



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

**Effet hépatique de lambda cyhalothrine et de la vitamine C chez la lapine
Étude histomorphométrique et immunohistochimique**

Présenté par :

Date de soutenance : le 14/07/2022

* Melle ALI-MIHOUB Bouchra.

* Melle KASSA Naouel.

Devant le jury :

- | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|
| • Mme Abdulhoussein A.S | MCA/USDB1 | Presidente. |
| • Mme Touaibia M. | MCA/USDB1 | Examinatrice. |
| • Mme khaldoun H. | MCA/USDB1 | Promotrice. |
| • Mme Mkhania | Residente /CHU | Co-promotrice. |

Promotion : 2021-2022



Remerciements

Au terme de ce travail, nous remercions notre Dieu ALLAH, le tout puissant pour toute la volonté , et le courage de nous avoir donné la force et la capacité d'avoir exécuté ce travail après maintes recherches approfondies que nous espérons convaincre tout lecteur de leur authenticité et leur vérité scientifique.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice **M^{me} Khaldoun Hassina** d'avoir nous encadré et pour *ses orientations, ses conseil* durant toute la période qu'elle nous consacre à la lecture des lames, pour sa compréhension et son travail rigoureux.

Nos remerciements les plus vifs vont également à notre Co-promotrice **M^{me} Mkhania** pour sa générosité, sa disponibilité tout au long du travail et son soutien précieux.

Nos sincères considérations et remerciements s'adressent à **M^{me} Abdulhussein A.S** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et à **M^{me}. Touaibia M** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci au **Pr Slimani. A** et à toutes l'équipes qui travaillent au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Béni Messous.

Nous tenons à témoigner notre respect au chef de service du laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Douera, **Pr Belarbi** ainsi que tous *les ingénieurs et les techniciens*.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous les personnes qui ont pris le temps de répondre à nos questions.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux enseignants de la faculté SNV de l'Université de Blida 1 et tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de ces années.

Merci à tous





Dédicaces

À l'Éternel, mon Dieu, le Tout-Puissant, pour m'avoir guidé dans le bon chemin et m'avoir accordé la force, la santé et la tranquillité d'esprit sans lesquelles je n'aurais pu achever ce travail.

La source de vie, d'amour et de sécurité ; à la lumière qui m'a guidé tout au long de ma vie et de mes études, à celle qui a toujours eu mon succès et mon bonheur comme objectif majeur, à toi ma très chère maman.

À mon père, l'épaule forte, l'œil vigilant et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect, je t'offre ce modeste travail en guise de reconnaissance pour tes sacrifices et l'affection dont tu m'as toujours entouré

À la mémoire de ma grande mère, paix à ton âme.

À mon cher frère mouloud, à qui je souhaite beaucoup de succès et une vie de joie et de bonne santé.

À l'ensemble de ma petite famille 'Samira, Nabila, Racha et farès' merci pour votre amour et vos prières, que Dieu vous protège.

À mon ange gardien, qui m'aime et que j'aime

À mon très cher binôme Naouel pour sa compréhension, son aide, et à qui sans elle ce travail n'aurait sans doute pas achevé.

À moi même

À Tous les étudiants de ma promotion Master 2 Biochimie 2020/2021

Je vous dis merci.



Bouchra



Je dédie ce travail

À mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À ma mère

Je n'oublie pas tes sacrifices l'amour que tu m'as donné, merci pour tes encouragements, ta patience avec moi, que Dieu te garde en bonne santé. À mon frère Toufik et mes chères sœurs Kahina et Samira que Dieu vous protège et vous offre une vie pleine de joie et de réussite.

À mes amies

«Amina , Hanane , Fatima , Fatima Zohra , Ikram , Kamilia , Zakia », merci pour les bons moments passés ensemble. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

En particulier À mon chère binôme Bouchra

Merci pour tous les souvenirs que nous avons partagés ensemble au cours de cette année merci pour ta gentillesse ta compréhension, et ta patience tout au long de ce travail.

À tous ceux qui m'aiment et que j'aime, à tous ceux qui ont confiance en moi et qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible

Merci infiniment.



Naouel

Résumé

L'usage multiple et incessant des pyréthrinoïdes devient une préoccupation mondiale croissante. La présente étude a pour but d'évaluer l'effet hépatotoxique de l'insecticide « lambda-cyhalothrine » chez la lapine de souche synthétique « *Oryctolagus cuniculus* » et ainsi l'effet amélioratif probable de la vitamine C, Administrés par gavage. Pour cela, 15 lapines ont été répartis en trois lots: témoin (T), traité par LCT, traité par LCT et supplémenté par la vitamine C, pendant 21 jours. Nous avons réalisés trois colorations topographiques : l'hématoxyline éosine, le trichrome de Masson et la réticuline, pour mettre en évidence l'effet histopathologique de la LCT sur le parenchyme hépatique .Nos résultats montre une désorganisation architectural, dilatation de la veine centro-lobulaire et une infiltration inflammatoire chez le lot traité par l'insecticide seul. Cependant, une atténuation et une régression des lésions engendrées par ce biopesticide chez les lapines supplémentées par la vitamine C. Ces résultats sont confirmés par ceux de l'étude morphométrique qui montre une augmentation de diamètre de la VCL et une diminution de la taille des noyaux et de cytoplasme suite à l'exposition à LCT comparativement au témoin. Concernant l'examen immunohistochimique de Ki67 et de AFP, l'observation microscopique révèle un signal positif très faible au niveau cytoplasmique et nucléaire chez les animaux témoins et un marquage faible au niveau membranaire des hépatocytes chez les traitées par LCT+VC. Alors qu'une expression cytoplasmique, membranaire, et voir même nucléaire de ces protéines a été constatée chez le lot traité uniquement par LCT. En conclusion, notre étude montre que l'exposition à lambda cyhalothrine provoque une hépatotoxicité et la supplémentation de la vitamine C permet de réduire les altérations histologiques sans conférer une protection complète du foie.

Mots clé : Lambda-cyhalothrine, Vitamines C, Foie, Morphométrie, Immunohistochimie (Ki67 , AFP), Lapines .

Abstract

The multiple and relentless use of pyrethroids is becoming a growing global concern. The purpose of this study is to evaluate the hepatotoxic effect of the insecticide « lambda cyhalothrin » in the synthetic strain rabbit « *Oryctolagus cuniculus* » and thus the probable ameliorative effect of vitamin C, administered by gavage. For this, 15 rabbits were divided into three batches: control (T), treated with LCT, treated with LCT and supplemented with vitamin C, for 21 days. We performed three topographic stains: hematoxylin eosin, Masson's trichrome and reticulin, to highlight the histopathological effect of LCT on hepatic parenchyma. Our results show an architectural disorganization, dilation of the centro-lobular vein and an inflammatory infiltration in the batch treated with insecticide only. However, an attenuation and regression of the lesions caused by this biopesticide in rabbits supplemented with vitamin C. These results are confirmed by those of the morphometric study which shows an increase in the diameter of the CLV and a decrease in the size of the nuclei and cytoplasm following exposure to LCT compared to the control. Regarding the immunohistochemical examination of Ki67 and AFP, microscopic observation revealed a very low positive signal at the cytoplasmic and nuclear levels in the control animals and a low labeling at the membrane level of the hepatocytes in those treated by LCT+VC. While a cytoplasmic, membrane, and even nuclear expression of these proteins was observed in the batch treated only with LCT. In conclusion, our study shows that exposure to lambda cyhalothrin causes hepatotoxicity and vitamin C supplementation reduces the histological alterations without conferring a complete protection of the liver.

Keywords: Lambda-cyhalothrine, Vitamins C, Liver, Morphometry, Immunohistochemistry (Ki67 , AFP), Rabbits .

ملخص

أصبح الاستخدام المتعدد والمتواصل للبيروثرويدات مصدر قلق عالمي متزايد. الغرض من هذه الدراسة هو تقييم التأثير السام لمبيد الحشرات « Lambda cyhalothrine » على كبد الأرناب من سلالة الاصطناعية «Oryctolagus cuniculus» بالإضافة الى التأثير المحسن المحتمل لفيتامين(C) وذلك بواسطة التغذية القسرية. لهذا، تم تقسيم 15 أرناباً إلى ثلاث مجموعات: الشاهد (T)، المعالج بـ (LCT)، والمعالج بـ (LCT + C) ، لمدة 21 يوماً. أجرينا ثلاث تلوينات طوبوغرافية: Hématoxyline éosine ، Trichrome de Masson ، Réticuline ، لتسليط الضوء على التأثير التشريحي المرضي لـ LCT على للنسيج الكبدي. تظهر نتائجنا خللاً في البنية الهيكلية، وتمددًا في الوريد المركزي وتسربات التهابية في المجموعة المعالجة بالمبيدات الحشرية فقط. في حين نلاحظ توهنا وتراجع للأضرار التي يسببها هذا المبيد الحيوي عند الأرناب المكملة بفيتامين(C). تم تأكيد هذه النتائج من خلال الدراسة المورفومترية التي تظهر زيادة في قطر VCL وانخفاض في حجم النواة والسيتوبلازم بعد التعرض لـ LCT مقارنة بمجموعة الشواهد. فيما يتعلق بالفحص الكيميائي المناعي لـ Ki67 و AFP، كشفت الملاحظة المجهرية عن إشارة إيجابية منخفضة جداً على المستويات السيتوبلازمية والنوية في الحيوانات الشاهدة وعلامة منخفضة على مستوى غشاء خلايا الكبد في تلك التي عولجت بواسطة LCT + VC. بينما لوحظ التعبير السيتوبلازمي والغشائي وحتى النووي لهذه البروتينات في المجموعة التي عولجت فقط باستخدام LCT. في الختام، تظهر دراستنا أن التعرض للامدا سيالوثرين يسبب تسمم الكبد وأن مكملات فيتامين(C) تقلل من التغيرات النسيجية دون منح حماية كاملة للكبد.

الكلمات المفتاحية:

لامدا سيالوثرين ، فيتامين (C)، الدراسة المورفومترية، الكبد، الفحص المناعي الكيميائي (AFP , Ki67) ، الأرناب.

Glossaire

Antioxydant : Substance capable de prévenir, réduire ou réparer des dégâts occasionnés par les radicaux libres. Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire. Il existe différents types d'antioxydants. Parmi eux, on trouve les vitamines E, C et A qui luttent contre une production exagérée de radicaux libres et s'opposent aux phénomènes toxiques. On trouve également les polyphénols

Détoxification : ou neutralisation des produits toxiques provenant de l'environnement dite exogène (xénobiotique) ou générés par notre organisme dite endogène (déchets cellulaires, produits de dégradation des protéines, hormones...).

Homéostasie : Processus de régulation par lequel l'organisme maintient l'équilibre des différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales face aux modifications du milieu extérieur.

Pro-oxydant : substance capable de déclencher un stress oxydatif par l'augmentation des radicaux libres, des molécules réactives connues pour endommager les cellules.

Scorbut : Maladie provoquée par une carence grave en vitamine C dans l'alimentation des individus et caractérisée par de l'anémie, de la fièvre, des hémorragies multiples, notamment au niveau des gencives, des troubles gastro-intestinaux, il est potentiellement mortel.

Stress oxydatif : est un déséquilibre entre la production des ERO « espèces réactives de l'oxygène » et des antioxydants, en faveur des premières.

Toxicité subaigüe : Est une toxicité réitérée pendant au maximum 28 jours. Elle correspond à des expositions fréquentes et répétées en une seule fois ou en plusieurs fois très rapprochées, d'une dose suffisamment importante sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent.

Xénobiotique : toute substance étrangère au corps, pouvant exercer une fonction destructrice (toxines), substitutive (vaccins, hormones) ou restauratrice (médicament) lorsqu'elle est administrée dans l'organisme.

Liste des abréviations

AA: Acide Ascorbique

AC: AntiCorps

AG: AntiGene

AFT : alpha-FetoProtiene

DAB: 3,3- DiAminoBenzidine

FAO: Food and Agriculture Organisation

Gr: Grossissement.

HE: Hématoxyline-Eosine.

HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval

H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène

IHC : ImmunoHistoChimie

Kd : Constante de Dissociation.

LCT : Lambda Cyhalorhrine

OMS : Organisation Mondial de la Santé

TBS: Tris-Buffered Saline

TRP: TRyPtophane

TRS : Target Retrieval Solution

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	A :Position du foie chez la lapine, B : Distribution des lobes du foie. LLL-Lobe Latéral Gauche ; LML-Lobe Médian Gauche ; RL-Lobe Droit ; CP-Processus Caudé ; PP : Processus Papillaire; QL : Lobe Carré ; GB-Vésicule Biliaire ; RK-Rein Droit	4
2	Organisation structurale et histologique du foie	5
3	Population cellulaire hépatique	6
4	Exemple de cibles des pesticides conduisant à des perturbations métaboliques au niveau de l'organisme.	15
5	Structure des pyréthrinoides	17
6	Structure chimique de six constituants des extraits de pyrèthre	17
7	Mode d'action des pyréthrinoides sur les neurones et la transmission de potentiels d'action.	19
8	Structure moléculaire de l'acide L-ascorbique	23
9	Aspect plurilobé du foie de lapine et pesé	30
10	Fixation des fragments	31
11	Automate d'inclusion	33
12	Microtomie identification des lames	33
13	Schéma présentant le principe de la technique d'immunohistochimie	37
14	Exemple d'une fenêtre du logiciel ImageView	40
15	Variation de la taille des noyaux chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C.	56
16	Variation de la taille de cytoplasme chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C	57
17	Variation de rapport nucléo-cytoplasmique chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C	58
18	Variation de l'épaisseur de la VCL chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C	59
19	Variation de diamètre de la VCL chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C	60
20	Variation de l'espace entre la VCL et la triade chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C	61

Liste des Planches

N°	Titre	Page
1	Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration H&E, (A) au faible Gr x10 et (B) au fort Gr x 40.	42
2	Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration de trichrome de Masson. (A) au faible Gr x10 et (B) au fort Gr x 40.	43
3	Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration Réticuline (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	44
4	Histologie du parenchyme hépatique des lapines traitées par LCT Coloration H&E (A) : Gr x 10 ; (B) : Gr x 40.	45
5	Histologie du parenchyme hépatique de lapines traitées par LCT, Coloration de trichrome de Masson, (A) Gr x10 et (B) Gr x 40.	46
6	Histologie du parenchyme hépatique des lapines traitées par LCT, mettant en évidence une dilatation de la VCL avec dépôt important de fibre de réticuline Coloration Réticuline, (A) Gr x10 et (B) Gr x 40.	47
7	Histologie du parenchyme hépatique des lapines traitées par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration H&E. (A) Gr x 10 et (B) Gr x 40.	48
8	Histologie du parenchyme hépatique des lapines traitées par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration de trichrome de Masson. (A) Gr x10 et (B) Gr x 40.	49
9	Histologie du parenchyme hépatique des lapines traitées par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration Réticuline. (A) Gr x10 et (B) Gr x 40.	50
10	Expression immunohistochimique de Ki67 dans le parenchyme hépatique chez le témoin (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	65
11	Expression immunohistochimique de Ki67 dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	66
12	Expression immunohistochimique de Ki67 dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.	67
13	Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez le témoin. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	70
14	Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchymehépatique chez des lapines traités par LCT. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	71
15	Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.	72

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Fonctions métaboliques du foie	7
II	Autres fonctions du foie	8
III	Croisements entre la classification chimique et la classification biologiques des pesticides	14
IV	Classification des pyréthrinoides en type I et type II	18
V	Propriétés physico-chimiques de lambda-cyhalothrine	20
VI	Moyenne des mesures de différents paramètres morphométriques des lobules hépatiques (M+SEM)	55

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
1.Foie.....	3
1.1.Généralités.....	3
1.2.Anatomie.....	3
1.3.Structure microscopique.....	4
1.4.Physiologie et fonctions hépatocellulaires.....	7
1.5.Hépatotoxicité.....	8
1.6 Marqueur moléculaire cible.....	9
1.6.1 Marqueur de prolifération Ki67.....	9
1.6.2 Marqueur de régénération AFP.....	10
2.Pesticides &Insecticides.....	11
2.1.Pesticide.....	11
2.1.1.Définition.....	11
2.1.2.Principes de bases concernant les formulations.....	11
2.1.3.Modes d'expositions aux pesticides.....	12
2.1.4.Classification des pesticides.....	12
2.1.5.Toxicité des pesticides.....	14
2.2.Insecticides.....	16
2.2.1.Définition.....	16
2.2.2.Pyréthroïdes de Synthèse.....	16
2.3.Lambda-cyhalothrine : un exemple d'étude.....	19
2.3.1.Définition.....	19
2.3.2 Caractéristiques physico-chimiques.....	20
2.3.3.Mode d'action.....	20
2.3.4.Métabolisme de lambda-cyhalothrine.....	21
2.3.5.Toxicité de la lambda-cyhalothrine.....	21
3.Vitamines C.....	22
3.1. Rappels généraux sur les vitamines.....	22
3.2.Définition.....	22
3.3.Structure biochimique.....	22
3.4.Propriétés physicochimiques.....	23
3.5.Sources de la vitamine C.....	23
3.6.Besoin et Biosynthèse de la vitamine C.....	24
3.7.Pharmacocinétique de la vitamine C.....	24
3.8.Rôles physiologiques de la vitamine C.....	25
3.9.Carence en vitamine C.....	27
3.10.Toxicité de la vitamine C.....	27

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

1. Matériel.....	29
1.1. Matériel biologique.....	29
1.2. Matériel non biologique.....	29
2. Méthodes.....	30
2.1.Sacrifice des animaux et prélèvement des organes.....	30
2.2.Etude histologique.....	30
2.2.1.Etude macroscopique.....	30
2.2.2.Fixation.....	30
2.2.3.Circulation.....	31
2.2.4.Inclusion.....	32
2.2.5.Microtomie.....	33
2.2.6.Etalement Collage et Séchage des rubans de coupes.....	33
2.2.7.Coloration.....	34
a)Hématoxyline Eosine (HE).....	34
b) Trichrome de Masson.....	35
c) Réticuline.....	35
2.2.8.Montage et observation microscopique.....	36
2.3.Étude d'immunohistochimie(IHC).....	36
2.4.Étude morphométrique.....	39
2.5.Etude statistique.....	40

CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSION

1. Résultat et Discussion.....	41
1.1. Etude histopathologiques.....	41
a) Coloration par l'hématoxyline Eosine.....	51
b) Coloration par trichrome de Masson.....	54
c) Coloration par la réticuline.....	54
1.2. Etude histomorphométrique.....	55
a) Taille des noyaux.....	56
b) Taille du cytoplasme.....	57
c) Taille nucléo - cytoplasmique.....	58
d) Épaisseur de la membrane de la veine centro-lobulaire.....	59
e) Diamètre de la veine centro-lobulaire.....	60
f) Distance entre la veine centro-lobulaire et les triades.....	61
1.3. Etude immunohistochimique.....	63
1.3.1.L'expression de Ki67dans le parenchyme hépatique.....	63
1.3.2. L'expression de APT dans le parenchyme hépatique.....	68

CONCLUSION.....	73
------------------------	-----------

REFERENCE BIBIOGRAPHIQUES.....	74
---------------------------------------	-----------

ANNEXE

INTRODUCTION

Introduction

La population humaine est constamment exposée à une variété des contaminants ; parmi lesquels figurent les pesticides. Ces derniers sont devenus la pierre angulaire des systèmes agricoles mondiaux, permettant une amélioration substantielle des rendements des cultures (Kim et al., 2016 ; Carvalho, 2017). Toutefois, selon la dose d'exposition, ces substances peuvent également induire un large spectre d'effets toxicologiques présentant ainsi un danger sérieux pour la santé, soit par exposition directe ou bien indirecte par des aliments ou de l'eau contaminés par les produits chimiques (Hussein et al., 2012 ; Benedetti et al., 2017).

Lambda cyhalothrine «KARATE[®]» est un insecticide appartenant à la famille des pyréthrinoïdes de synthèse de type II utilisé comme alternative des organophosphorés, organochlorés et des carbamates en raison de leur faible toxicité pour les mammifères, de leur potentiel toxique élevé pour le contrôle des insectes nuisibles en agissant sur leur système nerveux (Ravula et Yenugu, 2021 ; Zhou et al., 2020).

Cependant, plusieurs études ont montré leur implication dans l'induction du stress oxydant qui se traduit par des dommages oxydatifs contribuant à l'apparition des dégâts cellulaires souvent irréversibles capables de développer divers pathologies, y compris certains cancers, troubles neurologiques, respiratoires, et reproductifs (Fetoui et al., 2009 ; Khaldoun, 2014 ; Chakroborty et al., 2019 ; Rani et al., 2021).

Le foie est l'organe clé de détoxification (métabolisation, élimination) qui permet à l'organisme vivant de bio-transformer activement de nombreux xénobiotiques (Rouas, 2010 ; Armstrong et Guo, 2019). Bien que de nombreux agents piègeurs et antagonistes aient été établis pour atténuer la toxicité induite par les pesticides, certains d'entre eux présentent des effets secondaires indésirables. De nos jours, la vitamine C est le fameux antioxydant biologique largement utilisé comme atténuant des effets délétères exercés par ces derniers (Khalil et al., 2020 ; Doseděl et al., 2021).

À ce titre, Le présent projet de fin d'études consiste à mettre en lumière l'effet toxique de « lambda-cyhalotrine » sur le parenchyme hépatique des lapines suite à une toxicité subaiguë ainsi d'évaluer l'effet protecteur probable de supplémentation de la vitamine C.

INTRODUCTION

Ce travail est réparti en trois chapitres :

- Le premier chapitre s'intéresse aux données bibliographiques recueillis à savoir l'anatomie, l'histologie et les fonctions physiologiques de foie, ainsi que les deux marqueurs moléculaires cibles Ki67 et AFP ; se poursuit par des généralités sur les pesticides, leur classification, et leur impact sur la santé humaine, en précisant notre insecticide « lambda-cyhalothrin », et se termine par un rappel sur la vitamine C.
- Le deuxième chapitre expérimental est réservé à l'ensemble du matériel et méthodes utilisées.
- Enfin, le dernier chapitre traite les résultats obtenus et leurs discussions suivies par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I

Données bibliographiques

1. Foie

1.1. Généralités

Le foie est un organe appartient au système digestif assure plusieurs fonctions vitales et possède également d'importantes capacités de régénération : il joue un rôle dans la purification, la synthèse, le stockage et l'hémostase (**Wang et al., 2017 ; Trefts et al., 2017 ; Khither, 2019**).

Ceci est dû à sa fonction amphicrine étant donné qu'il représente la glande mixte la plus volumineuse de l'organisme, d'une part exocrine responsable de la production et la sécrétion de la bile, et d'autre part endocrine à la faveur de sa situation sur le courant sanguin et à la disposition particulière de sa vascularisation (**Radu-Ionita et al., 2020**).

1.2. Anatomie

Le foie de lapin est un organe thoraco-abdominal (**Figure 1**) situé dans la région épigastrique, en dessous de la coupole diaphragmatique, entre les deux arcs costaux, atteignant le niveau de la 7^{ème} côte droite et la 9^{ème} côte gauche (**Stamatova-Yovcheva et al., 2012 ; Netter et Scott, 2019**).

Il est anatomiquement impair et asymétrique, pèse en moyenne environ 2% du poids corporel, présente un aspect lisse, souple, richement vascularisé, de couleur rouge brunâtre et consistance ferme élastique, cependant il reste friable, fragile et se laisse déprimer par les organes voisins (**Deren, 2012 ; Berrabah, 2013**). Il est entouré par une capsule fibreuse conjonctive (la capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer cinq lobes qui ne correspondent en rien à une séparation fonctionnelle de la glande (**Zarei et al., 2019 ; Lowe et al., 2018**).

Le lobe hépatique droit non subdivisé, ovalaire, occupe presque la moitié de la face diaphragmatique parallèles au lobe hépatique gauche subdivisé (dont le lobe gauche médial recouvre le lobe gauche latéral sur la surface diaphragmatique) ; on distingue encore deux autres lobes plus petits : Lobe carré étroit moins visualisé et marqué par sa localisation dans la fosse de la vésicule biliaire ; lobe caudé constitué de deux processus, un processus papillaire (arrondi) et un processus caudé très développé qui montre une empreinte rénale évidente (**Yovcheva et al., 2013 ; Lardot, 2018 ; Stan, 2018**).

Notant que entre ces deux petits lobes se trouve le sillon transverse ou hile de foie. Et à son niveau les vaisseaux sanguins afférents, représentés par la veine porte et l'artère hépatique,

pénètrent dans le foie pendant que les deux branche droite et gauche du canal hépatique, en provenance des deux lobe le quittent (Netter et Scott, 2019).

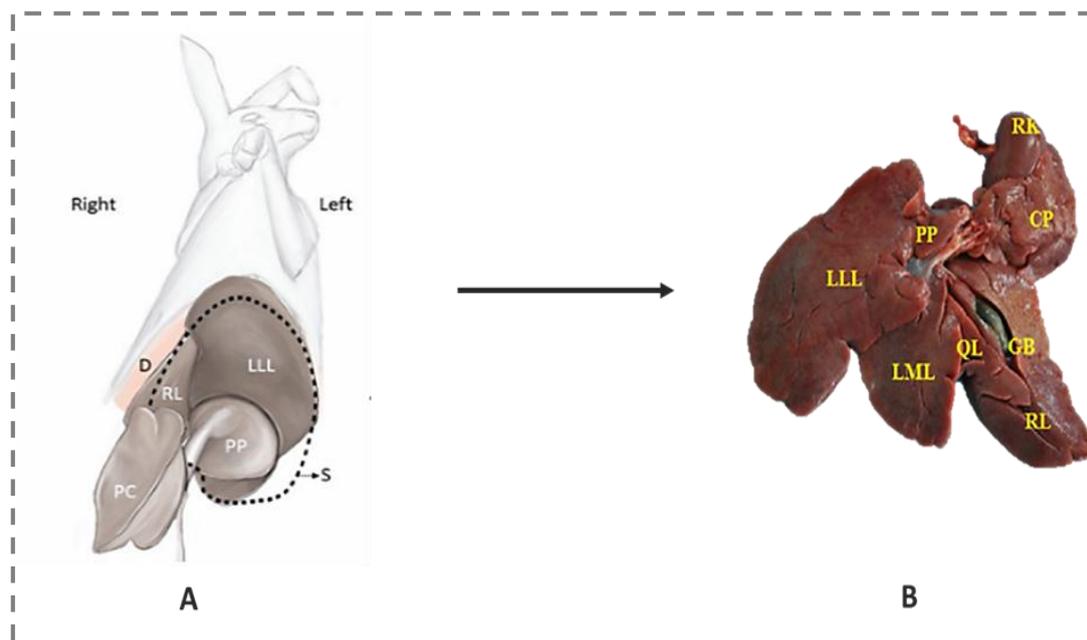


Figure 1 : **A** : position du foie chez la lapine, **B** : distribution des lobes du foie. LLL-lobe latéral gauche ; LML-lobe médian gauche ; RL-lobe droit ; CP-processus caudé ; PP : Processus papillaire; QL : lobe carré ; GB-vésicule biliaire ; RK-rein droit (Stan, 2018; Kilimci, 2020)

1.3. Structure microscopique

Le parenchyme hépatique se compose d'un grand nombre d'unités fonctionnelles appelées lobules. Ces derniers ont une forme hexagonale, irrégulière et sont séparés entre eux par de fins septa de tissu collagénique de soutien (Figure 2).

1.3.1. Lobule hépatique

Le lobule hépatique est centré par une veine centrolobulaire et limitée en périphérie par des espaces portes (de Kierman) de forme triangulaire constitués d'une branche de l'artère hépatique, d'une de la veine porte et d'un canal biliaire ; des vaisseaux lymphatiques sont également présents dans les espaces portes, mais on les identifie souvent moins facilement car leurs parois très fines sont souvent collabées (Lüllmann *et al.*, 1998 ; Wallace et Meyer, 2010).

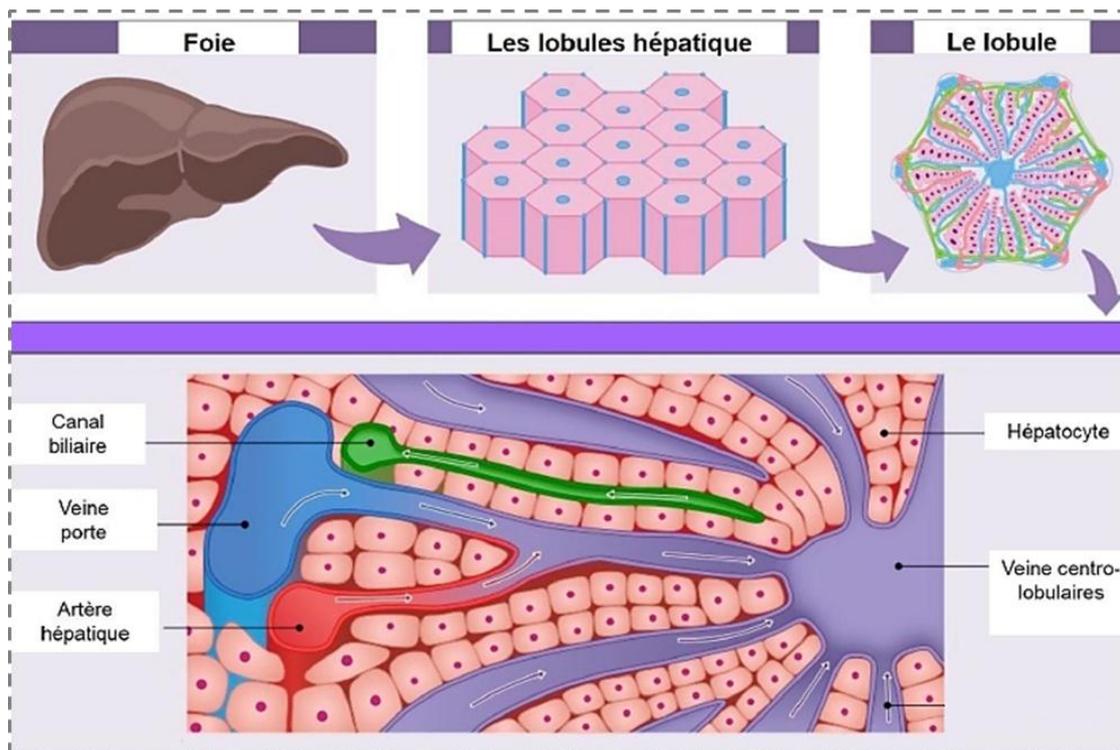


Figure 2 : Organisation structurale et histologique du foie (Lowe *et al.*, 2018)

1.3.2. Cellules du foie

Par ailleurs, de la périphérie du lobule hépatique au centre, on trouve des travées dénommées travées de Remak, qui ont une disposition radiaire et sont essentiellement constituées d'hépatocytes qui représente 80 % des cellules (**Figure 3**), le reste sont des lymphocytes hépatocytaires, cellules biliaires et endothéliales, cellules de Küppfer et des cellules Ito. Entre les travées cheminent des capillaires sinusoides (Young *et al.*, 2008).

a) Cellules parenchymateuses : hépatocytes

Les hépatocytes représentent le centre fonctionnel du foie, ce sont de grandes cellules épithéliales polyédriques (ou polygonales) d'un diamètre compris entre 30 et 40 μ m avec de gros noyaux ronds (mono/ binucléés) au nucléole bien visible. La taille des noyaux peut changer de façon importante en fonction de l'état de la cellule (Meeks *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2000 ; Sayah *et al.*, 2017 ; Febvre-James, 2019).

En outre, leur cytoplasme est très abondant, granulaire et très riche en organites cytoplasmiques ce qui reflète une importante activité métabolique (de synthèse et de sécrétion), il a également un aspect variable qui dépend de l'état nutritionnel de l'individu (Savary, 2014 ; Ploton, 2018).

b) Cellules non parenchymateuses

✓ Cellules endothéliales

Ce sont des cellules fenêtrées limitent la sinusoïde, différentes de celles des autres endothéliums vasculaires par l'absence de la membrane basale ; elles empêchent le sang de s'immiscer dans l'espace de Disse tout en autorisant les échanges entre le plasma et les hépatocytes par son système de pores (**Wheater et al., 2001 ; Benhamou et Erlinger, 2008 ; Catala et al., 2008**).

✓ Cellules de Kupffer

Ce sont des macrophages tissulaires à noyau fusiforme situées à la surface liminale des cellules endothéliales, qui jouent un rôle majeur dans le maintien du système immunitaire vu qu'elles sont impliquées dans la phagocytose des hématies âgées ou anormales et des particules étrangères nocives (**Thomson et Shaffer, 2005 ; Ju et al., 2016**).

✓ Cellules d'Ito (lipocytes)

Des cellules étoilées localisées dans l'espace péri sinusoidal de Disse, entre les hépatocytes et les cellules endothéliales. Riches en graisses, elles jouent un rôle dans le métabolisme et l'emmagasinage de la vitamine A et la synthèse de molécules de la matrice extracellulaire (ex. : collagène) (**Thomson et Shaffer, 2005**).

✓ Cellules des canaux biliaires (cholangiocytes)

Egalement appelés cellules intra hépatiques des voies biliaires, sont des cellules épithéliales responsables d'importantes modifications de la bile sécrétée par les hépatocytes, Ils représentent environ 5% de la population de cellules hépatiques (**Lecluyse et al., 2012 ; Trefts et al., 2017**).

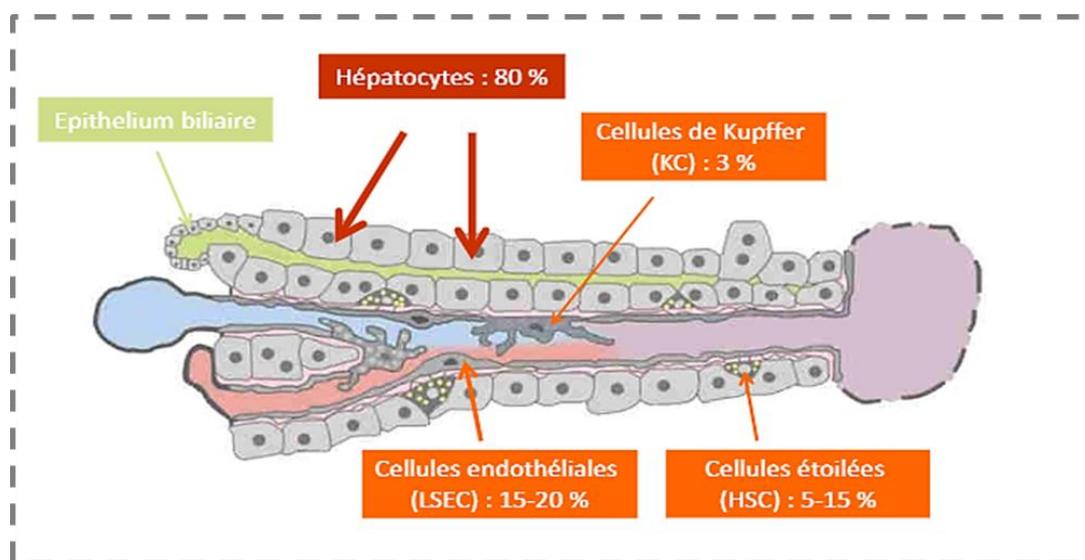


Figure 3 : Population cellulaire hépatique (Laurence, 2017)

1.4. Physiologie et fonctions hépatocellulaires

Le foie est un organe central qui assure des fonctions essentielles à l'homéostasie de l'organisme (Marchall et al., 2005).

1.4.1. Fonction métabolique

Les fonctions métaboliques de foie sont récapitulées dans le tableau au sous-dessus :

Tableau I : Fonctions métaboliques du foie (synthèse d'après : Thomson et Shaffer, 2005 ; Young et al., 2008 ; De Bari et al., 2010).

Fonction métabolique			
Métabolisme glucidique	Métabolisme lipidique	Métabolisme protidique	Métabolisme hormonal
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Régulation de la glycémie ➤ glycogénèse ↘ ➤ glycogénolyse ↗ ➤ néoglucogénèse ↗ 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Synthèse des AG, TG et lipoprotéines plasmatique ➤ Synthèses du cholestérol et de phospholipides. ➤ Cétogénèse ➤ Synthèse des acides biliaires ➤ Oxydation des triglycérides pour produire de l'énergie. ➤ hydroxylation de la vitamine D 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Synthèse de protéines plasmatiques <ul style="list-style-type: none"> ▪ l'albumine, ▪ la majorité des globulines (autres que les gammaglobulines) ▪ les facteurs de coagulations. ➤ Synthèse des acides aminés non essentiels. ➤ le siège du catabolisme des acides aminés en urée. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Métabolisme et excrétion des hormones stéroïdiennes ➤ Métabolisme des hormones polypeptidiques ➤ l'inactivation ou de la modification de plusieurs hormones endogènes

1.4.2. Fonction biliaire

Les cellules du foie secrètent la bile de façon continue qui est stockée dans la vésicule biliaire, suite à la stimulation par l'acidité gastrique, la bile est déversée dans l'intestin au niveau du duodénum (Belga, 2022). Après avoir joué leurs rôles, les acides biliaires sont métabolisés et réabsorbés par la muqueuse intestinale à 97% (Bonnet et Stéphane, 2018). Les métabolites des acides biliaires rejoignent le foie par la circulation hépatique où ils sont recyclés en acides biliaires par les hépatocytes. C'est « le cycle entéro-hépatique » (Bessaguet et Desmoulière, 2021).

1.4.3. Détoxification

Le foie est l'organe central de la détoxification des substances toxiques exogènes et endogènes, dont le but est de rendre ces dernières plus hydrophiles pour faciliter leur élimination (Le Daré et *al.*, 2021).

1.4.4. Fonction d'épuration et d'élimination

Élimination rénale : Les produits de dégradation du métabolisme facilement hydrosolubles seront rejetés par les hépatocytes dans les capillaires sinusoides. De là, ils parviennent par la circulation générale au niveau des reins et quittent l'organisme via les urines (Maitre et Blicklé, 2008 ; Bessaguet et Desmoulière, 2021).

Élimination biliaire : Les produits de dégradation peu solubles dans le sang, seront rejetés dans les canalicules biliaires par la face des hépatocytes opposée aux capillaires sinusoides ; et grâce à l'action émulsifiante des acides biliaires, ils peuvent être mis en solution dans la bile et parvenir dans l'intestin avec cette dernière. Ils seront alors éliminés dans les selles (Baudin, 2017 ; Bessaguet et Desmoulière, 2021).

1.4.5. Autre fonctions

Tableau II : Autres fonctions du foie (Doherty, 2016 ; Radu-Ionita et *al.*, 2020)

<i>Rôle immunitaire primordial</i>	<i>Métabolisme des micronutriments</i>	<i>Stockage</i>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ L'un des 3 filtres antimicrobiens à l'intérieur du corps humain. ➤ Régulateur de l'inflammation. ➤ Fonction de défense avec les cellules de Kupffer. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Certaines vitamines, comme la vitamine D ou la vitamine A, ont besoin d'être métabolisées en forme active par le foie. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réserve des vitamines liposolubles (Vitamine A Vitamine B 12...) conférant leur biodisponibilité. ➤ Lieu de captation et de stockage du fer et du cuivre. ➤ De glycogène.

1.5. Hépatotoxicité

Le foie assure une grande partie du métabolisme des xénobiotiques, ces substances étrangères apportées par l'alimentation ou l'environnement ; grâce à son équipement enzymatique, sa localisation anatomique et sa vascularisation abondante. Ses particularités en

font pourtant une cible privilégiée pour des composés ou des métabolites toxiques (**Louvet et Mathurin, 2015 ; Le Daré et al., 2021**).

L'ensemble des atteintes toxiques généralement figurés au niveau hépatique sont regroupées sous le mot « Hépatotoxicité » ; Ces dernières dépend fréquemment de la nature du toxique, la sévérité de l'intoxication, et ainsi du type d'exposition (aiguë ou chronique) : Stéatose, les Hépatites aigus (Nécrose, Fibrose, Cytolyse, Choléstase), les Hépatites chroniques (Cirrhose), ainsi que les dommages vasculaires, biliaires et tumorales (**Assis et Navarro, 2009**).

1.6. Marqueurs moléculaires cibles

1.6.1. Marqueur de prolifération / Ki67

Le Ki67 a été découvert pour la première fois au début des années 1980 par Gerdes, Au cours de travaux visant à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant les antigènes nucléaires spécifiques des cellules de lymphome hodgkinien (**Kim et al., 2019**).

La protéine fut ainsi définie originellement par l'anticorps monoclonal prototype Ki-67 ainsi obtenu, dont le nom provient de l'association de "Ki", en référence à l'université de Kiel ; et du nombre "67", correspondant au numéro du clone (67) de l'anticorps capable de la détecter. Comme l'antigène ne fut pas initialement caractérisé, le nom Ki-67 fut donné pour désigner également la protéine reconnu par cet anticorps (**Jose et al., 2021**).

Ki-67 est une protéine nucléaire non-histone de 395 kDa, codés par près de 30 000 paires de bases dans le génome humain. Elle est exprimée de manière constitutive dans les cellules de mammifères uniquement pendant les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), mais pas pendant les phases de repos (G0 et G1 en phase précoce). cela rend le Ki67 apparaissent comme un marqueur de prolifération efficace pour évaluer le taux de croissance des cellules tumorales (**Kim et al., 2019 ; Nanis et al., 2019**).

L'expression de Ki67 est classiquement détectée par immunohistochimie (IHC) afin d'évaluer la prolifération cellulaire dans les tissus. Cette expression varie considérablement pendant la progression du cycle cellulaire atteignant son niveau maximal pendant la mitose. d'où le prototype d'anticorps Ki67 réagi qu'avec des tissus frais instantanément congelés mais un autre anticorps monoclonal MIB-1 a été capable de détecter l'antigène Ki67 dans les tissus incluses à la paraffine (**De Jong et al., 1998 ; Dzulkipli et al., 2021**).

Malgré le rôle de Ki67 dans la division cellulaire et dans la synthèse de l'ARN ribosomal est clairement établi, sa fonction ne soit pas complètement élucidée en raison de sa nature complexe, sa sensibilité extrême à la dégradation des protéases et sa courte demi-vie, qui entravent toutes les analyses moléculaires (**Cidado et al., 2016 ; Mrouj, 2018 ; Sun et Kaufman, 2018**).

1.6.2. Marqueur de régénération / Alpha-FoetoProtéine (AFP)

L'alpha-foetoprotéine est une glycoprotéine fœtale immunorégulatrice de 70 kD, semblable à l'albumine ; synthétisée dans les cellules non différenciées du foie, dans le sac vitellin ainsi que dans le tractus gastro-intestinal du fœtus au cours du premier trimestre de la grossesse (**Galle et al., 2019 ; Hu et al., 2022**).

En physiologie normale, l'AFP diminue rapidement après la naissance et reste à de faibles niveaux pendant toute la durée de vie, étant donné que le gène *AFP* est réprimé lors de la différenciation terminale des hépatocytes pour être toutefois réactivé de manière aberrante chez l'adulte conséquemment au divers trouble et dysfonctionnements hépatiques tels que la cirrhose, la dégénérescence hépatocyttaire, les infections virales et certains cancers (**Sell, 1980 ; El Issaoui, 2022 ; Hu et al., 2022 ; Munson et al., 2022**).

L'AFP peut également être un biomarqueur utile dans l'évaluation des risques associés à une hépatotoxicité, dans le diagnostic des hépatocarcinomes, ainsi dans la régénération hépatique (**Mikolajczyk et al., 2019 ; Jiao et al., 2021**).

L'AFP exerce différentes activités physiologiques, elle a de larges effets immunosuppresseurs pendant la grossesse, en protégeant les antigènes paternels du fœtus des anticorps circulants maternels et aussi impliquer pour protéger les tumeurs du système immunitaire dans le cas d'auto-immunité et le cancer, limitant directement la viabilité et la fonctionnalité des cellules tueuses naturelles (NK), des monocytes et des cellules dendritiques (CD) (**Munson et al., 2022**).

De plus, elle participe dans le maintien du transport intravasculaire des protéines, des ions, de la bilirubine, des acides gras polyinsaturés et des hormones stéroïdiennes durant la vie embryonnaire (**Wang et Wang, 2018 ; Heym et al., 2022**).

Plusieurs études ont démontré que l'AFP est anti-apoptotique et joue un rôle primordial dans la promotion de la prolifération cellulaire agissant ainsi de concours avec les facteurs de croissance cellulaire (**Ho et al., 2009 ; Lin et al., 2021 ; El issaoui, 2022**).

2. Pesticides & Insecticides

2.1. Pesticide

2.1.1. Définition

Le terme "pesticides" est une appellation générique dont l'étymologie de ce mot est construite à partir du suffixe «-cide » dérivé du terme latin « *caedere* » qui signifie « tuer » et de la racine anglaise « Pest » (animal, insecte ou plante nuisible) provenant du latin « *Pestis* » qui désignait le fléau en général (**Baldi et al., 2013**).

Selon Food and Agriculture Organisation (**2021**), les pesticides désignent Toute substance, ou mélange de substances d'ingrédients chimiques ou biologiques ; destinée à repousser, détruire ou contrôler tout parasite (ravageurs animal ou encore une croissance indésirable des mauvaises herbes), et à prévenir des maladies causées par les microorganismes (**FAO, 2021**). Malgré leurs immenses bienfaits, les pesticides possèdent des impacts négatifs potentiels sur la santé humaine et à l'égard des organismes vivants auquel ils ne sont pas destinés (**Alalibo et al., 2019**).

2.1.2. Principes de bases concernant les formulations

« Formulation » est le terme qui désigne la Combinaison de divers ingrédients (composition chimique et physique) destinés à rendre le produit utile et efficace pour l'usage revendiqué et pour le mode d'application envisagé (**FAO, 2021**).

2.1.2.1. Formes des pesticides

Les produits phytosanitaire sont présentés à l'utilisateur sous différentes formes : liquides, poudres, granulés, émulsions, gels de contact, préparations micro-encapsulées, aérosol, fumigènes... ainsi selon différents conditionnements : bidons, sacs, sprays, pièges et plaquettes pour diffuseur (**Baldi et al., 2021**).

2.1.2.2. Composition d'un pesticide

➤ Une (ou plusieurs) substance active anciennement dénommée « *matière active* » : C'est La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux. Exemple : la matière active du Karate® est « lambda cyhalothrine » (**Anonyme, 2013**).

➤ Un diluant «*formulant*» : qui est une matière liquide (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) incorporé à une préparation et destiné à abaisser la concentration en matière active. Ce sont le plus souvent des huiles végétales (**Acta, 2005**).

De plus, un produit phytosanitaire pratique et fiable comprend tous les adjuvants nécessaires qui sont des substances dépourvues d'activité biologique, mais susceptibles de faciliter l'utilisation de la matière active (**Anonyme, 2013**).

2.1.3. Modes d'expositions aux pesticides

L'exposition aux pesticides peut se produire directement dans le cadre de leur fabrication, de leurs utilisations professionnelles ou domestiques, mais aussi indirectement par l'air et l'alimentation (**De Jaeger et al., 2012 ; Bouchard et al., 2019**). Elle se caractérise donc par une multiplicité de modes de pénétration des substances pesticides dans l'organisme d'après 3 ordres majeurs :

➤ **Voie cutanée** : En milieu professionnel (agriculteurs ou manipulateurs), le contact direct avec ces substance est démontrée comme la voie majeure de pénétration des pesticides (**Baldi et al., 2013**).

➤ **Voie orale ou digestive** : En population générale, celle-ci est souvent considérée comme la voie d'exposition la plus importante. Elle est due à l'ingestion d'aliments ou de boissons contenant des résidus de pesticides, soit liée au contact de la bouche avec les mains, les gants ou du matériel souillés, au fait de manger ou fumer sur le lieu de travail, à l'onychophagie surtout chez les enfants (comportement exploratoire et oralité) ainsi qu'à l'ingestion non alimentaire (poussières) (**Baldi et al., 2013**).

➤ **Voie respiratoire** : L'inhalation concerne plus particulièrement les personnes qui les manipulent dans certains conditions spécifiques, comme la fumigation, la préparation ou l'application dans les milieux fermés (serres, silos, bâtiment d'élevage...) ou des personnes qui vivent à proximité des plantations et des industries de fabrication (**Baldi et al., 2013**).

2.1.4. Classification des pesticides

En règle générale, Il existe de nombreuses façons de classer les substances actives : soit en fonction de la nature de l'espèce à combattre, ou bien selon la nature chimique de la principale substance active qui les compose (**Kojima et al., 2004**).

2.1.4.1. Classification biologique

Repose sur la nature des cibles visées en trois grandes catégories (**Inyang et al., 2016**).

➤ **Fongicides**

Ils sont destinés aux champignons pathogènes, en s'attaquant aux spores ou à leur perméabilité membranaire (**Cruz, 2015**).

➤ **Herbicides :**

Ce sont utilisés pour lutter contre les espèces végétales adventices des cultures de manière à les libérer de la concurrence (**Gupta, 2017**).

➤ **Insecticides**

Les insecticides sont des substances actives qui luttent contre les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies humaines mortelles telles que le paludisme et la fièvre jaune, en bloquant leur développement, en empêchant leur reproduction ou en interférant avec leur système nerveux (**Cruz, 2015**).

À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que :Acaricides ; Molluscicides ; Nématocides ; Rodenticides ; Avicides (**Baldi et al., 2013**).

2.1.4.2. Classification chimiques

Consiste à les distinguer en fonction de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (**Tableau III**). Certains se caractérisent par la présence de molécules halogénées (Chlore, Brome), d'autres comportent des groupes fonctionnels oxygénés, azotés, phosphorés ; qu'ils peuvent être principalement divisés en groupes d'organophosphorés, d'organochlorés, carbamates (amides) et de pyréthrinoides ; ainsi que d'autres groupes : les triazines, les benzimidazoles et les composés nitrés (**Merhi, 2008 ; Jiménez-Jiménez et al., 2019 ; Hassan et El Nemr, 2020**).

Il n'existe pas de classification universelle et consensuelle des pesticides. Le **tableau III** présente néanmoins les grands groupes de pesticides couramment utilisés et les principales classes (familles) chimiques au sein de ces groupes.

Tableau III : Croisements entre la classification chimique et la classification biologique des pesticides (Calvet et al., 2005).

Classement selon la cible	Famille chimique	Exemples de molécules
Insecticides	Insecticides minéraux	Arséniate de plomb, fluorure d'aluminium, composés soufrés, mercuriques, séléniés
	Carbamates	Aldicarbe, Carbofuran, Carbaryl, Méthomly
	Organochlorés	DDT (Dichlorodiphényl-trichloréthane), Lindane, Heptachlore, Dieldrine, Chlordane
	Organophosphorés	Malathion, Chlorpyrifos, Parathion, Diazinon
	Pyréthroïdes	Perméthrine, Cyperméthrine, Deltaméthrine
Herbicides	Herbicides minéraux	Sulfates, nitrates, chlorures, chlorates, cyanamide
	Phytohormones	Pichloranne, trichlopyr, fluroxypyr, glyphosate,
	Carbamates	Charbétamide, Chlorpropharme, Phenméthiphame
	Urée substituées	Chlortoluron, Diuron, Linuron
	Triazines	Atrazine, Simazine
	Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Zinèbe, Thirame
	Organophosphorés	Foséthyl-Al
Fongicides	Azoles	Cyproconazole, Flutriafol, Triconazole
	Carbamates	Benthiavalicarbe
	Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Thirame, Zinèbe
		Captane, Captafol, Folpel

2.1.4.3. Selon organisation mondiale de la santé (OMS)

Cette classification comprend cinq niveaux en fonction de la toxicité orale et cutanée des matières actives de produits agrochimiques, allant d'extrêmement dangereux au sans risque (OMS, 1991) :

- **Classe Ia** : Extrêmement dangereux.
- **Classe Ib** : Très dangereux.
- **Classe II** : Modérément dangereux.
- **Classe III** : Peu dangereux.
- **Classe IV** : Pas dangereux en cas d'usage normal.

2.1.5. Toxicité des pesticides

L'application extensive de pesticides souvent de façon irrationnelle s'accompagne de graves risques pour la santé humaine, vu que ces produits toxiques agissent chimiquement sur des effecteurs impliqués dans les fonctions vitales (**Figure 4**) provoquant des

perturbations au niveau de la signalisation hormonale, la respiration cellulaire, la division cellulaire ou la synthèse de protéines (Ghosh *et al.*, 2018 ; Tschudi, 2021).

Ce qui mène à une myriade de dysfonctionnements physiologiques et traduire l'atteinte d'un ou plusieurs organes ou systèmes par diverses pathologies (Alalibo *et al.*, 2019; Juricek *et Coumoul*, 2014).

- La maladie de parkinson, Alzheimer, sclérose latérale... Concernant le système nerveux central.
- Une multitude de cancers : leucémie, les cancers du sein, de la vessie, de la prostate...
- Troubles / insuffisances hépatiques et notamment rénales.
- Des déficiences immunitaires (diminution de la production d'anticorps), ou bien des réactions d'hypersensibilité retardée.

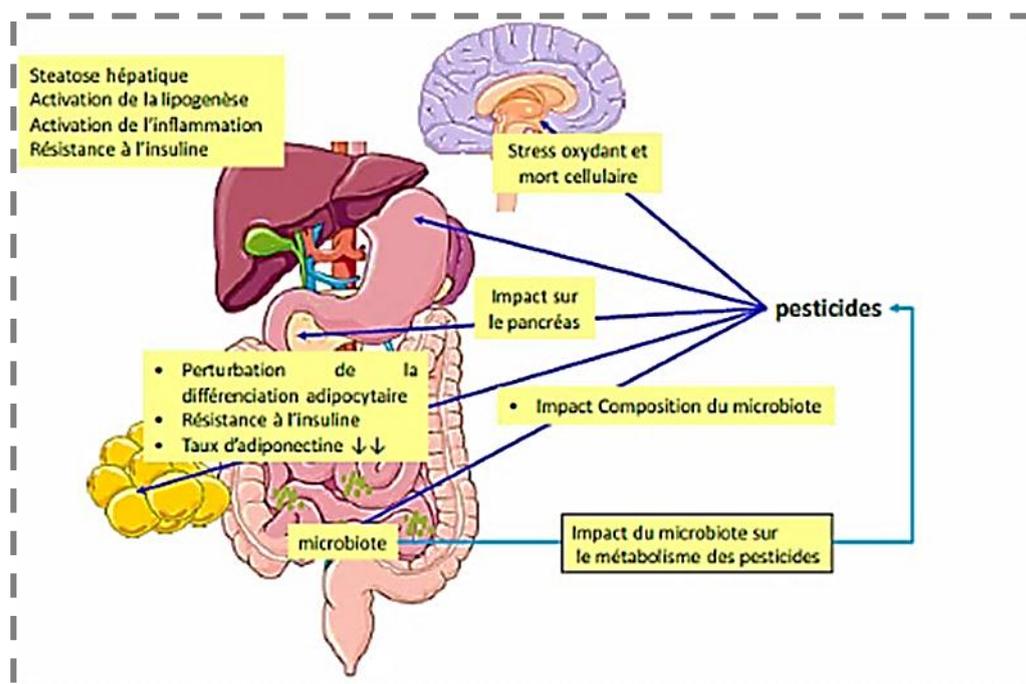


Figure 4 : Exemple de cibles des pesticides conduisant à des perturbations métaboliques au niveau de l'organisme (Gamet-Payrastre, 2019)

Ces manifestations peuvent également associée à des anomalies génétiques, à des troubles de fertilité et des atteintes cérébrales chez l'enfant consécutives à une exposition de la mère lors de la grossesse (Bhatia *et al.*, 2005 ; Weselak *et al.*, 2007). Notant que La connaissance et l'évaluation de ces effets permet d'appréhender le degré de dangerosité des pesticides (Saadane, 2018).

2.2. Insecticides

2.2.1. Définition

Les insecticides sont des substances actives constituant un grand nombre de produits chimiques de différentes classes, ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves et / ou leurs œufs. Ils sont largement utilisés en agriculture et en santé communautaire (lutte anti-vectorielle). Mais également présents dans l'environnement domestique sous forme de solution contre les poux, de médicaments vétérinaires, d'insecticides ménagers ou de produits de jardinage (Oberemok et al., 2015).

Ils exercent non seulement une toxicité chez les insectes, mais aussi chez les mammifères vertébrés à travers différents mécanismes d'action dont divers types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire ; en raison de différences distinctes dans les structures chimiques (Batsch, 2011)

Ce groupe comporte trois grandes familles auxquelles appartiennent les insecticides organiques de synthèse : les organochlorés, les organophosphorés, et les pyréthrinoides de synthèse (Gupta et al., 2019).

2.2.2. Pyréthrinoides de Synthèse

Les pyréthrinoides en générale peuvent être naturels d'origine botaniques « pyréthrines » : une poudre insecticide contenant le pyrèthre, d'où l'appellation « pyréthrinoides » ; fait de l'extrait des fleurs Chrysanthème (*Chrysanthemum cinerariae-folium*) ou de pyrèthre séché (*Chrysanthème cineum*), espèces retrouvées essentiellement en Afrique et en Australie (Schleier et Peterson, 2012 ; Birolli et al., 2019) ; ou bien ils se retrouve dans sa forme chimique synthétique « pyréthrinoides de synthèse » qui sont des composés très actifs à base d'insecticides naturels c'est-à-dire leur structure est adaptée de celle des pyréthrines (Gupta et al., 2019).

En raison de leur activité insecticide élevée et leur faible toxicité pour les oiseaux, les mammifères et pour l'homme, ils sont employés comme alternatives aux autres insecticides, en particulier les organophosphorés, les organochlorés et les carbamates ; d'autre part, leur utilisation devient de plus en plus accrue non seulement dans l'agriculture mais aussi comme des biocides (Barr et al., 2010 ; Zhang et al., 2010 ; Birolli et al., 2019).

2.2.2.1. Structure chimique

Les pyréthrinoides sont des esters de l'acide cyclopropane-carboxylique, composés de deux fractions structurales de base (**Figure 5**) : une partie acide et une partie alcool reliées par un pont ester (**Tustude, 2007**).

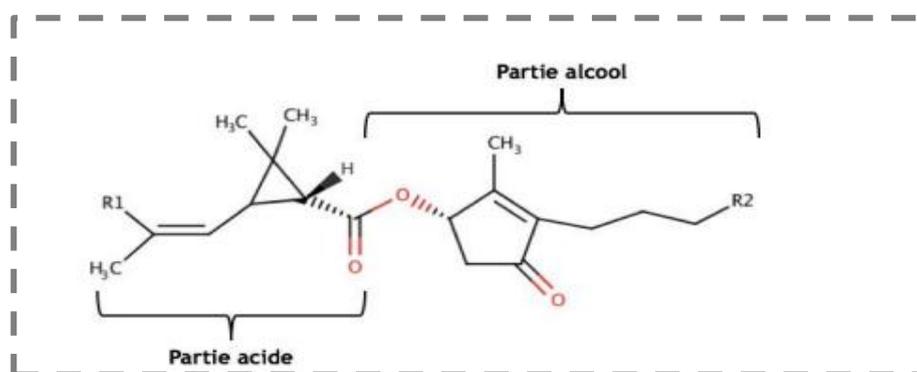


Figure 5 : Structure des pyréthrinoides (**Couture, 2008**).

2.2.2.2. Classification des pyrethrinoides

Il existe six pyréthrines naturelles que l'on peut extraire des fleurs de chrysanthème (**Figure 6**) : pyrethrine I, cinérine I, jasmoline I qui sont des esters de « l'acide chrysanthémique » et pyrethrine II, cinérine II, jasmoline II qui sont des esters de « l'acide pyréthrique » (**Nieradko-Iwanicka et Konopelko, 2020**).

Esters de l'acide chrysanthème			Esters de l'acide pyrèthre		
Composés	R1	R2	Composés	R1	R2
Pyrethrine I	CH ₃	CHCH ₂	Pyrethrine II	CH ₃ OC(O)	CHCH ₂
Cinérine I	CH ₃	CH ₃	Cinérine II	CH ₃ OC(O)	CH ₃
Jasmoline I	CH ₃	CH ₂ CH ₂	Jasmoline II	CH ₃ OC(O)	CH ₂ CH ₂

Figure 6 : Structure chimique de six constituants des extraits de pyrèthre (**Couture, 2008**).

Les pyréthrinoides de synthèse sont des esters synthétiques dérivés de ces 6 pyréthrines (**Tableau IV**), ils sont divisés en deux types en fonction de leurs différences structurales dont la présence d'un substituant cyano (–CN) influe sur le mécanisme d'action toxique :

- Les composés du type I : représentent les pyréthrinoides dépourvus du groupement α -cyané (**Schleier et Peterson, 2012**).
- Les composés du type II : sont les pyréthrinoides caractérisés par la présence d'un groupement nitrile (composé d'un atome de carbone et d'un atome d'azote)

lié à l' α -méthylène de l'alcool (Hénault-Ethier, 2016).

Tableau IV : Classification des pyréthrinoïdes en type I et type II (Thatheyus et Gnana, 2013).

PYRETHRINOIDES DE SYNTHESE	
Type I	Type II
<i>Bioallethrine</i>	<i>Cyfluthrine</i>
<i>Bifenthrine</i>	<i>Lambda-cyhalothrine</i>
<i>Permethrine</i>	<i>Cypermethrine</i>
<i>Metofluthrine</i>	<i>Deltamethrine</i>
<i>Tefluthrine</i>	<i>Fenvalerate</i>
<i>Teramethrine</i>	<i>Fluvalinate</i>

2.2.2.3. Propriétés physico-chimique

Les propriétés physico-chimiques ont un impact sur le potentiel toxique d'un pyréthrinoïde, la lipophilie en tête. Les molécules les plus lipophiles pénètrent plus facilement les tissus et sont moins bien métabolisées (Zhang et al., 2010).

2.2.2.4. Mode d'action et toxicité

Les pyréthrinoïdes synthétiques sont des analogues des pyréthrines naturelles, agissant selon le même mode d'action qui altèrent le système nerveux central et périphérique des insectes. Sauf qu'ils sont synthétisés de telle sorte que leur activité insecticide sera de haut niveau à large spectre (Bradberry et al., 2005 ; Hénault-Ethier, 2016).

Lors d'une exposition au pyréthrinoïdes, quand la cellule nerveuse est excitée, le temps d'ouverture des canaux sodiques sera prolongé, ce qui augmente le flux d'ions de sodium dans l'axone causant une dépolarisation de la membrane neuronale (Field et al., 2017 ; Miao et al., 2017). En maintenant ces canaux ouverts, les pyréthrinoïdes perturbent la transmission des impulsions nerveuses, paralysant l'insecte pour finalement le tuer (Figure 7). On les considère donc comme des poisons axoniques (Aydogdu et al., 2017 ; Khemiri et al., 2017 ; Chakroborty et al., 2018).

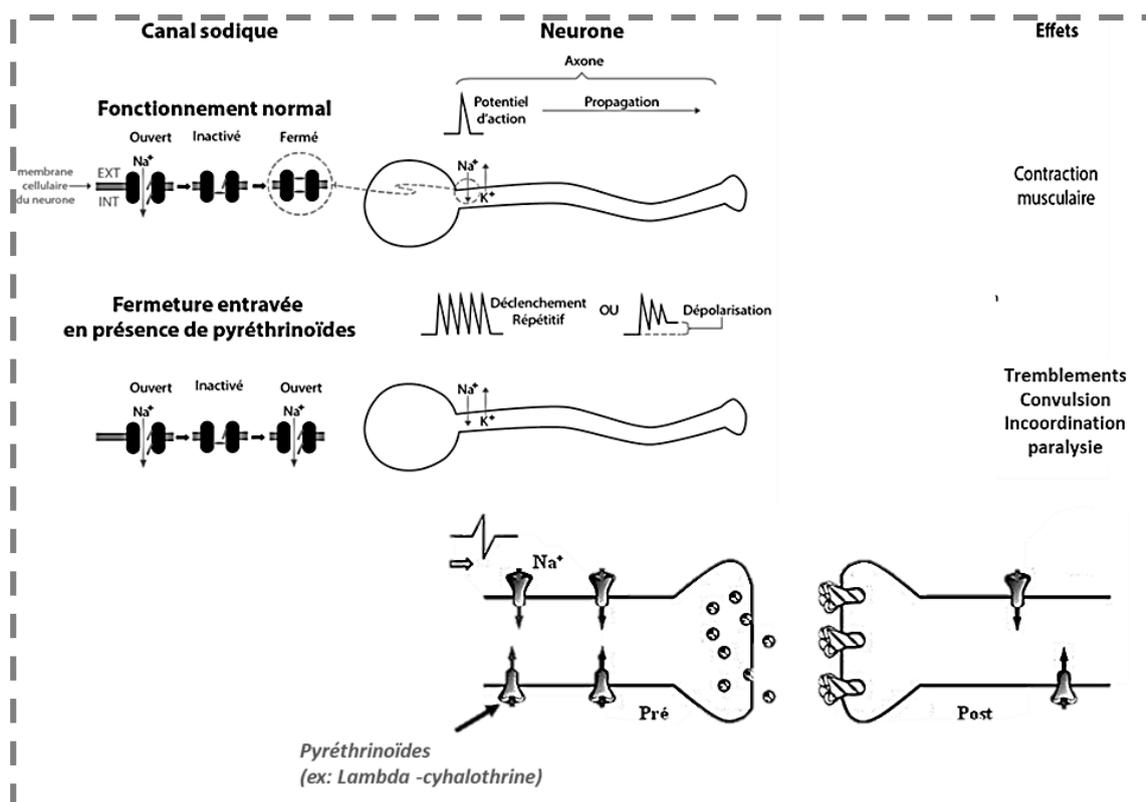


Figure 7 : Mode d'action des pyréthriinoïdes sur les neurones et la transmission de potentiels d'action (**Hénault-Ethier, 2016**)

2.3. Lambda-cyhalothrine : un exemple d'étude

2.3.1. Définition

Lambda-cyhalothrine (LCT) est l'un des plus récents insecticide, appartenant à la famille des pyréthriinoïdes synthétique de type II, possède une efficacité et une activité persistante contre une grande variété d'arthropodes préjudiciable à la fois pour la santé humaine et animale et pour la production végétale (**Abbassy et al., 2020**).

Cet insecticide a été utilisé avec succès dans de nombreux pays pour lutter contre les vecteurs de maladies infectieuses, tels que les punaises de triatomine (transmetteurs de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas) (**He et al., 2008**) ; et comme un important outil utilisé pour contrôler un large éventail des insectes ravageurs (les lépidoptères, les hémiptères, les diptères et les coléoptères) et d'ectoparasites (**Zoumenou et al., 2015** ; **Martínez et al., 2018**) notamment les cafards, les mouches, les poux, les moustiques et les tiques dans les champs agricoles et les secteurs de la santé publique (**Fetoui et al., 2010**). Lambda-cyhalothrine est modérément toxique pour les mammifères (**Ratnasooriya et al., 2003** ; **Anadón et al., 2006**) et hautement toxique pour les abeilles et les invertébrés

aquatiques à de faibles concentrations (**Schroer et al., 2004**). Ainsi que les résidus de denrées agricoles peut affecter directement la santé humaine (**Aydogdu et al., 2017**).

2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les principales propriétés physiques et chimiques de LCT sont présentées dans le tableau.

Tableau V : Propriétés physico-chimiques de lambda-cyhalothrine (**synthèse originale**).

Paramètres	Propriétés	Référence
Formule moléculaire	C 23 H19 ClF3 NO3	Aouey et al.,2017
Masse moléculaire [g/mol]	449,85 ± 0,023	Ineris, 2011
Densité [g/ml]	1.33 à 25°C	He et al .,2008
Couleur	solide incolore à température ambiante mais peut apparaître jaunâtre en Liquide visqueux.	
Odeur	Typique des solvants pétroliers aromatiques	Anonyme, 2003
Coefficient d'adsorption carbone organique) (Koc) [L/kg]	157 000 (valeur moyenne)	Ineris, 2011
Constante de dissociation Kd (pKa)	1,970 à 7,610	He et al .,2008
Hydrosolubilité [mg/L]	4.10-3 à 20°C et pH 5 5.10-3 à 20°C et pH 6.5 4.10-3 à 20°C et pH 9.2	Ineris, 2011
Point de fusion	49.2°C	He et al .,2008
Formulation commerciale	KARATE technologie zeon ® 5EC	Aouey et al.,2017

2.3.3. Mode d'action

La lambda-cyhalothrine agit comme un poison axonique affecte la fibre nerveuse en se liant à une protéine qui régule le canal sodique voltage-dépendant ce qui inhibe sa fermeture. Lorsque les canaux sont laissés ouverts, les cellules nerveuses produisent des décharges répétitive donc perturbe le fonctionnement normal du système nerveux périphérique et central de l'insecte. La lambda-cyhalothrine est parmi les PYR type II qui peuvent également affecter les canaux chlorure et calcium qui sont importants pour bon fonctionnement nerveux (**Burr et Ray, 2004**).

2.3.4. Métabolisme de lambda-cyhalothrine

Après l'administration de LCT par voie orale et une fois présents dans la circulation sanguine, ceux-ci sont distribués dans les divers organes et tissus biologiques qui les absorbent facilement, conformément à leur nature lipophile. y compris le cerveaux, foie, reins, graisse corporelle..., où ils vont exercer un effet (bénéfique ou délétère), être stockés ou être éliminés (*Çavuşoğlu et al., 2011 ; Alrawe et Alzubaidy, 2022*).

Le foie est l'organe chargé de métaboliser la lambda-cyhalothrine de manière très importante via le clivage de la liaison ester catalysé par l'enzyme d'estérase (*Anadon et al., 2006 ; Crow et al., 2007 ;Bhardwaj et al., 2020*).

2.3.5. Toxicité de la lambda-cyhalothrine

➤ Toxicité hépatique

Divers études ont montré une relation entre l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes et les dommages au niveau du foie, ce dernier étant le siège du métabolisme de tous les pesticides (*Fetoui et al., 2010 ; Khaldoun et al., 2014 ; Martinez et al., 2018*). D'où des concentrations importantes de métabolites de la lambda-cyhalothrine (CFMP et 3-PBA) ont été enregistrées dans le tissu hépatique ce qui montre leur accumulation étroitement liée aux lésions hépatocytaires entraînant des dommages oxydatifs (*Takasaki et al., 2013 ; Aouey et al., 2017 ; Aouey et al., 2019*).

➤ Effets endocriniens

Des résultats ont montré des effets toxiques sur le système immunitaire, notamment des maladies auto-immunes et des allergies. Certains pyréthrinoïdes de synthèse peuvent provoquer un dysfonctionnement de la régulation des hormones thyroïdiennes, de la testostérone et des androgènes (*Righi et al., 2009 ; Riederer et al., 2008*).

➤ Immunotoxicité

Il a également été montré que la λ -cyhalothrine provoque des effets cytotoxiques dans des lymphocytes humains en culture. Les résultats ont montré qu'après que des rats aient été exposés à trois doses de cyhalothrine (0,6, 1 et 3 mg/kg/jour) pendant 7 jours, des changements dans les taux de lymphocytes sériques et une diminution de la phagocytose par les macrophages ont été observés (*Zhang et al., 2010*).

3. Vitamines C

3.1. Rappels généraux sur les vitamines

Les vitamines, bien qu'elles n'aient aucune valeur énergétique, interviennent dans de nombreux processus physiologiques. À l'exception des vitamines D et K, notre organisme est incapable de les fabriquer (**Van Bellinghen et al., 2006 ; Buxeraud et Faure, 2021**).

Il existe deux grands types de vitamines :

- les vitamines liposolubles (A, D, E, K) sont stockées au niveau du tissu adipeux (D, E) ou en quantités importantes dans le foie (A) ; elles peuvent donc s'accumuler dans l'organisme et entraîner un risque potentiel en cas de surdosage.

- les vitamines hydrosolubles des groupes B (B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8, B9 et B12) et C ; cependant, les risques de surdosage sont moindres car elles sont éliminées dans les urines (**Cano et al., 2006 ; Médart, 2009**).

3.2. Définition

La vitamine C encore appelée acide ascorbique est un antioxydant non enzymatique puissant dans le cytosol agit comme un piègeur de ROS pour empêcher, ou au moins atténuer les effets délétères causés par les ces derniers (**Zuhair et Alamri, 2011 ; Carr et Maggini, 2017**).

L'AA de formule chimique générale $C_6H_8O_6$ possède deux formes optiques : lévogyre et dextrogyre, mais seule la forme lévogyre (acide L-ascorbique) représente la forme naturelle biologiquement active (**Ball, 2004**). L'activité vitaminique C est exprimée en mg d'acide L- ascorbique (**Bourgeois, 2003**).

3.3. Structure biochimique

Il s'agit d'un composé à six carbones dont la structure est apparentée à celle de glucose, avec un poids moléculaire 176,13 KDa et une formule brute $C_6H_8O_6$. L'AA (ou 2-oxo-L-thréo-hexono-4-lactone-2.3-énediol) comporte un cycle lactone, deux carbone asymétrique (les carbones 4 et 5), deux fonction alcool : l'une primaire et l'autre secondaire et une fonction éne-diol ($HO-C=C-OH$) sur les carbones 2 et 3 (**Figure 8**) ; c'est ce groupement qui est responsable du caractère acide de l'acide ascorbique ($pka=4,17$) (**Chambial et al., 2013 ; Elias et al., 2013**).

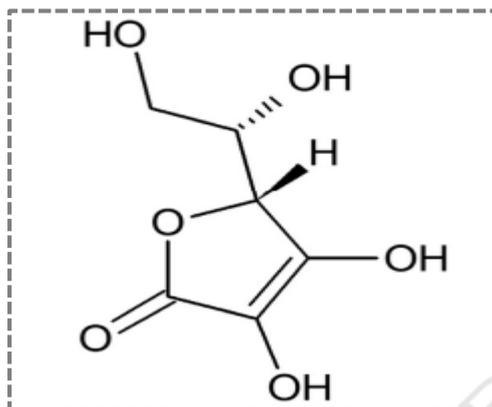


Figure 8 : Structure moléculaire de l'acide L-ascorbique (Caritá et al, 2019).

La vitamine C existe essentiellement sous deux formes : l'acide L-ascorbique forme réduite et l'acide L déhydroascorbique (ADHA) (Figure 3) forme oxydée, en équilibre réversible dans les tissus. Le couple agit alors comme un puissant catalyseur de réactions d'oxydoréduction dans l'organisme (Lykkesfeldt et al., 2014 ; De Matos, 2016 ; Sperte, 2016).

3.4. Propriétés physicochimiques

La vitamine c est l'un des agents réducteurs les plus puissants dans les tissus vivants, Elle se présente sous l'aspect d'une poudre blanche ou légèrement jaunâtre, cristalline, inodore, de saveur légèrement acide. Avec une température de fusion égale à 190°C et de masse molaire de 176 g.mol⁻¹(De Matos, 2016). L'AA est très hydrosoluble, en revanche moins soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther et le chloroforme (Layachi, 2013).

Cet antioxydant est Très sensible et instable en solution aqueuse, d'une part au contact du dioxygène de l'air d'où il s'oxyde facilement et réversiblement à l'acide deshydro-ascorbique mais ainsi qu'à la chaleur (thermosensible), et aux ultraviolets, par contre il est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité (Bourgeois, 2003 ; Zulfiquar et al., 2016).

3.5. Sources de la vitamine C

La vitamine C est très répandue dans la nature. Elle est essentiellement présente dans les végétaux frais, particulièrement dans les agrumes, les fruits tendres et les légumes verts à feuillus. En outre, les reins et le foie sont de bonnes source de vitamine C d'origine animal (Velmurugan et al., 2007 ; Levine et al., 2020). Comme supplément « antioxydant », la vitamine C est disponible sous formes de comprimé et de poudre de différentes doses. Elle est

généralement incluse dans beaucoup de formulations multivitaminées (**Adikwu et Deo, 2013**).

3.6. Besoin et Biosynthèse de la vitamine C

Le besoin vital en vitamine C varie de manière conséquente entre les espèces et est conditionnée par des paramètres environnementaux. Cependant contrairement à la majorité d'entre eux, l'homme et certains organismes sont incapables de la synthétiser en raison d'un déficit enzymatique particulier, une oxydase appelée L- gulcono- γ -lactone déshydrogénase, qui va réaliser l'oxydation du glucose et sa transformation en acide déhydroascorbique. Ce qui exige la présence de la vitamine dans leur alimentation (**Carité et al, 2019**).

Dans certaines situations pathologiques (comme le stress, l'inflammation, l'infection) les besoins en vitamine C peuvent être accrus (**Pescheux, 2016**). Dans le règne animal, la Biosynthèse de l'acide ascorbique est incluse dans la voie biochimique de l'acide glucuronique qu'est une voie importante pour des processus de détoxification au niveau du foie (**Linster et van Schaftigen, 2006 ; Fenech et al., 2019 ; Abdullah et al., 2022**).

3.7. Pharmacocinétique de la vitamine C

✓ **Absorption** : L'absorption de la vitamine C exogène s'effectue au niveau de la muqueuse buccale, l'estomac et efficacement l'intestin grêle y compris l'iléon, dont l'absorption buccale se fait par diffusion passive à travers la membrane de la cavité buccale. Tandis que l'absorption gastro-intestinale par l'intermédiaire d'un mécanisme de transport actif (Na⁺-dépendant), saturable et dose dépendant (**Djeffal, 2014 ; Fiorani et al., 2020**).

✓ **Distribution** : L'acide ascorbique passe rapidement dans le sang et diffuse de façon variable dans tous les tissus. Dans le sang, la forme majoritaire est celle réduite l'anion ascorbate AH⁻ (environ 85%). La forme oxydée (DHA) ne représente que 15 %. Dans le plasma, la vitamine C circule librement sous forme d'ascorbate (sans transporteur protéique) (**Das et al., 2007**).

✓ **Métabolisme** : L'ascorbate est métabolisé dans le foie et les reins, avec une série de réactions. Son activité en tant qu'antioxydant comprend la possibilité d'être oxydé réversiblement par l'enzyme L-ascorbate oxydase en un radical ascorbyle (ionisation) puis en déhydro-ascorbate (acide L-déhydroascorbique) . qui est à son tour oxydé mais d'une manière irréversible en acide dicétogulonique(l'acide 2,3-dikéto-L- gulonique), puis hydrolysé en

acide oxalique et thréonique (Ball, 2004 ; Iqbal et al., 2004 ; Figueroa-Méndez et Rivas-Arancibia, 2015).

✓ **Elimination** : La vitamine C ne se stocke pas dans l'organisme mais excrétée par trois voies principales : les urines, les matières fécales et la sueur (Labarthe, 2012). L'élimination urinaire est majoritaire, elle se fait sous la forme native inchangée et de métabolites dont le principal est l'acide oxalique (55 %). qui 80% des calculs rénaux sont composés d'oxalate de calcium (Lafargue, 2014).

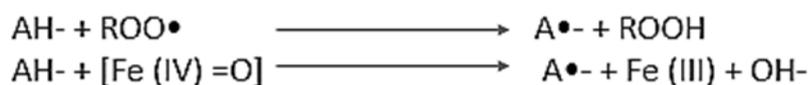
3.8. Rôles physiologiques de la vitamine C

La vitamine C semble exercer une multitude d'effets bénéfiques sur les fonctions biochimiques et moléculaires dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes (Youssef, 2022).

3.8.1. Action antioxydante

Du fait de son activité anti radicalaire, l'ascorbate est le plus puissant antioxydant hydrosoluble qui peut travailler à l'intérieur et à l'extérieur des cellules pour combattre les dommages oxydatifs. Il est capable de piéger les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) tels le radical hydroxyle (OH), l'anion superoxyde (O_2^-) et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN), tel que le peroxyde d'azote et les neutralisées.

Il protège les membranes, le plasma et les lipoprotéines de faible densité (LDL) vis à vis de l'attaque peroxydative : soit par stopper la phase de propagation de l'auto-oxydation et augmentent les cinétiques de réaction de terminaison. ; ou bien en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO^\bullet dans la phase aqueuse et les complexes oxoferryle avant qu'ils puissent initialiser la peroxydation lipidique (Pouliquen, 2022).



3.8.2. Rôle enzymatique

- a) **Absorption du fer** : Par son pouvoir réducteur, la vitamine C participe à la transformation du fer ferrique en fer ferreux pour faciliter et optimiser donc l'absorption du fer consommé dans les aliments surtout celui qui est non hémique (produits laitiers et végétaux) Il joue également un rôle dans la mobilisation du fer d'un compartiment à l'autre. La vitamine C est proposée pour les personnes atteintes l'anémie (**De Matos, 2016**).
- b) **Synthèse de collagène** : L'acide ascorbique agit comme un cofacteur sur les systèmes enzymatiques d'hydroxylation post-traductionnelle de la proline et de la lysine qui interviennent dans la biosynthèse du procollagène afin de former respectivement l'hydroxyproline et l'hydroxylysine, Ces acides aminés hydroxylés entrent dans la composition des fibres de collagène (**De Blas et Wiseman, 2010**).
- c) **Métabolisme de la carnitine** : Elle est impliquée dans la formation de la carnitine une substance retrouvée dans le muscle cardiaque, et squelettique ou encore dans le foie, nécessaire au transport des acides gras vers les mitochondries où ils sont oxydés pour produire de l'énergie (**Doseděl et al, 2021**).
- d) **Métabolisme Catécholamine** : La transformation de la dopamine en noradrénaline est catalysée par la dopamine - β -hydroxylase un dimère ou un tétramère située dans les vésicules de stockage des catécholamines du tissu nerveux contenant des sous-unités identiques, chacune avec deux ions cuivre catalytiques. L'acide ascorbique agit comme un cofacteur de cet enzyme dont le rôle est de maintenir le cuivre à l'état réduit (**Figuroa-Méndez et Rivas-Arancibia, 2015**).
- e) **Autres réactions d'hydroxylation** : La vitamine C intervient également dans la conversion du cholestérol en acides biliaires, ainsi que dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes dans les glandes surrénales. Elle participe aussi au catabolisme des toxiques et carcinogènes par les cytochromes P450 hépatiques. (**Cerullo et al, 2020**).

3.8.3. Agent d'oxydoréduction

Grâce à son couple oxydoréducteur, La vitamine C participe à la réduction des acides foliques en coenzymes actifs, les acides tétrahydrofoliques (THF). Elle a également un rôle détoxifiant d'une part, vis-à-vis un grand nombre de métaux lourds (plomb, mercure, cadmium, strontium ...), en favorisant leur élimination ou diminuant l'absorption intestinale de certains d'entre eux (**Guillot et al., 1998 ; Layachi, 2013**).

3.8.4. Stimulation de l'immunité et prévention de certaines maladies

Les recherches récentes sur l'acide ascorbique ont mis en évidence son intérêt dans le traitement et la prévention de certaines maladies. La vitamine C pourrait aider à prévenir ou retarder le développement de certains cancers, des maladies cardiovasculaires et d'autres maladies (**Padayatty et al., 2003**).

3.9. Carence en vitamine C

La vitamine C est entre autre indispensable à la biosynthèse du collagène. Lors d'un déficit en vitamine C (hypovitaminose) chez l'homme et les espèces sensibles incapables de la synthétiser, l'altération du collagène se caractérise par les signes cliniques suivants : anorexie, fatigue, douleur et atrophie musculaire, manifestations hémorragique, œdèmes et lésions cutanées, enflure et saignement des gencives pouvant conduire à la perte des dents, ainsi des perturbations psychologiques (dépression, hystérie) (**Djeffal, 2014 ; Gayen et al., 2020**).

Néanmoins, la vitamine C peut être conditionnellement essentielle même chez les espèces capables de la synthétiser tel que les lapins ; Dans les conditions de stress notamment, la synthèse endogène peut s'avérer insuffisante pour répondre aux besoins de l'organisme. (**Gidenne et al., 2015 ; Labarthe, 2012**).

3.10. Toxicité de la vitamine C

La vitamine C n'est pas réputée toxique du fait que la molécule étant hydrosoluble, elle est majoritairement éliminée lors d'excès éventuels par voie urinaire ; Aucune étude n'a révélé que l'acide ascorbique est cancérigène ou tératogène ou qu'il cause des effets indésirables sur la reproduction (**Hussein et al., 2012**).

Cependant Les apports élevés en vitamine C ont été signalés comme ayant une faible toxicité ; À cet égard L'OMS estime que 1g/j d'acide ascorbique semble être la limite supérieure recommandée de l'apport alimentaire (**Adikwu et Deo, 2013**).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Présentation de l'étude

Notre travail a débuté à partir des organes prélevés et fixés dans du formol à 10%. Un test de toxicité subaiguë de 21 jours de traitement par l'insecticide « lambda cyhalothrine » a été suivi par le sacrifice des animaux témoins, traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. L'organe cible de la présente étude étant le foie.

Notre expérimentation a été réalisée durant la période allant du 20 mars jusqu'au 20 Juin de 2022, au sein des laboratoires suivants :

- ✓ Clavier de la station expérimentale de la faculté SNV de l'université Blida 1 où nous avons assisté à l'étude toxicologique et le sacrifice des animaux.
- ✓ Laboratoire PFE de la faculté SNV de l'université Blida 1 où nous avons assisté à la dissection, prélèvement et pesée des organes.
- ✓ Laboratoire d'anatomie-pathologie CHU de l'hôpital de Beni Messous où nous avons réalisé notre étude histologique par coloration topographique HE et immunohistochimique (IHC) par les marqueurs moléculaires Ki67 et alpha foetoprotéine (AFP).
- ✓ Laboratoire d'anatomie pathologie de l'hôpital Douera, où nous avons réalisé des colorations histologiques topographiques du foie à savoir le trichrome et la réticuline.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Le modèle animal choisis dans notre étude est la lapine et Selon (**Garreau et al., 2015 ; Lebas et al., 1984**)) leur systématique est la suivante :

- **Règne** : Animale
- **Embranchement** : Vertébrés
- **Classe** : Mammifères
- **Ordre** : Lagomorphes
- **Famille** : Léporides (lièvre et lapin)
- **Sous-famille** : Leporinae
- **Genre** : *Oryctolagus*
- **Espèce** : *Oryctolagus cuniculus*

➤ Répartitions des lots

L'ensemble des lapines ont été divisés en trois groupes de 5 lapines chacun dont leur poids moyen homogènes, ces derniers sont gardées dans les mêmes conditions (**Hamadidi et Melek ,2020**).

- **Le 1^{er} Lot (Témoin)** : recevant de l'eau distillée.
- **Le 2^{ème} Lot** : traité par lambda cyhalothrine.
- **Le 3^{ème} Lot** : traité par la LCT + vitamine C.

1.2. Matériel non biologique

Dans la présente étude deux produits ont été testé à savoir l'insecticides **KARATE®** dont la matière active est « Lambda-cyhalothrine » et l'acide ascorbique, le reste du matériel utilisé est cité dans l'**annexe I**.

2. Méthodes

2.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

Nous avons assisté au niveau de clapier lieu de l'expérimentation animale et dans laboratoire PFE pour le sacrifice, le prélèvement et la dissection des organes avec d'autres étudiants master (**Figure 9**).



Figure 9 : Aspect plurilobé du foie de lapine et pesé (**Photo originale**)

2.2. Etude histologique

Le principe de la technique histologique est le recueil des fragments tissulaires hépatiques précédemment mis en cassettes pour permettre la réalisation de plusieurs étapes successives en vue d'obtenir des coupes histologiques fines et colorées observables au microscope optique selon les étapes suivantes :

2.2.1. Etude macroscopique

Afin d'effectuer une analyse morphologique, un examen macroscopique est recommandé permettant la recherche d'éventuelles lésions macroscopiques (couleur, œdème, nécrose....etc.) du parenchyme hépatique des animaux traités en comparaison avec les sujets témoins.

2.2.2. Fixation

C'est l'étape primordiale de la préparation des structures aux traitements ultérieurs (coloration). Elle est indispensable à la bonne immobilisation des constitutions cellulaires et tissulaires en conservant leurs morphologies dans un état aussi proche que possible de leur

état vivant. La fixation permet de protéger les tissus des organes contre les contaminations bactériennes qui entraînent la putréfaction des tissus et de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires (autodigestion). Après sacrifice, les organes prélevés sont pesés, coupés en petits fragments puis fixés dans le formol à 10% et mis en totalité dans des cassettes plastiques codifiées (portant le code d'identification pour chaque lapin) (**Figure 10**).



Figure 10 : Fixation des fragments

2.2.3. Circulation

Elle consiste à séjournier les pièces dans une série de liquides intermédiaires avec un ordre déterminé et de manière à faire remplacer l'eau présente dans les tissus par une matrice suffisamment stable pour maintenir les structures cellulaires qui est souvent hydrophobe. L'ensemble des opérations ont été effectuées à l'aide d'un automate de traitement des tissu de type « Leica » pendant une durée de 24 heures (**Annexe I**). La circulation passe par 3 processus :

a. Déshydratation

C'est la première étape indispensable pour l'élimination de l'eau des tissus, elle se fait par immersion des cassettes contenant les fragments du foie dans des bains d'alcool éthylique (2 heures chacun) de degrés croissant :

- Un bain d'alcool 70°
- Un bain d'alcool 80°
- Un bain d'alcool 95°
- deux bains d'alcool 100°

Notant que cette graduation dans les concentrations assure une déshydratation douce et non brutale préservant les cellules de la distorsion.

b. Clarification

Les cassettes ont été ensuite immergées dans 3 bains successifs du xylène (bain intermédiaire miscible dans l'alcool et la paraffine) de 2h chacun qui permettent de remplacer l'alcool présent dans les tissus par la paraffine. Au fur et à mesure de leur infiltration par le solvant, les tissus ont tendance à s'éclaircir. Cette étape est donc parfois appelée éclaircissement ou clarification.

c. Imprégnation

C'est l'étape terminale qui assure l'élimination du xylène et l'imprégnation des tissus par la paraffine. Elle consiste à Faire séjourner les cassettes d'organes successivement dans deux bains de paraffine pure fondue pendant 2 heures chacun. Les bains de l'automate sont thermostatés à 56°C pour maintenir la paraffine liquide.

2.2.4. Inclusion

Consiste à inclure le tissu imprégné « foie » dans un bloc de paraffine, qui va procurer la résistance mécanique nécessaire à la réalisation des coupes fines et régulières au microtome, elle permet aussi la conservation de l'échantillon.

Cette technique a été réalisée à l'aide d'un automate d'inclusion (**Figure 12**), selon les étapes suivantes :

- ✓ Couler la paraffine fondue par chauffage dans des moules métalliques.
- ✓ Orienter les fragments d'organe imprégné dans la paraffine, dont ils doivent être maintenus au fond et au centre du moule pour que la coupe soit représentative du fragment.
- ✓ Placer des cassettes sur lesquelles est inscrit les indications de la pièce traitée au-dessus des moules qui seront choisis en fonction de la taille des fragments.
- ✓ Verser la paraffine liquide de 56°C contenue dans un distributeur de paraffine à travers les grilles des cassettes jusqu'au remplissage.
- ✓ Laissez refroidir environ 10 minutes sur une plaque froide pour obtenir une solidification rapide.
- ✓ Démouler les blocs.

À la fin, on obtient des blocs de paraffine durs, incluant le fragment prélevé et qui sont par la suite conservés au congélateur à - 4°C jusqu'à la réalisation des coupes.

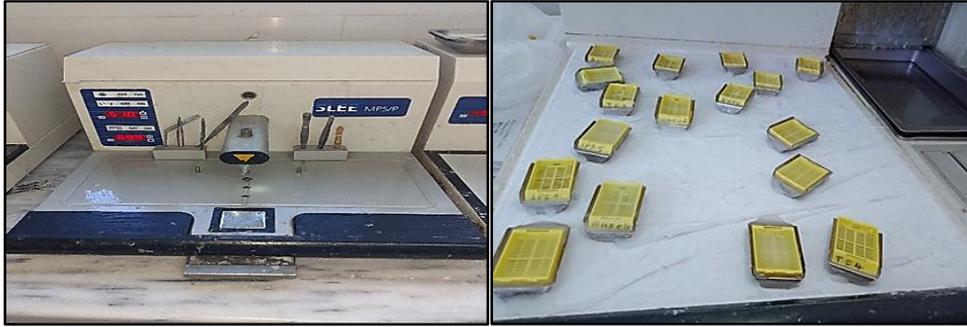


Figure 11 : Automate d'inclusion (photo originale)

2.2.5. Microtomie

Après l'obtention des fragments tissulaires inclus dans des blocs :

- ✓ Vérifier la solidité des blocs de paraffine.
- ✓ Orienter et fixer les cassettes de paraffine portant le fragment d'organe sur le porte-objets d'un microtome rotatif de type « Leica » (**Figure 13**).
- ✓ Éliminer le surplus de la paraffine par dégrossissement du bloc jusqu'à l'apparition de la pièce dans le plan de coupes.
- ✓ Réaliser une série de coupes fines et transversales sous forme de ruban de 3 à 5 μm d'épaisseur pour obtenir une seule couche de cellules.

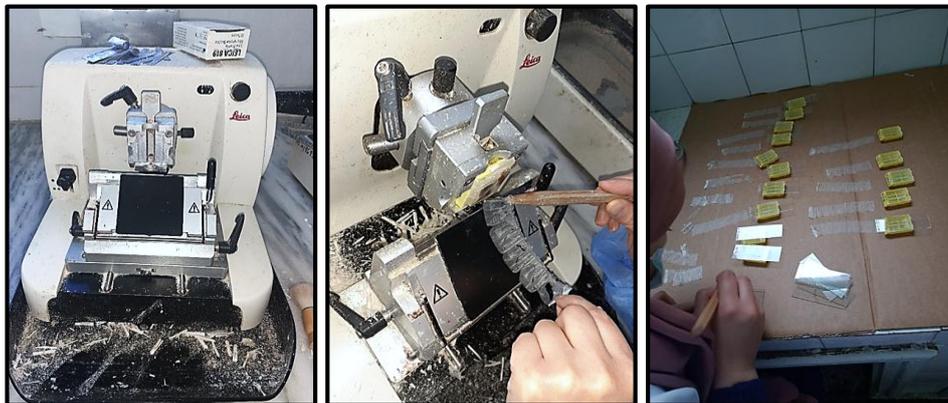


Figure 12 : Microtomie identification des lames (photo originale)

2.2.6. Etalement Collage et Séchage des rubans de coupes

Après avoir identifié les lames à l'aide d'un crayon diamanté (**Annexe I**) les rubans de coupe sont étalés à l'aide de l'eau et une plaque chauffante à 70°C pendant quelques secondes, afin de permettre une adhérence optimale des tissus.

À l'aide d'une pince, les plis de la paraffine sont tirés légèrement de chaque côté. Ensuite, l'ensemble coupe-lame est retiré de la plaque, égoutté sur papier joseph.

Ces lames obtenues dites « blanches » (car elles ne sont pas encore colorées) ont été ensuite placées sur un porte-lame et séchées dans un étuve réglée à 80°C pendant 15 min.

2.2.7. Coloration

Les lames subissent un prétraitement avant la coloration :

- L'étape de déparaffinage sert à enlever la paraffine intracellulaire pour que les colorants puissent le pénétrer, par passage des lames dans un bain de xylène de 5 à 7 minutes.
- La réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par de l'eau. Les lames déparaffinées passent par trois bains d'alcool a concentration décroissante **96°**, **80°** puis **70°** après on termine par un Rinçage de 1 à 3 minute à l'eau de robinet.

Après ces étapes préparatoires, nous avons appliqués trois types de coloration **topographique** pour la l'observation et l'étude du parenchyme hépatique.

a. Hématoxyline Eosine (HE)

C'est une coloration usuelle adoptée en anatomie pathologique par laquelle doivent passer tous les prélèvements, elle a pour but d'identifier les caractères histologiques de tissus, elle est dite bi-chromatique composée d'un colorant nucléaire (bleu/violet) : l'hématoxyline de Harris cationique (basique), et d'un colorant cytoplasmique (rose) : l'éosine anionique (acide).

Ce processus a été effectué comme suit :

- ✓ Passage des lames réhydratées dans un bac de l'hématoxyline de Harris (2 à 3 min).
- ✓ Rinçage avec du l'eau de robinet (5 min).
- ✓ Passage des lames dans un bac d'eau acidifiée(5ml d'acide chlorhydrique concentré dans 1L d'eau distillée), pendant quelques secondes pour différencier les coupes et éliminer l'excès de colorant.
- ✓ Bleuissement des noyaux dans un bac d'eau additionné de quelques gouttes d'ammoniaque (2 ml NH₄OH dans 1L d'eau distillée) pendant (15 s).
- ✓ Immersion des lames dans un bac d'éosine (30 s à 1 min).
- ✓ Deuxième rinçage avec du l'eau de robinet (5 min).

Après, on procède à une :

- ✓ **Déshydratation** : Les lames colorées ont été soumises successivement dans 3 bacs

d'éthanol à des concentrations croissantes (70% /30 secondes ,80%/30 secondes et 96% pendant 2 min) pour éliminer l'eau restante dans les coupes.

- ✓ **Éclaircissement** : Puis elles ont été plongées dans deux bacs de xylènes pendant 20 min.

b. Trichrome de Masson

C'est la 2^{ème} coloration topographique de routine utilisée dans notre travail pour mettre en évidence **les fibres de collagène** dans les coupes histologiques. Comme son nom l'indique, cette technique fait intervenir 3 colorations successives :

- 1) Une coloration des noyaux par « **l'hémalum de Mayer** ».
- 2) Une coloration du cytoplasme en rose par un mélange précis de « **fuchsineacide** » et de « **rouge ponceau** ».
- 3) Une coloration élective du collagène en bleu par « **le vert lumière** » ou « **le bleu d'aniline** ».

Elle passe par les étapes suivantes :

- ✓ Plonger la lame dans trois bains de xylène en agitant 3 à 5 min.
- ✓ Passer les lames dans 3 bains d'alcool puis rincer avec l'eau de robinet.
- ✓ Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- ✓ Colorer à l'Héματοxyline 10 min.
- ✓ Rincer à l'eau courante.
- ✓ Plonger dans l'eau ammoniacale jusqu'à bleuissement de la coupe.
- ✓ Rincer à l'eau courante.
- ✓ Rincer à l'eau distillée.
- ✓ Colorer à la Fuchsine Ponceau 10 min.
- ✓ Rincer à l'eau distillée.
- ✓ Plonger dans l'acide phosphomolybdique (éclaircissement du rouge) 3 min.
- ✓ Colorer sans rincer par le bleu d'aniline(ou par le vert lumière) 1 min.
- ✓ Déshydrater et monter.

c. Coloration de la réticuline

C'est une coloration topographique spéciale basée sur la méthode d'argentage de réticuline, dont **les fibres de réticuline** constituées de collagène de type III sont colorées en noir par les sels d'argent. Suivant les étapes ci-dessous : (**Annexe II**)

- ✓ Déparaffiner et réhydrater.

- ✓ Rincer à l'eau distillée.
- ✓ Oxydation préliminaire des fibres de réticuline : Poser sur la coupe 5 gouttes de réactif A et 5 gouttes de réactif B (5 min).
- ✓ Laver dans de l'eau distillée.
- ✓ Blanchiment : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif C (1 min).
- ✓ Double lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Sensibilisation (formation de complexes organométalliques) : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif D (3 min).
- ✓ Double lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Imprégnation : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif E (3 min).
- ✓ Lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Réduction d'argent ionique en argent métallique : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif F (5 min).
- ✓ Double lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Virage : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif G (2 min).
- ✓ Lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Fixage : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif H (2 min).
- ✓ Lavage dans de l'eau distillée.
- ✓ Contre coloration : Poser sur la coupe 10 gouttes de réactif I (5 min).
- ✓ Déshydrater et monter.

2.2.8. Montage et Observation microscopique

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique « l'Eukitt » dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre, en évitant la formation de bulles d'air.

Les lames séchées peuvent-être conservées pendant une période illimitée à température ambiante. Ces dernières sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope optique de type « **Leica** » et d'un appareil photo numérique à différents grossissements (Gx10 et Gx 40).

2.3. Étude d'immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie permet la localisation et la quantification des protéines spécifiques sur coupe histologique par la détection d'antigène (ex : Ki₆₇ et la AFP) grâce à un anticorps primaire (peuvent être d'origine polyclonale ou monoclonale) spécifique à l'antigène qu'il est capturé par un anticorps secondaire couplé à une enzyme pour donner une réaction colorée facile à visualiser au microscope (**Figure 13**) (**Kim et al., 2016**).

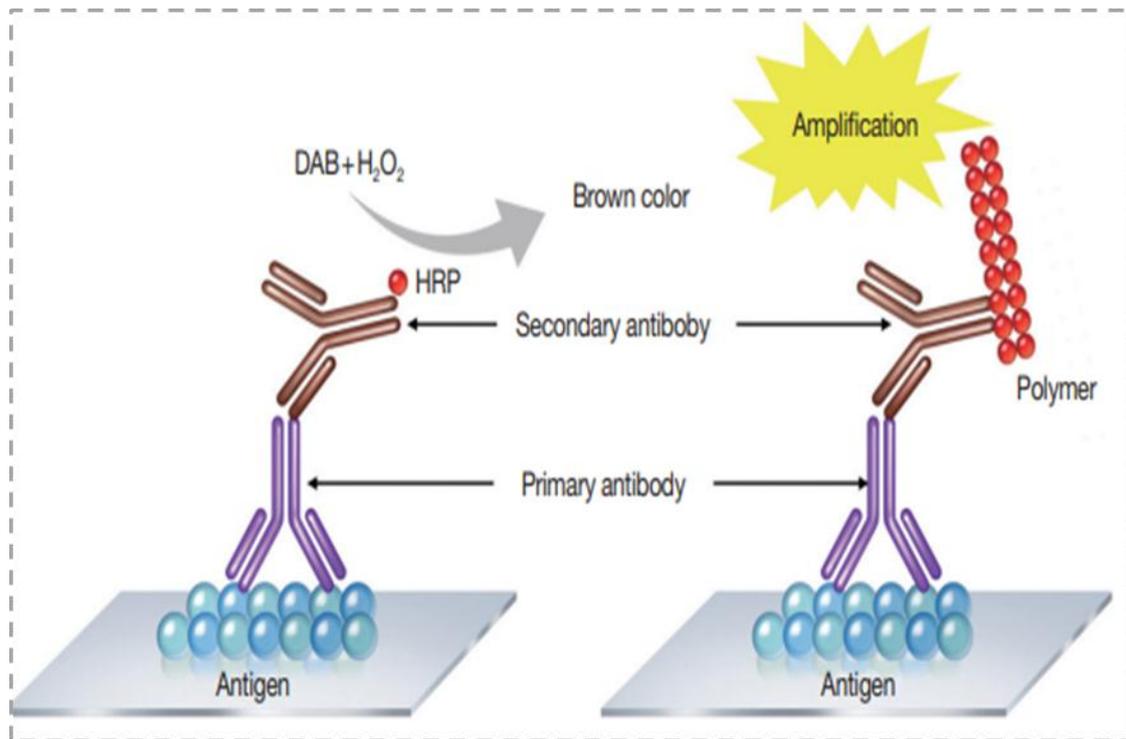


Figure 13 : Schéma présentant le principe de la technique d'immunohistochimie (**Méthode indirecte**) (Kim *et al.*, 2016)

L'application des anticorps peut se faire de deux manières distinctes :

Méthode directe : Elle repose sur l'utilisation d'un seul anticorps spécifique couplé à une molécule de détection.

Méthode indirecte : Elle consiste en l'utilisation de deux anticorps l'un primaire qui cible spécifiquement l'antigène et l'autre secondaire et couplé à une molécule de détection. Dans la présente étude nous avons adopté la méthode indirecte.

En anatomie-pathologique, l'IHC a un intérêt thérapeutique et diagnostique permettant de classer une tumeur et de définir son stade et son origine. Dans notre travail les substances antigéniques recherchées sont : **Ki67**, Alpha-fœtoprotéine **AFP**.

2.3.1. Etapes de la technique IHC

Les blocs de paraffine déjà préparés sont récupérés pour réaliser des coupes histologiques plus épaisses (5 μm), pour bien visualiser le marquage et éviter la sur-digestion de tissu ce qui donne un faux résultat.

L'étalement des coupes se fait sur des lames silanisées (thermo résistantes) pour réduire le risque de décollement des fragments à température élevée. Les lames sont mises dans l'étuve

(37°C à 42°C) pendant toute une nuit afin d'avoir une bonne adhésion des coupes sur les lames. Par la suite, on fait passer les lames successivement dans 3 bains de xylène et 3 bains d'alcools à concentration décroissante 96%, 80% et 70% de 5 min chacun, puis on rince les lames à l'eau distillée (5min).

2.3.2. Démasquage antigénique

Cette étape vise à briser les ponts créés par le formol lors de la fixation afin de rendre les sites antigéniques accessibles grâce à une technique appelée « récupération d'épitopes induite par la chaleur **HIER** » en appliquant les étapes suivantes :

- ✓ pour démasquer les sites Antigéniques : immerger les lames dans une solution de démasquage « **TRS** » préalablement préparée (diluée à 1/10 dans l'eau distillée) en gardant le pH requis (pH 6 ou 9) selon le type d'anticorps spécifique utilisé, et incubé dans un bain-marie à 98°C pendant 35minutes.
- ✓ Retirer les bacs et laisser refroidir sur la paille (20 min) à température ambiante afin d'éviter le choc thermique.
- ✓ Laver les lames avec de l'eau distillée puis avec un tampon TBS-T (tris-buffer saline tween) pendant 5 minutes.

2.3.3. Inhibition des molécules endogène.

- ✓ Incuber les lames dans la chambre humide obscure.
- ✓ Cercler les prélèvements avec un crayon hydrophobe (DAKO-PEN) pour empêcher les anticorps de diffuser sur toute la surface de la lame et réduire la quantité de réactifs.
- ✓ Bloquer la peroxydase endogène en incubant le tissu dans le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3 % à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- ✓ Rincer au TBS (Solution saline tamponnée, à pH =7,4) dans deux bacs pendant 5 minutes chacun afin d'éliminer les liaisons non spécifiques.

2.3.4. Application de l'anticorps primaire

- ✓ Appliquer l'anticorps primaire dilué sur les fragments (**Anti-protéine KI67/ α FP**).
- ✓ Mettre les lames dans une chambre humide à l'abri de la lumière pendant 35 minutes.
- ✓ laver avec de l'eau distillée puis dans un tampon TBS pendant 5 minutes.

2.3.5. Application de l'anticorps secondaire

- ✓ Appliquer l'AC secondaire HRP (amplificateur) couplé à la peroxydase de raifort pour toutes lames et laisser agir pendant 30 minutes dans une chambre humide à l'abri de la lumière.
- ✓ Laver avec de l'eau distillée puis dans un tampon TBS pendant 5 minutes.

2.3.6. Révélation

- ✓ Ajouter le Chromogène (DAB : une goutte avec 1 ml de substrat) sur chaque lame et Laisser incuber pendant 5 à 10 minutes.
- ✓ Rincer avec de l'eau distillée pendant 5 minutes afin d'arrêter la réaction.

2.3.7. Contre coloration

- ✓ Immerger les lames dans l'hématoxyline de Mayer qui va colorer le noyau pendant 3 à 5 minutes.
- ✓ Rincer à l'eau courant plusieurs fois puis avec de l'eau distillée pendant 5 minutes.
- ✓ Mettre les lames dans une solution ammoniacale pour bleuir les tissus, puis déshydrater et éclaircir.

2.3.8. Montage et observation

- ✓ Déposer les lamelles sur les lames à l'aide d'un milieu de montage aqueux (Faramount), et appuyez bien afin de chasser les bulles d'air ; Sécher l'ensemble à l'aide d'une compresse stérilisée.
- ✓ Observer les lames au microscope optique à différents grossissements (x10, x40), puis interpréter.

NB : Ne pas laisser les échantillons de tissu sécher pendant toute la durée du protocole.

Toute la technique se déroule à l'abri de la lumière sauf l'étape du chromogène.

2.4. Étude morphométrique

À partir des photos prises des coupes histologiques, nous avons opéré à l'histomorphométrie dans le but d'évaluer l'état physiologique du parenchyme hépatique et les lésions tissulaires causés par LCT. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel d'analyse et de traitement d'image « Image View version x 64, 4. 10.17614.20200822 », qui permet de mesurer les structures histologiques des organes étudiés à partir des observations microscopiques (**Figure 14**).

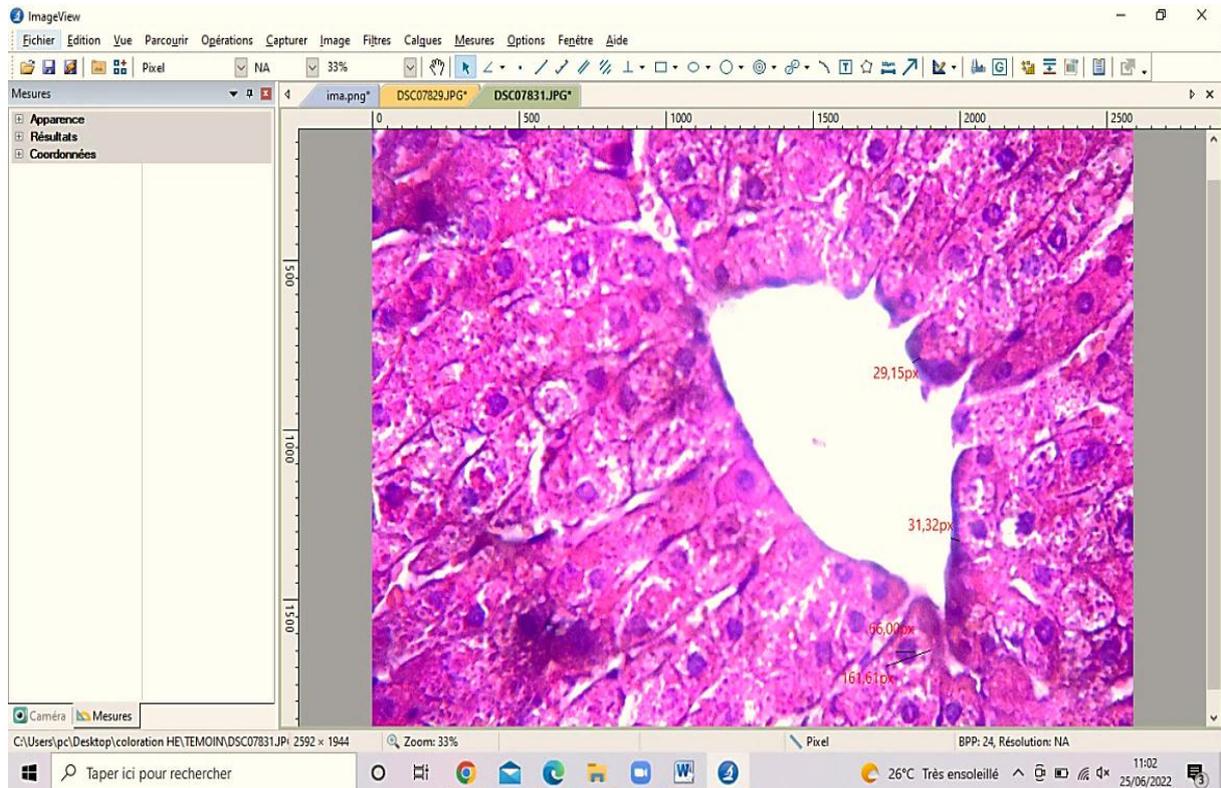


Figure 14 : Exemple d'une fenêtre du logiciel ImageView (**Originale**)

2.5. Etude statistique

Les valeurs des paramètres morphométriques ont été analysées statistiquement par le test d'ANOVA à un facteur au moyen du logiciel **STATISTICA Version 10**, en comparant le lot témoin à chacun des lots traités par lambda cyhalothrine (LCT) et Vitamines C + LCT.

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement et sous forme de moyenne \pm l'écart type. Une valeur $p < 0,05$ est considéré statistiquement significative.

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Résultat et Discussion

Dans la présente étude, des échantillons du foie de lapines témoins, traitées par un insecticide LCT et traitées + supplémentées par la vitamine C ont été utilisés. Le choix de cet animal est fondé sur plusieurs critères, étant donné que le lapin constitue un modèle expérimental qui est phylogéniquement proche de l'homme et aisé à manipuler, ainsi que sa taille permet d'obtenir facilement des échantillons tissulaires et sanguins (**Dewree et Drion, 2006 ; Sanroman, 2012 ; Gidenne et al., 2015**).

Le foie est l'organe majeur de multiples voies métaboliques et le premier site de la détoxification des pesticides. Son rôle dans la biotransformation des composés toxiques, le rend l'organe cible du stress causé par les xénobiotiques. De ce fait, l'homéostasie hépatique perturbée sous un tel stress est suffisante pour modifier la physiologie corporelle normale de tout organisme (**Bhushan et al., 2013 ; Mossa et al., 2015 ; Vardavas et al., 2016 ; El-Bialy et al., 2019**).

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble qui assure la protection des cellules contre les dommages oxydatifs infligés par les radicaux libres (**Fatmi, 2014 ; Buxeraud et Faure, 2021**). Dans ce contexte, notre travail s'intéresse aux variations histo-morphométriques et immunohistochimiques qui sont des critères importants pour l'évaluation de l'effet protecteur de la vitamine C contre l'hépatotoxicité induite par une administration journalière d'un insecticide pyréthrinaïde de type II appelé « lambda-cyhalotrine » chez les lapines.

Les résultats obtenus sont analysés et discutés en fonction de travaux relatés.

1.1. Etude histopathologiques

Nous avons réalisé trois types de colorations topographiques, l'hématoxyline-éosine (H&E), le trichrome de Masson et la réticuline, afin de mettre en évidence les altérations histopathologiques causées par LCT et rechercher l'effet protecteur de la vitamine C.

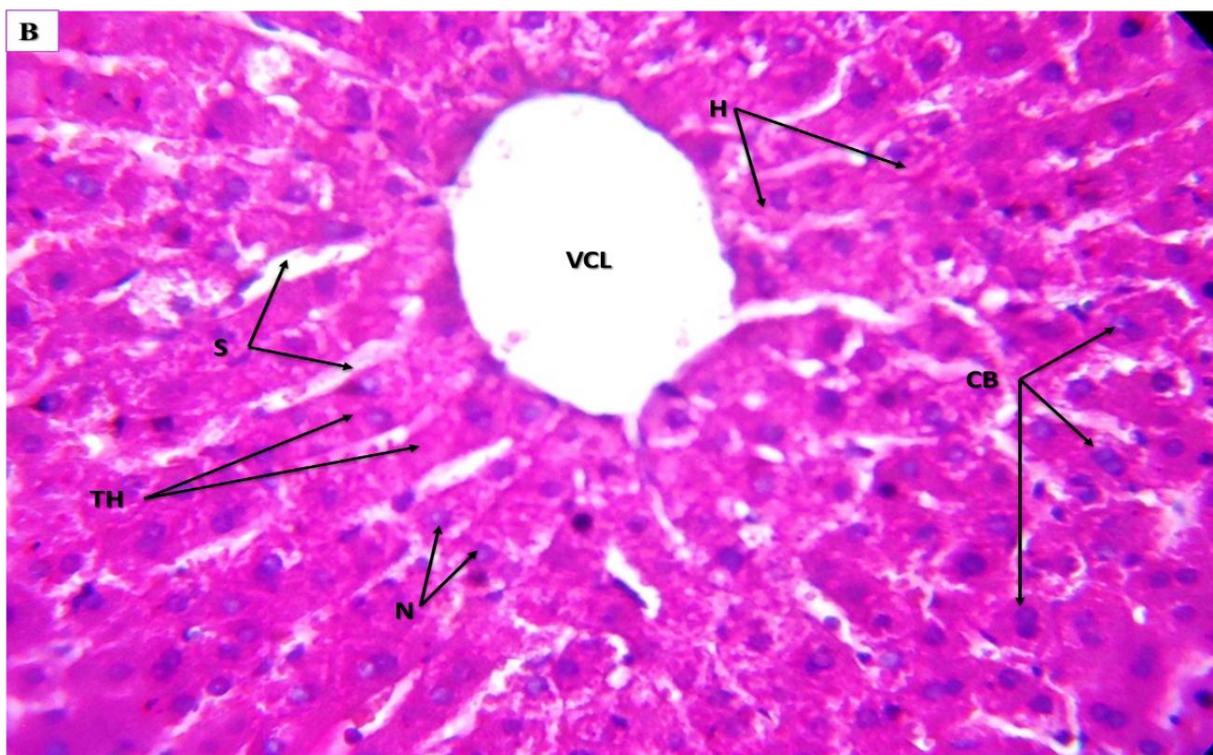
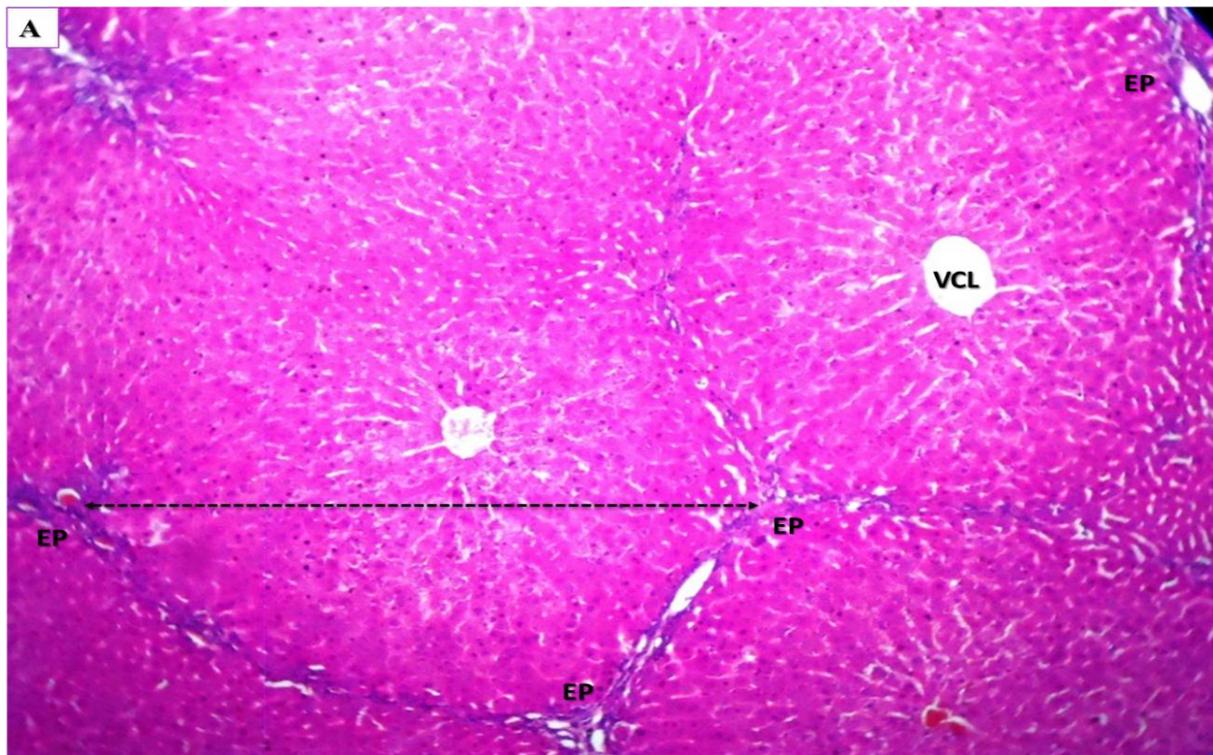


Planche 1 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration H&E, (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : **H** : hépatocytes ; **S** : sinusoïde ; **VCL** : veine Centro-lobulaire, **CB** : cellules binucléés ; **N** : noyaux ; **EP** : espace porte ; **TH** : Travées hépatocytaires \longleftrightarrow : Lobule hépatique.

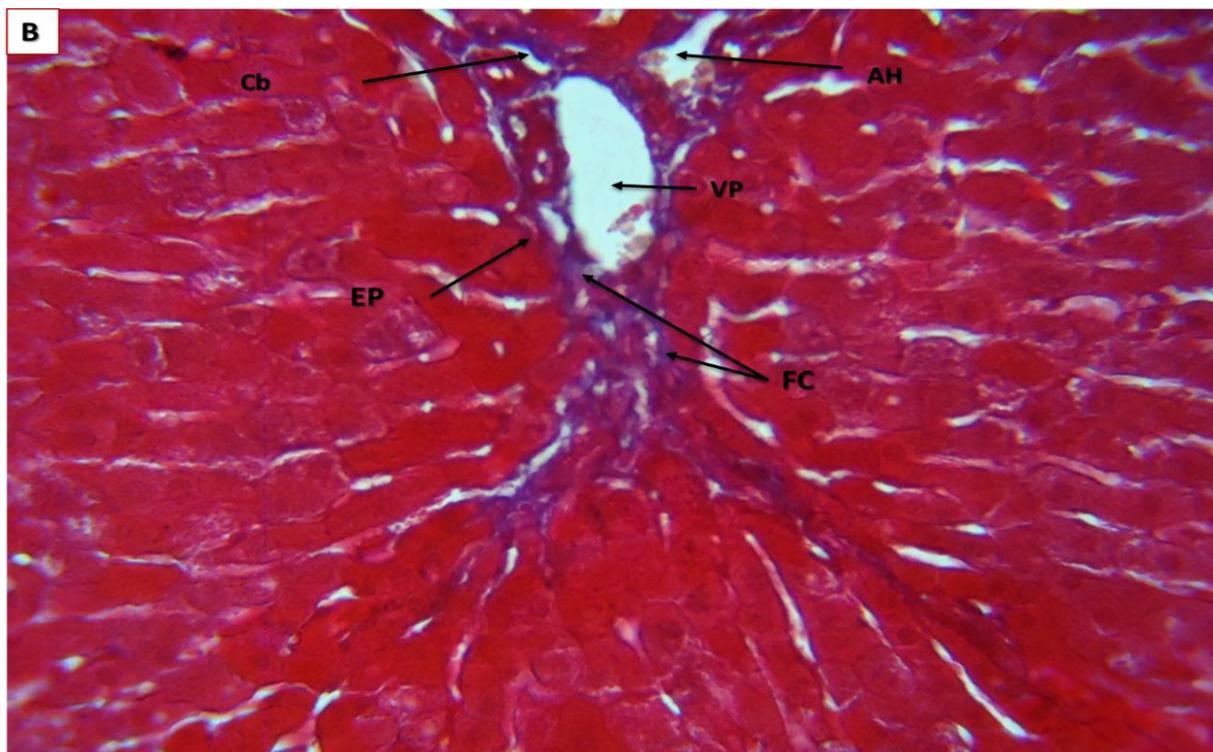
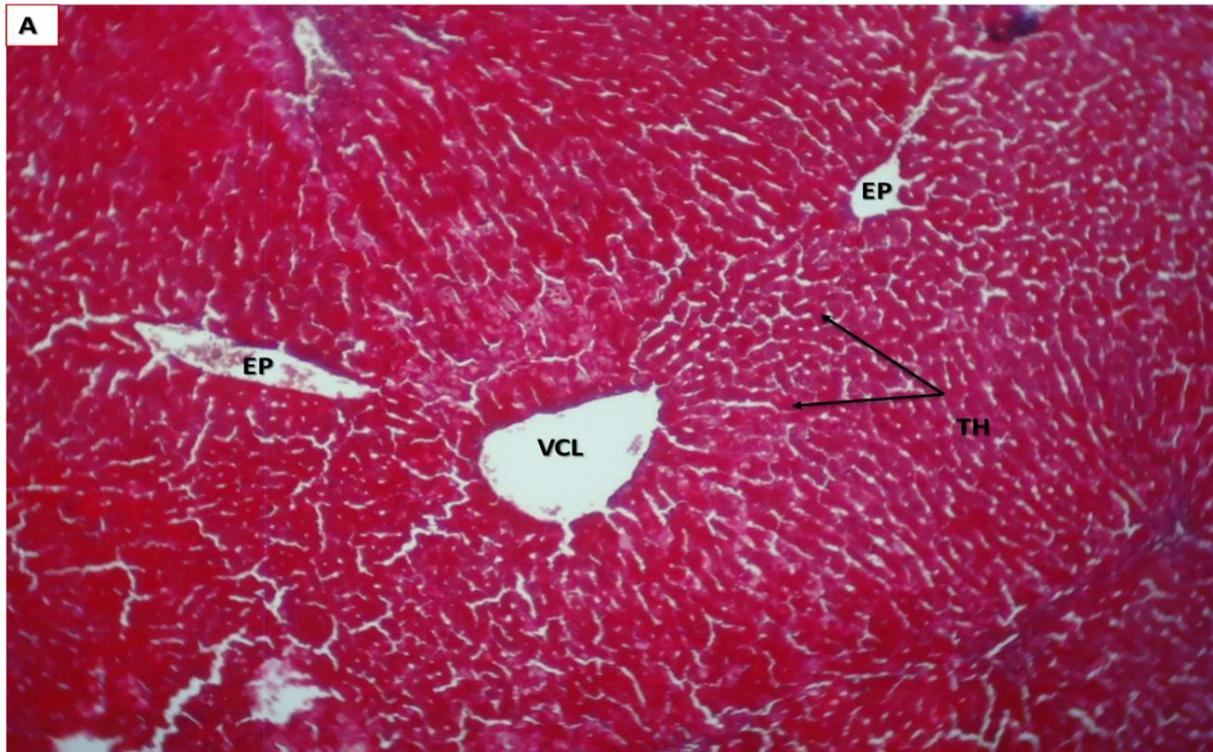


Planche 2 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration de trichrome de Masson (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : H : hépatocytes ; S : sinusoïde ; VCL : veine Centro-lobulaire ; EP : espace porte ; TH : Travées hépatocytaires ; FC : Fibre de collagène ; VP : veine porte ; AH : artère hépatique ; Cb : canal bélière.

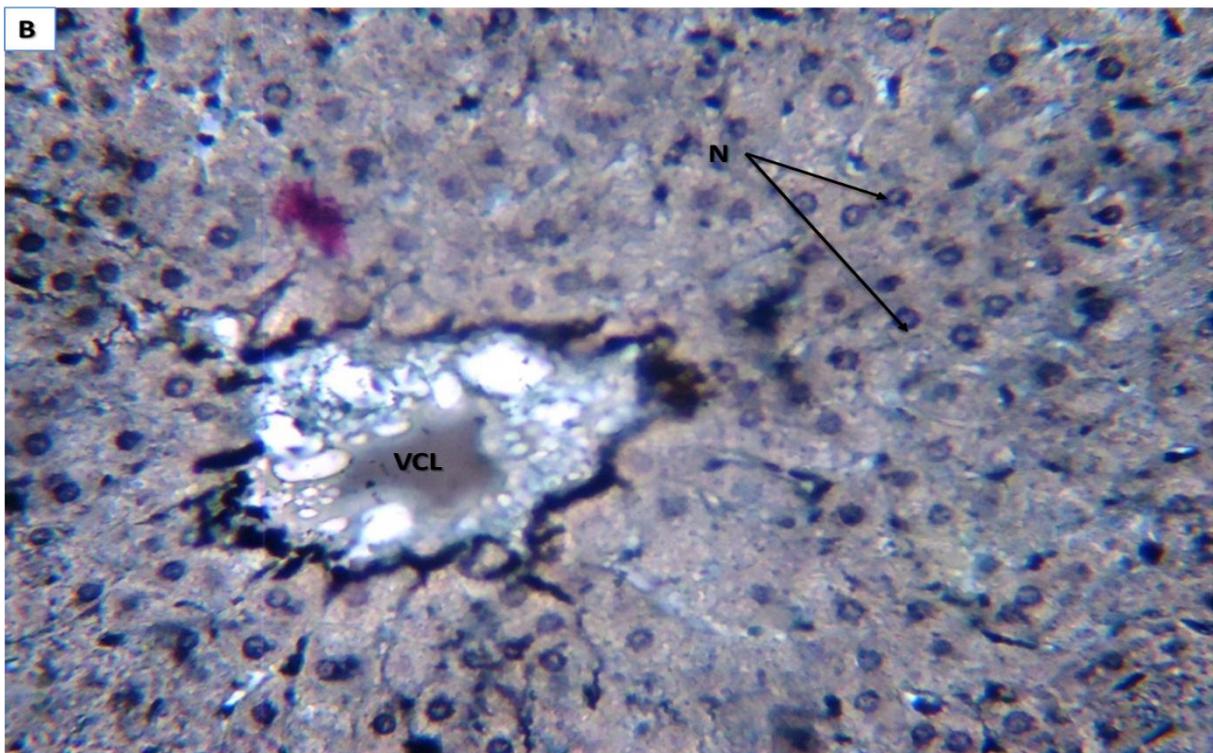
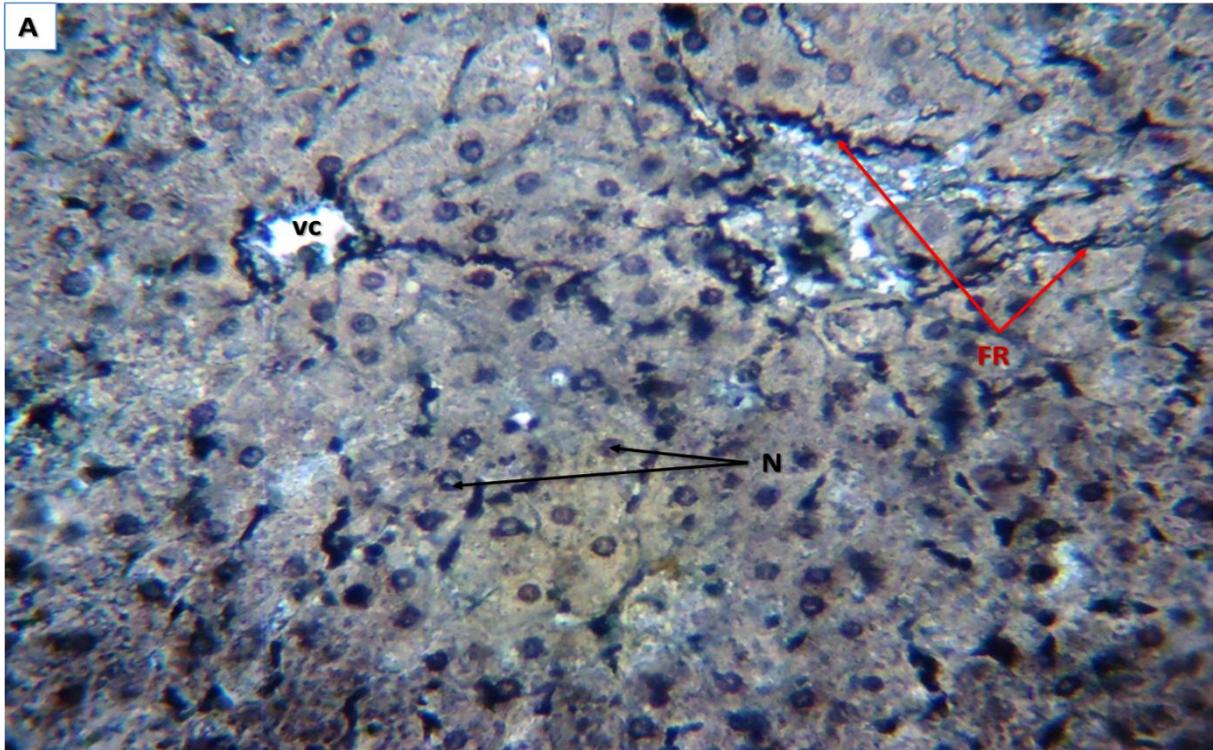


Planche 3 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines témoins, Coloration Réticuline. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : N : noyaux ; S : sinusoïde ; VCL : veine Centro-lobulaire ; FR : Fibre de Réticuline.

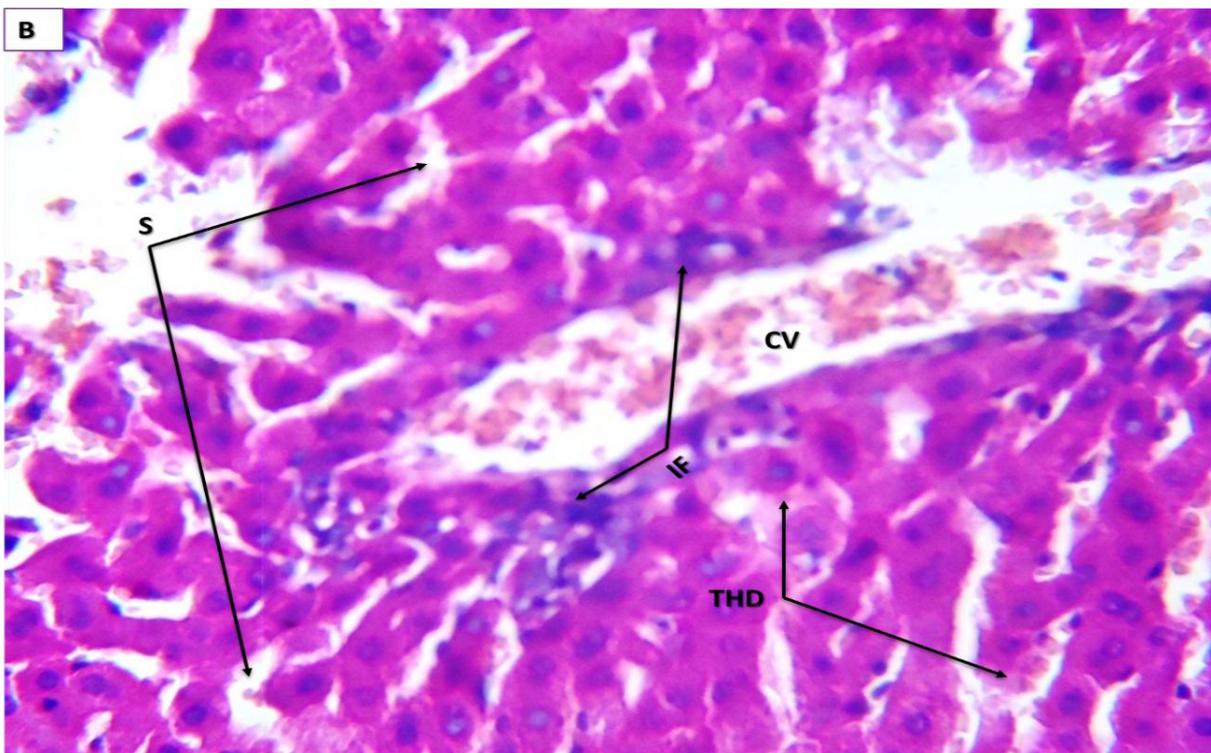
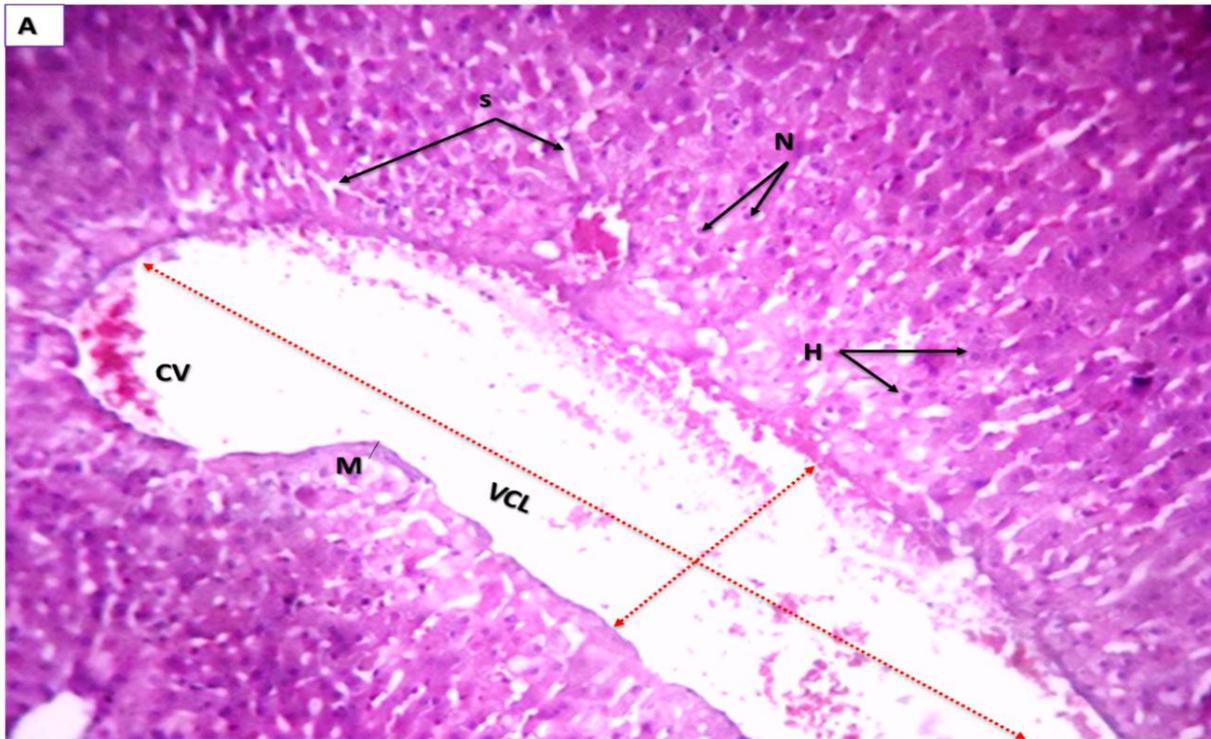


Planche 4 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines traités par LCT
Coloration H&E. (A) au faible Gr x 10 et (B) au fort Gr x 40.

Légende : S : Sinusoïde ; VCL : Veine Centro-lobulaire ; EP : Espace porte ; IF :
Infiltrat inflammatoire ; CV : Congestion de la VCL ; M : Membrane de la VCL ; THD :
Travées hépatocytaires dégénérées ;  Dilatation de la VCL ; N : noyaux

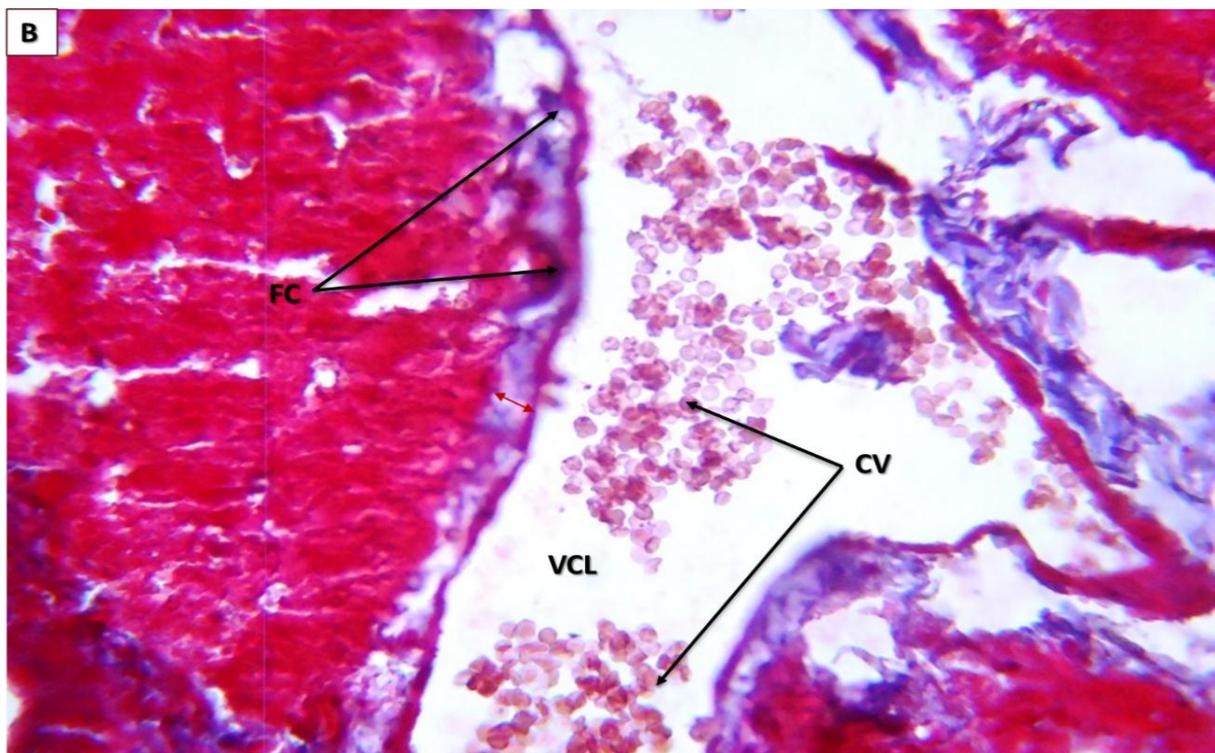
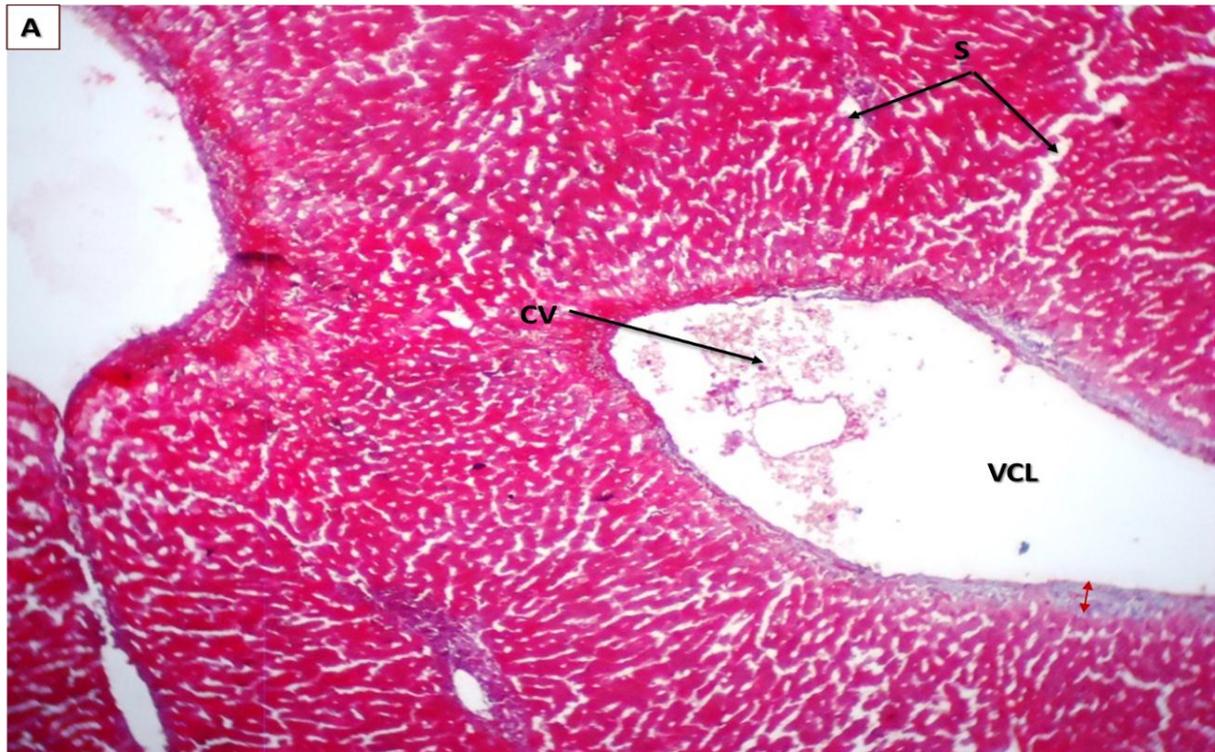


Planche 5 : Histologie du parenchyme hépatique des lapins traités par LCT, Coloration de trichrome de Masson. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : S : sinusöide ; VCL : veine Centro-lobulaire ; CV : Congestion de la VCL ; \longleftrightarrow : Épaississement de la membrane ; FC : Fibre de collagène.

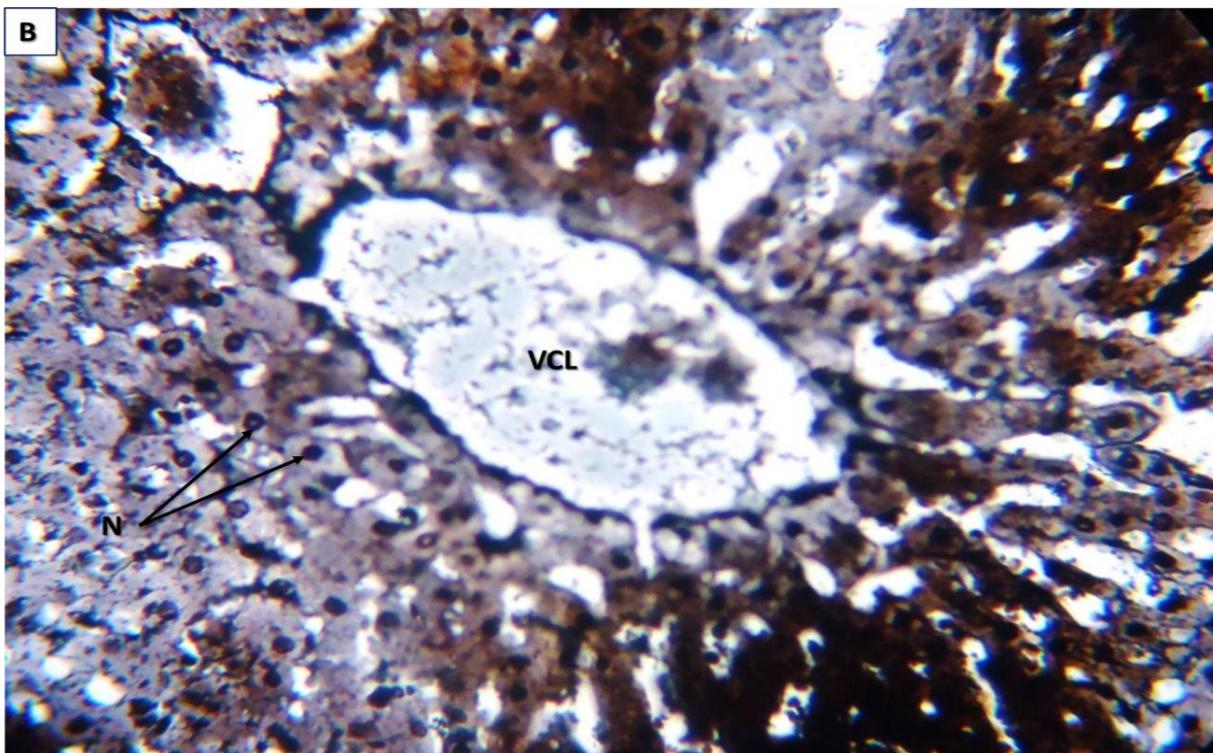
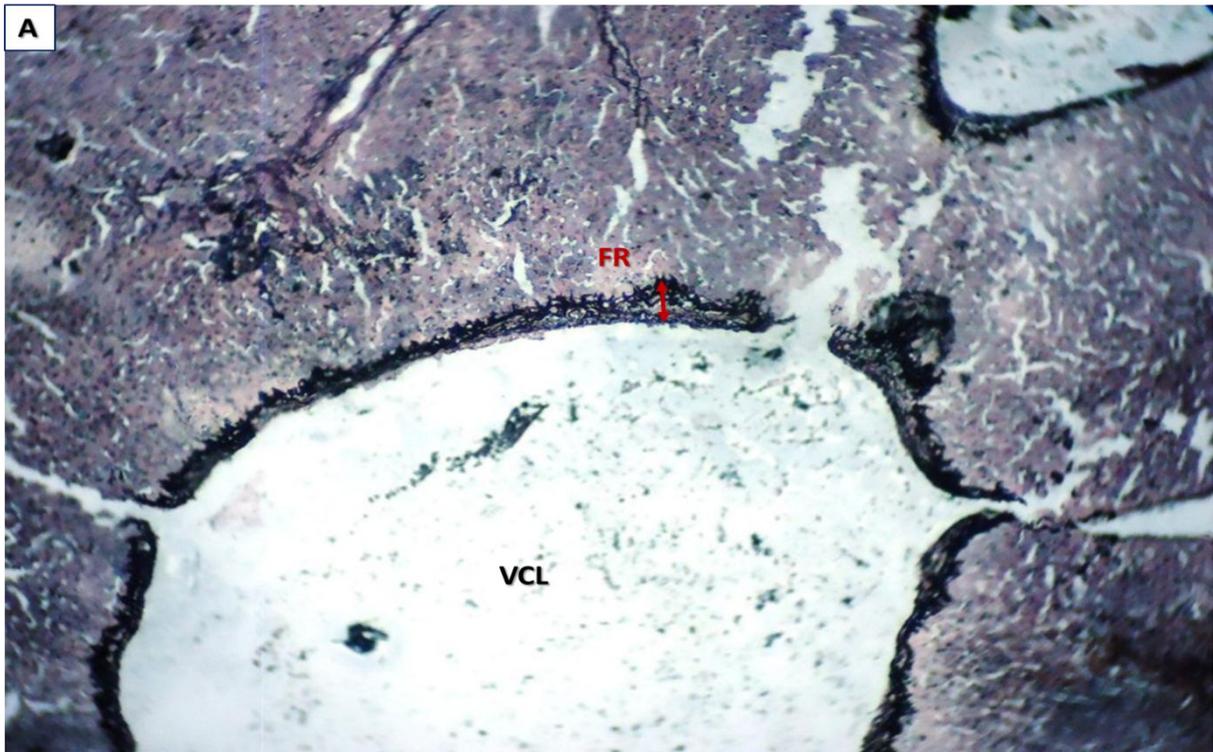


Planche 6 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines traités par LCT, mettant en évidence une dilatation de la VCL avec dépôt important de fibre de réticuline. Coloration Réticuline. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : N : noyaux ; VCL : veine Centro-lobulaire ; \longleftrightarrow : Épaississement de la membrane.

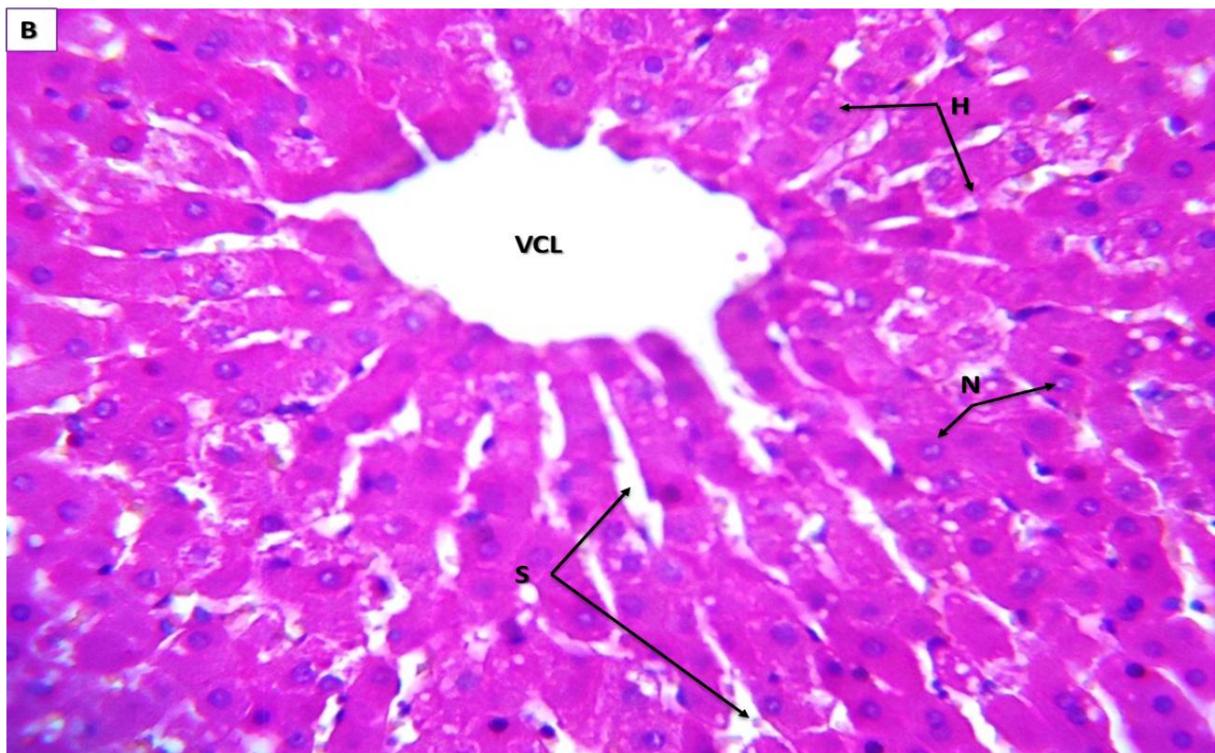
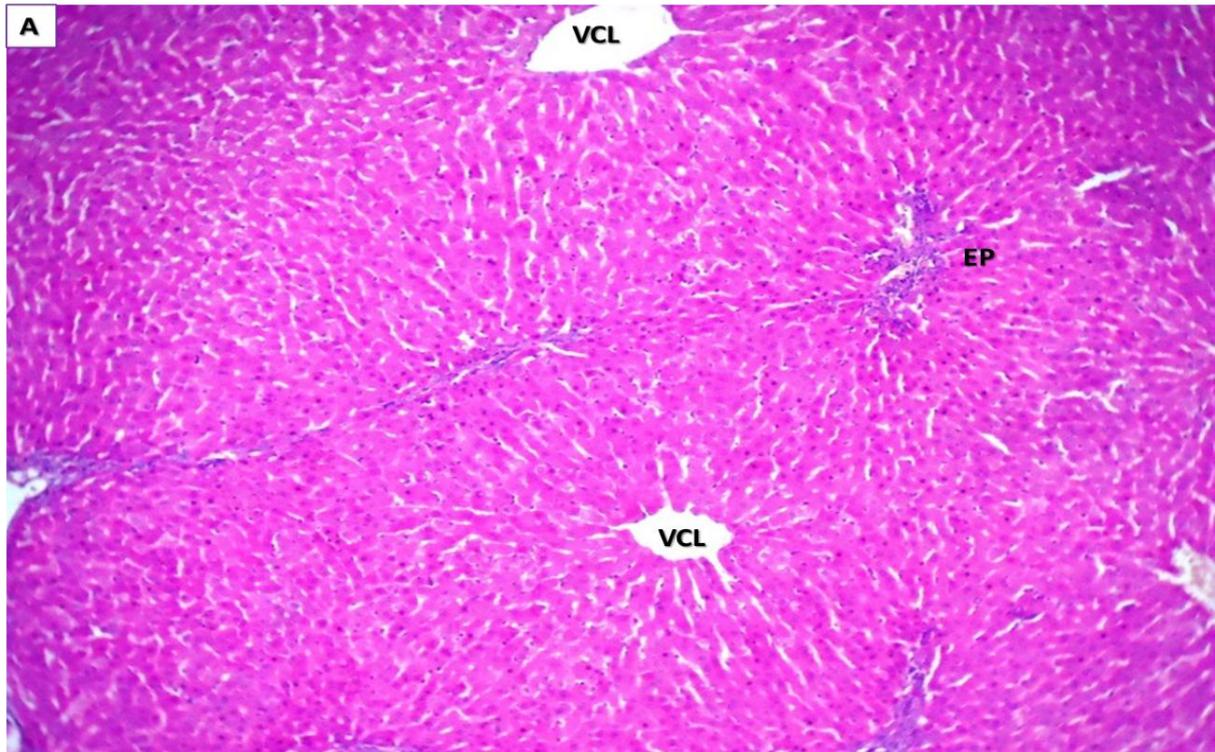


Planche 7 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration H&E. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : S : Sinusoïde ; VCL : Veine Centro-lobulaire ; EP : Espace porte ; H : hépatocytes ; N : noyaux.

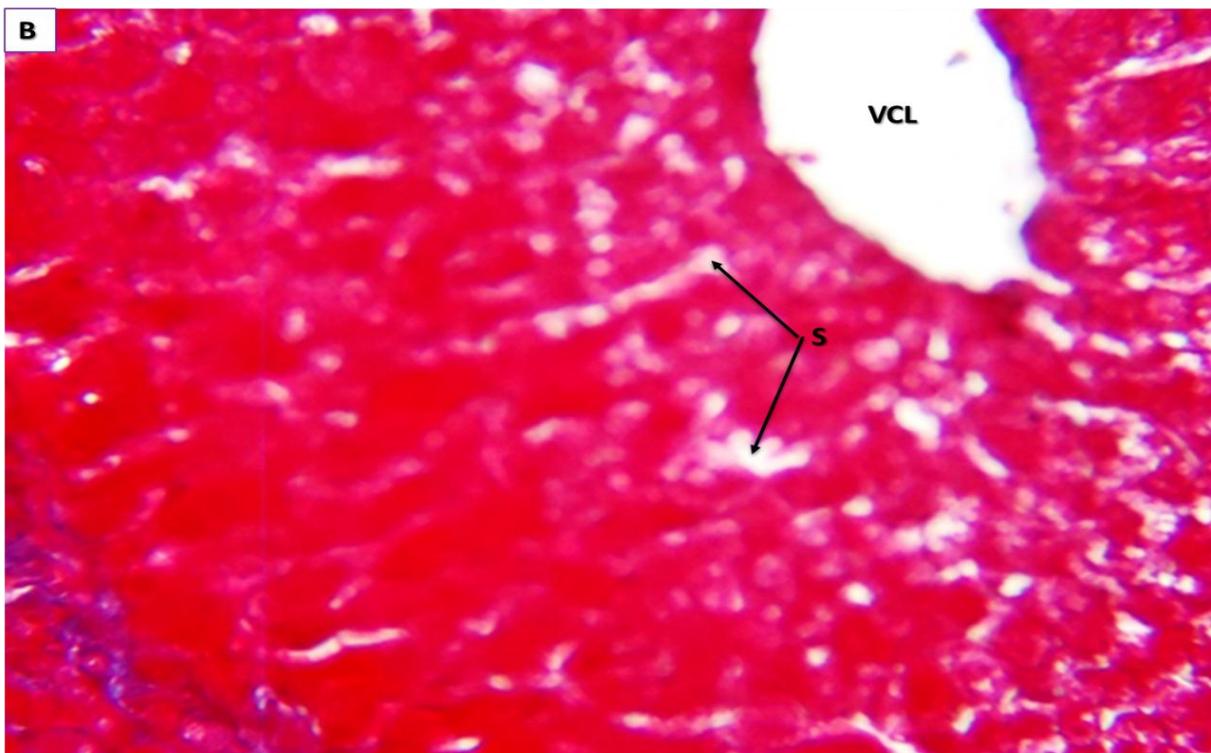
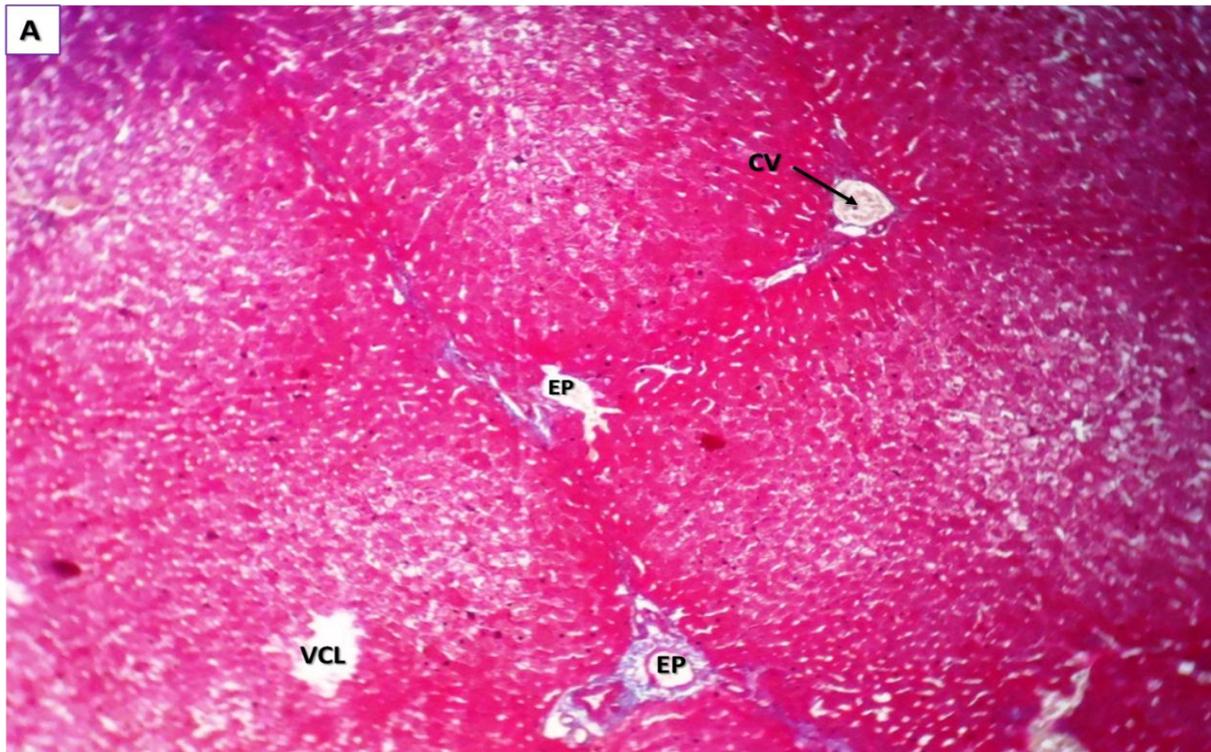


Planche 8 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration de trichrome de Masson. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : S : Sinusoïde ; VCL : Veine Centro-lobulaire ; EP : Espace porte ; H : hépatocytes ; N : noyaux ; CV : Congestion de la VCL.

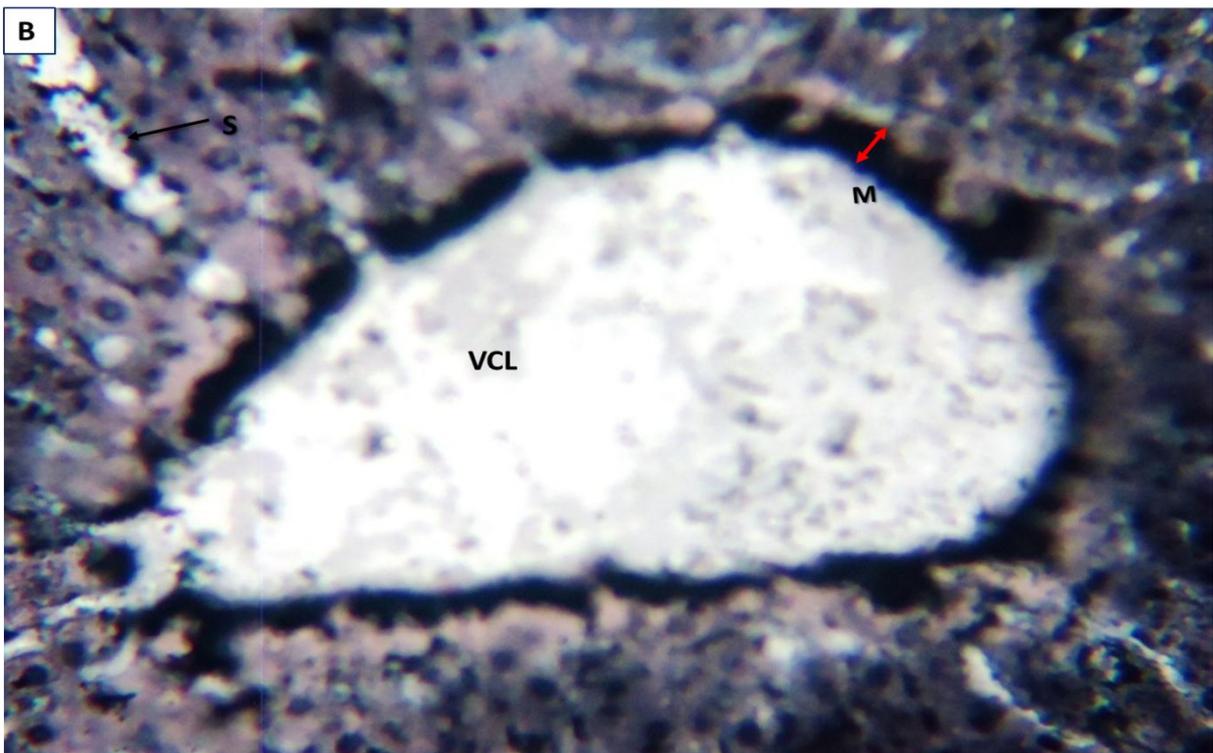
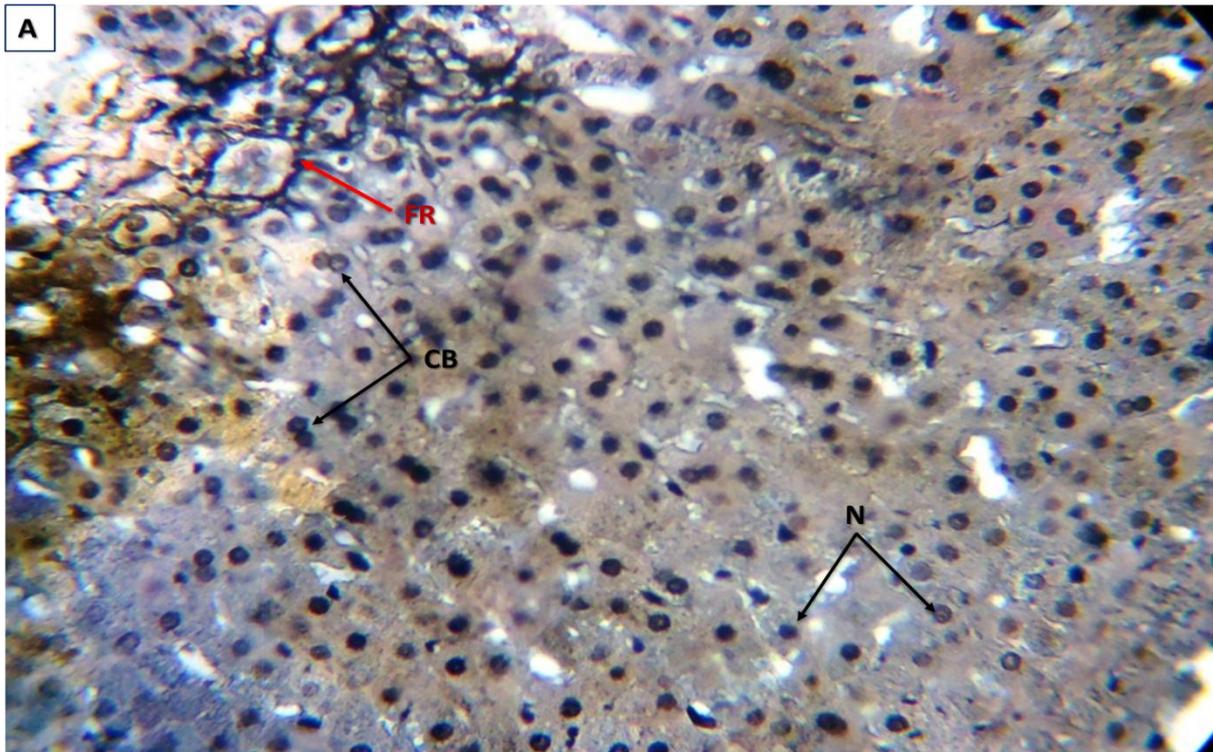


Planche 9 : Histologie du parenchyme hépatique des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. Coloration Réticuline. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.

Légende : N : noyaux ; VCL : veine Centro-lobulaire ; CB : cellules binucléés ; S : Sinusoïde ;  M : membrane de la VCL ; FR : Fibre de réticuline.

a) Coloration par l'hématoxyline éosine

• Groupe Témoins

L'observation des coupes histologiques du parenchyme hépatique de groupe témoin à différents grossissements révèle une organisation histologique du foie normal avec une architecture lobulaire bien conservée marquée par la présence de travées hépatocytaires disposées en fils radiaires autour d'une veine centrolobulaire (VCL).

Ces travées sont séparées par des capillaires sinusoides (S) sous forme d'espace peu colorée dont la limite hexagonale irrégulière du lobule est défini par les espaces portes « triades » qui comprennent les vaisseaux sanguins, les canalicules biliaires et les artères.

Les hépatocytes présentent un cytoplasme dense (rose définit par la coloration HE; rouge par la coloration de trichrome de Masson) avec un ou deux noyaux arrondis de taille variable (noyau bleu/violet définit par la coloration HE ; noyau bleu foncé/noir pour la coloration de Trichrome de Masson), comportent une chromatine dispersée à la périphérie (**Planche 1-2**).

Des résultats similaires ont été reportés par plusieurs études faites sur le lapin (**Ahmad et al., 2011 ; Boumezrag et al., 2021**) et autres modèles animaux poussins (**Aouey et al., 2017**) , le rats (**Alrawe et ALzubaidy, 2022**) n'ayant montré aucune lésion histologique hépatique chez le groupe témoins.

• Groupe traite par LCT :

L'examen du parenchyme hépatique traiter par LCT à faible puis au fort grossissement montre une architecteur plus au moins désorganisé des lobules hépatiques par rapport au foie témoin.

Les altérations structurales et cellulaires—représentées dans la (**Planche 4-5-6**) se résument comme suit :

- Une dilatation et congestion sanguine importante de la veine centro-lobulaire et des espaces porte, ainsi qu'une distension et hémorragie sinusoidale.
- Epaissement de la membrane de la VCL.
- Présence d'un infiltrat inflammatoire péri-portale polymorphe constitué de cellules lymphocytaire et autours de la VCL.
- Dégénérescence des hépatocytes avec désorganisation de l'agencement des cellules en travées autour de la VCL.

Ces résultats sont en accord avec les travaux d'autres chercheurs suite a toxicité par lambda cyhalothrine chez le lapin (**Basir et al., 2011 ; Adam, 2020 ; Boumezrag et al., 2021 ; Settar et al., 2022**) qui ont montré les même altérations histologiques du foie.

Plusieurs études (**Ramadhas et al., 2014; Al-Sarar et al., 2014 ; Aouey et al., 2017 ; Abdul-Hamid et al., 2020 ; Alrawe et ALzubaidy, 2022**) Ont rapportés des résultats pareils du foie traité avec la lambda-cyhalothrine chez les poussins ,les rats / souris indiquant que la lambda-cyhalothrine provoque une hépatotoxicité avec une toxicité subaiguë.

Ainsi, cela peut être dû aux dommages oxydatifs causé par la LTC en augmentant la peroxydation lipidique et en réduisant l'activité des principales enzymes antioxydantes (**Fouzai et al., 2020**) ont prouvés que le traitement par LCT provoque une génération des radicaux libres et des dommages oxydatifs des protéines qui présentes une source possible de la pathogénèse des lésions hépatiques mais chez les organismes aquatiques.

(**He et al., 2020 ; Jebur et al., 2021 ; Rehman et al., 2021 ; Saeed et Iqbal, 2021 ; Allam et al., 2022 ; Majumder et Kaviraj, 2022**) démontre que l'induction d'un stress oxydatif suite à une exposition aux autres pyréthrinoides de type II (Cyperméthrine Et Bêta-Cyfluthrine /// deltamethrine) chez les lapins et les rats perturbe les mécanismes de défense antioxydants et renforce la peroxydation lipidique entraînant des altérations tissulaire au niveau de foie qui constituent probablement des signes d'une hépatotoxicité similaires aux celles de lambda cyhalothrine.

- **Groupe traites par LCT et supplémenté avec la vitamine C :**

Au faible grossissement (Gr X10), Les résultats microscopiques du foie de lapines traités par la LTC et co- administrés avec la Vit c montrent un parenchyme moins altérer et une architecture lobulaire réorganiser comparativement à celle observée chez le lot traité par lambda cyhalothrine uniquement, Nous avons aussi remarqué une légère dilatation de la veine centrolobulaire et des espaces portes avec absence de congestion et d'infiltrat inflammatoire (**Planche 10-11-12**).

Au fort grossissement (Gr X40), on observe des travées hépatocytaires moins désorganisées et bien structurées comme celle observé chez les témoins qui convergent radiairement vers une veinecentrolobulaire. De plus, nous avons remarqué une intense activité régénérative hépatocytaire qui se manifeste par un cytoplasme dense avec des noyaux arrondis basophiles fortement nucléolés (colorés en bleu). Ceci reflète l'effet amélioratif et

protecteur de la vitamine C, dans la régression des lésions tissulaire et la diminution des effets nocifs causé par ce biopesticide.

Nos résultats corroborent avec ceux de **Fetoui et al. (2009)** qui ont trouvés une réduction des dommages hépatique suite à une supplémentation par la vitamine C et suggèrent que ce mécanisme d'hépatoprotection de la vitamine C est probablement du soit à ses propriétés de piégeage des radicaux libres et/ou à l'effet indirect comme un régulateur de système antioxydant. L'effet protecteur de la vitamine C sur l'activité des enzymes de stress oxydant causé par des insecticides a été reporté par plusieurs auteurs (**Mossa et al., 2011 ; Hussein et al., 2012 ; Adikwu et Deo, 2013**).

Selon **Pehlivan, (2017) et Hassan et al., (2020)** la vitamine C agit comme puissant antioxydant favorisant un grands nombre de réactions métaboliques, notamment le métabolisme des protéines, cicatrisation. Son rôle dans la stimulation du système immunitaire, la prévention et l'élimination des infections en tant que coenzyme est à l'étude.

Toutefois, une autre étude de **Uzunhisarcikli et Kalender, (2011)** sur l'effet protecteur des vitamines C et E contre l'hépatotoxicité induite par un autre insecticide de la famille des pyréthriinoïde « méthyl parathion » ont rapportés des résultats similaires.

De plus, les données histopathologiques de **Al-Omar et al. (2020)** ont montré que la Co administration de la vitamine C chez les rats intoxiqués par un autres insecticide pyréthriinoïde a provoqué une récupération des dommages au foie par rapport aux groupes exposés aux pyréthriinoïdes, comme l'acide ascorbique a amélioré les lésions tissulaires dans le cadre de la présente étude.

b) Coloration par le trichrome de Masson

La coloration topographique trichrome de Masson est utilisée pour détecter le collagène présent dans les voies portes et les parois des vaisseaux, mais indique également la présence et la distribution des fibres suite à une lésion hépatique (**Krishna, 2013**).

Chez le témoin, les coupes histologiques colorées ont montré un dépôt modéré de fibres de collagène au niveau de la membrane des triades portes (**Planche 2**).

Une coloration plus dense a été observée chez les animaux traités par LCT par rapport à celle de témoin, mettant en évidence l'accumulation de collagène autour la veine centrale (**Planche 5**). Nos résultats démontre que l'exposition à LCT affecte la fonction régulière des hépatocytes de synthétiser le collagène en raison des dommages oxydatifs générés (**Hall et al., 2021**).

Concernant le lot LCT + vitamine C, il présente peu de fibres collagénique autour la veine central en comparaisant avec le lot traité uniquement par LCT (**Planche 8**). Cela renforce encore le fait que la supplémentation de la vitamine C exerce un effet amélioratif au maintien du collagène (**Yu et al., 2015**).

c) Coloration par la réticuline

les fibres de réticuline ont été détecté avec une coloration au nitrate d'argent ; ces derniers apparaissent noires sur un fond gris à rose clair (**Krishna, 2013**).

Chez le témoin, l'examen microscopique a démontré la présence d'un grillage délicat de fibrilles très fines de réticuline (entrecroisées), propagées dans l'espace de Disse et entourées les hépatocytes ce qui révèle l'aspect normal de foie, d'où ces fibres sont présentes dans le cadre de la matrice extracellulaire (**Planche 3**) (**Krishna, 2013**).

Concernant les lapines traitées par LCT, cette coloration a montré la présence d'un grand dépôt de fibres réticulinique autour de la veine centrale ainsi dans les sinusoides (**Planche 6**). Ceci peut être expliqué par un mécanisme de compensation de tissu nécrosé renforçant encore le fait que l'agression par LCT provoque des changements cellulaires dégénératifs et modifie la synthèse de certaines protéines (**Fyfe et al., 2018**).

L'accumulation de ces fibres vient d'indiquer la causalité des dilatations vasculaires observées après leur rétrécissement .Cependant, le dépôt de fibres de réticuline observés chez le lot LCT+vitamine C est moins sévère à celui observé chez les traités par l'insecticide seul et presque similaire à celui de témoin révélant le rôle amélioratif de vitamine c dans le maintien de l'adhérence cellulaire et protecteur contre l'hépatotoxicité de cet insecticide (**Planche 9**) (**Yu et al., 2015**).

1.2. Etude histomorphométrique

Dans le présent travail nous avons réalisé une étude histomorphométrique afin d'évaluer l'impact de l'insecticide LCT sur le parenchyme hépatique et l'effet amélioratif probable de la vitamine C. pour cela différents paramètres ont été mesurés (μm) : La taille des noyaux, de cytoplasme, le rapport nucléo-cytoplasmique des VCL ainsi que leurs diamètre et l'épaisseur de sa membrane, la distance entre la VCL et les triades.

Les moyennes des valeurs obtenues par le test ANOVA sont représentées dans le (**Tableau VI**) et sous formes graphiques (**Figure 16, 17, 18, 19, 20, 21**).

Tableau VI : Moyennes des mesures de différents paramètres morphométriques des lobules hépatiques (M+SEM)

Dose Paramètre	Témoins	Lambda cyhalothrine	LCT + Vitamine C
Taille de Noyaux (μm)	63,06 \pm 0,61	68,50 \pm 1,13	61,32 \pm 1,2
Taille de Cytoplasme (μm)	173,55 \pm 2,32	194,23 \pm 7,25	134,15 \pm 3,48
Rapport Nucléo / Cytoplasmique	0,36 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01
Diamètre (μm) VCL	122,87 \pm 9,05	72,46 \pm 7,70	1840,61 \pm 72,31
Distance (μm) (VCL – TRIADE)	644,62 \pm 27,69	601,76 \pm 28,61	485,09 \pm 18,22
Épaisseur de la membrane VCL (μm)	28,34 \pm 0,31	31,87 \pm 0,83	77,95 \pm 4,51

a) Taille des noyaux

Comparativement au groupe témoin, les résultats illustrés dans **la figure 28** montrent une légère diminution de la taille des noyaux chez le lot traité par la LTC de l'ordre de 2,83%. Cependant on remarque une augmentation significative ($p < 0,05$) de la taille des noyaux des hépatocytes des lapines traitées par LCT et supplémentées par la vitamine C de l'ordre de 8,62% (**Figure 16 et Tableau VI**).

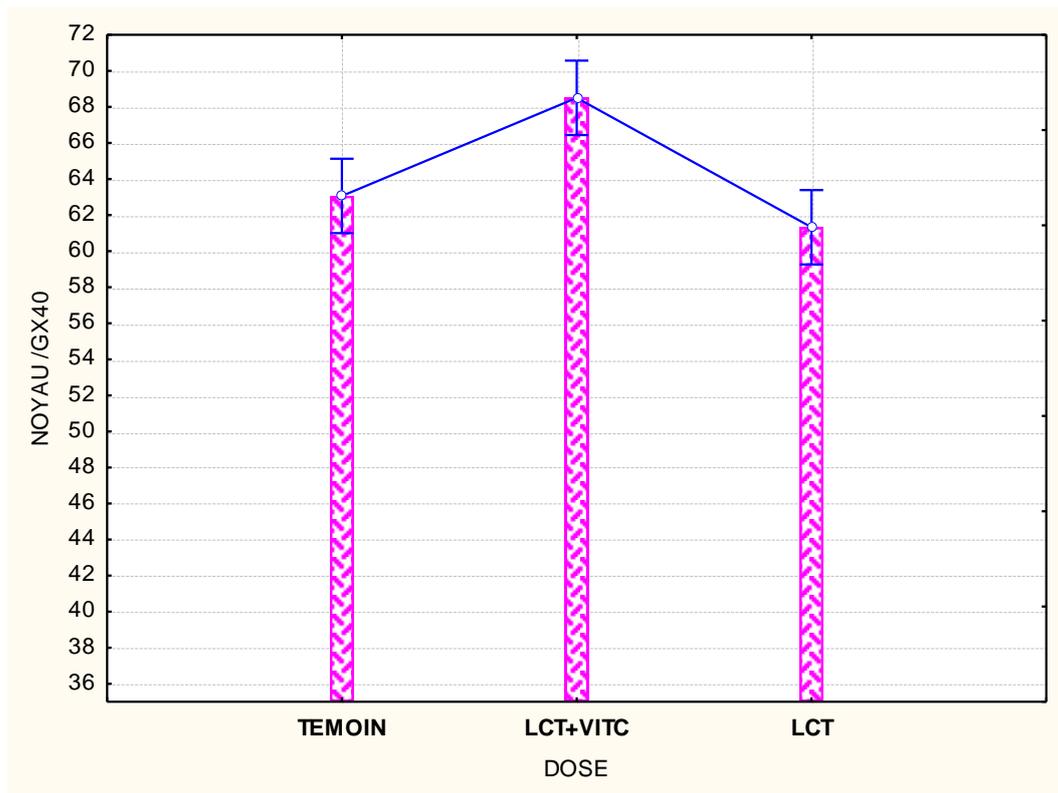


Figure 15 : Variation de la taille des noyaux chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe Co-administré par LCT et la vitamine C.

b) Taille du cytoplasme

Concernant la taille du cytoplasme des hépatocytes, après traitement par LCT nous constatons une diminution hautement significative ($p < 0,05$) de l'ordre de **29,37%** par rapport au témoin ; tandis que nous notons une légère augmentation significative ($p < 0,05$) de l'ordre de **11.91 %** pour le lot LCT+VITC (**Figure 17 et Tableau VI**).

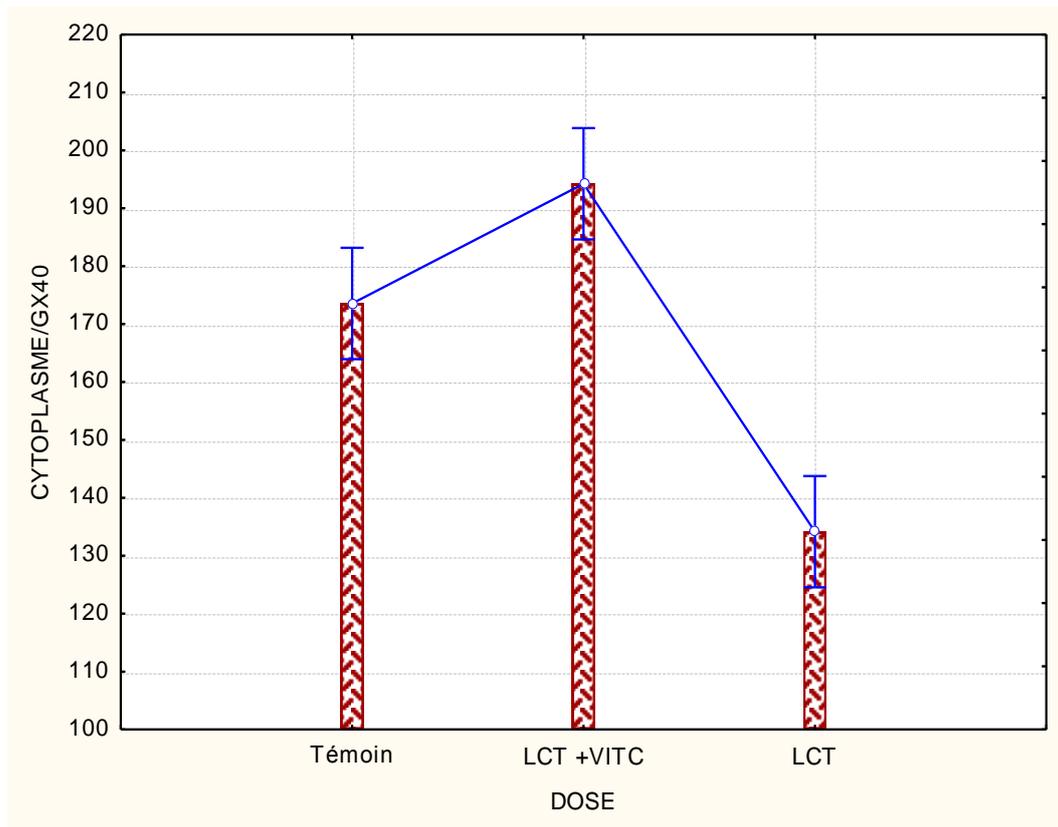


Figure 16 : Variation de la taille de cytoplasme chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe co-administré par LCT et la vitamine C

c) Rapport nucléo- cytoplasmique

Les histogrammes illustrés dans **la figure 30** montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre entre le noyau et le cytoplasme chez le lot traité par la LTC par rapport au témoin. Cette augmentation est de l'ordre de 25% (**Figure 18 et Tableau VI**).

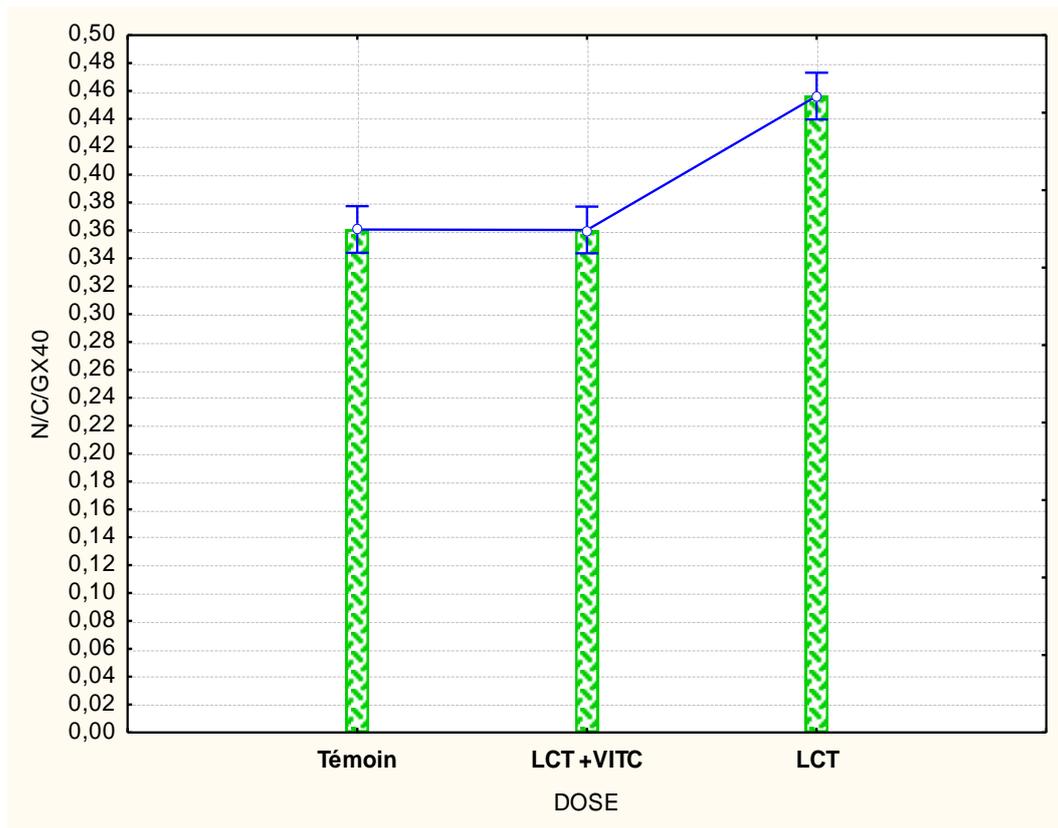


Figure 17 : Variation de rapport nucléo-cytoplasmique chez les différents lots.
Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LTC ; LCT+VITC : Groupe Co-administré par LTC et la vitamine C.

d) Épaisseur de la membrane de la veine centro-lobulaire

L'épaisseur de la VCL chez le lot traité par la LCT ainsi que celle du groupe co-administré LCT + VITC ont relativement augmentés par rapport au témoin, mais cette augmentation est presque 2 fois plus accentuée dans le groupe traité par LCT donc hautement significative ($p < 0,05$) (**Figure 19 et Tableau VI**).

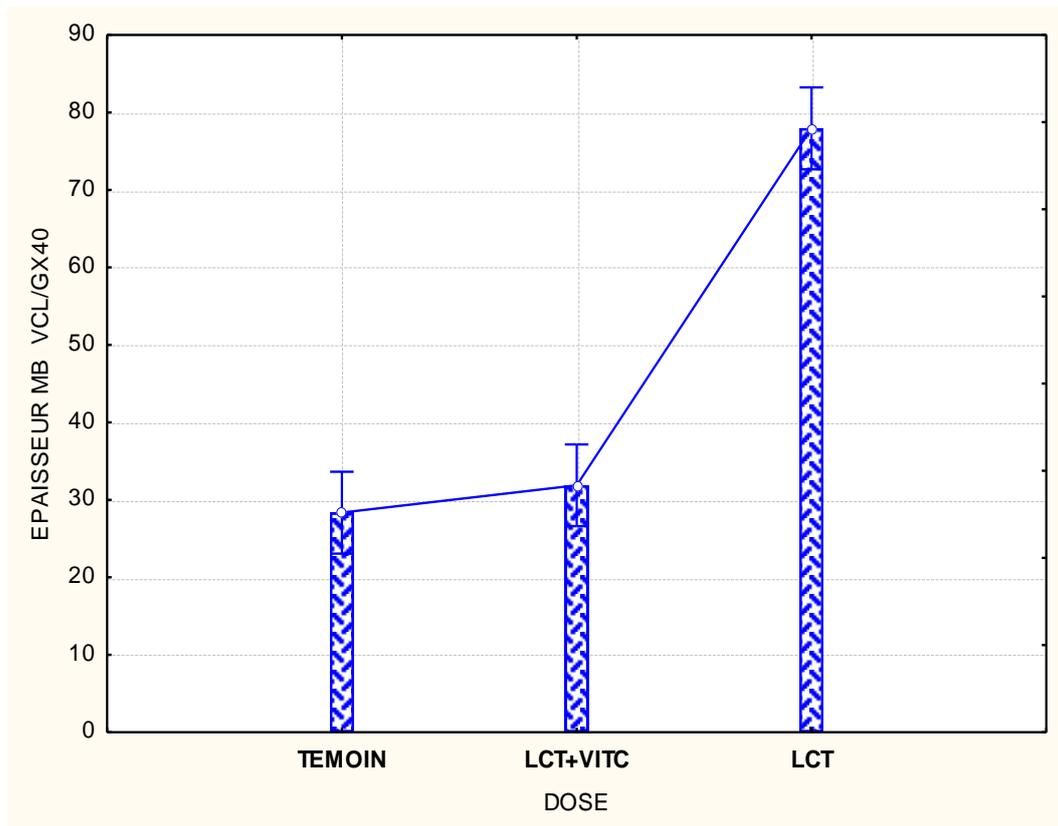


Figure 18 : Variation de l'épaisseur de la VCL chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe Co-administré par LCT et la vitamine C

e) Diamètre de la veine centro-lobulaire

Les résultats morphométriques montrent que le traitement par LCT induit une importante augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre de la VCL environ 11 fois comparativement au groupe témoin

Concernant le groupe Co-administré par les vits C et par LCT, une diminution de ce paramètre est constatée par rapport au témoin (**Figure 20 et Tableau VI**).

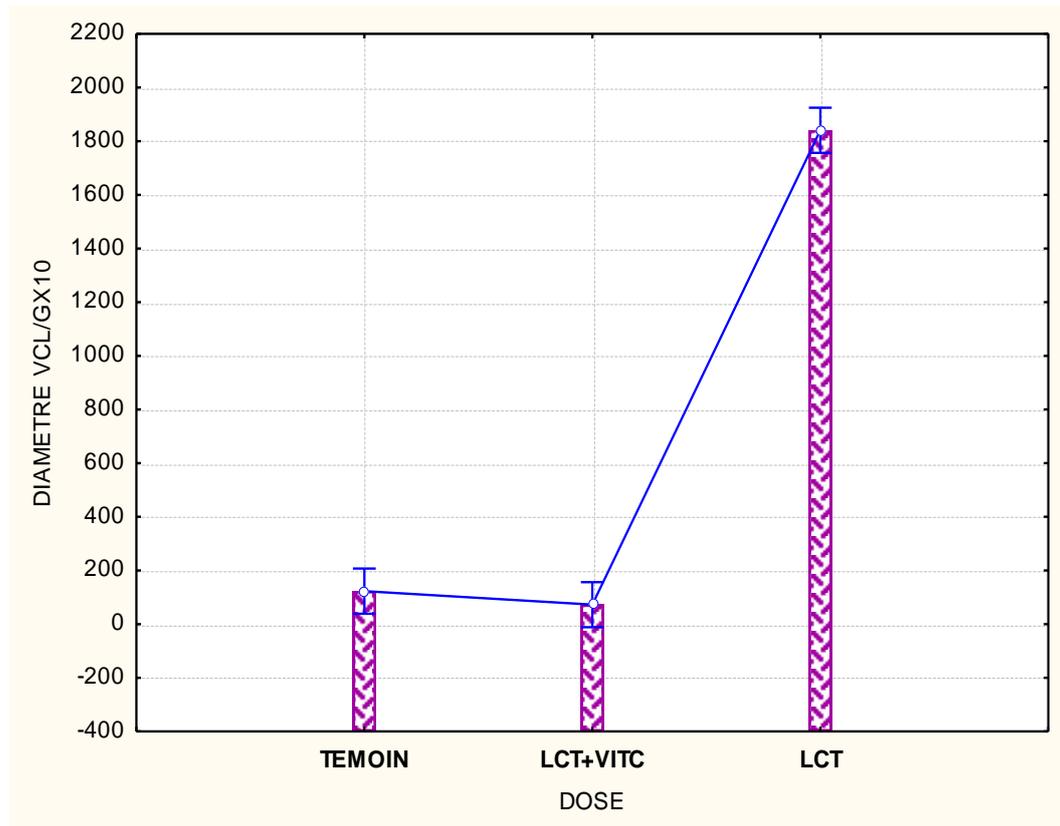


Figure 19 : Variation de diamètre de la VCL chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe Co-administré par LCT et la vitamine C

f) Distance entre la veine centro-lobulaire et les triades

Nous remarquons une diminution de l'espace entre la VCL et la triade pour les deux groupes traités par LCT et co-administré LCT + VITC par rapport au groupe témoin

Cet espace a significativement diminué ($p < 0,05$) avec un ordre de 32,88 % après l'exposition à notre insecticide comparativement au groupe témoin (**Figure 21 et Tableau VI**).

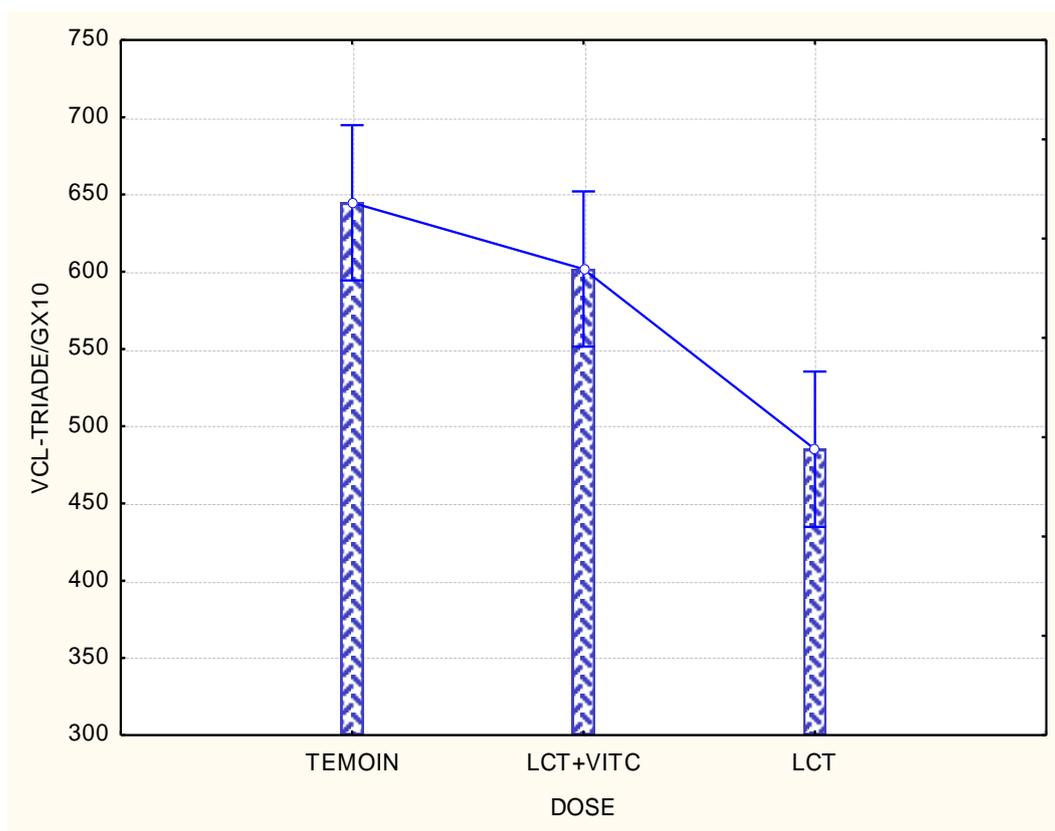


Figure 20 : Variation de l'espace entre la VCL et la triade chez les différents lots. Groupe témoin ; LCT : Groupe traité par LCT ; LCT+VITC : Groupe Co-administré par LCT et la vitamine C

Les résultats morphométriques viennent de confirmer nos résultats histopathologiques, qui montrent une réduction significative du diamètre des noyaux et des cytoplasmes des hépatocytes chez le lot traité par LCT en comparaison avec le témoin, ce qui se traduit par une dégénérescence hépatocytaire et nucléaire suite à l'exposition subaiguë à l'insecticide (**Watanabe et al., 1983 ; Fabre et Patriarche, 1995**).

Le rapport nucléo cytoplasmique affirme ces précédent résultats, dont la valeur chez les lapines traitées par la LTC ($0,45 \pm 0,01$) est supérieure à celle obtenue chez le témoin ($0,36 \pm 0,01$).

Le diamètre de la veine centro-lobulaire ainsi que l'épaisseur de sa membrane ont relativement augmentés chez le lot traité par rapport au groupe témoin, confirmant ainsi l'importante dilatation de la VCL et l'épaississement de sa membrane.

Concernant la distance entre la veine centrolobulaire et les triades nous constatons une réduction significative au niveau des lobules hépatiques des sujets traitées par LCT, ceci est probablement due à une dégénérescence hépatocytaire (**Watanabe et al., 1983**).

Donc on constate une relation inversement proportionnelle du diamètre de la veine centrolobulaire et de la longueur des travées hépatocytaires c'est-à-dire plus la VCL est dilaté et son diamètre augmente, plus la distance entre cette dernière et le système porte diminue. Ces résultats corroborent avec ceux de **Mamun et al. (2014)** qui ont observés une dilatation des veines centrolobulaires chez les rats traités par LCT.

L'examen microscopique a montré que les lésions pathologiques induites par la LCT ont été remarquablement réduites suite à la supplémentation de la vitamine C. Ceci est affirmé par la diminution du diamètre de la VCL, l'épaisseur de sa membrane et l'augmentation de la distance entre la VCL et la triade, comparativement au groupe traité par la LCT uniquement. Nos résultats sont en faveur d'une hyperplasie régénératrice réparatrice hépatocytaire (**Columbano et Shinozuka, 1996**). Ceci se confirme aussi par le rapport nucléo cytoplasmique nettement inférieur chez les lapines supplémentées par la vitamine C en comparaison avec les traitées par la LCT.

Fetoui et al. (2009) suggèrent que la co-administration de la LCT avec la vitamine C prévient les dommages causés par les radicaux libres et maintient le bon fonctionnement du système pro-oxydant, antioxydant. De ce fait, la co-administration de la vitamine C atténue l'effet hépatotoxique de la LCT. Ce qui explique la nette amélioration de l'architecture lobulaire observé.

1.3. Etude immunohistochimique

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression de deux biomarqueurs au niveau hépatique chez la lapine traitée par LCT et témoin : la protéine Ki67, un marqueur de prolifération et L'alpha-foetoprotéine (AFP) marqueur moléculaire de régénération.

1.3.1. L'expression du Ki67 dans le foie

La coloration immunohistochimique Ki67 (IHC) est une technique où des anticorps sont utilisés pour identifier un antigène ciblé dans un tissu. L'échantillon de tissu est coloré avec la Diaminobenzidine (DAB) et contre-coloré avec de l'hématoxyline (H). En conséquence, les cellules Ki67 immunopositives apparaîtront avec une coloration nucléaire et/ ou cytoplasmique brune granuleuse, tandis que Les cellules Ki67 immunonégatives apparaissent en bleu (**Dzulkifli et al., 2021**).

- **Expression hépatique du Ki67 chez la lapine témoin**

Une faible activité proliférative dans les hépatocytes est détectable chez le témoin d'où Notre observation microscopique révèle un marquage légèrement positive de la Ki67 (**Planche 10**). ce résultat pourrait être expliqué par l'activité basal de régénération des hépatocytes (**Kim et al., 2019**).

- **Expression du Ki67 dans le foie la lapine traitée par LCT**

Chez la lapine traitée par LCT, nous avons remarqué que l'administration de LTC a provoqué une surexpression nucléaire et cytoplasmique de la protéine Ki67 dans le parenchyme hépatocytaire comparativement au témoin (**Planche 11**), ceci pourrait être expliqué par l'agressivité de l'insecticide et les dommages oxydatifs causé par les radicaux libres générés (**De Jong et al., 1998 ; Nithyananthan et Thirunavukkarasu, 2020**).

Ceci est en accord avec une autre étude sur les altérations hépatiques et rénales induites par la toxicité du malathion (**Baiomy et al., 2015**) .

- **Expression du Ki67 dans le foie de la lapine traitée par le LCT et supplémenté par la vitamine C**

Nos résultats immunohistochimiques montrent que la supplémentation de la vitamine C avec l'insecticide a diminué l'expression de la Ki67 qui est devenue presque similaire à celle du témoin (**Planche 12**). Cette expression est probablement due à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et l'effet de la vitamine C dans l'amélioration et de la régénération hépatique (**Benzekka et al., 2021**).

L'expression du Ki67 n'est pas forcément associée aux caractéristiques clinico-pathologiques du carcinome hépatique primaire/métastatique ; elle peut être un signe du mécanisme de régénération hépatocytaires (**Nithyananthan et Thirunavukkarasu, 2020**).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de marqueurs multiples au lieu d'un marqueur unique (Ki-67) pourrait également être tentée, pour une meilleure estimation des hépatocytes en régénération (**Jose et al., 2021**).

Van der Loos et al. (2013) avaient conçu une approche immunohistochimique multicolore pour améliorer la quantification des cellules Ki67 positives en différenciant les hépatocytes Ki67 positifs et les cellules non parenchymateuses (leucocytes) dans le tissu hépatique du lapin en utilisant trois types de coloration IHC différents.

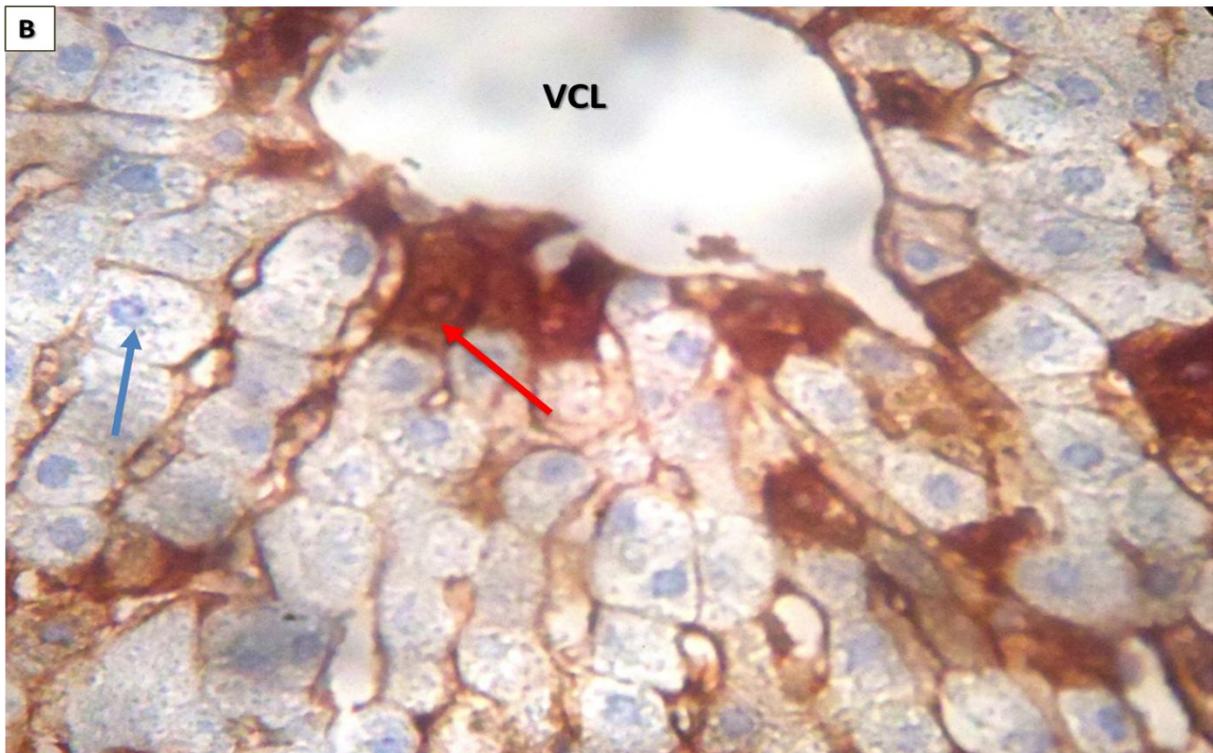
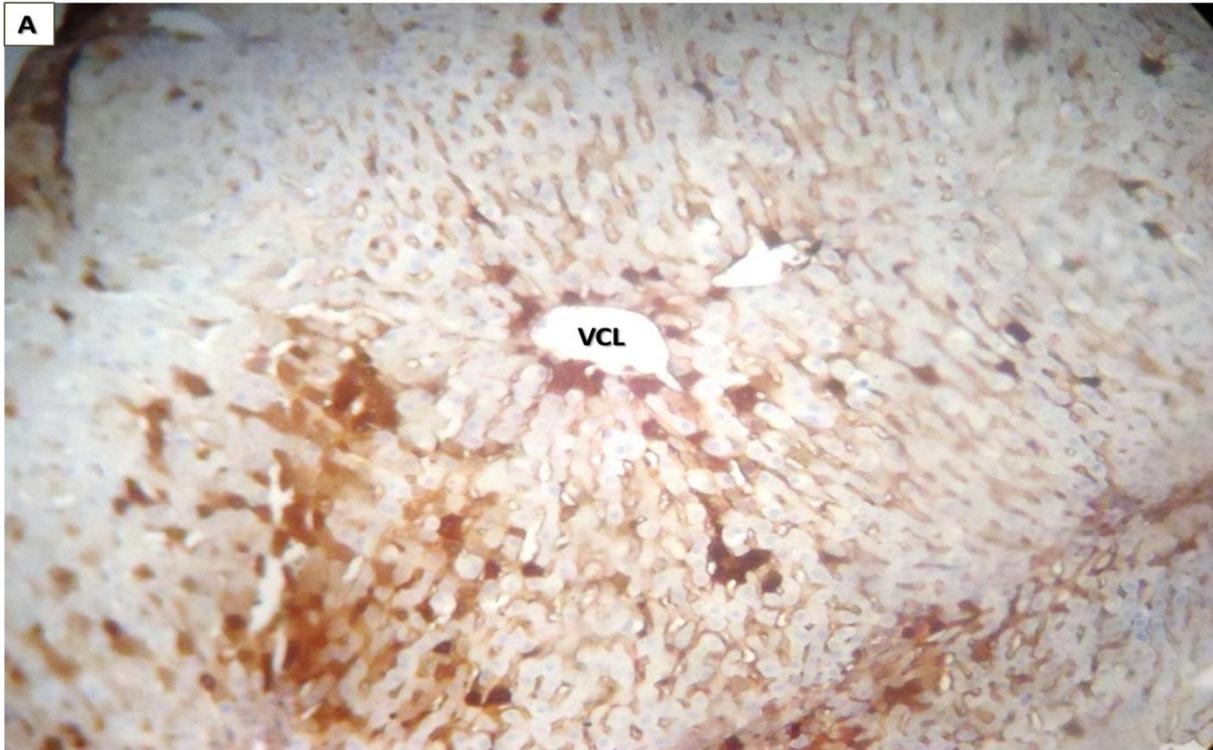


Planche 10 : Expression immunohistochimique de Ki67 dans le parenchyme hépatique chez le témoin (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.

Légende : **VCL** : Veine Centro-lobulaire ; **La flèche rouge** : une expression Ki67 positive /**bleue** : une expression Ki67 négative.

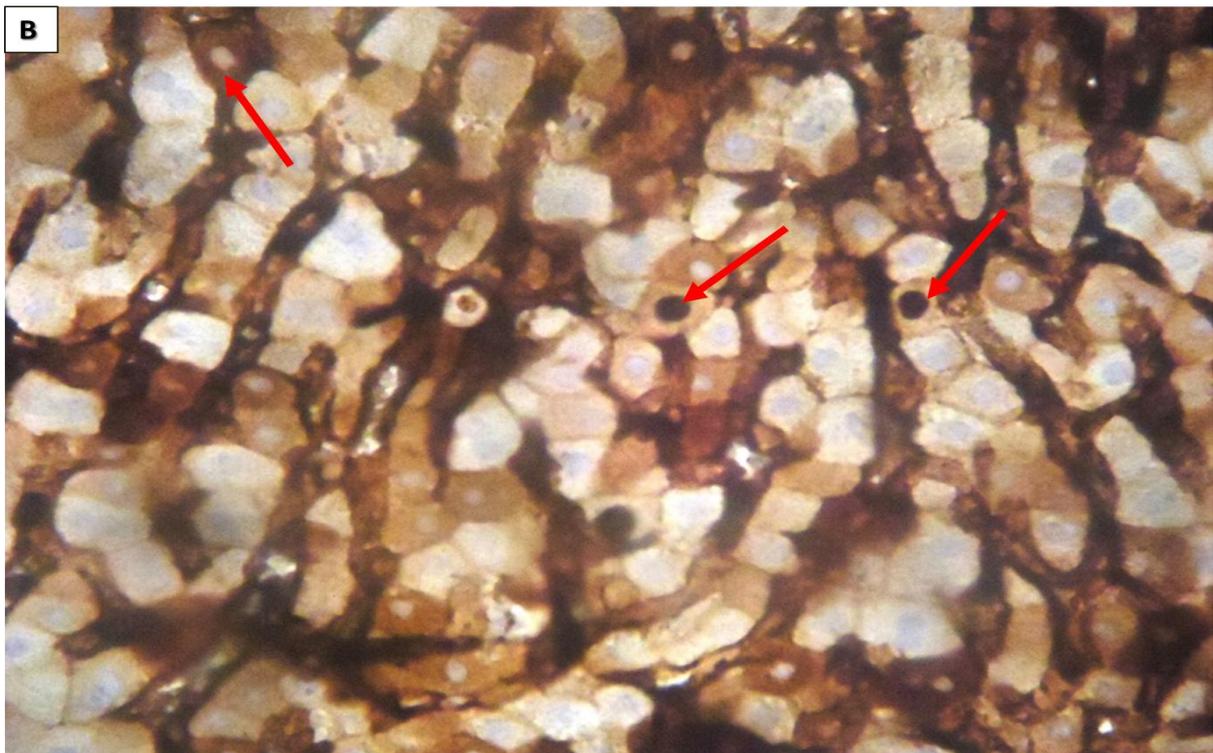
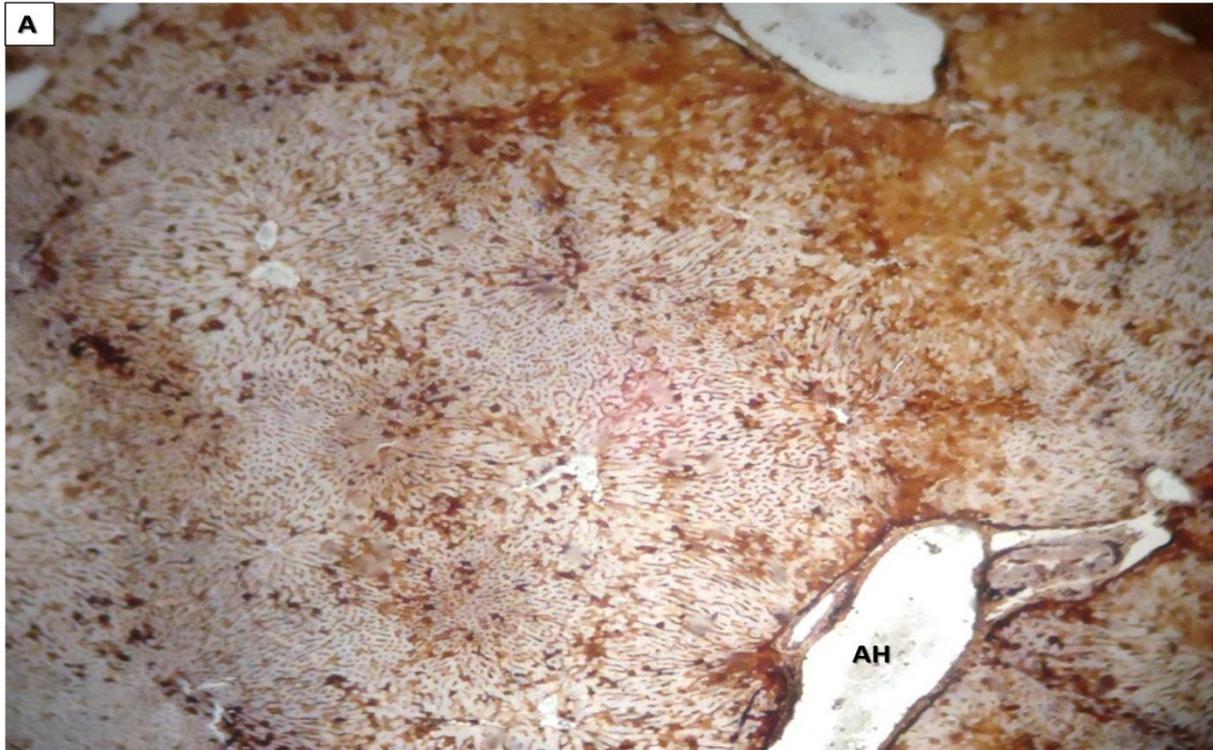


Planche 11 : Expression immunohistochimique de Ki67 dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.

Légende : N : noyaux ; Les flèches : pointent vers une expression nucléaire et cytoplasmique positive.

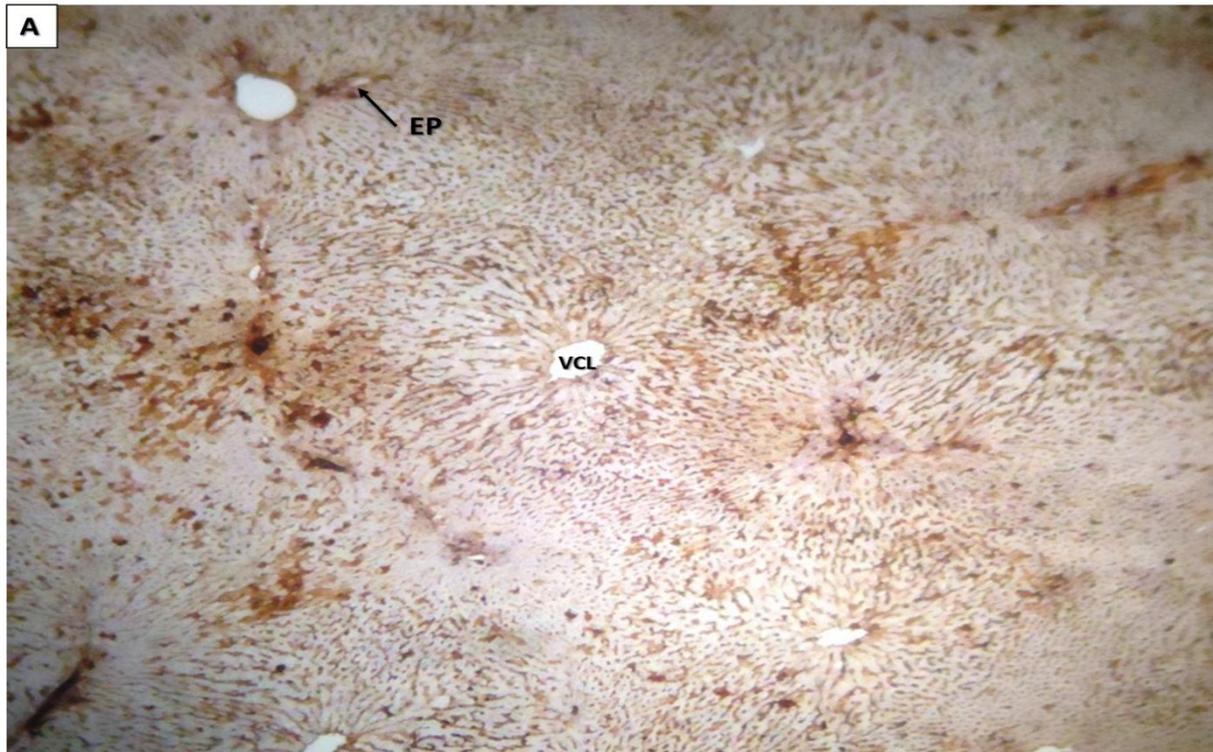


Planche 12 : Expression immunohistochimique de **Ki67** dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. (A) : Gr x10 et (B) : Gr x 40.
Légende : EP : espace porte ; VCL : Veine Centro-lobulaire.

1.3.2. L'expression du AFP dans le foie

L'AFP est la protéine plasmatique la plus abondante pendant la période de développement embryonnaire, la production d'AFP diminue rapidement et son expression est maintenue à un niveau bas tout au long de la vie chez l'adulte. Cependant une expression anormale de l'AFP peut être reprise dans certaines conditions physiopathologiques, telles que la régénération du foie après une exposition à un xénobiotique ou la transformation des cellules cancéreuses malignes pour son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration, de l'apoptose et de l'échappement immunitaire (Tomasi, 1977 ; Roncero *et al.*, 1998 ; Kuhlmann et Peschke, 2006 ; Lin *et al.*, 2021).

- **Expression de l'AFP dans le foie des lapins témoins**

L'observation microscopique révèle un faible signal immunohistochimique de l'AFP au niveau du parenchyme hépatique chez les lapins témoins (**Planche 13**), résulte d'un phénomène de prolifération intrinsèque des hépatocytes mature. Une différenciation à partir de cellules précurseurs n'est pas à exclure, mais reste sans doute quantitativement peu importante en conditions homéostatiques (Lemaigre, 2012).

- **Expression de l'AFP dans le foie des lapines traitées par LCT**

L'observation à faible grossissement montre une expression positive de l'AFP au niveau de l'artère hépatique et des hépatocytes qui se traduit par sa présence dans le sang suite à sa production irrégulière dans le foie chez les lapines traitées par l'insecticide seul.

Au fort grossissement, on remarque un immunomarquage positif au niveau membranaire et cytoplasmique voir même nucléaire des hépatocytes (**Planche 14**). Ces résultats peuvent être expliqués par l'activité régénératrice des hépatocytes qui s'avère un signe de compensation tissulaire basale manifesté par le foie après une dégénérescence hépatocytaire suite à la toxicité subaiguë par la LTC (Ho *et al.*, 2009 ; Jiao *et al.*, 2021 ; El issaoui, 2022).

Marzinke et Dufour, (2020) ont montré qu'une augmentation de l'expression de l'AFP après une nécrose hépatique est considérée comme indicative d'une régénération ou d'une prolifération hépatique.

- **Expression de l'AFP dans le foie des lapines traitées par le LCT et supplémentées par la vitamine C**

L'observation à faible grossissement montre une expression positive de AFP autour la VCL ceci révèle l'activité régénératrice du foie dû à un mécanisme d'atténuation de l'apoptose exercé par la vitamine C et son effet dans la promotion de prolifération cellulaire via son pouvoir antioxydant puissant protégeant et stimulant les hépatocytes à se régénérer suite aux dommages tissulaires causés par la LCT (**Pouliquen, 2022**).

Une expression négative dans la plupart des hépatocytes du parenchyme a été notée, ceci est dû à la réparation hépatique et l'effet protecteur exercés par la supplémentation de la vitamine C et sa capacité à réduire le stress oxydatif induit par le LCT.

Au fort grossissement, on observe une expression négative de l'AFP au niveau cytoplasmique des hépatocytes tandis que un faible marquage positif au niveau membranaire des hépatocytes a été observé (**Planche 15**).

Peu d'études immunohistochimique d'expression de AFP ont été menées sur l'effet amélioratif de la co-administration de la vitamines C en particulier, ce qui limite notre discussion.

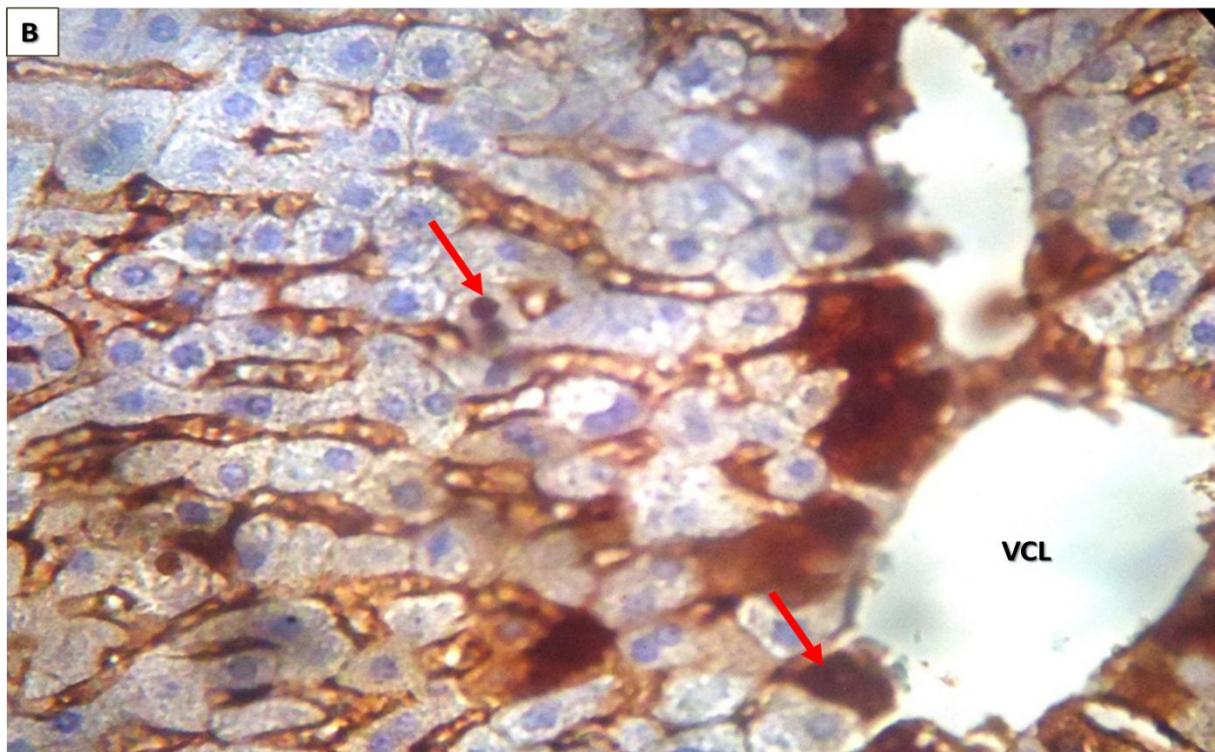
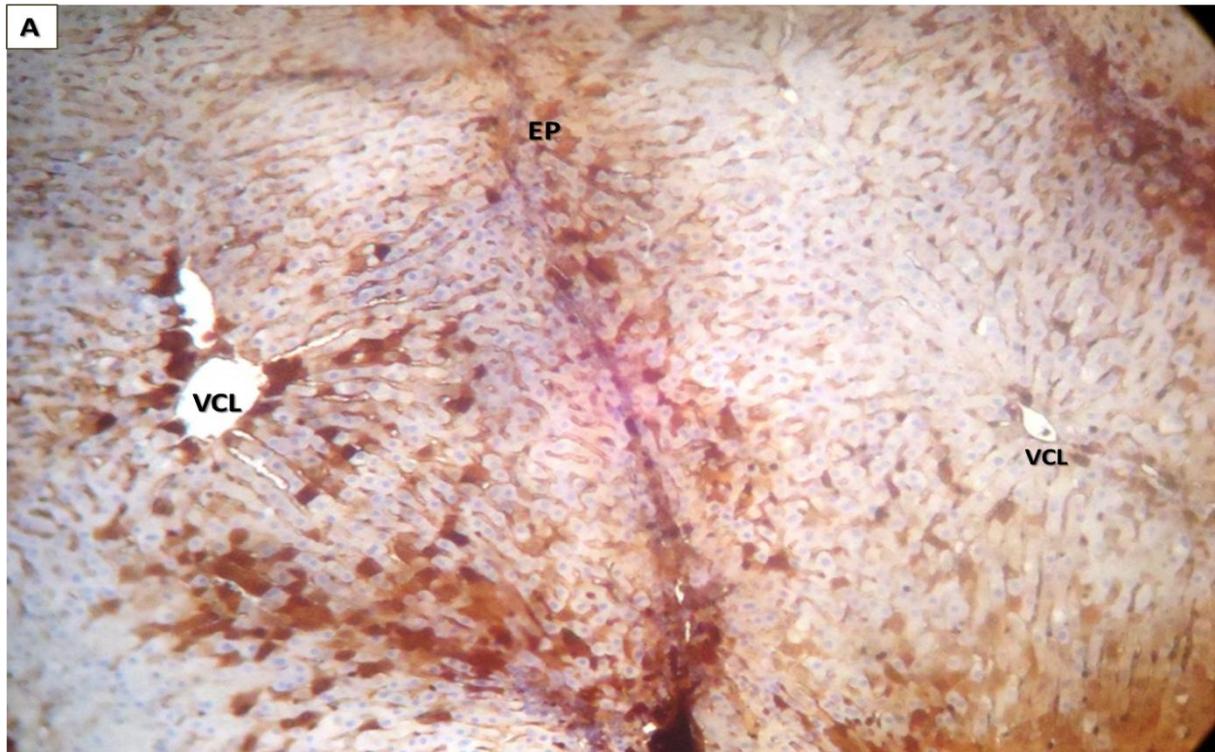


Planche 13 : Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez le témoin. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.

Légende : EP : espace porte ; VCL : Veine Centro-lobulaire ; Les flèches pointent vers une expression AFP nucléaire et cytoplasmique positive.

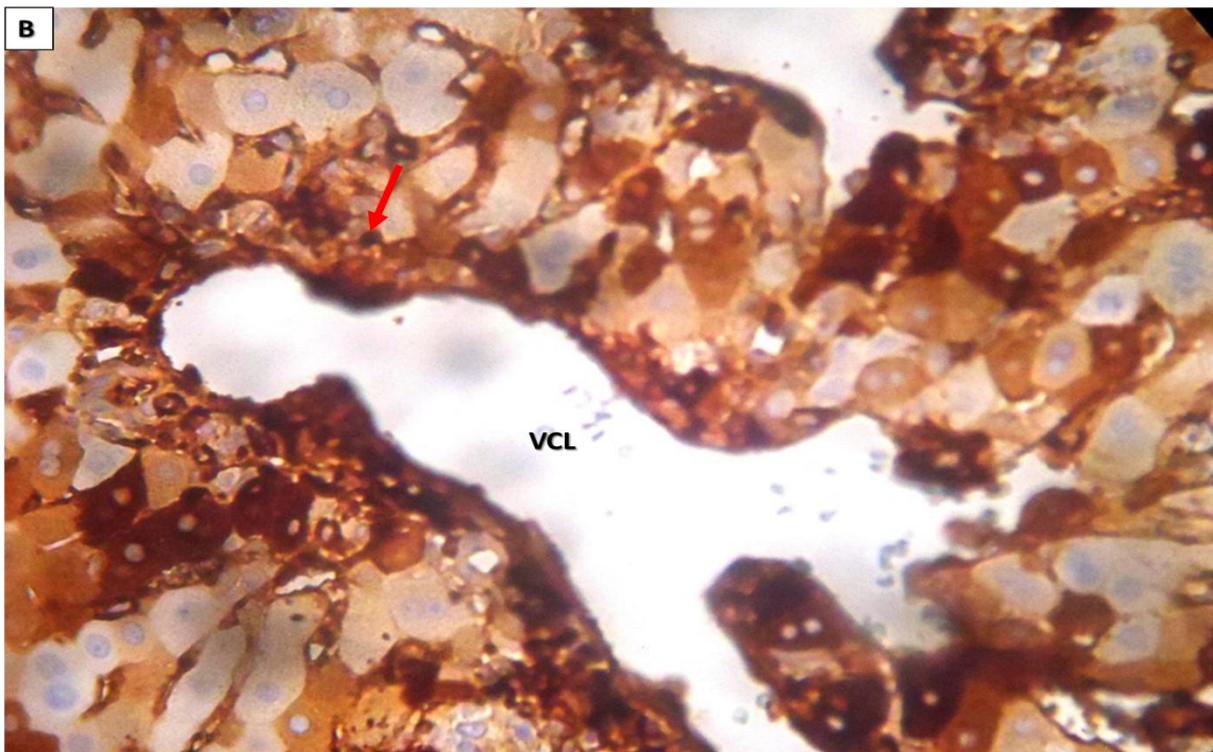
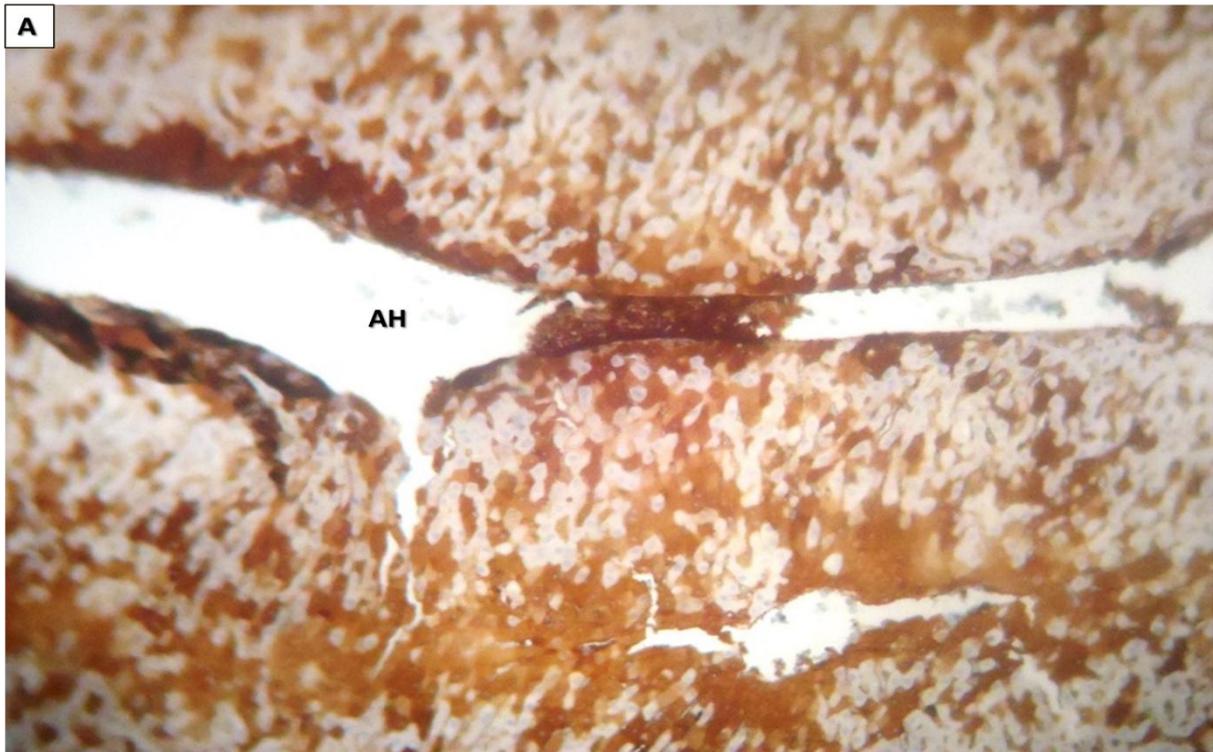


Planche 14 : Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.

Légende : VCL : Veine Centro-lobulaire ; Les flèches : pointent vers une expression AFP nucléaire et cytoplasmique positive ; AH : Artère hépatique.

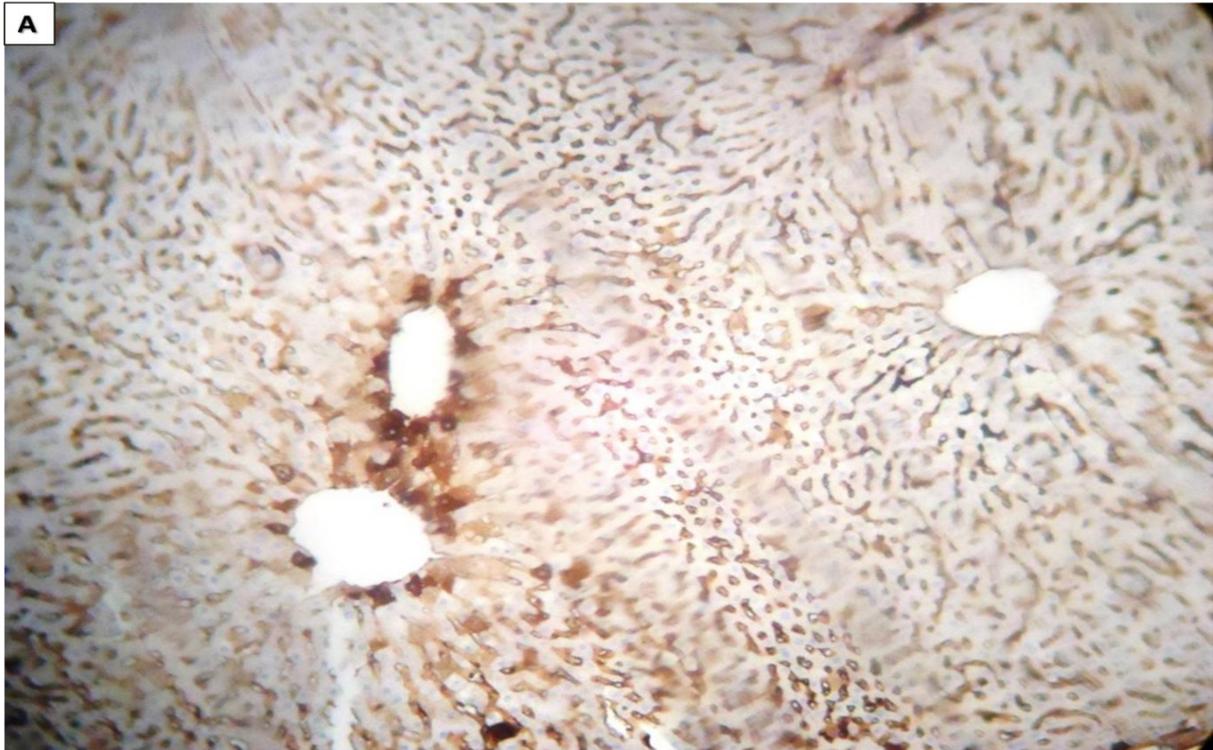


Planche 15 : Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez des lapines traités par LCT et supplémentés par la vitamine C. (A) : Gr x10 ; (B) : Gr x 40.

Légende : VCL : Veine Centro-lobulaire.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Les pesticides continueront de faire partie de la vie humaine et de l'environnement afin d'augmenter la production agricole. Cependant, leur utilisation a atteint un rythme alarmant en raison d'un certain nombre d'effets néfastes sur les organismes non ciblés. Malgré les efforts déployés pour développer des produits phytosanitaires alternatifs. Dont l'amélioration de la qualité nutritionnelle par une production alimentaire plus efficace et respectueuse de l'environnement sera clairement un défi pour les années à venir.

En se référant à la littérature et à nos résultats, nous pouvons conclure que « lambda cyhalothrine » est un puissant insecticide pyréthrinoides qui altère l'architecture histologique du foie induisant des changements cytotoxiques en particulier à dose élevée et pendant la période d'exposition (subaiguë) ; Ainsi que l'effet protecteur de la supplémentation de la vitamine C à réduire les impacts délétères provoqués par la LCT ainsi de rétablir l'état normale des différentes structures hépatiques par ses propriétés thérapeutiques antioxydantes.

À la lumière de cette étude, il est recommandé d'appliquer la lambda-cyhalothrine avec prudence vu qu'elle représente un réel danger pour l'homme lorsqu'elle n'est pas utilisée dans des conditions appropriées.

La corrélation entre les données histomorphométrique et immunohistochimique confirme l'impact néfaste de LCT sur le foie chez la lapine.

Dans le cadre des perspectives il s'avère intéressant :

- D'étudier la toxicité chronique de l'insecticide pour mettre en évidence les à long terme.
- D'étudier l'effet toxique de lambda cyhalothrine sur d'autres fonctions notamment le système endocrinien, hématologique et le système nerveux centrale.
- De Tester d'autres vitamines (vitamine A et E) et d'autres molécules telles que le sélénium ou les polyphénols impliquées dans l'effet protecteur, améliorant, ou curatif.
- D'explorer les marqueurs de stress oxydatif tel que le super oxyde dismutase, le glutathions transférase et réductase et la catalase. pour avancer vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires intervenant dans les altérations observés.
- D'évaluer l'expression d'autres anticorps comme la P53, Bcl2, Bax, CK et les caspases.
- De réaliser une étude in silico (bioinformatique).

Références bibliographiques

References Bibliographiques



1. **Abbassy, M. A., Nasr, H. M., & Mansy, A. S. (2020).** Rutin and vitamin E alleviate oxidative stress and hepatic-renal injury induced by technical and formulated lambda-cyhalothrin in adult rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 31-40.
2. **Abdul-Hamid, M., Mohamed, H. M., El-Twab, A., Sanaa, M., & Zaied, K. (2020).** Histological, ultrastructural, and biochemical study on the possible role of Panax ginseng in ameliorating liver injury induced by Lambda cyhalotherin. Beni-Suef .*University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), 1-18.
3. **Abdullah, M., Jamil, R. T., & Attia, F. N. (2022).** Vitamin C (ascorbic acid). In Stat Pearls [Internet]. StatPearls Publishing.
4. **ACTA. (2005).** Association de Coordination Technique Agricole .Index Phytosanitaire ACTA .41^{ème} édition. Paris, p 821.
5. **Adam, M. T. M. (2020).** Haematological Characteristics and Oxidative Stress Indicators in Pregnant Rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) Exposed to Lambda Cyhalothrin. *EC Veterinary Science*, 5, 65-75.
6. **Adikwu, E., & Deo, O. (2013).** Hepatoprotective effect of vitamin C (Ascorbic Acid). *Pharmacology and Pharmacy*, 4(1), 84-92.
7. **Ahmad, L., Khan, A., & Khan, M. Z. (2011).** Cypermethrin induced biochemical and hepato-renal pathological changes in rabbits. *Int J Agric Biol*, 13(6), 1-20.
8. **Alalibo, K., Patricia, U. A., & Ransome, D. E. (2019).** Effects of lambda cyhalothrin on the behaviour and histology of gills of *Sarotherodon Melanotheron* in Brackish Bater. *Scientific African*, 6, e00178.
9. **Allam, A., Abdeen, A., Devkota, H. P., Ibrahim, S. S., Youssef, G., Soliman, A., Abdel-Daim, M. M., Alzahrani, K. J., Shoghy, K., & Ibrahim, S. F. (2022).** N-Acetylcysteine Alleviated the Deltamethrin-Induced Oxidative Cascade and Apoptosis in Liver and Kidney Tissues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), 638.
10. **Al-Omar, M. S., Naz, M., Mohammed, S. A., Mansha, M., Ansari, M. N., Rehman, N. U., Kamal, M., Mohammed, H. A., Yusuf, M., & Hamad, A. M. (2020).** Pyrethroid-Induced organ toxicity and anti-oxidant-supplemented amelioration of toxicity and organ damage: the protective roles of ascorbic acid and α -tocopherol. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6177.
11. **Alrawe, S. A., & ALzubaidy, M. H. (2022).** Acute and sub-acute toxicity effects of lambda-cyhalothrin in chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(1), 191-200.
12. **Al-Sarar, A. S., Abobakr, Y., Bayoumi, A. E., Hussein, H. I., & Al-Ghothemi, M. (2014).** Reproductive toxicity and histopathological changes induced by lambda-cyhalothrin in male mice. *Environmental toxicology*, 29(7), 750-762.
13. **Anadón, A., Martínez, M., Martínez, M. A., Díaz, M. J., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2006).** Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicology Letters*, 165(1), 47-56.
14. **Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., & Fetoui, H. (2017).** Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5841-5856.

15. **Aouey, B., Fares, E., Chtourou, Y., Bouchard, M., & Fetoui, H. (2019).** Lambda-cyhalothrin exposure alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in platelets and liver of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 311, 108796.
16. **Armstrong, L. E. & Guo, G. L.(2019).** Understanding environmental contaminants' direct effects on non-alcoholic fatty liver disease progression. *Current environmental health reports*, 6(3), 95-104.
17. **Assis, D. N., & Navarro, V. J. (2009).** Human drug hepatotoxicity: A contemporary clinical perspective. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(5), 463-473.
18. **Aydogdu, M., Gokalp, F. D., & Güner, U. (2017).** Toxic effects of pyrethroids lambda-cyhalothrin and alpha-cypermethrin on pest *Archips rosana* (Lepidoptera: Tortricidae) and its common parasitoid. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(3), 2436-2445.



19. **Baiomy, A. A., Attia, H. F., Soliman, M. M., & Makrum, O. (2015).** Protective effect of ginger and zinc chloride mixture on the liver and kidney alterations induced by malathion toxicity. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 28(1), 122-128.
20. **Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payrastre, L., Lebailly, P., & van Maele-Fabry, G. (2013).** Pesticides : effets sur la santé .Thèse de doctorat, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM)), Paris : Inserm : Edition EDP Sciences. p1014.
21. **Baldi, I., Jérémie, B., Chevrier, C., Coumoul, X., Elbaz, A., Goujon, S., Jouzel, J.-N., Monnereau, A., Multigner, L., & Salles, B. (2021).** Pesticides et effets sur la santé : Nouvelles données. Thèse de doctorat, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).
22. **Ball, G.F.M. (2004).** Vitamins: Their role in the human body. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 449p.
23. **Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead Jr, R. D., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., & Needham, L. L. (2010).** Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 742-748.
24. **Basir, A., Khan, A., Mustafa, R., Zargham Khan, M., Rizvi, F., Mahmood, F., & Yousaf, A. (2011).** Toxicopathological effects of lambda-cyhalothrin in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Human & Experimental Toxicology*, 30(7), 591-602.
25. **Batsch, D. (2011).** L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré, Louis Pasteur.
26. **Baudin, B. (2017).** Exploration biochimique du foie en 2017. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2017(490), 25-33.
27. **Belga, H. (2022).** Le Cystadenocarcinome Hépatique : A Propos D'un Cas Et Revue De La Litterature.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

28. **Benhamou, J. & Erlinger, S. (2008).** Maladie du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion médecine science. p. 220.
29. **Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., Martínez-López, W., & Da Silva, J. (2018).** DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. *Mutagenesis*, 33(1), 87-95.
30. **Benzekka, D., Kamah, C., Madi, A., & Rezzagui, A. E. (2021).** Vitamine C et E : potentiel protecteur envers l'hyépatotoxicité induite par le paracétamol. Thèse de doctorat, Université de Mohammed Seddik Ben Yahia, Jijel.
31. **Berrabah, W. (2013).** Régulation du récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor par la voie de biosynthèse des hexosamines. Thèse de doctorat. Université du Droit et de la Santé-Lille II.
32. **Bessaguet, F., & Desmoulière, A. (2021).** Le foie. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(605), 57-61.
33. **Bhardwaj, K., Sharma, R., Abraham, J., & Sharma, P. (2020).** Pyrethroids: A Natural Product for Crop Protection. *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture. Springer*, 113-130.
34. **Bhatia, R. (2005).** Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect.* 113, 220-224
35. **Bhushan, B., Saxena, P. N., & Saxena, N. (2013).** Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 64(1).
36. **Birolli, W. G., Arai, M. S., Nitschke, M., & Porto, A. L. M. (2019).** The pyrethroid (\pm) lambda-cyhalothrin enantioselective biodegradation by a bacterial consortium. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129-137.
37. **Bonnet, N., & Stéphane, X. (2018).** Embryologie du foie et des voies biliaires. *Hépatologie de l'enfant*, 3.
38. **Boumezrag, A., Hemida, H., Boumezrag, F. A., Smail, F., & Cisse, S. (2021).** Pathological and biological effects of treatments with lambda-cyhalothrin in rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(3), 443-450.
39. **Bourgeois C. (2003).** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Éditions TEC & DOC, Paris. 708p.
40. **Bouchard, M., Côté, J., & Khemiri, R. (2019).** La lambda-cyhalothrine comme insecticide en milieu agricole. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.
41. **Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005).** Poisoning due to Pyrethroids, *Toxicological Reviews* 24(2), 93-106.
42. **Burr, S. A., & Ray, D. E. (2004).** Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicological Sciences*, 77(2), 341-346.
43. **Buxeraud, J., & Faure, S. (2021).** La vitamine C. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(604), S24-S26.



44. Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.-P., & Coquet, Y. (2005). Les pesticides dans les sols : Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole, 69-93.
45. Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M., & Lerverve, X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer*.p126-129.
46. Carità A.C., Santos B. F., Shultz J. D., Michniak-Kohn, B., Chorilli M, & Leonardi G. R., (2019). Vitamin C: one compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine*, 24, 102117.
47. Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9 (11), 1211.
48. Catala, M., Andre, J., Katsanis, G., & Poirier, J. (2008). Histologie : Organes, systèmes et appareils, 29-30.
49. Çavuşoğlu, K., Yapar, K., Oruç, E., & Yalçın, E. (2011). The protective effect of royal jelly on chronic lambda-cyhalothrin toxicity: Serum biochemical parameters, lipid peroxidation, and genotoxic and histopathological alterations in swiss albino mice. *Journal of medicinal food*, 14(10), 1229-1237.
50. Cidado, J., Wong, H. Y., Rosen, D. M., Cimino-Mathews, A., Garay, J. P., Fessler, A. G., Rasheed, Z. A., Hicks, J., Cochran, R. L., & Croessmann, S. (2016). Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*, 7(5), 6281.
51. Cerullo, G., Negro, M., Parimbelli, M., Pecoraro, M., Perna, S., Liguori, G., Rondanelli, M., Cena, H., & D'Antona, G. (2020). The long history of vitamin C: From Prevention of the Common Cold to Potential Aid in the Treatment of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 11 : 574029.
52. Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. *Indian journal of clinical biochemistry*, 28(4), 314-328.
53. Chakroborty, B., Pradhan, A., Maiti, P., & Choudhury, D. S. M. (2018). Taurine Modulates Neurobehavioral Impairments in Lambda Cyhalothrin Induced Male Albino Rats. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(3), 19.
54. Chakroborty, B., Pradhan, A., Maiti, P., & Choudhury, S. M. (2019). Alleviating Impact of Taurine on Renal Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Lambda-Cyhalothrin Exposed Rat. *Toxicology and Forensic Medicine – Open Journal*, 4(1), 1–7.
55. Colombo, R. (2001). Etude de la carence en vitamine dans une population gériatrique hospitalisée. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1.
56. Columbano, A., & Shinozuka, H. (1996). Liver regeneration versus direct hyperplasia. *The FASEB Journal*, 10(10), 1118-1128.
57. Couture, C. (2008). Caractérisation de l'exposition aux pyrétrinoïdes dans la population rurale agricole de la Montérégie. Mémoire en vue de l'obtention du grade de maîtrise en santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal. Canada.

- 58. Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., & Ross, M. K. (2007).** Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and applied pharmacology*, 221(1), 1-12.
- 59. Cruz, J. M. (2015).** Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : Développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de doctorat en sciences chimiques option chimie analytique et environnemental, Université de Bordeaux.



- 60. Das, K., Gupta, A., Dhundasi, S., Patil, A., Das, S., & Jeevan Gangadhar, A. (2007).** Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate. *Biometals*, 20, 177-184.
- 61. De Bari, B., Pointreau, Y., Rio, E., Mirabel, X., & Mornex, F. (2010).** Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : le foie. *Cancer/Radiothérapie*, 14(4-5), 344-349
- 62. De Blas, C., Wiseman, J., (2010).** Nutrition of the Rabbit, 2nd Edition. CAB International, 333p.
- 63. De Jaeger, C., Voronska, E., Fraoucene, N., & Cherin, P.(2012).** Exposition chronique aux pesticides, santé et longévité. Rôle de notre alimentation. *Médecine & Longévité*, 4(2), 75-92.
- 64. De Jong, K. P., Stellema, R., Karrenbeld, A., Koudstaal, J., Gouw, A. S., Sluiter, W. J., Peeters, P. M., Slooff, M. J., & De Vries, E. G. (1998).** Clinical relevance of transforming growth factor α , epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology*, 28(4), 971-979.
- 65. De Matos, S. (2016).** Statut vitaminique C chez des sujets hospitalisés dans un service de médecine interne : Analyse de fréquence, facteurs de risque et corrélation clinico-biologique. Thèse de doctorat. Faculté de médecine, Université Paris des cartes.
- 66. Deren, M. (2012).** Evaluation rétrospective d'un critère prédictif de mortalité après hépatectomie majeure en réanimation. Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine, Université de Lorraine.
- 67. Djeflal, A. (2014).** Évaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate «méthomyl» chez le rat wistar : stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba.
- 68. Doherty, D.G. (2016).** Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 60- 75.
- 69. Dosedèl, M., Jirkovsky, E., Macàková, K., Krcmovà, L.K., Javorskà, L., Pourovà, J., Micolini, L., Remiàò, F., Novàková, L., & Mlādèna, P. (2021).** Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients*, 13(2), 615.
- 70. Dewree, R., Drion, P. (2006).** Vers une meilleure gestion du lapin en tant qu'animal de laboratoire : état des lieux et perspectives. *Médecine vétérinaire* 150. 153-162.
- 71. Dzulkifli, F. A., Mashor, M. Y., Rahman, K. S. A., & Mohamad, H. (2021).** A Review: Recent Approaches on Improving the Accuracy in Determining the Tumor and Cancer

Grading in Histopathological Images Based on Scoring Ki67 Expression. *American Journal of Biomedical Sciences*, 13(3).



72. **El-Bialy, B-E-S. Abd Eldaim, M-A. Hassan, A .Abdel-Daim, M-M. (2019).** Ginseng Aqueous Extract Ameliorates Lambda-Cyhalothrinacetamiprid Insecticide Mixture for Hepatorenal Toxicity in Rats: Role Of Oxidative Stress-Mediated Proinflammatory And Proapoptotic Protein Expressions. *Environmental Toxicology*.1–12.
73. **El Azzouzi El Habib, E. H. (2013).** Les processus physico-chimiques de l'élimination des pesticides dans l'environnement: cas de l'herbicide Imazethapyr. Thèse de doctorat en chimie option chimie physique, Université Mohamed V-AGDAL.
74. **EL Issaoui, F. Z. (2022).** Interet De L'alpha Foetoprotéine En Pathologie Humaine.
75. **Elias, A., Nelson, B., Oputiri, D., & Geoffrey, O. B. P. (2013).** Antiretroviral toxicity and oxidative stress. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 8(4), 187.



76. **Fabre, M., & Patriarche, C. (1995).** Ponction à l'aiguille fine d'un nodule isolé sur foie cirrhotique. *Revue Francaise des Laboratoires*, 1995(274), 27-31.
77. **Fatmi, W. (2014).** L'effet de la vitamine C et le sélénium sur le développement de diabète chez les rats alimentés par un régime alimentaire carencé en zinc. Thèse de doctorat, Université Hadji Mokhtar Annaba.
78. **Febvre-James, M., Lecureur, V., & Fardel, O. (2020).** Potent repression of C-reactive protein (CRP) expression by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human hepatocytes. *Inflammation research*, 69(1), 51-62.
79. **Fenech, M., Amaya, I., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2019).** Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in plant science*, 9, 2006.
80. **Fetoui, H., Garoui, E. M., & Zeghal, N. (2009).** Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 189-196.
81. **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.
82. **Field, L. M., Emyr Davies, T. G., O'reilly, A. O., Williamson, M. S., & Wallace, B. A. (2017).** Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal*, 46(7), 675-679.
83. **Figuroa-Méndez, R., & Rivas-Arancibia, S. (2015).** Vitamin C in health and disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Frontiers in physiology*, 6, 397.
84. **Fiorani, Mara; Scotti, Maddalena; Guidarelli, Andrea; Burattini, Sabrina; Falcieri, Elisabetta; Cantoni, Orazio. (2020).** SVCT2-Dependent plasma and mitochondrial membrane transport of ascorbic acid in differentiating myoblasts. *Pharmacological Research*.159, 105042.

85. Fouzai, C., Trabelsi, W., Bejaoui, S., Telahigue, K., Rabeh, I., Nechi, S., Chelbi, E., El Cafsi, M., & Soudani, N. (2020). Cellular toxicity mechanisms of lambda-cyhalothrin in *Venus verrucosa* as revealed by fatty acid composition, redox status and histopathological changes. *Ecological Indicators*, 108, 105690.
86. Fyfe, B., Zaldana, F., & Liu, C. (2018). The Pathology of Acute Liver Failure. *Clinics in Liver Disease*, 22(2), 257–268.

G

87. Galle, P. R., Foerster, F., Kudo, M., Chan, S. L., Llovet, J. M., Qin, S., Schelman, W. R., Chintharlapalli, S., Abada, P. B., & Sherman, M. (2019). Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver international*, 39(12), 2214–2229.
88. Gamet-Payraastre, L. (2019). Impact des mélanges de pesticides. *Innovations Agronomiques* 73, 51-59.
89. Gayen, S. K., Abdelrahman, A. A., Preston, I. R., Petit, R. D., & Hill, N. S. (2020). Vitamin C deficiency-induced pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 157(2), 21–23.
90. Ghosh, D., & Scheepens, A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(3), 322–331.
91. Gidenne, T., Lebas, F., Savietto, D., Dorchie, P., Duperray, J., Davoust, C., & Fortun-Lamothe, L. (2015). Nutrition et alimentation. Le lapin. De la biologie à l'élevage Éditions Quae Versailles, France, 152-196.
92. Guillot, I., Lohr, B., Weiser, H., Halbach, S., Rambeck, W.A., Kienzle, E. et Tennan, T.B. (1998). Influence of vitamin C on cadmium and mercury accumulation. In: Proceedings of the Conference of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Munnich, Germany. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 80 : 167-169.
93. Gupta, P. K. (2017). Herbicides and fungicides. In *Reproductive and developmental toxicology*, (p. 657-679). Elsevier.
94. Gupta, R. C., Mukherjee, I. R. M., Malik, J. K., Doss, R. B., Dettbarn, W.-D., & Milatovic, D. (2019). Insecticides. In *Biomarkers in toxicology* (p. 455-475). Elsevier.

H

95. Hall, A., Cotoi, C., Luong, T. V., Watkins, J., Bhathal, P., & Quaglia, A. (2021). Collagen and elastic fibres in acute and chronic liver injury. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.
96. Hassan, D. H., Omar, A. Z., Gallaly, D. Q., Ahmad, S. R., & Maulood, I. M. (2020). Histological Impacts of L-Arginine, Vitamin C and Their Combination on Liver and Kidney of Paracetamol Treated Rats. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 32(6), 40-45.
97. Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207-220.
98. He, L.-M., Troiano, J., Wang, A., & Goh, K. (2008). Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 71-91.

- 99. He, K., Tang, Q., Gong, M., Yang, S., Chen, X., Zhu, H., Liu, D., & Huang, B. (2020).** A transcriptomic study of selenium against liver injury induced by beta-cypermethrin in mice by RNA-seq. *Functional & integrative genomics*, 20(3), 343-353.
- 100. Heym, K. M., Masand, P. M., & Margolin, J. F. (2022).** How we approach the diagnosis of a vascular anomaly. *Pediatric Blood & Cancer*, e29802.
- 101. Hénault-Ethier, L., Soumis, N., & Bouchard, M. (2016).** Impacts des insecticides pyréthrinoïdes sur la santé humaine et environnementale : Ce que l'on sait, ce qu'on ignore et les recommandations qui s'y rapportent. Équiterre. Montréal, Canada.
- 102. Ho, H. K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J. E., Hart, S., Lim, K. S., Loo, H. L., Aung, M. O., Lim, S. G., & Ullrich, A. (2009).** Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *Journal of hepatology*, 50(1), 118-127.
- 103. Hu, X., Chen, R., Wei, Q., & Xu, X. (2022).** The Landscape of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: Where are we? *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 536.
- 104. Hussein H.K., Elnaggar M.H., Al-Dailamy J.M. (2012).** Protective role of Vitamin C against hepatorenal toxicity of fenvalerate in male rats. *Journal of Environmental Science and Toxicology*, 1(4): 60-65.



- 105. INERIS., (2011).** LAMBDA CYHALOTHRINE-N° Cas 91465-08-6. INERIS : NORMES DE QUALITE ENVIRENMENTALE.
- 106. Inyang, I. R., Obidioso, O. Z., & Izah, S. C. (2016).** Effects of Lambda cyhalothrin in protein and Albumin content in the kidney and liver of *Parpohiocephalus obscurus*. *EC Pharmacology and Toxicology*, 2(3), 148-153.
- 107. Iqbal, K., Khan, A. et Ali Khan Khattak, M. (2004).** Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3(1) : 5-13.



- 108. Jebur, A. B., El-Sayed, R. A., & El-Demerdash, F. M. (2021).** *Ocimum basilicum* essential oil modulates hematotoxicity, oxidative stress, DNA damage, and cell cycle arrest induced by β -cyfluthrin in rat liver. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- 109. Jiao, Y., Lu, W., Xu, P., Shi, H., Chen, D., Chen, Y., Shi, H., & Ma, Y. (2021).** Hepatocyte-derived exosome may be as a biomarker of liver regeneration and prognostic valuation in patients with acute-on-chronic liver failure. *Hepatology International*, 15(4), 957-969.
- 110. Jiménez-Jiménez, S., Casado, N., García, M. Á., & Marina, M. L. (2019).** Enantiomeric analysis of pyrethroids and organophosphorus insecticides. *Journal of Chromatography A*, 1605, 360345.
- 111. Jin, D. K., Vacher, J., & Feuerman, M. H. (1998).** α -Fetoprotein gene sequences mediating Afr2 regulation during liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8767-8772.

- 112. Jose, D., Allen, A. L., Blakley, B., & Al-Dissi, A. (2021).** Evaluation of metallothionein and Ki-67 expression in chronic cholangiohepatitis in cats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 85(1), 36-44.
- 113. Ju, C., & Tacke, F. (2016).** Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases : From pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 316-327.
- 114. Juricek, L., & Coumoul, X. (2014).** Alimentation, pesticides et pathologies neurologiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(2), 74-80.



- 115. Khaldoun Oularbi, H. (2014).** Biochemical and Histopathological Changes in the Kidney and Adrenal Gland of Rats Following Repeated Exposure to Lambda-Cyhalothrin. *Journal of Xenobiotics*, 4(1), 2240.
- 116. Khalil, S-R. Abd Elhakimb, Y. Abd El-Fattahc, A-H. Faraga, M-R. Abd El-Hameedd, N- E. El-Murr, A- E. (2020) .** Dual Immunological And Oxidative Responses In Oreochromis Niloticus Fishexposed To Lambda Cyhalothrin And Concurrently Fed With Thyme Powder (Thymus Vulgaris L.): Stress And Immune Encoding Gene Expressionmurrb .*Fish And Shellfish Immunolog*100 ,208–218.
- 117. Khemiri, R., Côté, J., Fetoui, H., & Bouchard, M. (2017).** Documenting the kinetic time course of lambda-cyhalothrin metabolites in orally exposed volunteers for the interpretation of biomonitoring data. *Toxicology Letters*, 276, 115-121.
- 118. Khither, H. (2019).** Etude des effets de la Thymoquinone sur le stress oxydant : Application A l'hépatotoxicité Et l'arthrite Rhumatoïde Induites Chez Le Rat. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas. Sétif 1.
- 119. Kilimci, F. S. (2020).** Rabbit liver lobes : An anatomical study of experimental surgical approaches. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2), 103-108.
- 120. Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016).** Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *Journal of pathology and translational medicine*, 50(6), 411-418.
- 121. Kim, S. H., Moon, H. H., & Yoon, M. H. (2019).** Establishment of metastatic liver carcinoma model by implanting AX7 cells into rabbit liver, and its histological findings. *International Journal of Medical Sciences*, 16(3), 409.
- 122. Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., & Kobayashi, K. (2004).** Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental health perspectives*, 112(5), 524-531.
- 123. Krishna, M. (2013).** Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clinical Liver Disease*, 2(Suppl 1), S8.
- 124. Kuhlmann, W. D., & Peschke, P. (2006).** Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *International journal of experimental pathology*, 87(5), 343-359.



- 125.Labarthe, C. (2012).** Carence et toxicité des vitamines chez les reptiles et les petits mammifères de compagnie. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 138 p.
- 126.Lafargue, A. (2014).** Le déficit en vitamine C des sujets âgés en institution. Signes et facteurs de risque. Etude en USLD. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux U.F.R.Sciences Medicales. N°149.
- 127.Lardot, B. (2018).** Les affections hépatobiliaires du lapin de compagnie. Thèse De Doctorat, Université Claude-Bernard - Lyon I.
- 128.Laurence, F. (2017).** Histologie Comparée : Le Foie Dans Tous Ses Etats. Pathologie Hépatique Institut Pasteur. Médecine Moléculaire Et Modèles Animaux. Immr, Paris, France.
- 129.Lawrence, L. J., & Casida, J. E. (1983).** Stereospecific Action of Pyrethroid Insecticides on the γ -Aminobutyric Acid Receptor-Ionophore Complex. *Science*, 221(4618), 1399-1401.
- 130.Layachi, N. (2013).** L'effet Combiné des Vitamines C (Acide Ascorbique) et E (A-Tocophérol) Sur La Toxicité Du Cadmium Chez Les Rats Wistar. Thèse de doctorat, Université de Badji Mokhtar-Annaba.
- 131.LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012).** Organotypic liver culture models : Meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology*, 42(6), 501-548.
- 132.Le Daré, B., Ferron, P.-J., & Gicquel, T. (2021).** Il était une fois l'hépatotoxicité... médecine/sciences, 37(3), 235-241.
- 133.Lemaigre, F. (2012).** Le développement des lignages hépatiques dans le foie normal et durant la régénération. médecine/sciences, 28(11), 958-962.
- 134.Levine M, Ebenuwa I, et Violet P.C. (2020).** Vitamin C. Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health, 241-262.
- 135.Li, A. P., Berry, M. N., & Edwards, A. M. (2000).** The hepatocyte review. Human hepatocytes as an experimental system for the evaluation of xenobiotics. *Kluwer Academic Publishers: Netherlands*, 391-410.
- 136.Lin, B., Wang, Q., Liu, K., Dong, X., Zhu, M., & Li, M. (2021).** Alpha-Fetoprotein Binding Mucin and Scavenger Receptors: An Available Bio-Target for Treating Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 96.
- 137.Linster, C.L., and Van Schaftingen, E. (2006).** Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver. *FEBS J.* 273, 1516-1527.
- 138.Louvet, A., & Mathurin, P. (2015).** Alcoholic liver disease : Mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 12(4), 231-242.
- 139.Lowe, J. S., Anderson, P. G., & Anderson, S. (2018).** Stevens & Lowe's Human Histology-E-Book. *Elsevier Health Sciences*.
- 140.Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A. (1998).** Atlas de poche de pharmacologie. Médecine-Sciences : Flammarion médecine sciences, 2^{ème} édition. Paris. 32-42.

141. Lykkesfeldt, J., Michels, A. J., & Frei, B. (2014). Vitamin C. *Advances in Nutrition*, 5(1), 16-18.



142. Majumder, R., & Kaviraj, A. (2022). Histopathological Alterations of Gills, Liver and Kidney of Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus*, Exposed to Cypermethrin. *Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 10(1), 1-5.

143. Maitre, M., & J.-F. Blicklé. (2008). Métabolismes hépatiques. EMC - Hépatologie 3 (1) : 116.

144. Mamun, M. A. A., Illa, I. J., Haque, K. M. F., & Ferdousi, Z. (2014). Histological study of the effects of cypermethrin on liver and kidney tissues of mice model. *Iosr Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(5), 121-128.

145. Marshall, W. J., Bangert, S. K., & Raynaud, E. (2005). *Biochimie médicale : Physiopathologie et diagnostic*. 5ème édition Française Elsevier. France. p59-87.

146. Martínez, M.-A., Ares, I., Rodríguez, J.-L., Martínez, M., Roura-Martínez, D., Castellano, V., Lopez-Torres, B., Martínez-Larrañaga, M.-R., & Anadón, A. (2018). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. *Science of The Total Environment*, 631-632, 1371-1382.

147. Marzinke, M. A., & Dufour, D. R. (2020). Laboratory diagnosis of liver disease. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 545-559). Academic Press.

148. Mrouj, K. (2018). *Functional analysis of the proliferation antigen, KI-67 roles in cancer*. Thèse de doctorat, Université Montpellier.

149. Meeks, R. G., Harrison, S. D., & Bull, R. J. (1991). Hepatotoxicology, 700 p. *Michel V*, (2007). *Biochimie Hématologie*, 3, 39-44.

150. Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition : L'alimentation préventive et curative. Bruxelles, (2^{Éd}) .De Boeck université.

151. Merhi M. (2008) Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin .Thèse doctorat Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, Université De Toulouse.

152. Miao, J., Wang, D., Yan, J., Wang, Y., Teng, M., Zhou, Z., & Zhu, W. (2017). Comparison of subacute effects of two types of pyrethroid insecticides using metabolomics methods. *Pesticide biochemistry and physiology*, 143, 161-167.

153. Mikolajczyk, A. E., Yassan, L. J., & Pillai, A. A. (2019). A Patient With an Elevated α -Fetoprotein Level and Liver Masses. *JAMA*, 321(1), 97-98

154. Mossa, A.H., Refaie, A.A., Ramadan, A. (2011). Effect of Exposure to Mixture of Four Organophosphate Insecticides at No Observed Adverse Effect Level Dose on Rat Liver: The Protective Role of Vitamin C. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(6): 323-335.

155. Mossa, A. T. H. Heikal, T. M. Belaiba, M. Raoulison, E. G. Ferhout, H. & Bouajila, J. (2015). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrelopsis grevei* on

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-10.

156. Munson, P. V., Adamik, J., & Butterfield, L. H. (2022). Immunomodulatory impact of α -fetoprotein. *Trends in Immunology*.



157. Nanis, S. H., Walaa, G., Dina, S., Dalia, R., Mohammed, T., & ASMAA, G. A. (2019). Association of Ki-67 Expression and the Aggressiveness of Hepatocellular Carcinoma. *The Medical Journal of Cairo University*, 87(June), 1649-1655.

158. Netter, F. H., & Scott, J. (2019). *Atlas d'anatomie humaine*. Elsevier Health Sciences.

159. Nieradko-Iwanicka, B., & Konopelko, M. (2020). Effect of Lambda-cyhalothrin on Locomotor Activity, Memory, Selected Biochemical Parameters, Tumor Necrosis Factor α , and Interleukin 1 β in a Mouse Model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), 9240.

160. Nithyananthan, S., & Thirunavukkarasu, C. (2020). Arsenic trioxide, a cancer chemo drug hampers fibrotic liver regeneration by interrupting oxidative stress rekindling and stellate cell rejuvenation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 1222-1234.



161. Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Gninenko, Y. I., Zaitsev, A. S., Nyadar, P. M., & Adeyemi, T. A. (2015). A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55(3), 221-226.

162. Organisation mondiale de la santé, & Programme des Nations Unies pour l'environnement. (1991). L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique.

163. Okamoto M, Ueno Y .(2006). Is sudden with vitamin C deficiency caused by lack of carnitine?. *J. Clin. Forensic Med.* 13, 26-29.



164. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., & Dutta, S. K. (2003). Vitamin C as an antioxidant : Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.

165. Pehlivan, F. E. (2017). Vitamin C: An antioxidant agent. *Vitamin C*, 2, 23-35.

166. Pescheux, J. (2016). L'implication de la vitamine C dans la thérapie parodontale. Thèse de doctorat en chirurgie dentaire, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

167. Ploton, M. (2018). Impact de la phosphorylation de fxr par la pka sur son activité transcriptionnelle et sur la régulation de la néoglucogenèse hépatique. Thèse doctorat en Sciences biologiques pharmaceutiques , Université Lille. France.

168. Pouliquen, L. (2022). La vitamine C, notre ange-gardien—AMESSI. Org® Alternatives Médecines Évolutives Santé et Sciences Innovantes®. Bronches, 7, 662.

169.Pyabalo Aklesso, K.(2011). Action des pyréthrinoïdes sur le canal sodique activé par le potentiel des neurones du système olfactif de l'abeille domestique *Apis mellifera*. Thèse de doctorat .Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.



170.Ramadhas, M. Palanisamy, K. Sudhagar, M. , Mani, V-M.(2014).Ameliorating effect of *Phoenix dactylifera* on lambda cyhalothrine induced biochemical, hematological and hepatopathological alterations in male wistar rats. *Biomedicine & Aging Pathology*.

171.Radu-Ionita, F., Pirsopoulos, N. T., Jinga, M., Tintoiu, I. C., Sun, Z., & Bontas, E. (2020). Liver Diseases : A Multidisciplinary Textbook. *Springer International Publishing*.

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

173.Ratnasooriya, W. D., Ratnayake, S. S., & Jayatunga, Y. N. (2003). Effects of IconÒ, a pyrethroid insecticide on early pregnancy of rats. *Human & Experimental Toxicology*, 22(10), 523-533.

174.Ravula, A. R. & Yenugu, S.(2021). Effect of oral administration of a mixture of pyrethroids at doses relevant to human exposure on the general and male reproductive physiology in the rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111714.

175.Rehman, H., Naveed, M., Ahmad, K., Iqbal, M., Yousaf, S., Jamil, M., Imtiaz, H., Khan, H., & Naeem, R. (2021). Curcumin Attenuates Hepato-, and Nephrotoxicity Induced by Cypermethrin Through Inhibition of Oxidative Stress in Male Albino Rabbits.

176.Riederer, A. M., Bartell, S. M., Barr, D. B., & Ryan, B. (2008). Diet and nondiet predictors of urinary 3-Phenoxybenzoic acid in NHANES 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 116(8), 1015–1022.

177.Righi, D. A., Xavier, F. G., & Palermo-Neto, J. (2009). Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: A flow cytometric study. *International Immunopharmacology*, 9(1), 148–152.

178.Roncero, C., Ventura, J.-J., Sánchez, A., Bois-Joyeux, B., Mesa, M. L., Thomassin, H., Danan, J.-L., Benito, M., & Fabregat, I. (1998). Phorbol esters down-regulate alpha-fetoprotein gene expression without affecting growth in fetal hepatocytes in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1402(2), 151-164.

179.ROUAS, C.(2010).Etude des mecanismes mis en jeu lors d'une exposition a l'uranium appauvri sur le systeme de detoxification in vivo et in vitro. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry , Université paris XI.



180.Saadane, O. (2018). L'impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine et méthodes alternatives. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed v de rabat.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 181.Saeed, F., & Iqbal, R. (2021).** Impact of cypermethrin on blood profile, tissue redox parameters and the observation of histopathological changes in the liver of Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Pure and Applied Biology (PAB)*, 11(2), 468-482.
- 182.Sanroman, E. (2012).** Guide pratique de médecine des principaux nouveaux animaux de compagnie présente en Consultation : lapin, furet, cochon d'inde et rat. Thèse de doctorat, Université clau-bernard. Lyon, 1. 26.
- 183.Savary, C. (2014).** Etude de la toxicité chronique et du potentiel cancérogène de contaminants de l'environnement séparément et en mélange sur les cellules HepaRG .Thèse de doctorat , École doctorale Vie-Agro-Santé.
- 184.Sayah, F. Ouazene, Dj. (2017).** Effet Du Sulfate Ferreux Comme Un Supplémentaire Sur Quelques Paramètres Biologiques Et Sur l'histologie De Tissu Hépatique Chez Les Souris. Mémoire De Master, Université Saad Dahleb. Blida.
- 185.Schleier, J. J., & Peterson, R. K. D. (2012).** The Joint Toxicity of Type I, II, and Nonester Pyrethroid Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 85-91.
- 186.Schroer, A. F. W., Belgers, J. D. M., Brock, C. M., Matser, A. M., Maund, S. J., & Van den Brink, P. J. (2004).** Comparison of Laboratory Single Species and Field Population-Level Effects of the Pyrethroid Insecticide λ -Cyhalothrin on Freshwater Invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3), 324-335.
- 187.Sell, S. (1980).** Alpha-fetoprotein. *Cancer Markers*, 249-293.
- 188.Settar, A., Khaldoun Oularbi, H., Tarzaali, D., Selmani, I., Oularbi, Y., & Makhlouf, C. (2022).** Evaluation of the Effects of lambda cyhalothrin insecticide formulation "Ampligo 150 ZC", vitamins C, and E on rabbit liver: Biochemical, Histological and Morphometrical study. *Egyptian Journal of Histology*.
- 189.Soumaré, H. M. (2010).** Évaluation de l'efficacité de la land-cyhalothrine en pulvérisation intradomiciliaire dans les cercles de Koulikoro et de Bla au Mali .Thèse de Doctorat en PHARMACIE (FMPOS). Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'OdontoStomatologie . Université de Bamako.
- 190.Sperte M. (2016).** vitamines et oligoéléments : manifestations buccales des déficits et implications thérapeutiques en chirurgie dentaire. Thèse doctorat. Université Toulouse III – Paul Sabatier.
- 191.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.
- 192.Stan, F. G. (2018).** Comparative Study of the Liver Anatomy in the Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Veterinary Medicine*, 75(1), 33.
- 193.Steinberg, F.M., Rucker, R.B. (2013).** Vitamin C. In: Lennarz W.J., Lane M.D. Encyclopedia of Biological Chemistry. 2^{ème} edition. *Academic Press*, New York, p530-534.
- 194.Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018).** Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175-186.

T

195. Takasaki, I., Oose, K., Otaki, Y., Ihara, D., Fukuchi, M., Tabuchi, A., Tsuneki, H., Tabuchi, Y., Kondo, T., Saitoh, A., Yamada, M., & Tsuda, M. (2013). Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behavioural Brain Research*, 257, 182-188.
196. Testud, F., & Grillet, J. P. (2007). Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides de synthèse et divers. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Toxicologie - Pathologie professionnelle*, 16-059-C-10.
197. Thatheyus, A. J., & Selvam, A. G. (2013). Synthetic pyrethroids: Toxicity and biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 1(3), 33-36.
198. Thomson, A., Shaffer, E., Paré, P., Adams, P., Baik, S., Bain, N., Grover, P., Heathcote, J., Kichian, G., & Lee, S. (2005). Principes fondamentaux de gastro-entérologie: États pathologiques et démarches thérapeutiques ; *Janssen-Ortho Inc.* Vancouver, Canada. . 972 p.
199. Tomasi Jr, T. B. (1977). Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annual review of medicine*, 28(1), 453-465.
200. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151.
201. Tschudi, J. (2021). Les pesticides : Quel impact pour la santé? *Bulletin des médecins suisses*, 102(03), 102-104.

U

202. Uzunhisarcikli, M., & Kalender, Y. (2011). Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), 2112-2118.

V

203. Van Bellingen Céline, Bénédicte Gérard, Nathalie Kruyts, Philippe Lenoir. (2006). Université Catholique de Louvain, Faculté des Sciences ; VISTAMINE :Didactique spéciale en sciences naturelles SC2321 ; Rapport « Festival des Sciences ».
204. Vardavas, A. I. Stivaktakis, P. D. Tzatzarakis, M. N. Fragkiadaki, P. Vasilaki, F., Tzardi, M. Datseri, G. Tsiaoussis, J. Alegakis, A. K. Tsitsimpikou, C. Rakitskii, V. N. Carvalho, F. & Tsatsakis, A. M. (2016). Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food and chemical toxicology*, 94, 250-259.
205. Van der Loos, C. M., de Boer, O. J., Mackaaij, C., Hoekstra, L. T., van Gulik, T. M., & Verheij, J. (2013). Accurate quantitation of Ki67-positive proliferating hepatocytes in rabbit liver by a multicolor immunohistochemical (IHC) approach analyzed with automated tissue and cell segmentation software. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 61(1), 11-18.
206. Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 286-291.

- 207. Vijverberg, H. P. M., & Oortgiesen, M. (1988).** Steric structure and action of pyrethroids. Stereoselectivity of pesticides: biological and chemical problems/edited by EJ Ariens, JJS van Rensen and W. Welling.



- 208. Wallace, A.D. & Meyer, S.A. (2010).** Hepatotoxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley et Sons. Inc (Hoboken, New Jersey). 277-290.
- 209. Wang, H., Liang, X., Gravot, G., Thorling, C. A., Crawford, D. H., Xu, Z. P., Liu, X., & Roberts, M. S. (2017).** Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy. *Journal of biophotonics*, 10(1), 46-60.
- 210. Wang, X., & Wang, Q. (2018).** Alpha-fetoprotein and hepatocellular carcinoma immunity. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018.
- 211. Watanabe, S., Okita, K., Harada, T., Kodama, T., Numa, Y., Takemoto, T., & Takahashi, T. (1983).** Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer*, 51(12), 2197-2205.
- 212. Weselak, M., Arbuckle, T. E., & Foster, W. (2007).** Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(1-2), 41-80.
- 213. Wheater, P. R., Young, B., & Heath, J. W. (2001).** *Histologie fonctionnelle*. 1^{Ed}. Paris : De Boeck Université. pp. 144-335.



- 214. Youssef, M. (2022).** L'interet de l'utilisation de la Vitamine C et le Zinc au cours de la Pandemie Covid-19. Diplôme de Docteur en Pharmacie, Faculte De Medecine et de Pharmacie, Universite Mohammed V De Rabat.
- 215. Young, B. Heath, J. Wheater, P-R. Stevens, A. (2008).** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. De Boeck, p288-294.
- 216. Yovcheva, K. S., Dimitrov, R., Toneva, Y., Yonkova, P., Kostov, D., Rusenov, A., Uzunova, K., & Yordanova, V. (2013).** Helical computed tomography application in rabbit liver anatomy : Comparison with frozen cross-sectional cuts. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(5), 553-558.
- 217. Yu, S. J., Bae, S., Kang, J. S., Yoon, J.-H., Cho, E. J., Lee, J.-H., Kim, Y. J., Lee, W. J., Kim, C. Y., & Lee, H.-S. (2015).** Hepatoprotective effect of vitamin C on lithocholic acid-induced cholestatic liver injury in Gulo (-/-) mice. *European Journal of Pharmacology*, 762, 247-255.



- 218. Zarei, A., Noroozi, S., & Khadem, E. (2019).** A Review on the Structure and Function of Liver from Avicenna Point of View and Its Comparison with Conventional Medicine. *Traditional and Integrative Medicine*, 28 36.
- 219. Zhang, Q., Wang, C., Sun, L., Li, L., & Zhao, M. (2010).** Cytotoxicity of lambda-cyhalothrin on the macrophage cell line RAW 264.7. *Journal of Environmental Sciences*, 22(3), 428-432.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 220. Zhou, L. Zhou, M. Tan, H. & Xiao, M. (2020).** Cypermethrin-induced cortical neurons apoptosis via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Pesticide biochemistry and physiology*, 165, 104547.
- 221. Zoumenou, B., Aïna, M. P., Agbohessi, P., Imorou Toko, I., & Scippo, M.-L. (2015).** Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 2184.
- 222. Zulfiqar, A.-A., Martin-Kleisch, A., El Adli, A., Andres, E., Vogel, T., Kadri, N., & Doucet, J. (2016).** Carence en vitamine C : Y penser chez le sujet âgé fragile. *Nutrition clinique et métabolisme*, 30(2), 198-200.
- 223. Zuhair, Z. ALamri, H. (2011).** The role of vitamin C in alteration of enzymes responsible of energy metabolism induced by administration of tamoxifen to mouse. *Advances in Biological Chemistry*, 1(02), 15.
- 224. Anonyme (2013).** Fiche conseil pour la matière active : Lambda cyhalothrine (insecticide) Famille : pyréthrinoïdes .Réseaux National Des Chambres D'agriculture Du Niger.

ANNEXE

Annexe I : Matériel non biologique et appareillages



Trousse à dissection



Flacon



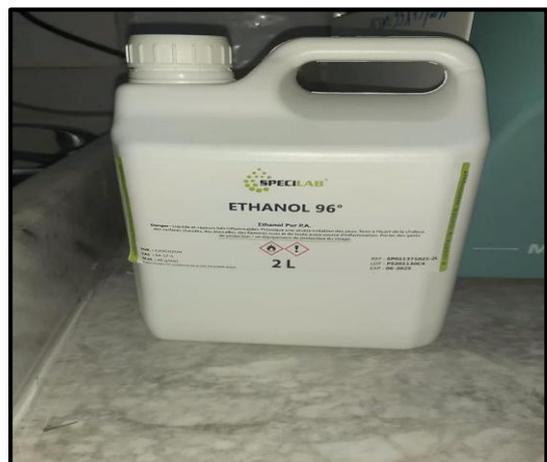
Éosine



Xylène



Paraffine



Ethanol

ANNEXE



Moule en métal utilisé dans l'enrobage



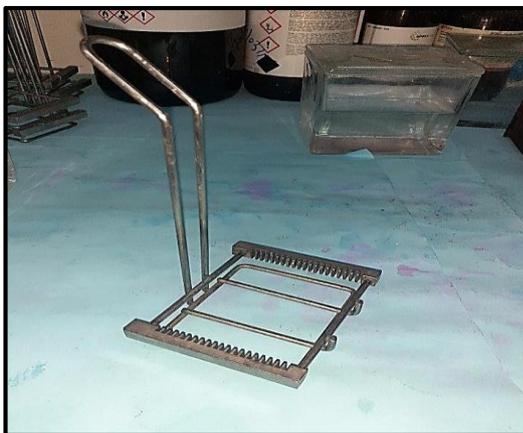
Station d'enrobage à la paraffine



Microtome



Crayon diamant



Porte lames



Plaque chauffante

ANNEXE



Etuve



La haute



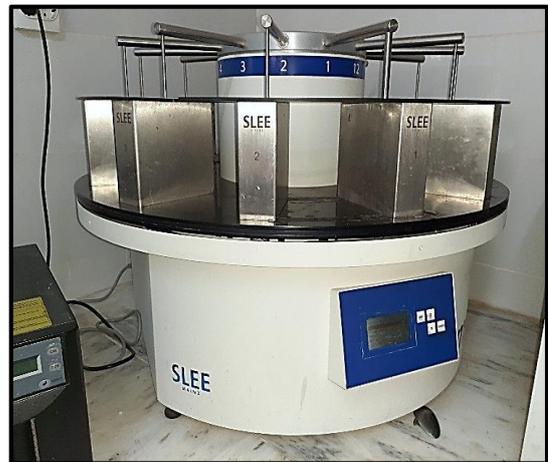
Eukitt



Pince



Lame blanche



Automate de coloration

ANNEXE



Lame coloré



Réactif de réticuline



Kitt d'immunohistochimie



Anti ki67 + anti AFP (DAKO)



**Automate d'immunomarquage
(VENTANA :BenchMark ULTRA)**



Automate de circulation

ANNEXE



Microscope photonique(Leica)

ANNEXE

ANNEXE II : Tableau des réactifs de la coloration de la réticuline

Réactifs	
A	Solution de permanganate de potassium
B	Tampon acide d'activation
C	Acide oxalique en solution
D	Sulfate d'ammonium et de fer en solution
E	Solution ammoniacale
F	Aldéhyde formique en solution
G	Chlorure d'or en solution
H	Hyposulfite de sodium en solution