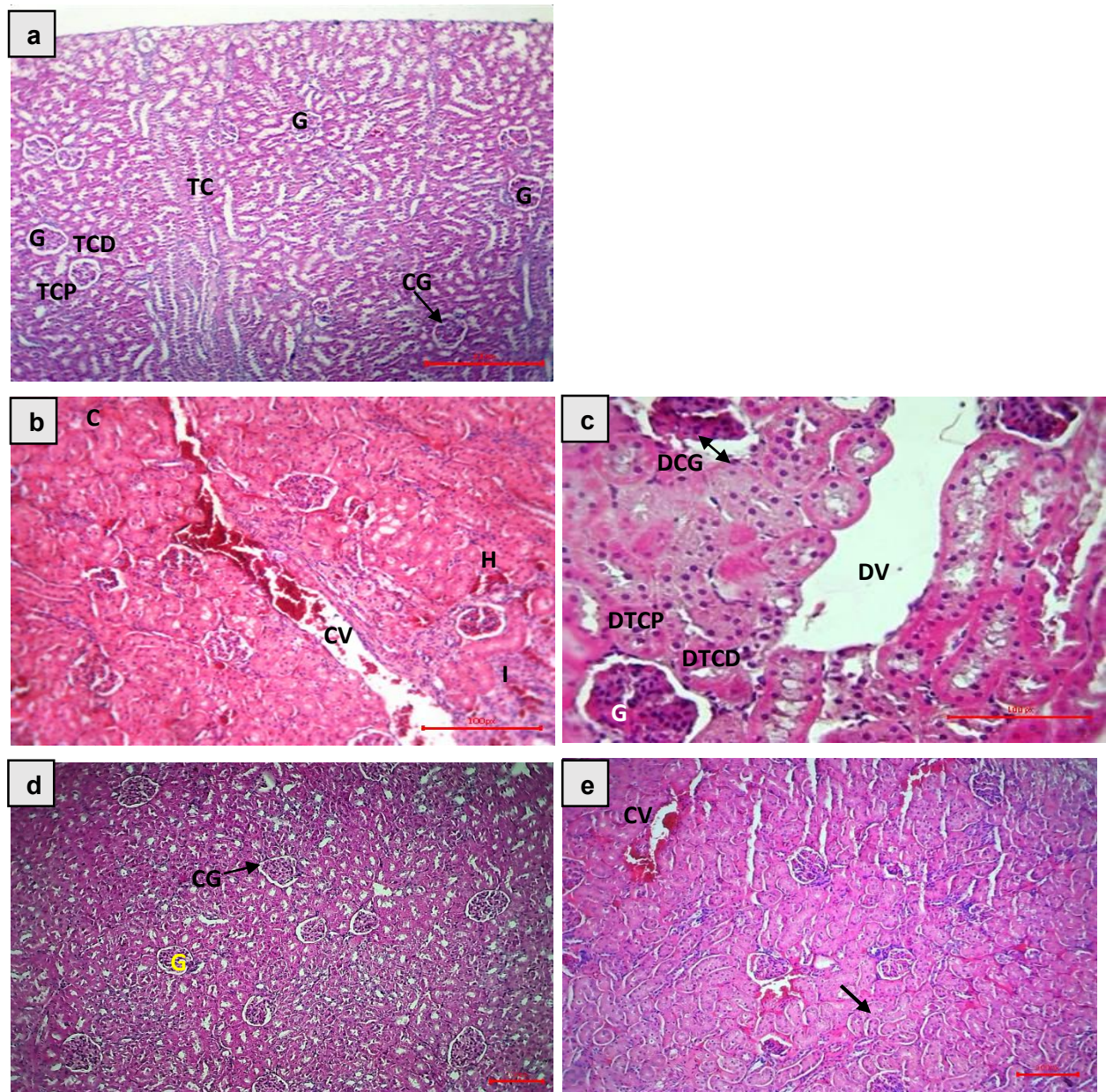


Planche 9 : Aspect histologique du cortex rénal des lapins témoins (a) montrant un aspect normal du cortex rénal limité par la capsule rénale. Une architecture typique des glomérules (G), de la chambre glomérulaire (CG), des tubes collecteurs (TC) et des tubules contournés proximaux (TCP) et distaux (TCD). Du groupe traité par l'IVM (b et c), montrant une congestion vasculaire (CV) de l'artère interlobaire, hémorragies (H), infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires (I), dilatation vasculaire (DV), dilatation de la chambre glomérulaire (DCG) qui limite le glomérule (G) et dilatation des tubules contournés proximaux (DTCP) et distaux (DTCD). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (d) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (e) montrant un aspect normal des glomérules avec une chambre glomérulaire (CG) moins dilatée. Une congestion vasculaire (CV) faible et des tubules rénaux moins dilatés (flèche). Coloration H&E : (a, b, d et e) $\times 100$ et (c) $\times 400$.

1.6.3. Histopathologie du poumon

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins témoins

Selon les coupes histologiques montrées dans la **Planche 10**, le poumon des lapins témoins est caractérisé par une architecture normale de ses différents composants comme suivant :

- La bronche intrapulmonaire (BI) est identifiée par les plaques environnantes du cartilage hyalin (C) et elle est tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudo-stratifié dont la lumière montre des plis muqueux.
- La bronchiole (B) est caractérisée par sa lumière tapissée par un épithélium cilié cylindrique pseudo-stratifié avec des plis muqueux. Par contre les plaques du cartilage hyalin sont absentes.
- La bronchiole respiratoire (BR) est directement liée aux canaux alvéolaires qui se terminent par des sacs d'alvéoles pulmonaires (A).

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins traités par l'AVIMEC®

Chez le groupe traité par l'IVM, le tissu pulmonaire a révélé une modification sévère des différentes structures pulmonaires (**Planche 11**) dont les plus marquées sont :

- Une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux et une altération des plaques du cartilage hyalin.
- Dilatation des bronches (B) et épaississement de leurs épithéliums.
- Dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaississement de leurs parois
- Dilatation et épaississement des bronchioles respiratoires (BR).
- Hémorragies pulmonaires (H)
- Congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire

❖ Histopathologie du poumon chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C

Après co-administration de la vitamine C avec l'IVM, l'histologie pulmonaire a montré une amélioration importante des différentes lésions pulmonaires causées par l'IVM injecté seul. Ces modifications sont représentées par les **Planches 12 et 13**.

Selon la **Planche 12**, le poumon des lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage a montré :

- une BI semblable à celle du lapin témoin qui est entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers.
- Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP).
- Une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B).

D'après la **Planche 13**, la structure des différents tissus composant le poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (en aliment) a illustré un rétablissement de l'histologie pulmonaire qui est caractérisée par des bronchioles respiratoires (BR), des sacs alvéolaires et des alvéoles (A) moins dilatés avec une paroi moins épaisse par rapport au groupe traité par l'IVM seul.

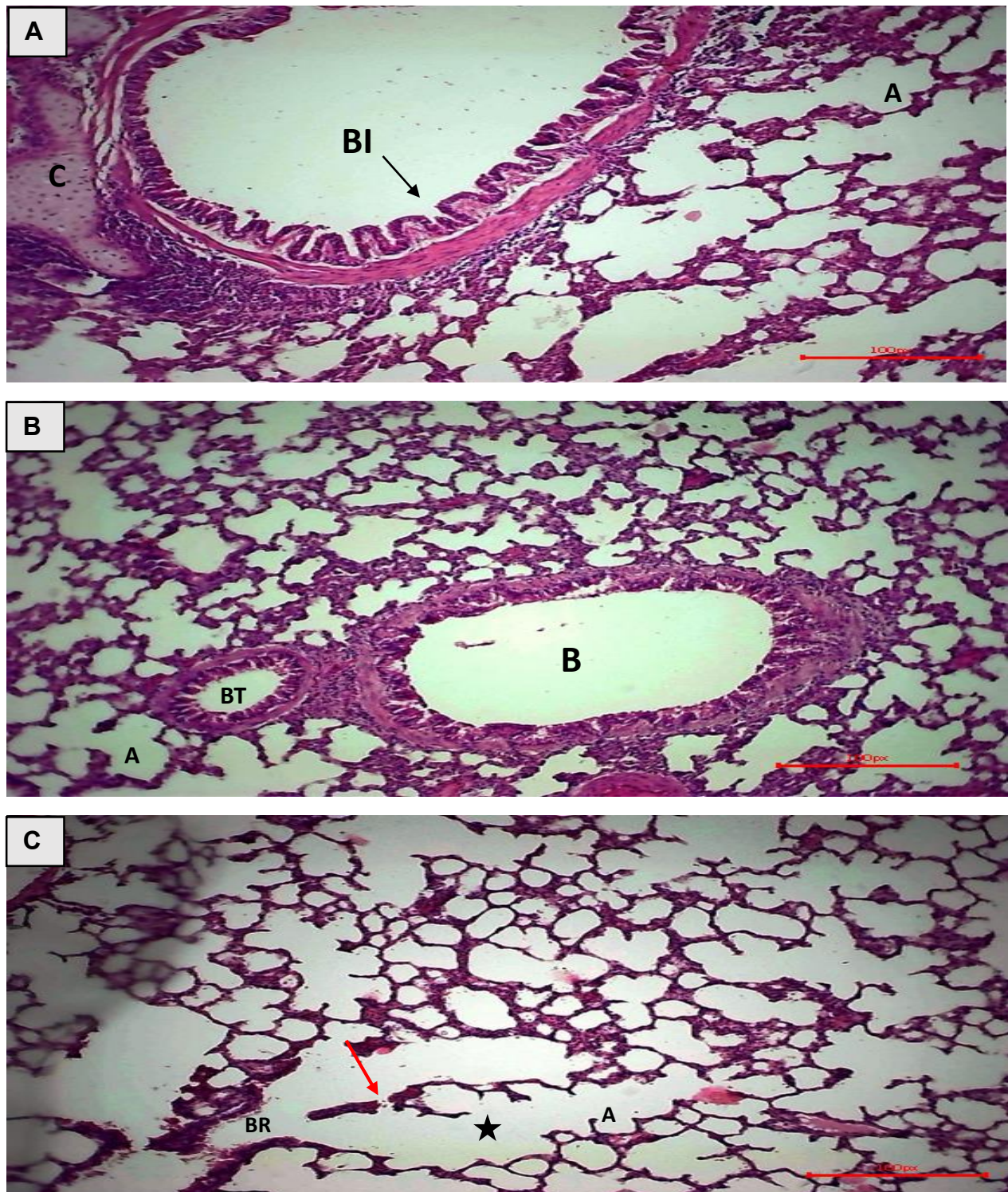


Planche 10 : Aspect histologique du poumon chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (B et C), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : Architecture normale : de l'épithélium de la branche intrapulmonaire (BI) avec des plis muqueux (flèche noire) et des plaques environnantes de cartilage hyalin (C), de bronchiole pulmonaire (B), de bronchiole terminale (BT), de bronchiole respiratoire (BR), des canaux alvéolaires (flèche rouge), des sacs alvéolaires (étoile) et des alvéoles (A).

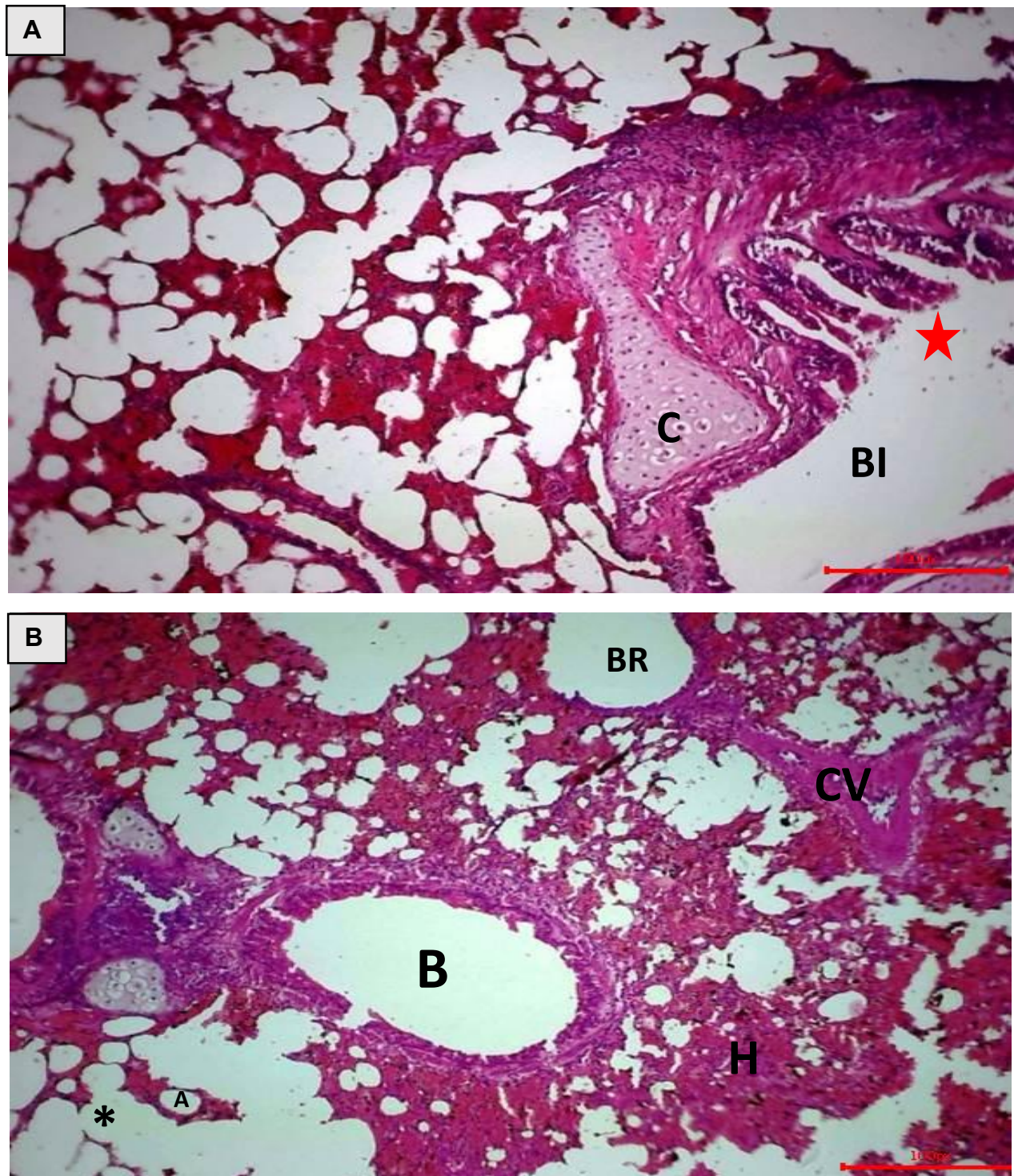


Planche 11 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : Une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux (étoile) et une altération des plaques du cartilage hyalin (C). Dilatation des bronches (B) et épaississement de leurs épithéliums. Dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaississement de leurs parois. Dilatation et épaississement des bronchioles respiratoires (BR). Hémorragies pulmonaires (H). Congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire.

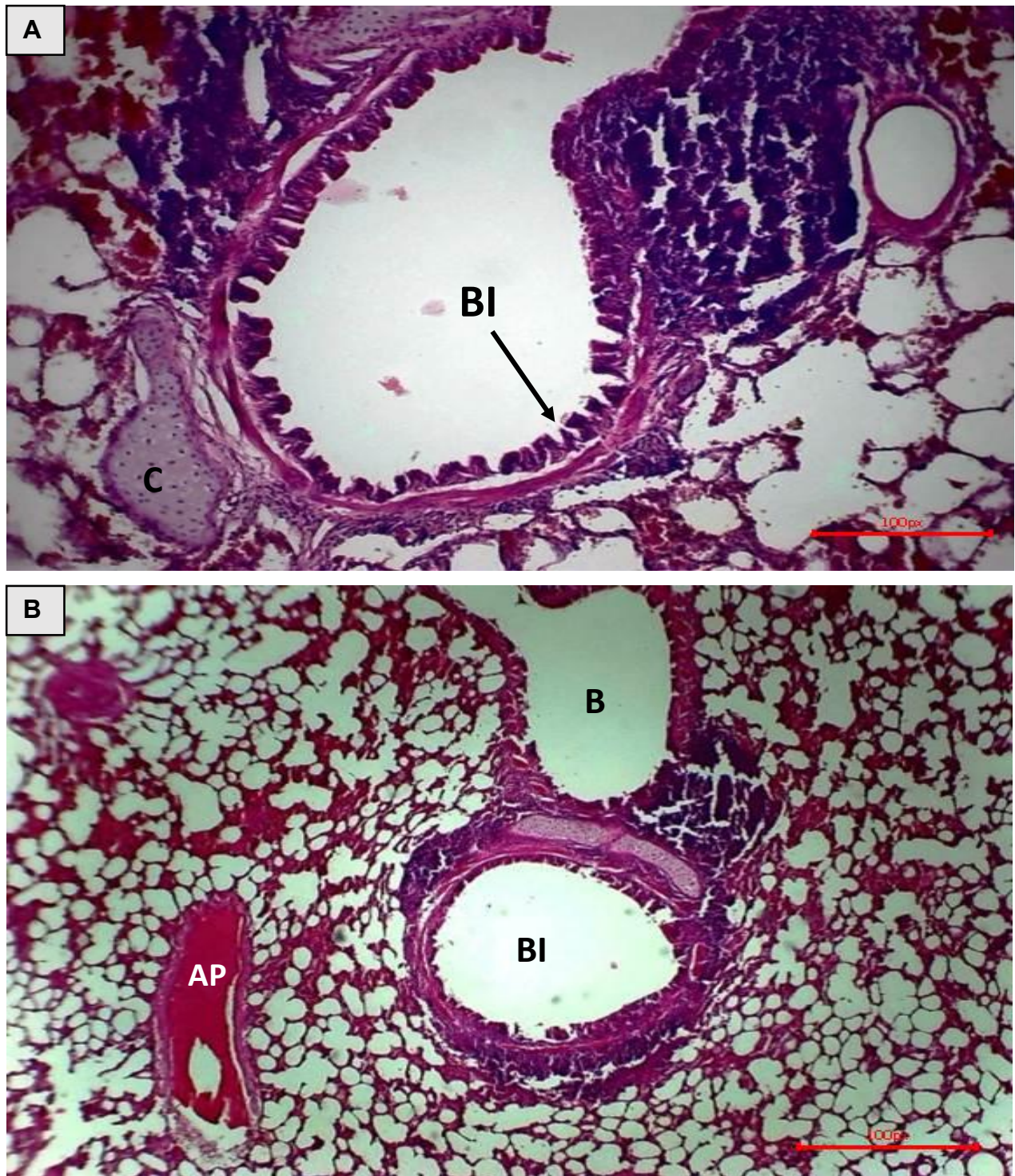


Planche 12: Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C par gavage. Grossissement : Gx100 (B), Gx400 (A). Coloration H&E. Légende : une bronche intrapulmonaire (BI) entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers. Une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B). Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP) et une faible hémorragie pulmonaire.

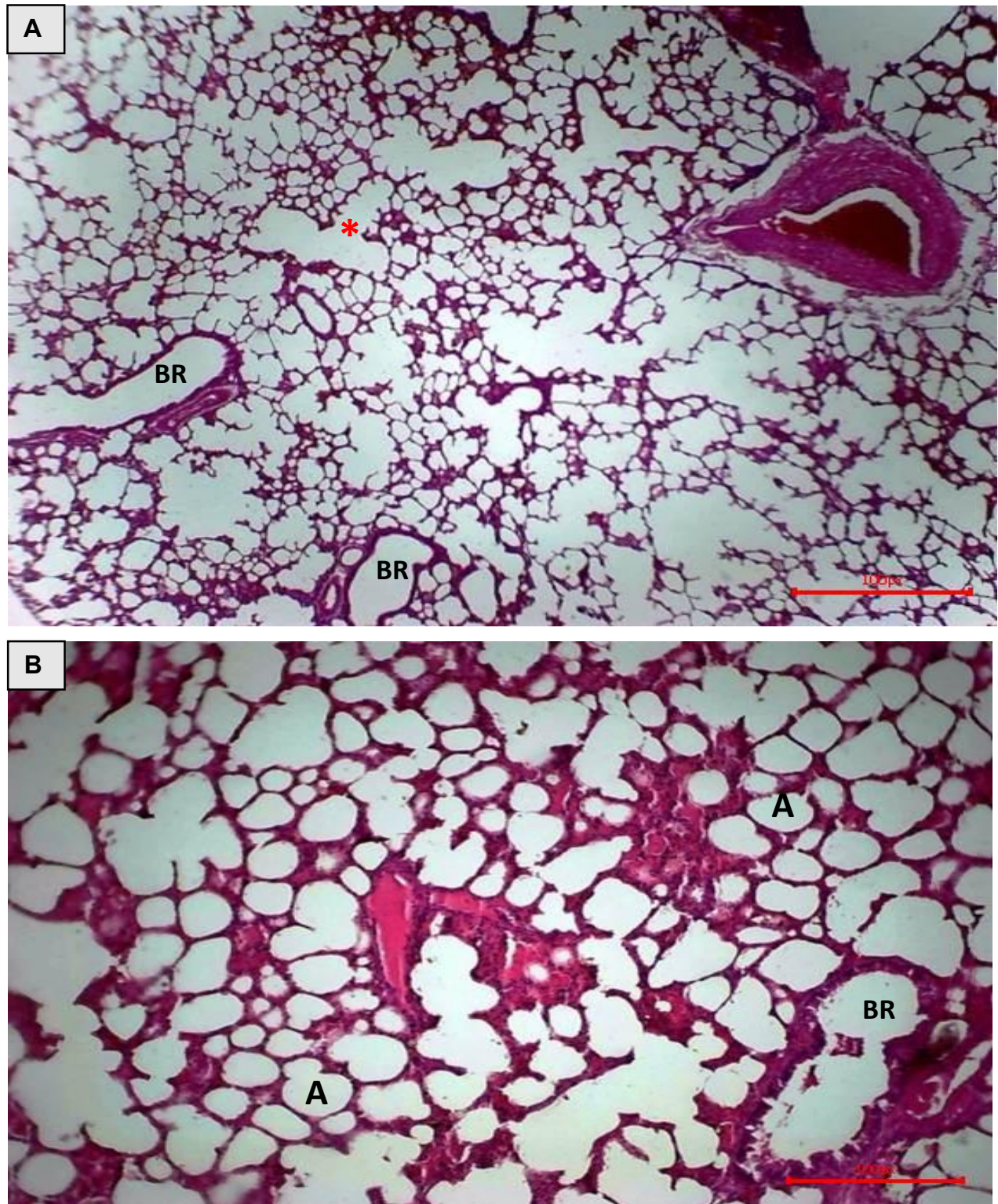


Planche 13 : Aspect histologique du poumon chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C supplémentée en aliment. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : des bronchioles respiratoires (BR), des sacs alvéolaires (astérisque) et des alvéoles (A) moins dilatés avec une paroi moins épaisse par rapport au groupe traité par l'IVM seul.

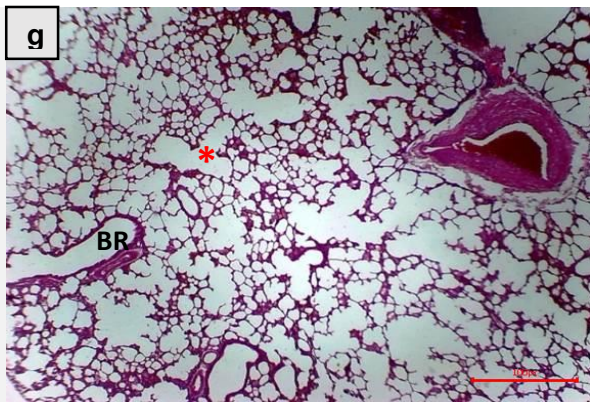
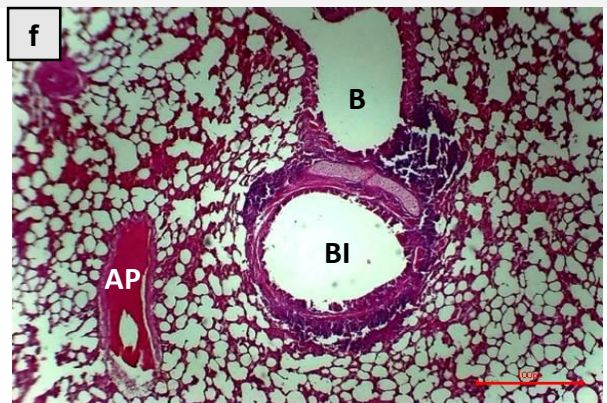
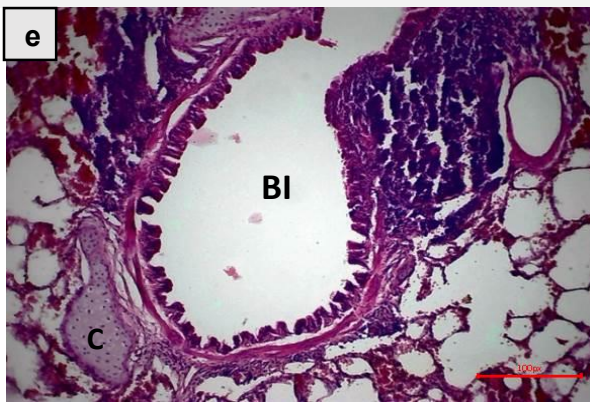
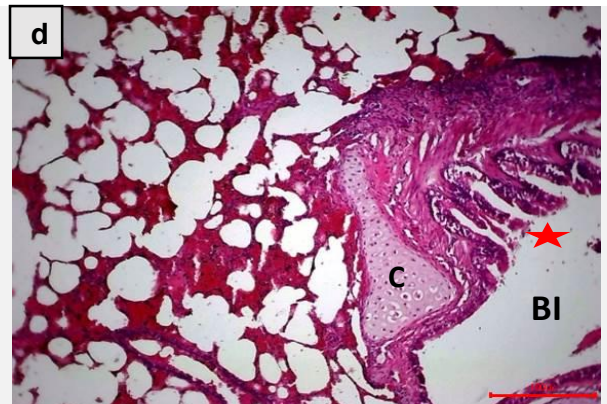
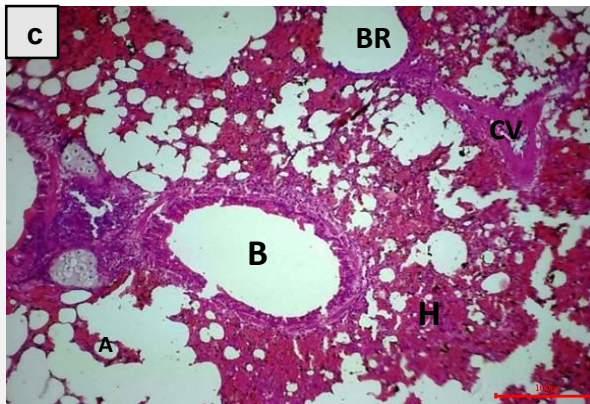
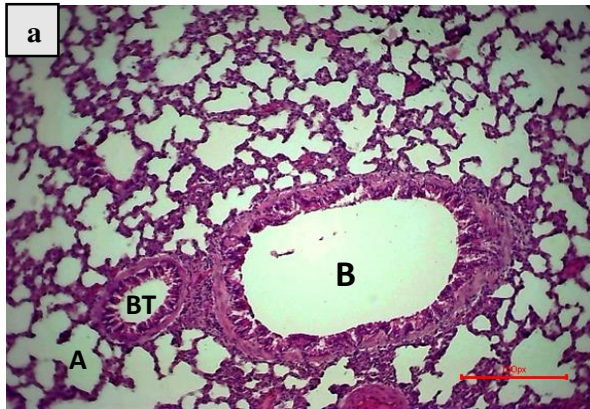


Planche 14 : Aspect histologique du poumon des lapins témoins (a et b) montrant une architecture normale : de l'épithélium de la branche intrapulmonaire (BI) avec des plis muqueux et des plaques environnantes de cartilage hyalin (C), de bronchiole pulmonaires (B), de bronchiole terminale (BT), des sacs alvéolaires et des alvéoles (A). Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant une structure anormale de la bronche intrapulmonaire (BI) avec une désorganisation des diverses couches constituant son épithélium muqueux (étoile) et une altération des plaques du cartilage hyalin (C), dilatation des bronches (B) et épaississement de leurs épithéliums, dilatation des alvéoles pulmonaires (A) et épaississement de leurs parois, dilatation et épaississement des bronchioles respiratoires (BR), hémorragies pulmonaires (H) et congestion vasculaire (CV) de l'artère pulmonaire. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e et f) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (g et h) montrant une bronche intrapulmonaire (BI) entourée par des plaques du cartilage hyalin (C) et tapissée par un épithélium moins désorganisé et des plis muqueux réguliers, une légère dilatation de la bronchiole pulmonaire (B) et respiratoire (BR). Une restauration de la congestion vasculaire de l'artère pulmonaire (AP) et une faible hémorragie pulmonaire. Coloration H&E : (a, c, f et g) $\times 100$ et (b, d, e et h) $\times 400$.

1.6.4. Histopathologie du système nerveux centrale

➤ Histopathologie du cortex cérébral

❖ Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins témoins

Les coupes histologiques du cortex cérébral chez les lapins témoins ont révélé une architecture typique des différentes cellules nerveuses (neurones) constituant les 6 couches du cortex cérébral (matière grise du cerveau). La **Planche 15** représente l'aspect histologique du cortex cérébral chez le groupe témoin qui est marqué par :

- Le cortex cérébral est constitué par 6 couches dont la structure des cellules nerveuses qui les composent est typique :
 1. La couche moléculaire (recouverte par la pie mère).
 2. La couche granulaire externe.
 3. La couche pyramidale externe.
 4. La couche granulaire interne.
 5. La couche pyramidale interne.
 6. La couche multiforme.
- La couche granulaire interne (4) est composée par des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de structure normale.

❖ **Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins traités par l'AVIMEC®**

La **Planche 16** montre l'aspect histologique du cortex cérébral après un traitement de 21 jours par l'AVIMEC®, cette structure histologique est caractérisée par :

- Un neuropile (tissu glial du soutien) vacuolisé au niveau des différentes couches du cortex cérébral.
- La couche granulaire interne (4) est très dense et chargée avec des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée.
- La couche pyramidale interne (5) a montré des cellules pyramidales (Py) de forme irrégulière entourées d'un halo.
- Congestion vasculaire (CV).
- Une nécrose (N) des cellules nerveuses.

❖ **Histopathologie du cortex cérébral chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C**

Les aspects histologiques du cortex cérébral des lapins traités par l'IVM + vitamine C (par gavage et supplémentée dans l'aliment) sont comparables et sont illustrés par la **Planche 17** dont ils sont caractérisés par :

- Un neuropile (tissu glial du soutien) moins vacuolisé du cortex cérébral.
- Une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.

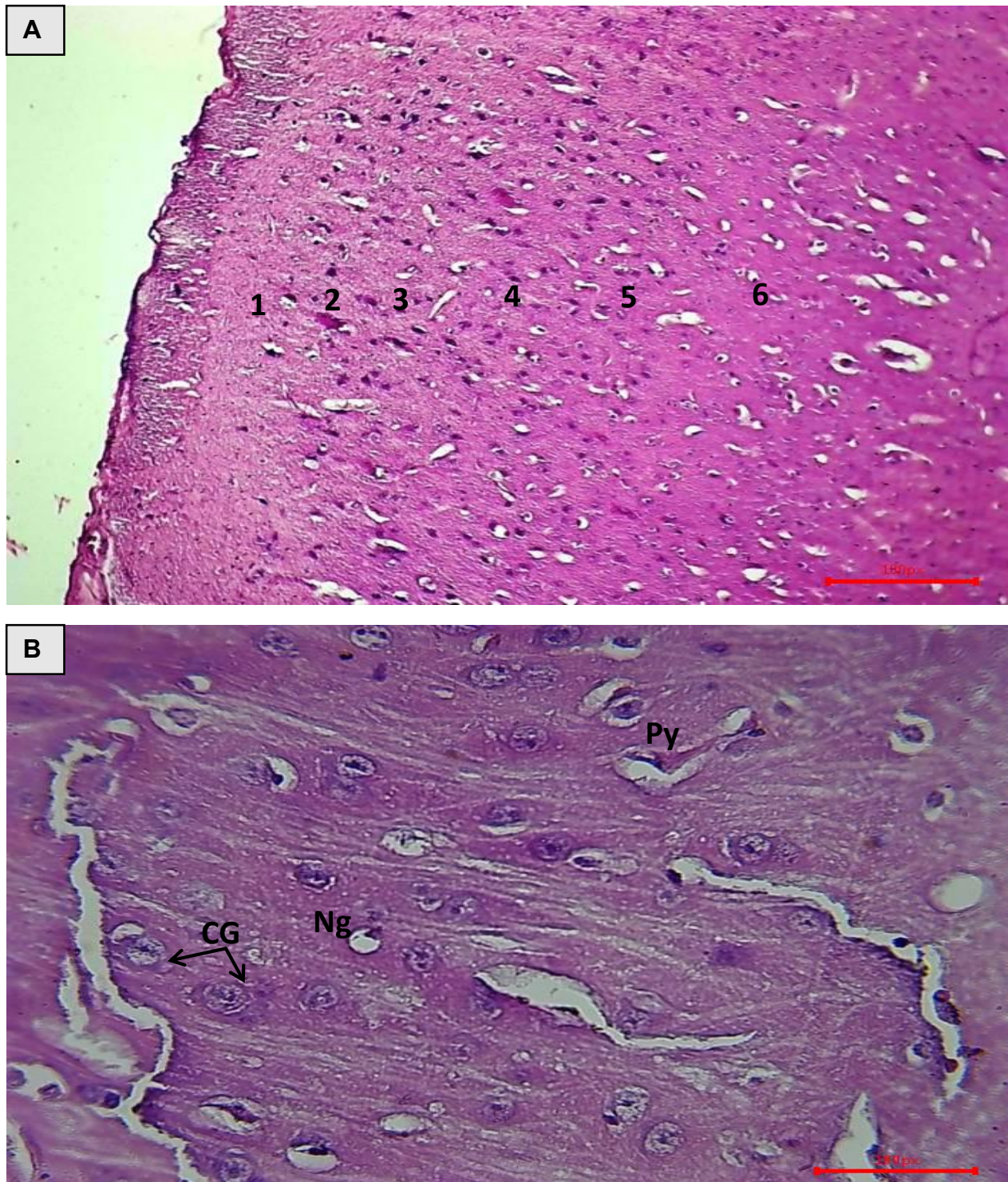


Planche 15 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : une architecture normale des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral (1: couche moléculaire; 2: couche granulaire externe; 3: couche pyramidale externe; 4: couche granulaire interne; 5: couche pyramidale interne; 6: couche multiforme). Structure typique des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de la couche granulaire interne.

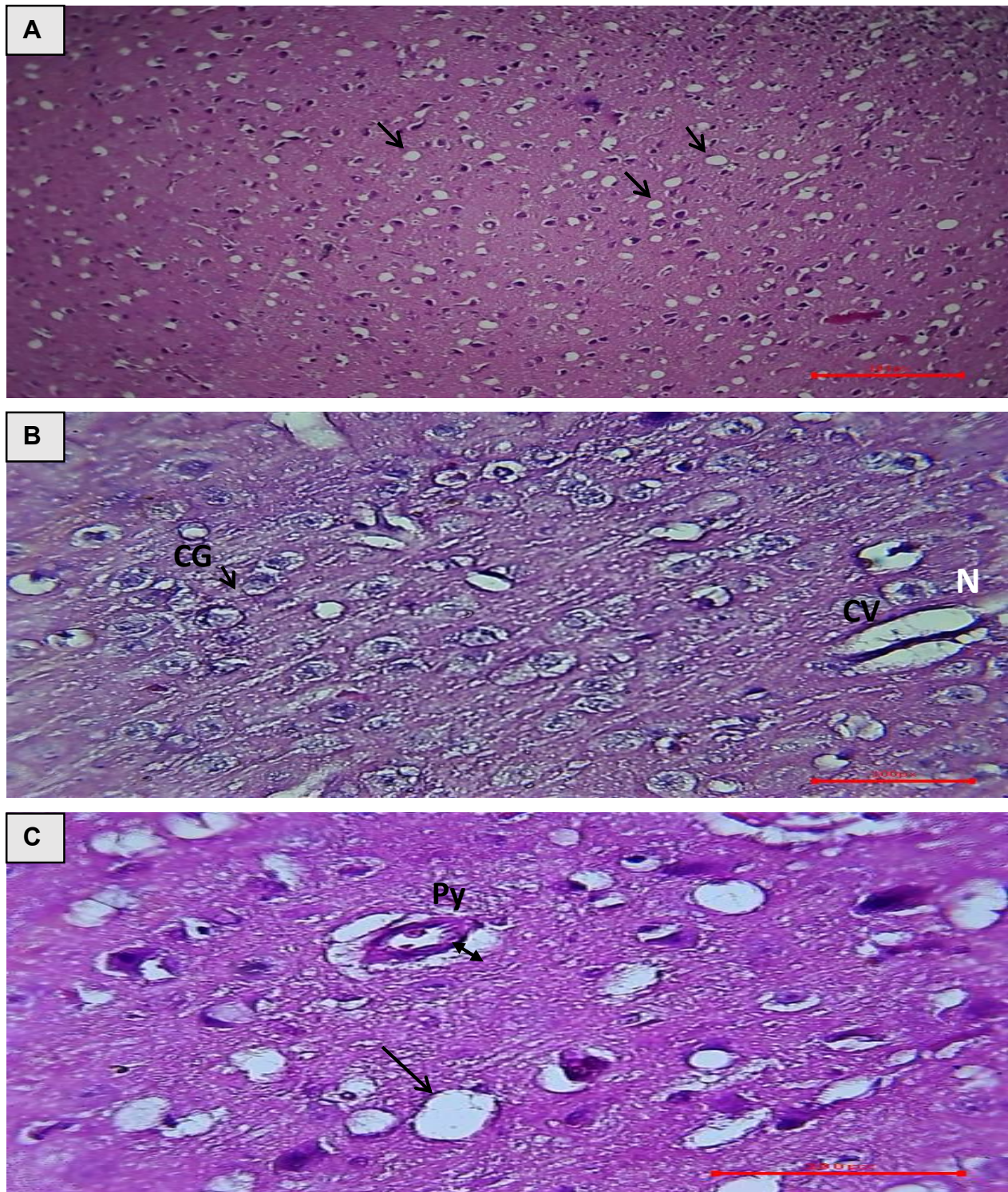


Planche 16 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B et C). Coloration H&E. Légende : Un neuropile vacuolisé (flèche) au niveau des différentes couches du cortex cérébral. La couche granulaire interne est très dense et chargée avec des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée. Une congestion vasculaire (CV) et une nécrose (N) des cellules nerveuses. La couche pyramidale interne a montré des cellules pyramidales (Py) de forme irrégulière entourées d'un halo.

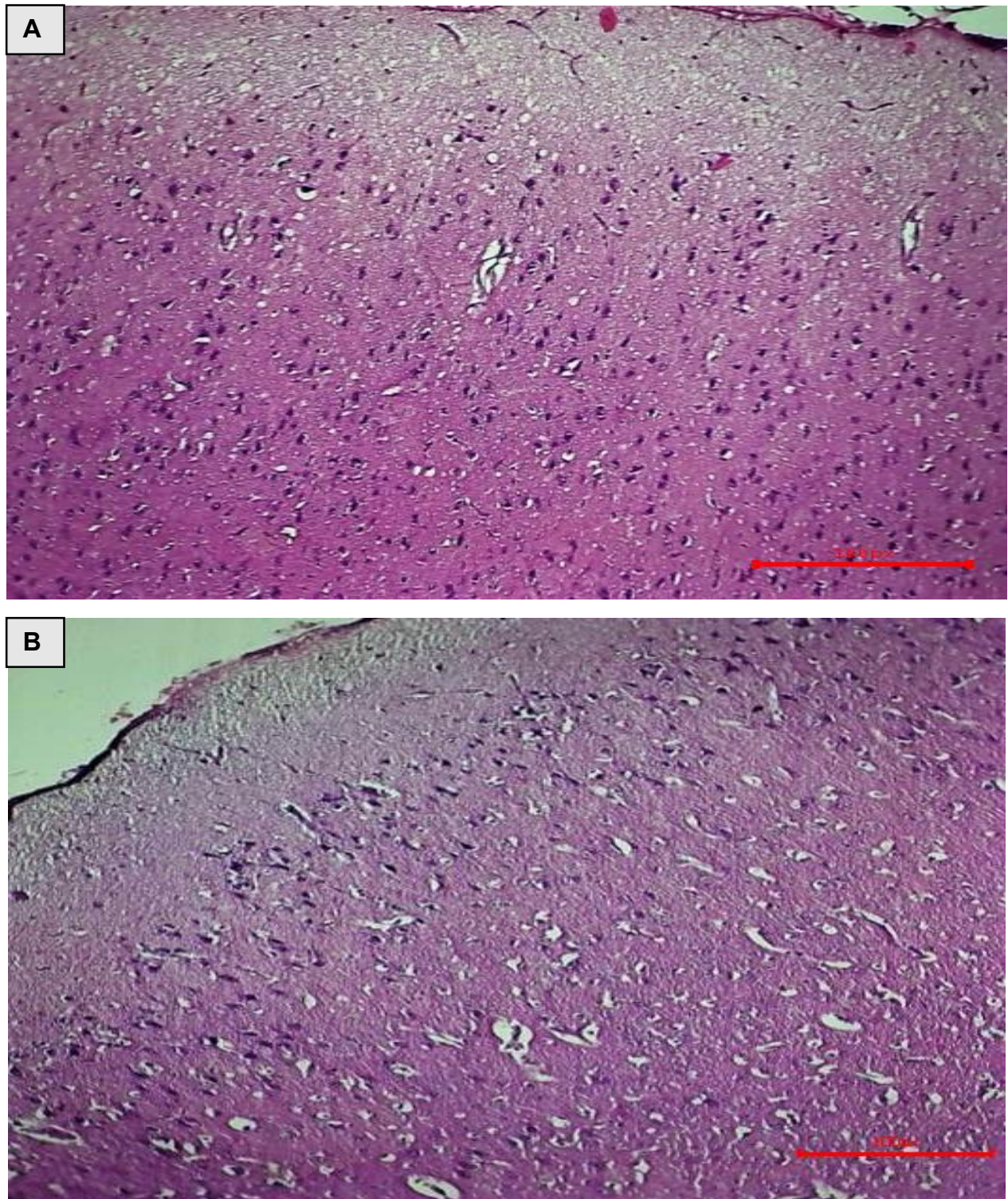


Planche 17 : Aspect histologique du cortex cérébral chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Un neuropile moins vacuolisé du cortex cérébral. Une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.

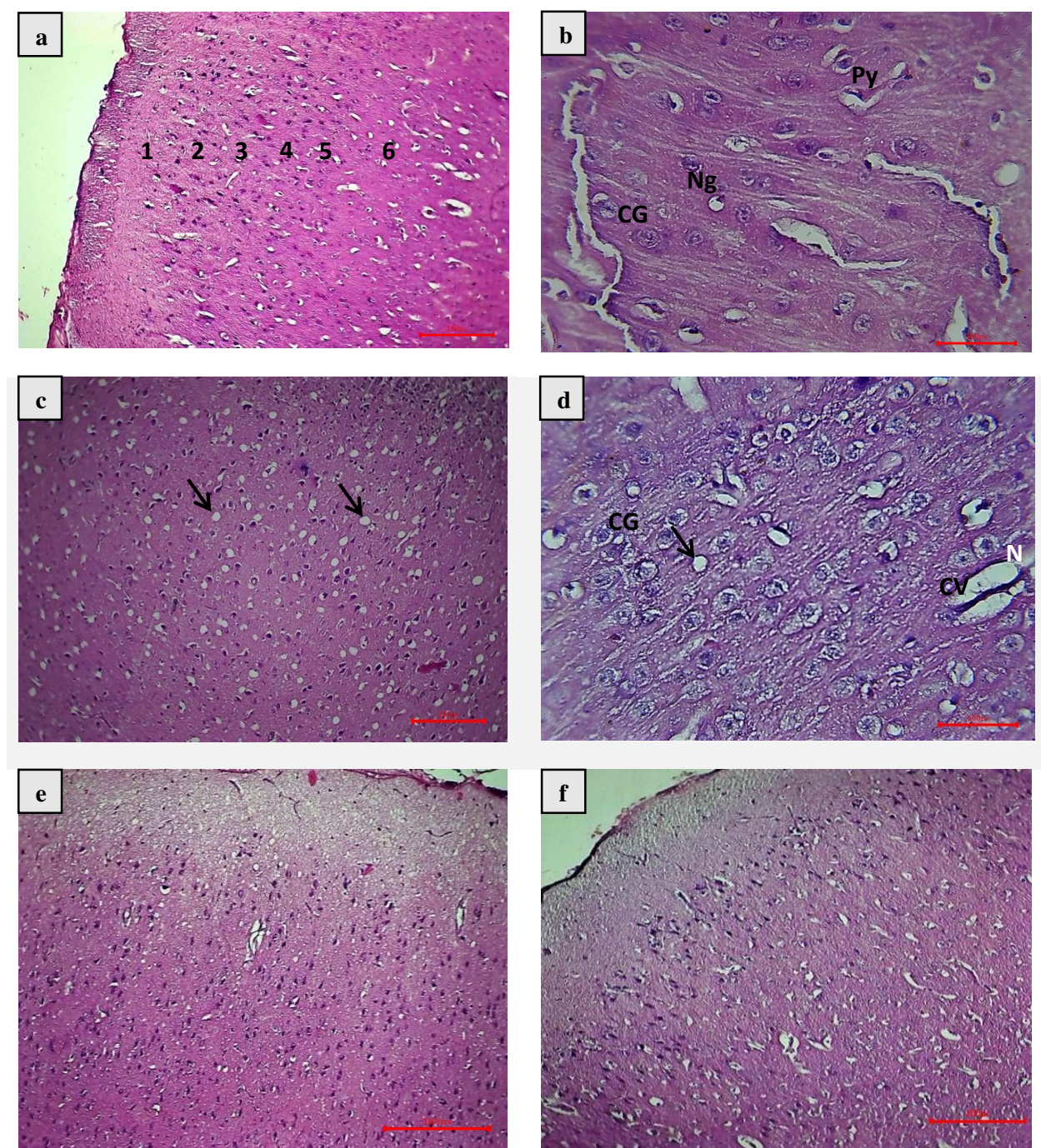


Planche 18 : Aspect histologique du cortex cérébral des lapins témoins (a et b) montrant une architecture normale des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral (1: couche moléculaire; 2: couche granulaire externe; 3: couche pyramidale externe; 4: couche granulaire interne; 5: couche pyramidale interne; 6: couche multiforme) et une structure typique des cellules granulaires (CG), neurogliales (Ng) et pyramidales (Py) de la couche granulaire interne. Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant Un neuropile vacuolisé (flèche) au niveau des différentes couches du cortex cérébral, des cellules granulaires (CG) de structure désorganisée, une congestion vasculaire (CV) et une nécrose (N) des cellules nerveuses. Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (f) montrant un neuropile moins vacuolisé du cortex cérébral et une amélioration dans la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral.. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times 100$ et (b et d) $\times 400$.

➤ **Histopathologie de l'hippocampe**

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins témoins**

La **Planche 19** représente l'aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins.

L'hippocampe de ces lapins est constitué par :

- La présence de deux régions neurales en forme d'U inversé : la corne d'Ammon (CA) composée par 4 régions (CA1, CA2, CA3 et CA4) et le gyrus denté (GD).
- Une structure normale des cellules pyramidales (Py) au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2).
- Une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du gyrus denté (GD).
- Une cytologie typique des cellules neurogliales (Ng) et cellules pyramidales (Py) de la couche moléculaire du gyrus denté (GD).

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins traités par l'AVIMEC®**

L'administration de l'IVM seul pendant 3 semaines a causé des lésions sévères au niveau de l'hippocampe des lapins. Ces lésions sont montrées dans la **Planche 20** :

- Le neuropile (tissu glial du soutien) est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD).
- Formation des vacuoles intracellulaires donnant naissance à des cellules en mousse dans la corne d'Ammon (CA) et le gyrus denté (GD).
- Une désorganisation des cellules nerveuses avec des noyaux sombres.

❖ **Histopathologie de l'hippocampe chez les lapins traités par l'AVIMEC® + vitamine C**

La **Planche 21** montre les résultats de l'aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par une co-administration de l'IVM + vitamine C.

La structure histologique de l'hippocampe dans les deux lots a montré une structure qui ressemble à celui des lapins témoins qui est caractérisé par un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale par rapport au groupe traité uniquement par l'IVM.

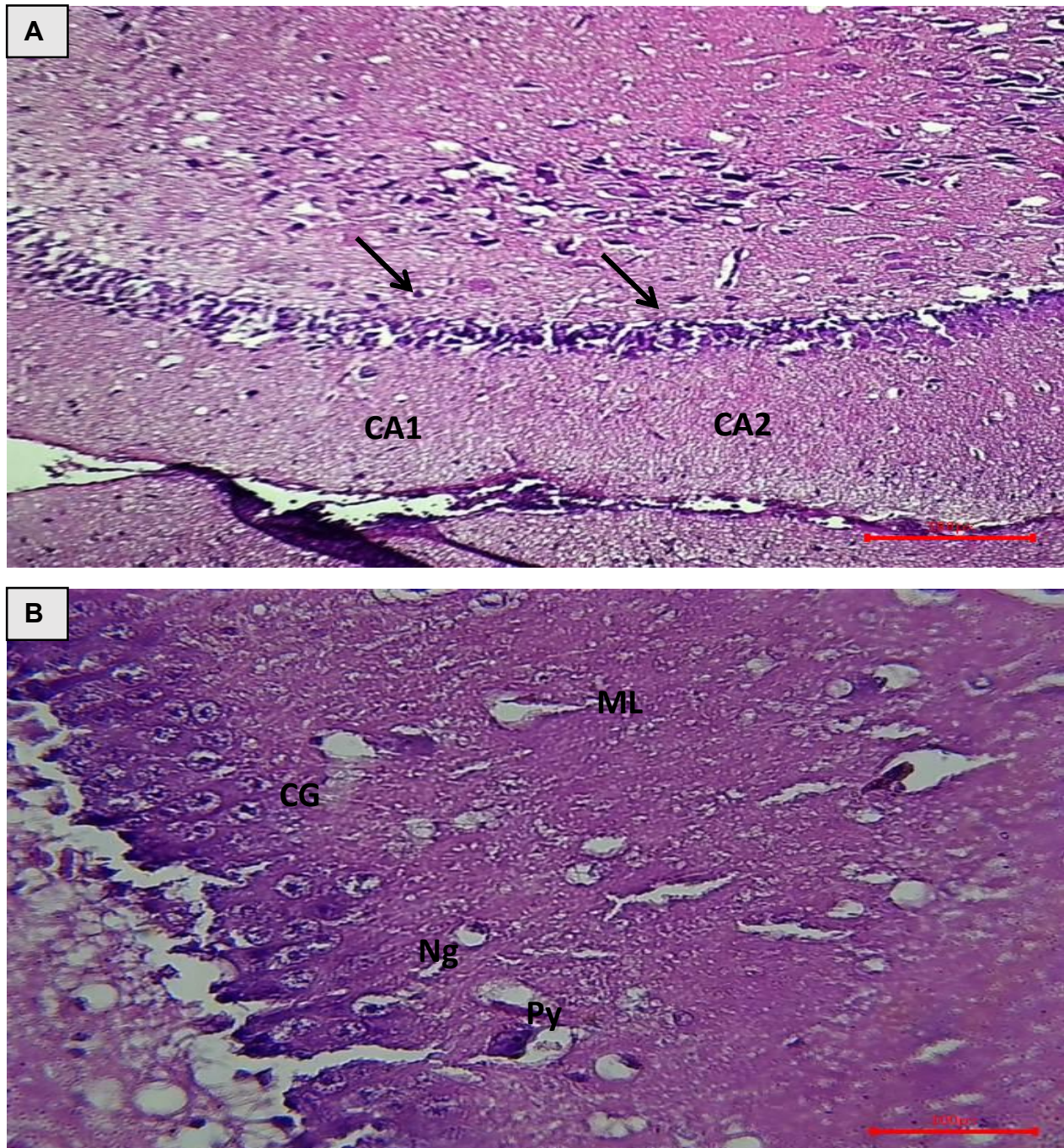


Planche 19 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins témoins. Grossissement : Gx100 (A), Gx400 (B). Coloration H&E. Légende : Une structure normale des cellules pyramidales (Py) avec des noyaux clairs au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2). Une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du Gyrus denté (GD). Une cytologie typique des cellules neurogliales (Ng) et cellules pyramidales (Py) de la couche moléculaire (ML) du Gyrus denté (GD).

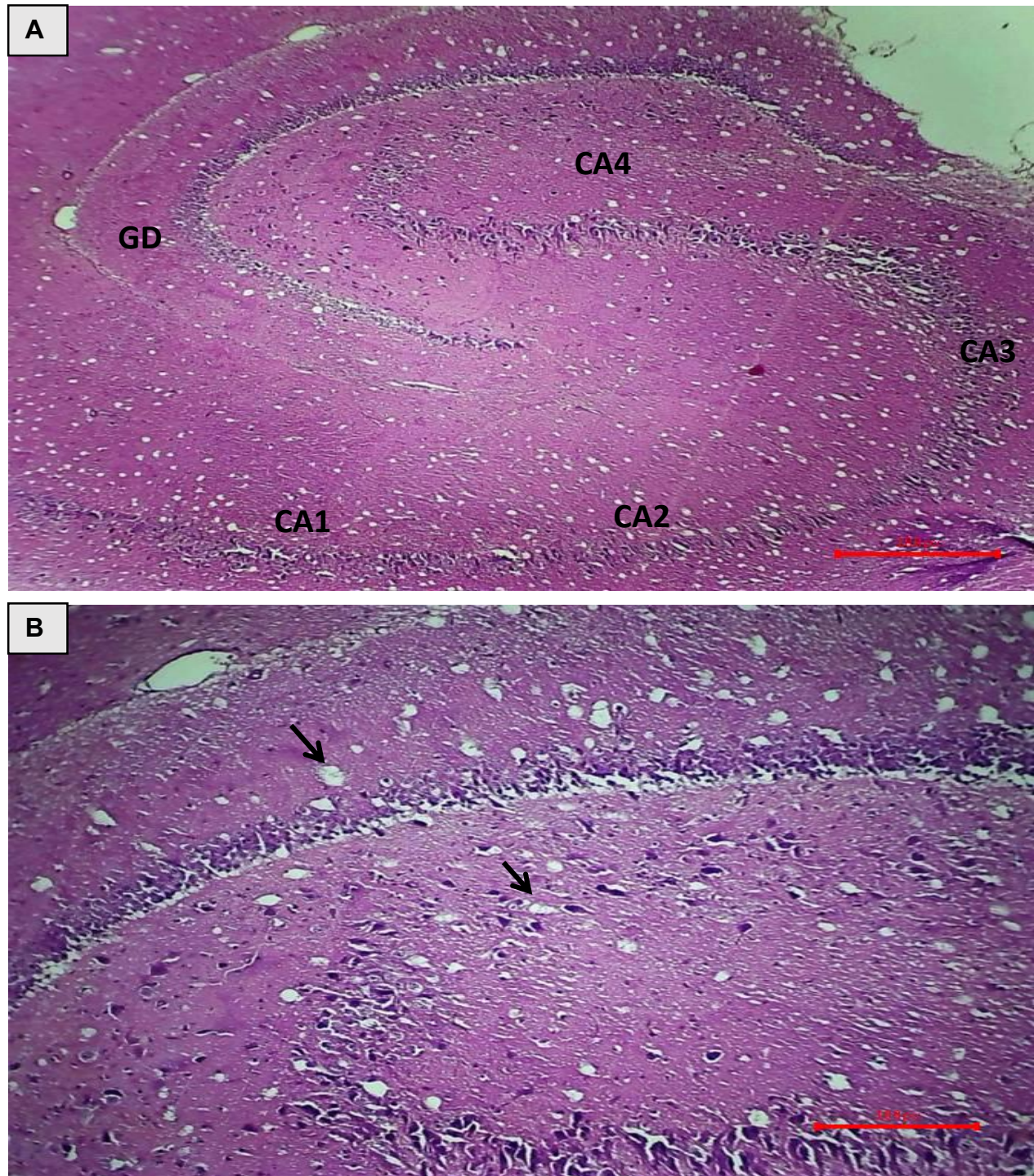


Planche 20 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM. Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Le neuropile est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD). Formation des vacuoles intracellulaires donnant naissance à des cellules en mousse dans la corne d'Ammon (CA) et le Gyrus denté (GD). Une désorganisation des cellules nerveuses avec des noyaux sombres.

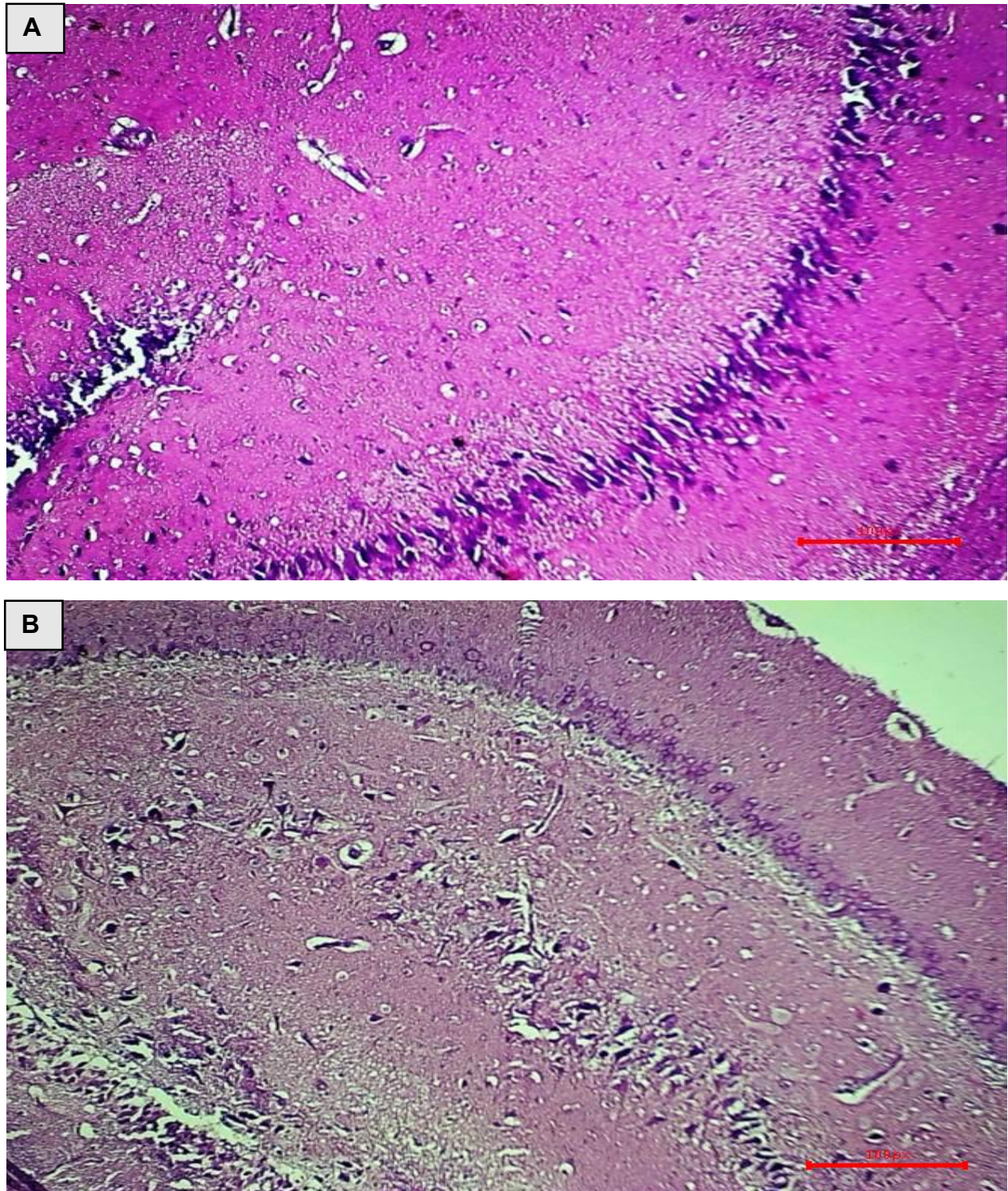


Planche 21 : Aspect histologique de l'hippocampe chez les lapins traités par l'IVM + vitamine C (A : par gavage, B : en aliment). Grossissement : Gx100 (A et B). Coloration H&E. Légende : Un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale.

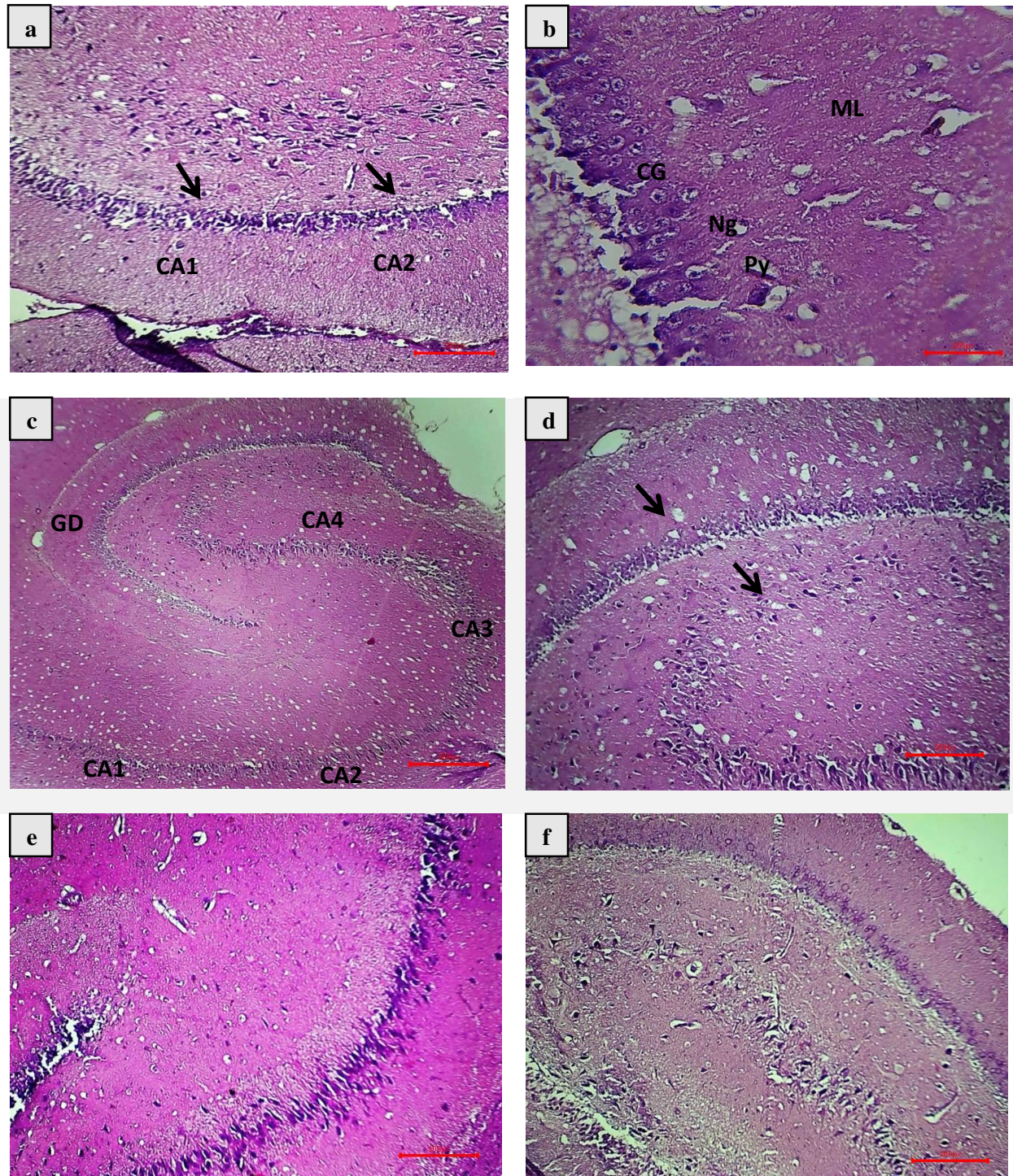


Planche 22 : Aspect histologique de l'hippocampe des lapins témoins (a et b) montrant une structure normale des cellules pyramidales (Py) avec des noyaux clairs au niveau des deux régions de la corne d'Ammon (CA1 et CA2) et une structure normale des cellules granulaires (CG) de la couche granulaire du Gyrus denté (GD) avec une cytologie typique des cellules nerveuses du Gyrus denté (GD).. Du groupe traité par l'IVM (c et d), montrant un neuropile est vacuolisé dans la couche granulaire et moléculaire des deux régions de l'hippocampe (CA et GD). Des groupes traités par l'IVM + vitamine C par gavage (e) et IVM + vitamine C supplémentée en aliment (f) montrant un neuropile moins vacuolisé et des neurones d'architecture plus au moins normale. Coloration H&E : (a, c, e et f) $\times 100$ et (b et d) $\times 400$.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4116306>

Beneficial effects of ascorbic acid on ivermectin repeated high-dose therapy in rabbits: biochemical and histopathological investigations

Makhlouf Chahrazed^{1,2*}, Khaldoun Oularbi Hassina^{1,2}, Bokreta Soumya^{1,2}, Tarzali Dalila¹, Boukrid Asma¹, Boulahia Meriem¹, Daoudi Zerrouki Nacira²

¹ Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Blida 1, BP 270, Soumaa, Blida, Algeria

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

* Corresponding author: E-mail: chahrazedmakhlouf@yahoo.com

Received: 23 August 2020; Revised submission: 05 October 2020; Accepted: 21 October 2020



<http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/ejbr>

Copyright: © The Author(s) 2021. Licensee Joanna Bródka, Poland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ABSTRACT: Ivermectin (IVM) is a lipophilic anthelmintic drug widely used for the control of internal and external parasites in both human and veterinary medicine. Conversely, overdoses of IVM are associated with resistance and efficacy problems. The present study aimed to evaluate the effects of repeated administration of a high dose of IVM alone or with combination of ascorbic acid (AA) in male young rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histological investigations. Twenty rabbits were divided into four groups (n=5) and treated for three consecutive weeks: Control group; IVM group (2 mg/kg of body weight subcutaneously, 3 times a week); IVM + AA_g (20 mg/mL) group and IVM + AA_f (200 mg/kg of diet) group. IVM induced a disruption of hepatic biochemical parameters and lipid profile with a statistically significant ($p < 0.05$) increase in glucose, ALT, AST, GGT, HDL-C and a significant decrease of TC, TG, LDL-C, VLDL-C in IVM group compared to control group. Co-administration of AA moderately improved those biochemical parameters. Histopathological changes following IVM treatment in liver comprised loss of normal hepatocytes structure, central vein dilation and portal vein congestion. The lung showed abnormal structure of intrapulmonary bronchus, dilated bronchioles and alveoli and congested pulmonary artery. Nevertheless, the AA treatment groups revealed significant improvement when co-administered orally with IVM. This study suggested that AA has a beneficial ameliorative role against toxic effects induced by repeated high-dose of IVM.

Keywords: Ivermectin; Ascorbic acid; Biochemical parameters; Histopathology; Rabbit.

1. INTRODUCTION

In veterinary medicine, macrocyclic lactones (MLs) has a position of prominence in the control of parasites and are probably the most widely used anti-parasitic agents in the treatment of food producing animals, poultry, aquaculture and crops. Ivermectin (IVM) was the first commercially available endectocide macrocyclic lactone (ML), discovered in the mid-1970s and used in veterinary and humans clinical medicine [1, 2]. IVM is a chemical derivative of avermectin. Since its discovery, a number of alternative products such

abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, moxidectin, milbemycin and selamectin, have been marketed [3, 4]. The antiparasitic effect of IVM is said to be due to its interaction with glutamate and GABA-gated chloride channels, which cause influx of chloride ions across the cell membranes and lead to paralysis in many types of parasites [5].

In addition to its efficacy in the control of endo and ectoparasites [6], IVM a '*Splendid gift from microorganisms*' has been demonstrated to have anticancer activities on various types of cancer, including glioblastoma [7], chronic myelogenous leukemia [8], breast cancer [9], ovarian cancer [10] and renal cancer [11]. Recently, it was reported that IVM is also an inhibitor of the replication of SARS-CoV-2 (COVID-19) *in vitro* [12].

The use of endectocide drugs for the treatment of parasitic diseases in rabbits has been increasing recently. Lu et al. [13] revealed that treatment of female rabbits naturally infected with *Psoroptes cuniculi* with a commercial IVM injection (Ivomec® at 0.2 mg/kg) showed rapid and high efficacy against ear-mite. Gokbulut et al. [14] indicated that subcutaneous administration of two doses of IVM (0.3 mg/kg) with a 15- 20 day interval in-between could be necessary for treatment of ectoparasites.

Guzzo et al. [15] reported that IVM at doses up to 10 times the highest FDA (Food and Drug Administration), approved dose of 200 µg/kg is generally well tolerated, with no indication of associated central nervous system toxicity. Nonetheless, at higher concentrations IVM has a broad range of effects in many different organisms [16, 17] and repeated administration of different doses of IVM induced histopathological alterations in liver [18], kidneys and lungs [19] of rabbit; testis [20] of rat and brain tissues [21] of pigeon.

Recently, the protective effects of natural antioxidants against the toxicity of various xenobiotic are the focus of interest. As have been approved by the study of Abdeldaim and Abdellatief [22], Caffeic Acid Phenethyl ester and Betaine have a protective effect against Abamectin induced toxicity. Also, some antioxidant can be administered with IVM to improve its side effects such as vitamin A [23], vitamin K [24], Selenium and vitamin E [25] and some phenols and flavonoids [26].

Ascorbic acid (AA) or vitamin C is a water-soluble antioxidant which efficiently scavenges free radicals, protecting cell membranes from oxidative damage [27, 28]. Previous animal studies suggested that vitamin C treatment may have potential protective effects on oxidative stress and environmental toxicities [29, 18]. Recently we demonstrated the beneficial effects of Vitamin C in attenuating emamectin benzoate toxicity, an avermectin insecticide formulation [30].

Accordingly, this study has two stages of demonstration, first to describe the toxic effect of repeated subcutaneous injections of IVM on the hepatic biochemical parameters, lipid profile and the liver and lung histology in male young rabbits of (*Oryctolagus cuniculus*) strain. Secondly, to investigate the beneficial effects of AA on IVM repeated high-dose therapy in rabbits.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Ivermectin (AVIMEC®, 10 mg/ml) was purchased from the Arab Veterinary Industrial Company (AVICO, Jordan). This formula is used by subcutaneous injection for rabbits: 0.15 ml per 1 kg of body weight (1.5 mg/kg). Vitamin C of purity 99%, was purchased from Sigma–Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, USA). All other reagents used were obtained from commercial sources: Biosolve Chimie (Valkenswaard, Netherlands) and BIOLABO SA. (France).

2.2. Animals

Healthy male young Algerian rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (aged 4–5 weeks; 850 to 950 g) were used in this study. Rabbits were obtained from a state breeding unit of Djebba (Tizi-Ouzou) and kept for experimentation in the CRD of Saidal, Algeria. All animals were housed in temperature-controlled rooms with 12-h light/dark cycle. Animal experimentation was consistent with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology [31]. Rabbits were acclimated to the laboratory conditions for 2 weeks before treatment and had free access to a commercial pellet diet and water *ad libitum*.

2.2.1. Experimental design

Twenty rabbits were divided into four groups (n=5). A control group, received distilled water by gavage and three groups treated with a high dose of IVM (2 mg/kg of body weight subcutaneously, 3 times/week) [13] for three consecutive weeks including; a group was treated only with IVM (IVM group); a group was co-treated orally with ascorbic acid by gavage (IVM + AA_g group; 20 mg/ml, 3 times/week) and a group was co-treated with ascorbic acid enriched diet (IVM + AA_f group; 200 mg/kg of food, 3 times/week) [32]. AA is administered with a mean interval of 12 h after IVM injection. Animals were weighed daily throughout the acclimation (2 weeks) and experimentation (3 weeks) periods in order to follow their weight evolution. At 14 and 21 days of the experiment, blood samples were collected with heparinized syringes from the ear vein for biochemical analysis.

2.2.2. Samples collection

At the end of the experiments, the rabbits were euthanized by cervical decapitation, and liver and lung were carefully dissected out and weighed. Blood samples were collected after a fasting period of 12 hours and plasma was separated by centrifugation at 4000 r/min for 15 min.

2.3. Biochemical analysis

To assess the effect of vitamin C on IVM toxicity, the following hepatic parameters; alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT) and glucose and lipid profile tests; triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were assessed in plasma using a commercially available spectrophotometric enzymatic kit (Biolabo, France) and analyzed by an auto-analyzer (Hitachi 912) instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The plasma level of very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) was evaluated using the following formula: $VLDL-C = TC - (HDL-C + LDL-C)$. In addition, for better expression of the rapport between triglycerides and HDL-C, atherogenic index of plasma (AIP) factor based on the ratio of the values of triglycerides to high-density lipoprotein (HDL-C) levels was calculated according to the following formula: $AIP = \text{Log } [TGs] / [HDL-C]$, where both of them are measured in the plasma [33]. Otherwise, other atherogenic factors (AF) were calculated as the ratio between; total Cholesterol and HDL-C, LDL-C and HDL-C [34].

2.4. Histopathological examinations

For histopathological examination, the liver and lung were excised from all rabbits and fixed in 10% neutral formalin buffer, processed through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin blocks. Organ sections (2–3 µm thick) were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for histopathological studies.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Data were calculated using one-way analysis of variance followed by the Duncan's post hoc tests. Data were expressed as the mean $\pm$ SD. A p-value < 0.05 was considered as a level of significance.

3. RESULTS

3.1. Effect on general body health condition, body weight and weight gain

No deaths occurred in any group throughout the experiment. Some signs of general toxicity (hair loss and diarrhea) and decreased food intake were apparent in male rabbits treated with IVM alone. As shown in the Table 1, the body weight as well as the percentage of body weight gain (% BWG) and the food intake of the rabbits in the control, IVM, IVM + AAg and IVM + AAF groups during the acclimation period (2 weeks) are normal. However, during the experimental period (3 weeks), in the IVM treated group, the food intake (21.01 ± 0.9) was significantly ($p < 0.05$) decreased compared to control group (33.03 ± 0.1), also the final body weight and the % BWG (1587.0 ± 71.6 and 19.3 ± 0.8) was significantly decreased compared to control (1806.4 ± 63.2 and 34.1 ± 0.5), respectively. Conversely, the food intake (27.5 ± 0.2 ; 35.2 ± 0.5), the final body weight (1693.0 ± 47.1 ; 1678.1 ± 48.0) and the % BWG (25.3 ± 0.7 ; 26.4 ± 0.8) in the IVM + AAg and IVM + AAF groups, respectively were significantly increased compared to the food intake, the final body weight and % BWG of rabbits treated with IVM alone.

Table 1. Effect of IVM and/or AA on body weight and weight gain for the acclimation and experimental periods.

Body weight / groups		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
Acclimation	Initial BW (g)	862.1 $\pm$ 9.8	914.8 $\pm$ 22.7	946.7 $\pm$ 25.6	932.2 $\pm$ 27.8
	Final BW (g)	1085.7 $\pm$ 18.9	1147.7 $\pm$ 21.9	1156.8 $\pm$ 26.2	1149.1 $\pm$ 30.8
	% BWG	25.9 $\pm$ 0.9	25.5 $\pm$ 0.9	22.23 $\pm$ 0.7	23.31 $\pm$ 0.8
	Food intake %	28.1 $\pm$ 0.1	30.3 $\pm$ 0.2	26.01 $\pm$ 0.1	23 $\pm$ 0.4
Experimentation	Initial BW (g)	1347.1 $\pm$ 21.1	1330.6 $\pm$ 19.8	1351.0 $\pm$ 26.6	1328.3 $\pm$ 36.4
	Final BW (g)	1806.4 $\pm$ 63.2	1587.0 $\pm$ 71.6 ^a	1693.0 $\pm$ 47.1 ^b	1678.1 $\pm$ 48.0 ^c
	% BWG	34.1 $\pm$ 0.5	19.3 $\pm$ 0.8 ^a	25.3 $\pm$ 0.7 ^b	26.4 $\pm$ 0.8 ^c
	Food intake %	33.03 $\pm$ 0.1	21.01 $\pm$ 0.9 ^a	27.5 $\pm$ 0.2 ^b	35.2 $\pm$ 0.5 ^c

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food; BW: body weight; BWG: body weight gain. Results are given as a mean $\pm$ SD for five rabbits in each group. a, b and c: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.2. Effect on absolute and relative organ weights

According to table 2, the absolute and relative weight of lung showed no significant change in the IVM group compared to control group, but these weights were significantly ($p < 0.05$) increased in the IVM + AA-treated groups (9.8 ± 0.8 g and 11.7 ± 0.7 g) compared to IVM group (8.0 ± 1.0 g) and the control group (8.8 ± 0.9 g) and with no significant difference between IVM + AAg and IVM + AAF groups. However, the absolute and relative weight of liver showed no significant change in the IVM group when compared to control and IVM + AA-treated groups.

Table 2. Effect of IVM and/or AA on absolute and relative liver and lung weights, 21 days after treatment.

Organ weight (g) / groups		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
Liver	Absolute	76.5 ± 9.2	75.8 ± 6.5	77.7 ± 8.7	77.3 ± 9.5
	Relative	4.1 ± 1.0	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.5	4.5 ± 1.2
Lung	Absolute	8.8 ± 0.9	8.0 ± 1.0	9.8 ± 0.8 ^{a, b}	11.7 ± 0.7 ^{a, c}
	Relative	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.03 ^{a, b}	0.7 ± 0.2 ^{a, c}

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b and c: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.3. Effect on serum biochemical parameters

As shown in Table 3, IVM induced hepatic disorders as demonstrated by the elevation of liver biomarkers in plasma. The glucose plasma level didn't change significantly in different treated groups at day 14 of experimentation but at day 21, the glucose level was significantly ($p < 0.05$) increased in the IVM group compared to control group. However, this level was significantly decreased in the IVM + AAg group compared to IVM and IVM + AAF groups. At day 14 of experimentation, the plasma levels of GGT, ALT and AST were significantly increased in the IVM group compared to control group. These levels were significantly decreased in both IVM + AA-cotreated groups compared to IVM group. In the same manner, the levels of GGT, ALT and AST continue to be significantly increased in IVM group compared to control group at day 21 of the experimentation. These levels didn't change significantly in both IVM + AA-cotreated groups.

Table 3. Effect of IVM and/or AA on liver biomarkers at 14 and 21 day of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
14 day	Glucose (g/L)	0.89 ± 0.01	1.19 ± 0.11	1.18 ± 0.02	1.17 ± 0.01
	Gamma GT (U/L)	10.0 ± 0.02	13.0 ± 0.01 ^a	12.5 ± 2.1 ^b	12.0 ± 6.4 ^c
	ALT (U/L)	27.0 ± 0.2	43.5 ± 7.9 ^a	32.0 ± 0.1 ^b	38.0 ± 4.8 ^c
	AST (U/L)	33.0 ± 0.05	57.0 ± 0.02 ^a	50.2 ± 7.2 ^b	52.5 ± 6.4 ^c
21 day	Glucose (g/L)	1.02 ± 0.19	1.64 ± 0.13 ^a	1.20 ± 0.09 ^{b, d}	1.34 ± 0.17
	Gamma GT (U/L)	11.0 ± 0.03	18.0 ± 4.6 ^a	11.2 ± 0.6	12.1 ± 0.8
	ALT (U/L)	32.0 ± 2.7	44.5 ± 3.7 ^a	31.5 ± 7.9	33.2 ± 3.8
	AST (U/L)	36.5 ± 8.7	42.0 ± 6.7 ^a	34.2 ± 3.2	38.2 ± 1.9

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b, c and d: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups and d: significant difference between IVM + AAg and IVM + AAF groups).

As indicated in Table 4, all lipid parameters were significantly decreased in the IVM group compared to control group at day 14 of experimentation, except the HDL-C level which was significantly increased in the same group. The co-administration of vitamin C to the IVM treated rabbits, especially in the IVM + AAg group, resulted in a significant recovery of all lipid parameters compared to IVM group except the level of HDL-C. At day 21, only LDL-C and TG levels and the LDL-C/HDL-C ratio were still significantly

decreased in the IVM group compared to control group. In addition to the total cholesterol/ HDL-C ratio, the above mentioned parameters were significantly better corrected in the IVM + AAg group compared to IVM group. The AIP was increased in the IVM group compared to the control and decreased in the IVM + AA-cotreated groups compared to IVM group at 14 day of experimental period. However, at 21 day of experimentation, the AIP was still increased in the IVM group and both IVM + AA-cotreated groups compared to control group.

Table 4: Effect of IVM and/or AA on lipid profile at 14 and 21 day of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + AAg	IVM + AAF
14 day	TC (g/l)	1.05 ± 0.001	0.78 ± 0.001 ^a	0.86 ± 0.24 ^b	0.66 ± 0.10
	TG (g/l)	1.75 ± 0.004	0.11 ± 0.002 ^a	1.17 ± 0.16 ^b	0.94 ± 0.24 ^c
	HDL-C (g/l)	0.29 ± 0.003	0.39 ± 0.001 ^a	0.34 ± 0.07	0.27 ± 0.03
	LDL-C (g/l)	0.41 ± 0.002	0.21 ± 0.003 ^a	0.30 ± 0.12 ^b	0.19 ± 0.10 ^c
	VLDL-C (g/l)	0.35 ± 0.01	0.23 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.03 ^b	0.17 ± 0.08 ^c
	TC/HDL-C	3.62 ± 0.001	2.22 ± 0.003 ^a	2.49 ± 0.23 ^b	2.32 ± 0.27 ^c
	LDL-C/HDL-C	1.41 ± 0.002	0.58 ± 0.001 ^a	0.82 ± 0.33 ^b	0.70 ± 0.29 ^c
	AIP	0.83 ± 0.001	-2.66 ± 0.002	-0.15 ± 0.17	0.15 ± 0.09
21 day	TC (g/l)	0.93 ± 0.05	0.83 ± 0.10	0.85 ± 0.17	0.73 ± 0.08
	TG (g/l)	1.10 ± 0.17	0.87 ± 0.12 ^a	0.90 ± 0.24 ^b	0.84 ± 0.18
	HDL-C (g/l)	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.40 ± 0.06
	LDL-C (g/l)	0.37 ± 0.03	0.28 ± 0.07 ^a	0.27 ± 0.08 ^b	0.21 ± 0.07 ^c
	VLDL-C (g/l)	0.21 ± 0.07	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01
	TC/HDL-C	2.53 ± 0.19	2.34 ± 0.20	2.19 ± 0.37 ^b	1.82 ± 0.12 ^c
	LDL-C/HDL-C	1.00 ± 0.11	0.79 ± 0.15 ^a	0.71 ± 0.23 ^b	0.47 ± 0.11 ^c
	AIP	0.11 ± 0.08	-0.17 ± 0.06	-0.20 ± 0.11	-0.17 ± 0.15

IVM: Ivermectin; AA: Ascorbic acid; AAg: Ascorbic acid by gavage; AAF: Ascorbic acid supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. a, b and c: p < 0.05 (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + AAg groups, c: significant difference between IVM and IVM + AAF groups).

3.4. Histopathological findings

Histological examination of the control liver sections showed a normal histological architecture with normal hepatocytes arranged in cords that are separated from each other by sinusoids (Figure 1 a, b). H&E-stained sections of the liver of rabbits treated with IVM revealed severe hepatic damage, including, loss of normal hepatocytes architecture, sinusoidal dilation, central vein dilation, congested branches of portal vein (Figure 1 c, d). These changes were reduced in the liver of (IVM + AAg) (Figure 1 e, f) and (IVM + AAF) (Figure 1 g, h) groups of rabbit.

In the control group, the lung sections showed normal limits of intrapulmonary bronchus, bronchiole and alveoli (Figure 2 a, b). However, in the IVM group, the rabbit lung sections showed an irregular intrapulmonary bronchus limit with altered proliferation of mucosal epithelium, dilated bronchiole with a thick epithelium, dilated alveoli with thickening of their septa, pulmonary hemorrhage and pulmonary artery congestion (Figure 2 c, d). These histopathological modifications were less apparent in the lung of (IVM + AAg) (Figure 2 e, f) and (IVM + AAF) (Figure 2 g, h) groups of rabbit.

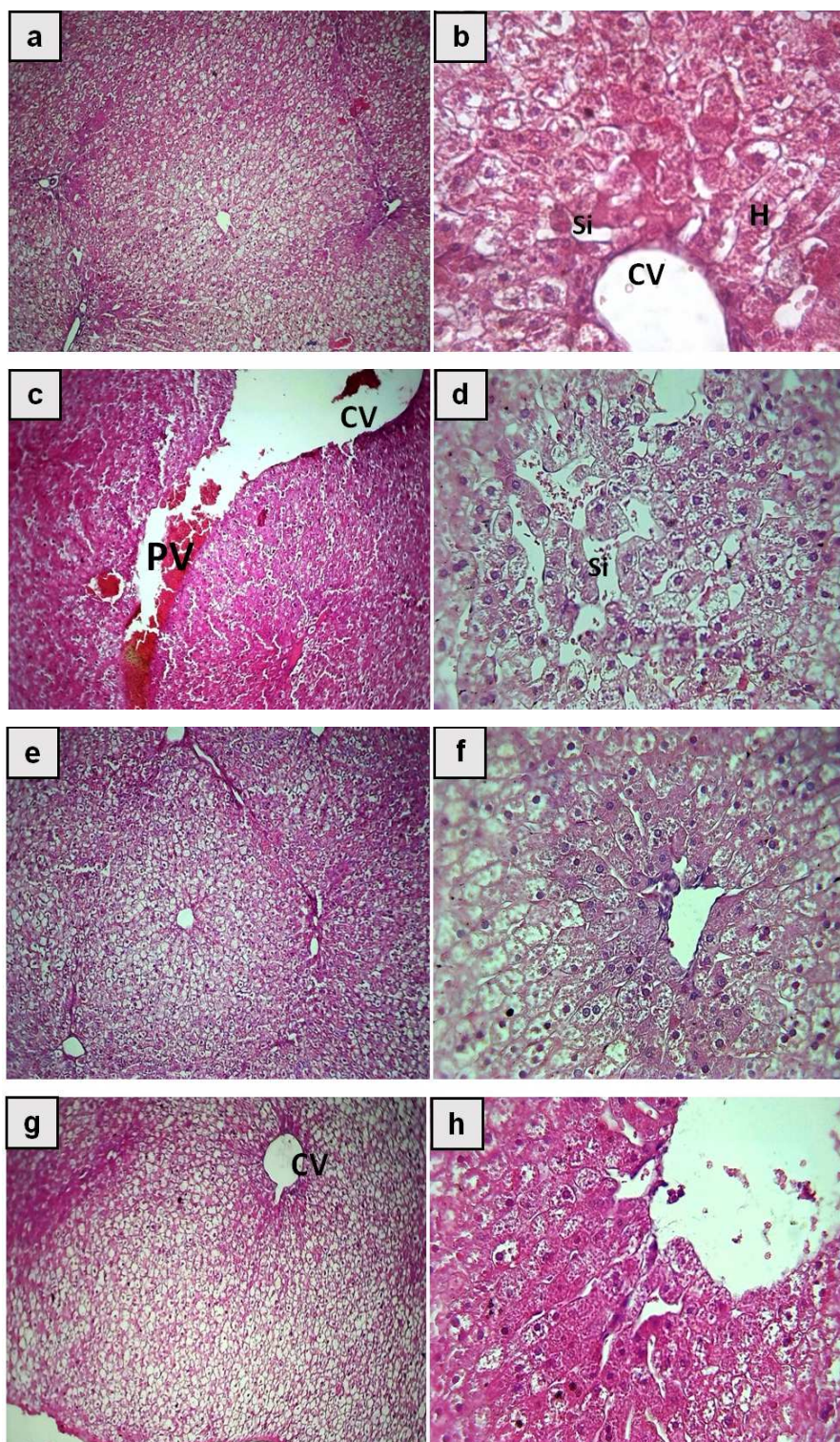


Figure 1. Photographs of liver sections from control rabbits (a and b) showing normal lobular architecture with a central vein (CV) and normal structure of hepatocytes (H) and hepatic sinusoids (Si). From IVM group (c and d), showing a loss of normal hepatocytes architecture, dilated and congested central vein (CV), dilated and congested portal vein (PV), dilated hepatic sinusoids (Si). From IVM + AAg (e and f) and IVM + AAF (g and h) showing normal central vein (CV) and portal vein (PV) with restoration of hepatocytes (H) structure. H&E: (a, c, e and g) $\times 100$ and (b, d, f and h) $\times 400$.

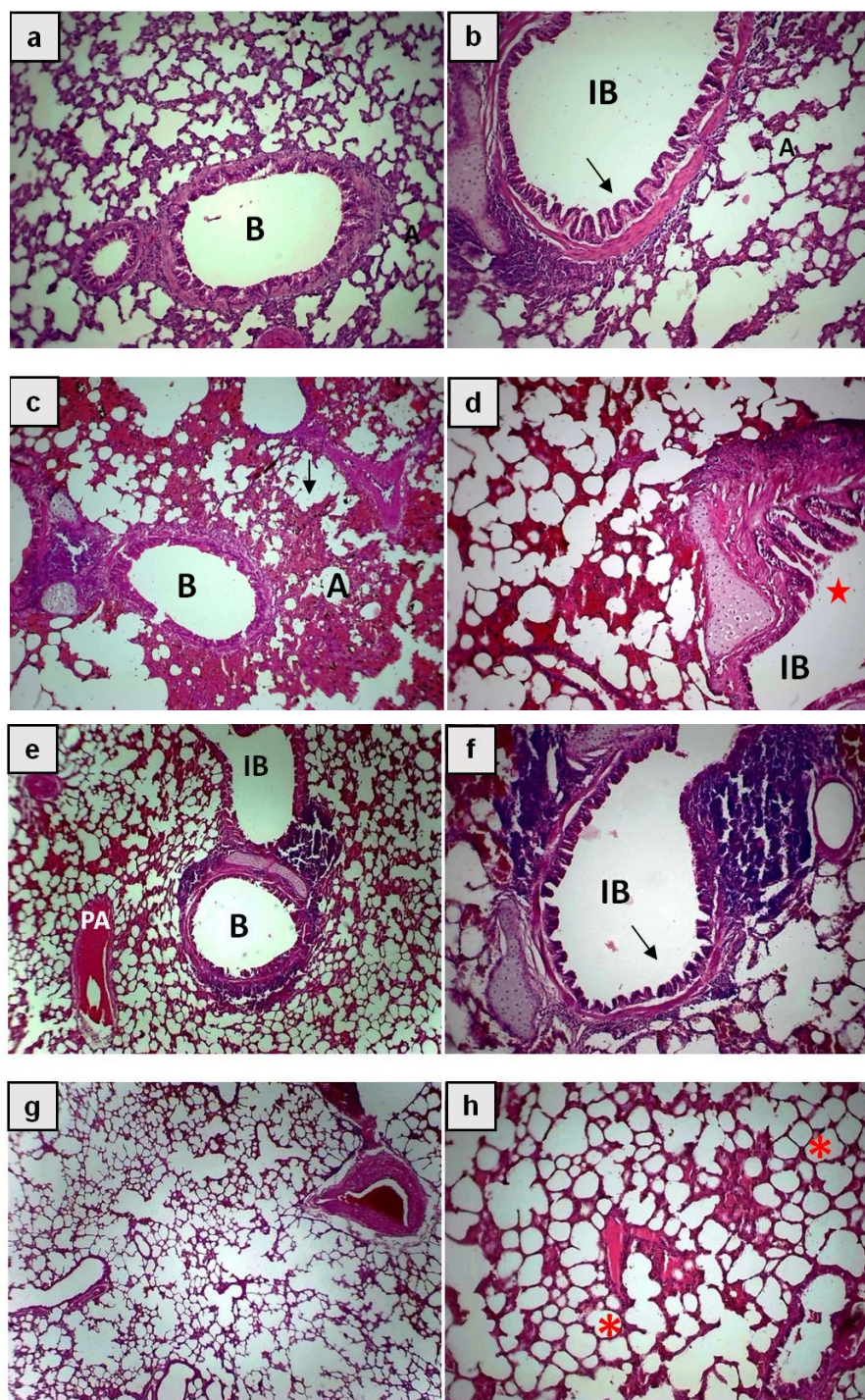


Figure 2. Photographs of lung sections from control rabbits (a and b) showing normal limit of intrapulmonary bronchus (IB) with folded mucosa (arrow), bronchiole (B) and alveoli (A). From IVM group (c and d) showing dilated alveoli (A) with thickening of their septa and pulmonary hemorrhage (arrow), irregular intrapulmonary bronchus (IB) limit with altered proliferation of mucosal epithelium (star), dilated bronchiole (B) with a thick epithelium and congested pulmonary artery. From IVM + AA (e and f) and IVM + AAF (g and h) showing intrapulmonary bronchus (IB) with normal limit and folded mucosal epithelium (arrow), restoration of pulmonary artery congestion (PA) and mild dilation of bronchiole (B) and alveoli (asterisk). H&E: (a, c, e and g) $\times 100$ and (b, d, f and h) $\times 400$.

4. DISCUSSION

MLs resistance has become a problem in human and veterinary medicine thus threatening the sustainable efficacy of antiparasitic drugs [35]. IVM is one of the most important drugs for the control of parasitic infection and was the joint focus of the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine, after 35 years of its remarkable discovery [16]. In Algeria, Many generic preparations of IVM drugs are used for the treatment and prevention of major parasitic diseases in animal, caused by both endo and ectoparasites [36]. However, increases in the use of these compounds are associated with resistance and efficacy problems [37].

Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis [38]. Omshi et al. [23] revealed that treatment with IVM at a concentration of 0.4 mg/kg of body weight orally once a week for three consecutive weeks resulted in insignificant oxidative degradation in the drug-treated group.

In the present study, IVM was given at a dose up to 10 times the highest FDA-approved dose of 200 µg/kg (0.2 mg/kg) [13, 15] for which no death was observed during the experiment. However, a decrease in the body weight and the % BWG of rabbits were observed after IVM treatment. This decrease might be due to the reduced food intake as a result of loss of appetite of the young male rabbits. Our results are similar to those of Khaldoun et al. [30]. The results showed a significant increase in absolute and relative weight of lung in ascorbic acid co-treated groups compared to control group. These findings may be explained by oxidative stress generation due to repeat administration of IVM and its accumulation in lung tissue [19]. For the liver weight, it was found no change in the absolute and relative weight of the liver in all treated groups. These results are not in agreement with previous studies showing a significant increase in liver weight after avermectin administration [20, 30, 39]. Interestingly, the co-administration of AA orally by gavage or in food to IVM rabbits was capable of protecting against the lowered body and organ weight and overall health of rabbits.

Liver damage is caused by excessive exposure to drugs and toxins, which overwhelm the detoxifying power of the liver leading to enzyme leakage, lipid peroxidation, and oxidative stress [40, 41]. The current study showed significant increase in glucose level after 21 day of experimentation and significant increase of GGT, ALT and AST at 14 and 21 of experimental period in rabbits treated with IVM alone which correlated with liver histopathological results. Many reports have stated that avermectins exposure has a significant potential to induce damages in rat liver by increasing plasma transaminases and/or glycemia [30, 39, 41, 42].

In contrast, these parameters were reduced when IVM treated-rabbits were co-administered AA compared to rabbits administered with IVM alone. The IVM + AAg treatment was found to better decrease the level of plasma glucose compared to IVM + AAf. The effects of IVM and its combination with vitamin C on hepatic biomarkers in rabbits indicate that vitamin C provides better protection against IVM-induced hepatic damage. Our results are in agreement with those found by Khaldoun Oularbi et al. [30] that confirmed the ameliorative effect of vitamin C on glucose, AST and ALT plasma level when co-administered to emamectin benzoate during 28 days.

Miyajima et al. [43] demonstrated a significant correlation between the increases of total cholesterol (TC) and IVM concentrations in rabbit's plasma. The authors proposed that the pharmacokinetic profile of IVM is influenced not only by the promotion of IVM dissolution in gastrointestinal tract but also the change of plasma cholesterol concentration. Conversely, our study demonstrated that IVM administration provoked a decrease in all lipid parameters except the HDL-C level which was increased at 14 day. However, the co-administration of vitamin C to the IVM-treated rabbits resulted in a partial recovery of TC, HDL-C and

VLDL-C, as well as TG levels. Moreover, the LDL-C and TG levels were still significantly inferior to those of the control rabbits at 21 day.

Our results are in line with those of Jin et al. [44] who demonstrated that ivermectin decreased serum cholesterol, including high-density lipoprotein and low-density lipoprotein (LDL)/very LDL levels in mice. They established that the antiparasitic drug, IVM, is a Farnesoid X receptor (FXR) ligand that maintain bile acid and cholesterol homeostasis and can effectively improve hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice model by regulating genes expression. According to Al-Jassim et al. [18], the level of TC did not change significantly in IVM and IVM + vitamin C treated groups of rabbits compared to control group while this study showed a significant decrease in plasma level of TG in two groups exposed to IVM + vitamin C orally (0.5 mg/kg + 50 mg/kg and 2 mg/kg + 50 mg/kg; respectively).

Atherogenic indexes are considered as a better indicator of coronary heart disease risk than individual lipoprotein concentration [33]. The most important finding of our study is that the atherogenic index of plasma (AIP) was found to be augmented in IVM group compared to that of the control group. Thus, the co-administration of AA into a diet or by gavage to rabbits had statistically significant effects on the lipid profile compared to IVM group, and corrected the atherogenic index of plasma. In our study, the two atherogenic factors (total cholesterol/HDL-C and LDL-C/HDL-C) were found to be significantly decreased in IVM group compared to the control rabbits. Thus, the co-administration of AA into a diet or by gavage to rabbits had statistically significant effects on the lipid profile compared to IVM group, and corrected the atherogenic indexes.

The aforementioned results revealed that IVM administration 3 times/week for three consecutive weeks in young rabbits displayed histological alterations in liver and lung of male rabbits. Liver histological damage's consist essentially in loss of normal hepatocytes architecture, sinusoidal dilation, central vein dilation and congested branches of portal vein. These results explained the significant high level of liver biochemical parameters and are in accordance with many work's which demonstrated that the repeated administration of either therapeutic or double therapeutic doses of IVM induced severe degenerative changes and necrosis in some parenchymatous organs [20].

The histological testing of lung in IVM group revealed irregular intrapulmonary bronchus limit with altered proliferation of mucosal epithelium, dilated bronchiole with a thick epithelium, dilated alveoli with thickening of their septa, pulmonary hemorrhage and pulmonary artery congestion. These results are in line with those obtained by AL-Jassim et al. [19] and Abd-Elhady and Abou-Elghar [45] who observed interstitial pneumonia with congestion and edema in the lung section of rat exposed to abamectin for 30 days, while local hemorrhages associated with atelectasis was observed in the lung of animals exposed to abamectin for 210 days.

Vitamin C prevents the subsequent histological damage induced in liver and lung tissues. From our results we can assume that liver and pulmonary histological damages of ivermectin are mainly attributed to oxidative stress increase since the effects were largely prevented by ascorbic acid supplementation especially when this later was administered by gavage. Previously, studies have also shown the curative and antioxidative efficiency of orally administered AA and other vitamins against avermectin toxicity [19, 23, 25, 30].

5. CONCLUSION

The findings presented from this study have revealed that IVM repeat high-dose therapy in rabbits may cause toxic effect on liver function, lipid profile and several changes of the liver and lung histological structure. AA co-treatment could reduce the level of IVM toxicity. In the light of these results, vitamin C by

gavage is recommended over that supplemented in the food. Careful application should be considered when using IVM on a wide scale in rabbits and others farm animals.

Abbreviations

IVM: ivermectin; AA: ascorbic acid; AAg: ascorbic acid by gavage; AAF: ascorbic acid supplemented in food; AST: alanine aminotransferase; ALT: aspartate amino transferase; GGT: gamma-glutamyltransferase; MLs: macrocyclic lactones; ML: macrocyclic lactones; BW: body weight; BWG: body weight gain; H&E: haematoxylin and eosin; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol; AF: atherogenic factor; AIP: atherogenic index of plasma; FDA: Food and Drug Administration; SD: standard deviation; DNA: deoxyribonucleic acid; GABA: Gama-aminobutyric acid.

Authors' Contributions: MC and KH performed experiments and statistical analysis, interpreted the results and prepared the manuscript. BS revised the manuscript and provided valuable advices. TD, BA and BM participate in the experimental design, biochemical analysis and histopathological studies. ZN and KH supervised the study and revised the study for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest: The author has no conflict of interest to declare.

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).

Availability of data and materials: The datasets used and/or analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Omondi EO, Nyabadza F, Bonyah E, Badu K. Modeling the infection dynamics of onchocerciasis and its treatment. *J Biol Systems*. 2017; 25(02): 247-277.
2. Campbell WC. Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel lecture). *Angewandte Chemie Int Edn*. 2016; 55(35): 10184-10189.
3. Danaher M, Howells LC, Crooks SR, Cerkvénik-Flajs V, O'Keeffe M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J Chromatogr B*. 2006; 844(2): 175-203.
4. Campbel CW. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharmac Biotechnol*. 2012; 13(6): 853-865.
5. Qureshi S. Biochemical toxicity of ivermectin in Wistar albino rats. *Am-Euras J Toxicol Sci*. 2013; 5(1): 15-19.
6. Batiha GE, El-Far AH, El-Mleeh AA, Alsenosy AA, Abdelsamei EK, Abdel-Daim MM, et al. In vitro study of ivermectin efficiency against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, among cattle herds in El-Beheira, Egypt. *Vet World*. 2019; 12(8): 1319-1326.
7. Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu B. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 480(3): 415-421.
8. Wang J, Xu Y, Wan H, Hu J. Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 497(1): 241-247.
9. Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, et al. Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res*. 2016; 76(15): 4457-4469.

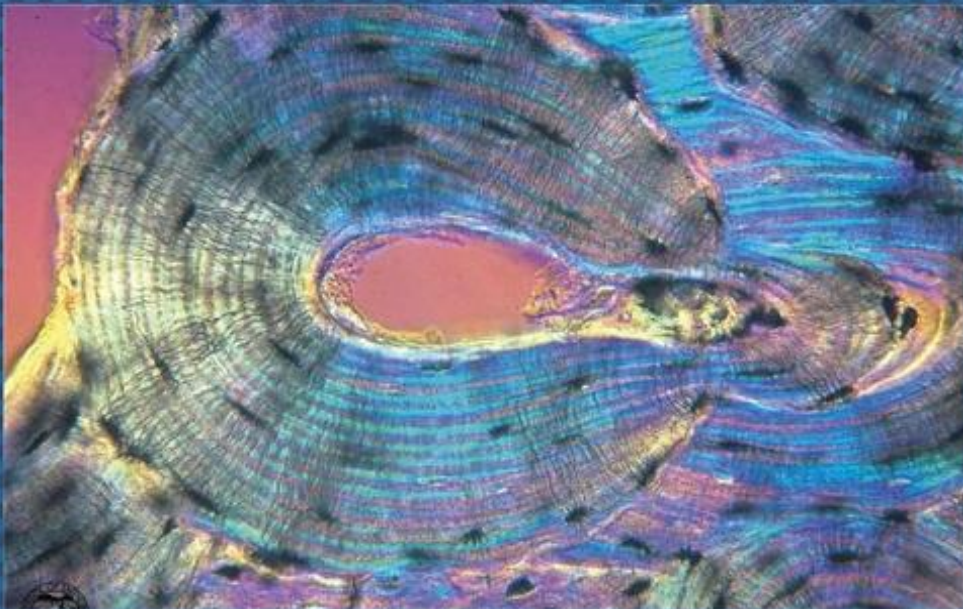
10. Hansen JM, Coleman RL, Sood AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016; 56: 131-143.
11. Zhu M, Li Y, Zhou Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 492(3): 373-378.
12. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res*. 2020; 104787.
13. Lu M, Xiong D, Sun W, Yu T, Hu Z, Ding J, et al. Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery*. 2017; 24(1): 622-631.
14. Gokbulut C, Biligili A, Kart A, Turgut C. Plasma dispositions of ivermectin, doramectin and moxidectin following subcutaneous administration in rabbits. *Lab Animals*. 2010; 44(2): 138-142.
15. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol*. 2002; 42(10): 1122-1133.
16. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends Parasitol*. 2017; 33(6): 463-472.
17. Merola VM, Paul AE. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Vet Clinics Small Animal Practice*. 2018; 48(6): 991-1012.
18. Al-Jassim KB, Jawad AADH, Al-Masoudi EA. Effects of ivermectin on lipid profiles, antioxidant enzymes and proteins with the beneficial effects of vitamin C in rabbits. *Int J Sci Technol*. 2015; 143(2495): 1-13.
19. Al-Jassim KB, Jawad AADH, Al-Masoudi EA, Majeed SK. Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (*Lupus cuniculus*). *Basrah J Vet Res*. 2016; 14: 110-24.
20. El Zoghby RR, Amin A, Hamouda AF, Ali AF. Toxicological and pathological studies of ivermectin on male albino rats. *J Am Sci*. 2015; 11(3): 73- 83.
21. Li M, You TZ, Zhu WJ, Qu JP, Liu C, Zhao B, et al. Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicol*. 2013; 22(8): 1241-1254.
22. Abdel-Daim MM, Abdellatif SA. Attenuating effects of caffeic acid phenethyl ester and betaine on abamectin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25(16): 15909-15917.
23. Omshi FS, Abbasalipourkabir R, Abbasalipourkabir M, Nabyan S, Bashiri A, Ghafourikhosroshahi A. Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25(29): 29408-29417.
24. Ali BH. The effect of ivermectin on some haematological indices in rabbits: influence of vitamin K treatment. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1990; 17(10): 735-738.
25. Behera SK, Dimri U, Singh SK, Mohanta RK. The curative and antioxidative efficiency of ivermectin and ivermectin+ vitamin E-selenium treatment on canine *Sarcoptes scabiei* infestation. *Vet Res Commun*. 2011; 35(4): 237-244.
26. Singh R, Verma PK, Singh G. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *J Complem Med Res*. 2012; 1(2): 101-104.
27. Jurczuk M, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(8): 1478-1486.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA; 2015.

29. Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British J Pharmacol.* 2009; 157(7): 1097-1110.
30. Khaldoun Oularbi H, Richeval C, Lebaili N, Zerrouki-Daoudi N, Baha M, Djennas N, et al. Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human Exp Toxicol.* 2017; 36(7): 709-717.
31. Derelanko MJ, Auletta CS, eds. *Handbook of toxicology.* CRC Press, 2014.
32. Fetoui H, Makni M, Garoui EM, Zeghal N. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroids pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62: 593-599.
33. Króliczewska B, Miśta D, Ziarnik A, Żuk M, Szopa J, Pecka-Kiełb E, et al. The effects of seed from *Linum usitatissimum* cultivar with increased phenylpropanoid compounds and hydrolysable tannin in a high cholesterol-fed rabbit. *Lipids Health Disease.* 2018; 17(1): 76.
34. Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF, et al. Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular Health Risk Manag.* 2009; 5: 757.
35. Gonzalez-Canga A, Fernandez-Martinez N, Sahagun-Prieto A, Diez-Liébana MJ, Sierra-Vega M, Garcia-Vieitez JJ. A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. *Curr Drug Metab.* 2009; 10(4): 359-368.
36. Bentounsi B, Ouksel M, Kachtarzi B. Compared efficacy of twelve registered preparations of ivermectin on the digestive and respiratory nematodes in Algerian sheep. *Revue Méd Vét.* 2009; 160(7): 329-334.
37. Kaplan RM, Vidyashankar AN. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol.* 2012; 186(1-2):70-78.
38. Zhang Y, Luo M, Xu W, Yang M, Wang B, Gao J, et al. Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. *J Agricult Food Chem.* 2016; 64(36): 6895-6902.
39. Khaldoun-Oularbi H, Richeval C, Djenas N, Lhermitte M, Humbert L, Baz A. Effect of sub-acute exposure to abamectin “insecticide” on liver rats (*Rattus norvegicus*). *Ann Toxicol Anal.* 2013; 25(2): 63-70.
40. Arise RO, Malomo SO. Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *Afr J Biochem Res.* 2009; 3(5): 190-197.
41. El-Far AH. Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *Am J Animal Vet Sci.* 2013; 8(3): 128-133.
42. Hsu DZ, Hsu CH, Huang BM, Liu MY. Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. *Toxicology.* 2001; 165(2-3):189-193.
43. Miyajima A, Komoda M, Akagi K, Yuzawa K, Yoshimasu T, Yamamoto Y, et al. Experimental study of pharmacokinetics of external, whole body bathing application of ivermectin. *J Dermatol.* 2015; 42(1): 87-89.
44. Jin L, Feng X, Rong H, Pan Z, Inaba Y, Qiu L, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature Commun.* 2013; 4(1): 1-8.
45. Abd-Elhady HK, Abou-Elghar GE. Abamectin induced biochemical and histopathological changes in the albino rat, *Rattus norvegicus*. *J Plant Protect Res.* 2013; 53(3): 263-270.



EGYPTIAN ACADEMIC JOURNAL OF
BIOLOGICAL SCIENCES
HISTOLOGY & HISTOCHEMISTRY

D



ISSN
2090-0775

WWW.EAJBS.EG.NET

Vol. 13 No. 1 (2021)



Protective Effects of Vitamin C on Ivermectin Induced Toxicity on Kidney Functions and Brain Tissue in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Makhlouf Chahrazed^{1, 2, *}, Khaldoun Oularbi Hassina^{1, 2}, Bokreta Soumya^{1, 2},
Oularbi Yasmine³, Zerrouke Houda¹ and Daoudi Zerrouki Nacira²

1- Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Blida 1, BP 270.
Soumaa, Blida, Algeria

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

3- National Higher School of Agronomy, El-Harrach, 16200, Algiers, Algeria

E.Mail : chahrazedmakhlouf@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article History

Received:28/2/2021

Accepted:17/4/2021

Keywords:

Ivermectin,
Vitamin C,
Biochemical
parameters,
Histopathology,
Rabbit.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of repeated intake of a high dose of Ivermectin (IVM) alone or with co-administration of Vitamin C on kidney biochemical parameters and histological structure of kidney and brain of male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Male rabbits were distributed into four groups (5 rabbits/group) and treated for three consecutive weeks: receiving distilled water; IVM 2 mg/kg b.w. subcutaneously, 3 times a week; IVM + Vitamin C 20 mg/1mL by gavage and IVM + Vitamin C 200mg /kg of diet in food. IVM significantly ($p < 0.05$) increased the plasma level of creatinine compared to the control group. Co-treatment with vitamin C orally by gavage ameliorated this level compared to IVM group. The histopathological examination of kidney sections in IVM alone treated group showed dilated Bowmans' spaces, dilated renal tubules, vascular congestion and cell infiltration. The brain tissues demonstrated vacuolated neuropil and degenerative changes in nerve cells in both the cerebral cortex and hippocampus of IVM-treated rabbits. However, these histological changes were moderate in both vitamin C co-treated groups. In conclusion, vitamin C has a protective effect against nephrotoxicity and neurotoxicity induced by subacute administration of a high dose of IVM.

INTRODUCTION

Macrocyclic lactones (MLs) represent a wide family of antiparasitic drugs of a broad spectrum (McKellar and Benchaoui 1996). MLs are divided into two groups of molecules: avermectins (AVMs) and milbimycins. AVMs were firstly discovered in the fermentation bouillon of *Streptomyces avermitilis*, a soil microorganism (GabAllh *et al.*, 2017). After performing many bioassays, eight natural components, specifically A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b, were found. AVMs molecules of B series were extremely effective over helminthes and arthropods. Ivermectin (IVM; 22, 23-dihydro-avermectin B1) was commercialized for animal and clinical use in 1981 (Shoop *et al.*, 1995).

Based on its high efficacy and tolerability, IVM is a miraculous endectocide drug widely used as an antiparasitic agent in veterinary and human therapy (Trailović and Nedeljković 2010).

IVM is utilized in a large range of animals for internal and external parasites, it is used with different doses as heartworm prophylaxis, ectoparasite treatment and a microfilaricide (Papich 2015). In human medicine, IVM was very effective in treating onchocerciasis (Crump and Omura 2011), strongyloidiasis, scabies, gnathostomiasis, pediculosis, myiasis, leishmaniasis (Dos Santos *et al.*, 2009; Geary, 2005), children head lice and scabies (Bockarie *et al.*, 2000), it was also found efficient against malaria parasite and vector (Azevedo *et al.*, 2019; Mekuriaw *et al.*, 2019) and *Papulopustular rosacea* (De Ménonville *et al.*, 2017). As well, the use of IVM in a mice model was associated with a decrease in alcohol intake (Yardley *et al.*, 2012). The anticancer and the antiviral activity of IVM are well known. Thus recently, IVM was found to have an anti-cancer effect on human colon cancer and lung carcinoma (Diao *et al.*, 2019). Given the widespread of COVID-19 pandemic caused by Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), researchers are constantly striving to find a suitable drug to treat this malady. (Gonçalves *et al.*, 2020) has concluded from the review of many realized works that IVM can inhibit the viral replication of SARS-CoV-2.

IVM is a lipophilic drug that acts by preserving the transmission of electrical impulses in nerves and muscles by intensifying the glutamate-gated chloride ions channels (GluCl_s) in parasites. This leads to cell penetration of more chloride ions resulting in hyperpolarization and paralysis of the neuromuscular systems of invertebrates (Bloomquist 2003).

The GluCl_s are entirely absent in the nervous system of vertebrates.

However, MLs are well known to link to other transmembrane receptors that are existing in Mammals as well as γ -aminobutyric acid type A (GABA_A), glycine, neuronal α_7 -nicotinic and purinergic P_{2x4} receptors. AVMs are well tolerated in vertebrates and characterized with few to no side effects. This can be explained by their low affinity to the aforementioned receptors compared to GLuCl_s (Spampanato *et al.*, 2018). On the other hand, the most common adverse effects of AVMs are related to GABA_A receptor activation (Moreira *et al.*, 2017). According to (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010), this lack of side effects can be due to the presence of a P-glycoprotein pump in the blood-brain barrier that limits the AVMs penetration in the central nervous system (CNS). Even the wide safety of MLs in both animals and human, they can be toxic and even mortal in mammals with P-glycoprotein deficiencies (Menez *et al.*, 2012). In another way, whereas the proper mechanism is unclear, MLs administered at high doses may penetrate through the blood-brain barrier and cause GABA-mimetic toxic effects in mammals. This toxicity starts with hyper-excitability, incoordination, tremors and hypotension and later expands into ataxia, coma and respiratory failure and may lead to death (Yang 2012).

IVM when taken orally or in other routes is well diffused to all tissue compartments via blood circulation, the widest quantity is found in the liver, while the smallest one is found in the brain tissue because of the blood-brain barrier limitation. IVM is almost metabolized in the liver by the cytochrome P450; it is mainly eliminated in the feces while only < 5% is excreted via the kidneys. This unequal distribution of IVM in different organs can explain the diverse toxicity of IVM between invertebrates and their vertebrate hosts (Kudzi *et al.*, 2010).

In addition to the clinical signs of IVM neurotoxicity, actually many studies have detected the effect of Therapeutic and double therapeutic doses of IVM on kidney function in rats (Arise and Malomo 2009; El Sawy *et al.*, 2015; Elzoghby *et al.*, 2015; Omshi *et al.*, 2018) and brain tissue especially the cerebral cortex in rabbits (GabAllh *et al.*, 2017). Conversely, few studies were conducted on the functional and histopathological effects of IVM on the hippocampus. The hippocampus which is fully developed only in mammals is located under the cerebral cortex and form a key brain zone for many forms of learning and memory (Amin *et al.*, 2013). While there are various studies on the toxic effect of IVM, there is a need to study this effect at repeated high-dose therapy.

The toxic effects of AVMs are mainly attributed to oxidative stress (Zhu *et al.*, 2017), which explains the need to use antioxidant products to alleviate their harmful effects in mammals. The utilization of natural antioxidants to ameliorate different xenobiotic-induced alterations in vertebrates becomes a field of interest for many recent researchers. Amongst natural antioxidants, vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble vitamin that protects cellular compartments in the face of reactive oxygen species (Jurczuk *et al.*, 2007). It is one of the main important elements in the biological system (Magdy *et al.*, 2016). This vitamin must be incorporated into the diet for the reason that it cannot be produced in mammals' organisms (Radi *et al.*, 2020). It has been demonstrated that vitamin C ameliorates AVMs induced biochemical; histopathological and/or oxidative stress parameters alterations in kidneys (Omshi *et al.*, 2018; Magdy *et al.*, 2016; Al-Jassim *et al.*, 2016), brain tissues (Radi *et al.*, 2020) and other organs (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017).

The objectives of this study were to examine the impact of sub-acute

exposure to a high dose of IVM (Avimec®) on the renal biochemical parameters and histopathological modifications in kidneys and brain tissues of male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Moreover, the ameliorative effect of vitamin C against IVM toxicity was also tested in this experiment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals:

The injectable solution of IVM (AVIMEC®, 10 mg/ml) and Vitamin C (the content of which was more than 99%) were purchased from the Arab Veterinary Industrial Company, Jordan and Sigma–Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, USA), respectively.

Animals:

To perform this study, young male rabbits of the local breed (*Oryctolagus cuniculus*) with an initial weight of 0.85 to 0.95 kg were used in this work. Rabbits were supplied from a breeding barn of Djebba (Tizi-Ouzou) and maintained for experimentation in the Saidal CRD, Algiers. All animals were lodged in temperature and hygrometry-controlled rooms with a 12 h light/dark cycle. Animal experimentation was consistent with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology (Derelanko and Auletta 2014). Before any treatment, the rabbits were subjected to a 14-day acclimation period and were fed with a commercial pellet diet and water *ad libitum*.

Experimental Design:

The experiment was carried out on 20 male rabbits divided into four groups (n=5) according to their homogeneous mean weight in each group. A control group was given distilled water by gavage; IVM group, treated subcutaneously with a high dose of IVM (2 mg/kg of body weight, three times/week) for 21 days (Lu *et al.*, 2017); IVM + Vit C_g group; treated with the same dose of IVM and Vitamin C by gavage (20 mg / 1ml, three times/week) and IVM + Vit C_f group, treated with the same dose of IVM and Vitamin C supplemented in food (200

mg/kg of food, three times/week) (Fetoui *et al.*, 2010). Vitamin C was administered 24 h after IVM injection. During the acclimation (2 weeks) and experimentation (3 weeks) periods, all animals were weighed daily. While the blood samples were collected at 14 and 21 days of the experiment in heparin tubes from the lateral marginal vein of the ear for renal biomarkers analysis. After 21 days of treatment, all rabbits were sacrificed by cervical decapitation, and kidneys and brain were carefully removed and weighed.

Biochemical Analysis:

To evaluate the effect of ascorbic acid on IVM toxicity, Blood samples were gathered after a fasting period of 12 hours and plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 20 min. The following renal parameters; creatinine, uric acid and urea were evaluated in plasma using a commercially available spectrophotometric enzymatic kit (Biolabo, France) and analyzed by an auto-analyzer (Hitachi 912) instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Histopathological Examinations:

For the histopathological study, the kidneys and the brain were dissected out from all rabbits and fixed in 10% neutral formalin buffer, processed through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin blocks. Organ sections were cut and stained with

haematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examinations.

Statistical Analysis:

Statistical analysis was carried out using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc tests. Data were expressed as the mean $\pm$ SD. A p-value < 0.05 was considered as a level of significance.

RESULTS

No deaths occurred in any group during the experiment. However, severe physical signs (tremor and commotion), hair loss, diarrhea and reduced activity were observed in IVM group rabbits compared to the control group.

Effect on Absolute and Relative Organ Weights:

As mentioned in **Table 1**, the absolute and relative weight of both right and left kidneys showed a significant ($p < 0.05$) increase in the IVM group compared to control group. On the other hand, these weights were not significantly changed in the IVM + Vit C-treated groups compared to control group. However, the absolute and relative weights of the brain were significantly decreased in the IVM group compared to control group without a significant modification of the brain weight in both IVM + Vit C-treated groups compared to control.

Table 1: Effect of IVM and/or Vitamin C on absolute and relative kidneys' and brain weights, 21 days after treatment.

Organ weight (g) / groups			Control	IVM	IVM + VitC _g	IVM + VitC _f
Kidneys	RK	Absolute	5.7 $\pm$ 0.9	6.8 $\pm$ 1.3*	5.9 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 0.8
		Relative	0.3 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.1*	0.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1
	LK	Absolute	6.0 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 1.4*	6.1 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 1.8
		Relative	0.3 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.1*	0.3 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.1
Brain	Absolute		8.4 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.3*	8.3 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 2.4
	Relative		0.4 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.03*	0.5 $\pm$ 0.01	0.5 $\pm$ 0.1

IVM: Ivermectin; VitC: Vitamin C; VitC_g: Vitamin C by gavage; VitC_f: Vitamin C supplemented in food; RK: right kidney; LK: left kidney. Results are given as a mean $\pm$ SD for five rabbits in each group.

*: $p < 0.05$ (significant difference between IVM group and control).

Effect on Serum Biochemical

Parameters:

The results of renal biochemical parameters are shown in Table 2. IVM induced nephrotoxicity as proved by the elevation of kidneys' biomarkers in plasma. On day 14 of experimentation, only the creatinine level increased significantly ($p < 0.05$) in the IVM group compared to the control group. This level was significantly decreased in

IVM + VitC_g group compared to IVM group. On day 21 of experimentation, the plasma level of creatinine continues to be increased significantly in the IVM group compared to control without any significant change in the same level in IVM + VitC-treated groups. However, the levels of uric acid and urea didn't change significantly between the four studied groups on days 14 and 21 of the experimental period.

Table 2: Effect of IVM and/or Vitamin C on renal biomarkers at 14 and 21 days of experimentation.

Period	Biochemical parameters	Experimental groups			
		Control	IVM	IVM + VitC _g	IVM + VitC _f
14 day	Creatinine (mg/dl)	7.16 ± 0.01	10.8 ± 0.01 ^a	8.85 ± 0.13 ^b	7.4 ± 0.36
	Uric acid (mg/dl)	4.4 ± 0.02	5.1 ± 0.01	4.9 ± 0.6	4.8 ± 0.4
	Urea (mg/dl)	0.27 ± 0.2	0.32 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.29 ± 0.01
21 day	Creatinine (mg/dl)	7.24 ± 1.69	12.24 ± 0.88 ^a	7.38 ± 0.51	7.72 ± 1.3
	Uric acid (mg/dl)	4.4 ± 0.03	4.4 ± 0.01	4.91 ± 1.4	4.5 ± 0.3
	Urea (mg/dl)	0.27 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03

IVM: Ivermectin; VitC: Vitamin C; VitC_g: Vitamin C by gavage; VitC_f: Vitamin C supplemented in food. Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group.

A and b: $p < 0.05$ (a: significant difference between all treated groups and control, b: significant difference between IVM and IVM + VitC_g groups).

Histopathological Results:

In the control group, the kidney showed normal morphology with a normal appearance of renal corpuscles, glomeruli, surrounded by Bowman's spaces and cortical tubules with proximal and distal convoluted tubules (Fig. 1: A). In IVM alone treated group, the kidney cortex showed severe pathological alterations, including vascular congestion, mononuclear infiltrating cells, dilation of the Bowmans' spaces, vacuolization in tubular cells and dilated proximal and distal convoluted tubules (Fig. 1: B & C). These pathological changes were ameliorated in IVM + Vitamin C groups (Fig. 1: D).

The cerebral cortex of control (Fig. 2: A & B) rabbits exhibited normal cellular architecture. However,

IVM group (Fig. 2: C, D & E) showed abnormal cellular morphology of granule cells and pyramidal cells in granular and pyramidal layers, respectively accompanied by severe vacuolation of neuropil and necrosis of neurons in the brain cortex. In Vitamin C-treated group's (Fig. 2: F & G) modulation of the abnormalities in brain cortex histopathology as compared to IVM group are shown.

The histological structure of the hippocampus of IVM alone treated group (Fig. 3: C & D) showed degenerative changes mainly neuropil vacuolation and intracellular vacuoles, which result in foam structure cells as compared to control (Fig. 3: A & B) and Vitamin C exposed rabbits (Fig. 3: E & F).

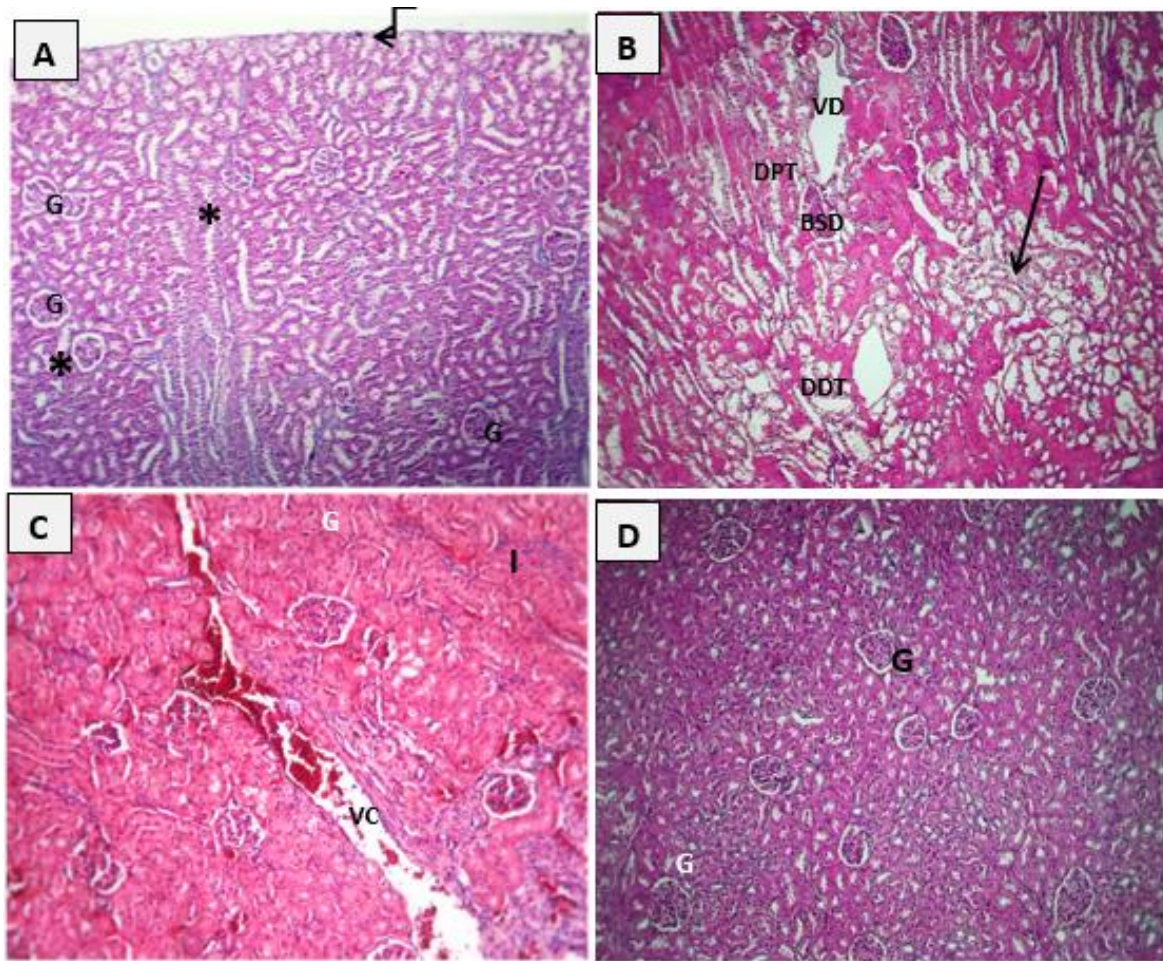


Fig. 1: Photomicrographs of rabbit kidney sections (hematoxylin-eosin) showing (A): the normal appearance of renal cortex limited with renal capsule (arrow) and normal histology of glomeruli (G); surrounded with Bowmans' spaces and distal and proximal convoluted tubules (astirisks) in the control group. (B and C): vacuolation in tubular cells (arrow), vascular dilation (VD), glomeruli with Bowmans' spaces dilation (BSD), dilated distal and proximal convoluted tubules (DDT and DPT, respectively), vascular congestion (VC) and mononuclear cells' infiltrations in IVM group (I). (D): ameliorated architecture of renal cortex in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups, respectively. (Magnification A, B, C and D: Gr × 100).

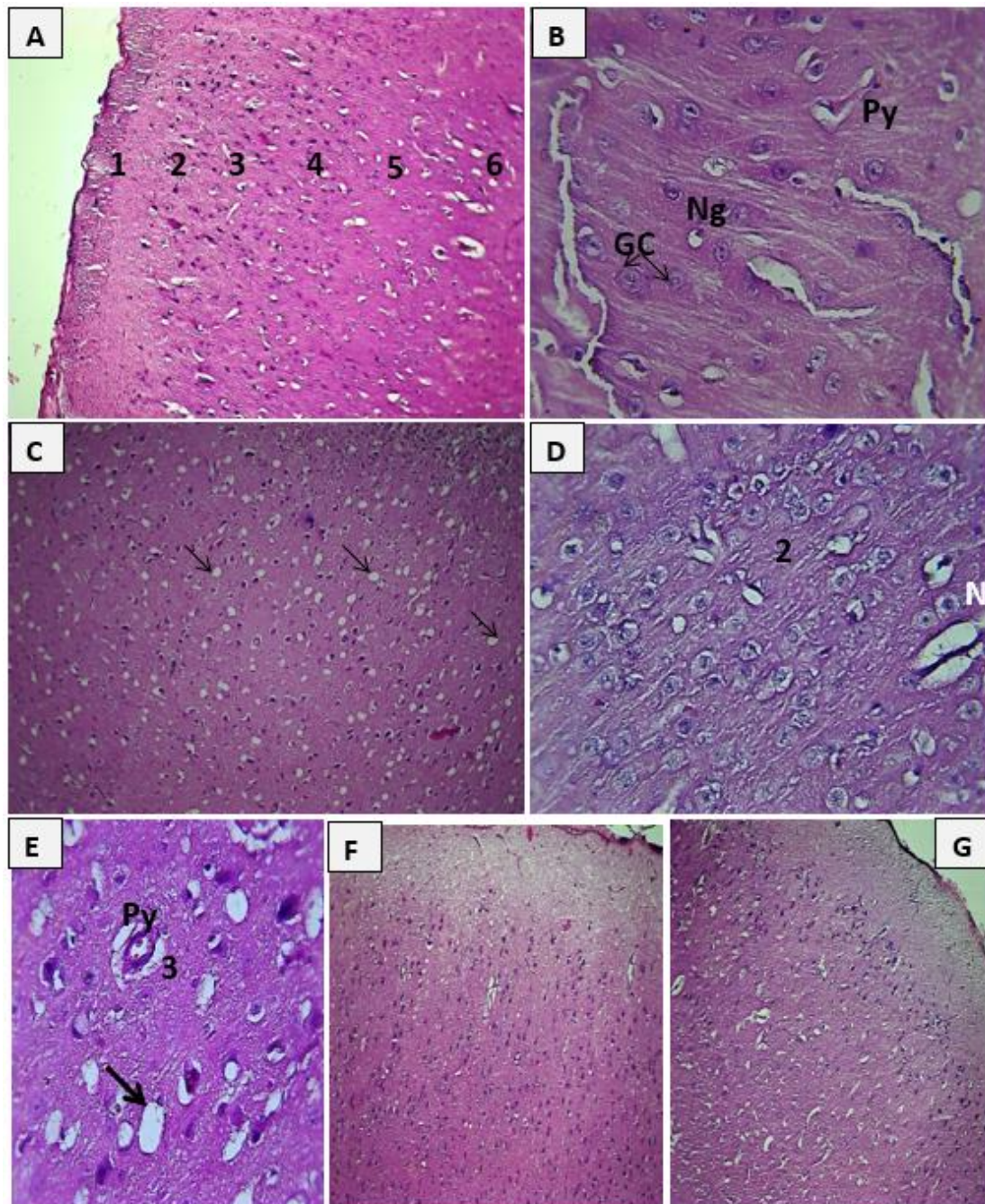


Fig. 2: Photomicrographs of rabbit cerebral cortex sections (hematoxylin-eosin) showing (A and B): the normal architecture of cells (GC: granule cells; Py: pyramidal cell; Ng: neuroglial cell) in cerebral cortex layers (1: molecular layer; 2: outer granular layer; 3: outer pyramidal layer; 4: inner granular layer; 5: inner pyramidal layer; 6: multiform layer). (C, D and E): vacuolated neuropil of the cerebral cortex (arrows), the outer granular layer becomes more cellular with abnormal granule cells (2), irregular shaped pyramidal cells (Py) surrounded by pericellular halos in the outer pyramidal layer and neurons necrosis (N) in IVM group. (F and G): Apparently normal architecture of cerebral cortex layers and cells with less vacuolated neuropil in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups. Magnification: A, C, F and G $\times 100$; B, D and E $\times 400$.

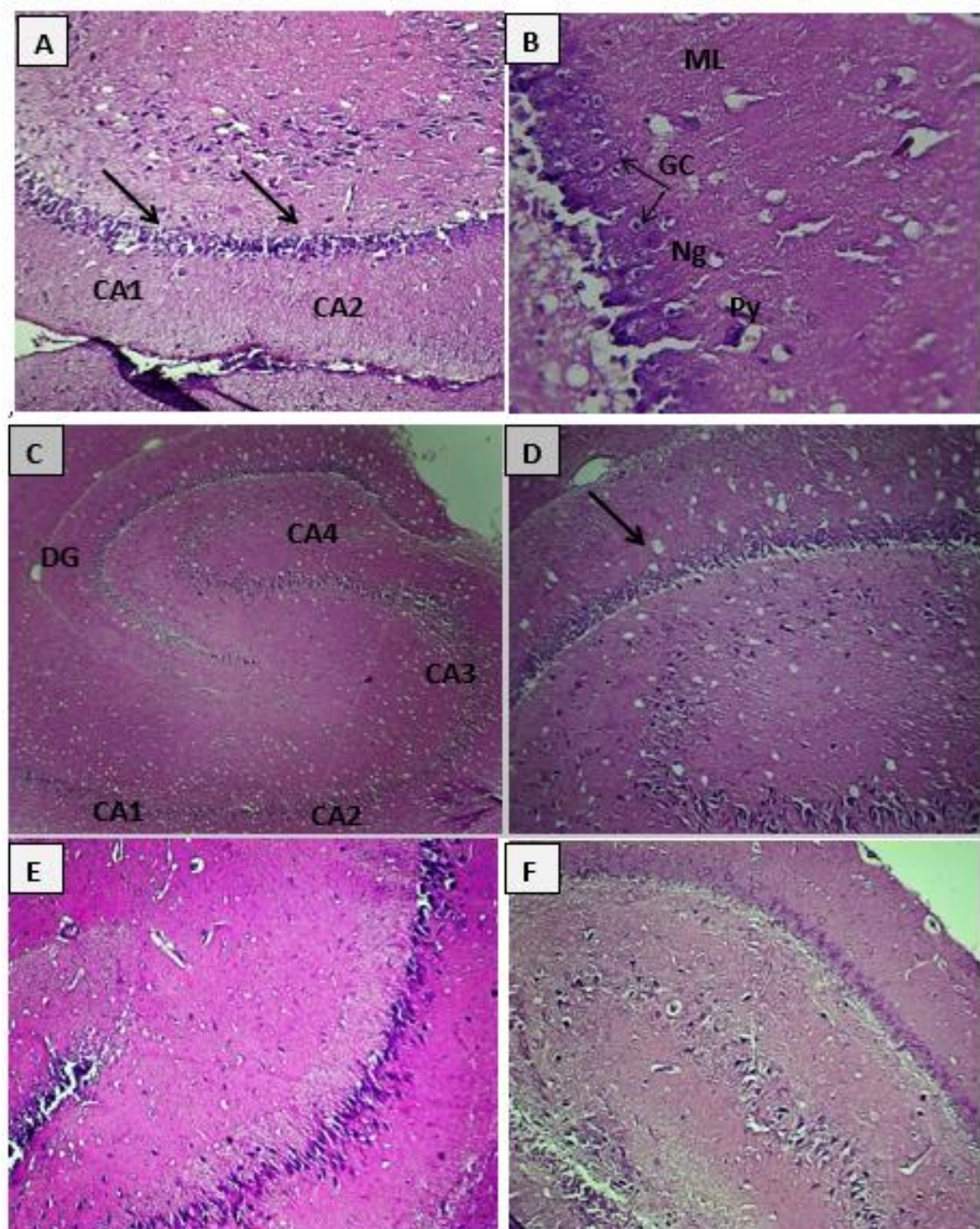


Fig. 3: Photomicrographs of rabbit hippocampus sections (hematoxylin-eosin) showing (A): the normal appearance of pyramidal cells of Cornu Ammonis (CA1 and CA2) region, (B): granular layer with normal granule cells (GC) and normal neuroglial cells (Ng) and pyramidal cells (Py) of the molecular layer in Dentate Gyrus region in the control group. (C and D): vacuolated neuropil of all layers of both Cornu Ammonis (CA1, CA2, CA3, CA4) and Dentate Gyrus (DG) regions and intracellular vacuoles with the formation of foam cells (arrow) in IVM group. (E and F): corrected pathological changes of hippocampus in IVM + VitC_g and IVM + VitC_f groups. Magnification: A, C, D, E and F $\times 100$; B $\times 400$.

DISCUSSION

AVMs are the largest marketed anthelmintic drugs in the world. AVMs are potent antiparasitic used for the treatment of both internal and external parasites in animals, they are lipophilic compounds known by a broad spectrum of activity with noticed long-lasting efficacy (GabAllh *et al.*, 2017). The wide range of use of IVM in the treatment of many conditions in animals and humans explains the need of studying its effects on vertebrates especially mammals (Omshi *et al.*, 2018). IVM is considered a very safe drug when therapeutic doses are respected. However, several toxic effects were reported in sensitive populations or are related to involuntary overdoses. The dose and dosage of IVM for animals and humans are changing depending on the clinical case and the type of parasites (Ahmed *et al.*, 2020). According to (Barrett *et al.*, 2016), parenteral IVM is better tolerated compared to oral administration which is associated with embarrassing gastrointestinal side effects.

The present work evaluated the ameliorative and protective effect of vitamin C administered either orally by gavage or supplemented in food on the toxic effects associated with the administration of a high dose of an antiparasitic drug, AVIMEC® (2 mg/kg b.w) given at a dose up to 10 times the highest therapeutic dose of 0.2 mg/kg (0.2 mg/kg b.w) (Barrett *et al.*, 2016) subcutaneously for 21 days in a male rabbit. To achieve this goal, the animals' behaviors, as well as the evolution of the organs' weights, the analysis of renal biochemical parameters and the histopathological changes of the kidney and brain were evaluated.

In the present study, no death was marked in all rabbit groups throughout the acclimation or experimental period. At therapeutic doses, IVM is well tolerated with fewer adverse effects (Grayson *et al.*, 2017). During

experimentation, some behavioral changes were reported in rabbits treated with IVM alone: tremor, commotion, decreased animal activity, hair loss and diarrhea. The observed tremors and commotion are probably related to the IVM neurotoxicity. Despite the fact that IVM does not normally traverse the blood-brain barrier invertebrates due to the expression of P-glycoprotein which restrict the passage of many drugs in the CNS, high-dose animal studies have noticed signs and symptoms of central nervous system toxicity, including emesis, mydriasis, and ataxia (Edwards 2003). Severe signs of neurotoxicosis (depression, ataxia, somnolence, mydriasis, salivation, and tremor) are also provoked by the use of IVM therapeutic dose of 0.2 mg/kg in P-glycoprotein lacking dogs (Hopper *et al.*, 2002). From (Trailovic and Nedejkovic 2010), IVM at 2.5, 5, 7 and 10 mg/kg b.w didn't cause visible CNS depression but at 15 mg/kg b.w produced CNS depression similar to general anesthesia in rats. In the opposite of our results, sub-chronic administration of the oral high dose of emamectine benzoate, an avermectin insecticide, was associated only with decreased activity and increasing weakness (Khaldoun-Oulabi *et al.*, 2015).

The results revealed a significant ($p < 0.05$) increase in the absolute and relative weight of both right and left kidneys in the IVM group compared to control group. Our results are in disagreement with those of (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015) who found a non-significant change in the kidney weight in the emamectin-benzoate treated rat. In contrast, the absolute and relative weights of the brain were significantly decreased in the IVM group compared to control group. This can be explained by the possible penetration and accumulation of IVM in the brain when administered at high doses (Menez *et al.*, 2012). The kidneys' and brain weights were not significantly changed

in the IVM + Vit C-treated groups compared to the control group. These results are in line with other studies that proved the protective effects of vitamin C co-administration on body weight in rats (Omshi *et al.*, 2018; Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2017).

Renal dysfunction can be assessed by plasma levels of creatinine, urea and uric acid (Omshi *et al.*, 2018). In our study, the plasma analysis of renal biomarkers at day 14 of experimentation showed a significant increase in creatinine level in IVM group compared to the control. This level continues to be significantly increased at day 21 of the experiment. However, both uric acid and urea concentrations showed a non-significant increase in the IVM group compared to the control group on both days 14 and 21 of the experimental period. Depending on (Arise and Malomo 2009), these high levels of renal plasma parameters may be attributed to the impairment of the glomerular filtration that produces the retention of creatinine and urea. Our results were matched with the findings of several studies that determine the effects of therapeutic and/or double therapeutic doses of IVM on the variation of renal biomarkers (Arise and Malomo 2009 ; El Sawy *et al.*, 2015 ; Elzoghby *et al.*, 2015 ; Al-Jassim *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2020). In the other hand, our results are in disagreement with those of (Omshi *et al.*, 2018) who determined a non-significant change of creatinine level in IVM treated group compared to the control. For the levels of renal biochemical parameters in the IVM + Vitamin C co-treated groups, only the plasma creatinine level was significantly decreased in the IVM + VitC_g group compared to IVM group. These findings are in agreement with those found by a previous study (Omshi *et al.*, 2018). Conversely, (Aljassim *et al.*, 2016) detected a significant increase of creatinine level even in the vitamin C co-treated groups and a significant decrease of urea in IVM + vitamin C

groups compared to IVM group in rabbits. (Magdy *et al.*, 2016) concluded that vitamin C was able to preserve the kidney tissues against the abamectin-induced oxidative stress that resulted in the abnormal levels of renal biomarkers.

In the current study, all these modifications in plasma renal markers were confirmed by the histopathological alterations found in the IVM treated group including vascular congestion, hemorrhages, mononuclear cell infiltration, dilation of Bowmans' spaces, vacuolization in tubular cells and dilated renal tubules. The same results are found in therapeutic and double therapeutic doses of IVM treated groups in rats (El Sawy *et al.*, 2015; Elzoghby *et al.*, 2015) and rabbits (GabAllh *et al.*, 2017). Vitamin C co-administration orally by gavage or supplemented in food showed less histopathological changes compared to IVM group. According to (Omshi *et al.*, 2018), vitamin C was effective in reducing the level of serum oxidative stress parameters when co-administered to IVM. Similarly, vitamin C was found to have protective effects against renal histology damage when taken orally with IVM (Al-Jassim *et al.*, 2016) and abamectin (Magdy *et al.*, 2016) and intraperitoneally with emamectin benzoate in rats ((Khaldoun-Oulabi *et al.*, 2017).

As mentioned in (Menez *et al.*, 2012), IVM is very safe in mammals. In fact, the P-glycoprotein limits their passage in the brain, thereby preserving their binding to GABA_A receptors. In contrast, IVM neurotoxicity has been stated in mammals in cases of P-glycoprotein failure (Geyer *et al.*, 2009) or overdoses (Trailovic and Nedejkovic 2010). As another finding of the present study, the cerebral cortex histological examination showed severe vacuolated neuropil, abnormal structure of granule cells, the irregular shape of pyramidal cells surrounded with pericellular halos and neurons necrosis in the IVM group compared to the control group. In the same manner, the hippocampal sections

demonstrated vacuolated neuropil and intracellular neuropil with the appearance of foam cells in IVM group compared to control. According to the literature research, few studies were performed on the histopathological effects of IVM on the brain tissues of mammals. Compared to our results, severe alterations of the brain tissues were found in rabbits when administered a therapeutic dose of IVM (degenerative changes in neurons) for 8 weeks and a double therapeutic dose (vesiculation of brain structure) for the same period. In the aforementioned study, it was conducted that the brain lesions were related to the dose and frequency of use of IVM. Identical results were observed in the brain tissue of pigeon when exposed to avermectin (Li *et al.*, 2013). Accordingly, this neurotoxicity was induced by oxidative damage of P-glycoprotein. Recently, the effects of abamectin, an AVM insecticide, on brain oxidative stress parameters and histopathological changes were evaluated in rats (Radi *et al.*, 2020). In this study, the cerebral cortex of the abamectin-treated group showed vacuolated neuropil and hemorrhages, the hippocampus of the same group displayed pyknosis and degenerative changes in pyramidal layers. These results are in line with our findings. In the present work, all treated groups with IVM + VitC orally or in food showed an ameliorated architecture of both cerebral cortex and hippocampus with less vacuolated neuropil. According to (Radi *et al.*, 2020), the histopathological alterations of the cerebral cortex and hippocampus were accompanied by a significant increase in MDA concentration and a significant decrease in GSH and CAT activity in brain tissues. All these oxidant/antioxidant markers were significantly corrected in abamectin + vitamin C treated groups; this finding confirms the antioxidant activity of vitamin C against AVMs neurotoxicity. The neuroprotective effect of vitamin C was confirmed in previous studies in

vivo (Shokouhi *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007).

CONCLUSION

The repeated administration of a high dose of IVM for three consecutive weeks in male rabbits may disturb the renal function and alter the histological structure of kidneys and brain tissue. Vitamin C co-treatment could ameliorate the IVM produced nephrotoxic and neurotoxic effects.

Acknowledgement

The authors express their thanks to the General Directorate of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) for the financing of this research.

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

- Ahmed, A. E.; Alshehri, A.; Al-Kahtani, M. A.; Elbehairi, S. E. I.; Alshehri, M. A.; Shati, A. A.; Alfaifi, M. Y.; Al-Doais, A.A.; Taha R., Morsy, K. and El-Mansi, A. A. (2020). Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124 109841.
- Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., Al-Masoudi, E. A., & Majeed, S. K. (2016). Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). *Basrah Journal of Veterinary Research*, 14, 110-24.
- Amin, S. N.; Younan, S. M.; Youssef, M. F.; Rashed, L. A. and Mohamady, I. (2013). A

- histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research* 2.
- Arise, R. O. and Malomo, S. O. (2009). Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5) 190-197.
- Azevedo, R.; Mendes, A. M. and Prudêncio, M. (2019). Inhibition of Plasmodium sporogonic stages by ivermectin and other avermectins. *Parasites & vectors*, 12(1) 549.
- Barrett, J.; Broderick, C.; Soulsby, H.; Wade, P. and Newsholme, W. (2016). Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe Strongyloides stercoralis infection: two case reports and a discussion of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1) 220-225.
- Bloomquist, J. R. (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(4) 145-156.
- Bockarie, M. J.; Alexander, N. D. E.; Kazura, J. W.; Bockarie, F.; Griffin, L. and Alpers, M. P. (2000). Treatment with ivermectin reduces the high prevalence of scabies in a village in Papua New Guinea. *Acta Tropica*, 75(1) 127-130.
- Crump, A. and Omura, S. (2011). Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 87(2) 13-28.
- De Ménonville, S. T.; Rosignoli, C.; Soares, E.; Roquet, M.; Bertino, B.; Chappuis, J. P.; Chaussade, C. D. P. and Piwnica, D. (2017). Topical treatment of rosacea with ivermectin inhibits gene expression of cathelicidin innate immune mediators, LL-37 and KLK5, in reconstructed and ex vivo skin models. *Dermatology and Therapy*, 7(2) 213-225.
- Derelanko, M. J. and Auletta, C. S. (2014). Handbook of Toxicology. CRC Press, New York, USA.
- Diao, H.; Cheng, N.; Zhao, Y.; Xu, H.; Dong, H.; Thamm, D. H.; Zhang, D. and Lin, D. (2019). Ivermectin inhibits canine mammary tumor growth by regulating cell cycle progression and WNT signaling. *BMC veterinary research*, 15(1) 1-10.
- Dos Santos, A. R.; Falcão, C. A. B.; Muzitano, M. F.; Kaiser, C. R.; Rossi-Bergmann, B. and Férézou, J. P. (2009). Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 17(2) 496-502.
- Edwards, G. (2003). Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, 2(S1) S8.
- El-Sawy, A. E. S. F.; El-Maddawy, Z. K. and Seed, S. A. (2015). Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, (47) 119-128.
- ElZoghby, R.R.; Amin, A.; Hamouda, A.F. and Ali, A.F. (2015). Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. *The Journal of American Science*, 11(3) 73-83.
- Fetoui, H.; Makni, M.; Garoui, E. M. and Zeghal, N. (2010). Toxic

- effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6) 593-599.
- GabAllh, M. S.; El-mashad, A. B. E.; Amin, A. A.; Darweish, M. M. (2017). Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal*, 32(1) 104-112.
- Geary, T. G. (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in parasitology*, 21(11) 530-532.
- Geyer, J.; Gavrilova, O. and Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdrla, b P-glycoprotein-and bcrp-deficient knockout mice. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1) 87-96.
- Gonçalves, K.; Vasconcelos, A.; Barbirato, D.; Vasconcelos, C. and Vasconcelos, B. (2020). Therapeutic potential of ivermectin for COVID-19. Authorea Preprints.
- Grayson, M. L.; Cosgrove, S. E.; Crowe, S.; Hope, W.; McCarthy, J. S.; Mills, J.; Mouton, J. W. and Paterson, D. L. (Eds.). (2017). *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs*, -Three Volume Set. CRC Press, New York, USA.
- Han, J. M.; Chang, B. J.; Li, T. Z.; Choe, N. H.; Quan, F. S.; Jang, B. J.; Cho, I. H.; Hong, H. N. and Lee, J. H. (2007). Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain research*, 1185 68-74.
- Hopper, K.; Aldrich, J. and Haskins, S. C. (2002). Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1) 89-94.
- Jurczuk, M.; Brzóska, M. M. and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2007). Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 45(8) 1478-1486.
- Khaldoun Oularbi, H.; Richeval, C.; Lebaili, N.; Zerrouki-Daoudi, N.; Baha, M.; Djennas, N. and Allorge, D. (2017). Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human & experimental toxicology*, 36(7) 709-717.
- 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.
- Kiki-Mvouaka, S.; Menez, C.; Borin, C.; Lyazrhi, F.; Foucaud-Vignault, M.; Dupuy, J.; Collet, X.; Alvinerie, M. and Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug metabolism and disposition*, 38(4) 573-580.
- Kudzi, W.; Dodoo, A. N. and Mills, J. J. (2010). Genetic

- polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC medical genetics*, 11(1) 1-8.
- Li, M.; You, T. Z.; Zhu, W. J.; Qu, J. P.; Liu, C.; Zhao, B.; Xu, S. W. and Li, S. (2013), Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicology*, 22(8) 1241-1254.
- Lu, M.; Xiong, D.; Sun, W.; Yu, T.; Hu, Z.; Ding, J. and B. (2017), Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug delivery*, 24(1) 622-631.
- Magdy, B. W.; Mohamed, F. E.; 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.
- McKellar, Q. A. and Benchaoui, H. A. (1996) Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5) 331-351.
- Mekuriaw, W.; Balkew, M.; Messenger, L. A.; Yewhalaw, D.; Woyessa, A. and Massebo, F. (2019). The effect of ivermectin® on fertility, fecundity and mortality of *Anopheles arabiensis* fed on treated men in Ethiopia. *Malaria journal*, 18(1) 1-10.
- Menez, C.; Sutra, J. F.; Prichard, R. and Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in Mdr1ab (–/–) mice and effects on mammalian GABA (A) channel activity. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(11) e1883.
- Moreira, N.; Sandini, T. M.; Reis-Silva, T. M.; Navas-Suárez, P.; Auada, A. V. V.; Lebrun, I.; Flório, J. C.; Bernardi, M. M. and Spinosa, H. S. (2017). Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reproductive Toxicology*, 74 195-203.
- Omshi, F. S. H.; Abbasalipourkabir, R.; Abbasalipourkabir, M.; Nabyan, S.; Bashiri, A. and Ghafourikhosroshahi, A. (2018). Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29) 29408-29417.
- Papich, M. G. (2015). Saunders handbook of veterinary drugs-e-book: small and large animal. Elsevier Health Sciences, North Carolina, USA.
- Radi, A. M.; Mohammed, E. T.; Abushouk, A. I.; Aleya, L. and 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.
- Shokouhi, G.; Hadidchi, S.; Ghorbanihaghjo, A.; Rahbani-Noubar, M.; Panahi, S.; Forouzanfar, M.; Rashtchizadeh, N. and Mesgari, M. (2005). Neuroprotective effect of ascorbic acid in experimental blunt sciatic nerve injury in

- rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1(2) 1-5.
- Shoop, W. L.; Mrozik, H.; and Fisher, M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology*, 59(2) 139-156.
- Spampanato, J.; Gibson, A. and Dudek, F. E. (2018). The antihelminthic moxidectin enhances tonic GABA currents in rodent hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 119(5) 1693-1698.
- Trailović, S. M. and Nedeljković, J. T. (2010). Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1012080409-1012080409.
- Yang, C. C. (2012). Acute human toxicity of macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6) 999-1003.
- Yardley, M. M.; Wyatt, L.; Khoja, S.; Asatryan, L.; Ramaker, M. J.; Finn, D. A.; Alkana, R. L.; Huynh, N.; Louie, S. G.; Petasis, N. A.; Bortolato, M. and Davies, D. L. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology*, 63(2) 190-201.
- Zhu, M.; Li, Y. and Zhou, Z. (2017). Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(3) 373-378.

DISCUSSION
GENERALE

2. DISCUSSION GENERALE

Les AVMs représentent une classe des antiparasitaires les plus largement commercialisés dans le monde. Les AVMs sont des puissants endectocides utilisés pour le traitement des parasites internes et externes chez les animaux, ce sont des composés lipophiles connus par un large spectre d'activité et une efficacité durable remarquée (GabAllh *et al.*, 2017).

L'IVM est l'un des médicaments de la famille des AVMs les plus utilisés pour le contrôle des maladies parasitaires et a fait l'objet du prix Nobel 2015 de physiologie et/ou médecine, après 35 ans de sa remarquable découverte (Laing *et al.*, 2017). En Algérie, de nombreuses préparations génériques de l'IVM sont utilisées pour le traitement et la prévention des principales parasitoses chez les animaux, causées à la fois par des endo et des ectoparasites (Bentounsi *et al.*, 2009).

L'utilisation des médicaments endectocides pour le traitement des maladies parasitaires chez les lapins a augmenté récemment. Lu *et al.* (2017) ont révélé que le traitement de lapines naturellement infectées par *Psoroptes cuniculi* avec une injection sous-cutanée de l'IVM (Ivomec® à 0,2 mg / kg) a montré une efficacité rapide et élevée contre ces acariens. Gokbulut *et al.* (2010) ont indiqué que l'administration sous-cutanée de deux doses d'IVM (0,3 mg / kg) avec un intervalle de 15 à 20 jours entre les deux pourrait être nécessaire pour le traitement des ectoparasites chez les lapins.

L'utilisation intensive de l'IVM dans le traitement de nombreuses affections chez l'homme et les animaux est associée à des problèmes de résistance et d'efficacité (Kaplan et Vidyashankar, 2012), ce qui explique la nécessité d'étudier les effets liés à une telle utilisation chez les mammifères (Omshi *et al.*, 2018). La dose et la posologie de l'IVM pour les animaux et les hommes changent en fonction du cas clinique et du type de parasites (Ahmed *et al.*, 2020). L'IVM est considérée comme un médicament très sûr lorsque ses doses thérapeutiques sont respectées. Omshi *et al.* (2018) ont révélé que le traitement par l'IVM à une dose de 0,4 mg / kg de poids corporel par voie orale une fois par semaine pendant trois semaines consécutives a entraîné une dégradation oxydative non significative dans le groupe traité par l'IVM par rapport aux autres groupes.

Cependant, plusieurs effets toxiques de ce produit ont été rapportés chez les populations sensibles ou sont liés à des surdosages involontaires (Trailović et Nedeljković, 2010).

Les effets toxiques des AVMs sont principalement attribués au stress oxydatif (Zhu *et al.*, 2017), ce qui explique la nécessité d'utiliser des produits antioxydants pour atténuer leurs effets néfastes chez les mammifères. Récemment, l'évaluation des effets protecteurs des antioxydants naturels contre la toxicité de divers xénobiotiques constitue un domaine de recherche très intéressant. Comme il a été prouvé par l'étude d'Abdeldaim et Abdellatif (2018), l'ester phénéthylrique d'acide caféique et la bétaine ont un effet protecteur contre la toxicité induite par l'abamectine. En outre, certains antioxydants peuvent être administrés avec l'IVM pour améliorer ses effets secondaires tels que la vitamine A (Omshi *et al.*, 2018), le sélénium et la vitamine E (Behera *et al.*, 2011 ; Ahmed *et al.*, 2020) et certains phénols et flavonoïdes (Singh *et al.*, 2012).

La vitamine C ou l'acide ascorbique (AA) est un antioxydant hydrosoluble qui élimine efficacement les radicaux libres, protégeant les membranes cellulaires des dommages oxydatifs (Jurczuk *et al.*, 2007 ; Halliwell et Gutteridge, 2015).

Le présent travail a évalué l'effet amélioratif et protecteur de la vitamine C administrée par gavage ou supplémentée dans l'aliment sur les effets toxiques associés à l'administration répétée d'une dose élevée d'un médicament vétérinaire antiparasitaire, l'AVIMEC® (2 mg / kg p.c.) administré à une dose jusqu'à 10 fois plus élevée que la dose thérapeutique (0,2 mg / kg p.c.) par voie sous-cutanée pendant 21 jours chez le lapin mâle (*Oryctolagus cuniculus*). Selon Barrett *et al.* (2016), l'IVM par voie parentérale est mieux tolérée par rapport à la voie orale qui est associée à des effets secondaires gastro-intestinaux embarrassants.

Pour atteindre cet objectif, le comportement des animaux, la variation du poids corporel et la prise d'aliment et l'eau de boisson, la variation du poids absolu et relatif des organes (foie, rein, poumon et cerveau), ainsi que l'analyse des paramètres biochimiques (hépatiques, rénaux et bilan lipidique) et les modifications histopathologiques du foie, rein, poumon et du cerveau ont été évalués par la réalisation d'une seule expérimentation.

Dans la présente étude, aucun décès n'a été marqué dans tous les groupes de lapins pendant l'acclimatation ou la période expérimentale. Selon la littérature, l'IVM administrée à des doses thérapeutiques est bien tolérée avec moins d'effets indésirables (Grayson *et al.*, 2017). Pendant la période expérimentale, certains changements de comportement ont été rapportés chez des lapins traités par l'IVM seule : tremblements, agitation, baisse de l'activité animale, perte de poils et diarrhée. Les signes neurologiques (tremblements et agitation) observés sont probablement liés à

la neurotoxicité de l'IVM. Chez les animaux vertébrés, tous les LMs possèdent le même mécanisme de toxicité par fixation sur les canaux chlorure- GABA dépendants, qui sont spécifiques au SNC. D'une manière générale, les LMs ont une marge de sécurité élevée chez les mammifères à cause de la présence de la P glycoprotéine (P-gp), un transporteur d'efflux des xénobiotiques fortement exprimée à la barrière hémato-encéphalique et codée par le gène de multirésistance aux médicaments (MDR1), qui limite efficacement leur pénétration dans le SNC (Geyer *et al.*, 2009). Tandis que l'IVM ne traverse normalement pas la barrière hémato-encéphalique chez les vertébrés en raison de l'expression de la P-gp, son administration à des fortes doses chez les mammifères est associée avec des signes et des symptômes de toxicité pour le SNC, y compris vomissements, mydriase et ataxie (Edwards, 2003). Cependant, des signes sévères de neurotoxicose (dépression, ataxie, somnolence, mydriase, salivation et tremblements) sont également provoqués par l'utilisation d'une dose thérapeutique de l'IVM (0,2 mg/kg p.c.) chez les chiens dépourvus de la P-gp (Hopper *et al.*, 2002). D'après l'étude réalisée par Trailovic et Nedekovic (2010), l'IVM administrée à des doses de 2,5, 5, 7 et 10 mg/kg p.c. n'a pas provoqué une dépression apparente du SNC, mais à 15 mg/kg p.c., elle a produit une dépression du SNC similaire à l'anesthésie générale chez le rat. À l'opposé de nos résultats, l'administration sub-chronique d'une dose élevée par voie orale de benzoate d'émamectine, un insecticide à base d'ivermectine, n'a été associée qu'à une baisse de l'activité et à une faiblesse dose dépendante (Khaloudoun-Oularbi *et al.*, 2015). La diarrhée observée lors de notre expérimentation est peut-être expliquée par le fait que les risques de troubles digestifs (diarrhées) sont élevés chez le jeune lapin, surtout dans les 2 à 4 semaines qui suivent le sevrage, et c'est une source majeure de morbidité et de mortalité. Ces risques sont réduits en respectant un apport minimum de fibres dans l'aliment (Giedenne *et al.*, 2015). Dans le même sens, l'administration sous-cutanée de l'IVM (2mg/kg p.c.) chez les chèvres, a pu provoquer des signes cliniques comme l'ataxie (apparition 12h après l'injection durant 4 jours), tremblements et dépression (apparition 20h après l'injection durant 2 jours) et la diarrhée (apparition 6h après l'injection durant 3 jours) (Abdou et Sharkawy, 2004).

La variation du poids corporel est un signe de l'aggravation de l'état de santé générale de l'animal. Nos résultats montrent une diminution significative du poids corporel et le % PP chez les lapins traités par l'IVM par rapport au groupe témoin. nos résultats sont en ligne avec ceux trouvés durant les études de la toxicité d'autres AVMs (abamectine et benzoate d'émamectine) chez les rats (Khaloudoun-Oularbi *et al.*, 2013 ; Khaloudoun-Oularbi *et al.*, 2015 et Khaloudoun-Oularbi *et*

al., 2017). Par contre, nos résultats ne concordent pas à ceux trouvés par *Omshi et al.* (2018), qui n'ont trouvé aucune différence significative du poids corporel entre le groupe témoin et celui traité par une dose thérapeutique de l'IVM par voie orale chez les lapins mâles.

Une baisse du pourcentage de l'aliment (% PA) et le pourcentage de prise de l'eau de boisson (% PB) ont été également notées chez le groupe traité par l'IVM. Ce résultat peut expliquer clairement la baisse du poids corporel dans ce même groupe. Cette baisse de la prise d'aliment est peut-être expliquée par le mécanisme d'action des AVMs qui sont capables d'inhiber la motilité du muscle pharyngien bloquant ainsi le transit de l'aliment chez les nématodes (*Trichostrongylus colubriformis*) (Sheriff *et al.*, 2002). Une telle diminution de la consommation de l'aliment peut entraîner chez les lapins un déséquilibre énergétique qui est caractérisé par une baisse des apports alimentaires par rapport aux besoins énergétiques. L'un des mécanismes de compensation de ce déséquilibre est l'utilisation des réserves du tissu adipeux comme une source d'énergie ce qui peut entraîner une diminution de la masse grasse corporelle qui peut justifier la diminution du poids corporel chez les lapins traités par l'IVM.

Nous avons noté chez les groupes traités par l'IVM + vitamine C, une augmentation significative du poids corporel final, % PP, % PA et % PB relativement au groupe traité par l'IVM seule. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par *Khaldoun-Oularbi, et al.* (2017) et *Omshi et al.* (2018) qui ont montré chez les animaux traités par le benzoate d'émamectine + vitamine C (200 mg/kg) et l'IVM + vitamine C (1.25 mg/kg), respectivement, aucune différence significative du poids corporel, la prise d'aliment et de boisson par rapport au groupe témoin. Ce qui prouve l'effet protecteur de la vitamine C lorsqu'elle est associée à l'IVM.

Les résultats de la variation des poids des organes étudiés ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids absolu et relatif du poumon dans les deux groupes co-traités par l'IVM + vitamine C par rapport au groupe témoin. Ces résultats peuvent être expliqués par la génération du stress oxydatif dû à l'administration répétée d'IVM et à son accumulation dans les tissus pulmonaires (*Aljassim et al.*, 2016). Pour le foie, aucun changement n'a été observé dans ses poids absolu et relatif dans tous les groupes traités. Ces résultats ne sont pas en accord avec les études précédentes montrant une augmentation significative du poids du foie après l'administration des AVMs (*Elzoghby et al.*, 2015 ; *Khaldoun-Oularbi, et al.* 2013 ; *Khaldoun-Oularbi, et al.* 2017). Nos résultats ont révélé aussi une augmentation significative du poids absolu et relatif des

reins droits et gauches dans le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin. Cette élévation est peut-être due à l'augmentation des demandes accrues de détoxification des composés toxiques (Hayes et Laws, 1990). Notre résultat est en désaccord avec ceux de Khaldoun-Oularbi *et al.* (2015) qui ont trouvé un changement non significatif du poids des reins chez le rat traité à l'émamectine-benzoate. En revanche, les poids absolus et relatifs du cerveau étaient significativement diminués dans le groupe IVM par rapport au groupe témoin. Cela peut s'expliquer par la destruction du tissu cérébral lié à la pénétration de l'IVM dans le cerveau après son administration à forte dose (Elzoghby *et al.*, 2015). Les poids des reins et du cerveau n'ont pas été modifiés de manière significative dans les groupes traités par l'IVM + Vitamine C par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en ligne avec d'autres études qui ont prouvé les effets protecteurs de la co-administration de vitamine C sur le poids corporel chez le rat (Omshi *et al.*, 2018 ; Khaldoun-Oularbi *et al.* 2017).

L'IVM administrée par voie orale ou par d'autres voies est bien diffusée dans tous les compartiments tissulaires via la circulation sanguine, la plus grande quantité se trouve dans le foie, tandis que la plus petite se trouve dans le tissu cérébral en raison de la restriction de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique. L'IVM est presque totalement métabolisée dans le foie par le cytochrome P450 ; il est principalement éliminé dans les fèces alors que seulement (<5%) est excrété dans les urines (El-Saber Batiha *et al.*, 2020). Cette répartition inégale de l'IVM dans différents organes peut expliquer la toxicité diversifiée de l'IVM entre les invertébrés et leurs hôtes vertébrés (Kudzi *et al.*, 2010).

En plus des signes cliniques de neurotoxicité de l'IVM, de nombreuses études ont détecté l'effet des doses thérapeutiques et thérapeutiques doubles de l'IVM sur la fonction rénale chez le rat (Arise et Malomo, 2009 ; El Sawy *et al.*, 2015 ; Elzoghby *et al.*, 2015 ; Omshi *et al.*, 2018, Al-Jassim *et al.*, 2016) et les tissus cérébraux chez le lapin (GabAllh *et al.*, 2017) et les pigeons (Li *et al.*, 2013).

Néanmoins, à des concentrations plus élevées, l'IVM a un large éventail d'effets dans de nombreux organismes (Laing *et al.*, 2017 ; Merola et Paul, 2018) et l'administration répétée de différentes doses d'IVM a induit des altérations histopathologiques dans le foie (Al-Jassim *et al.*, 2015) et les poumons (Al-Jassim *et al.*, 2016) chez le lapin et le testicule (Elzoghby *et al.*, 2015) chez le rat.

Nos résultats montrent que l'administration répétée d'une forte dose de l'AVIMEC® cause des troubles des paramètres biochimiques de la fonction hépatique, rénale et bilan lipidique et des altérations tissulaires du foie, rein, poumon et cerveau chez le lapin mâle. Ces résultats sont récapitulés ci-après.

Le foie et les reins jouent un rôle fondamental dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, ce qui implique leur prédisposition aux différents dommages cellulaires et tissulaires, lors d'une exposition excessive, favorisant ainsi une défaillance de ces organes par une fuite des enzymes, une peroxydation lipidique et un stress oxydatif (Arise et Malomo, 2009 ; El-Far, 2013). D'après la littérature, les études de la toxicité biochimique et histologique des xénobiotiques pour la fonction hépatique et rénale sont les plus fréquemment accomplies (Zhu et al., 2013 ; Eissa et Zidan, 2010).

La présente étude a révélé une augmentation significative du taux de glucose chez le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin, après 21 jours d'expérimentation. Cette hyperglycémie est éventuellement due à une perturbation du métabolisme glucidique sous l'effet d'une administration d'une forte dose de l'IVM. Selon Bergmeyer, (1980), en cas des lésions hépatiques, le métabolisme des protéines est obligatoirement modifié vers la néoglucogenèse. L'exploration de la fonction hépatique a montré aussi une élévation significative des transaminases hépatiques (l'ALAT et l'ASAT) et γ -GT aux 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période expérimentale chez les lapins traités par IVM seule, ce qui était en corrélation avec les résultats histopathologiques du foie. Les transaminases sont des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique et leurs taux plasmatiques élevés indiquent une altération du tissu hépatique. L'augmentation des concentrations plasmatiques d'ASAT témoigne une lésion cellulaire au niveau des différents tissus à savoir le tissu hépatique, rénal, cardiaque ou musculaire. par contre, l'ALAT est une enzyme spécifique au tissu hépatique (Khaldoun-Oularbi, 2015). Un taux élevé de la γ -GT est enregistré dans les maladies hépatobiliaires (Khaldoun-Oularbi et al., 2013). De nombreuses études ont déclaré que l'exposition aux AVMs a un potentiel significatif pour induire des lésions dans le foie du rat en augmentant les transaminases plasmatiques et / ou la glycémie (Khaldoun-Oularbi et al., 2013 ; Khaldoun-Oularbi et al., 2017 ; El-Far, 2013 ; Hsu et al., 2001).

En revanche, ces paramètres ont été réduits lorsque les lapins ont été co-traités par l'IVM et la vitamine C par rapport aux lapins administrés par l'IVM seule. Le traitement IVM + vitamine

C par gavage a permis de mieux diminuer le taux de glycémie par rapport à l'IVM + vitamine C supplémenté en aliment. Les effets de l'IVM et de sa combinaison avec la vitamine C sur les biomarqueurs hépatiques chez le lapin indiquent que la vitamine C offre une meilleure protection contre les lésions hépatiques induites par l'IVM par son activité antioxydante. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par [Khaldoun Oularbi et al. \(2017\)](#) et [Magdy et al. \(2016\)](#) qui ont confirmé l'effet d'amélioration de la vitamine C sur les taux plasmatiques de glucose, d'ASAT, d'ALAT et la γ -GT lorsqu'elle était co-administrée au benzoate d'émamectine pendant 28 jours et à l'abamectine pendant 45 jours.

Le dysfonctionnement rénal peut être évalué par les taux plasmatiques de créatinine, d'urée et d'acide urique ([Omshi et al., 2018](#)). Dans notre étude, l'analyse plasmatique des biomarqueurs rénaux au 14^{ème} jour de l'expérimentation a montré une augmentation significative du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au témoin. Ce niveau continue d'être considérablement augmenté au 21^{ème} jour de l'expérience. Cependant, les concentrations d'acide urique et d'urée ont montré une augmentation non significative dans le groupe injecté par l'IVM par rapport au groupe témoin aux 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période expérimentale. Selon [Arise et Malomo \(2009\)](#), ces taux élevés de paramètres plasmatiques rénaux peuvent être attribués à l'altération de la filtration glomérulaire qui produit la rétention de la créatinine et de l'urée. La décomposition des protéines hépatiques peut expliquer l'augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique chez les rats traités par les AVMs, où les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine ([Khaldoun et al., 2015](#)). Nos résultats ont été en accord avec les conclusions de plusieurs études qui déterminent les effets des doses thérapeutiques et / ou thérapeutiques doubles d'IVM sur la variation des biomarqueurs rénaux ([Arise et Malomo, 2009](#) ; [El Sawy et al., 2015](#) ; [Elzoghby et al., 2015](#) ; [Al-Jassim et al., 2016](#); [Ahmed et al., 2020](#)). En revanche, nos résultats sont en désaccord avec ceux d'[Omshi et al. \(2018\)](#) qui ont déterminé un changement non significatif du taux de créatinine dans le groupe traité par l'IVM par rapport au groupe témoin. Pour les niveaux de paramètres biochimiques rénaux dans les groupes co-traités par l'IVM + Vitamine C, seulement le taux de créatinine plasmatique a été significativement diminué dans le groupe IVM + Vitamine C par gavage par rapport au groupe administré par l'IVM. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédemment citée ([Omshi et al., 2018](#)). À l'inverse, [Aljassim et al. \(2016\)](#) ont détecté une augmentation significative du taux de créatinine même dans les groupes co-traités par la vitamine C et une diminution significative de l'urée dans

les groupes traités par l'IVM + vitamine C par rapport au groupe injecté par l'IVM chez les lapins. [Magdy et al. \(2016\)](#) ont conclu que la vitamine C en comparaison avec la vitamine E était capable de préserver les tissus rénaux contre le stress oxydatif induit par l'abamectine qui entraînait des niveaux anormaux de biomarqueurs rénaux.

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la cause d'un tiers des décès dans le monde et cette situation progressera en raison de l'augmentation des facteurs de risque de MCV ([Deaton et al., 2011](#)). Le bilan lipidique est le principal facteur de risque prédictif des MCV ([Kanthé et al., 2012](#)). Des preuves scientifiques solides indiquent qu'il existe une forte liaison entre l'incidence des MCV et un taux élevé de LDL-C et également un faible taux de HDL-C ([Igweh et al., 2005](#)). Par conséquent, les rapports LDL-C / HDL-C et CT/ HDL-C sont souvent calculés pour estimer le risque cardiovasculaire ([Millàn et al., 2009](#)). D'un autre côté, un niveau élevé de TG a été associé à une augmentation de LDL-C et à un risque cardiovasculaire accru ([Nwagha et al., 2010](#)). Sur ce fondement, la dyslipidémie athérogène, définie comme un rapport de LDL-C / HDL-C élevé et une hypertriglycémie, est associée à un risque cardiovasculaire élevé.

Un autre marqueur puissant pour prédire le risque d'athérosclérose et de maladie coronarienne, est représenté par l'indice athérogène du plasma (IAP) ([Króliczewska et al., 2018](#)). L'IAP reflète la véritable relation entre les lipoprotéines protectrices et athérogènes et est lié à la taille des particules de lipoprotéines pré- et antiathérogènes ([Dobiášová et al., 2011](#)). Il a été suggéré qu'une valeur d'IAP qui varie entre -0,3 et 0,11 est associée à un faible risque de MCV ; les valeurs comprises entre 0,11 et 0,24 et supérieures à 0,24 sont associées respectivement à des risques intermédiaires et élevés ([Dobiasova et al., 2006](#)).

[Miyajima et al. \(2015\)](#) ont démontré une corrélation significative entre l'augmentation des concentrations de cholestérol total (CT) et celles de l'IVM dans le plasma de lapin. Ces auteurs ont proposé que le profil pharmacocinétique de l'IVM soit influencé non seulement par la promotion de la dissolution de l'IVM dans le tractus gastro-intestinal, mais également par le changement de la concentration plasmatique de cholestérol. À l'inverse, notre étude a démontré que l'administration IVM provoque une diminution des taux plasmatiques de tous les paramètres lipidiques à l'exception du taux de HDL-C qui est augmenté au 14ème jour de l'expérimentation. Cependant, la co-administration de la vitamine C aux lapins traités par IVM a entraîné une amélioration partielle des

taux de CT, HDL-C et VLDL-C, ainsi que des taux de TG. De plus, les taux de LDL-C et de TG ont été encore significativement inférieurs à ceux des lapins témoins au 21^{ème} jour.

Nos résultats sont en ligne avec ceux de [Jin *et al.* \(2013\)](#) qui ont démontré que l'ivermectine diminuait le cholestérol sérique, y compris les taux LDL et HDL chez la souris. Ils ont établi que le médicament antiparasitaire, IVM, est considéré comme un ligand du récepteur farnésoïde X (FXR) qui maintient l'homéostasie des acides biliaires et du cholestérol et peut améliorer efficacement l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie chez les souris diabétiques en régulant l'expression de leurs gènes. Selon [Al-Jassim *et al.* \(2015\)](#), le niveau de CT n'a pas changé significativement dans les groupes de lapins traités par IVM et IVM + vitamine C par rapport au groupe témoin alors que cette étude a montré une diminution significative du taux plasmatique de TG dans deux groupes exposés à IVM + vitamine C par voie orale (0,5 mg / kg + 50 mg / kg et 2 mg / kg + 50 mg / kg; respectivement).

La découverte la plus importante de notre étude est que l'indice athérogène du plasma (IAP) et les deux facteurs athérogènes (cholestérol total / HDL-C et LDL-C / HDL-C) se sont avérés diminués dans le groupe traité par l'AVIMEC[®] par rapport à celui du groupe témoin. Ce qui explique l'effet antiathérogène de l'IVM. Par contre, la co-administration de la vitamine C dans l'aliment ou par gavage a causé une élévation des valeurs de l'IAP et les facteurs athérogènes chez les lapins mais qui sont semblables à celles du groupe témoin.

Les résultats mentionnés ci-dessus ont révélé que l'administration d'une dose élevée de l'IVM 3 fois / semaine pendant trois semaines consécutives chez de jeunes lapins présentait des altérations histologiques dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau des lapins mâles. Les lésions histologiques hépatiques consistent essentiellement en une perte de l'architecture normale des hépatocytes, une dilatation sinusoïdale, une dilatation de la veine centrolobulaire, une nécrose des hépatocytes, une congestion vasculaire et une infiltration des cellules inflammatoires. Ces résultats expliquent le taux élevé significatif des paramètres biochimiques hépatiques et sont conformes à de nombreux travaux qui ont démontré que l'administration répétée de doses thérapeutiques ou thérapeutiques doubles de l'IVM induisait de graves modifications dégénératives et une nécrose dans le parenchyme hépatique ([Elzoghby *et al.*, 2015](#) ; [Omshi *et al.*, 2018](#) ; [Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2013](#)).

Les tests histologiques du poumon dans le groupe traité par l'IVM ont révélé une bronche intrapulmonaire irrégulière avec une prolifération altérée de l'épithélium muqueux, des bronchioles dilatées avec un épithélium épais, des alvéoles dilatées avec un épaississement de leurs septa, une hémorragie pulmonaire et une congestion des artères pulmonaires. Ces lésions tissulaires constituent des signes de toxicité pulmonaire de l'IVM. Ces résultats sont en ligne avec ceux obtenus par [AL-Jassim et al. \(2016\)](#) et [Abd-Elhady et Abou-Elghar \(2013\)](#) qui ont observé une pneumonie interstitielle avec congestion et œdème dans la coupe histologique pulmonaire de rat exposé à l'abamectine pendant 30 jours, tandis que des hémorragies locales associées à une atelectasie ont été observées dans les poumons des animaux exposés à abamectine pendant 210 jours.

La vitamine C prévient les dommages histologiques ultérieurs induits dans les tissus hépatiques et pulmonaires. D'après nos résultats, nous pouvons supposer que les dommages histologiques hépatiques et pulmonaires de l'ivermectine sont principalement attribués à une augmentation du stress oxydatif puisque les effets ont été largement évités par une supplémentation en acide ascorbique, en particulier lorsque celui-ci a été administré ultérieurement par gavage. Auparavant, de nombreuses études ont également montré l'efficacité curative et antioxydante de la vitamine C ([Al-Jassim et al., 2016](#) ; [Omshi et al., 2018](#) ; [Khaldoun-Oularbi et al., 2017](#)) et d'autres vitamines comme la vitamine E et sélénium ([Behera et al., 2011](#)) contre la toxicité des AVMs.

Dans la présente étude, toutes les modifications des marqueurs rénaux plasmatiques ont été confirmées par les altérations histopathologiques trouvées dans le groupe traité par IVM, y compris la congestion vasculaire, les hémorragies, l'infiltration du parenchyme rénal par des cellules inflammatoires, la dilatation des chambres glomérulaires, la vacuolisation dans les cellules tubulaires et les tubules rénaux dilatés. Les mêmes résultats sont trouvés après une administration des doses thérapeutiques et thérapeutiques doubles de l'IVM chez le rat ([El Sawy et al., 2015](#) ; [Elzoghby et al., 2015](#)) et le lapin ([GabAllh et al., 2017](#)). La co-administration de vitamine C par voie orale par gavage ou en supplément alimentaire a montré moins de lésions histopathologiques par rapport au groupe qui a reçu l'IVM. Selon [Omshi et al. \(2018\)](#), la vitamine C a été efficace pour réduire le taux des paramètres de stress oxydatif sérique lorsqu'elle a été co-administrée à l'IVM. De même, la vitamine C s'est avérée avoir des effets protecteurs contre les dommages histologiques rénaux lorsqu'elle est prise par voie orale avec l'IVM ([Al-Jassim et al.,](#)

2016) et l'abamectine (Magdy *et al.*, 2016) et par voie intrapéritonéale avec le benzoate d'émamectine chez le rat (Khalidoun-Oularbi *et al.*, 2017).

Comme mentionné par Menez *et al.* (2012), l'IVM est très sécuritaire chez les mammifères. En effet, la P-gp limite leur passage dans le cerveau, préservant ainsi leur liaison aux récepteurs GABA_A. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la neurotoxicité de l'IVM ne sont pas complètement compris et peuvent être dus à de nombreuses théories. Selon Guzzo *et al.* (2002), l'IVM administrée à des doses élevées jusqu'à 10 fois plus la dose approuvée par la FDA (Food and Drug Administration), 200 µg / kg, est généralement bien tolérée, sans indication de toxicité associée au SNC. En revanche, la neurotoxicité de l'IVM a été rapportée chez les mammifères en cas de dysfonctionnement de la P-gp (Geyer *et al.*, 2009) ou en cas de surdosage (Trailovic et Nedeljkovic, 2010).

Comme un autre résultat de la présente étude, l'examen histologique du cortex cérébral a montré une vacuolisation sévère du neuropile, une structure anormale des cellules granulaires, une forme irrégulière des cellules pyramidales entourées des halos péricellulaires et une nécrose des neurones chez le groupe traité uniquement par l'IVM par rapport au groupe témoin. De la même manière, les coupes histologiques de l'hippocampe ont démontré un neuropile vacuolé et une vacuolisation intracellulaire avec apparition de cellules en mousse. Selon la littérature, peu d'études ont été menées sur les effets fonctionnels et histopathologiques de l'IVM sur les tissus cérébraux des mammifères, spécifiquement l'hippocampe qui n'est totalement développé que chez les mammifères et situé sous le cortex cérébral et forme une zone cérébrale clé pour de nombreuses formes d'apprentissage et de mémoire (Amin *et al.*, 2013). La vacuolisation dans le neuropile des tissus cérébraux pourrait être attribuée au rétrécissement des cellules nerveuses suite à une affection cytosquelettique laissant des espaces péri-cellulaires (halos). ces espaces indiquent une mort neuronale et sont compatibles avec la nécrose neuronale observée aux stades précoces des états ischémiques (Auer et Sutherland, 2002). Par rapport à nos résultats, des altérations sévères des tissus cérébraux ont été retrouvées chez le lapin lors de l'administration d'une dose thérapeutique d'IVM (modifications dégénératives des neurones) pendant 8 semaines et d'une double dose thérapeutique (vésiculation de la structure cérébrale) pendant la même période (GabAllh *et al.*, 2017). Dans l'étude susmentionnée, il a été réalisé que les lésions cérébrales étaient liées à la dose et à la fréquence d'utilisation de l'IVM. Des résultats identiques ont été observés dans le tissu cérébral du pigeon exposé à l'ivermectine (Li *et al.*, 2013). En conséquence, cette neurotoxicité a

été induite par des dommages oxydatifs de la P-glycoprotéine. Les tissus cérébraux sont très sensibles aux dommages oxydatifs en raison de leur forte utilisation d'oxygène et de leur mécanisme de défense antioxydant peu développé (Afifi et Embaby, 2016). Récemment, les effets de l'abamectine, un insecticide de la famille des AVMs, sur les paramètres du stress oxydatif des tissus cérébraux et les changements histopathologiques ont été évalués chez le rat (Radi et al., 2020). Dans cette étude, le cortex cérébral du groupe traité par l'abamectine a montré un neuropile vacuolé et des hémorragies, l'hippocampe du même groupe présentait une pycnose et des changements dégénératifs dans les couches pyramidales. Ces résultats sont conformes à nos résultats. Dans le présent travail, tous les groupes traités par IVM + Vitamine C par voie orale ou alimentaire ont montré une architecture améliorée du cortex cérébral et de l'hippocampe avec un neuropile moins vacuolé. Selon Radi et al. (2020), les altérations histopathologiques du cortex cérébral et de l'hippocampe ont été accompagnées d'une augmentation significative de la concentration de MDA (Malondialdéhyde) et d'une diminution significative de l'activité GSH (Glutathione réduit) et CAT (Catalase) dans les tissus cérébraux. Tous ces marqueurs oxydants / antioxydants ont été significativement corrigés dans les groupes traités par abamectine + vitamine C. Cette découverte confirme l'activité antioxydante de la vitamine C contre la neurotoxicité des AVMs. L'effet neuroprotecteur de la vitamine C a été confirmé dans des études antérieures in vivo (Shokouhi et al., 2005 ; Han et al., 2007). D'après Naseer et al. (2010), la vitamine C a pu réduire efficacement la gravité des lésions cérébrales induites par l'éthanol en tant que puissant piègeur de radicaux libres d'oxygène. Cette vitamine a restauré aussi l'expression d'importants marqueurs neuronaux, et elle a pu également interagir avec l'éthanol au niveau extracellulaire et ainsi atténuer l'effet tératogène global de l'éthanol chez le rat.

CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Actuellement, les risques sanitaires liés à l'administration et à l'utilisation des médicaments vétérinaires constituent une inquiétude majeure pour les éleveurs, les vétérinaires et leurs assistants qui sont amenés à être exposés chroniquement à ses produits.

Dans ce contexte, nous avons contribué à la recherche des effets de l'administration répétée d'une forte dose de l'IVM (AVIMEC®) pendant 21 jours chez le lapin de souche (*Oryctolagus cuniculus*) et les effets protecteurs d'une coadministration de la vitamine C par deux voies différentes.

La présente étude est réalisée en utilisant des analyses biochimiques et des examens histologiques afin de rechercher l'impact toxicologique de ce médicament. D'après les résultats de notre étude, l'IVM administré à une dose de 2 mg/kg p.c. a pu affecter significativement les variations du poids corporel, la consommation d'aliment et le poids absolu et relatif des différents organes.

Selon les résultats d'analyse des échantillons plasmatiques, l'IVM a montré clairement un effet hyperglycémiant et hypolipidémiant chez le lapin. Les autres marqueurs biochimiques du bilan hépatique, rénal et lipidique sont aussi perturbés.

Nous avons prouvé par le biais de l'examen histopathologique du foie, du rein, du poumon et cerveau que l'IVM possède une hépatotoxicité, une néphrotoxicité, une toxicité pulmonaire et une neurotoxicité chez les mammifères.

Les effets toxiques de l'IVM sont trouvés contrôlables après une coadministration de la vitamine C par gavage ou supplémenté dans l'alimentation du lapin. Cet antioxydant d'origine naturelle a permis d'atténuer toutes les anomalies causées par l'IVM. D'où la nécessité de sa supplémentation avec le traitement par IVM comme solution efficace contre la toxicité de l'IVM.

Pour conclure, une application prudente doit être envisagée lors de l'utilisation de l'IVM à grande échelle chez les lapins et autres animaux d'élevage.

La sensibilisation des éleveurs et des manipulateurs vis-à-vis des effets néfastes causés par l'utilisation aléatoire et excessive des endectocides et spécifiquement l'IVM, devient une démarche obligatoire. De ce fait, nous recommandons une co-administration de la vitamine C avec l'IVM pour éliminer ses effets toxiques. Cette étape va proportionnellement contribuer à la réduction de la formation des résidus médicamenteux dans les denrées alimentaires d'origine animale pour la consommation humaine. La vitamine C par gavage est recommandée par rapport à celle apportée dans l'aliment.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos observations nous permettent de proposer plusieurs pistes à explorer dorénavant :

- Renforcer cette étude par la réalisation d'une étude histomorphométrique.
- La réalisation d'une coloration histochimique par le PAS serait un complément plus que nécessaire afin de mettre en évidence les différents dommages engendrés par ce médicament sur les différents tissus.
- Estimer l'effet du stress oxydatif sur les différents tissus en déterminant les éventuelles variations des marqueurs biologiques spécifiques à chaque tissu afin de démontrer le rôle antioxydant de la vitamine C.
- Etudier l'impact de l'IVM sur d'autres organes en utilisant des biomarqueurs plus spécifiques.
- Vérifier l'effet toxique des avermectines par des dosages des résidus B1a et B1b dans les différents organes en utilisant les méthodes analytiques les plus modernes.
- Etudier les mécanismes cellulaire et moléculaire des effets protecteurs des antioxydants en général et de la coadministration des vitamines C en particulier sur la toxicité induite par l'IVM.
- Il serait intéressant de reprendre l'étude sur une période plus longue (toxicité Subaiguë et toxicité chronique), pour rechercher un éventuel effet mutagène et/ou cancérogène de ce médicament.
- Tester l'activité antioxydante d'autres vitamines et oligoéléments comme la vitamine E, sélénium, ...
- Enfin, et afin de pouvoir évaluer précisément le risque lié à l'exposition des avermectines, il est indispensable de faire appel à des méthodes alternatives de biologie moléculaires qui peuvent apporter des éléments d'interprétation sur le mode d'action des avermectines en ciblant la famille des protéines ABC et spécifiquement la P glycoprotéine P (P-gp) substrat des avermectines. Sachant que la P-gp a un rôle d'efflux des xénobiotiques au niveau de nombreuses barrières tissulaires de l'organisme, en particulier de la barrière hémato-méningée et l'absence de cette protéine résulte en une accumulation de certains xénobiotiques pouvant conduire à l'intoxication.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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.
2. 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), 263-270.
3. Abdou, K. A., & Sharkawy, A. A. (2004, February). Some toxicological studies on ivermectin in goats. In Proceeding of the 20 Annual meeting of the Egyptian Society of toxicology. Bibliotheca Alexandria, Alexandria University, Alexandria, Egypt (pp. 18-19).
4. Afifi, O. K., & Embaby, A. S. (2016). Histological study on the protective role of ascorbic acid on cadmium induced cerebral cortical neurotoxicity in adult male albino rats. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 4(1), 36-45.
5. Agus, D. B., Gambhir, S. S., Pardridge, W. M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J. C., & Golde, D. W. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *The Journal of clinical investigation*, 100(11), 2842-2848.
6. Ahmed, A. E., Alshehri, A., Al-Kahtani, M. A., Elbehairi, S. E. I., Alshehri, M. A., Shati, A. A., ... & El-Mansi, A. A. (2020). Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109841.
7. Albérich, M. (2014). *Impact de l'ivermectine sur les systèmes de détoxification des xénobiotiques: régulations chez l'hôte et chez le nématode* (Doctoral dissertation).
8. Ali, B. H. (1990). The effect of ivermectin on some haematological indices in rabbits: influence of vitamin K treatment. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 17(10), 735-738.
9. Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., & Al-Masoudi, E. A. (2015). Effects of ivermectin on lipid profiles, antioxidant enzymes and proteins with the beneficial effects of vitamin C in rabbits. *International Journal for Sciences and Technology*, 143(2495), 1-13.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

10. Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., Al-Masoudi, E. A., & Majeed, S. K. (2016). Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). *Basrah J Vet Res*, 14, 110-24.
11. 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.
12. Amin, S. N., Younan, S. M., Youssef, M. F., Rashed, L. A., & Mohamady, I. (2013). A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research*, 2.
13. Anonyme,..2018. Algérie - Importation de médicaments vétérinaires Mercredi 5 Décembre,2018.<https://lesoirdalgerie.com/articles/2018/01/27/article.php?sid=1127&c id=2;>
14. Arise, R. O., & Malomo, S. O. (2009). Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), 190-197.
15. Auer, R. N., & Sutherland, G. R. (2002). Hypoxia and related conditions. *Greenfield's neuropathology*, 1, 233-80.
16. Azevedo, R., Mendes, A. M., & Prudêncio, M. (2019). Inhibition of Plasmodium sporogonic stages by ivermectin and other avermectins. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-8.
17. Badawi, A. F., Stern, S. J., Lang, N. P., & Kadlubar, F. F. (1996). Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Progress in clinical and biological research*, 395, 109-140.
18. Barrett, J., Broderick, C., Soulsby, H., Wade, P., & Newsholme, W. (2016). Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe Strongyloides stercoralis infection: two case reports and a discussion of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 220-225.
19. Batiha, G. E., Ali, H., El-Mleeh, A. A., Alsenosy, A. A., Abdelsamei, E. K., Abdel-Daim, M. M., ... & Shaheen, H. M. (2019). In vitro study of ivermectin efficiency against the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) annulatus, among cattle herds in El-Beheira, Egypt. *Veterinary world*, 12(8), 1319.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

20. Beaune, P. H., & Lorient, M. A. (2000). Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. *Médecine/sciences*, 16, 1051-1056.
21. Behera, S. K., Dimri, U., Singh, S. K., & Mohanta, R. K. (2011). The curative and antioxidative efficiency of ivermectin and ivermectin+ vitamin E-selenium treatment on canine *Sarcoptes scabiei* infestation. *Veterinary Research Communications*, 35(4), 237-244.
22. Bentounsi, B., Oukel, M., & Kachtarzi, B. (2009). Compared efficacy of twelve registered preparations of ivermectin on the digestive and respiratory nematodes in Algerian sheep. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160(7), 329-334.
23. Berchiche, M., Kadi, S. A., 2002. The kabyle rabbits (Algeria). Rabbit Genetic Resources in Mediterranean Countries.
24. Bergmeyer, H. (1980). Dietary nitrate in man: friend or foe. *Clin Chim Acta.*, 105, 147-152.
25. Bergmeyer, H. U., Scheibe, P., & Wahlefeld, A. W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical chemistry*, 24(1), 58-73..
26. Bloomquist, J. R. (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(4), 145-156.
27. Bockarie, M. J., Alexander, N. D. E., Kazura, J. W., Bockarie, F., Griffin, L., Alpers, M. P. (2000). Treatment with ivermectin reduces the high prevalence of scabies in a village in Papua New Guinea. *Acta Tropica*, 75(1), 127-130.
28. Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. Biochimie Pathologique. *Aspects Moléculaires et Cellulaires*, 59-81.
29. Bruyère, F., Desoubreaux, G., Malavaud, S., Fourcade, C., Chandenier, J., Lachaud, L., ... & Sotto, A. (2013). Les médicaments anti-infectieux non antibiotiques en urologie. *Progrès en urologie*, 23(15), 1342-1356.
30. Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., ... & Ōmura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 15(3), 361-367.
31. Burns, J. J. (1959). Biosynthesis of L-ascorbic acid; basic defect in scurvy. *The American journal of medicine*, 26(5), 740-748.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

32. Caly, L., Druce, J.D., Catton, M.G., Jans, D.A., Wagstaff, K.M. (2020). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral research*, 104787.
33. Campbell, C.W. (2012 a). History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 853-865.
34. Campbell, W.C. (2012 b). Ivermectin and Abamectin; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany.
35. Campbell, W.C. (2016). Ivermectin: a reflection on simplicity (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 55(35), 10184-10189.
36. Campbell, W.C. Ivermectin and Abamectin. *Springer Verlag*; 1989.
37. Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Liébana, M. J. D., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, 179(1), 25-37.
38. Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *The FASEB journal*, 13(9), 1007-1024.
39. Carrère, L. (2016). *Étude pharmacocinétique de l'ivermectine administrée par voies orale et intramusculaire à la dose de 400 µg/kg, chez les Callithricidés, réalisée au Zoo de La Palmyre en Charente Maritime* (Doctoral dissertation).
40. Colombo, R. (2001). *Etude de la carence en vitamine C dans une population gériatrique hospitalisée* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
41. Combs, G.F. 2008. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health, 3rd Ed. Elsevier Press Academic.
42. CROSIA, J. L. (2011). Marché mondial du médicament vétérinaire: analyse des tendances des dix dernières années et perspectives d'évolution. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
43. Crump, A., Omura, S. (2011). Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(2), 13-28.
44. Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Paress, P. S., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M., & Arena, J. P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371(6499), 707-711.
45. Danaher, M., Howells, L.C., Crooks, S.R., Cerkvénik-Flajs, V., O'Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 844(2): 175-203.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

46. De Ménonville, S. T., Rosignoli, C., Soares, E., Roquet, M., Bertino, B., Chappuis, J. P., Chaussade, C. D. P., Piwnica, D. (2017). Topical treatment of rosacea with ivermectin inhibits gene expression of cathelicidin innate immune mediators, LL-37 and KLK5, in reconstructed and ex vivo skin models. *Dermatology and Therapy*, 7(2), 213-225.
47. Deaton, C., Froelicher, E. S., Wu, L. H., Ho, C., Shishani, K., & Jaarsma, T. (2011). The global burden of cardiovascular disease. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, 10(2_suppl), S5-S13.
48. Derelanko, M. J., Auletta, C. S. (2014): Handbook of Toxicology. CRC Press, New York, USA.
49. Destreicher, M., Desmeules, J., Piguet, V., & Dayer, P. (1999). Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Médecine et hygiène*, 57(2251), 793-800.
50. Diao, H., Cheng, N., Zhao, Y., Xu, H., Dong, H., Thamm, D. H., Zhang, D., Lin, D. (2019), Ivermectin inhibits canine mammary tumor growth by regulating cell cycle progression and WNT signaling. *BMC veterinary research*, 15(1), 1-10.
51. Dimitrov, R., Kostov, D., Stamatova, K., & Yordanova, V. (2012). Anatomotopographical and morphological analysis of normal kidneys of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Trakia Journal of Sciences*, 10(2), 79-84.
52. Djerrou, Z. (2011). *Etude des effets pharmaco-toxicologique de plante médicinales d'Algérie: l'activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de Pistacia lentiscus L* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en sciences. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine).
53. Dobiasova, M. (2006). AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. *Vnitřní lékařství*, 52(1), 64-71.
54. 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.
55. Dos Santos, A. R., Falcão, C. A. B., Muzitano, M. F., Kaiser, C. R., Rossi-Bergmann, B., Férézou, J. P. (2009). Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(2), 496-502.
56. Dou, Q., Chen, H.N., Wang, K., Yuan, K., Lei, Y., Li, K., et al. (2016). Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer research*, 76(15): 4457-4469.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

57. Dupin, H. (1992). *Alimentation et nutrition humaines*. ESF éditeur.
58. Edwards, G. (2003). Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, 2(S1), S8.
59. 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.
60. El-Far, A.H. (2013). Effect of therapeutic and double therapeutic doses of ivermectin on oxidative status and reproductive hormones in male rabbits. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 8(3): 128-133.
61. 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.
62. El-Sawy, A. E. S. F., El-Maddawy, Z. K., & Seed, S. A. (2015): Adverse Effects of Ivermectin in comparison with Rafoxanide on Male Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 47(1).
63. ElZoghby, R.R., Amin, A., Hamouda, A.F., Ali, A.F. (2015). Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats. *J. Am. Sci*, 11(3), 73- 83.
64. Eroschenko, V. P. (2008). DiFiore's atlas of histology with functional correlations. Lippincott Williams & Wilkins. 11th edition.
65. Fabiny, D. L., & Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical chemistry*, 17(8), 696-700.
66. Fetoui, H., Makni, M., Garoui, E. M., Zeghal, N. (2010), Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593-599.
67. Fischer, M.H., Mrozik, H. (2012). Chapter I : Chemistry. In : Campbell W.C. Ivermectin and Abamectin, New-York, Springer Science and Business Media ed. New-York.
68. Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

69. Fossati, P., Prencipe, L., & Berti, G. (1980). Use of 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical chemistry*, 26(2), 227-231.
70. Fromm, M. F. (2000). P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 38(2), 69-74.
71. GabAllh, M. S., El-mashad, A. B. E., Amin, A. A., Darweish, M. M. (2017). Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal*, 32(1), 104-112.
72. GABE, M. (1968). Techniques Histologiques. Paris, Masson et Cie.
73. Gad, S. C. (Ed.). (2006). Animal models in toxicology. CRC press. 2nd edition.
74. Gartner, L. P. (2018). Color atlas and text of histology. Lippincott Williams & Wilkins. 7th edition.
75. Geary, T. G. (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in parasitology*, 21(11), 530-532.
76. Gerloff, T. (2004). Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(1), 69-77.
77. Geyer, J., Gavrilova, O., Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdrla, b P-glycoprotein-and bcrp-deficient knockout mice. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(1), 87-96.
78. Gidenne, T., Lebas, F., Savietto, D., Dorchies, P., Duperray, J., Davoust, C., & Fortun-Lamothe, L. (2015). Nutrition et alimentation. *Le lapin: de la biologie à l'élevage* (Gidenne T., ed.), Quae publ. 137, 182.
79. Gokbulut, C., Biligili, A., Kart, A., Turgut, C. (2010). Plasma dispositions of ivermectin, doramectin and moxidectin following subcutaneous administration in rabbits. *Laboratory animals*, 44(2), 138-142.
80. Gonçalves, K., Vasconcelos, A., Barbirato, D., Vasconcelos, C., Vasconcelos, B. (2020). Therapeutic potential of ivermectin for COVID-19. *Authorea Preprints*.
81. Gonzalez-Canga, A., Fernandez-Martinez, N., Sahagun-Prieto, A., Diez-Liébana, M.J., Sierra-Vega, M., Garcia-Vieitez, J.J. (2009). A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. *Curr Drug Metab*, 10(4), 359-368.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

82. Grayson, M. L., Cosgrove, S. E., Crowe, S., Hope, W., McCarthy, J. S., Mills, J., Mouton, J. W., Paterson, D. L. (Eds.). (2017). Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, - Three Volume Set. CRC Press, New York, USA.
83. Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., ... & Souidi, M. (2006). Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann Biol Clin*, 64(6), 535-48.
84. Guzzo, C. A., Furtek, C. I., Porras, A. G., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C. M., ... & Lasseter, K. C. (2002). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(10), 1122-1133.
85. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
86. Halliwell, B. (1999). gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine.
87. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M., 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.
88. Han, J. M., Chang, B. J., Li, T. Z., Choe, N. H., Quan, F. S., Jang, B. J., Cho, I. H., Hong, H. N., Lee, J. H. (2007). Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain research*, 1185, 68-74.
89. Hansen, J.M., Coleman, R.L., Sood, A.K. (2016). Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 56, 131-143.
90. Hayes, W.J., & Laws, E.R. (1990). Handbook of Pesticide Toxicology, Classes of Pesticides, vol. 2. Academic Press Inc., NY, p. 3."
91. Hennessy, D. R., & Alvinerie, M. R. (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, 97, 124.
92. 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.
93. Heuillet, M. (2013). *Développement de méthodes de référence pour les biomarqueurs du bilan lipidique: application au contrôle qualité en biologie clinique* (Doctoral dissertation, Dijon).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

94. Hopper, K., Aldrich, J., Haskins, S. C. (2002). Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), 89-94.
95. 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.
96. Igweh, J. C., Nwagha, I. U., & Okaro, J. M. (2005). The effects of menopause on the serum lipid profile of normal females of South East Nigeria. *Nigerian journal of physiological sciences*, 20(1), 48-53.
97. Iqbal, K., Khan, A., & Khattak, M. M. A. K. (2004). Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(1), 5-13.
98. Jadhav, R. K., & Bhikane, A. U. (2020). Ivermectin toxicity in American Pit Bull Terrier bitch and its therapeutic management. *Indian J. Vet. Med. Vol*, 40(1), 48-51.
99. Jin, L., Feng, X., Rong, H., Pan, Z., Inaba, Y., Qiu, L., et al. (2013). The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature communications*, 4(1), 1-8.
100. Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.
101. Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J. (2007). Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead-and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food and chemical toxicology*, 45(8), 1478-1486.
102. Kanthe, P. S., Patil, B. S., Bagali, S., Shaikh, G. B., & Aithala, M. (2012). Atherogenic index as a predictor of cardiovascular risk among women with different grades of obesity. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*, 4(10), 0-0.
103. Kaplan, R.M., & Vidyashankar, A.N. An inconvenient truth: global warming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*, 186(1-2), 70-78.
104. 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

105. Khaldoun-Oularbi, H. (2015). *Etude des variations biochimiques et histologiques hépatique et rénale chez le rat traité par deux biopesticides l'emamectine benzoate et l'abamectine*. (Doctoral dissertation, Algeria).
106. 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.
107. 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*). *Annales de toxicologie analytique*, 25(2), 63-70.
108. Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., Lespine, A. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug metabolism and disposition*, 38(4), 573-580.
109. Klotz, U., Ogbuokiri, J. E., & Okonkwo, P. O. (1990). Ivermectin binds avidly to plasma proteins. *European journal of clinical pharmacology*, 39(6), 607-608.
110. König, H. E., Hans-Georg, H. G., & Bragulla, H. (2007). *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas*. Schattauer Verlag. 3rd edition.
111. Krieger, R. (2010). *Hayes' handbook of pesticide toxicology* (Vol. 1). Academic press. 3rd ed. USA, Elsevier.
112. Krishna, D. R., & Klotz, U. (1993). Determination of ivermectin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Arzneimittel-forschung*, 43(5), 609-611.
113. Króliczewska, B., Miśta, D., Ziarnik, A., Żuk, 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), 76.
114. Kudzi, W., Dodoo, A. N., & Mills, J. J. (2010). Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC medical genetics*, 11(1), 1-8.
115. Lacour, B. (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue francophone des laboratoires*, (451), 25-37.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

116. Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends in parasitology*, 33(6), 463-472.
117. Layachi, N. (2013). *L'effet combiné des vitamines c (acide ascorbique) et e (α-tocophérol) sur la toxicité du cadmium chez les rats wistar*. (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
118. Li, M., You, T. Z., Zhu, W. J., Qu, J. P., Liu, C., Zhao, B., Xu, S. W., Li, S. (2013): Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicology*, 22(8), 1241-1254.
119. Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. (2006). Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver. *The FEBS journal*, 273(7), 1516-1527.
120. Liu, Y., Fang, S., Sun, Q., Liu, B. (2016). Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 480(3), 415-421.
121. Lu, M., Xiong, D., Sun, W., Yu, T., Hu, Z., Ding, J., et al. (2017). Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug delivery*, 24(1), 622-631.
122. MADRP.,2018.http://madrp.gov.dz/wpcontent/uploads/2019/02/Liste_des_AM_M_24_10_2018.pdf
123. 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.
124. Mandl, J., Szarka, A., Banhegyi, G. (2012). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1097-1110.
125. Marrs, T. C. (Ed.). (2012). Mammalian toxicology of insecticides (No. 12). *Royal Society of Chemistry*.
126. Marshall, W. J., Bangert, S. K., & Raynaud, E. (2005). *Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic*. 5ème éd. Paris, Elsevier.
127. Martínez-Fernández, L., Pons, Z., Margalef, M., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2015). Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(3), 277-284.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

128. Martoja, R. et Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. Edition Masson et Cie, Paris-VI.
129. Mayer, P. (2000). The relevance of P-glycoprotein in drug transport to the brain: the use of knockout mice as a model system. In Bradbury M, Begley D, Kreuter J, eds. *The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS*. New York: Marcel Dekker.
130. McKellar, Q. A., & Benchaoui, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5), 331-351.
131. Mealey, K. L., Bentjen, S. A., Gay, J. M., & Cantor, G. H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(8), 727-733.
132. Mekuriaw, W., Balkew, M., Messenger, L. A., Yewhalaw, D., Woyessa, A., Massebo, F. (2019). The effect of ivermectin® on fertility, fecundity and mortality of *Anopheles arabiensis* fed on treated men in Ethiopia. *Malaria journal*, 18(1), 1-10.
133. Menez, C., Sutra, J. F., Prichard, R., Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in *Mdr1ab* ($-/-$) mice and effects on mammalian GABA (A) channel activity. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(11), e1883.
134. Merola, V.M., & Paul, A.E. (2018). Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(6), 991-1012.
135. Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L.F., et al. (2009). Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health and risk management*, 5, 757.
136. Miyajima, A., Komoda, M., Akagi, K., Yuzawa, K., Yoshimasu, T., Yamamoto, Y., et al. (2015). Experimental study of pharmacokinetics of external, whole body bathing application of ivermectin. *The Journal of Dermatology*, 42(1), 87-89.
137. Moreira, N., Sandini, T. M., Reis-Silva, T. M., Navas-Suárez, P., Auada, A. V. V., Lebrun, I., Flório, J. C., Bernardi, M. M., Spinoso, H. S. (2017). Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. *Reproductive Toxicology*, 74, 195-203.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

138. Naseer, M. I., Lee, H. Y., & Kim, M. O. (2010). Neuroprotective effect of vitamin C against the ethanol and nicotine modulation of GABAB receptor and PKA- α expression in prenatal rat brain. *Synapse*, 64(6), 467-477.
139. Nwagha, U. I., Ikekpezazu, E. J., Ejezie, F. E., Neboh, E. E., & Maduka, I. (2010). Atherogenic index of plasma as useful predictor of cardiovascular risk among postmenopausal women in Enugu, Nigeria. *African health sciences*, 10(3).
140. 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.
141. Omondi, E.O., Nyabadza, F., Bonyah, E., Badu, K. (2017). Modeling the infection dynamics of onchocerciasis and its treatment. *Journal of Biological Systems*, 25(02), 247-277.
142. Omshi, F. S. H., Abbasalipourkabir, R., Abbasalipourkabir, M., Nabyan, S., Bashiri, A., Ghafourikhosroshahi, A. (2018). Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29408-29417.
143. Packer, L. (Ed.). (2002). Antioxidants: Vitamins C and E for health. *The American Oil Chemists Society*.
144. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.
145. Papich, M. G. (2015). Saunders handbook of veterinary drugs-e-book: small and large animal. Elsevier Health Sciences, North Carolina, USA.
146. Pernot, F. (2009). *Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires* (Doctoral dissertation).
147. Peterson, B. S., Rauh, V. A., Bansal, R., Hao, X., Toth, Z., Nati, G., ... & Perera, F. (2015). Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *JAMA psychiatry*, 72(6), 531-540.
148. Pharmacopée européenne. (1996). Sainte Ruffine: Conseil de l'Europe Maisonneuve SA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

149. Picard, N. (2002). *Métabolisme des xénobiotiques, modèles in vitro et outils analytiques: application à l'étude du métabolisme de l'acide mycophénolique* (Doctoral dissertation).
150. Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134-153.
151. Qureshi S. (2013). Biochemical toxicity of Ivermectin in Wistar albino rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 5(1), 15-19.
152. 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.
153. Rajender, K. , Fauste, T., (2006). Liver Disease. SLACK Incorporated.USA. P 331-332.
154. Raoul, W. (2005). *Effets des facteurs angiogéniques et des cellules progénitrices dans la réparation de la barrière alvéolo-capillaire au cours des agressions pulmonaires aiguës* (Doctoral dissertation, Paris 12).
155. Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*, 34(1-2), 83-448.
156. Ringler, D. H., & Newcomer, C. E. (2014). The biology of the laboratory rabbit. Academic Press.
157. Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J. F., Drag, M., Soll, M., ... & 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.
158. Rumm-Kreuter, D., & Demmel, I. (1990). Comparison of vitamin losses in vegetables due to various cooking methods. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 36(4-SupplementI), S7-S15.
159. Schubert, GE. (1965). Enzymatic urea determination in the blood and serum in the Warburg optical test. *Klinische Wochenschrift*, 43, 174-175.
160. Sheriff, J. C., Kotze, A. C., Sangster, N. C., & Martin, R. J. (2002). Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Parasitology*, 125(5), 477-484.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

161. Shokouhi, G., Hadidchi, S., Ghorbanihaghjo, A., Rahbani-Noubar, M., Panahi, S., Forouzanfar, M., Rashtchizadeh, N., Mesgari, M. (2005). Neuroprotective effect of ascorbic acid in experimental blunt sciatic nerve injury in rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1(2), 1-5.
162. Shoop, W. L., Mrozik, H., & Fisher, M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology*, 59(2), 139-156.
163. Silbernagl, S., Despopoulos, A., & Laurent, D. (2001). Atlas de poche de physiologie. Médecine-sciences.
164. Singh, R., Verma, P.K., Singh, G. (2012). Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *Journal of Complementary Medicine Research*. 1(2), 101-104.
165. Spampinato, J., Gibson, A., Dudek, F. E. (2018). The antihelminthic moxidectin enhances tonic GABA currents in rodent hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 119(5), 1693-1698.
166. Sperte, M. (2016). *Vitamines et oligoéléments: manifestations buccales des déficits et implications thérapeutiques en chirurgie dentaire*. (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
167. Stamatova-Yovcheva, K., Dimitrov, R., Kostov, D., & Yovchev, D. (2012). Anatomical macromorphological features of the liver in domestic rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Trakia Journal of Sciences*, 10(2), 85-90.
168. Stevens, J., Breckenridge, C. B., & Wright, J. (2010). The Role of P-glycoprotein in Preventing Developmental and Neurotoxicity: Avermectins—A Case Study. In Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (pp. 2093-2110). Academic Press.
169. Szasz, G. (1969). A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clinical chemistry*, 15(2), 124-136.
170. Tiffany, T. O., Jansen, J. M., Burtis, C. A., Overton, J. B., & Scott, C. D. (1972). Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clinical Chemistry*, 18(8), 829-840.
171. Trailović, S. M., Nedeljković, J. T. (2010). Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1012080409-1012080409.
172. Trinder, P. (1969). Enzymatic methods for glucose determination. *Ann Clin Biochem*, 6, 24-26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

173. Van Praag, E. (2014). Maladies des voies respiratoires profondes. Medirabbit.com.http://www.medirabbit.com/FR/Respiration/Diff/Domes_lungs_fr.pdf. DOI: 10.13140/2.1.4947.8401.
174. Van't Veer, P., Jansen, M. C., Klerk, M., & Kok, F. J. (2000). Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public health nutrition*, 3(1), 103-107.
175. Vercruysse, J., & Rew, R. S. (Eds.). (2002). Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy. CABI.
176. Walter, H. H. (2008). Handbook of Veterinary Pharmacology. Antiparasitic agents. Wiley-Blackwell. IOWA, 379-416.
177. Wang, J., Xu, Y., Wan, H., Hu, J. (2018). Antibiotic ivermectin selectively induces apoptosis in chronic myeloid leukemia through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 497(1), 241-247.
178. Wheater, P. R., Young, B., & Heath, J. W. (2001). Histologie fonctionnelle. De Boeck Supérieur. 4ème édition.
179. Yang, C. C. (2012). Acute human toxicity of macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 999-1003.
180. Yardley, M. M., Wyatt, L., Khoja, S., Asatryan, L., Ramaker, M. J., Finn, D. A., Alkana, R. L., Huynh, N., Louie, S. G., Petasis, N. A., Bortolato, M., Davies, D. L. (2012). Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology*, 63(2), 190-201.
181. Zerrouki, N., Bolet, G., Berchiche, M., & Lebas, F. (2005). Evaluation of breeding performance of a local Algerian rabbit population raised in the Tizi-Ouzou area (Kabylia). *World Rabbit Science*, 13, 29-37.
182. Zerrouki, N., Bolet, G., Berchiche, M.1., Lebas, F., 2004. Breeding performance of local kabylian rabbits does in Algeria. 8th World Rabbit Congress (accepted communication), 371-377. 1.
183. Zhang, Y., Luo, M., Xu, W., Yang, M., Wang, B., Gao, J., et al. (2016). Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(36), 6895-6902.
184. Zhu, M., Li, Y., Zhou, Z. (2017). Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(3), 373-378.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

185. Zhu, W. J., Li, M., Liu, C., Qu, J. P., Min, Y. H., Xu, S. W., & Li, S. (2013). Avermectin induced liver injury in pigeon: mechanisms of apoptosis and oxidative stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 74-81.

ANNEXES



1. Répartition des lots des lapins dans des cages métalliques



2. Couleurs variables de la robe de la souche synthétique



3. Aliment granulé du lapin

3. Aliment granulé du lapin



4. Pesée du lapin

4. Pesée du lapin



AVIMEC 1% Composition: Each 1 ml contains:

Ivermectin 10 mg.

Properties

AVIMEC Injection is effectively control and treatment of internal and external parasites that impair livestock health and productivity. Ivermectin has a broad spectrum efficacy and wide safety margin. Ivermectin is derived from the family avermectins, which are isolated from fermentation of the soil organism streptomyces avermitilis. Ivermectin paralyzes and ultimately kills parasitic nematodes, arachnoids, and insects by a unique effect on the nervous systems of these parasites. Ivermectin action is due to a neurotransmitter chemical that serves as a signal from one nerve cell to another or from a nerve cell to a muscle cell and is called gamma amino butyric acid (GABA). In round worms Ivermectin stimulates the release of GABA from nerve endings and enhances binding of GABA to special receptors at nerve junctions, thus interrupting nerve the same effect occurs in mites & lice. Ivermectin has no effect on acetylcholine which is the principal peripheral neurotransmitter in mammals and does not readily penetrate the central nervous system of mammals were GABA functions as neurotransmitter.

Indications

For the control and treatment of the following parasites:

Dosage and administration

(single dose) By subcutaneously injection.
Cattle, Buffaloes and Camels: 1 ml per 50 kg b. wt.
Sheep and Goats: 0.5 ml per 25 kg b. wt.
Rabbits: 0.15 ml per 1 kg b. wt.

Withdrawal period

Meat: Cattle, Sheep, Goats and Rabbits: 21 days.
Camels: 28 days.
Milk: 28 days.

Precautions

AVIMEC Injection is not for intravenous or intramuscular use.

	Don't smoke or eat during handling the product. Wash hands after use. N.B.: Transitory discomforts in some cattle may occur after subcutaneously injection. These reactions disappear without treatment. Divide the large dose in different sites. Storage: Store in a dark place at a temperature below 30°C. Packing: 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml and 250 ml amber glass. 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml , 250 ml and 500ml clear plastic injection bottles. FOR VETERINARY USE ONLY
	Description General description Pharmaceutical secondary standards for application in quality control, provide pharma laboratories and manufacturers with a convenient and cost-effective alternative to the preparation of in-house working standards. Ascorbic acid is a powerful antioxidant and is widely used in pharmaceutical formulations.[2][3] It has proven to have a beneficial effect on age-related diseases such as cancer, atherosclerosis, ocular, neurodegenerative diseases, etc. It is mainly involved in the formation and maintenance of collagen.[1] The prolonged deficiency of ascorbic acid in diet may result in scurvy.[3] Application Ascorbic Acid may be used as a pharmaceutical reference standard for the quantification of the analyte in pharmaceutical formulations using hydrophilic interaction chromatography.[2] Biochem/physiol Actions Ascorbic Acid, also known as Vitamin C, is a six-carbon lactone produced by plants and some animal species but not by humans and other primates. Ascorbic acid functions as an enzymatic cofactor

	for multiple enzymes, serving as an electron donor for monooxygenases and dioxygenases. Ascorbic acid also functions as a powerful antioxidant, particularly in regards to reactive oxygen species. Analysis Note These secondary standards offer multi-traceability to the USP, EP (PhEur) and BP primary standards, where they are available.

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)	REACTIFS flacon R1 REACTIF DE TRAVAIL 2-Oxoglutarate 15 mmol/L L-Alanine 500 mmol/L LDH ≥ 1600 UI/L NADH $\leq 0,18$ mmol/L Tampon Tris 100 mmol/L pH à 30°C $7,50 \pm 0.1$ Conservateur
1. Réactifs du dosage de glucose	2. Réactifs du dosage d'ALAT
REACTIFS R1 REACTIF DE TRAVAIL Danger EDTA 5 mmol/L 2-Oxoglutarate 12 mmol/L L-Aspartate 200 mmol/L MDH 495 UI/L LDH 820 UI/L NADH $\leq 0,18$ mmol/L Tampon Tris 80 mmol/L pH à 30°C $7,80 \pm 0.1$ Conservateur	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
3. Réactifs du dosage d'ASAT	4. Réactifs du dosage de γ -GT
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
5. Réactifs du dosage de créatinine	6. Réactifs du dosage de l'acide urique

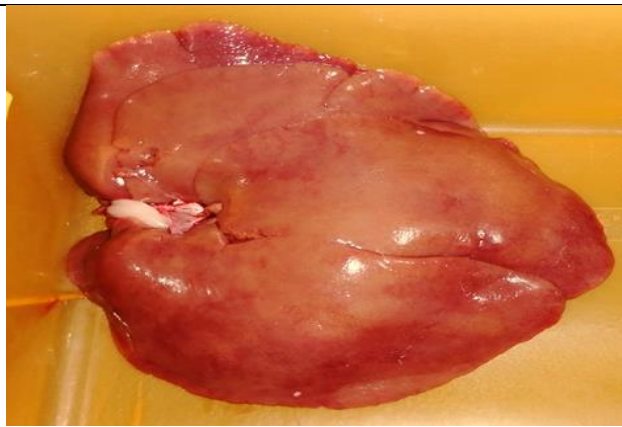
REACTIFS R1 TAMPON ENZYME BUF ENZ UREA Tris pH 7,9 ± 0,1 à 30°C100 mmol/L Uréase≥ 17000 UI/L GLDH≥ 700 UI/L Oxoglutarate6,5 mmol/L Conservateur R2 COENZYME COENZ UREA NADH≥ 1,5 mmol/L Conservateur R3 STANDARD STD Urée40 mg/dL	REACTIFS R1 CHO Réactif Tampon phosphate100 mmol/L Chloro-4-phénol5 mmol/L Sodium Cholate2,3 mmol/L Triton x1001,5 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 6000167 µmol/L Conformément à la réglementation 1272/2008, ce réactif n'est pas classé comme dangereux.
7. Réactifs du dosage de l'urée	8. Réactifs du dosage de CT
REACTIFS R1 REAGENT REAG TRI PIPES100 mmol/L Chlorure de magnésium9,8 mmol/L Chloro-4-phénol3,5 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 clarifiant1,5 mmol/L R2 ETALON STD Triglycérides2 g/L	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 % EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande EUH208 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 TG	10. Réactifs du dosage de HDL-C
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	• Formol à 10% • Alcool 70°, 90°, 95° et 100° • Xylène • Paraffine • Eukitt • HCl 1% • Carbonate de lithium • Hématoxyline • Eosine
11. Réactifs du dosage de LDL-C	12. Autres réactifs



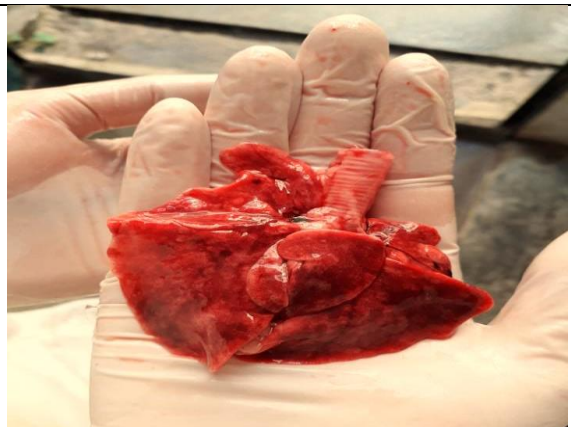
13. Dissection de lapin



14. Prélèvement des organes



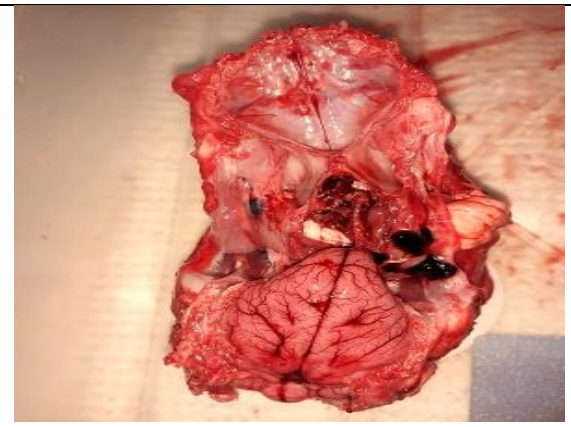
15. foie polylobé du lapin



16. Appareil respiratoire du lapin traité



17. Rein du lapin



18. Cerveau du lapin

Tableau 6 : Paramètres biochimiques de la fonction hépatique (glucose, γ -GT, ALAT, ASAT) des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14^{ème} et au 21^{ème} jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	Glucose (g/l)	0,89 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,01
	γ -GT (UI/l)	10,0 $\pm$ 0,02	13,0 $\pm$ 0,01^a	12,5 $\pm$ 2,1^b	12,0 $\pm$ 6,4^c
	ALAT (UI/l)	27,0 $\pm$ 0,2	43,5 $\pm$ 7,9^a	32,0$\pm$0,1^b	38,0$\pm$4,8^c
	ASAT (UI/l)	33,0 $\pm$ 0,05	57,0 $\pm$ 0,02^a	50,2$\pm$7,2^b	52,5$\pm$6,4^c
21^{ème} jour	Glucose (g/l)	1,02 $\pm$ 0,19	1,64 $\pm$ 0,13^a	1,20$\pm$0,09^{b,d}	1,34 $\pm$ 0,17
	γ -GT (UI/l)	11,0 $\pm$ 0,03	18,0 $\pm$ 4,6^a	11,2 $\pm$ 0,6	12,1 $\pm$ 0,8
	ALAT (UI/l)	32,0 $\pm$ 2,7	44,5 $\pm$ 3,7^a	31,5 $\pm$ 7,9	33,2 $\pm$ 3,8
	ASAT (UI/l)	36,5 $\pm$ 8,7	42,0 $\pm$ 6,7^a	34,2 $\pm$ 3,2	38,2 $\pm$ 1,9

Les Résultats sont donnés par la moyenne $\pm$ SD (n=5). a, b, c et d : p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groups traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage), c: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (en aliment), d : différence significative entre le groupe IVM + vitamine C (par gavage) et le groupe IVM + vitamine C (en aliment)).

Tableau 7 : Paramètres biochimiques de la fonction rénale des lapins témoins et traités. Les prélèvements sont réalisés au 14ème et au 21ème jour de l'expérimentation.

Période	Paramètres biochimiques	Groupes			
		Témoin	IVM	IVM + vitamine C (gavage)	IVM + vitamine C (en aliment)
14^{ème} jour	Créatinine (mg/dl)	7,16 ± 0,01	10,8 ± 0,01^a	8,85 ± 0,13^b	7,4 ± 0,36
	Acide urique (mg/dl)	4,4 ± 0,02	5,1 ± 0,01	4,9 ± 0,6	4,8 ± 0,4
	Urée (mg/dl)	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,01
21^{ème} jour	Créatinine (mg/dl)	7,24 ± 1,69	12,24 ± 0,88^a	7,38 ± 0,51	7,72 ± 1,3
	Acide urique (mg/dl)	4,4 ± 0,03	4,4 ± 0,01	4,91 ± 1,4	4,5 ± 0,3
	Urée (mg/dl)	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,03

Les Résultats sont donnés par la moyenne ± SD (n=5). a et b : p < 0,05 (a: différence significative entre tous les groupes traités et le groupe témoin, b: différence significative entre le groupe traité par l'IVM et le groupe IVM + vitamine C (par gavage)).



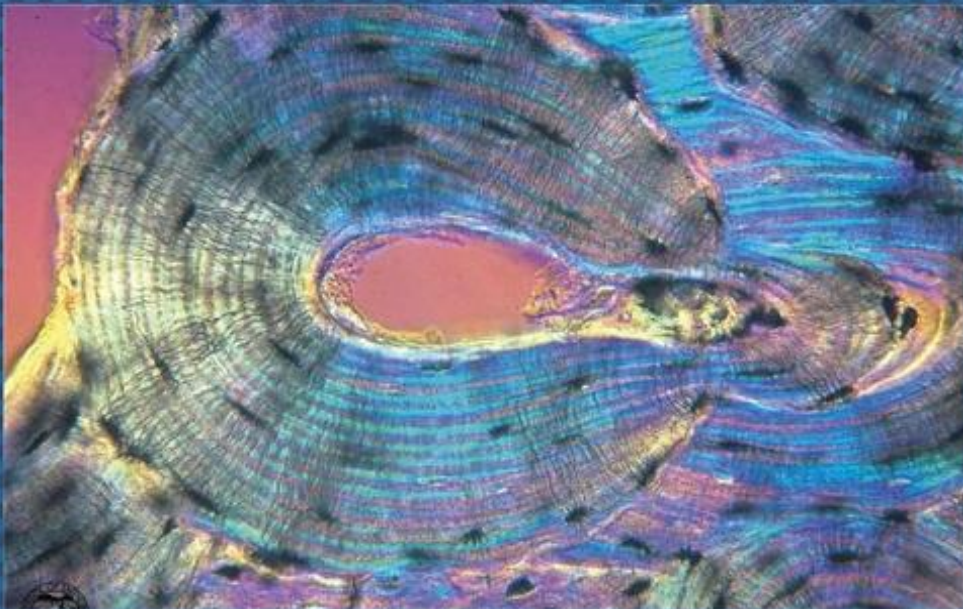






EGYPTIAN ACADEMIC JOURNAL OF
BIOLOGICAL SCIENCES
HISTOLOGY & HISTOCHEMISTRY

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 µl; 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 × 0.25 mm i.d., 0.25 µm 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 µl. 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 µm 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^{**}	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).

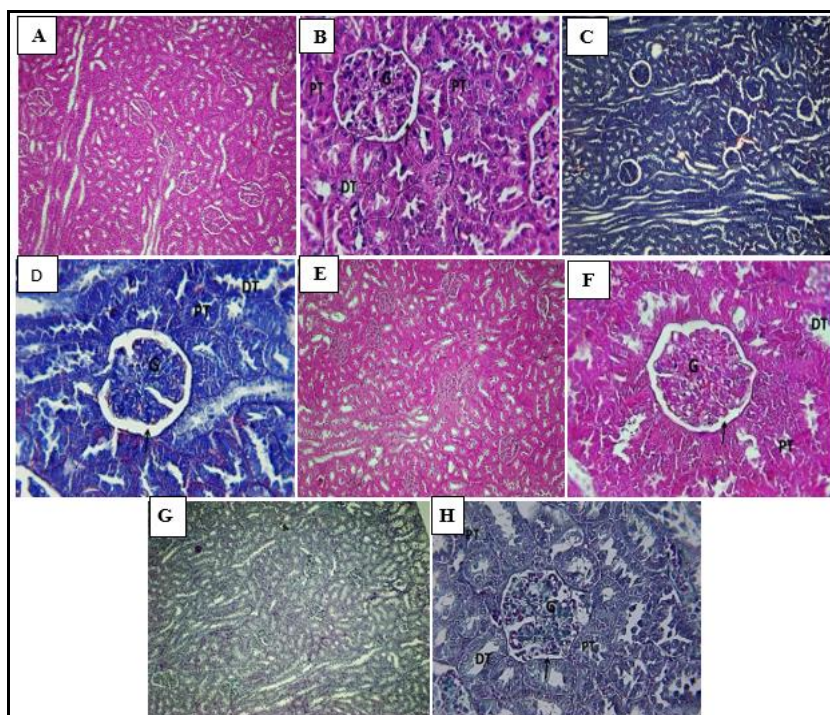


Fig. 1: Photomicrographs of rabbit kidney sections of control and TEO groups. A, B, C and D: Control group; E, F, G and H: TEO group. Kidney sections from control and TEO-treated rabbits showed normal morphology of renal tissue, proximal and distal tubules and glomerular capsule are intact and no tissue 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: $\times 100$; $\times 400$.

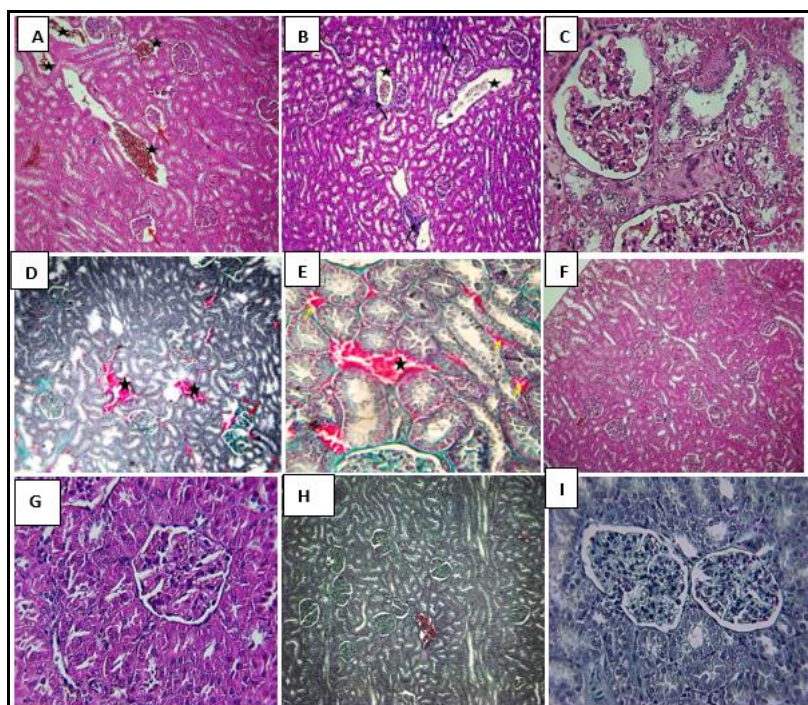


Fig. 2: Photomicrographs of kidney sections of VT-treated group and VT+ TEO group. A, B, C, D and E: VT group; F, G, H and I: (VT+ TEO) group. VT group sections showed dilatation and congestion of blood vessels (asterisk), leucocytes infiltration (black arrow), dilatation of proximal and distal tubules, 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: $\times 100$; $\times 400$.

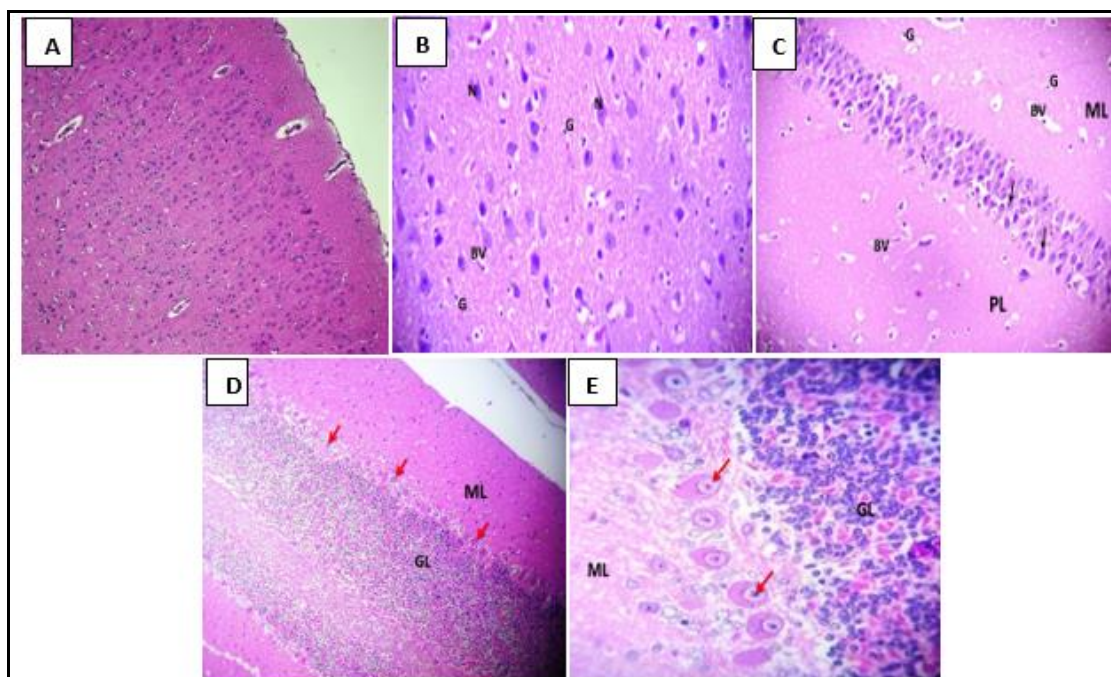


Fig. 3: Photomicrographs of brain sections of control rabbits stained with H&E. Sections of cerebral cortex (A and B), Hippocampus (C) and cerebellum (D and E) from Control rabbits showing normal histological structure. N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 , x400.

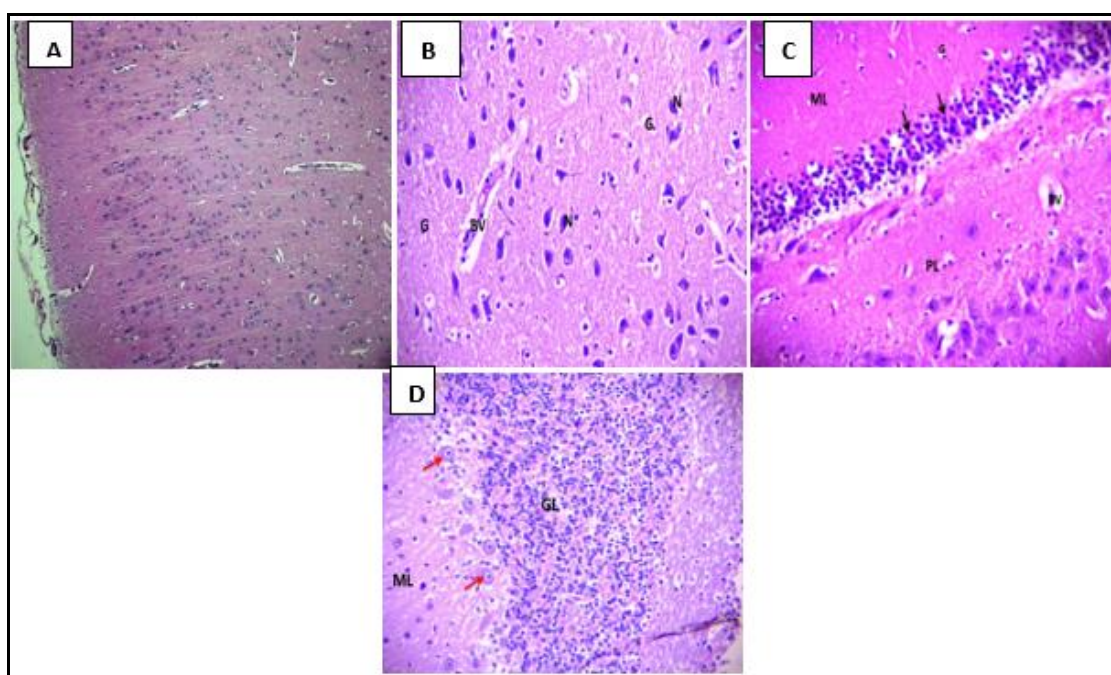


Fig. 4: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with TEO alone, stained with H&E. TEO group showing nearly normal histological architecture of the cerebral cortex (A and B), the hippocampus (C) and the cerebellum (D). N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 and x 400.

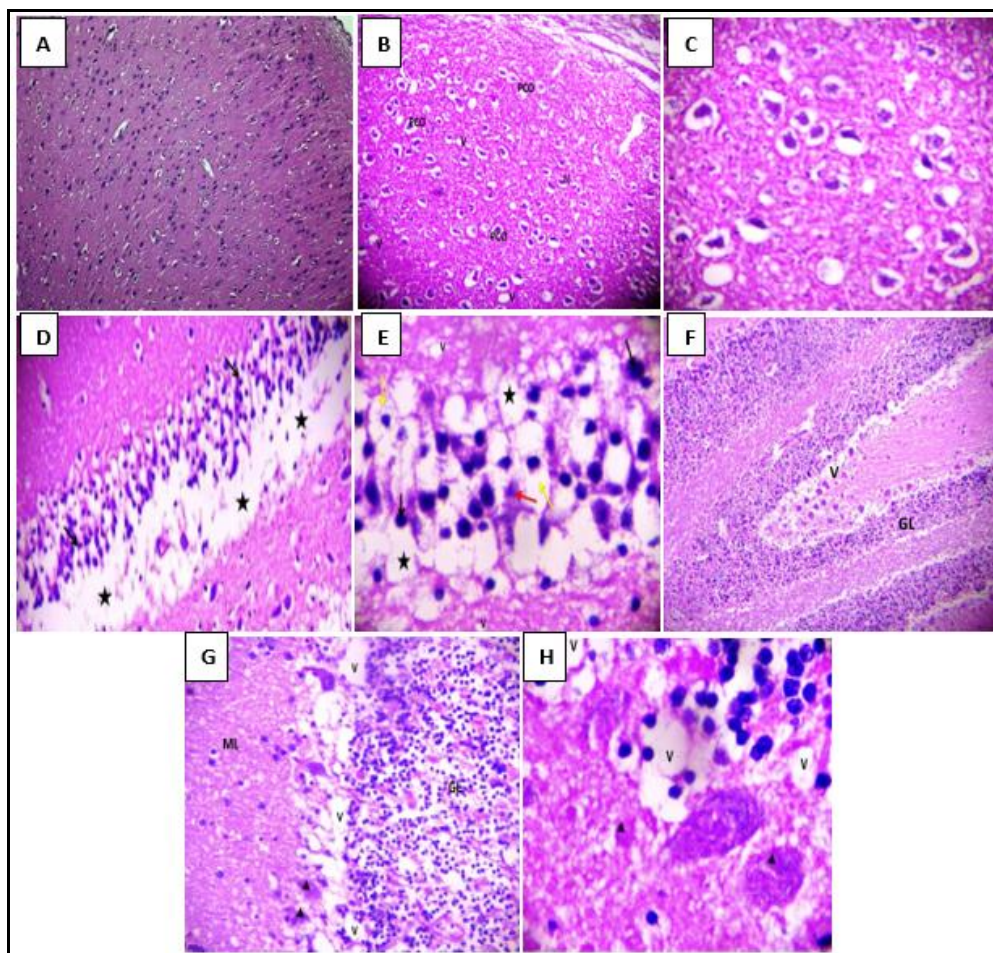


Fig. 5: Photomicrographs of brain sections of VT-treated rabbits stained with H&E. VT-treated group showing neuronal degenerative changes; pericellular oedema (PCO) and neuropil vacuolation (V) in the cerebral cortex (A, B and C). The hippocampal tissue was the site of significant oedema (asterisk) and 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

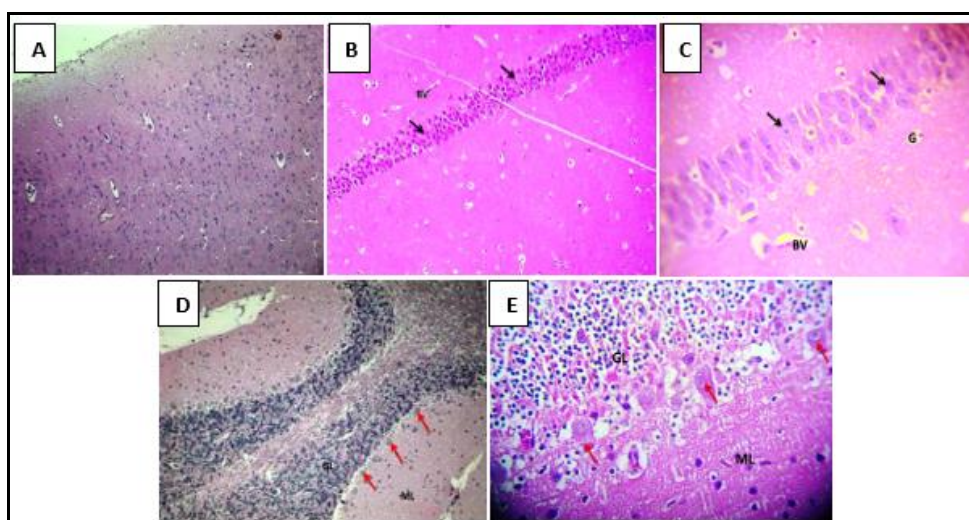


Fig. 6: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with (VT+TEO) stained with H&E. (VT+TEO)-treated rabbits showing a more preserved architecture of the cerebral cortex (A), the hippocampus (B and C) and the cerebellum (D and E). G: glial cells; BV: blood vessel; Black arrows: pyramidal cells; 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 Enamectin benzoate), significantly reduced body weight gain (Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015; Khaldoun-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.; Quinten, 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. *Toxicon*, 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 Cerkvénik-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.

Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats

Hassina Khaldoun-Oularbi,¹
Noura Bouzid,² Soumia Boukreta,¹
Chahrazed Makhoul,¹
Fariza Derriche,¹ Nadia Djennas²

¹Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, Blida; ²Laboratory of Anatomy-Pathology, CHRU Parnet, Alger, Algeria

Abstract

Thiamethoxam (TMX), a second-generation neonicotinoid insecticide, is one of the most widely used insecticides in Algeria. The present study assessed the effects of repeated subchronic exposure to the commercial formulation of thiamethoxam (Actara®, 25% WG) in albino male rats. The toxic effects of thiamethoxam (TMX) were studied biochemically and histopathologically. Twenty-eight male albino rats weighing between 226 and 243 g were randomly assigned to four groups. One group served as control, and the other three were served as experimental groups administered a neonicotinoid thiamethoxam (TMX; 26, 39 and 78 mg/kg/day) for 6 weeks. The effects of the insecticide on various biochemical parameters were evaluated at 2, 4 and 6 weeks. Histopathological studies were carried out in the liver, kidney, cerebellum and hippocampus at the end of the experiment. Changes in biochemical parameters glucose, ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), γ GT (gamma-glutamyltransferase) ALP (alkaline phosphatase) urea and creatinine were observed in treated-groups in a dose dependent manner when compared to the control. Histopathological alterations were more intense in male rats from the TMX high dose group than those from group 2 and 3. Based on these results, subchronic oral administration of thiamethoxam altered the biochemical parameters, which correlated with histopathological changes in the liver kidney and brain.

Introduction

Nowadays, acute pesticide poisoning is an important public health problem worldwide and inappropriate use of those chemical products can lead to adverse effects to humans and the environment. The research

on the risk of diseases associated with occupational and environmental exposures are primarily drawing on studies in human populations, along with supportive findings from experimental studies. Lifelong cumulative exposure to pesticides may produce lasting toxic effects on various organs including the central nervous system and contribute to the development of pathologies like systemic lupus erythematosus¹ and Alzheimer's disease.²

Neonicotinoids insecticides have been registered globally in more than 120 countries,³ in major markets acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid, clothianidin, thiamethoxam, and dinotefuran.⁴ These six neonicotinoids have distinct structural features compared with nicotine and at high doses were associated with evidence of systemic toxicity.⁵ Animal studies indicate relatively low toxicity of neonicotinoids to birds, fish and mammals^{6,7} because they have resistant nicotinic receptor subtypes compared to insects, as well as the protection of the central nervous system (CNS) by the blood-/brain barrier.⁸ However, Rodrigues *et al.* (2010)⁹ demonstrate that administration of the neonicotinoid insecticide may provoke alterations on the cholinergic system of rats, producing biochemical and behavioral effects that can be correlated to the toxicity produced by other kinds of pesticides that are linked to the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's type dementia.

Thiamethoxam (TMX), a second-generation neonicotinoid insecticide, developed both for foliar/soil applications and as a seed treatment for use in most agricultural crops all over the world.¹⁰ Clothianidin and thiamethoxam are extremely toxic to winter worker honey bees, they act like endocrine disrupting chemicals.¹¹ It has been shown that TMX is a much better substrate for mouse liver microsomal CYPs than the corresponding rat or human enzymes in forming desmethyl-TMX (dm-TMX), which is also hepatotoxic, and clothianidin (CLO), which is not hepatotoxic or hepatocarcinogenic.¹² Systemic administration of 20 mg/kg/b.w./TMX in mice has shown that at least 44% of this substance is metabolized and that its metabolites are found in the brain.¹³ Comparisons of the major metabolic pathways of thiamethoxam in vitro using mouse, rat, and human liver fractions has shown that metabolic rates in humans are lower than those in the rat. Though, the insecticide, thiamethoxam, has been found to cause a reduction in serum cholesterol an earlier sign of liver dysfunction that may be causally associated with the later pathological changes, and eventually cell death, increased cell proliferation and tumor for-

Correspondence: Hassina Khaldoun-Oularbi, Department of Biology and Cellular Physiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, BP 270, Route Soumaa, Blida, Algeria.
E-mail: khaldounhassina@hotmail.fr

Key words: Thiamethoxam; subchronic toxicity; biochemical parameters; histopathology; Albino rat.

Received for publication: 19 October 2017.

Revision received: 15 December 2017.

Accepted for publication: 15 December 2017.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright H. Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2017
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2017; 7:7149
doi:10.4081/xeno.2017.7149

mation¹⁴ suggesting that thiamethoxam is unlikely to pose a hazard to humans exposed to this chemical at the low concentrations found in the environment or during its use as an insecticide.

In Algeria, the two formulations of Thiamethoxam Actara® for foliar application and Cruiser® for seed treatment are largely commercialized. The aim of this study was to determine the potential effects of the commercial formulation of thiamethoxam named Actara® in multiple organs of rats. For this purpose, biochemical and histopathological analysis were investigated in this setting.

Materials and Methods

A commercial formulation of thiamethoxam [3-2-Chloro 1,3-tiazol-5-ylmetil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamine], named Actara® (25 WG) 25% purity of active compound was purchased from Syngenta Crop Protection Agrochemicals, Greensboro, USA. All other biochemical reagents used were obtained from commercial sources (BIO-LABO SA, France).

Experimental animals and research design

Male Wistar rats, weighing 226-243 g, were housed in four groups of seven animals under controlled conditions of temperature and photoperiod of 12 h light/dark, with free access to food and water. Treated animals received, by gavage three different doses of TMX dissolved in distilled water,

1/60, 1/40 and 1/20 TMX-LD50 respectively 26, 39 and 78 mg/kg/b.w. The oral LD50 value of thiamethoxam was 1563 mg/kg/b.w.¹⁰ Control animals received vehicle (H₂O) in the same volume as treated animals. All rats were allowed to acclimate to their home cages for a week prior to the initiation of experiments.

The experiment was performed in accordance with the OCDE guidelines.¹⁵ The research design involves treatment of the rats with the chemicals for 6 weeks. At the end of the 6 weeks experiment, the overnight-fasted rats were anesthetized using anesthetic ether than sacrificed by cervical dislocation.¹⁶ The following organs liver, kidney, brain, testes, thymus and adrenal glands were collected. All these organs were weighed individually and organ body weight ratio was calculated (Figure 1).

Biochemical measurements

At 2, 4 and 6 weeks after treatment, blood was collected by retro-orbital bleeding. Plasma samples were separated from blood cells by centrifugation at 3000 g for 10 min. Subsequently, plasma samples were used to determine creatinine, urea, ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), γ GT (gamma-glutamyl-transferase) ALP (alkaline phosphatase) and glucose levels using standard kits marketed by BIOLABO SA, France.

Histopathological examination

For selective investigation, the *liver*, *kidney*, *brain* were quickly excised and fixed in 10% normal buffered formalin. The samples were afterward paraffin-embedded, sectioned and stained with haematoxylin and eosin for microscopic examination.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA) to compare the experimental groups followed by Duncan's post-hoc test to identify significantly different groups

(Statistica version 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Body weight

No deaths occurred in any group throughout the experiment. The body weight of the control and the TMX-treated rats during the experiment are summarized in Table 1.

Body weight of rats significantly decreases after TMX exposure for 6 weeks in a dose dependent manner. Comparison of the final body weight with the initial body weight revealed a significant difference and hence the increase of about 22 %, 18% and 15% was considerable in the control and TMX low and middle dose-groups respec-

tively compared with an increase of about 10% in the TMX high dose group.

Absolute and relative organ weights

The relative and absolute organ weights are shown in Table 2. The organs like adrenals, kidneys and thymus of rats did not illustrate any significant change in their weights at any doses as compared to controls. However, relative weight of liver and testicles were significantly reduced ($P < 0.05$) at 78 mg/kg/b.w.

Biochemical parameters

Plasma biochemical data after sub-chronic toxicity in rats, treated with three doses of thiamethoxam 26, 39, 78 mg/Kg/b.w at 2, 4 and 6 weeks, are presented on Table 3.

After six weeks of treatment, TMX at higher dose caused significant increase ($P < 0.05$) in plasma glucose, urea and crea-

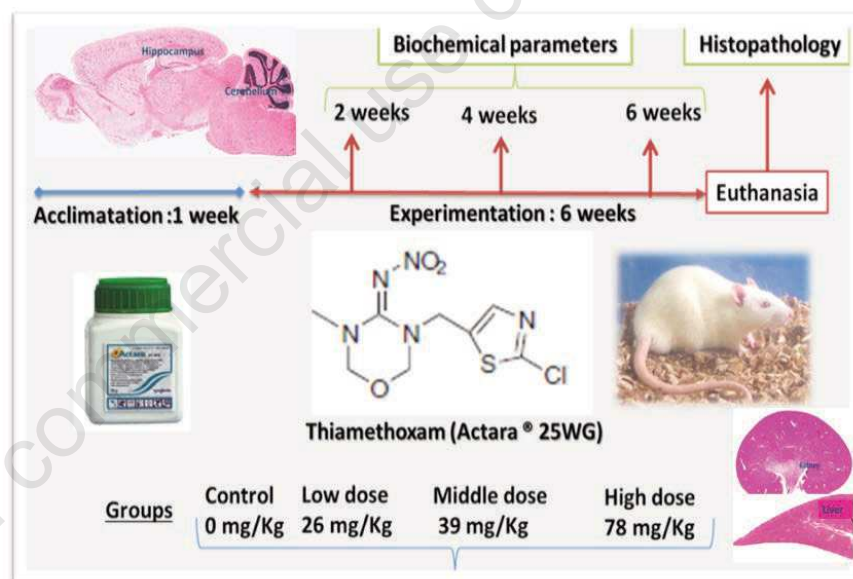


Figure 1. Experimental animals and research design.

Table 1. Body weight gain in rats after oral administration of thiamethoxam (26, 39 and 78 mg/Kg/b.w. of TMX) for 6 weeks.

Period	Dose (mg/kg/d)	Bodyweight (g)			
		Control	TMX Low 26 mg/kg	TMX Middle 39 mg/kg	TMX High 78 mg/kg
Acclimation	1 week	239.73±4.44	238.26±4.60	241.46±5.46	243.13±5.26
Experimentation (6 weeks)	1 week	246.00±2.53	244.13±5.74	248.06±7.50	252.73±6.87
	2 week	252.57±1.85	254.57±6.58	257.14±5.47	260.07±7.08
	3 week	256.42±1.98	252.92±6.68	257.21±7.54	259.78±7.58
	4 week	260.40±2.43	247.85±5.74*	257.45±6.87*	253.65±9.04*
	5 week	286.29±4.99	269.09±7.83*	274.50±9.28*	267.81±9.27*
	6 week	301.75±3.58	289.60±7.60	287.79±4.52*	279.30±8.45*

Values represent the mean±SE of 7 animals in each group. *Significant at the level of $P < 0.05$.

tinine levels as compared with control group. While, AST, ALT, PAL and γ -GT levels significantly increased ($P < 0.05$) in dose dependent manner.

Histopathological finding

The results of microscopic examination of the organs are summarized as follows. The liver, kidney, cerebellum and hippocampus of control rats appeared structurally and functionally normal without any visible lesion. However, pathological changes were observed in all cited organs of rats exposed to TMX at 26, 39 and 78 mg/kg/d in a dose dependent manner (Figures 2-5).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the liver

In the liver, TMX lower dose (26 mg/kg/d) treatment for 6 weeks resulted in congestion of vessels and mild periportal infiltration by inflammatory cells. While, hepatocytes of liver at middle and high doses 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively showed mild focal necrosis with swollen cellular nuclei and cytoplasmic lesions as compared to control (Figure 2).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the kidneys

There were no pathological changes in the kidney of rats exposed to TMX at 26 mg/Kg/b.w. as compared with control. However, administration of TMX at 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively caused renal necrosis, congestion of renal vessels and degeneration of the tubular cells (Figure 3).

Effect of thiamethoxam on histological structure of the cerebellum

The histological structure of the cerebellum in TMX exposed rats at low (Figure 4B) and middle (Figure 4C) doses showed congestion in cerebrum and degenerative changes in Purkinje cells as compared to control (Figure 4A). Whereas, repeated

exposure of thiamethoxam at higher (Figure 4D) dose for 6 weeks, produced necrosed Purkinje cells with loss of dendrites and granules in the granular layer of cerebellum.

Effect of thiamethoxam on histological structure of the hippocampus

Histological structure of the hippocampus of the control group show normal pyramidal and multilateral cells forming the

molecular layer (Figure 5A). In hippocampus of rats treated with TMX a decrease of degenerative changes can be observed (Figure 5B, 5C and 5D). It concerns all hippocampus zones of pyramidal cells as well as cells of granular and molecular layers. Degenerative changes in the structure of the hippocampus layers consist principally in various degree of cytoplasmic vacuolation, which result in foam structure.

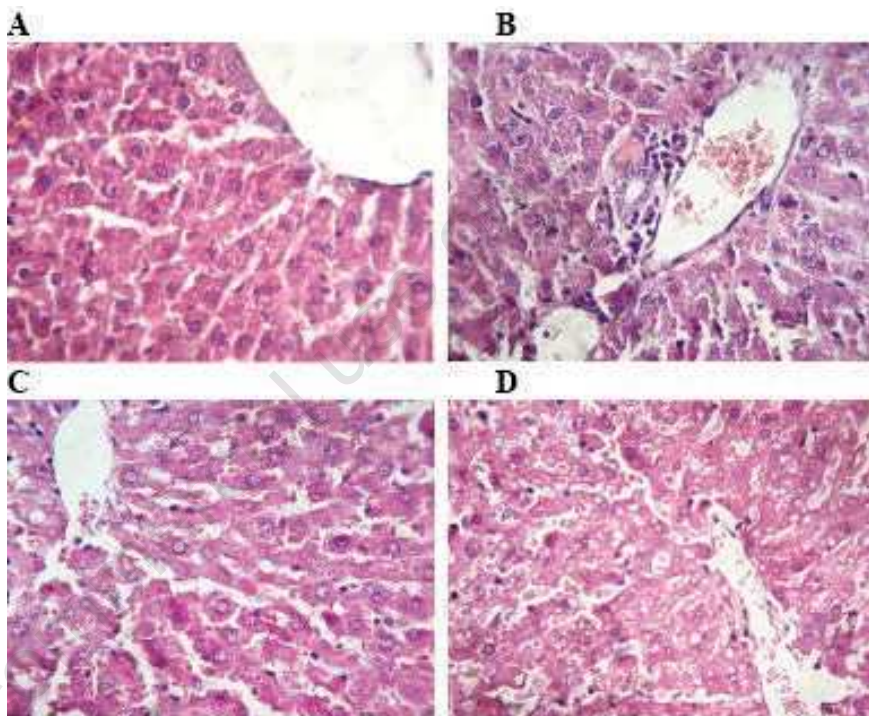


Figure 2. Photomicrograph of rat liver stained with hematoxylin and eosin: A) the histo-architecture of the liver is intact in control rats. B) Rats treated with TMX at 26 mg/Kg/b.w show few inflammatory cells infiltration and congestion. C and D) Rats treated with TMX 39 mg/Kg/b.w and 78 mg/Kg/b.w respectively shows disorganization of hepatic cords and degeneration of the hepatocytes with swollen cellular nuclei (A, B, C and D: H&E; Gr x400).

Table 2. Effects of thiamethoxam (TMX) on absolute and relative organ weights in the control and TMX-treated groups.

	Control		Thiamethoxam Organs weight (g)							
	A	R	Low		Mid		High			
	A	R	A	R	A	R	A	R		
Liver	12.32±0.48	4.54±0.18	14.28±0.32*	4.05±0.09	12.22±0.54	3.64±0.15	10.86±0.43*	3.62±0.16*		
Kidney (Right)	1.21±0.04	0.44±0.01	1.40±0.02	0.39±0.06	1.40±0.05	0.40±0.01	1.19 ± 0.06	1.39±0.02		
Kidney (Left)	1.15±0.03	0.42±0.01	1.45±0.03	0.41±0.01	1.40±0.03	0.42±0.01	1.23 ± 0.07	0.41 ± 0.02		
Adrenal (Right)	0.05±0.07	0.08±0.03	0.11±0.02	0.03±0.04	0.12±0.03	0.03±0.04	0.04 ± 0.07	0.04±0.01		
Adrenal (Left)	0.04±0.01	0.27±0.01	0.11±0.01	0.03±0.01	0.12±0.03	0.03±0.01	0.04 ± 0.03	0.03±0.01		
Testicle (Right)	1.45±0.15	0.53±0.06	1.74±0.03*	0.49±0.01	1.78±0.04*	0.53±0.01	1.23±0.11*	0.21±0.04*		
Testicle (Left)	1.47±0.14	0.54±0.05	1.70±0.04*	0.48±0.01	1.80±0.03*	0.53±0.01	1.38±0.17*	0.26±0.05*		
Thymus	0.45±0.02	0.17±0.01	0.50 ± 0.05	0.14±0.01	0.52±0.09	0.16±0.06	0.45±0.05	0.15±0.02		

A, absolute; R, relative; the relative organ weight is expressed as (organ weight (g)/body weight (g) x 100) of rat. Results are given as a mean±SD (n=7). *Statistically different from the control group ($P < 0.05$).

Discussion and Conclusions

There is epidemiological and experimental evidence that environmental factors, like pesticides, influence a diverse array of molecular mechanisms and consequently alter disease risk not only for metabolic syndrome and cardiovascular diseases, insulin resistance, diabetes mellitus and immune system diseases but also for psychiatric and neurobehavioral disorders.^{1,2,17}

In the present study, we examined the toxic effects of three doses of thiamethoxam 26, 39 and 78 mg/Kg/b.w. respectively for six weeks on hepatotoxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity by using biochemical and histological techniques in rat.

Exposure to TMX caused a significant decrease in the body weight gain. This result is in agreement with the findings of Arfat *et al.* (2014),¹⁸ who indicate that exposure to imidacloprid a neonicotinoide insecticide decreased body weight in male albino mice at 15 mg/kg/day together with significant toxicity symptoms.

The organ weights are important criteria for evaluation the toxicity of xenobiotics. Our results showed insignificant changes in the relative weights of kidney and thymus of rats. But, treatment with high dose TMX

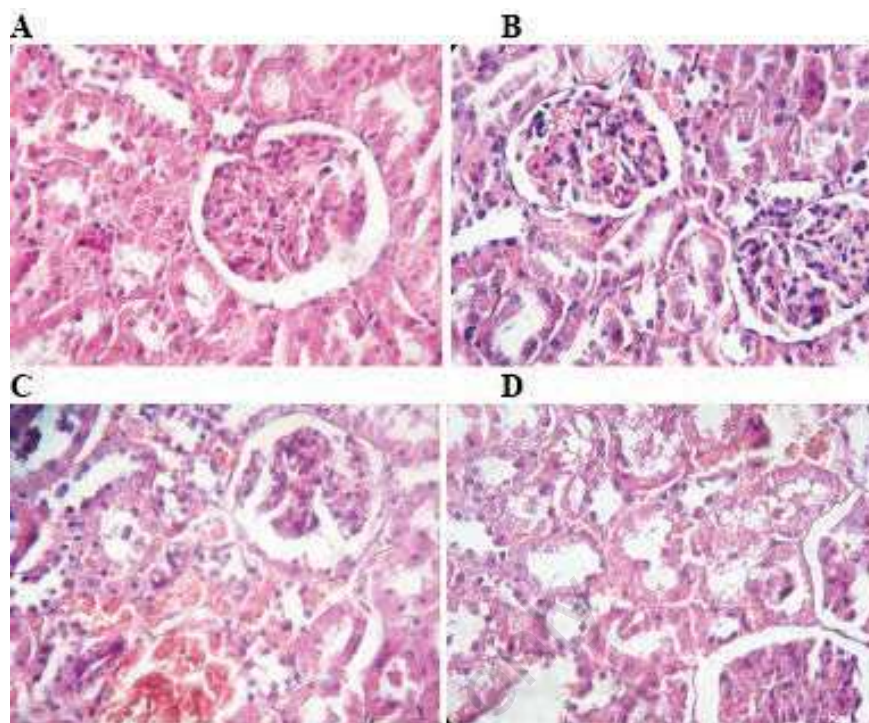


Figure 3. Photomicrograph of rat kidney stained with hematoxylin and eosin: The histological structure of the renal cortex is intact in control rats and TMX low dose (A and B). Rats treated with TMX at 39 mg/Kg/b.w and 78 mg/Kg/b.w respectively (C and D) shows mild congestion in the glomeruli, and vacuolar degeneration of tubular cells (A, B, C and D H&E; 400).

Table 3. Biochemical data of male rats orally administered thiamethoxam for 6 weeks.

Blood chemistry parameters	Period	Thiamethoxam/Doses			
		Control 0 mg/kg	TMX Low 26 mg/kg	TMX Middle 39 mg/kg	TMX High 78 mg/kg
Glucose (mg/dL)	2 Week	0.91±0.15	1.06±0.17	1.01±0.14	1.59±0.08*
	4 Week	1.20±0.03	1.48±0.14	1.43±0.09	1.51±0.11*
	6 Week	1.23±0.14	1.44±0.20	1.31±0.16	1.52±0.04*
Urea (mg/dL)	2 Week	0.60±0.02	0.58±0.03	0.53±0.04	0.52±0.02
	4 Week	0.62±0.02	0.56±0.05	0.53±0.03	0.51±0.03
	6 Week	0.63±0.00	0.59±0.05	0.52±0.03	0.30±0.05*
Creatinine (mg/dL)	2 Week	5.67±0.21	5.67±0.49	5.50±0.22	5.33±0.21
	4 Week	6.00±0.52	6.33±0.42	6.33±0.21	6.17±0.40
	6 Week	6.33±0.21	5.83±0.17	5.50±0.34*	4.83±0.60*
AST (U/L)	2 Week	85.28±1.53	85.17±2.73	106.5±7.71*	110.6±11.10*
	4 Week	88.17±2.26	88.95±5.65	99.96±8.64*	109.83±9.25*
	6 Week	83.67±1.65	93.67±8.94*	99.17±11.22*	118.50±6.03*
ALT (U/L)	2 Week	44.58±2.34	43.83±1.70	42.13±2.59	45.02±2.44
	4 Week	43.63±1.92	40.33±3.84	41.80±8.47	45.03±2.45
	6 Week	44.33±4.62	40.50±3.37	41.67±3.83	49.67±3.80*
ALP (U/I)	2 Week	139.0±3.79	140.83±10.87	145.5±13.6*	173.5±18.14*
	4 Week	135.0±4.99	140.67±10.41	174.2±9.36*	168.83±8.95*
	6 Week	142.0±2.63	163.8±11.0*	167.33±9.40*	169.00±11.24*
γ-Gt (U/I)	2 Week	7.33±0.95	8.84±1.87*	9.17±1.25*	13.50±3.06*
	4 Week	7.15±0.91	8.67±1.84*	11.67±1.45*	12.33±3.02*
	6 Week	7.67±1.69	8.00±1.18*	12.67±1.45*	17.59±3.45*

Results are given as a mean±SD (n=7). *Statistically different from the control group (P<0.05).

induced a significant reduction in relative liver and testes weights compared to respective control. Considering that thiamethoxam is metabolized to clothianidin in mammals, these findings agree with other several previous studies.^{19,20}

The liver and kidney play an important role in the detoxification and elimination of numerous xenobiotics and are prone to various disorders as a consequence of exposure to environmental pollutants. Conventional liver biochemical parameters provide information about the integrity of hepatocytes, such as serum transaminases ALT and AST, with ALT being considered as the gold standard clinical chemistry marker of liver injury. In addition, the integrity of the biliary system is commonly assessed by measuring gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase.²¹⁻²³

Our result shows that six weeks oral exposure of high dose of thiamethoxam to rat has produced significant toxic effects. The activities of AST, ALT, ALP, γ GT and glucose levels in the plasma of TMX exposed rats were significantly elevated, and the activity of creatinine and uric acid was significantly decreased, indicating that TMX disturbs the hepatic and renal functions. This effect was more pronounced in the TMX mild and high dose-groups. TMX provoke an increase in glucose levels those results are in agreement with the study of Khalil *et al.* (2017)²⁴ who show that imidacloprid perturbed the glucose regulation through hyperglycemic activity in both developing and adult rats.

The present study shows that subchronic oral administration of thiamethoxam lead to systemic biochemical but also histopathological damages of kidney, liver and brain. The renal tissue showed in TMX-treated groups glomerular and tubular lesions both in proximal and distal parts. Besides, the hepatic tissue showed mild focal necrosis with swollen cellular nuclei and cytoplasmic lesions in the TMX-treated groups. Consequently, thiamethoxam like imidacloprid disturb liver and kidney functions. Similar results have been found in animals exposed to neonicotinoid compound imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin who demonstrate oxidative stress and inflammation in organs like liver, kidney and brain in mice and rats.^{13,18,25,26}

The hippocampus is importantly and directly involved in the mediation of untrained anxiety reactions in animals.²¹ Numerous works show that Alzheimer's disease is a consequence of neuron loss, decrease of choline acetyltransferase (ChAT), sodium- dependent choline transporter, and AChE activities, and a decreased level of acetylcholine in the hippocampal

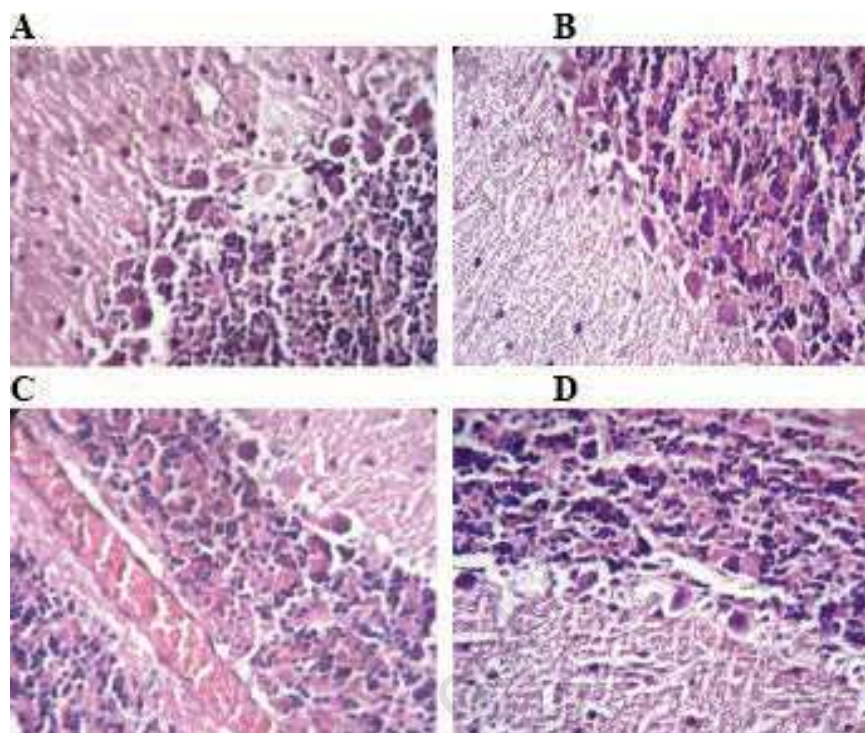


Figure 4. Histological architecture of the cerebellum in the control and TMX-treated groups. In control group (A) normal histological architecture of cerebellum shows intact Purkinje layer, molecular layer, granular layer and gray matter. Rats treated with TMX at 26 mg/Kg/b.w shows Purkinje layer with few necrotic Purkinje cells (B). Cerebellum of TMX-treated rats at 39 and 78 mg/Kg/b.w respectively (C and D) showing congestion severe vacuolation in the molecular layer with degeneration and detachment of pyramidal cell layer degeneration of Purkinje cell layer (A, B, C and D H&E; 400).

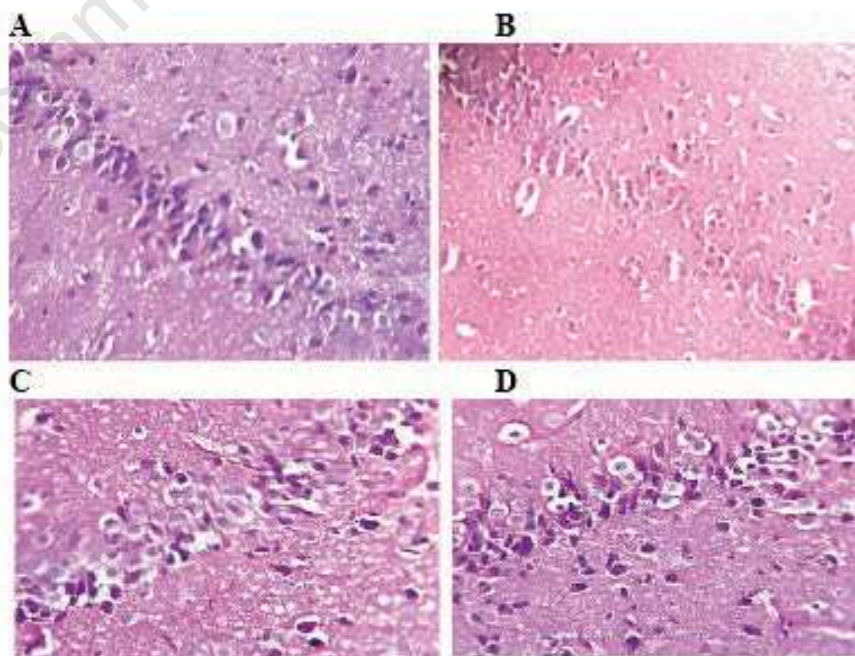


Figure 5. Histological architecture of the hippocampus in the control and TMX-treated groups (H&E; 400). In control group (A), normal histological architecture of hippocampus. Rats treated with TMX shows neurodegradation states of pyramidal neurons and granule cells and foam structure between neurons (B, C and D) (A, B, C and D H&E; 400).

and cortical regions of the brain.^{2,27,28} Potential concern that the neonicotinoid insecticides could affect the developing nervous system is associated with their nicotinic mode of insecticidal action and recognition of nicotine as a likely developmental neurotoxicant in humans and laboratory animals.⁵ Nicotine is believed to interfere with neuronal development, with adverse effects on various brain regions, including cortex, hippocampus, cerebellum, and/or the limbic system.²⁸

Rodrigues *et al.* (2010)⁹ indicate that mice 7 days exposure to high doses of thiamethoxam 100 mg/Kg/b.w. produces AChE inhibition in three cerebral regions, the hippocampus, striatum and cortex, that persists some days after exposure ceases and that it is accompanied by deficits in behavioral performance. According to the histopathological findings in this study, exposure to thiamethoxam led to destructive effects on the hippocampus and cerebellum of rat showing neuro-degradation states of pyramidal neurons and granule cells, foam structure between neurons of the hippocampus, degeneration and detachment of pyramidal cell layer and degeneration of Purkinje cell layer in the cerebellum of rats treated with TMX at middle and high doses.

Kimura-Kuroda *et al.* (2012)²⁹ show that acetamiprid and imidacloprid (two insecticides neonicotinoids), and nicotine exert similar excitatory effects on mammalian nAChRs at concentrations greater than 1 μ M. Therefore, the neonicotinoids may adversely affect human health, especially the developing brain. The present investigation is the first to assess the impact of the TMX on the brain hippocampus and cerebellum, kidney and liver of male rats, and thus, contributes to the existing literature on the potential correlation between neonicotinoids and neurodegenerative disease and neurotoxicity.

References

1. Parks CG, De Roos AJ. Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:527-36.
2. Yan D, Zhang Y, Liu L, Yana H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:322-22.
3. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Ann Rev Entomol* 2003;48:339-64.
4. Ensley SM. Chapter 48: Neonicotinoids. *Veterinary Toxicology* (Second Edition); 2012. pp 596-598.
5. Sheets LPAA, Lib DJ, Minnema RH, Colliard MR, Creeke RC, Peffer A. Critical review of neonicotinoids insecticides for developmental neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2016;46:153-90.
6. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:247-68.
7. David D, George IA, Peter JV. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clin Toxicol* 2007;45:485-6.
8. Hung YM, Meier KH. Acute Confidor® (imidacloprid-N-methyl pyrrolidone) insecticides intoxication with mimicking cholinergic syndrome. *Toxicol Ind Health* 2005;21:137-40.
9. Rodrigues KJ, Santana MB, Do Nascimento JL, Picanço-Diniz DL, Maués LA, Santos SN, et al. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:101-7.
10. Maienfisch P, Huerlimann H, Rindlisbacher A, Gsell L, Dettwiler H, Haettenschwiler J, et al. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manage Science* 2001;57:165-76.
11. Baines D, Wilton E, Pawluk A, Gorter Md, Chomistek N. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Sci Rep* 2017;7:109-79.
12. Tami L, Swenson J, Casida E. Neonicotinoid formaldehyde generators: possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicol Lett* 2013;216:139-45.
13. Ford KA, Casida JE. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res Toxicol* 2006;19:1549-56.
14. Green T, Toghill A, Lee R, Waechter F, Weber E, Peffer R, et al. Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol Sci* 2005;86:48-55.
15. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents. Guideline No. 408.; 2010.
16. Directive 2010/63/EU of The European Parliament And Of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union.
17. Dubovický M. Neurobehavioral manifestations of developmental impairment of the brain. *Interdisc Toxicol* 2010;3:59-67.
18. Arfat Y, Mahmood N, Tahir MU, Rashid M, Fan Zhao SA, Li D-J, et al. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicol Rep* 2014;1:554-61.
19. Hirano T, Yanai S, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Kubota N, et al. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J Vet Med Sci* 2015;77:1207-15.
20. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Baydaş G, et al. Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. *Drug Chem Toxicol* 2013;36:421-9.
21. Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol* 2007;18:365-74.
22. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomarker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008;245:194-205.
23. Hernández A, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Tsatsakis A, Tesifón Parrón MR, et al. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food Chem Toxicol* 2013;61:144-51.
24. Khalil SR, Hesham AA, AbdoNassan HM. Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;55:165-74.
25. Duzguner V, Erdogan S. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pestic Biochem Physiol* 2010;97:13-8.
26. Kapoor U, Srivastava MK, Bhardwaj S, Srivastava LP. Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats. *J Toxicol Sci* 2010;35:577-81.
27. Phua DH, Lin CC, Wu ML, Deng JF, Yang CC. Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clin Toxicol* 2009;47:4.
28. Dwyer JB, Mcquown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* 2009;122:125-39.
29. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal Rats. *PLoS One* 2012;7:e32432.

Abstract

Currently, the marketing of new antiparasitic drugs for veterinary use has enabled better therapeutic management of various parasitoses. However, their excessive use causes toxic effects on animal and human health. Ivermectin (IVM), an antiparasitic drug of high efficacy and very frequent use specifically in veterinary medicine. The present study aims firstly to assess the toxic effects of repeated administration of a high dose of IVM and secondly to determine a possible ameliorative effect of a co-administration of a powerful antioxidant, vitamin C (ascorbic acid) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) via biochemical and histopathological investigations. Twenty male rabbits were divided into four groups (n = 5) and treated for three consecutive weeks: control group; Group treated with IVM (2 mg / kg bw subcutaneously, 3 times per week); Group treated with IVM + vitamin C by gavage (20 mg / mL) and group treated with IVM + vitamin C supplemented with food (200 mg / kg of food). On the 14th and 21st day of the experiment, blood samples were collected for biochemical analysis and at the end of the experiment, the rabbits were euthanized and the liver, kidney, lung and brain organs were carefully weighed and fixed for histological study. Our results showed behavioral disorders, a decrease in body weight, food and water intake, variations in the absolute and relative weight of the organs studied in the IVM group compared to control and vitamin C co-treated groups. IVM induced a disruption of biochemical markers of hepatic and renal function and parameters of the lipid profile with a significant ($p < 0.05$) increase in the plasma level of glucose, ALT, AST, γ -GT, creatinine and HDL-C and a significant decrease of the level of TC, TG, LDL-C and VLDL-C in the IVM batch compared to the control group. Co-administration of vitamin C significantly improved these biochemical parameters. Histopathological examination of the liver, kidneys, brain and lungs shows tissue disruption in the IVM group. However, it was noted that the animals treated with IVM + vitamin C (by gavage or food) show less altered tissue architecture, which are similar to those in the control group. Following these results, the co-administration of vitamin C has proved to be an effective solution to attenuate the IVM induced toxic effects on the various biological systems of the rabbit. Hence, it is recommended to combine vitamin C by gavage with IVM treatment in animals to eliminate its harmful effects.

Keywords: Ivermectin, Vitamin C (ascorbic acid), Biochemical analysis, Histopathology, Rabbit.

ملخص

حاليًا، أتاح تسويق الأدوية الجديدة المضادة للطفيليات للاستخدام البيطري تحكم علاجي أفضل للطفيليات المختلفة. ومع ذلك، فإن استخدامها المفرط يسبب آثارًا سامة على صحة الحيوان والإنسان. الأيفرمكتين (Ivermectin)، دواء مضاد للطفيليات ذو فعالية عالية واستخدام كثيف للغاية خاصة في مجال الطب البيطري. تهدف الدراسة الحالية أولاً إلى تقييم الآثار السامة الناتجة عن تناول المكرر لجرعة عالية من الأيفرمكتين وثانيًا للتأكد من فعالية التناول المشترك لمضاد الأكسدة القوي، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك) لدى الأرانب (*Oryctolagus cuniculus*) عن طريق الدراسات البيوكيميائية والنسجية. تم تقسيم عشرين أرنبًا ذكرًا إلى أربع مجموعات (ن = 5) وعولجوا لمدة ثلاثة أسابيع متتالية: المجموعة الشاهدة؛ المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين (2 مغ / كغ من وزن الجسم تحت الجلد، 3 مرات في الأسبوع)؛ المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين + فيتامين ج بالتزقيم (20 مغ / مل) والمجموعة المعالجة بالأيفرميكتين + فيتامين ج المضاف إلى الطعام (200 مغ / كغ من الطعام). في اليومين الرابع عشر والحادي والعشرين من التجربة، تم جمع عينات الدم للتحليل الكيميائي الحيوي، وفي نهاية التجربة، تم ذبح الأرانب ووزن الكبد والكلى والرئة والدماغ بعناية وثبتتها للدراسة النسجية. أظهرت نتائجنا اضطرابات سلوكية، وانخفاض في وزن الجسم، وتناول الطعام والماء، واختلافات في الوزن المطلق والنسبي للأعضاء المدروسة لدى المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعتين المعالجتين بالأيفرميكتين مع الفيتامين ج. تسبب الأيفرميكتين في اختلال العلامات البيوكيميائية لوظائف الكبد والكلى ومعلّات توازن الدهون مع زيادة كبيرة ($p < 0.05$) في مستويات البلازما من الجلوكوز، ALAT، ASAT، γ -GT، الكرياتينين و HDL-C وانخفاض ملحوظ في مستوى كل من TC و TG و LDL-C و VLDL-C في المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى التناول المشترك لفيتامين ج إلى تحسن كبير في هذه المعلّات البيوكيميائية. أظهر الفحص التشريحي المرضي للكبد والكلى والدماغ والرتنتين اضطرابًا في الأنسجة في المجموعة المعالجة بالأيفرميكتين. ومع ذلك، لوحظ أن الحيوانات التي عولجت بالأيفرميكتين + فيتامين ج (بالتزقيم أو الطعام) تظهر بنية نسيجية أقل تغيرًا ومثابة للبنية الخاصة بالمجموعة الشاهدة. على ضوء هذه النتائج، أثبتت دراستنا أن الاستعمال المشترك لفيتامين ج يعتبر حل فعال للتخفيف من الآثار السامة التي يسببها الأيفرميكتين على الأنظمة البيولوجية المختلفة للأرانب. لذلك، يوصى بدمج الفيتامين ج عن طريق التزقيم لدى الحيوانات المعالجة بالأيفرميكتين للتخلص من آثاره الضارة.

الكلمات المفتاحية: أيفرميكتين، فيتامين ج (حمض الأسكوربيك)، التحليل البيوكيميائي، التشريح المرضي، الأرنب