

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saïda

FACULTE DES SCIENCES

**Mémoire Élaboré en vue de l'obtention du diplôme de master en
Biologie**

Spécialité : Biologie

Option : biochimie et physiologie cellulaire

Présenté par :

- Mostefai zakaria
- Djama khelifa

Sur le thème intitulé

--- ○○○○ ---

**Evaluation du pouvoir thérapeutique de l'huile essentielle de
Syzygium aromaticum chez les rats wistar co-exposé aux Pb et
Mn au cours de la période de développement.**

--- ○○○○ ---

Soutenu le 13/06/2015 Devant la commission du jury,

Melle Hadjaj Hassina	Maître - assistante « B »	U de Saida	Présidente
Mr Kahloula Khaled	Maître - conférence « A »	U de Saida	Examineur
Mr slimani Miloud	Professeur	U de Saïda	Encadreur
Mr Adli Djallal Edinne	Maître - assistant « A »	U de Saida	Co-encadreur

Remerciements

Avant tous nous tenons à remercier « Dieu ».

Ainsi que mes parents pour leur aide morale et matériel qui m'ont apporté et qui m'a été un soutien indéfectible.

*Et à travers ce modeste de travail nous remercions notre promoteurs « **Pr slimani** et **Mr Adli D E** » pour l'intéressante documentation qu'il a mise à nos dispositions, pour ses conseils précieux et pour toutes les commodités et aisances qu'il met apportées durant la préparation et la réalisation de ce projet.*

Nous remercions les membres de jury qui nous avons fait l'honneur d'accepter et d'examiner notre travail.

*Nous remercions **Mr halla .N, Amemem.K Mell Hadjadj.H et Mr K.kahloula***

Pour sa collaboration.

Nous exprimons également nos gratitudes à tous les professeurs et enseignants qui ont collaboré à nos formation depuis notre premier cycle d'étude jusqu'à la fin de notre cycle universitaire.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation du présent travail.

Résumé :

Le plomb(Pb) et le manganèse(Mn) sont des contaminants environnementaux, industriels ubiquitaire et neurotoxiques, produisant des changements biochimiques et histologiques dans le système nerveux central qui peuvent entraîner des effets sur le comportement.

La co-exposition chronique aux plomb et manganèse chez rats pendant la période de développement, a permis d'enregistrer une baisse corporelle des jeunes rats (J30). Ainsi a provoqué un changement des paramètres biochimiques et des lésions histologiques ou ces résultats sont en faveur d'un dysfonctionnement cérébral par une dégénérescence des cellules nerveuse et activation des microglies.

L'utilisation de différentes techniques relatives aux tests de comportements plus précisément ceux de l'anxiété (labyrinthe de croix surélevé) et de la dépression (forced swimming test) dévoilent clairement que l'intoxication aux Pb-Mn provoque un état anxieux et dépressif chez les jeunes rats issues de femelles intoxiquées pendant la période de développement qui est expliquée par un effet délétère du Pb et Mn sur la transmission dopaminergique et sérotoninergique .On a aussi enregistré une hyperactivité locomotrice accompagnée d'une augmentation significative dans les comportements stéréotypés (le nombre de carreaux traversés, le redressement, les visites au centre) évalué par le test (open-field).

Il ressort à travers le test de reconnaissance d'objet et labyrinthe Y que la co-exposition aux Pb et Mn s'accompagne d'une atteinte des performances d'apprentissage et la mémorisation chez les jeunes rats intoxiqués pendant la gestation et lactation comparée aux jeunes rats témoins.

Dans une autre séries d'expérimentations, nous avons constaté que le déséquilibre de la balance oxydative traduite par une perturbation dans les activités enzymatiques :Super Oxide Dismutase ,Glutathionne peroxydase et de la catalase chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins. Cette perturbation dans les activités des différents systèmes de défense cellulaires est due à l'effet pro oxydant du plomb qui a engendré une surproduction de radicaux libres.

Par ailleurs, le dosage du Pb et Mn au niveau sanguin et cérébral a permis de constater que le cerveau constitue un des sites préférentiels de fixation du Pb et Mn.

Cependant, l'administration de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (l'HEC) à une dose de 0,1 ml/kg pendant une durée de 3 semaines à des rats préalablement intoxiqués, induit une nette amélioration des différents troubles d'ordres neurocomportementaux (activité locomotrice , dépression , anxiété et mémoire) , biochimiques (les enzymes antioxydants , phosphatase alcaline , glucose et taux du Pb et Mn sanguin et cérébral) et histologique .Cette série d'expériences a montré que l'HEC est douée d'un pouvoir correcteur des dommages causés par les effets toxiques du Pb et Mn .

Mots clés : Apprentissage, Comportement cognitif, Développement cérébral, Enzymes cérébrales, mémoire, Plomb, manganèse, *Syzygium aromaticum*, clous de girofle, Huiles essentielles.

Abstract:

Lead (Pb) and manganese (Mn) are environmental contaminants, industrial ubiquitous and neurotoxic, producing biochemical and histological changes in the central nervous system that can cause behavioral effects.

Chronic exposure to co-lead and manganese rats during the development period, allowed to record a drop in body young rats (J30). Thus caused a change in biochemical parameters and histological lesions or the results are in favor of a brain dysfunction by degeneration of nerve cells and microglial activation.

The use of different techniques for behavior tests specifically those of anxiety (raised cross maze) and depression (forced swimming test) clearly reveal that intoxication Pb and Mn causes anxiety and depression in young female rats from intoxicated during the development period is explained by a deleterious effect of Pb and Mn on the dopaminergic and serotonergic transmission .We also recorded a locomotor hyperactivity accompanied by a significant increase in stereotyped behaviors (the number of crossed tiles, recovery, visits the center) rated by the test (open field).

It emerges through the object recognition test and y maze there that co-exposure to Pb and Mn is associated with achievement of learning and memory performance in young rats poisoned during gestation and lactation compared to youth control rats. In another series of experiments, we found that the oxidative imbalance reflected a disruption in the enzymatic activities: Super Oxide Dismutase, Glutathione peroxidase and catalase in addicted rats compared to control rats. This disruption in the activities of various cellular defense systems is due to the pro-oxidizing effect of lead which caused an overproduction of free radicals. Furthermore, the determination of Pb and Mn the blood and the brain showed that the brain constitutes a preferential binding sites Pb and Mn.

Furthermore, the determination of Pb and Mn the blood and the brain showed that the brain constitutes a preferential binding sites Pb and Mn.

However, essential oil administration *Syzygium aromaticum* (HEC) at a dose of 0.1 ml / kg over a period of 3 weeks previously addicted rats induced a significant improvement of different orders disorders neurobehavioural (locomotor activity, depression, anxiety and memory), biochemical (antioxidant enzymes, alkaline phosphatase, glucose and Pb rates and blood and brain Mn) and histological .This series of experiments showed that the HEC is gifted with protective or corrective power and the damage caused by the toxic effects of Pb and Mn.

Keywords: Learning, Cognitive Behavior, Brain Development, Enzymes brain, memory, lead, manganese, *Syzygium aromaticum*, cloves, Essential Oils.

LISTES DES FIGURES

Figure 01.....	06
Figure 02.....	07
Figure 03.....	08
Figure 04.....	09
Figure 05.....	13
Figure 06.....	22
Figure 07.....	23
Figure 08.....	23
Figure 09.....	25
Figure 10.....	27
Figure 11.....	30
Figure 12.....	31
Figure 13.....	31
Figure 14.....	33
Figure 15.....	34
Figure 16.....	35
Figure 17.....	35
Figure 18.....	37
Figure 19.....	38
Figure 20.....	44
Figure 21.....	45

Figure 22.....	47
Figure 23.....	48
Figure 24.....	48
Figure 25.....	49
Figure 26.....	50
Figure 27.....	51
Figure 28.....	52
Figure 29.....	53
Figure 30.....	54
Figure 31.....	55
Figure 32.....	55
Figure 33.....	56
Figure 34.....	57
Figure 35.....	59
Figure 36.....	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01	26
Tableau 02.....	27
Tableau 03.....	30
Tableau 04.....	46

LISTE D'ABREVIATIONS

ACh : acétyle choline.

ADHN : acide désoxyribonucléique.

ALA : Acide aminolévulinique

ALA-D : Acide aminolévulinique déshydratase

ATP : adénosine triphosphate.

Ca : calcium.

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer.

EPPI : eau pour préparation injectable

FST : Forced Swimming Test

GABA : acide-gamma-amino-butyrique

GC/MS : la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse

GR : globules rouges

GSH : glutathion réduit.

GSSG : glutathion oxydé.

HE :Huile essentiel

HEC : Huile essentiel de clou de girofle.

K : potassium.

Mg : magnésium.

Mn : manganèse

Na : sodium.

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartic acide

PAL : phosphatase alcaline

Pb : plomb.

Ph : potentiel hydrométrique.

SNC : système nerveux centrale.

SNP : système nerveux périphérique.

SEM : erreur standard moyenne

TIM : temps d'immobilité.

MP : maladie du parkinson

INTRODUCTION

Introduction

L'exposition humaine aux métaux neurotoxiques est un problème mondial de santé publique. Les métaux qui provoquent une toxicité neurologique, tels que le plomb (Pb) et le manganèse (Mn), sont d'intérêt particulier et probablement irréversible de leurs effets. L'exposition au Pb dans l'enfance peut avoir comme conséquence des déficits cognitifs et comportementaux chez les enfants. Ces effets sont de longue durée et persistent à l'âge adulte. Alors le Mn est un élément essentiel de l'alimentation humaine et sert de nombreuses fonctions cellulaires dans le corps humain, les niveaux élevés de Mn peuvent entraîner un syndrome comme la maladie de Parkinson et l'exposition in utero de Mn peut nuire le développement neurologique d'enfance. En raison de l'omniprésence des deux métaux Mn et Pb la réduction de l'exposition humaine à des niveaux toxiques reste un défi de la santé mondial publique (**Neal et Guilarte, 2013**).

Les plantes produisent naturellement des substances actives permettant de se protéger contre les maladies ou d'attaques extérieures. De celles-ci ont été tirées les huiles essentielles (HE). Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications des leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux (**Tchamdja, 1995 ; Mayer, 2012**).

De ce fait, depuis des décennies le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales. De plus, d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple un effet anti-inflammatoire, antibactérien, des propriétés neuroprotectrices, anesthésique, hépatoprotectrice, anti-anaphylactiques et anti-oxydantes (**El-segaey et al., 2007 ; ashti-R et al., 2009**).

A la lumière de ces données notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur des rats intoxiqués par l'acétate du plomb et chlorure de manganèse tétrahydraté durant la période de développement.

Différentes approches expérimentales ont été développées dans l'exploration du fonctionnement cérébral :

-Approche physiologique, portant sur la croissance de la progéniture (Taux de natalité, évolution pondérale)

- Approche comportementale (activité locomotrice, test d'anxiété, test de dépression et test d'apprentissage)

-Approche biochimique (Dosage de la plombémie et détermination de l'activité de certaines enzymes cérébrales a savoir : phosphatase alcaline, des enzymes antioxydants.

- -Approche histologique: coupe sagittale du cerveau.

CHAPITRE I

L'histoire des métaux lourds n'a pas été écrite. Et pourtant, ils paraissent étroitement liés à la civilisation. L'or, l'argent, le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie. La problématique même des métaux et des métaux lourds en particulier repose sur le fait qu'ils sont très utiles, voire indispensables à l'homme (**Di Benedetto., 1997**).

Le Pb est l'un des métaux lourds les plus anciens, largement utilisé depuis la période antique. Ainsi des découvertes archéologiques ont mis en évidence la présence de pb dans des objets et des pigments dès début de l'Age de Bronze (**Lessler, 1988**).L'extraction de Pb a connu son apogée à l'époque romaine (5000 ans), pour la production d'ustensiles, des récipients, des conduites, des soudures et des monnaies, se servaient aussi de l'acétate de Pb comme édulcorant et conservateur du vin (**Garnier, 2005**). Ainsi que lors de la révolution industrielle où une demande sans précédent s'est accompagnée d'une augmentation exponentielle de l'intensité des émissions dans l'environnement (**Gildlow, 2004**).

Chaque année, du fait de l'extraction et de l'utilisation de 3 millions de tonnes de Pb dans le monde, près de 200 000 tonnes de ce métal sont émises dans l'atmosphère, ce qui fait une menace permanente pour la santé des populations (**Derache, 1989**).

Des mesures réglementaires ont progressivement été mises en place afin d'interdire l'utilisation des peintures contenant du plomb, de réduire l'utilisation des canalisations en Pb pour la distribution d'eau potable et d'interdire la commercialisation de l'essence plombée (**ORS, 2007**).

I.1. Propriétés physico-chimiques du plomb

Le Pb est un élément trace métallique, xénobiotiques, du latin *plombum*, ubiquitaire, de couleur gris bleuté, on le trouve à l'état naturel, sous forme de minerai, il appartient au groupe IV_A de la classification périodique des éléments, ainsi qu'il existe 20 isotopes, dont 16 sont radioactifs et 4 naturels: ²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb et ²⁰⁸Pb (**OMS, 2000**).

I.2. Les sources d'exposition

Les sources les plus courantes d'exposition au Pb en cours sont la peinture au Pb dans les vieilles maisons, les sols contaminés, la poussière, l'eau potable, cristal au Pb et poterie glacée au Pb.

Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître qu'il est souvent difficile d'identifier la source de Pb ayant intoxiqués l'animal (**Landrans et Paclot, 1994; Landrans et al., 1989 ; 1999**). En fonction de l'origine des aliments consommés, l'alimentation contribue pour une part parfois non négligeable à l'apport en Pb. Mais même en absence d'une consommation de ce type, il existe une exposition de fond, de la population des pays industrialisés, par accumulation du Pb dans la chaîne alimentaire et également par des techniques inappropriées de conditionnement ou de cuisson des denrées destinées à la consommation humaine ou animale (**Ait hamadouche, 2009**).

I.3. Toxicocinétique

Le métabolisme du Pb absorbé est important à connaître pour comprendre certains aspects de l'intoxication suite à une exposition.

I.3.1. L'absorption

Trois voies d'expositions au Pb sont possibles pour l'homme ; l'ingestion, l'inhalation et le contact cutané.

I.3.1.1. L'absorption digestive

L'ingestion du Pb est, de loin, la voie d'intoxication prédominante. Notamment chez les enfants près de 50% du plomb ingéré grâce à des objets portés à la bouche (**Traore, 2007**)

De plus, la biodisponibilité du Pb dépend de sa solubilité dans le tractus intestinal, (**Bonnard et al., 2006**), celle-ci évolue entre autre avec le pH local (augmente avec l'acidité du pH) en effet, le Pb doit être solubilisé pour être absorbé (**Amadur et al., 1996**), cette absorption s'effectue par transport actif (saturable) et transport passif (non saturable), elle est fortement augmentée par le jeûne, la carence martiale en Mg^{+2} , vitamines B1, Fe, les régimes alimentaires riches en graisse et (**Happiette, 2010**), et tout besoin supplémentaire riche en Ca^{+2} (grossesse, lactation, croissance) (**Chaveron, 1999**).

I.3.1.2. L'absorption respiratoire

L'absorption pulmonaire du Pb est importante pour les personnes exposées en milieu industriel dans l'environnement, des entreprises polluantes, mais elle peut également constituer une voie pour les personnes vivant sous les rejets atmosphériques (**ORS 2007**). La détérioration de la peinture à base de Pb dans les vieilles maisons et les niveaux élevés de poussière de maison contaminée au plomb sont les plus fréquentes sources (**Pearce 2007**).

En effet, le Pb atmosphérique peut être inhalé sous forme de vapeurs ; de gaz ou migrant directement jusqu'aux alvéoles pulmonaire ou ils passent dans le sang ou sous forme des particules métallurgiques qui se dépose sur la muqueuse de différents segment de l'appareil respiratoire en fonction de leur taille, les plus grosses restant au niveau de rhino-pharynx et des grosses branches souches, les particules les plus fin diffusent directement vers la membrane alvéolocapillaire (**Philippon, 2000**).

De ce fait, la fréquence respiratoire d'un enfant de 3 ans inhale 2fois plus d'air par kilo de poids qu'un adulte, ainsi que les enfants sont plus actifs physiquement, or l'activité augmente les besoins en oxygène (O_2) et donc la fréquence respiratoire augmente (**Happiette, 2010**).

Globalement on estimée qu'environ un tiers du Pb absorbé par inhalation, pouvant atteindre 70% sous l'effet de la température (**Saka et al., 2011**).

I.3.1.3. L'absorption cutanée

Le Pb peut aussi pénétré par voie cutanée, à la faveur de lésion de la peau et pour certains composés organiques, grâce à leur liposolubilité. Des tests in vitro réalisé sur la peau humain ont permis de classer différents composées du Pb selon leur taux d'absorption par ordre décroissent : tétrabutyl de pb > naphthalène de pb > acétate de pb > oxyde de pb (**Bress et Bidaneset, 1991**).

I.3.2. La distribution

Après avoir été absorbé, le Pb passe dans le sang est réparti entre les hématies (plus de 90% se trouve liée aux érythrocytes), dans ces hématies 52% du plomb est fixé à l'hémoglobine (**Ong et Lee 1980**), Le compartiment sanguin est par le même un carrefour de tous les trajets du plomb dans l'organisme, c'est la raison pour laquelle au plan analytique le Pb doit être dosé dans le sang totale et non pas seulement dans le plasma.

Le second compartiment est formé des tissus mous et possède lui aussi une demi de vie de 40 jour, quant au troisième compartiment, il correspond l'os et se distingue par une demi de vie très long (10-20 ans), avec une concentration de 95% de plomb contenu dans l'os (**Demichele, 1984**). (**Voir figure 01**)

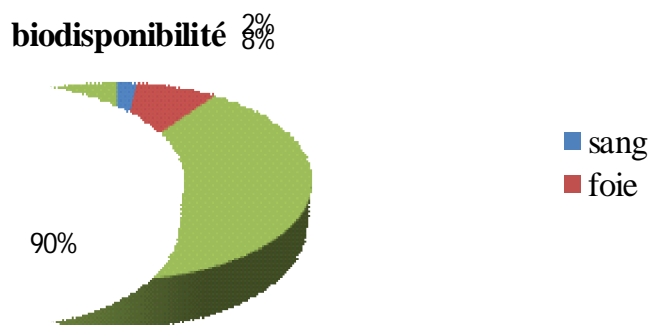


Figure 01: Répartition du plomb dans l'organisme (**Happiette, 2010**)

I.3.3. L'élimination

Chez l'homme, la principale voie d'excrétion du Pb est urinaire, au moins de 75% du Pb absorbé sont éliminés par cette voie (**Haguenoer et Furon 1982 ; Orloff et al., 2004**), comme la concentration du Pb dans la bile est dix fois supérieure à celle de l'urine (**Laurewys, 1983 ; Bonnard et al., 2006**). La quantité de Pb contenue dans les fèces reflète plus le Pb non absorbé par l'intestin que le Pb excrété par voie biliaire (**Saka et al., 2011**).

Le Pb peut également s'éliminer par la salive, la sueur, les cheveux et les ongles. Négligeable dans des conditions normales, l'exposition à la chaleur peut entraîner chez l'homme une excrétion sudorale supérieure à l'élimination urinaire (**Asayama et al., 1975 ; Piechalak et al., 2008**), ainsi que le Pb en raison de sa similarité avec le calcium est excrété dans le lait (**INRS, 2003**). (Voir la figure 02)

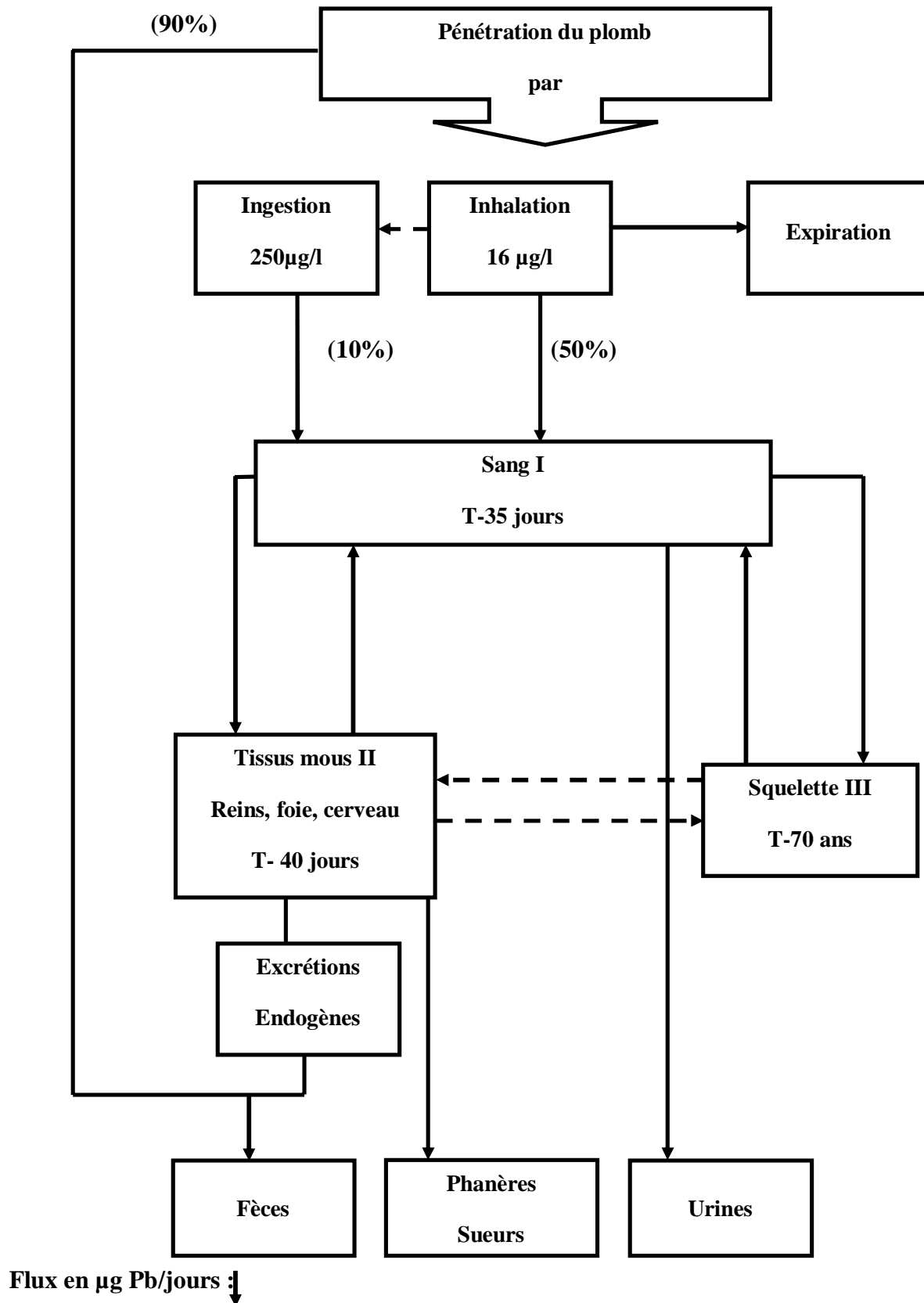


Figure 02: Le devenir du plomb dans l'organisme (Brun et al., 1995).

I.4. La toxicité de plomb

Le Pb ne joue aucun rôle physiologique au sein de l'organisme, (Kahloula., 2009) mais il est toxique pour les systèmes hématopoïétique, rénal, reproducteur, cardiovasculaire et nerveux central et périphérique. Les symptômes de l'intoxication au plomb chez les adultes, s'ils sont présents, sont non spécifiques et varient considérablement entre les individus (Karri, 2008), et aussi selon sa forme chimique, la fréquence, la durée et la voie d'administration (Nabil .M Ibrahim et al., 2012).

I.4.1. Intoxication chronique

La toxicité du plomb peut se manifester cliniquement dans plusieurs organes. Spécifique dysfonctionnement du système organe comprend le système nerveux central et périphérique, et le système rénal, hématologique, gastro-intestinal et reproductif. (Voir Figure 03).

Enfants	Plombémie (µg/l)	Adultes
	1500	
	Décès →	
	1000	← Encéphalopathie
Encéphalopathie →		
Néphropathie →		← Anémie
Anémie →		← Longévité diminuée
	500	← Altération de la synthèse d'hémoglobine
Douleurs abdominales →		
	400	← Neuropathie périphérique
↘ Synthèse de l'hémoglobine →		← Infertilité masculine
	300	← Néphropathie
↘ Métabolisme de la vitamine D →		← Pression artérielle systolique ↗ (hommes)
	200	← Acuité auditive ↘
↘ Vitesse de conduction nerveuse →		← Proto porphyrines érythrocytaires ↗ (hommes)
↗ Proto porphyrines érythrocytaires →		← Proto porphyrines érythrocytaires ↗ (femmes)
↘ (?) Métabolisme de la vitamine D →		
↘ Toxicité neurologique →		
↘ QI →	100	← Hypertension ↗ (?)
↘ Audition →		
↘ Croissance →		
Passage placentaire →		

Légende : ↗ Augmenté la fonction ; ↘ Diminué la fonction.

Figure 03 : Effets du plomb inorganique sur les enfants et les adultes (ATSDR, 1990)

I.4.1.1. Effet Enzymatique

La principale cause de la toxicité du Pb est son interférence avec une variété d'enzymes car il se lie à des groupes sulfhydryle trouvés sur de nombreuses enzymes. (Pearson et Schonefeld, 2003). Le pb est capable de se lier et d'interagir avec un grand nombre des mêmes enzymes que ces métaux, mais, en raison de sa composition chimique différente, ne pas fonctionner correctement en tant que cofacteur, interférant ainsi avec la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction normale ou réactions. Parmi les métaux essentiels qui interagissent de plomb sont le calcium, le fer et le zinc (Kosnett, 2006).

I.4.1.2. Effet sur le système nerveux central (SNC)

En témoignent, chez les enfants intoxiqués, la présence de modifications de l'humeur et de l'attention, ou la diminution des performances intellectuelles perceptibles par exemple lors de l'apprentissage de la lecture ou des mathématiques (Banks et al, 1997).

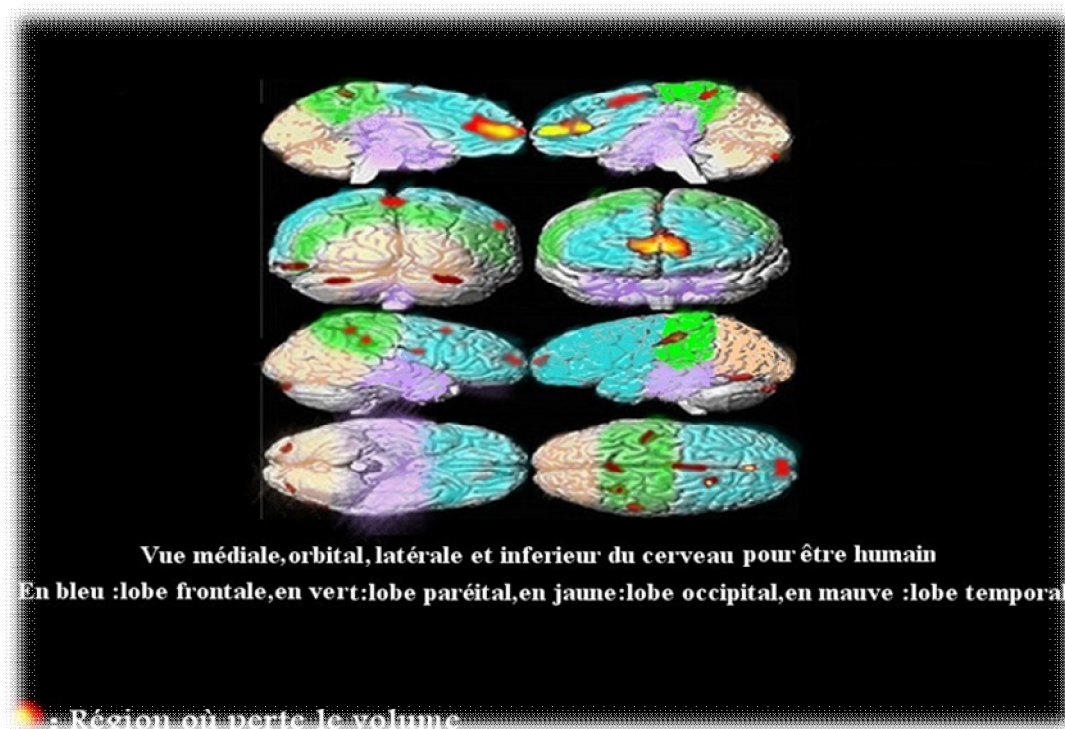


Figure 04 : région de la perte de volume s'affichent en couleur sur un modèle d'un cerveau normal (Cecil et al., 2008).

Cette neurotoxicose est due à la perturbation des mécanismes de libération de neurotransmetteurs régulés par le calcium (**Godwin, 2001**). Plusieurs modes d'action sont proposés : compétition du plomb avec le calcium et blocage des canaux calciques, inhibition de la Na⁺/K⁺-ATPase membranaire,; la croissance, la différenciation et la survie des neurones pourraient également être indirectement altérées, du fait d'effets toxiques du plomb sur les cellules gliales. (**INSERM, 1999**). Mener des causes atteinte asymptomatique fonction neurocomportementaux chez les enfants à des doses insuffisantes pour produire encéphalopathie clinique (**WHO, 2010**), ont été associées à importantes diminutions de volume de matière grise pour plusieurs régions corticales (Figure 06). L'analyse volumétrique a révélé une relation dose-effet linéaire inverse entre la plombémie moyenne de l'enfance et de volume dans des régions spécifiques du cerveau (**Cecil et al., 2008**).

I.4.1.3 Effets sur les systèmes neurotransmetteurs

Le plomb interfère avec la libération de neurotransmetteurs, les produits chimiques utilisés par les neurones d'envoyer des signaux à d'autres cellules (**Dart et al.2004**).

I.4.1.3.1. Sur système dopaminergique

C'est les cellules capables de libérer de la dopamine, ce sont surtout des neurones soit dans le SNC soit dans SNP comme pour tout système, il y a des familles de récepteurs qui vont contrôler le tonus des muscles striés (**Girodet, 2010**).

L'effet du plomb consiste à une défaillance dans la régulation de la synthèse de la dopamine et de sa libération (**Croy-Slechta, 1995**), accompagnée d'une inhibition de la transmission synaptique dans les nerfs périphériques (**Tong et al, 1995**).

I.4.1.3.2 Sur système glutaminergique

Le Pb interfère avec la libération de glutamate, un neurotransmetteur important dans de nombreuses fonctions, y compris l'apprentissage, en bloquant les récepteurs N- Méthyl D- aspartate (NMDA), le ciblage de ces récepteurs est considéré comme l'une des principales causes de plomb de la toxicité pour les neurones (**Xu et al., 2009**).

I.4.1.3.3. Système cholinergique

L'acétylcholine, (ACh), est un neurotransmetteur qui joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central, où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, notamment dans l'activité musculaire et les fonctions végétatives.

Par ailleurs, Le plomb décline la libération d'acétylcholine et diminue la fonction cholinergique in vivo et in vitro (**Croy-slechta, 1995**).

I.4.1.4 Effets sur le système nerveux périphérique

Le système nerveux Périphérique (SNP) est plus important chez les adultes et le système nerveux central est plus important chez les enfants (**Bellinger., 2004**).

Une atteinte sur SNP caractérise par une baisse de la conduction nerveuse se traduit sur le plan histologique par un changement pathologiques dans ces fibres comprennent démyélinisation segmentaire et dégénérescence des axones. (**Dart et al., 2004**).

I.4.1.5 Effets hépatiques

Le foie, par l'intermédiaire de la veine porte, est le premier organe exposé aux aliments absorbés par voie parentéral et à tout autre xénobiotique. Elle se compose de tissu métabolique fortement actif contenant un équipement enzymatique très important de désintoxication désigné sous le nom des systèmes d'enzymes de la phase I et de la phase II qui sert à protéger les autres systèmes physiologiques des effets toxiques des composés xenobiotique. Plusieurs études ont rapporté que le Pb induit une forte hépatotoxicité et provoque des changements dans le métabolisme du cholestérol, une prolifération des cellules du foie, et de synthèse d'ADN indiquant une hyperplasie hépatique (**Dini et al., 1999**).

De plus, l'accumulation des quantités significativement élevée du Pb au niveau du foie est impliquée dans l'induction d'un effort oxydant importante ; et ce par une peroxydation de lipide avec l'inhibition concomitante de plusieurs enzymes antioxydants telles que la superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase, le glutathion réductase. Ceci a été accompagné d'une augmentation simultanée en bisulfure de glutathion (GSSG) et d'une réduction du rapport GSH/GSSG (**Sandhir et Gill, 1995 ; Aykin et al., 2003**).L'exposition au Pb chronique augmente également l'activité de la phosphatase alcaline et α -glycérophosphate déshydrogénase qui pourrait être une adaptation aux changements métaboliques, structuraux et fonctionnels dans les organites des cellules hépatiques en raison de Pb (**Bashir et Taib, 2012**).

I.4.1.6.Effets sur la reproduction

Chez l'homme, les études suggèrent qu'une exposition à long terme au plomb de plusieurs années, de l'ordre de 6 à 10 ans (plombémie supérieure à 400 $\mu\text{g/l}$), provoque une réduction de la production des spermatozoïdes due à une diminution de la stéroïdogénèse (**Anjum et al., 2011**),et donc, un risque d'hypofertilité (**Alexander et al., 1996**).

Chez les femmes ayant une plombémie moyenne de 150 µg/l, plusieurs études n'ont montré aucune augmentation du risque d'avortement spontané comparativement à un groupe témoin (**Murphy et al., 1990**). Cependant, une baisse de fécondité a pu être associée à un groupe de femmes qui présentait des plombémies comprises entre 290 et 500 µg/l (**Sallmen et al., 1995 ; Greenlee, 2003**).

Par ailleurs, contrairement aux résultats d'une étude qui suggérait que le plomb entraînait une réduction du poids de naissance, des accouchements prématurés et une altération de la croissance et du développement fœtal, une étude plus récente ne retrouve pas d'effet sur le poids de naissance ou la durée de la grossesse pour les mères dont les plombémies sont inférieures à 150 µg/l (**Bellinger et al., 1991**).

I.4.1.7. Effets cancérigènes

En 1980, le groupe d'experts réunis par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a conclu que le plomb et ses dérivés inorganiques étaient potentiellement cancérigènes pour l'homme (groupe 2B) (**IARC, 1980**). Certains composés du plomb exercent une faible activité génotoxique dans les cellules de mammifères, par des mécanismes indirects reposant sur la perturbation de l'activité d'enzymes impliqués dans la synthèse, la réparation ou le maintien de la structure hélicoidale de l'ADN. En outre, certains composés du plomb peuvent contribuer à un effet cancérigène en agissant au niveau de protéines nucléaires, où ils exerceraient une activité promotrice ou induiraient une stimulation de la prolifération cellulaire (**Zelikoff et al 1988, Fowler et al 1994**). En particulier, il a été montré que l'ion Pb^{2+} peut, à faible concentration, stimuler l'activité de la protéine kinase C. Cela indiquerait un potentiel cocancérigène et/ou promoteur (**MarLovac et Goldstein, 1988**). La formation d'inclusions nucléaires composées de protéines acides complexées au Pb^{2+} peut également influencer la croissance et la division cellulaire (**Beck, 1992**).

CHAPITRE II

L'intoxication au manganèse est une maladie initialement décrite par **Couper en 1837**, est fréquemment retrouvée chez les mineurs, les soudeurs, et les ouvriers travaillant dans le blanchiment du textile. En effet, lorsque les conditions de travail sont mauvaises (ventilation insuffisante, protection limitée), ces travailleurs respirent des particules de Mn tout au long de leurs années de travail.

Le Mn est un élément essentiel pour les humains, les animaux et les plantes. Que l'on trouve dans l'air, le sol et l'eau. Il est un oligoélément essentiel requis pour la fonction normale et le développement de nombreux processus physiologiques. En effet, le Mn est un constituant d'un grand nombre d'enzymes cellulaires (comme la superoxyde dismutase-2 ou la pyruvate carboxylase) et sert à en activer d'autres (les kinases, décarboxylases, transférases, hydrolases...) (**Hurley et al., 1984**). Dans le système nerveux central, Mn fonctionne comme un cofacteur d'enzymes nécessaires à la fonction neuronale et la biosynthèse des neurotransmetteurs (**Bouchard et al. 2011**). Normalement, les mécanismes régulateurs maintiennent des niveaux homéostatiques de Mn dans le corps en contrôlant l'absorption et l'élimination des excès métallique par excrétion hépatobiliaire. Les besoins physiologiques en manganèse sont facilement couverts par l'alimentation. (**Roberto et al., 2014**).

11.1. Propriété Physicochimiques :

Le manganèse est un élément chimique noté Mn (**Figure 05**), de masse moléculaire 54,9g/mol et avec un numéro atomique $Z=25$, qui appartient au groupe VIIB dans la classification périodique des éléments (**Daoust, 2012**).



Figure 05 : Photo du manganèse sous forme minérale extrait d'un minerai. **Daoust, 2012**

II .2. Sources d'exposition :

Le Mn est l'un des métaux les plus abondants sur la surface de la terre, recouvrant environ 0,1% de la croûte terrestre. On trouve le Mn sous forme pure mais aussi associé à plus de 100 minéraux. L'homme peut être exposé au Mn de quatre façons : par l'eau, par l'alimentation, par l'air ou encore par contact avec des produits industriels (**ATSDR, 2000**). Les expositions professionnelles aux composés inorganiques du Mn se produisent presque uniquement par inhalation de poussières et de fumées contenant du Mn. Elles sont surtout reliées aux émissions des véhicules automobiles et des camions lors de l'entretien de même qu'aux poussières de minerais lors de l'extraction et du traitement, aux opérations de préparation d'acier au Mn, dans les usines de fabrication de piles sèches de même que dans les opérations de soudage d'acier au manganèse et utilisant des électrodes à fortes teneurs en Mn. (**ACGIH, 2001**).

II .3. Rôle physiologique du Mn :

Le Mn est indispensable au bon fonctionnement de nombreux organes mais aussi à celui du système immunitaire. Il joue un rôle important dans la régulation de la glycémie ou encore pour la production de l'énergie cellulaire, la reproduction, la digestion et la croissance des os. Le Mn est également nécessaire (avec le potassium) pour initier la coagulation du sang (**Aschner et al., 2006**). Placés expérimentalement en carence de Mn, les hommes présentent une éruption érythémateuse sur le torse et les femmes développent une humeur altérée et une augmentation de la douleur pendant la phase prémenstruelle du cycle ovarien (**Aschner, 2005**).

II .4. Toxicocinétique :

II .4.1. L'absorption:

Les états d'oxydation du Mn affectent son absorption. des recherches ont montré que la forme Mn^{2+} ($MnCl_2$) est plus facilement absorbée que les autres tels que les sels de sulfates ou acétate (**Gibbons et al., 1976**). La voie d'absorption est aussi importante puisque le Mn est absorbé plus rapidement par inhalation que par les autres voies (**Tjälve et al., 1996**). En effet, très peu de Mn passe la barrière cutanée. L'absorption de Mn après inhalation, par injection intraveineuse ou intrapéritonéale (expérimentation chez l'animal) permet de contourner la faible absorption du Mn par le tract gastro-intestinal. En effet, seulement 3 à 10%

du Mn ingéré est absorbé (**Mertz, 2009**). Le Mn absorbé sous la forme Mn^{2+} par l'intestin est complexé avec les protéines du sang qui sont ensuite éliminées par le foie via la veine porte. De nombreux processus physiologiques permettent cette régulation de l'entrée de Mn et le maintien de son homéostasie. A titre d'exemple, chez l'animal il est connu que le Mn inhalé est transporté de façon rétrograde de l'épithélium olfactif jusqu'au striatum cérébral (**Gianutsos et al., 1997**).

II .4.2. Distribution du Mn:

Le Mn est présente dans tous les tissus du corps. Les plus forts taux sont couramment trouvés dans le foie, les reins, le pancréas et les glandes surrénales (**Sumino et al., 1975**). Des concentrations intermédiaires sont trouvées dans le cerveau, le cœur et les poumons (**ATSDR, 2000**), avec une accumulation préférentielle dans certaines régions du cerveau des nourrissons et jeunes animaux (**Kontur and Fechter, 1988**). Les plus faibles concentrations sont trouvées dans les os et la graisse. Certaines études suggèrent que les tissus riches en mitochondries (par exemple le foie, les reins et le pancréas) contiennent plus de Mn (**Kato, 1963**).

II.4.3.Métabolisme :

Cet élément chimique est capable d'exister dans un certain nombre d'états d'oxydation, et des données limitées suggèrent qu'il peut subir des changements dans l'état d'oxydation dans le corps. L'état d'oxydation de l'ion de Mn dans plusieurs enzymes semble être Mn (III), tandis que la plupart des Mn pris de l'environnement sont Mn (II) ou Mn (IV) **Roberto et al., 2014**. **Gibbons et al. (1976)** ont suggéré que l'oxydation du Mn se produit dans le corps. Il a observé que la céruloplasmine humaine a provoqué l'oxydation de Mn (II) à Mn (III) in vitro et, bien que le processus n'ait pas été étudié in vivo, il est probablement un mécanisme pour l'oxydation de Mn dans le sang.

II .4.4. Excrétion du Mn :

Le Mn est entièrement excrété par les fèces, seule une toute petite proportion (0,1-2%) est éliminée par les urines (**Hauser et al., 1994**) . De plus, le Mn fécal est composée de Mn ingéré non absorbé et de Mn excrété par la bile (**Davis and Greger, 1992**). La sueur, les cheveux et le lait maternel contribuent aussi à l'excrétion du Mn (**Daoust, 2012**).

II .5. La toxicité de manganèse

II .5.1. Neurotoxicité :

Le système nerveux central est la principale cible de la toxicité de Mn. Bien que le Mn est connu pour être un toxique cellulaire qui peut nuire des systèmes de transport, activités enzymatiques et les fonctions du récepteur (**Aschner et Aschner 1991 ; Roberto et al., 2014**).

Le Mn provoque une réduction importante des niveaux de dopamine dans le noyau caudé, putamen(**Karin Tuschl et al., 2013**) une réduction de noradrénaline dans l'hypothalamus (**Bernheimer et al. 1973**). des études chez les primates non humains exposés au Mn ont montré une dégénérescence dopaminergique dans le striatum ; Cependant, ces animaux expriment des dysfonctionnement des neurones dopaminergiques (**Guilarte et al., 2008**), une conclusion qui a été confirmée chez les rongeurs (**Karin Tuschl et al., 2013**).

Les effets du manganèse sur d'autres neurotransmetteurs tels que l'acide g-aminobutyrique (GABA) et le glutamate ont aussi été étudiés. Alors qu'il semble que le manganèse peut moduler le GABA chez les animaux de laboratoire, la nature de la réponse peut varier selon la région du cerveau (**Karin Tuschl et al., 2013**). Les résultats dans le cas du glutamate semblent plus clairs, les données indiquant que le manganèse accroît la fréquence de libération du glutamate et élève aussi les concentrations extracellulaires en réduisant le captage par les astrocytes, ce qui peut entraîner une excitotoxicité (**Miele et al., 2000; Centonze et al., 2001; Erikson et Aschner, 2003**).

Les changements histologiques majeurs comprennent une diminution marquée des fibres myélinisées et une prolifération des astrocytes (**Yamada et al., 1986**), contrastant ainsi avec ceux observés dans le parkinsonisme : dépigmentation et perte neuronale dans le système nerveux central, le locus ceruleus et le noyau dorsal du nerf vague ; présence occasionnelle de corps de Lewy et d'enchevêtrement neurofibrillaire dans le cortex cérébral(**Ostiguy et al., 2003**) .

Les effets néfastes sur le système nerveux résultent probablement de l'échec des enzymes protecteurs à détoxifier les excès de manganèse ou à altérer son potentiel d'oxydation. Le cortex cérébral est probablement une zone cible critique, en plus des noyaux gris centraux. Mémoire de travail semble être affectée par la toxicité de Mn dans le noyau caudé dans le striatum, le cortex frontal et le cortex pariétal, comme le montre les primates non humains

(Guilarte, 2013). Effets sur la santé associés à l'exposition élevée Mn chez les enfants sont altération de la fonction cognitive, avec des diminutions dans la mémoire, l'apprentissage verbal, et l'intelligence **(Khan et al., 2012)**.

Au niveau cellulaire, le manganèse peut s'accumuler dans la matrice mitochondriale, sa sortie des mitochondries est cinétiquement très lente **(Gavin et al., 1990)**. Un dysfonctionnement mitochondrial et une insuffisance du métabolisme énergétique semblent être les mécanismes clés de l'action cytotoxique. Les données in vivo et in vitro semblent indiquer que le manganèse peut bloquer la phosphorylation oxydative et perturber la fonction mitochondriale, et peut nuire au métabolisme énergétique au niveau de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique **(Hirata et al., 2001; Zhang et al., 2003; Zwingmann et al., 2004)**.

Certaines données indiquent qu'une quantité anormalement élevée de manganèse dans le cerveau peut perturber la répartition intracellulaire du Ca^{2+} et conduire à des altérations de l'homéostasie du calcium **(Chetty et al., 2001)**.

II .5.1.1. Manganisme :

Il a été montré qu'une exposition chronique au manganèse (inhalation supérieure à 0,15 μg de Mn / m^3 d'air par jour) induit une accumulation de cet ion dans le cerveau **(Bonilla et al., 1982)**. Seule une exposition chronique (plusieurs années) peut induire le manganisme ; une exposition aiguë chez l'homme n'a jamais été reportée dans la littérature. Chez le rongeur, elle peut induire un arrêt cardiaque **(Jiang et Zheng, 2005)**. L'atteinte du système nerveux central conduit à une variété de perturbations psychiatriques et motrices. Les premières conséquences visibles d'une intoxication au Mn ont été des syndromes extra-pyramidaux, similaires à la maladie de Parkinson(MP)**(Couper, 1837; Barbeau, 1984)**, comme la bradykinésie, tremblement, trouble de la démarche, posture instable et dystonie et/ou, mais aussi des déficits cognitifs comme la perte de mémoire, perte du langage, diminution de la flexibilité mentale, ralentissement cognitif **(Josephs et al., 2005; Weiss, 2006)**. D'autres symptômes semblent être plus spécifiques du manganisme tels que les changements de l'humeur et de l'état psychiatrique (dépression, agitation, hallucination, rires et pleurs anormaux). Pour plus d'information, **Bowler et al., 2007** ont réalisé une liste des revues de la littérature traitant des symptômes neurologiques et neuropsychologiques des travailleurs exposés au manganèse.

La dégénérescence neuronale est évidente au niveau du globus pallidus avec des dommages moins sévères dans le striatum (putamen et noyaux caudés) et dans la substance noire réticulée. **(Dietz et al., 2001).**

II .5.2. Immunotoxicité :

Une augmentation de la sensibilité à l'infection a été observée chez les souris et les cobayes exposés au manganèse par inhalation de matières particulaires dans l'air pendant une courte période. Variation du taux sanguins de leucocytes, les lymphocytes et les neutrophiles ont également été observées chez les rats et les souris par administration orale de manganèse pendant une courte durée. Cependant, il reste encore des informations limitées qui sont associée à toute altération significative du système immunitaire **(Gad ,2014).**

II .5.3. Génotoxicité:

L'exposition à des doses élevées de manganèse affecte la réplication de l'ADN dans des bactéries et de la réparation et provoque des mutations dans des cellules de mammifères et micro-organismes. Dans les cellules de mammifères, le manganèse provoque des dommages de l'ADN et les aberrations chromosomiques. **(Lima et al., 2011).**

II .5.4. Reprotoxicité:

L'exposition de lapins mâles adultes au manganèse par une dose intratrachéale unique conduit à la dégénérescence des testicules, accompagnée par une perte de la spermatogenèse et la stérilité complète. Les rats gestante exposées à des concentrations élevées de manganèse par voie orale ou par injection connu moins de grossesses ou les pertes post-implantation et augmentation le nombre de mortalité fœtales chez la souris. Chez l'homme, l'impuissance et la perte de la libido sont plaintes communes chez les travailleurs exposés professionnellement au manganèse qui ont été atteints de signes cliniques de manganisme**(Gad ,2014).**

CHAPITRE III

III.1. Généralité

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes dans plusieurs domaines, tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures d'où le nom de métabolites secondaires (**El Haib, 2011**). C'est après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites de plantes commencent à livrer leurs secrets et leurs composants principaux ont été identifiés. Actuellement, plus de 100000 substances sont connues (**Malo, 1991**).

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**AFNOR, NF T 75-006 ,1998**).

L'aromathérapie est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes. Ce mot vient du latin « aroma » signifiant odeur et du grec « therapeia » signifiant traitement. Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odorifères (**Mayer, 2012**). Cette dernière est définie comme étant l'utilisation des principes actifs contenus dans les huiles essentielles chémotypées, c'est à dire de composition biochimique bien connue, par divers voies ou un soin préventif ou curatif d'un large panel d'affections chez l'homme, l'animal et la plante, tant au niveau de la destruction des foyers infectieux pathogènes que de la gestion des troubles symptomatiques, organiques ou fonctionnels de la dite affection » (**Baudoux, 2008**).

III .2. Les huiles essentielles

III .2.1. Définition

Le terme « Huiles essentielles » est défini comme un produit odorant, généralement de composition complexe obtenu à partir d'un végétal botaniquement définie; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage l'huiles essentielles est le plus souvent séparé de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (**Milpied, 2009**).

III .2.2. Répartition, localisation et lieu de synthèse dans la plantes

Les HE sont largement réparties dans le règne végétal; certaines familles sont particulièrement riches: Conifères, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères, Composées, Labiées (**Chami, 2005**).elles peuvent être stockées dans divers organe fleur (origan), feuillés (citronnelle), écorce (cannelier), bois (bios de rose), rhizomes (acore), fruits (badiane), ou grain carvi (**Degryse et al, 2008**).Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockés dans des cellules dites cellules à huiles essentielles exemple : (Lauraceaeou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceaeou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaciaceaeou Asteraceae) (**Oussalah et al., 2006**).

III .2. 3. Composition Chimique des Huiles Essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes de composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Lahlou, 2004**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés ; par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (**Buchbauer, 2010**). Etles composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou du girofle (**Teisseire, 1991**). Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Bruneton, 1993**).

III .2.4. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (**Benini, 2007**). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

III .2.4.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (**Bruneton, 1999**). L'influence du stade végétatif (**Aprotosoie et al., 2010**), l'organe de la plante (**Chowdhury et al., 2009**), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (**Garnéro, 1991; Aprotosoie et al., 2010**) .et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent sur la composition et le rendement des huiles essentielles(**Anton et Lobstein, 2005**).

III .2.4.2. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (**Mohammad et al., 2009**). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (**Mohammedi, 2006**), les conditions culturelles telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Aprotosoie et al., 2010**).

III .2.5. Procèdes d'obtention des HES

III .2.5.1. La distillation

La technique d'extraction des HE utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par sa vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (**Franhomme et al., 1990**) il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe:

III .2.5.2. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le

tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (El haib, 2011) (figure 6).

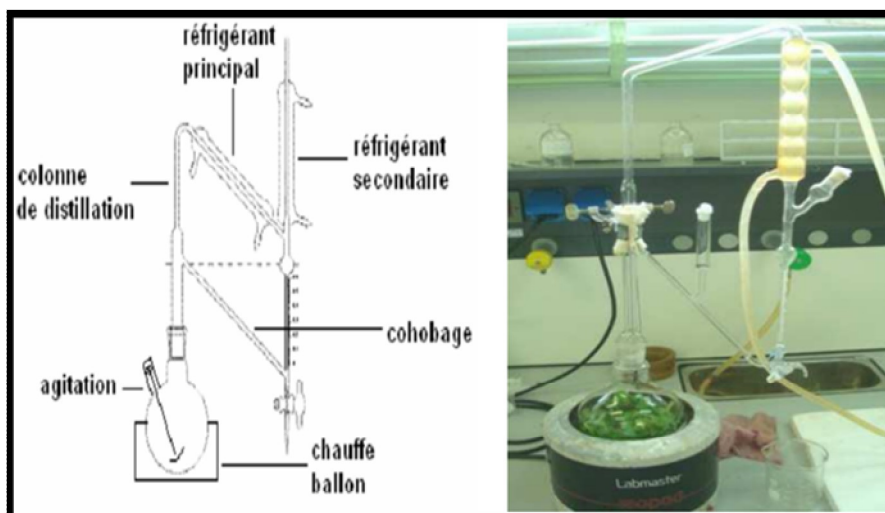


Figure 6 : montage d'hydrodistillation (El haib, 2011).

III .2.5.3. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (El haib, 2011)(Figure 7).

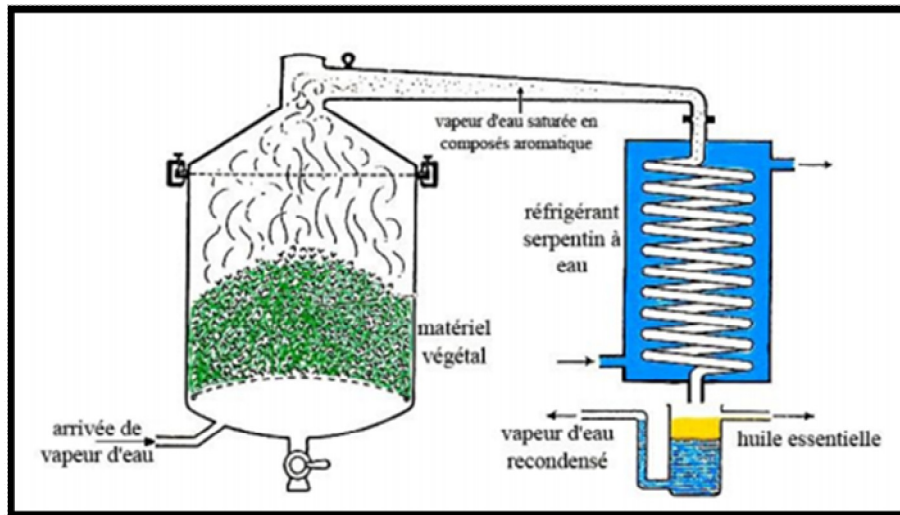


Figure 7 : montage d'entraînement à la vapeur d'eau (Benayad, 2008)

III .2.5.4. Hydrodiffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils (Franchomme et al., 1990) (Figure 8).

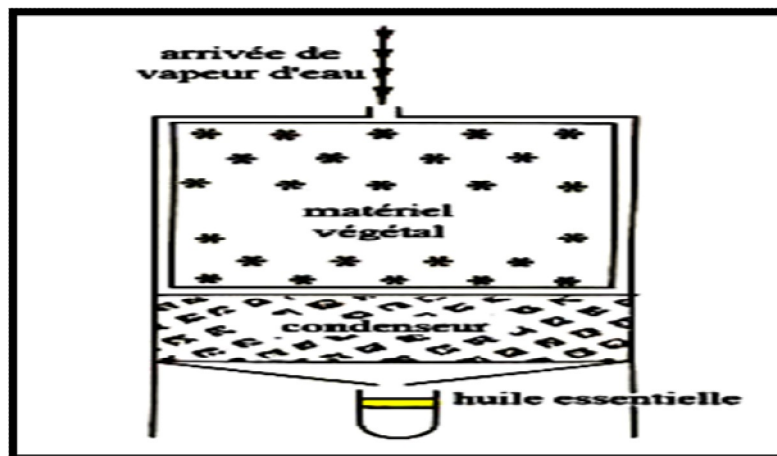


Figure 8 : montage d'hydrodiffusion (Benayad, 2008).

III .2.5.5. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

III .2.6. Le mode d'action des huiles essentielles

D'après **Buchbauer (1993)**, le mode d'action des huiles essentielles et des produits odorants se partage entre deux principes théoriques diamétralement opposés: la théorie d'action réflexive et la théorie systémique.

III .2.6.1. La théorie d'action réflexive

Soutient que l'odeur d'un produit apporte l'effet désiré en créant des sensations agréables au niveau des voies olfactives qui les transmettent au cerveau et de là, atteint le système lobaire responsable des émotions et des sensations comme l'anxiété, l'appétit, la peur.

III .2.6.2. La théorie systémique

Suppose que les molécules des produits odorants en se mettant en contact avec les cellules vivantes, apportent les effets prétendus de ces molécules.

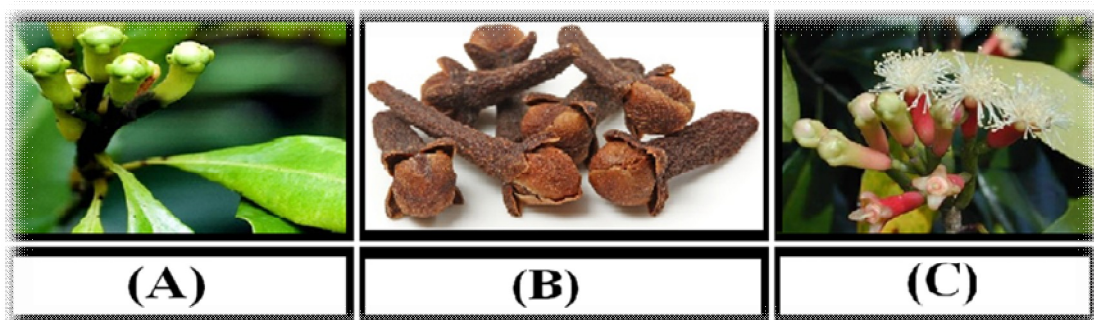
CHAPITRE IV

IV.1. Généralité

L'huile de clou de girofle est extraite des boutons floraux de l'arbre de giroflier (*Eugenia aromatica* ou *Syzygium aromaticum*)(**Guénette, 2008**). Les boutons floraux sont récoltés avant floraison puis séchés au soleil pour donner cette épice que nous connaissons bien(**Lionnet, 2009**). Cette huile est communément utilisée comme épice alimentaire et comme conservateur d'aliments (**Ferland, 2011**). Il est démontré que l'huile essentielle de clou de girofle (L'HEC) possède des propriétés antioxydantes lors d'applications pharmaceutiques (**Chaieb et al., 2007**). Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales. Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local (**Ohkubo et Shibata, 1997**). Aujourd'hui les techniques se sont améliorées par le mélange d'oxyde de zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilisé en tant que matériau de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe dentaire. ce ciment est en général très bien toléré par les patients. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires (**Garibaldi et al., 1995**).

IV.2. Aspect botanique

C'est un grand élancé, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres de haut, à port pyramidal, et au tronc gris clair ridé (**Alma et al., 2007**). Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes et à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. L'inflorescence comprend des petites cymes (4-5 cm) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de 3 à 5 petites fleurs parfumées (**Ghedira et al., 2010**).



Figures 09:(A): Les boutons floraux non épanoui de giroflier (B) : clou de girofle non épanoui et Séché (C) : Clou de girofle épanoui (**Lionnet, 2009**).

Le fruit appelé « Antholfe », est une drupe ellipsoïde brun violacé, contenant une seule graine d'environ 1,5 cm de long (Ghedira et al., 2010).

IV.3. classification

Situation botanique de l'espèce *Syzygium aromaticum* montrés sur le tableau 02.

Tableau 01 : Classification botanique (Goetz et al., 2012).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i> (= Phanérogames)
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i> (= Angiospermes)
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (= Dicotylédones)
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Syzigium</i>
Espèce	<i>S. aromaticum</i> (L) Merr. & Perry

IV.4 .Origine et culture

Il est originaire des îles Moluques (Indonésie), maintenant cultivé en Asie tropicale, Afrique, Amérique tropicale etc. telle: Penang (en Malaisie), Zanzibar et Pemba (en Tanzanie), Madagascar(Burdock ,1995).

IV.5. Composition chimique

L'analyse chimique de l'huile de clou de girofle par la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse (gaschromatography/ mass spectrometry, GC/MS) a permis l'identification de 36 composantes (Chaieb et al., 2007). Le principal élément chimique de l'huile de clou de girofle est l'eugénol (4-allyl-2-methoxyphenol) avec une concentration de 85 % et plus(Figure 10).

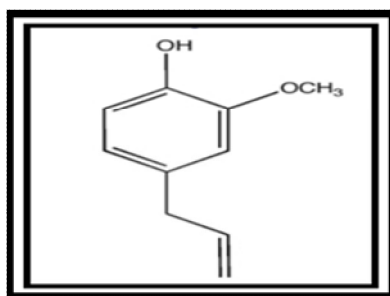


Figure 10 : Structure moléculaire de l'eugénol (Ghedira et al., 2010).

Cette molécule de l'eugenol très lipophile appartient à la famille des phénols, tout comme la capsaïcine. Les phénols sont des composés chimiques aromatiques ayant une fonction hydroxyle (groupement OH)(Ferland, 2011).

Tableau02: Les principaux Constituants chimiques des boutons floraux ou « clous de girofle » (Goetz et al., 2012)

Famille de constituants	Détail des constituants
Huile essentielle 15 à 20 %	Eugénol (80 à 90 %) acétate d'eugénol (5 à 10 %), alpha et bêta-caryophyllène (5 à 12 %), cétones aliphatiques
Tanins (12 %)	Tanins gallique et ellagique, acide gallique, acide protocatéchique, eugéniine, casuarictine, 1,3-di-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphényl-bêta-D-glucopyranose, tellimagrandine
Flavonoïdes (0,4 %)	Quercétine, kaempférol, rhamnétine, eugénitine
Chromones	Biflorine, isobiflorine, hétérosides de chromone
Corps gras	Stérols, glycosides stéroliques, huile grasse (10 %)
Autres	Acides phénols, triterpènes

IV.6. Propriétés pharmacologique

Plusieurs études ont démontré jusqu'à présent que l'eugénol possède des propriétés pharmacologiques variées, Outre sa propriété d'anesthésique local, l'eugénol était déjà utilisé au siècle dernier comme anti-infectieux contre la tuberculose et la gangrène bronchique (Lebeau et Courtois, 1929).

Depuis d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple un effet anti-inflammatoire en inhibant la biosynthèse du thromboxane (Reddy et Lokesh, 1994), un effet

antibactérien (**Laekeman et al., 1990**), des propriétés neuroprotectrices (**Wie et al., 1997**), anesthésiques (**Guenette et al., 2006**), anti-cancer (**Newmark, 1996**), antihistaminiques (**Nishijima et al., 1998**), anti-anaphylactiques (**Jadhav et al., 2004**), et antifongiques contre *Candida albicans* (**He et al., 2007**), antiparasitaire (**Girard, 2010**). Et utilisé pour le traitement des troubles sexuels masculins comme un aphrodisiaque (**Dashti et Morshedi, 2009**).

Des résultats démontrent que la consommation de certains régimes à base de plantes peut-être avoir des effets bénéfiques pour le traitement du diabète et indiquent un rôle potentiel des composés dérivés de clou de girofle en tant qu'agents insulino-mimétiques (**Prasad et al., 2005**).

IV.7. Pharmacocinétique de l'eugénol

L'étude menée par **Guenette et al., (2006)** a démontré la pharmacocinétique de l'eugénol chez le rat et rapporte que les concentrations plasmatique et sanguine diminuent rapidement suite à une injection intraveineuse à la dose de 20mg/kg, L'eugénol présente une demi-vie de 7.05 min dans le plasma et de 12.6 min dans le sang, suggérant une distribution rapide de l'eugénol aux tissus périphériques. Cette distribution extravasculaire serait en relation avec les propriétés lipophiliques de l'eugénol.

Suite à une administration orale à la dose de 40 mg/kg L'eugénol présente une demi-vie de 14h dans le plasma et 18h dans le sang, la concentration d'eugénol dans la moelle épinière était plus grande que la concentration observée dans le plasma et le cerveau des rats. Cela suggère que son action au niveau central peut être plus importante dans la moelle épinière. (**Lionnet et al., 2010**).

Les principaux métabolites de l'eugénol dans l'urine des rats, après une administration d'eugénol, sont des sulfates et des glucuronides conjugués (**Guenette et al., 2006**).

IV.8. Mode d'action de l'eugénol

Le mécanisme d'action de l'eugénol qui présente la proportion majoritaire de l'huile de clou de girofle (95%) n'est pas encore tout à fait élucidée. Il agirait sur plusieurs récepteurs, dont les récepteurs GABA (acide-gamma-amino-butyrique), les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartic acid) et, les canaux à Na⁺ (**Ohkubo et Kitamura, 1997**).

IV.8.1. Action de l'eugéno1 sur les récepteurs au GABA

L'eugéno1 pourrait moduler les voies de la douleur en se liant aux récepteurs GABA et en augmentant l'affinité du GABA pour son récepteur (**Aoshima et Hamamoto, 1999**).l'eugéno1 potentialiserait la réponse du récepteur GABA induisant un effet sédatif, mécanisme qui pourrait expliquer son effet anesthésique (**Aoshima et Hamamoto, 1999**).

IV.8.2. Action de l'eugéno1 sur les récepteurs NMDA

L'effet neuroprotecteur de l'eugéno1 vis à vis de la neurotoxicité induite par le glutamate. L'eugéno1 modulerait l'action du récepteur NMDA en bloquant partiellement l'entrée massive de calcium à l'intérieur du neurone provoquée par le glutamate (**Wie et al., 1997**).

IV.8.3. Action de l'eugéno1 sur les canaux à sodium

L'eugéno1 inhibe les courants au niveau des neurones par interaction avec les canaux à sodium inactivés, en ralentissant beaucoup leur passage à une forme activée. Ces canaux sont essentiels dans l'initiation et la propagation de potentiels d'action cette inhibition de courants Na⁺ dans les neurones sensoriels pourrait donc être un mécanisme important provoquant l'analgésie et diminuant ainsi l'excitabilité neuronale (**Akopian et al., 1996**).

CHAPITRE V

Notre travail se focalise sur l'évaluation de l'effet de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur les rats coexposé par le manganèse et le plomb durant la période de développement. L'expérimentation est réalisée selon plusieurs approches : phénotypiques, comportementales, biochimiques et histologiques.

V.1. Matériel végétal

La matière végétale a été achetée sous forme séchée chez l'épicerie située au quartier de la marine dans la wilaya de Saida. (**Tableau 03**).

Les Bouton floraux sont moulus à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre (**Figure 11**) qui sera conservée dans un bocal en verre hermétiquement fermé pour préserver sa qualité initiale.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de l'université de Saida.

Tableau 03 : Origine et caractéristique du matériel végétal (clou de girofle).

Quantité de la plante	500g
La date d'achat	15/12/2014
L'origine de la plante	L'Inde
Partie utilisée	Bouton floral
État	Sèche

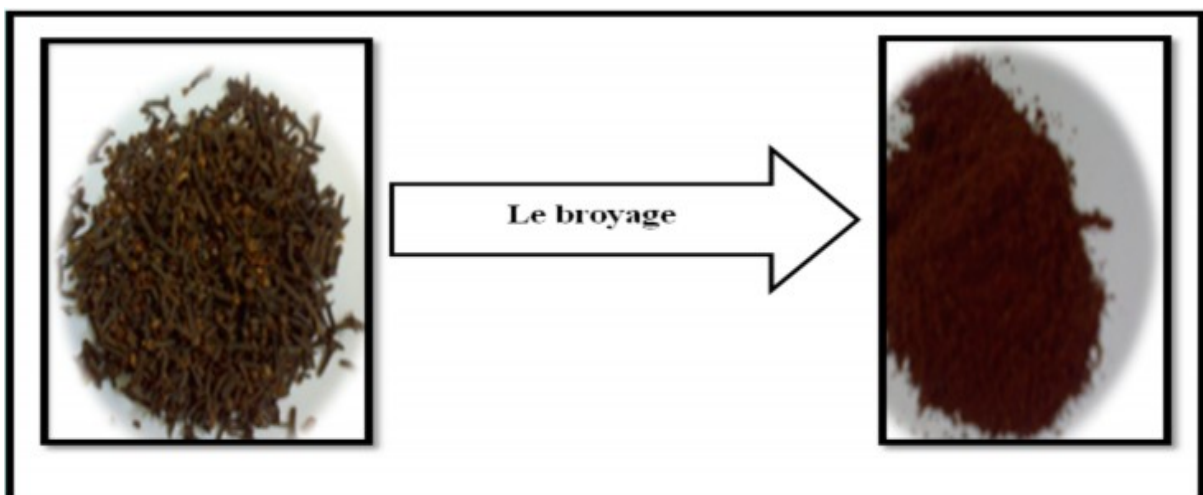


Figure 11 : le broyage de clou de girofle.

V.2. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles des clous de girofle a été faite par la méthode de l'hydrodistillation, le procédé consiste à immerger directement le broyat de clou de girofle (30g) dans un ballon de 1 litre rempli de 700 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 5 heures. Les vapeurs chargées des substances volatiles traversent le réfrigérant (**Figure 12**) se condensent puis elles sont récupérées dans un flacon, à travers l'ampoule à décanté (**Figure 13**) l'eau et l'HE se séparent par différence de densité (**Boubrit et Boussad, 2007**).



Figure 12: Montage d'un hydrodistillateur.



Figure 13: Ampoule à décanté

V.3. Conservation des huiles essentielles

Les HE récupérées sont recueillies dans un flacon en verre stérile et bien enveloppé par papier aluminium, et gardé à une température de réfrigération de 4°C pour éviter leur dégradation (**Nelly Grosjean, 2007**).

V.4. Le rendement des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traité (**Haj ammar et al., 2009**). Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R (\%) = M \times 100 / M_0$$

- R (%) : Rendement en huile essentielle de matière sèche.

- M :quantité d'huile récupérée exprimée en g.
- M0:quantité de la matière sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

V.5. Animaux d'expérimentation

Expériences ont été menées sur des rats Wistar (obtenus à partir de Charles River) pesant 200 ± 50 grammes. Les animaux étaient logés avec libre accès à l'eau et de nourriture dans une animalerie, avec un cycle lumière/obscurité de 12/12 heures, à 22 ± 2 ° C.

V.6. Répartition des groupes

Les rats ont été accouplés une semaine après leur arrivée (trois femelles et un mâle par cage).

A G0 de l'accouplement, les rats sont divisés en deux lots : groupe témoin et groupe intoxiqué par le Pb et Mn. Le premier groupe reçoit seulement l'eau distillée et le deuxième reçoit l'eau distillée contenant l'acétate du plomb (2,84g/l) et chlorure de manganèse tétrahydraté (4,79g/l) pendant la période de gestation et lactation.

A J21 les rats sont divisés en trois lots :

Lot (Pb+Mn): composé d'un effectif de 07 jeunes rats qui reçoivent de Pb et Mn dans l'eau distillée dont on administre l'eau physiologique 0,9% pendant 21.

Lot Pb+Mn-HEC :composé d'un effectif de 07 jeunes rats qui reçoivent Pb et Mn dans l'eau distillée dont on administre la solution d'HEC injectable pendant 21 jours.

Lot Témoin : composé d'un effectif de 07 jeunes rats qui reçoivent l'eau distillée dont on administre l'eau physiologique 0,9% pendant 21.

V.7. Préparation de solution d'HE injectable

L'HE de *Syzygium aromaticum* est diluée dans l'eau physiologique avec une goutte de Tween 80 pour préparer une dose de 0,1 ml/kg (Halder et al., 2011).

V.8. La répartition chronologique des protocoles expérimentaux

Chronologie du protocole expérimental des trois lots des rats (Pb+Mn-HEC, Pb+Mn et T-solvant) est représenté par la **figure 14**. L'intoxication des femelles débute dès le premier jour de la cohabitation avec les rats mâles qui est représenté par G0 et se poursuit pendant la période de la gestation. Les nouveaux nés sont également exposés au plomb jusqu'au J51 après la naissance. Au J30, ces jeunes rats reçoivent une solution injectable d'HEC par la voie intra-péritonéale pendant une durée de 21 jours et qui sont soumis à leur tour à différents tests comportementaux, à la fin on sacrifie les rats pour récupérer le sang selon l'ordre chronologique indiqué dans la (figure 14).

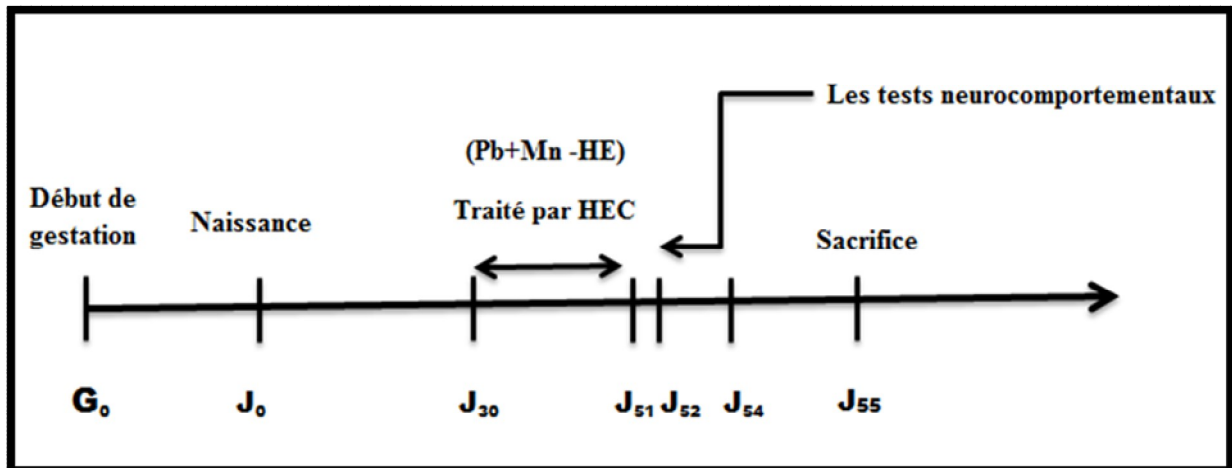


Figure 14: Chronologie du protocole expérimental

V.9. Evolution du poids corporel et poids du cerveau

Le poids corporel de chaque rat a été noté chaque jour durant la durée de traitement (21 jour) ensuite, nous avons procédé au sacrifice de ces rats et le poids de cerveau des trois lots a été enregistré.

V.10. Testes neurocomportementaux

V.10.1. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)

L'épreuve de la nage forcée a été initialement proposée par **Porsolt et al., (1977)** comme épreuve permettant la sélection de molécules à activité antidépressive. Les rats sont placés durant 15 minutes dans la pièce où se déroule le test. Les animaux sont soumis à une épreuve de nage forcée d'une durée de 6 minutes. Ils sont placés à l'intérieur d'un cylindre de 20,7 cm de diamètre et de 39 cm de hauteur, dans une eau à 22°C. On mesure la durée pendant laquelle l'animal nage activement ou flotte seulement de manière à conserver la tête hors de l'eau (**Figure 15**). Après d'être débattu dans l'eau, l'animal devient presque immobile, bougeant les pattes de temps à autre pour rester à flot ou retrouver son équilibre. Cette immobilité est interprétée comme étant le reflet d'un «désespoir comportemental», qui survient lorsque l'animal réalise qu'il ne pourra pas s'échapper. Dans le cadre de cette interprétation, l'immobilité est vue comme un comportement dépressif.



Figure15: Epreuve de test de nage forcée (FST).

V.10.2. L'open-field

L'open-field est décrit par **Dauge et al ; 1989**. c'est une large boîte carré ouverte (70cm x 70 cm, et 34 cm de haut), à fond blanc, et fortement éclairée du dessus. Des lignes noires au sol délimitaient des carreaux (10 x 10 cm) (**Figure16**) le test Ce teste permet d'évaluer la réaction d'un animal vis-à-vis d'un environnement nouveau et spécial. Il crée une situation de conflit entre la tendance naturelle de l'animal à explorer Ce nouvel environnement et son aversion pour les espaces ouvert .de ce fait, les animaux normaux ont tendance à passer plus de temps dans les coins et la périphérie de dispositif plutôt que dans le centre, qui est alors considère comme la zone la plus anxiogène (**Alexis, 2011**). Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'openfield, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 6 minutes. Six paramètres étaient mesurés par l'expérimentateur :

- le temps de latence (exprimé en secondes), qui correspond au temps mis par le rat pour sortir des quatre carreaux formant le coin,
- le nombre total de carreaux traversés par le rat pendant la durée du test (6 min), qui reflète l'activité locomotrice,
- le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre,
- le nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi),
- le nombre total de toilettages,
- le nombre total de défécations.

Ainsi, ce test évalue les capacités exploratoires du rat dans un contexte stressant. Le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire

et son état émotionnel. Les autres paramètres sont plutôt des indices de son état émotionnel. (Elodie et al;2003).

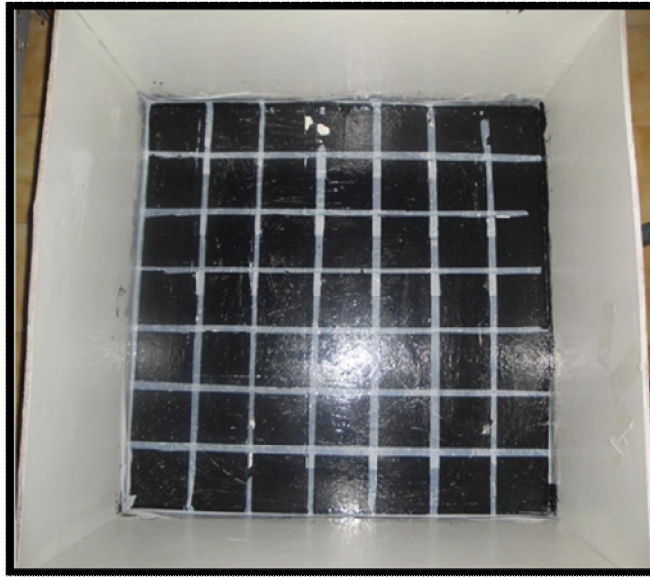


Figure16:EpreuveL'open-field

V.10.3. Le labyrinthe en croix surélevé

Ce test s'appuie sur le fait que le rat a une peur innée du vide. Permet de mesurer le degré d'anxiété d'un animal selon son aversion spontanée pour le vide .L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement, les bras fermes représentent la sécurité, alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratrice.



Figure17:Epreuve du labyrinthe en croix surélevé.

Un animal anxieux aura naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés. Partant de ce principe, l'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe (**Pellow et al., 1985**).

Le labyrinthe en croix surélevé utilisé était un dispositif en bois, constitué de quatre plates-formes (les bras) formant une croix à angles droits mesurant chacun 50 cm de long et 10 cm de large. Le labyrinthe se situait à une hauteur de 50 cm au-dessus du sol. Deux bras en continuité, dits "fermés", sont protégés du vide par un muret hauts de 40 cm; les deux autres, dits "ouverts", ne le sont pas. L'animal est placé au centre de la croix et on le laisse libre d'explorer les quatre bras. On mesure le temps qu'il passe dans les bras ouverts, censé témoigner de sa capacité à surmonter sa peur pour satisfaire sa curiosité (**Calenco-Choukroun et al., 1991 et Ollat et Pirot, 2003**).

L'animal est placé en zone centrale, face à un bras fermé et le temps passé dans chaque compartiment est mesuré pendant 5 minutes (**Figure 17**).

V.10.4. Evaluation de la performance dans différentes tâches d'apprentissage et mémorisation :

V.10.4.1. Test de Reconnaissance d'objet :

Cette tâche, développée par **Ennaceur et Delacour (1988)**, est basée sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel objet par rapport à un objet familier. Le test s'est déroulé dans des open-field éclairés, de manière homogène et indirecte à 40 lux. Les objets à discriminer sont une bille en verre et un dé en plastique. L'animal est d'abord habitué à l'open-field pendant 50 min. Pendant que l'animal explore librement l'enceinte. Le lendemain de la séance d'habitation, l'animal est déposé au même endroit que la veille et explore librement pendant 10 mn l'enceinte où a été placé un objet A (bille ou dé à jouer). Le temps d'exploration de l'objet est mesuré pendant cette séance d'acquisition. Après un délai de 5 min dit « de rétention », l'animal est replacé dans l'enceinte durant 10 mn et explore librement les deux objets (A et B) placés comme indiqué sur la figure 17. Les temps d'exploration de ces deux objets sont relevés minute par minute pendant cette séance de rétention. Les temps d'exploration de l'objet familier A (TA) et de l'objet nouveau B (TB) permettent de calculer un indice d'exploration du nouvel objet défini par: $TB / (TA + TB)$ (**Figure 18**).

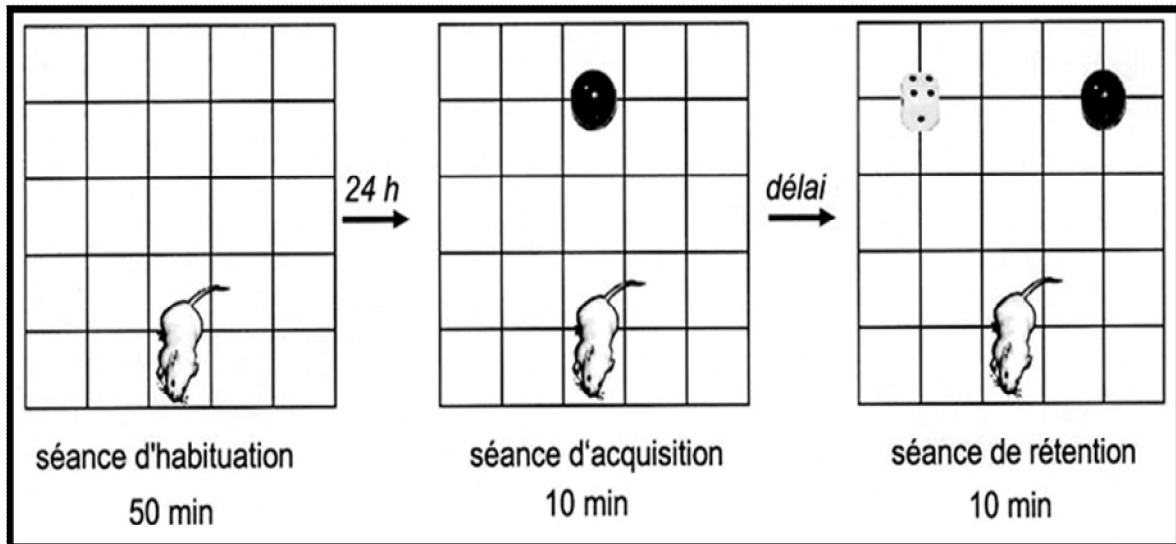


Figure 18:Épreuve de reconnaissance d'objet

V.10.4.2. Test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y

Ce test permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Quand l'animal est placé dans le labyrinthe, il explore spontanément le bras le moins récemment visité, et de ce fait, montre un haut degré d'alternance des visites des trois bras. Pour ce faire, il utilise la mémoire de travail qui consiste à mémoriser les bras les plus récemment visités et à renouveler continuellement cette information (Nagahara & McGaugh, 1992). Cette tâche implique également certains aspects de l'attention qui peuvent être mesurés en comptabilisant les retours au même bras visité ou au bras adjacents (Wall & Messier, 2002).

L'appareil est un labyrinthe en Y, avec 3 branches identiques (60 x 10 x 45 cm) séparées d'un angle de 120°. Les parois de chaque bras sont décorées d'un motif différent des autres permettant ainsi de les différencier (A, B et C). Pour le test, les animaux sont placés individuellement à l'extrémité d'une branche avec la tête dirigée vers la paroi, leur permettant ainsi d'explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes, avec l'expérimentateur en dehors de la pièce de test.

Le nombre de bras visités et la séquence des visites sont recueillis à l'aide d'une caméra placée au-dessus du labyrinthe. Une alternance spontanée est définie comme trois entrées successives dans les trois différents bras du labyrinthe (ex. ABC, CBA...). Le pourcentage d'alternance est utilisé comme indice de performance de la mémoire de travail des animaux, et est calculé de la façon suivante:

$$\text{Pourcentage d'alternance} = \frac{\text{Nb Alt} \times 100}{\text{Nb Visites} - 2}$$

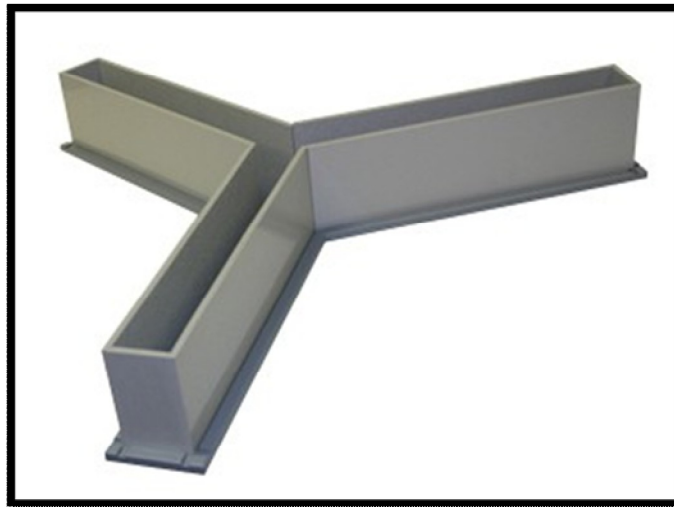


Figure 19: Epreuve de labyrinthe en y

V.11. Sacrifice des rats

Les animaux sont sacrifiés le matin par décapitation et cela après une injection intra péritonéale d'une solution chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$), à 10% (4mg/Kg de poids corporel). Le sang est récupéré dans des tubes EDTA et héparines pour les analyse biochimique et Les cerveaux sont rapidement prélevés de la boîte crânienne, rincé, séché puis pesé et placés sur un support en verre en contact avec la glace (+4°C). (Ait hamadouche, 2009).

V.12. Dosages biochimiques

V.12.1. Dosage du glucose

La méthode utilisée pour le dosage de la glycémie est une méthode colorimétrique (**Kit chronolab**). Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose sanguin en acide gluconique en formant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est détecté par le phenol-aminophenazone avec la présence de la peroxydase (POD).



Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 500 \text{ nm}$.

V.12.2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

V.12.2.1. Préparations des synaptosomes

Les synaptosomes représentent les terminaisons neuronales détachées des axones et des collatérales, dont les membranes s'est ressoudée au niveau de la cassure. Elles constituent un matériel biologique permettant l'étude des propriétés des systèmes de transport des amines

L'homogénat cérébral (synaptosomes) de rats intoxiquées est utilisé pour évaluer l'activité des enzymes utilisées comme de bon marqueur de neurotoxicité. L'enzyme qui a été étudiés est la phosphatase alcaline. Les cerveaux des rats sont placés dans un homogénéiseur de potter Elvehjem de 4ml .L'homogénéisation est effectuée dans 10 volumes solution glacée de saccharose 0.32 M. L'ensembles de l'homogénat et liquide de rinçage sont centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant représente ainsi une fraction synaptosomale brute est prélevée et gardé dans la glace qui servira pour le dosage des enzymes (**Slimani 1988**).

Principe :

Le p-nitrophenylphosphate est scindé par les phosphatases alcalines en phosphate et p-nitrophenyl. La concentration en p-nitrophenyl libérée est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline et est mesurée par photométrie à une longueur d'onde 405 nm (**Bablok et al 1988**), selon la formule suivante :

PAL

$\text{P-nitrophenylphosphate} + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{Phosphate} + \text{P-nitrophenol}$.

Mg²⁺

V.12.3.Mesure de l'activité des enzymes antioxydants

V.12.3.1. Préparation de tissu cérébrale :

Les cerveaux des rats ont été pesé et homogénéisé dans une solution tampon contenant 0.32 M saccharose, 0.5 mM d'EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) dans de la glace (1mg tissu /4 ml solution tampon) en utilisant un homogénéisateur verre/verre. Les tissus ont été maintenus à 4°C durant toutes les procédures de dissection et d'homogénéisation.

L'homogénat a été centrifugé à 1000xg pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu a été centrifugé à 10000xg pendant 15 minutes à 4°C .Le culot constitue la fraction mitochondriale et le surnageant est re-centrifugé a 10.000g/30 minutes .Les deux culots ainsi obtenu sont solubilisé dans une solution tampon contenant 0.32 M de saccharose, 0.5 mM d'EDTA, 10mM de Tris-HCl et 0.02% de digitonine (pH 7.4), l'addition de la digitonine est ajouté pour libérer toutes les mitochondries emprisonnées dans les synaptosomes et centrifugé une deuxième fois à 10000×g pendant 15mn à 4°C, le culot ainsi obtenu constitue la fraction des mitochondries totale qui seront solubilisées dans une solution contenant du saccharose (0.32 M à pH 7.4) (**Rotruk et al 1973**)

V.12.3.2.Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

La SOD a été analysé sur le surnageant en utilisant la technique de **Kakkar et al., (1984)** ; cette méthode est basés sur l'inhibition de la formation de l'adénine nicotinamide dinucleotide, methosulfate de phenazine et d'amino tetrazolium blue de formazane. 7.10.5.2. Catalase (CAT EC 1.11.1.6) CAT a été analyse par méthode de **Sinha (1972)**. Le mélange de la réaction (1.5

ml) contenant 1.0 ml de tampon phosphate à 0.01 M pH 7.0, 0.1 ml de l'échantillon et 0.4 ml d'H₂O₂ à 2 M. La réaction a été arrêtée par l'addition de 2.0 ml d'acide dichromate acétique (5% de dichromate de potassium et l'acide acétique glacial ont été mélangés avec un rapport de 1:3 (V/V)) ; l'absorbance est déterminé à 620nm.

V.12.3.3. Glutathion peroxydase (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

L'activité de GPx a été mesurée par la méthode décrite par **Rotruck et al. (1973)**. Brièvement, le mélange de la réaction contient 0.2 ml de tampon tris-HCl à 0.4 M, à pH 7.0, 0.1 ml d'azide de sodium à 10 mM, 0.2 ml de tissu (homogénéisé dans du tampon Tris-HCl, pH 7.0), 0.2 ml de glutathion, et 0.1 ml de peroxyde d'hydrogène à 0.2 mM. Le tout est incubé à 37°C durant 10 min. la réaction est arête par addition de 0.4 ml de TCA à 10%, et centrifugé. Le surnageant est utilisé pour déterminer le taux de glutathion par le réactif d'Ellman (19.8 mg d'acide 5, 5'-dithiobisnitro benzoïque (DTNB) dans 100 ml de solution de nitrate de sodium à 0.1%).

V.12.3.4. Le glutathion réduit :

Le glutathion réduit (GSH) a été analysé par la méthode de **Jollow et al. (1974)**, qui consiste à mélanger 0.5 ml de l'échantillon avec 1.0 ml d'acide sulfosalicylique (4%). Les échantillons ont été maintenus à +4°C pendant une heure puis centrifugés à 1200 tr/m pendant 15 mn à. Le mélange d'analyse contient 0.1 ml d'un prise aliquote du surnageant et 2.7 ml de tampon phosphate. La lecture a été faite immédiatement à 412 nm.

V.12.3.5. Catalase (CAT EC 1.11.1.6)

CAT a été analyse par méthode de **Sinha (1972)**. Le mélange de la réaction (1.5 ml, vol.) contenant 1.0 ml de tampon phosphate à 0.01 M pH 7.0, 0.1 ml de l'échantillon et 0.4 ml d'H₂O₂ à 2 M. La réaction a été arrêtée par l'addition de 2.0 ml d'acide dichromate acétique (5% de dichromate de potassium et l'acide acétique glacial ont été mélangés avec un rapport de 1:3 (V/V)) ; l'absorbance est déterminé à 620nm.

V.12.4. Dosages de plomb et de manganèse

Les dosages de plomb et de manganèse dans le sang et dans le cerveau sont réalisés dans laboratoire CAQUE (Oran).

V .13. Technique de préparations des coupes Histologique

Englobant l'étude et l'analyse des changements morphologiques et fonctionnels des tissus, la pathologie permet de mieux comprendre la cause et les mécanismes de la maladie. Les organes prélevés sont soumis préalablement aux étapes suivant :

V .13.1. Fixation

Les organes prélevés sont rincés à l'eau physiologique (Na Cl 0,9%) puis fixés dans du formol à 1/10^{ème} salé et tamponné à pH 7 par le sulfite de sodium (Na₂SO₃).

La fixation a pour but essentiel d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant (**Nzelof, 1972**).

La fixation est immédiate après le prélèvement pour empêcher une putréfaction (altération microbienne) du tissu par autolyse. Les organes séjournent 24 à 48 heures dans le fixateur et y seront totalement immergés.

V .13.2. Inclusion (circulation)

L'inclusion a pour but d'empêcher la fragmentation des tissus et d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré. Les tissus acquièrent ainsi une consistance qui permet d'obtenir des coupes minces au microtome.

La paraffine n'ayant pas davantage soluble dans les alcools, il faut ensuite passer le fragment déshydraté dans un milieu intermédiaire, soluble à la fois dans l'alcool et la paraffine (par exemple acétone, toluène, xylène, chloroforme...)

La déshydratation permet l'élimination d'eau d'organes en les plongeant dans l'alcool pendant un temps suffisant à degré croissant : alcool à 70° (acétone I) pendant 45 minutes , alcool 90° pendant 45 minutes et alcool absolu 100° pendant 45 minutes.

Toutes les réactions ont lieu dans des bacs fermés hermétiquement dans un lieu bien aéré ou sous haute aspirante à une température ambiante sauf le paraffinage à 56 C° ensuite les blocs sont refroidis au congélateur.

Un solvant de la paraffine est destiné à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène ou de xylène pendant 45 minutes.

A la sortie du dernier bain de paraffine, l'échantillon est déposé dans la paraffine fondue vierge que l'on coule dans des moules (cassettes d'inclusions ou moules d'inclusion); puis on laisse refroidir la paraffine dans le congélateur. Le refroidissement de cette paraffine amène sa solidification en un bloc prêt à être coupé. La durée totale de l'opération d'inclusion est de 24 à 48 heures. (**Hould, 1984**).

V .13.3. Coupe, étalement des coupes et coloration

Le microtome permet d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 3 à 5µm. La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant la lame du microtome.

A chaque passage, celui-ci enlève une tranche d'épaisseur réglable. Les rubans de paraffine obtenus sont plissés et doivent être étalés sur un milieu liquide légèrement chauffé afin que les plis disparaissent et que la coupe acquière une planéité parfaite.

Le collage des coupes se fait sur une lame de verre qui est recouverte d'une solution d'albumine (2g d'albumine + 50ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée) qui maintient la coupe sur la lame. Sur chaque lame de verre porte-objet est gravé le numéro d'identification du bloc.

L'étalement de la coupe se fait sur une platine chauffante réglée à une température de 40°C; inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. Les coupes égouttées et mises dans des portoirs sont ensuite séchées à température ambiante jusqu'au moment de la coloration.

La paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans deux bains d'un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) et ceci durant 10 minutes à chaque bain. Puis dans des alcools (éthanol) de titre décroissant, de 96° jusqu'à 50° durant 30secondes à chaque bain, enfin rinçage à l'eau courante (1 minute) assurant la réhydratation finale.

Après réhydratation, la coupe est colorée, le but de la coloration est de renforcer le contraste et de rendre plus évidents les différents constituants cellulaires et tissulaires ainsi que les substances extrinsèques. Les lames ont été colorées à la coloration de l'émalunéosine, c'est la plus simple des colorations.

Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage, la déshydratation (éclaircissement) est réalisée en plongeant successivement les lames dans deux bains de toluène pendant 10 minutes.

Après coloration une goutte d'Eukitt de montage est disposée sur les coupes, une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Lors de la manipulation, aucune bulle d'air ne doit s'insérer entre la lame et la mamelle. L'Eukitt polymérise en une vingtaine de minutes mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 50°C ou simplement sur un radiateur.

Après le montage, les lames sont rangées dans des boîtes spécifiques à l'abri de la poussière. L'observation des lames se fait au microscope optique.

V.14. Expression et analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne (M) des valeurs individuelles, affectées de l'erreur standard à la moyenne (S.E.M). La comparaison de deux moyennes est effectuée par un test t de Student. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (ANOVA) avec le facteur intoxication (Pb-Mn, Témoin) et/ou le facteur traitement (HE) suivie éventuellement du test Student-Newman Keuls.

Une probabilité $p < 0,05$ est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma plot build 12,5 (css.inc. germany).

CHAPITRE VI

VI.1. Résultats de l'extraction des HE

VI.1.1. Caractères organoleptiques

Après l'extraction de l'HE de clou de girofle on a remarqué que cette huile possède les caractères organoleptiques suivants **Figure 20** :

- Aspect : liquide limpide mobile.
- Couleur : jaune claire.
- Odeur : très forte.

VI.1.2. Calcul du Rendement (en %)

Les résultats relatifs au rendement révèlent une valeur du 10,15%



Figure 20: l'huile essentielle de *S. aromaticum*

VI.2.Observation macroscopiques des jeunes rats

Les animaux coexposés aux Pb et Mn en prénatal jusqu'au 51e jour de leur vie postnatale à la fin de l'expérimentation comparés aux rats non intoxiqués ont manifesté plusieurs troubles tels que anorexie, excitation, épuisement et incapacité motrice.

VI.3.Détermination du taux des naissances, la croissance pondérale et le poids des organes :

L'étude a porté sur la détermination de la croissance pondérale, le nombre de naissances et le poids des organes, chez les jeunes rats âgés de 30 ±3jours qui sont issus de femelles intoxiquées aux Pb-Mn durant la période de gestation , lactation et croissance comparés aux rats témoins. Les résultats de la croissance pondérale montrent que les animaux exposés aux

Pb-Mn présentent une diminution significative ($P < 0,001$) du poids corporel à celle des animaux témoins durant 21 jours d'expérimentation ce qui peut être expliqué par une baisse de la prise alimentaire (food intake). Les animaux qui sont exposés aux Pb-Mn et traités par l'HE présentent une augmentation significative ($P < 0,001$) du poids corporel par rapport aux rats intoxiqués non traités (**Figure 21**). De Plus, le nombre de naissance des sujets intoxiqués est de l'ordre de (7.27 ± 0.60) significativement inférieur par rapport aux sujets non intoxiqués qui est de l'ordre (10.20 ± 0.50) .

Les résultats trouvés chez les animaux intoxiqués révèlent également une baisse significative ($p < 0,001$) des poids du cerveau (**tableau 05**). Ceci montre quela co-exposition par Pb-Mn induits un retard de croissance de cerveau chez les rats traités à les doses $(2,84g + 4,79g)$. Par contre les animaux qui ont traités par l'HE présentent Une augmentation significative ($P < 0,001$) de poids du cerveau par rapport aux rats exposés au Pb non traité.

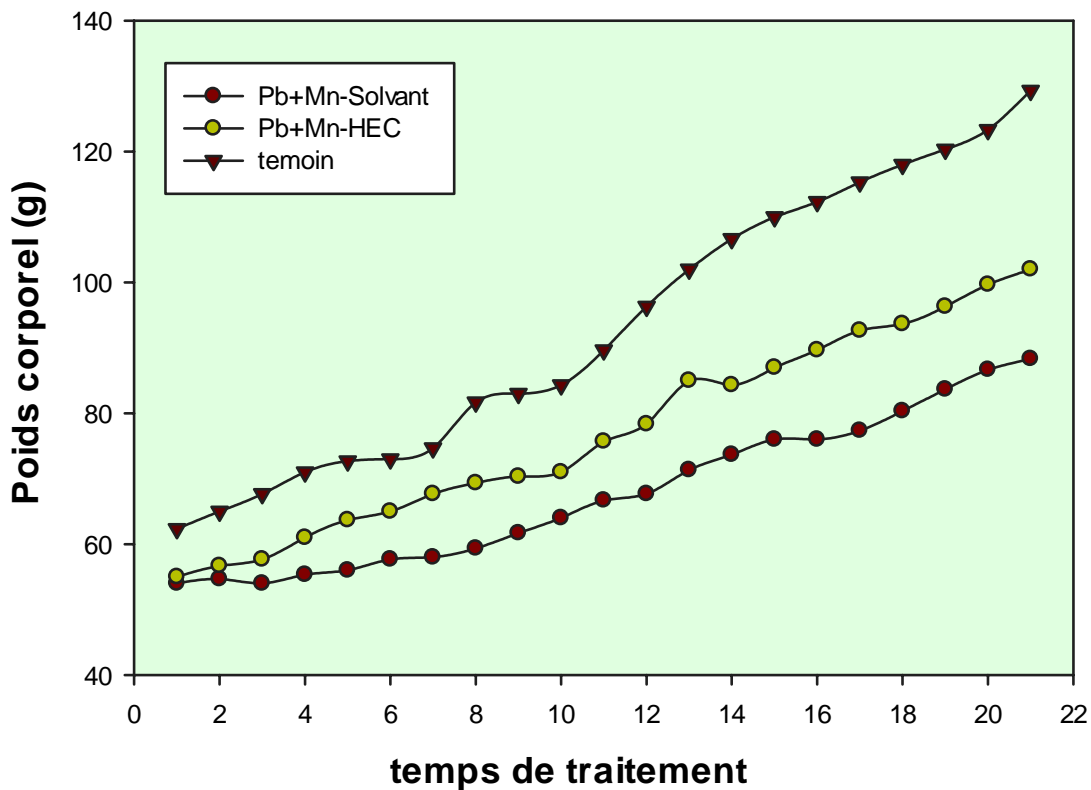


Figure 21: l'évolution du poids corporel des quatre lots de jeunes rats pendant 21 Jd'expérimentation.

Tableau 04 : Evaluation des paramètres pondéraux des quatre lots.

Groupes	Pb+Mn-HEC	Pb-Mn	Témoin
Poidscorporel(g)	77,222±3,270	67,730±2,503**	93,270±4,722
cerveau(g)	1,72±0,031***	1,59±0,026	1,71±0,021**

Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm SEM : (** $p<0.01$; ***: $p<0.001$).

VI.4. Testes comportementaux :

VI.4.1 Test de l'open-field:

Les résultats relatifs du test d'openfield montrent :

Un temps de latence significativement important ($P<0,001$) chez les rats témoins comparé à celui des rats co-exposé aux (Pb+Mn), les rats intoxiqués et traités par l'HEC présentent un temps de latence significativement supérieur ($P<0,001$) à celui des rats intoxiqués **Figure 22**.

De plus, le nombre des carreaux traversés par les animaux co-exposé aux (Pb+Mn) est significativement élevé ($P<0,001$) par rapport aux animaux témoins, qui traduit par une augmentation de leur activité locomotrice (une hyperactivité locomotrice), ce test montre aussi une diminution significative ($P<0,001$) de l'activité locomotrice est présentée chez les animaux intoxiqué traité par l'HEC comparé à celle des animaux intoxiqués **Figure 22**.

Par ailleurs, les animaux témoins, intoxiqué et traités par L'HEC ont un nombre de redressement et de défécation significativement inférieur ($P<0,001$) à celui des animaux co-exposé aux (Pb+Mn) **Figure 22**.

Le nombre de visite au centre et de toilettage est significativement élevé ($P<0,001$) chez les rats intoxiqués comparé à celui des rats témoins et les rats intoxiqués traités par L'HEC **Figure 22**.

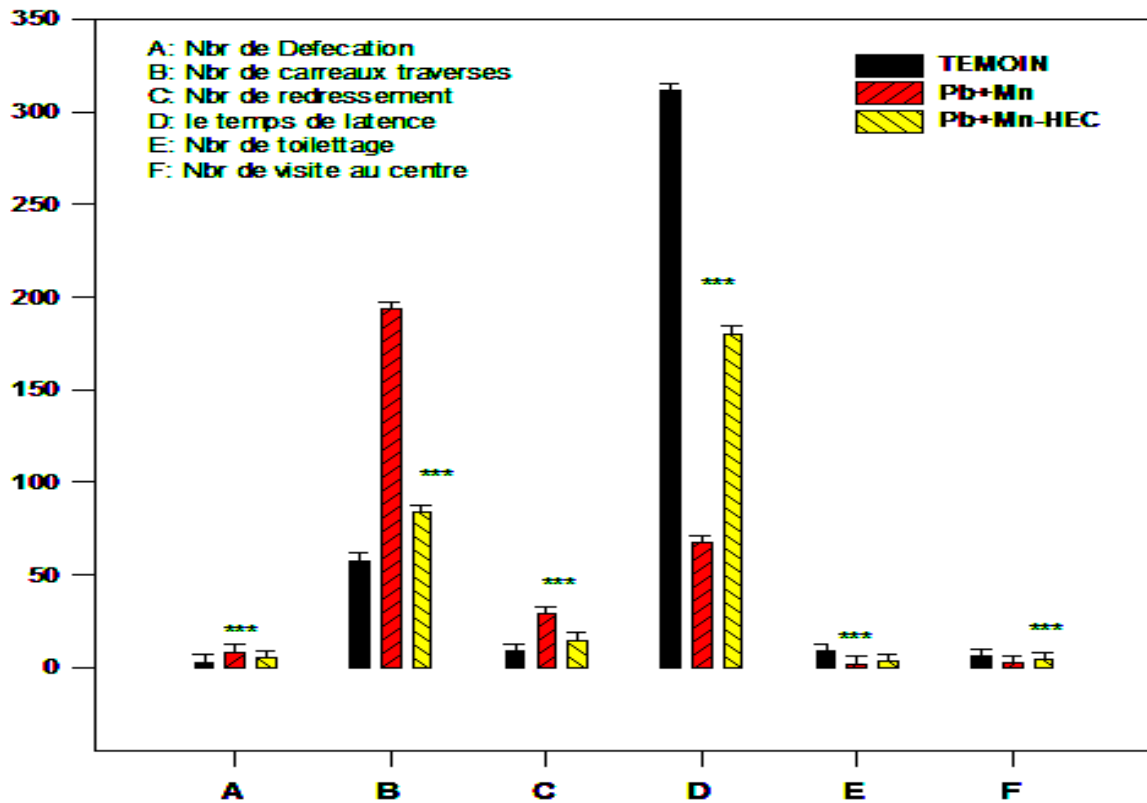


Figure 22: Evalue dans le test de l’open-field les jeunes rats témoins non traités, les intoxiqués traités par l’HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne± SEM (***) $p < 0.001$)

VI.4.2.Reconnaissance d’objet

C’est le test qui nous permet d’évaluer l’état de la mémoire de reconnaissance à partir du temps d’exploration des objets nouveaux et familiers lors de la séance de rétention effectué 5 min après l’acquisition.

La performance de reconnaissance est comparable entre les lots, En effet le groupe témoin a présenté un indice de reconnaissance significativement plus élevé à celui des animaux co-exposés aux Pb+Mn ($P < 0,01$), On a remarqué aussi que les rats intoxiqués traités par l’HEC ont montré une augmentation significative de leurs performances comparé à celui des rats intoxiqué non traités ($P < 0,01$) **Figure 23.**

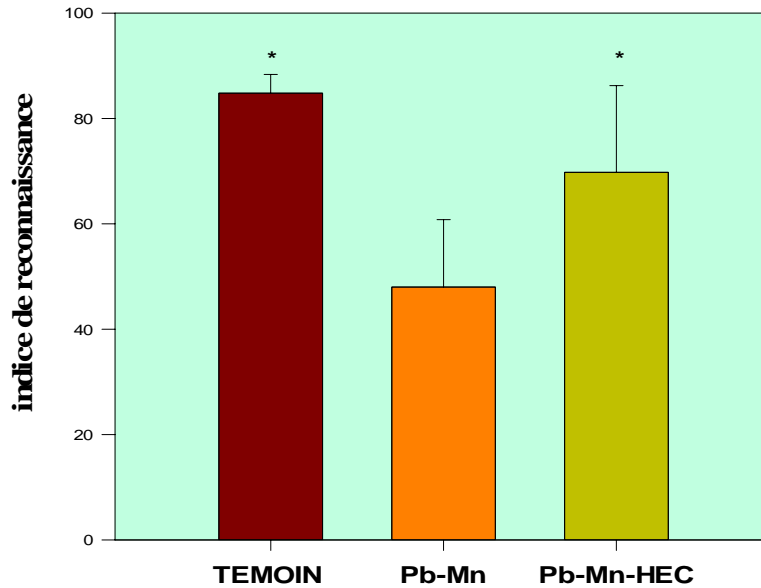


Figure 23 : indice de reconnaissance chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (*: $p < 0.05$)

VI.4.3 Test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y

Les résultats de test de labyrinthe en Y ont permis d'observer un pourcentage d'alternance significativement réduit ($P < 0,05$) chez le groupe co-exposé aux Pb+Mn par rapport à celui du groupe témoin. Le pourcentage d'alternance chez les rats intoxiqués et traités par l'HEC est significativement supérieure ($P < 0,05$) comparé à celui des rats intoxiqué non traités **Figure 24**.

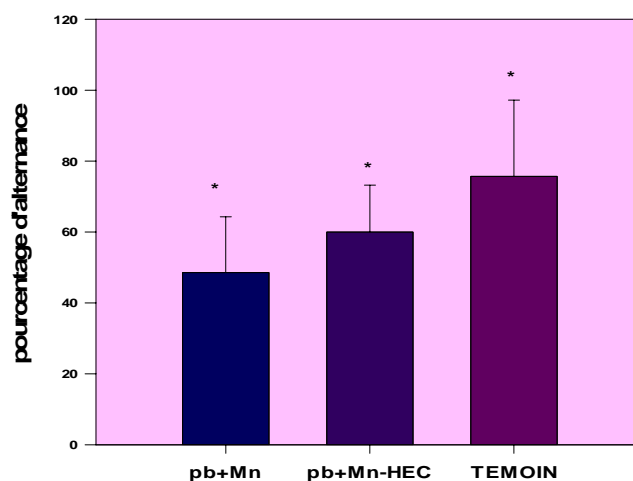


Figure 24 : pourcentage d'alternance chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (*: $p < 0.01$)

VI.4.4. Comportement de type Dépressif « Test de la nage forcée »

Les résultats enregistrés concernant ce test montrent un temps d'immobilité (TIM) chez les jeunes rats intoxiqués est significativement supérieur ($p < 0.001$) à celui des rats témoins. Cette augmentation explique l'incapacité de l'animal à nager ceci est due à une diminution du tonus musculaire et l'instauration d'un comportement de désespoir, l'immobilité est interprétée comme un état dépressif. Dans le même contexte, l'administration de l'HE de *S. aromaticum* montre une diminution de TIM des jeunes rats intoxiqués (**figure 25**).

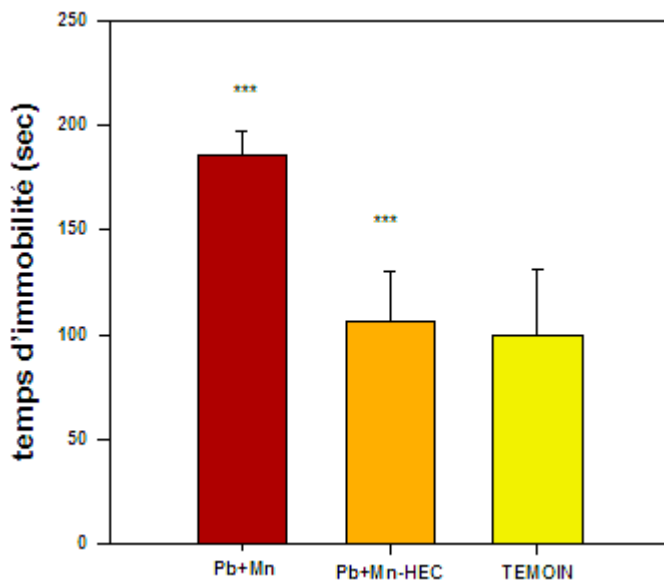


Figure 25 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (***: $p < 0.001$).

VI.4.4 . Le test labyrinthe en croix surélevé :

Les résultats statistiques enregistrés concernant ce test d'anxiété, montrent que les jeunes rats intoxiqués présentent un pourcentage de visite dans les BO est significativement réduit comparé à celui des rats témoins. Ces résultats montrent bien que le plomb et manganèse induisent l'instauration d'un état de stress. D'autre part le traitement par l'HEC montre une augmentation significative ($p < 0.05$) du pourcentage de visite dans les BO comparativement aux rats intoxiqués (**Figure 26**).

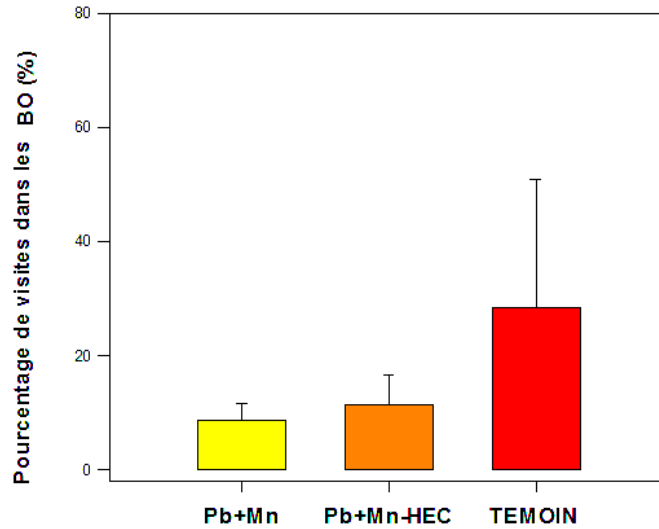


Figure 26: Comparaison entre le pourcentage de visite dans les BO chez les différents groupes les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité.

VI.5. Activité des enzymes du statut oxydants au niveau cérébrale :

Après la co-exposition par le Pb et Mn, l'activité de la CAT est significativement ($p < 0.001$) plus faible chez les rats intoxiqués comparé aux rats témoins au niveau cérébral. Après 21j de traitement par l'HEC, on observe une nette amélioration dans l'activité de la CAT chez les rats traité comparé aux rats intoxiqués (**Figure 27**).

En effet l'analyse de l'activité de la GPx indique une diminution significative ($p < 0.05$) chez les rats intoxiqués comparé aux rats témoins, le traitement par l'HEC chez les rats intoxiqué on note une légère augmentation au niveau cérébral comparé aux rats témoins (**Figure 27**).

Par ailleurs l'activité de SOD chez les rats intoxiqués pendant la période de gestation et de lactation est significativement diminuée ($p < 0.001$) comparée aux rats témoins, au niveau cérébral. Après 21j de traitement par l'HEC montre une augmentation significative ($p < 0.001$) chez les rats intoxiqués (**Figure 27**).

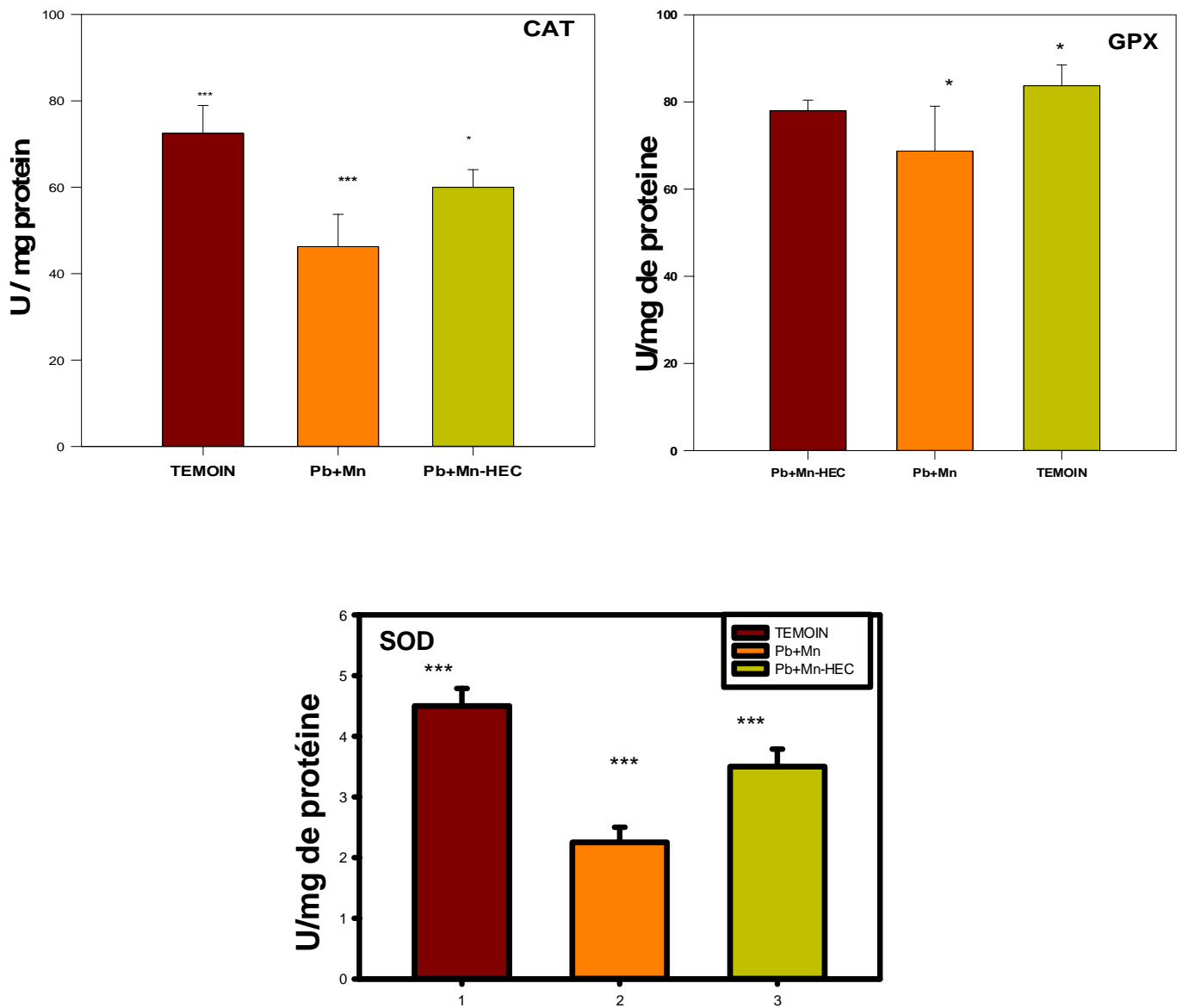


Figure 27 : Activité des enzymes antioxydants cérébral (CAT : Catalase, GPx : glutathion peroxydase, SOD : superoxide dismutase). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

VI.6 Teneur en glutathion réduit cérébral

La teneur en glutathion réduit diminué significativement ($p < 0.001$) chez les rats intoxiqués par rapport aux rat témoins .le traitement par l’huile essentiel entraîne chez les rats intoxiqués une augmentation significative ($p < 0.001$) au niveau cérébral, comparé aux rats intoxiqué (**Figure 28**).

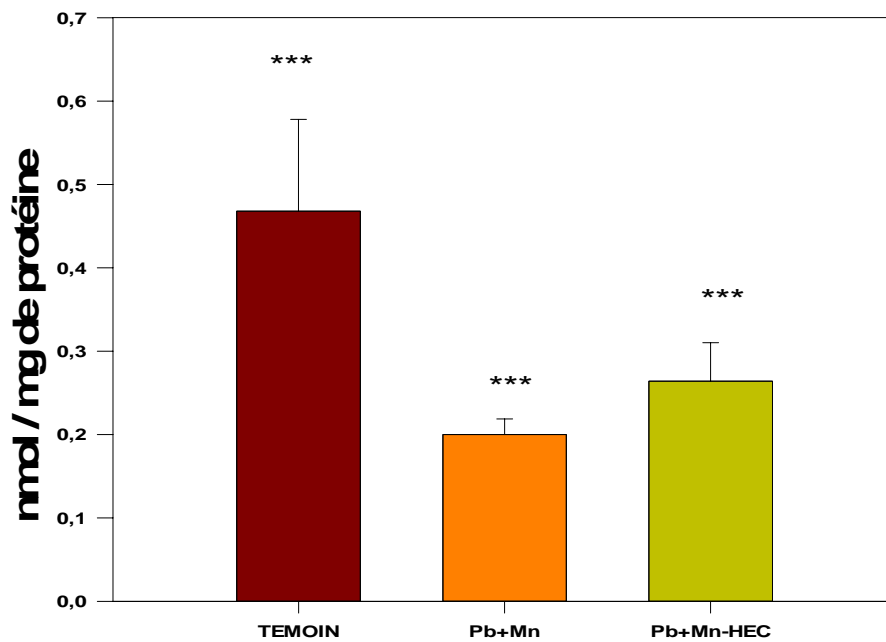


Figure 28 : Teneurs en glutathion réduit cérébral .Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***) $p < 0.001$).

VI.7. Dosage de glycémie :

Les résultats ont montré une augmentation significative du taux de la glycémie chez les rats intoxiqués par rapport aux témoins ($P < 0,001$). Cependant les rats intoxiqués et traités par l’HEC ont présenté une diminution significative de la glycémie. ($P < 0,001$). (**Figure 29**).

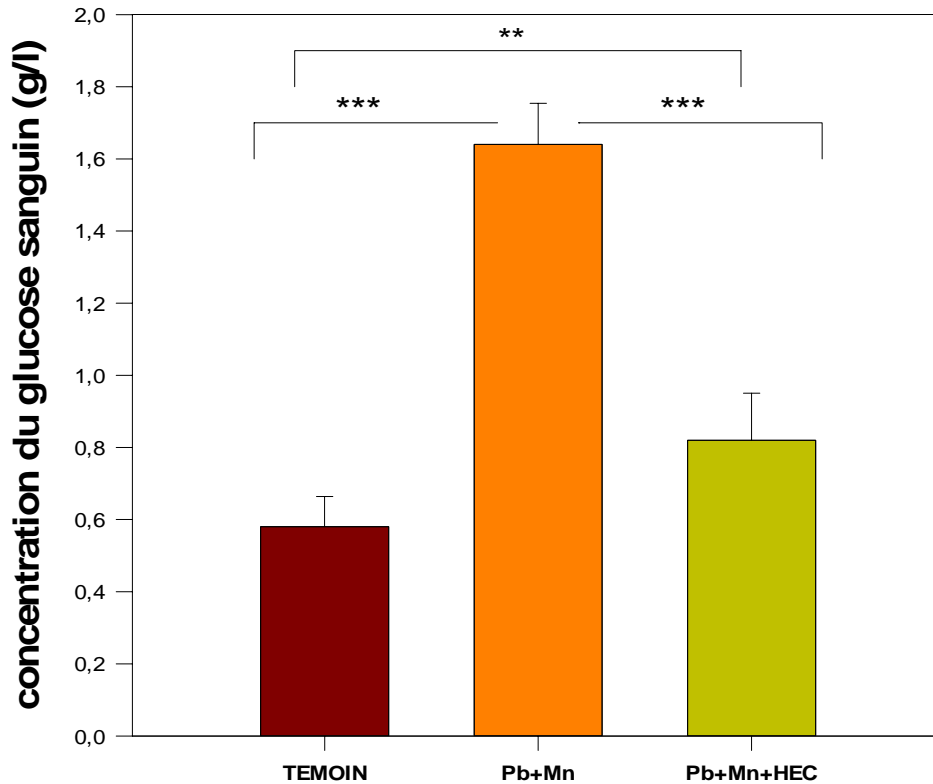


Figure 29: La glycémie chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

VI.8. Dosage de l'activité de PAL cérébral

Les résultats obtenus (figure30) indiquent une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité de PAL chez les rats intoxiqués par le plomb et manganèse par rapport à ceux qui ont reçu que de l'eau distillée. Cependant on remarque que l'activité de PAL est significativement élevée chez les rats intoxiqués et traités par l'HEC ($p < 0.001$) **Figure 30**.

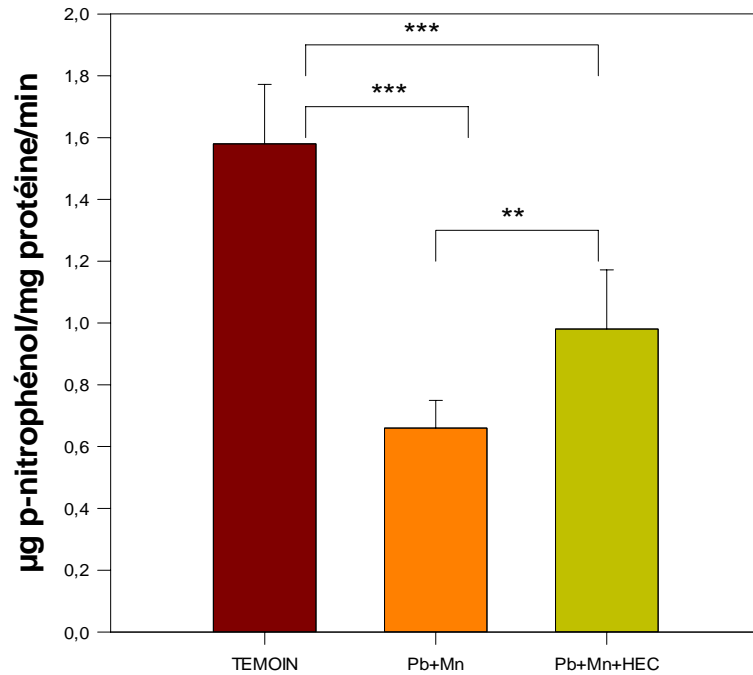


Figure 30: l'activité de PAL chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

VI.9. Détermination de la plombémie

Le taux en Pb augmente significativement ($p < 0.001$) chez les rats intoxiqués par rapport aux rat témoins .le traitement par l'huile essentiel entraîne chez les rats intoxiqués une augmentation significative ($p < 0.001$) au niveau plasmatique, comparé aux rats témoins (**Figure 31**).

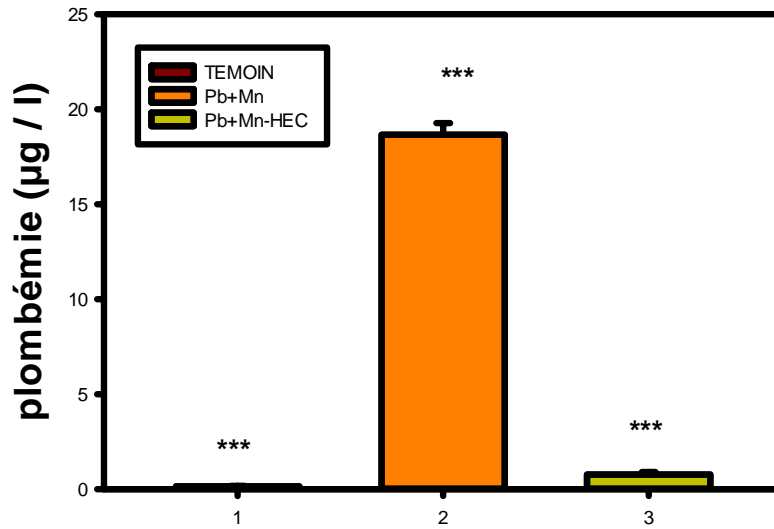


Figure 31: La plombémie chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$).

VI.10. Taux de manganèse dans le sang

L'intoxication aux Pb et Mn entraîne une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux de manganèse au niveau sanguin par rapport aux rats témoins. Les rats traités à l'HEC qui sont préalablement intoxiqués ont montré une diminution de taux de manganèse au niveau sérique (Figure 32).

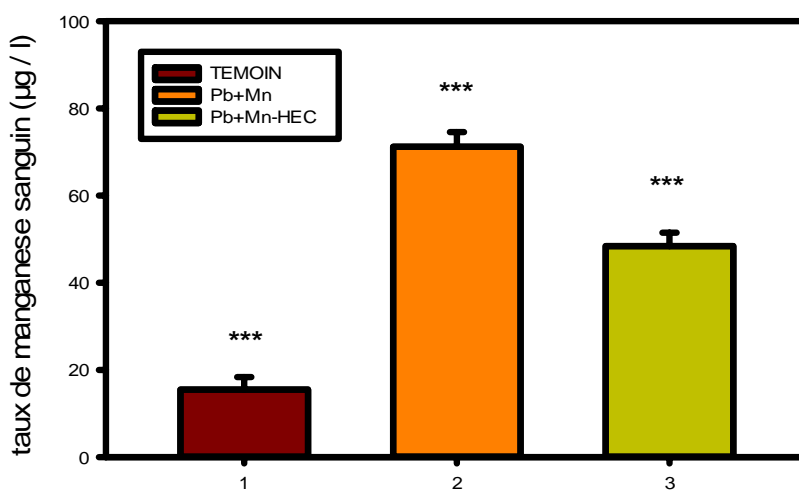


Figure 32: Taux de manganèse sanguin chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$).

VI.11. Dosage du plomb au niveau cérébral :

Les résultats montrent que la concentration du plomb cérébral augmente significativement ($p < 0.001$) chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins **Figure 33**.

L'administration de l'huile essentielle a permis d'enregistrer une réduction significative ($p < 0.001$) du taux du plomb au niveau cérébral **Figure 33**.

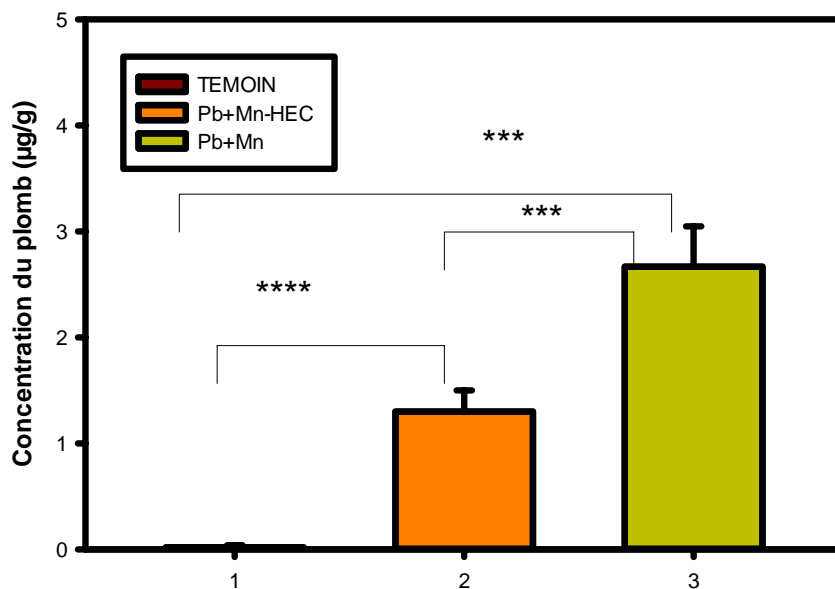


Figure 33: Taux de Pb cérébral chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$).

VI.12. Dosage du manganèse au niveau cérébral

La concentration du manganèse est augmentée significativement ($p < 0.001$) chez les rats intoxiqués comparé aux rats témoins. Le traitement par l'HEC entraîne chez rats intoxiqué une diminution significative ($p < 0.001$) du taux du manganèse au niveau cérébral **Figure 34**.

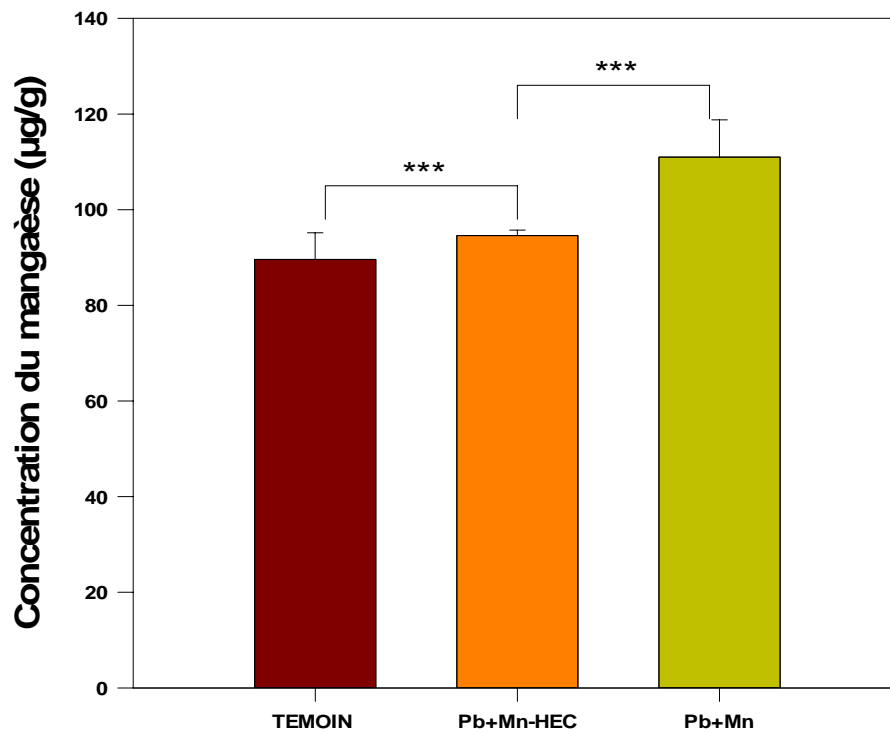


Figure 34: Taux de manganèse cérébral chez les rats témoins, les intoxiqués traités par l'HEC et les intoxiqués non traité. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$).

VI.13.Effet du Pb et Mn sur la structure histologique du cerveau :

L'observation microscopique réalisée sur coloration topographique des coupes histologiques révèle l'action toxique sévère due à la co-exposition chronique aux chlorure de manganèse et l'acétate du plomb a des doses (4.79g Mn/l. 2,84gPb/l). Cette toxicité qui se traduit au niveau d'architecture tissulaire par:

Une chromatolyse neuronale marquée au niveau du cortex cérébral (têtes de flèches orange)(**Figure 35 ; A**) et l'activation de la microglie (têtes de flèches) (**Figure 35 ; A**).

Au niveau du cortex cérébral les animaux intoxiqués montrent une nécrose tissulaire marquée par la présence des vacuoles entourant quelques cellules et d'autres sont vides, et la dégénérescence et nécrose des neurones suivi d'une perte d'architecture tissulaire (flèches) (**Figure 35 ; A**).

De plus, nous avons observé une atteinte très marquée avec des altérations et une dissociation de la couche des cellules de Purkinje(**Figure 36 ; A**).

Par ailleurs, l'observation au microscope optique de tissu cérébral des rats témoins a montré une l'architecture tissulaire normale.(**Figure 35 ; B**), (**Figure 36 ; C**).

Dans le même contexte, Les animaux intoxiqués et traités par l'HEC montrent une structure plus ou moins normale de l'aspect tissulaire. (**Figure 35 ; C**), (**Figure 36 ; B**)

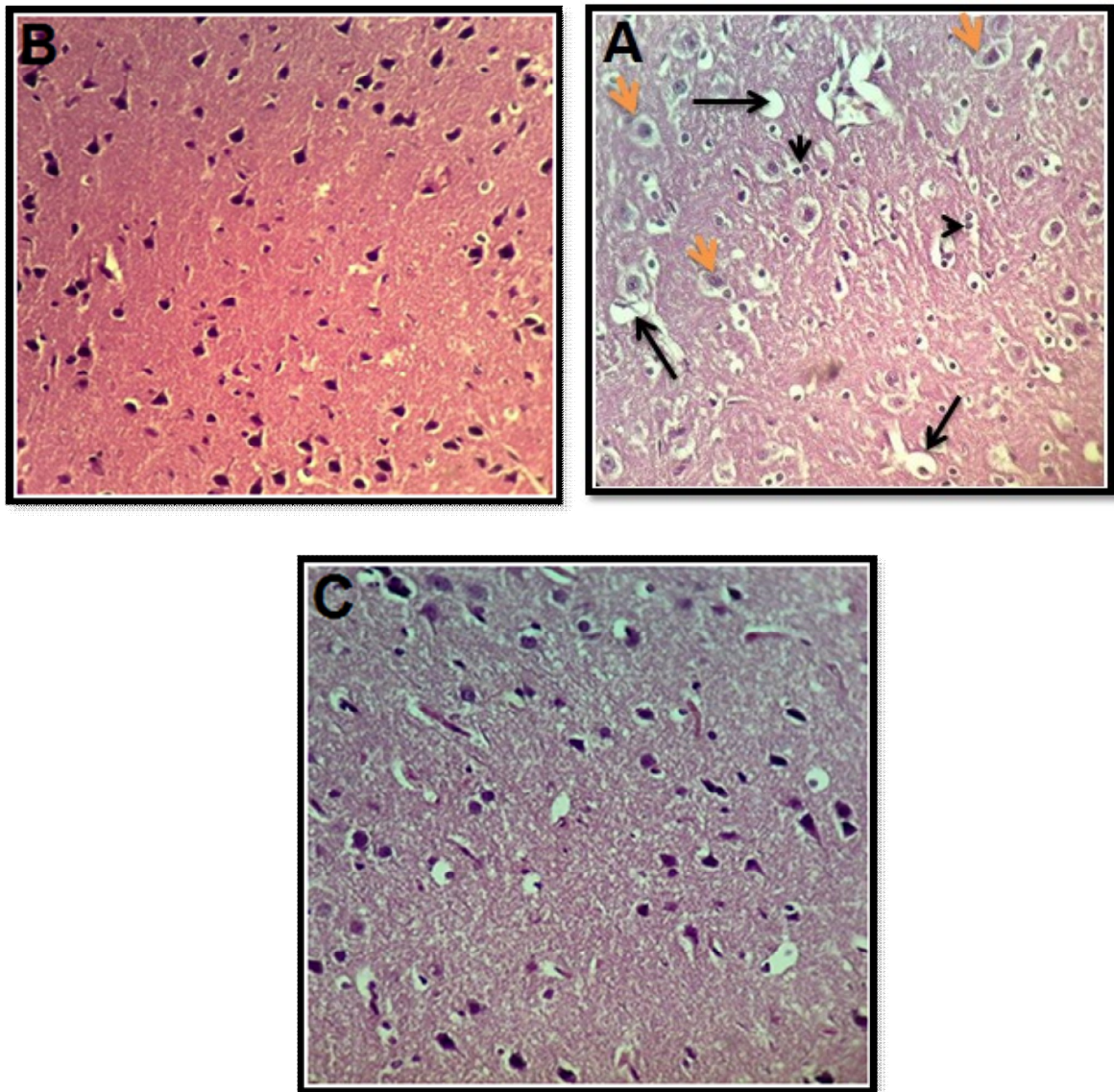


Figure 35: Vues au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébral colorées à l'hématoxyline et de l'éosine G:(x 40). (B) sections du cortex cérébral des rats témoins sont apparus avec une architecture normale. (A) coupes histologiques d'un tissu du cortex cérébral chez les rats intoxiqué, Sections est apparu avec l'activation de la microglie (têtes de flèches) et dégénérescence et nécrose des neurones (flèche) avec une vacuolisation marquée et une chromatolyse neuronale (tête de flèche orange).

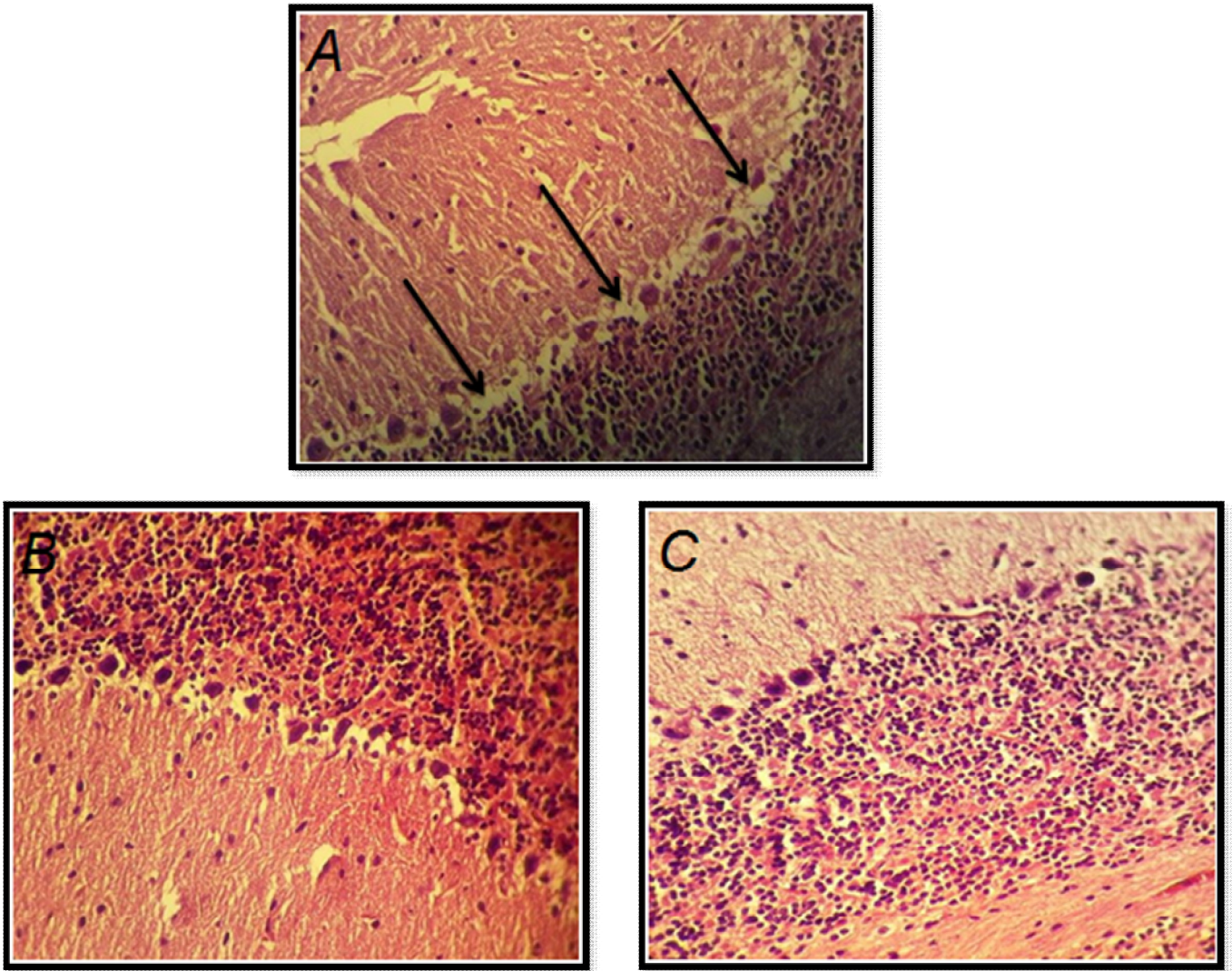


Figure36: Vues au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébelleux colorées à l'hématoxyline et de l'éosine G:(x 40). **(B)** sections du cortex cérébelleux des rats témoins sont apparus avec une architecture normale. **(A)** coupes histologiques d'un tissu du cortex cérébelleux chez les rats intoxiqué,Sections est apparu avec des altérations et une dissociation de la couche des cellules de Purkinje (flèche). **(C)** coupes histologiques d'un tissu du cortex cérébelleux chez les rats intoxiqué traité par l'HEC.

CHAPITRE VII

Discussion

Le plomb et le manganèse sont des contaminants environnementaux, industriels ubiquitaire et neurotoxiques, produisant des changements biochimiques dans le système nerveux central qui peuvent entraîner des effets sur le comportement (**Betharia et Maher, 2012**).

Les effets neurocomportementaux de la coexposition des neurotoxiques connus comme le Pb et le Mn sont d'actualité, surtout quand l'exposition pendant la période de développement précoce. L'incidence de la toxicité sur le développement neurologique de la vie réelle dépend de l'exposition simultanée à plusieurs substances neurotoxiques présentes dans l'environnement, et il est donc important d'étudier ces combinaisons.

En parallèle à l'utilisation des médicaments modernes et surtout synthétiques, il est aussi possible de faire recours à la médecine alternative et traditionnelle afin d'améliorer les fonctions cognitives et profiter de leurs effets anxiolytiques.

Parmi ces remèdes ; le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) a été utilisé depuis l'antiquité comme un puissant stimulant du système nerveux, analgésique, carminatif, antispasmodique, hypotensif et potentiellement neuroprotecteur (**Goetz et al., 2012**).

De ce fait, notre travail a pour but d'évaluer l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de la plante de *Syzygium aromaticum* vis à vis l'intoxication chronique aux plomb et manganèse chez les rats *Wistar* au cours de la période de gestation et de lactation.

Toutefois, notre étude a permis de distinguer en premier lieu et de façon expérimentale l'effet de la co-exposition du plomb et du manganèse sur le taux de natalité chez les rats intoxiqué comparé à celui des rats témoins. Les résultats montrent clairement que le Pb et Mn induisent nettement une diminution du nombre des nouveaux nés chez les parents intoxiqués durant la période de gestation et lactation par rapport aux rats témoins. Cela indique selon plusieurs auteurs que ces métaux traverse la barrière placentaire pendant la gestation perturbant le développement embryonnaire (**Rodrigues et al. 1996; Dorman et al., 2005ab; kahloula et al., 2010 ;Betharia et Maher, 2012**).

Les résultats enregistrés montrent clairement que le poids des animaux co-exposés aux Pb et Mn en prénatale est significativement inférieur à celui des animaux témoins qui se traduit par une diminution du gain corporel ce qui explique la diminution de la consommation de la nourriture. Nos résultats montrent aussi que l'intoxication aux Pb et Mn provoque un effet anorexigène par une action directe sur les centres nerveux responsable de la régulation de

Discussion

la satiété et de la faim. Nos résultats sont en accord avec les travaux entrepris par différents auteurs qui ont observé une réduction dans la consommation de la nourriture chez les rats intoxiqués selon la dose administrée et la durée d'exposition. (**Gautam et al, 2001 ; Smith et al., 2008 ; Horváth et al., 2012 ; Adli et al., 2014**).

De plus, nous avons observé que l'administration du plomb et du manganèse diminue le poids cérébral, Ces résultats pourraient être dus à un retard de développement des organes internes au cours de la période prénatale(**Smith et al., 2008; Bisson, 2012 ; Adli et al., 2014**). Nos résultats s'accordent aussi avec ceux (**Ronis et al., 1998**) qui suggèrent que le Pb peut agir sur le développement cérébral en inhibant les différentes hormones de croissance et les facteurs associés.

Dans le même contexte, l'administration par la voie intrapéritonéale de l'huile essentielle de la plante « *Syzygium aromaticum* » a des rats préalablement co-exposés aux plomb et manganèse a permis d'observer une nette augmentation dans le gain corporel ceci comparé aux rats exposés au plomb non traité. Ce regain de poids enregistré pourrait être dû à la présence des composés terpénoïdes dans l'HEC qui agissent en stimulant le transport du glucose dans les cellules (**Judpentiene et Mockute, 2004**). Nos observations sont en accord avec ceux des **Anbu et Anuradha., 2012**, qui ont indiqué que l'eugénol peut suggérer un effet bénéfique pour corriger la perte de poids chez l'animal.

Les tests neurocomportementaux démontrent que l'administration précoce aux Pb et Mn provoque une perturbation comportementale et cognitive.

Le teste de la nage forcée est le modèle le plus largement utilisée pour évaluer l'activité potentiel antidépressive chez les rongeurs (**Cryan et al., 2002 ; Emamghoreishi., 2009**). Tout fois, les résultats obtenus montrent un temps d'immobilité (TIM) significativement élevé chez le groupe intoxiqué par rapport au groupe témoin.

Cela pourrait être dû aux effets de Pb et de Mn agissent comme des éléments dépressifs sur le système sérotoninergique particulièrement de systèmes monoaminergiques dans les zones du cerveau différentes, principalement l'axe hypothalamo-hypophysaire, hippocampe et striatum. Nos résultats sont en accord d'une part avec (**Kimura et al., 1978 ; Moreno et al., 2009 ; adli et al., 2014**). Qui indiquent que les rats intoxiqué pendant la gestation et lactation avaient un comportement dépressif comme qui a été détecté dans le test de nage forcée.

Discussion

Certains auteurs expliquent l'effet de Mn sur la sérotonine (5-HT), qui est métabolisée en acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) et a été rapportée pour être diminué dans le globus pallidus dans les noyaux gris centraux et d'autre part avec **kahloula et al., 2009** qui confirme que l'administration du Pb a une dose de 0.2% durant la période prénatale engendre un effet dépressif .

Par ailleurs, les rats intoxiqués traités par l'HEC présente une réduction de (TIM) comparant avec les intoxiqué, ces résultats sont en accord avec ceux de **(Jeferson et al., 2012)** qui montrent que le bis-eugénol (Dehydrodieugenol) présente un effet antidépressive.

De plus, les résultats de **Liu et al., 2015** ont confirmé que l'huile essentielle de *syzygium aromaticum* possède une propriété antidépresseur efficace pourrait être attribuée à l'amélioration de la voie hippocampique de pERK1/2-pCREB-BDNF chez les rats exposés au stress chronique léger imprévisible.

L'activité de l'eugénol a été comparable à l'imipramine, un antidépresseur **(Irie et al., 2004)**. Ces résultats suggèrent que l'huile de clou de girofle ou l'eugénol seul peuvent être des alternatives potentielles aux médicaments antidépresseurs pour traiter la dépression.

Nous avons observé dans nos expériences une hyperactivité locomotrice et cela dû à plusieurs raisons. En premier lieux les résultats sont rapportés dans la littérature concernant les changements dans l'activité locomotrice après une exposition au Mn chez les rongeurs montrent une modification des récepteurs / transporteur dopaminergique D1et D2, dans le cortex préfrontal, le noyau accumbens, et striatum dorsal qui sont impliqués dans la manifestation de certains comportements stéréotypé **(Duterte - Boucher, 1988)**. Ces données suggèrent que l'exposition au Mn pendant le développement cérébrale modifié de manière significative des environnements dopaminergique dans les noyaux synaptiques du cerveau qui interviennent dans le contrôle des comportements et des fonctions exécutives, comme l'impulsivité, l'hyperréactivité et la flexibilité cognitive. Ces résultats corroborent des études épidémiologiques chez les enfants, et suggèrent que l'exposition au Mn modifie de manière significative le développement neurologique **(Barkley 1997 ; Bouchard et al., 2007 ; Collipp et al., 1983 ; Ericson et al., 2007 ; Oades et al., 2005 ; Wasserman et al., 2006 ; Winstanley et al., 2006 ; Wright et al., 2006 ; Kern et al., 2010)**.

Discussion

De plus l'absence des changements de l'homéostasie du DA face à une augmentation significative dans des concentrations striatal en métabolite 5-HT, les indicatives de l'utilisation 5-HT ou le changement élevée de 5-HT, suggèrent que la signalisation sérotoninergique semble être plus sensible à l'exposition subchronique du manganèse. Généralement, la DA est considéré comme le neurotransmetteur prédominant qui contrôle l'activité locomotrice et les changements émotionnels. (**Missale et al., 1998 ; Sotnikova et autres ,2005 ; Krishna et al., 2015**).

En second lieu les résultats obtenus par **djebli et al. (2005)** montre que l'exposition au plomb induit une diminution de la recapture de la dopamine par les terminaisons pré-synaptiques neuronales ; ce qui peut expliquer que l'augmentation dans l'activité exploratrice et le comportement stéréotypé des rats intoxiqué, et dû à la mise à disposition de la dopamine au niveau post-synaptique.

Par ailleurs, il est prouvé qu'une déficience en Acides Gras Polyinsaturés (AGPI) au niveau cérébral prédispose l'expression d'une hyperactivité locomotrice, un comportement d'évasion accru, et un déficit cognitif (**Richardson et Ross, 2000**). Cette déficience peut avoir de multiples origines ; une origine constitutionnelle où la conversion des acides gras essentiels en acides gras polyinsaturés peut être lente et inefficace (**Pawlosky et al., 2001**), ou que le recyclage des phospholipides est inefficace, ce qui influence sur la fluidité membranaire, et/ou le métabolisme des AGPI sera accéléré dû à un stress oxydatif accrue (**Burgess et al., 2000**).

De plus, l'hyperactivité induite par le plomb pendant la période de développement et due au changement épigénétiques des histones (**Luo et al., 2014**) . Et le traitement par l'huile essentielle de clous de girofle améliore l'activité locomotrice. (**Mehta et al., 2013**).

Le test de labyrinthe de croix surélevé, qui est un test relatif à évaluer le degré d'anxiété, nous avons noté que les jeunes rats issues des mères intoxiquées durant la gestation et la lactation présentent une réduction de pourcentage d'entrées dans les bras ouverts, ce qui reflète un niveau d'anxiété significativement important comparé aux animaux témoins. Ces observations s'accordent avec d'autres chercheurs (**Leret et al., 2003 ; Soeiro et al., 2007 ; kahloula et al., 2012 ; Liu et al., 2015**) qui confirment que l'administration du Pb a une dose de 0.2% durant la période prénatale engendre un effet anxiogène cela peut être expliquer par l'influence du Pb sur le développement de neurones monoaminergiques. Ce comportement anxieux des rats pourrait être traduit par une interaction du Pb avec les neurones

Discussion

sérotoninergiques et dopaminergiques du l'hippocampe. Ces systèmes semblent être impliqués dans la régulation du CRF (Corticotropin Releasing Factor) qui joue un rôle important dans le comportement d'anxiété. De plus, le système sérotoninergique a un rôle central dans la modulation d'anxiété (Voig et al., 1998) ; une augmentation de niveaux 5-HT dans l'hippocampe est à l'origine d'un effet d'anxiogène (Leret et al., 2003).

D'autres auteurs ont montré que cet état d'anxiété est dû essentiellement à l'effet inhibiteur du Pb sur la production des nouveaux neurones sérotoninergique au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et que Pb induit un retardement de la prolifération des cellules souches neuronales qui dérivent des neurones embryonnaires (Schneider et al., 2005; Schneider et al., 2001).

les résultats de Liu et al., 2015 ont confirmé que La consommation de Pb a causé un déficit important d'apprentissage sur des souris et une augmentation de l'anxiété. La consommation de Pb inhibe l'activité des deux isoformes de l'AChE dans toutes les régions cérébrales. En outre, l'exposition au Pb augmente la peroxydation lipidique et la diminution des niveaux de glutathion dans toutes les régions du cerveau.

De plus, certaines réponses psychologiques et physiologiques au stress sont médiés par les systèmes monoaminergiques et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Ce comportement d'anxiété peut s'expliquer, d'une part, par une carence en fer qui est induite par une exposition chronique au Mn (Molina et al., 2011) et d'autre part, la réduction de la quantité de fer dans le cerveau au cours de la période de développement, provoque une altération de la fonction monoaminergiques et particulièrement la fonction dopaminergique (barbe et al., 2002).

Toutefois, l'administration de l'huile essentielle de *S.aromaticum* a des rats préalablement exposés au chlorure de manganèse et l'acétate de plomb a permis d'observer une nette augmentation dans le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts ,Cela montre que l'huile essentielle de *S. aromaticum* a des propriétés anxiolytiques.

Les effets anxiolytique de *S. aromaticum* pourraient être due à l'interaction de nombreux flavonoïdes et des alcaloïdes (constituant chimique de la *S. aromaticum*) avec le complexe l'acide γ -aminobutyrique / récepteur de benzodiazépine dans le cerveau (Nishikava et Funakami, 2004; Tiwari et al., 2014).

Discussion

Le dispositif de la reconnaissance d'objet est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer la mémoire de reconnaissance chez les rongeurs. La présente étude montre que, l'intoxication chronique aux Pb et Mn chez des rats *wistar* pendant la gestation et la lactation a eu comme conséquence la diminution des performances de la mémoire de reconnaissance au cours du test.

Par ailleurs le test de labyrinthe en Y est couramment utilisé pour évaluer la mémoire de travail chez les rongeurs, l'intoxication chronique aux Pb et Mn chez des rats *wistar* pendant la gestation et la lactation montre une diminution significative du pourcentage d'alternance.

Les résultats de cette étude ont montré que l'administration Pb et Mn pendant la gestation et la lactation provoque la diminution des performances de mémoire et l'apprentissage au cours des tests.

Nos observations sont en accord avec ceux **kahloula, 2010; Khodamoradi et al., 2015 ; Salehi et al., 2015**, qui ont indiqué une diminution des performances d'apprentissage chez les rats intoxiqués.

Par ailleurs, Le système glutamatergique, spécifiquement le complexe du récepteur NMDA, est une cible clé qui fait l'objectif de l'action neurotoxique du Pb (**Finkelstein et al., 1998 ; Song et al., 2006**). L'exposition à cet élément induit un changement des fonctions du récepteur NMDA (**Bellinger, 2000 ; Chen et al., 2008**), il entraîne une grande variété de changements de la signalisation intracellulaire (**Flora et Seth, 2000 ; Zhang et al., 2005**) et de la plasticité synaptique dans le hippocampe (**Nihei et Guilarte, 2001 ; Reymann et Frey, 2007**) qui sont connus pour interférer lors de l'apprentissage et la mémorisation.

Des Résultats d'une étude clinique ont suggéré que l'exposition cumulative à long terme au Pb peut être associée à un déclin cognitif chez les femmes de la communauté d'habitation (**Power et al., 2014**).

Adonaylo et Oteiza, 1999 ; Salehi et al., 2015 ont démontré que Pb provoque la mort neuronale dans l'hippocampe.

Zhong et al., 2010 démontrent que l'exposition prénatale et chronique au Pb (5,5 mg/kg) induit chez les poussins des troubles de mémoire à long terme et suggèrent que la

Discussion

toxicité pendant la croissance fœtale mène l'affaiblissement des processus cognitifs et de mémoire.

Par ailleurs **Schneider et al., 2015** démontrent que l'attention et la mémoire sont sensible à la toxicité de Mn chez les primates non humains.

Le Mn influence sur la libération de l'acétylcholine (**Kita et al., 1981**), la liaison aux récepteurs post-synaptiques ACh, et la clairance acétylcholine par l'acétylcholinestérase (**Lai et al., 1992**). En outre, Mn a un effet sur des protéines de liaison et de transport de ACh dans les astrocytes (**Finkelstein et al., 2007**). Changements dans les niveaux de ce neurotransmetteur sont compatibles avec la phase psychotique début de manganisme, dénommé «folie de Mn" ainsi que des déficits cognitifs dans la mémoire et la décadence intellectuelle (**Feldman et Ratner, 1999; Iregren, 1999**), et de déficits de la mémoire à court terme (**Roels et al, 1987b; Mergler et al, 1994**).

Les effets sur la santé liés à l'exposition élevée de manganèse chez les enfants sont dépréciés de la fonction cognitive, avec une diminutions de la mémoire, l'apprentissage verbal, et de l'intelligence (**Wasserman et al., 2006; Wright et al., 2006; Bouchard et al, 2011; Riojas-Rodriguez et al, 2010;Menezes-Filho et al., 2011, 2013;Khan et al., 2012**).

La littérature sur l'exposition pédiatrique indique que les fonctions cognitives forment également une cible importante de la toxicité au Mn (**Zoni et al, 2007; Roels et al, 2012**). Le cortex cérébral est probablement une zone cible critique, en plus des ganglions de base. La mémoire de travail semble être affectée par la toxicité de Mn dans le noyau caudé, le striatum, le cortex frontal et le cortex pariétal, comme indiqué dans les primates non humains (**Guilarte, 2013**).

À bien des égards, les études animales ont été très productive pour comprendre le mécanisme de la toxicité et de différencier l'impact des différentes fenêtres d'exposition par rapport à une exposition à vie cumulative. exposition présevrage au Mn cause des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (**Kern et al., 2010**).

Cependant , nous avons observé que l'administration de l'huile essentielle de clou de girofle a permis d'enregistrer une nette amélioration des déficits cognitifs. Certaine auteur, ont observé que l'effet aigu de l'huile de girofle sur la mémoire et l'apprentissage entraînant une correction des déficits amnésiques induite par la scopolamine. Cette action est essentiellement à l'effet de l'eugénol. De plus l'eugénol module l'action de récepteur NMDA

Discussion

par un blocage partiel de l'entrée de Ca^{++} et l'évitement de la mort neuronale (**Wie et al.,1997**).

Les antioxydants sont des composés importants pour le traitement des troubles de la mémoire causés par le stress oxydatif (**Mehta et al.,2010**) .

L'huile essentielle de clou de girofle diminue le stress oxydatif évalué par des niveaux de glutathion réduit et malondialdéhyde dans le cerveau des souris. Cette étude a conclu que l'huile de clou de girofle pourrait revenir déficits de la mémoire et de l'apprentissage causés par la scopolamine à court et long terme en raison de la réduction du stress oxydatif (**Halder et al.,2011**).

Eugénol, le principal constituant actif du clou de girofle, inhibe le peptide β -amyloïde par afflux excessif de Ca^{2+} dans les neurones qui provoque la mort neuronale et fournit un appui solide pour le potentiel thérapeutique et prophylactique des plantes contenant de l'eugénol pour la gestion de la maladie d'Alzheimer (**Irie et Keung, 2003;Waring, 2004**).

En outre, **Dashti et Morshedi, 2009** ont indiqué que l'administration aiguë d'un extrait éthanolique de clou de girofle améliore les processus d'apprentissage et de la mémoire chez des souris

En outre, **Kassab et al.,2014**enregistrent que le clou de girofle offre une propriété neuroprotectrice contre la neurotoxicité de aluminium (AlCl_3).

Dans une autre série d'expérimentations, nous avons exploré le statut antioxydant dans le cerveau chez les rats intoxiqués pendant la période de gestation et de lactation ; l'intérêt de cette étude est due au fait que le cerveau répond différemment à l'effort oxydant générer par le plomb et manganèse.

L'exploration des enzymes antioxydants chez le rat intoxiqué par le plomb et manganèse ont permis d'observer des perturbations considérables dans l'activité des différentes enzymes (CAT, GSH-Px, et SOD) chez le groupe intoxiqué comparé au témoin, au niveau cérébrale.

Une diminution très importante est notée au niveau cérébral dans l'activité des SOD et GPx. Ces résultats montrent que l'exposition au plomb, durant une période assez longue, induit la diminution des activités des enzymes responsable des défenses contre la production de radicaux libres du corps au niveau cérébrale (**Moreira et al., 2001**)

Discussion

Shukla et al., 2003 indiquent que l'activité antioxydante du superoxyde dismutase (SOD) a diminué dans toutes les régions du cerveau après exposition au plomb.

En outre, Pb épuise les cellules majeurs anti oxydantes, en particulier Les enzymes qui contient le groupement thiol (par exemple, le glutathion) (**Abdel Moniem et al., 2010**).

L'exposition au Pb provoque la diminution significative de l'activité du complexe mitochondriale I-III / II-III en Hc/St et diminue les niveaux de thiols totaux (**Venkareddy et Muralidhara, 2014**).

Abdel Moneim et Dkhil, 2011 ont également observé des changements dans l'activité de certaines enzymes du système d'oxydoréduction dans le cerveau des rats intoxiqués au Pb. La conséquence de la diminution des d'antioxydants dans les tissus est due à l'augmentation du taux de peroxydation des lipides, calcium modifié et homéostasie de sulfhydryle. Tous ces procédés peuvent être associés à des niveaux de ROS renforcée dans la cellule, suivie par le stress oxydatif.

Nos résultats sont en corrélation avec **Moreira et al., 2001; Khalaf et al., 2012** qui révèlent une diminution significative de l'activité de SOD chez rats exposés au plomb. Certains chercheurs ont évalué l'activité des enzymes antioxydantes dans les régions du cerveau à la place du cerveau entier parce que les différentes régions peuvent réagir différemment au stress oxydatif (**Sandhir et al., 1994; Shukla et al., 1988**).

Le plomb ne subissant pas de cycle oxydo-réducteur, cette peroxydation est due indirectement à son effet sur GSH et les autres enzymes antioxydants, attribué à la forte affinité du plomb pour les groupements sulfhydryles et les cofacteurs métalliques présents dans ces enzymes. Le plomb agit également en perturbant les fonctions mitochondriales par l'élévation de la $[Ca^{2+}]$, le tout contribuant à stimuler la synthèse des radicaux libres. La peroxydation des lipides qui s'ensuit provoque la cassure des chaînes d'acides gras polyinsaturés et donc la fin de la perméabilité sélective de la membrane, d'où le gonflement des cellules neuronales et gliales et leur nécrose (**Aschner et al., 1999**).

Toutefois, ces résultats sont en accord avec ceux de **Iatronico et al., 2013** qui ont déterminé l'état redox intracellulaire des astrocytes traités par le manganèse, l'évaluation de l'activité de superoxyde dismutase (SOD) et les espèces réactives oxygénées (ROS) a enregistré une augmentation significative de ROS et une diminution d'activité de superoxyde dismutase (SOD).

Discussion

De plus, **Bhuvaneswari et al., 2013** montrent que l'exposition à faible ou à forte dose de Mn induit un dommage oxydatif dans différentes régions du cerveau (cortex cérébral, le cervelet et l'hippocampe) conduit à l'altération de l'activité des enzymes les isoformes SOD, CAT, GPx, et l'expression des gènes de Mn-SOD et de la GPx.

Les noyaux gris centraux sont des zones dans le cerveau avec une activité oxydante élevée favorisant l'oxydation Mn^{2+} à Mn^{3+} , les espèces ayant un grand potentiel pro-oxydant augmentent l'autoxydation du DA (**Donaldson, McGregor, et LaBella, 1982**).

Il est suggéré que la première étape dans la production de ROS est la production de $O_2^{\bullet-}$ qui peut être converti en H_2O_2 par le Mn et Cu / Zn superoxyde dismutase dans les mitochondries et le cytoplasme. H_2O_2 peut être encore converti en OH^{\bullet} . En présence de Mn ou d'autres métaux de transition (**Goldstein, Meyerstein, & Czapski, 1993; Martinez-Finley et al, 2013**).

Le Mn^{2+} interfère avec l'homéostasie du Ca^{2+} dans les mitochondries en occupant les sites de liaison de Ca^{2+} . Avec la génération du stress oxydatif, ce qui conduit à l'induction d'un processus nommé transition de perméabilité mitochondriale. L'ouverture d'un pore de transition de perméabilité conduit à la solubilité de la membrane mitochondriale pour des ions et des protons qui causent le gonflement rapide et le changement d'ultrastructure associés à la perte du potentiel mitochondrial de la membrane interne, la phosphorylation oxydative altérée, la synthèse d'ATP, l'apoptose et induisant la neurodégénérescence (**Farina et al., 2012; Martinez-Finley et al, 2013; Rao & Norenberg, 2004**).

De plus, l'administration de L'HEC par voie intrapéritonéale à la dose de 0,1ml/kg, a permis d'observer une augmentation significative de la teneur en GSH et activité de la GPx chez les rats co-exposés aux Pb et Mn. Nos résultats sont en accord avec (**Kassab et al., 2014; Shyamala et al., 2003; Ravi et al., 2004**) qui indiquent que le gavage de l'extrait aqueux de clou de girofle pendant 14 jours consécutifs a entraîné une augmentation significative de la teneur en GSH et activité de la GPx chez les rats préalablement intoxiqués par l'aluminium.

Tasleem et al., 2012 montrent que l'activité de catalase augmente suite à l'administration de l'extrait aqueux des boutons floraux de clous de girofle.

Discussion

L'exposition au Pb provoque la diminution significative de l'activité du complexe mitochondriale I-III / II-III en Hc/St et diminue les niveaux de thiols totaux. L'eugénol renforce la fonction mitochondriale, les niveaux de thiols totaux et l'activité des enzymes antioxydantes(SOD, GPx) (Venkareddy et Muralidhara ,2014).

Venkareddy et Muralidhara ,2014 Suggèrent que le traitement oral de l'eugénol a le potentiel pour protéger de façon significative les rats contre le dommage oxydatif induit par le Pb.

Dans notre étude, nous avons constaté que l'activité de PAL est significativement inférieure dans le cerveau des rats coexposés aux Pb et Mn comparée à celles des rats non exposés.

Toutefois, divers molécules changent durant le processus de développement et de la maturation cérébrale incluant les gènes et les protéines sensibles à la toxicité du Pb et Mn (Nihei et Guilarte, 2000).

La phosphatase alcaline (PAL) est l'une des enzymes clés qui indique le fonctionnement du système nerveux central (SNC) et son activité permettra d'approfondir l'étude de l'impact de la neurotoxicité durant la période prénatale chez les rats. (ref)

Cependant, la PAL est synthétisée au niveau du plexus choroïde et joue un rôle important dans la neurotransmission et le développement cérébral (Fonta et al., 2005).

Les fonctions de cette enzyme est très active dans certaines aires cérébrales (aires primaires et frontales) chez les mammifères (Fonta et Imbert, 2002, Fonta et al., 2004) .

Sa localisation membranaire, au niveau des synapses et des nœuds de Ranvier, ainsi que son activité régulée par le niveau d'activité afférente et la maturation neuronale, suggèrent un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux et sa régulation (Fonta et al., 2004, 2005).

Les résultats de **Mirhashemi et al., 2009** montrent que l'injection intrapéritonéale de manganèse a la dose 175 mmol /kg du manganèse aux rats mâles pendant deux semaines consécutives a permis enregistré une diminution significative de l'activité d'ALP cérébrale

De plus, le poids moléculaire d'ALP a été diminué de manière significative dans le cerveau chez les animaux traités par le Mn **Mirhashemi et al., 2009**.

Discussion

Les résultats des mêmes auteurs ont montré que l'injection par la voie intrapéritonéale de plomb pendant 15 jours chez des rats mâles a entraîné une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline cérébrale. **Mirhashemi et al., 2009**

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Antonio et Leret, 2000 ; Antonio et al., 2003** qui indiquent que l'exposition chronique au Pb durant la gestation et la lactation entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la PAL. Cette réduction de l'activité de la PAL pourrait s'expliquer par une perturbation du développement cérébral induite par le Pb.

Et peuvent être aussi expliqués par l'effet inhibiteur du Pb sur l'activité de PAL directement, en substituant (Zn) ou indirectement, en diminuant la disponibilité du Zn dans le cerveau (**Goering, 1993; Shinozaki et Pritzker, 1996 ; Peterson et Oskarsson, 2000**).

Par ailleurs, le traitement par l'huile essentielle de clou de girofle a permis une augmentation significative de l'activité enzymatique de PAL et cela peut être expliqué par sa propriété neuroprotectrice. **Kassab et al., 2014**.

L'exposition prénatale aux Pb et Mn a permis d'enregistrer une hyperglycémie chez les jeunes rats intoxiqués comparés aux rats témoins. Cela signifie que l'administration chronique aux Pb et Mn durant la période de développement entraîne un dysfonctionnement du métabolisme énergétique, cette augmentation de la concentration sanguine de glucose est probablement le résultat de la glycogénolyse hépatique et musculaire pour couvrir les besoins énergétiques cérébraux (**Kasdallah et al., 2005**). Ces auteurs confirment que l'exposition à l'acétate de Pb et Mn engendrent un effet stressant qui se traduit par une hyperglycémie sous l'action des hormones de stress à savoir ; la corticotropin releasing factor, la corticotropine et la cortisone au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale respectivement, activant ainsi les enzymes du métabolisme glucidique.

L'administration de l'huile essentielle de clou de girofle à des rats exposés aux Pb et Mn a entraîné une diminution du taux de glucose dans le sang, il a été montré que cette huile essentielle possède une activité hypoglycémique en réprimant l'expression de gènes de phosphor-enol pyruvate-carboxy-kinase (PEPCK) et le glucose 6-phosphatase (G6Pase) codent pour des enzymes qui contrôlent la gluconéogenèse hépatique (**Prasad et al., 2005 ; Adli et al., 2014**).

Par ailleurs, dans notre étude, la plombémie et le taux de manganèse sanguin chez les animaux exposés pendant la gestation et la lactation à (2,84g/l) d'acétate du plomb et

Discussion

(4,79g/l) de chlorure de manganèse tétrahydraté sont supérieure, comparée à celles des animaux témoins, pouvant être due à la perméabilité placentaire par le biais du cordon ombilical qui laisse passer le Pb et Mn ou bien à travers le lait pendant la période de la lactation. **Betharia et Maher, 2012.**

De plus, **Bellinger, 2000** rapporte que cette augmentation s'expliquerait par le fait que le Pb ne s'accumule pas dans le placenta, et que la concentration du Pb dans le sang maternel est presque identique que celle dans le sang fœtal. Il a été démontré aussi qu'une forte corrélation entre la plombémie maternelle et celle du cordon ombilical indiquant le transfert du Pb à partir de la mère au fœtus (**Yang et al., 2003**).

De même, nous avons enregistré chez les rats intoxiqués une accumulation du Pb et de Mn au niveau cérébral. Cette accumulation au niveau cérébrale, confirme la capacité du plomb à passer à travers la barrière hémato encéphalique. La distribution du plomb dans les tissus mous a fait l'objet de plusieurs études chez le rat qui mentionne après 90 jours d'exposition à deux concentrations différentes de 1,7 et 17 mg Pb/kg/j, une accumulation préférentielle de plomb au niveau cérébrale (**Areola et al, 1999**). Les autopsies réalisées sur des travailleurs ont révélé une accumulation du plomb, par ordre décroissant, dans le foie > les reins > les poumons > le cerveau (**Gerhardsson et al, 1995**). De plus, l'accumulation sélective du plomb notamment dans certaines zones du cerveau (l'hippocampe) et des reins a pu être observée chez l'homme (**Ahmad et al, 2011**).

Par ailleurs, l'exposition alimentaire excessive au Mn peut conduire à une augmentation de l'absorption et de l'accumulation de Mn dans le cerveau. (**Bouchard et al, 2011; Khan et al, 2012**). De plus, le Manganèse est réparti plus uniformément chez le fœtus que dans les tissus adultes. (**Cahill et al., 1980**).

Les résultats réalisées par **Yokel et Crossgrove** semblent indiquer que l'afflux de manganèse au cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique s'effectue par l'intermédiaire des transporteurs, alors que la sortie de manganèse est lente et s'effectue principalement par diffusion, permettant ainsi une accumulation possible de manganèse dans les tissus du cerveau après une exposition chronique. (**Yokel, 2002; Crossgrove et coll., 2003; Yokel et coll., 2003; Yokel et Crossgrove, 2004**).

Discussion

De plus, la barrière hémato-encéphalique n'est pas entièrement développée chez les animaux néonataux et les cerveaux des jeunes animaux semblent être plus susceptibles à la neurotoxicité (**Fornstedt et coll., 1990; Lipe et coll., 1999; Miele et coll., 2000**).

Les études chez les animaux qui ont directement comparé des rats en croissance et des adultes dans les mêmes conditions expérimentales indiquent que les rats néonataux ont manifesté une plus grande absorption et accumulation de manganèse dans le cerveau, une plus forte tendance à exhiber des changements au niveau des enzymes et des neurotransmetteurs, ainsi que des changements comportementaux, comparativement aux animaux plus âgés (**Kostial et coll., 1978; Shukla et coll., 1980; Heilbronn et coll., 1982; Dorman et coll., 2000**).

La parkine est responsable de l'ubiquitination de DMT1, les mutations dans PARK2 mènent aux plus grands niveaux de DMT1 qui pourrait faciliter la plus grande accumulation du manganèse dans le cerveau (**Roth, 2009 ; Roth, singleton, Feng, Garrick, et Paradkar, 2010**).

Le premier syndrome génétique de surcharge de manganèse cérébral provoqué par des mutations dans le gène SLC30A10 qui est le transporteur de manganèse (**Quadri et autres, 2012 ; Tuschl et autres, 2012**)

L'administration de HEC chez les rats intoxiqués a indiqué que le traitement par l'huile a considérablement diminué la concentration de plomb et de manganèse dans le sang ainsi que le cerveau. Cet effet peut-être due à la présence des composés chélateur comme l'eugénol qui réduit l'accumulation de ces xenobiotiques dans le sang. (**Nassar et al., 2007**).

Pour compléter les analyses biochimiques, nous avons effectué une étude histologique sur le cervelet et le cortex cérébral des rats intoxiqués, témoins et intoxiqués traités par HEC. Cette étude a révélé une atteinte très marquée avec des altérations et une dissociation de la couche des cellules de Purkinje. Nous avons observé également une destruction cellulaire plus remarquable avec des espaces vasculaires plus agrandies et des cellules de forme et de taille différentes chez les rats co-exposés aux Pb et Mn par rapport aux rats témoins. Ces observations ont été rapportées par **Benlahcen (2007)** avec la dose d'acétate de plomb de l'ordre de 750mg/l pendant une durée de 90 jours chez le rat.

Des études anatomiques ont montré un développement anormal des cellules de Purkinje du cervelet et des anomalies de leur branchement dendritique chez des chats traités au plomb

Discussion

(**Patrick et al, 1979**). Les études neurophysiologiques de **Palmer et al (1984)** et **Lalith Kumar et al (2014)** ont montré aussi une diminution de l'amplitude des potentiels dans les cellules de Purkinje du cervelet soumis à l'action du plomb. Et le cervelet a un rôle important dans la coordination motrice qui est modérément atteint chez l'homme et l'animal exposé à de faibles doses de plomb (**Carlson, 1991**).

plus, nous avons observé une dégénérescence et nécrose des neurones au niveau du cortex cérébral chez les rats intoxiqués et la diminution induite par PAL a indiqué que la fonction cérébrale a été affectée.

De plus, il a été signalé que Mn exerce divers effets à plusieurs sites dans les systèmes nerveux central et périphérique (**Finkelstein et al, 2007 ; Mousa et al, 2015**). Il perturbe les fonctions de ganglions de la base ainsi que les régions corticales du cerveau, telles que l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex pariétal. Dans le système nerveux périphérique, Mn exerce son effet sur les nerfs moteurs et des jonctions neuromusculaires (**AP Marreilha dos Santos et al, 2012**). il a été également montrée que le Mn induit une dégénérescence neuronale du noyau caudé, putamen, globus pallidus, cervelet et la substance noire ainsi que des altérations morphologiques dans les neurones du cortex frontal, l'hippocampe, mésencéphale et la protubérance annulaire (**Yamada et al, 1986 ; Mousa et al, 2015**).

L'évaluation histologique des régions étudiées de cerveau a montré une diminution de nombre total des cellules et une augmentation du nombre de cellules endommagées. Nos résultats prouvent que des changements morphologiques du cerveau de rat sont en corrélation avec le stress oxydants induit par le Pb et Mn ces résultats sont semblables à ceux rapportés par (**Lalith Kumar et al., 2014**).

Une lésion neuronale à la suite de la co-expositionaux Pb et Mn est limitée aux cortex cérébral et le cervelet. Cette dégénérescence neuronale due au Pb a été précédemment rapportée dans certaines expériences in vivo comme indiqué par **Finkelstein et al (1998)**.

Dans ce contexte, **Seddik et al. (2011)** ont rapporté que l'exposition chronique au plomb chez les rats a provoqué la fragmentation de l'ADN dans le cortex frontal, l'hippocampe et le cervelet, ce qui indique un mécanisme apoptotique sous-jacent. Perte de l'intégrité cellulaire dans ces trois régions du cerveau pourrait soustendre pour certaines caractéristiques cliniques de l'intoxication au plomb tels que des perturbations dans la réponse émotionnelle, la mémoire et l'apprentissage (**Schneider et al., 2012**).

Discussion

En effet, l'administration de HEC chez les rats intoxiqués a indiqué que le traitement par l'huile a considérablement amélioré l'architecture du cortex cérébral et cervelet.

D'une part, l'eugénol renforce le fonctionnement métabolique normal du cortex cérébral de rat et possède aussi une propriété anti-apoptotique, et ces évidences sous-tendent l'efficacité de l'eugénol pour préserver la fonction neuronale. D'autre, l'eugénol a empêché des niveaux élevés de la caspase-3 d'exprimer et excluant les cellules à entrer au apoptose. **(Singh et Panwar, 2013)**.

En fin, **Singh et Panwar, 2013** considèrent eugénol comme un agent neuroprotecteur contre des troubles cérébraux.

Discussion

CONCLUSION

L'intérêt principal de cette étude était en premier lieu, d'évaluer le risque de l'intoxication chronique aux plomb et manganèse. En employant plusieurs approches ; neurocomportementale, biochimiques et histologique ainsi qu'a testé l'efficacité de l'administration de l'huile essentielle de *S.aromaticum* à rétablir ou non les dommages causé par ces métaux.

En effet, les différents travaux entrepris chez l'animale et l'homme ont permis de montrer que L'exposition environnementale chronique aux plomb et manganèse durant la période du développement pourrait être un facteur critique responsable des déficits cognitifs et comportemental ainsi que la maturation du système nerveux juvénile.

Cependant nos résultats ont montré que l'exposition chronique aux chlorure de manganèse et l'acétate du plomb a des doses (4.79g Mn/l , 2,84gPb/l) chez les rats issus des femelles intoxiqué durant leurs période de gestation et la lactation, entraîne une réduction du poids corporel et cérébral enregistré chez les jeunes rats intoxiqués comparé aux rats témoins.

Cette exposition chronique de ces xenobiotiques au cours de la période de développent entraine des perturbations neurocomportementales tel que l'installation des états d'anxiété, dépression et une augmentation de l'activité locomotrice chez les sujets intoxiqués, De même, l'analyse biochimique révèle une hyperglycémie. Sur même échelle on a observé une perturbation au niveau de la mémoire due à un changement des fonctions des récepteurs (NMDA) qui sont interférer lors de l'apprentissage et la mémorisation.

Par ailleurs, nous avons observé que la co-exposition chronique aux plomb et manganèse durant la période de gestation et lactation est neurotoxique, elle affecte certains enzymes impliqués dans le développement périnatal et dans la maturation du SNC, tels que la PAL.

Dans une autre série d'expérimentations, nous avons constaté un déséquilibre de la balance oxydative traduite par une diminution de l'activité de SOD, GPX et CAT chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins. Ces résultats sont dus à l'effet pro oxydant du plomb et manganèse qui ont engendré une surproduction de radicaux libres ce qui expliquerait cette perturbation dans les activités des différents systèmes de défense cellulaire.

L'étude toxico-cinétique de la distribution du plomb et manganèse chez les rats a permis de montrer que ce métal est susceptible d'être bioaccumulé et bioconcentré dans le cerveau. Nous avons constaté que cette distribution est hétérogène entre le cerveau et le sang, et cette accumulation cérébrale expliquée par l'effet neurotoxique.

En effet, l'étude histologique entreprise a montré des altérations au niveau du cortex cérébral et cortex cérébelleux.

Par ailleurs, l'administration de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a permis d'observer une augmentation dans le gain corporel ainsi une nette amélioration dans les différents tests neurocomportementaux et d'autre part les tests biochimiques montrent une amélioration de tous les paramètres analysés. Ceci se traduit par l'effet de cette huile comme un stimulant nerveux, un améliorateur cognitif et régulateur biochimique, et protecteur contre les lésions cérébrales.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel wahhab et aly : antioxidant property of nigella sativa (black cumin) and syzygium aromaticum (clove) in rats during aflatoxicosis j. Appl. Toxicol. 2005 .

Abderrahim el Haib. (2011). valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques.P : 4-11.

Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Behari JR. 2009. Lead-induced phospholipidosis and cholesterogenesis in rat tissue. Chem Biol Interact; 179 (2-3): 314-20.

Ait hamadouche N. (2009), effets de l'exposition chronique au plomb sur le système reproducteur et l'axe hypothalamo-hypophysaire chez le rat mâle wistar. Etude histologique et biochimique

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. 1996. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. Nature 379:257-262.

Alexander b.h., checkoway h., van netten c., muller c.h., ewers t.g., kaufman j.d., mueller b.a., vaughan t.l. And faustman e.m.(1996) - semen quality of men employed at a lead smelter.occup environ med, 53, 6, 411-416.

Alma M H, Ertaş M, Nitz S, Kollmannsberger H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove bioresource 2(2) 265-269.

Amdurm.o., doullj., klaassenc.d. - lead. In : casarrett and doull's toxicology, 5 ed. New york,mcgraw-hill, 1996.

Anbu s and anuradha : protective effect of eugenol against alcohol-induced biochemical changes in rats international journal of research in biotechnology and biochemistry 2012.

Angelidis, P., Laurencin, F.B., Youinou, P., 1987. Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol. 31, 113–122.

Anton R. and Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.

Aoshima H, Hamamoto K. 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. Biosci Biotech Bioch 63:743-748.

Aprotosoia A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1); pp. 46-54.

Assayama M, Ogawa T, Morimoto T (1975) excretion of heavy metals in sweat. *J aichi med uni assoc* 3(4): 230-235.

Aykin Burns N, Laegeler A, Ellog G, Ercal N. Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003; 44: 417-20.

Azuma, Y., Ozasa, N., Ueda, Y., et Takagi, N. (1986). Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *Journal of Dental Research*, 65(1), 53-56.

BABLOK (1988). Laboratory diagnosis of increased lead absorption. *Arch Environ Health* 28,(4) ;198- 208.

Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

Baudoux D. (2008). *Guide Pratique d'Aromathérapie familiale et scientifique*. Paris : Amyris.

Beck B.D. (1992) - an update on exposure and effects of lead. *Fundam Appl Toxicol*, 18, 1, 1-16.

Bellinger D., Sloman J., Leviton A., Rabinowitz M., Needleman H.L. and Waterman C. (1991) - low-level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years. *Pediatrics*, 87, 2, 219-227.

Bellinger DC (2000) Effect modification in epidemiological studies of low level neurotoxicant exposures and health outcomes. *Neurotoxicol Teratol* 22: 133-140.

BENAYAD NISRIN. (2008)- les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair, Département de Chimie, Faculté des Sciences de Rabat.

Benini C., 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109p.

Bingham, Barkly W, Zerwas M. (1972). Responses of alveolar macrophages to metals. I. Inhalation of lead and nickel, *Arch Environ Health* ; 25 : 61-14-06-414.

Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Arch Intern Med*. 2006 ; 84 : 18-2

Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency, a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2001 ; 169 ; 551-561. 8.

Bismuth C. Et al. *Plomb, toxicologie clinique*, Paris: Flammarion médecine-sciences, 2000, p.638-55.

Boissier T, Simon (1962). *Thérapie. Arch. Int. pharmacodynamie*. ; 229 : 327 _ 336.

Bress WC and Bidanset JH. (1991) Percutaneous in vivo and in vitro absorption of lead. *Vet Hum Toxicol* 33(3) 212-214.

Brun S, Buxaders Sanchez S, Cabanis JC. (1995) *Les cahiers scientifiques et techniques de l'O.I.V : le plomb groupe d'expert " sécurité alimentaire " de la sous-commission " nutrition & santé " de l'O.I.V.* Paris p : 141.

Bruneton J., 1993. *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. Tec. & Doc. Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.

Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. Tec. & Doc. Lavoisier 3ème édition, Paris.

BUCHBAUER G, MÜLLER LM (1993)- *Biological Effects of Fragrances and Essential Oils. Perfumer & Flavorist*, 18(1), 19-24.

Burdock GA (Ed) (1995) *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Volume I*, 3rd Edition CRC Press.

California environmental protection agency. (1997) *public health goal for lead in drinking water*, p17.

Catherine Estelle Ferland-Legault, Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire Département de biomédecine vétérinaire ; Faculté de médecine vétérinaire 2011.

Cecil, km; brubaker, cj; adler, cm; dietrich, kn; altaye, m; egelhoff, jc; wessel, s; elangovan, i et al. (2008). "decreased brain volume in adults with childhood lead exposure". In balmes, john. Plos medicine 5 (5): e112. Doi:10.1371/journal.pmed.0050112. Pmc 2689675. Pmid 18507499.

Chami F. (2005). Evaluation in vitro de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires in vivo Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah Faculté des Sciences Dhar El Mehrez.p ; 28 ; 35.

Chanel o. Dollfus c. Haguenoer j-m. Hartemann p. Huel g. Larroque b. Lison d. Marret s. Pinon-lataillade g. Premont j. De verneuil h. Zmirou d. (1999). Plomb dans l'environnement : quels risques pour la sante ; groupement de recherche en economie quantitative d'aix-marseille (greqam), cnrs umr 6579, marseille.

Chen Q, Shu WQ, Zeng H, Luo JH, Fu WJ (2008) Long-term drinking purified water may aggravate the inhibition of NMDA expression and spatial learning ability induced by lead on rat. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 42(6):431-436.

Chichovska m, anguelov a. 2006. Study of the influence of l-lysine and zinc administration during exposure to lead and ethanol in rats. Viterinarski arjuv; 76: 65-73.

Chowdhury J.U., Mobarok H. Bhuiyan N.I. and Nandi N.C., 2009. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. Bangladesh J. Bot.38(2): pp.181-183.

Cory slechta ; annual review of pharmacology and toxicology, vol. 35: 391 -415 (volume publication date april 1995).

Cruz, G.L., 1979. Dicionario das Plantas U` teis do Brasil. Civilizac,a`o Brasileira S.A., Rio de Janeiro.\$

Cryan jf, markou a, lucki i. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future need. Trends in pharmacological sciences 2002; 23:238-245.

Dart, r.c.; hurlbut, k.m.; boyer-hassen, l.v. (2004). "lead". In dart, rc. Medical toxicology (3rd ed.). Lippincott williams & wilkins. Isbn 0-7817-2845-2.

Dashti-R M H, Morshedi A.(2009). The effects of *Syzygium aromaticum* (clove) on learning and memory in mice. Asian Journal of Traditional Medicines, 4 (4)

Degryse A., Delplala I. et Voinier M. (2008). Risque et bénéfices possibles Huiles essentielles. École des hautes études en santé publique, P. 2-44.

Demichele sg. Nutrition and lead, comp biochem physiol 1984 ; 78: 401-8

Derache r. (1989) toxicologie et securite des aliments. Coordonnateur. Paris. P : 159-172).

DHAWAN M, FLORA SJSAND TANDON SK: Preventive and therapeutic role of vitamin E in chronic plumbism, Biomed Environ Sci 1989; 2: 335–341.

Di Benedetto : Axe " Génie des Procédés", centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne 1997.

Dini I, giudetti am, ruzittu m, gnoni gv, zara v. Citrate carrier and lipogenic enzyme activities in lead nitrate-induced proliferative and apoptotic phase in rat liver. Biochem mol biol int 1999; 47: 607-14.

Dini I, giudetti am, ruzittu m, gnoni gv, zara v.(1999). Citrate Carrier and lipogenic enzyme activities in lead nitrate-induced proliferative and Apoptotic phase in rat liver. Biochem mol biol int 9; 47: 607-14.

Dorman DC, McElveen AM, Marshall MW, Parkinson CU, Arden James R, Struve MF, et al. Maternal–fetal distribution of manganese in the rat following inhalation exposure to manganese sulfate. Neurotoxicology 2005a;26:625–32.

Dorman DC, McElveen AM, Marshall MW, Parkinson CU, James RA, Struve MF, et al. Tissue manganese concentrations in lactating rats and their offspring following combined in utero and lactation exposure to inhaled manganese sulfate. Toxicol Sci 2005b;84:12–21.

Editeur Paris. 1984 ; p65-81.

Emamghoreishim., talebianpourm.s : antidepressant effect of melissa officinalis in the forced swimming test .department of pharmacology, psychiatric research center, medical school, shiraz university of medical sciences, shiraz, iran 2009

Ennaccur A. Dclacour J (1988) a new one-trial test for neurobiologies! studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioral brain research 31: 47-59.

Ercal N, Neal R, Treeratphan P, Lutz PM, Hammond TC, Dennery PA, Spitz DR (2000) A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead exposed fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 39:251–6

Farmand F, Ehdai A, Roberts C, Sindhu RK (2005) Lead induced dysregulation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and guanylate cyclase. *Environ Res* 98:33–39.

Finkelstein Y, Morri E, Markowitz B, Rosen JF (1998) Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects *Brain Research Reviews* 27:168–176.

Flora GJ and Seth PK (2000) Alterations in some membrane properties in rat brain following exposure to lead. *Cytobios* 103: 103-109.

Florence mayer (2012). utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : etude de cas en maison de retraite p.11.

Fossati P. PRINCE L, (1982) serum triglycérides determied colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide . *Clin, Chem.* , 28/2077-2080.

Fowler ba, du val g. Effects of lead on the kidney: roles of High-affinity lead binding proteins. *Environ health perspect.*1991; 91: 77–80.

Fowler ba. Mechanisms of kidney cell injury from metals. *Environ health perspect* 1993, 100: 57-63.

Franchomme, P.; Pénoël, D. 1990. L'aromathérapie exactement. *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

Fred hl, van dijk ha. Images of memorable cases: case 81. *Connexions*. Retrieved august 25, 2009.

Garibaldi JA, Greenlaw J, Choi J, Fotovatjah M. 1995. Treatment of post-operative pain. *CDA Journal* 23:71-72.

Garnéro J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France, pp. 2-20.

Gautam AK, Agarwal K, Shah BA, Kumar S, Saiyed HN, (2001). Lead induced genotoxicity: areview. *Environ HealthPerspect* 102: 45–50 .

Gerard miquel,. Rapport sur les effets des metaux lourds sur l'environnement et la sante
page 8

Gerard. (2010)Les proprietes des huiles essentielles dans lessoins bucco -dentaires d'hier a
au jourd ' hui. p ;13 ;23 ;24.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R.(2010) Syzygium Aromaticum (L.) Merr. & Perry
(Myrtaceae) Giroflier. Phytothérapie 8:37-43.

Gidlow da. (2004) lead toxicity occupational medicine 54:76-81.

GIDLOW. D.A (2004) Lead toxicity Occupational Medicine 54:76–81. 59. Ghedira K,
Goetz P, Le Jeune R.(2010) Syzygium Aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier.
Phytothérapie 8:37-43.

Godwin h. 2001. Synaptotagmin is a molecular target for lead. Curr.opin. Chem. Biol. 5 :
223-227.

Goyer ra. Effect of toxic, chemical, and environmental factors on the kidney.monogr pathol
1979, 20: 202-217.

Greenlee ar risk factors for female infertility in an agricultural region. Epidemiology 2003 ;
14(4) : 429-436.

GUENETTE SA, BEAUDRY F, MARIER J F, VACHON P. (2006). Pharmacokinetics and
anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. J Vet Pharmacol Ther, 2006, 29:
265-70.

Guénette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic
activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. J Vet Pharmacol Ther29:265-270.

Gulson b.l., jameson c.w., mahaffey k.r., mizon k.j., korsch m.j. And vimpani g. (1997) -
pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton.j lab clin med, 130, 1, 51-62.

Haguenoer jm, furon d. Toxicologie et hygiene industrielles. Les derives mineraux, 2e
partie. Paris. 1982, paris. Technique et documentation, tome ii.

Haitao liu, ruiyan niu, jinming wang, yinghe, jundong wang, shanxi china. Changes caused
by fluoride and lead in energy metabolic enzyme activities in the reproductive system of male
offspring rats. Research report fluoride 2008; 41 (3): 184-191.

Haj Ammar A, F. Zagrouba, M. Romdhane, M. Abderrabba. (2009). extraction de l'huile essentielle de myrte (*myrtus communis* l.) provenant de la tunisie par hydrodistillation .international symposium on medicinal and aromatic plants

Hajem s., moreau t., hannaert p., lellouch j., huel g., hellier g., orssaud g., claude j.r., juguet b. And festy b. (1990) - influence of environmental lead on membrane ion transport in a french urban male population. *environ res*, 53, 2, 105-118.

Halder S, A K Mehta, R Kar, M Mustafa, P K Mediratta, K K Sharma. (2011) Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. *Planta Med* ; 77: 830–834

Hami j, dashti gh r, nema-bkhsh m, afshar m, ghaffari hr. 2006. The relationship Between high dose lead exposure and serum lipids and lipoprotein levels. *Shiraz e medical journal*; 7 (2): 1-7.

Hammond pb, lerner si, gartside p.s, hanenson ib, roda sb, foulkes ec et al. the relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. *J occup med*. 1980; 22(7): 475–484.

Hanan, a. Azoz and riham, m. Raafat : effect of lead toxicity on cytogenicity, biochemical constituents and tissue residue with protective role of activated charcoal and casein in male rats, *australian journal of basic and applied sciences*, 6(7): 497-509, 2012.

Hannaert pa, Moreau t, Huel G, Orssaud G, Leuouch j et coll. Blood pressure and erythrocyte na + transport systems in a french urban male population. *J hypertens* 1988, 6: 905-911.

Happiette Laurent, le saturnisme d'hier et d'aujourd'hui université paris. 2010. p 29

He M, Du M, Fan M, Bian Z. 2007. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 163:137-143.

Henri chaveron. Introduction a la toxicologie nutritionnelle, 3e edition, tec & doc, 1999, 214 pages.

Herman ds, geraldine tv. 2009. Influence of minerals on lead-induced alterations in liver function in rats exposed to long-term lead exposure. *J hazard mater*; 166 (2-3): 1410-4.

Hernberg S (2000) Lead poisoning in a historical perspective. *Americ J Indust Med* 254:244–254

Hlengiwe p. Madlala¹, bubuya masola², moganavelli singh² and cephas t. musabayane¹ : the effects of *Syzygium aromaticum*-derived oleanolic acid on kidney function of male sprague-dawley rats and on kidney and liver cell lines, 2012.

Homan, c. S. Et brogan, g. X. (1993), lead toxicity, in handbook of medical toxicology (ed, p viccellio), pp. 271-284.

Hould Rene. *Techniques d'histopathologie et de cytologie*. Malune Editeur Paris .Décarie

Humphreys DJ (1991) Effects of exposure to excessive quantities of lead on animals. *Brit Vet J* 147:18–30

Iarc. Lead and lead compounds. In: some metals and metallic compounds, iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: iarc, 1980: 325-416.

IPCS. environmental health criteria 165. Inorganic lead. geneva: who; 1995 300p.

Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. 2004. Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Disease. *Drug Dev Ind Pharm* 30:195-203.

Jeferson Falcao Do Amarala, Maria Izabel Gomes Silvaa, Manuel Rufino De Aquino Neto, Brinell Arcanjo Mouraa, Alyne Mara Rodrigues De Carvalho, Patri 'Cia Freire Vasconcelosa, Jose ' Maria Barbosa Filhob, Stanley Juan Chavez Gutierrezb, Silva ^nia Maria Mendes Vasconcelosa, Danielle Silveira Macedoa, Francisca Clea Florenco De Sousa : Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement of the monoaminergic system ; doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.

Juberg DR, Kleiman CF, Simona CK. Position paper of the American Council on Science and Health: lead and human health. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997;38:162–80.

Juberg DR, Kleiman CF, Simona CK. Position paper of the American Council on Science and Health: lead and human health. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997;38:162–80.

Judpientienė A and Mockutė D. Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius. *CHEMIJA*. 2004 ; 15(4): 64–68

K. Ghedira P.Goetz R.LeJeune ; Syzygium aromaticum(L.) Merr.&Perry(Myrtaceae) Giroflier, Phytothérapie (2012).

Kahloula K., Effets de l'exposition chronique au plomb pendant la période de la gestation et lactation sur les fonctions neurocomportementales chez les jeunes rats Wistar. Impact sur les récepteurs glutaminergiques (2010).

Karri, sk; saper, rb; kales, sn. (2008). Encephalopathie plomb raison de medecines traditionnelles" . L'innocuite des medicaments actuelle 3 (1):549 doi :10.2174/157488608783333907 . Pmc 2538609 . Pmid 18690981.

Kasdallah ag, mornagui b, gharbi n, machghoul s, el-fazaa s (2005) metabolic And endocrine effects of water and/or food deprivation in rats c r biol 328(5): 463-470.

Khalil, manesh f, tartaglia-erler j, gonick hc. Experimental model of lead nephropathie. Iv. Correlation between renal function changes and haematological indices of lead toxicity. J trace elem electr health dis 1994, 8: 13-19.

Khalil-Manesh F, Gonick HC, Cohen AH, Alinovi R, Bergamaschi E, Mutti A, Rosen VJ (1992) Experimental model of lead nephropathy I. Continuous high dose lead administration. Kidney Inter 41:1192–1203

Khan, m.s.h., m. Mostafa, m.s. Jahan, m.a. Sayed and m.a. Hossain, 2008. Effect of garlic and vitamine b. Complex in lead acetate induced toxicities in mice bangl. J. Vet. Med., 6(3): 203-210.

Kim R, Rotnitskya, Sparrowd et al. A longitudinal study of low-level lead exposure and impairment of renal function. The Normative Aging study. JAMA 1996;275:1177-1181.

KLASSEN C.D (2001). Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of poisons . 6th edn. McGraw-Hill Medical publishing division. Pp. 812-841.

Kosnett, m.j. "lead". In olson, k.r. Poisoning and drug overdose (5th ed.). Mcgraw-hill professional. P. 2006. Isbn 0-07-144333-9.

Laekeman SM, Hoof VL, Haemers A, Berghe VAD, Herman AG, Vlietink AK. 1990. Eugenol, a valuable compound for in-vitro experimental research and Worth while for further in-vivo investigation. Phytother Res 4:90-96.

Lagerkvist b.j., ekesrydh s., englyst v., nordberg g.f., soderberg h.a. And wiklund d.e. (1996) - increased blood lead and decreased calcium levels during pregnancy : a prospective study of swedish women living near a smelter. *Am j public health*, 86, 9, 1247-1252.

Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.

Landrans m, paclot c. "le saturnisme infantile". *change sante sociale*. 1994; 74 :23-28.

Landrans m, quenel p, jouan m. Evaluation des risques sanitaires lies a la population emise par une fonderie de metaux non ferreux a bourg-fidel : bilan des donnees disponibles et propositions, saint-maurice, rnst, 1989, 20, p et annexes.

Landrans m., le goaster c., bouy p., debaisieux f., roussel c. Evaluation de l'exposition des enfants aux polluants emis par l'usine metal blanc a bourg-fidele, st-maurice, rnsp et ddass des ardennes, 1999, 47, , p. Et annexes.

Lappe j. Vitamin d and calcium supplementation reduces cancer risk : results of a randomized trial. *Am j clin nutr*. 2007 ; 85 (6) : 158-91.

Laurewys rr (1983) biological monitoring of exposure to inorganic and organometallic substances. *Lead. Industrial chemical exposure guidelines for biological monitoring*. Davis, biomedica publ. P 27-38.

Lebeau P, Courtois G. 1929. *Traité de pharmacie chimique – Tome II*. Masson et Cie.

Lessler ma. Lead and lead poisoning from antiquity to modern times. *Othio j sci*. 1988; 3: 78-84.

Loikkanen J, Naarala J, Vähäkangas Kh, Savolainen Km. Glutamate increases toxicity of inorganic lead in GT1-7 neurons: partial protection induced by flunarizine. *Arch Toxicol*. 2003; 77(12): 663-71.

Ludivine Lionnet, Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire Département de biomédecine vétérinaire ; Faculté de médecine vétérinaire 2009.

Lynda allouche, mohamed hamadouche, abderrezek touabti and seddik khennouf, 2011. Effect of long-term exposure to low or moderate lead concentrations on growth lipid profile and liver function in albino rats. *Advances in biological research*, 5(6): 339-347.

M. Falcy, a. Hesbert, d. Jargot, j.c. Protois, m. Reynier, o. Schneider, p. Serre ; plomb et composés minéraux, fiche toxicologique n° 59 note établie par les services techniques et médicaux de l'inrs institut national de l'environnement industriel et des risques (2003) plomb et dérivés, fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques

M. Reshma anjuma,1, s.b. Sainatha,1, y. Suneeth, p. Sreenivasula reddy 2011 ; lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats.

Malo.N, 10^{ème} Journées Internationales, Digne-Les-Bains 5-6-7 Sept. 1991; p. 28.

Manal k abdel-rahman and ashraf a. Abd el-megeid : hepatoprotective effect of soapworts (*saponaria officinalis*), pomegranate peel (*punica granatum*) and cloves (*syzygium aromaticum* linn) on mice with ccl4 hepatic intoxication , 2012.

Markovac j. And goldstein g.w.(1988a) - lead activates protein kinase c in immature rat brain microvessels. *toxicol appl pharmacol*, 96, 1, 14-23.

Markovac j. And goldstein g.w.(1988b) - picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase c. *nature*, 334, 6177, 71-73.

Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., et Kim, S. (1992). Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 73(6), 729-737.

Mehana, e.e., a.m.a. Meki, and k.m. Fazili, 2010. Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* Doi: 10: 1016 / j. Etp

MilpiedHoms. (2009)- Progrès en dermato-Allergologie. P123 mRNA in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats: implications for synaptictargeting.

Minpei kuroda• yoshihiro mimaki• takayuki ohtomo• junji yamada• tozo nishiyama• tatsumasa mae• hideyuki kishida• teruo kawada : hypoglycemic effects of clove (*syzygium aromaticum* flower buds) on genetically diabetic kk-ay mice and identification of the active ingredients, *j nat med* (2012) 66:394–399.

Missoun fatiha ; impact d'une intoxication au plomb au niveau hépatique, renal etcerebral chez le rat wistar jeune et adulte. 2009 page 39.

Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh Z.H.M., 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.

Mohammedi Z. & Fouzia A. 2007. Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante aromatique sur la croissance des champignons. Université Abou Bakr Belkaïd –Tlemcen, Algérie. 3p.

Moreau t, hannaert p, orssaud g, huel g, garay rp et coll. Influence of membrane sodium transport upon the relation between blood lead and blood pressure in a general male population. *Environ health perspect* 1988, 78: 47 51.

Morin J, Malhuret R, Bastide P. (1983). *Aromathérapie. Exemples de la réalisation pratique de l'utilisation des huiles essentielles en thérapeutique.* ISSN 0992-9406.

Mosaad A. Abdel-Wahhab, Soher E. Aly.(2003). Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (8), pp 2409–2414.

Mounia Oussalah, Stéphane Caillet, Linda Saucier, Monique Lacroix. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat; Volume 73, Issue 2, June 2006, Pages 236–244.

Moussa sa, bashandy sa. 2008. Biophysical and biochemical changes in the blood of Rats exposed to lead toxicity. *Romanian j biophys*, 18 (2): 123-133.

Moussa, s.a. And s.a. Bashandy, 2008. Biophysical and biochemical changes in the blood of rats exposed to lead toxicity. *Romanian. J. Biophy*, 18: 123-133

Murphy m.j., graziano j.h., popovac d., kline j.k., mehmeti a., factor_litvak p., ahmedi g., shrou p., rajovic b. And nenezic d.u.(1990) - past pregnancy outcomes among women living in the vicinity of a lead smelter in kosovo, yugoslavia. *am j public health*, 80, 1, 33-35.

Nabil, m. Ibrabim; esam, a. Eweis; hossams, el-beltagi and yasmin, e. Abdel – mobdy, 2012. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rate. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*; 41-46.

Nadkarni KM. *Indian Materia Medica.* Bombay: Popular Book Depot, 1982, 835-37.

Nassar Mahmoud I., Ahmed H. Gaara, Ahmed H. El-Ghorab, Abdel-Razik H. Farrag, Hui Shen, Enamul Huq and Tom J. Mabry.(2007). Chemical Constituents of Clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their Antioxidant Activity. *Rev. Latinoamer. Quím.* 35/3

Nelly Grosjean. (2007)-l'aromathérapie tout simplement. P52

Newmark HL. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol* 401:25-34.

Nihei MK and Guilarte TR (2001) Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb²⁺: association with deficits of LTP and spatial learning. *Neurotoxicology* 22(5):635-43.

Nishijima H, Uchida R, Kawakami N, Shimamura K, Kitamura K. 1998. Role of endothelium and adventitia on eugenol induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *J Smooth Muscle Res* 34:123-137.

Noriega, g.o., m.l. Tomaro and a.m. Del battle, 2003. Bilirubin is highly effective in preventing in vivo delta – aminolevulinic acid – induced oxidative cell damage. *Biochem. Biophys. Acta*, 1638(2): 173-178.

Observatoire Regional de la Sante Rhone alpes, 2007 pages 01

Ohkubo T, Kitamura K. 1997. Eugenol activates Ca²⁺-permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J Dent Res* 76:1737-1744.

Ohkubo T, Shibata M. 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res* 76:848-851.

Ohkubo T, Shibata M. 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res* 76:848-851.

Ong cn and lee wr (1980) distribution of lead-203 in human peripheral blood in kaminsky p, klein m, duc m. *Physiopathologie de l'intoxication par le plomb inorganique. Rev med interne.* 1993; 14:163-170.

Orloff k g, mistry k, charp p, metcalf s, marino r, shelly t, melaro e, donohoe am, jones rl. (human exposure to lead in groundwater. *Environ res.* 2004; 94: 319-326.

Pearson h.a.; schonfeld, d.j. (2003). "lead". In rudolph, c.d. *Rudolph's pediatrics* (21st ed.). McGraw-hill professional. Isbn 0-8385-8285-0.

Philippon jean francois ; evaluation de l'exposition des enfants au plomb d'origine industrielle ; le cas de l'usine octel de paimboeuf ; (2000).

Piechalak a, malecka a, baraekiewicz d, tomaszewska b. Lead uptake, toxicity and accumulation in phaseolus vulgaris. *biologia plantarum*. 2008; 52(3): 565-568.

Pierre olivier girodet ue .bases moléculaires, cellulaires et tissulaires des traitements médicamenteux ;2010 page 02.

Ponce-Canchihuamán, J. C.; Pérez-Méndez, O.; Hernández-Muñoz, R.; Torres-Durán, P. V. and Juárez-Oropeza, M. A. (2010): Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids Health Dis.*, 31:9:35.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604):730-732.

Prasad R C, B Herzog, B Boone, L Sims, M Waltner-Law.(2005). An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* 96 295–301.

Ramirez-cervante b, embree jw, hine ch, nelson kw, varner mo, putnam rd. Health assessment of employers with different body burden of lead. *J med occup*. 1978; 20(8): 610–617.

Reddy AC, Lokesh BR. 1994. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann nutr metab* 38:349–358.

Rendón-Ramírez, A.; Cerbón-Solórzano, J.; Maldonado-Vega, M.; Quintana-Escorza, M. A. and Calderón-Salinas, J. V. (2007): Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol. In Vitro*, 21:1121–6.

Reymann, KG and Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52: 24–40.

Rodrigues AL, Rocha JB, Mello CF, Souza DO. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol* 1996;79:150–6.

Ronis MJ, Badger TM, Shema SJ, Roberson PK, Templar L, Ringer D, Thomas PE (1998) Endocrine mechanisms underlying the growth effects of developmental lead exposure in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health* 54: 101-120.

Roux D. (2008). conseil en aromatherapie edition .p ; 13,14

Saad saka¹, ahlem bahi², wassila aouacheri² : l'effet du stress oxydant induit par l'acetate de plomb sur le systeme enzymatique du glutathion chez les rats , societe française de toxicologie analytique 2011.

Said Mahmoud Mohamed (2011) The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney *Fundamental & Clinical Pharmacology* 25 :708–716

Sallmen m, anttila a, lindbohm ml, kyyronen p, taskinen h, hemminki k. Time to pregnancy among women occupationally exposed to lead. *J occup environ med.* 1995; 37 (8): 931-934.

Sandhir r, gill kd. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol trace elem res* 1995; 48: 91-7.

Sarah Annie Guénette, thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire ; Département de biomédecine vétérinaire ; Faculté de médecine vétérinaire 2008.

Shalan, m.g., m.s. Mostafa, m.m. Hassouna, s.e. Hassab el – nabi and a. El – rafaie, 2005. A melioration of lead toxicity on rat liver with vitamin c and silymarin supplements. *Toxicology*, 206: 1-25.

Silbergeld e.k.(1991) - lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *environ health perspect*, 91, 63-70.

Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., & Lewbart, G.A. (2001) Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62, 337-342.

Smith DM, Mielke HW, Heneghan JB., 2008. Subchronic lead feeding study in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* [Epub ahead of print].

Soeiro ac, gouvêa ts, moreira eg.(2007). Behavioral effects induced by Subchronic exposure to pb and their reversion are concentration and gender dependent. Hum exp toxicol 26(9):733-9.

Sokol rz, madding ce, swerdloff rs. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. Biology of reproduction, 1985 ; 33 : 722-728.

Song B, Han CC, Sun X, Peng L, Niu YJ (2006) Effects of prenatal exposure to low level lead on learning and memory of rats' offspring. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi 24(7):399-402.

Souleymane traore 2007 ; faculte de medecine de pharmacie et d'odontostomatologie (fmpos) Bamako .p 27.

Srivastava KC (1993) Antiplatelet principles from a food spice clove (*Syzygium aromaticum* L.). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 48(5): 363-72

Staessen j.a., roels h., lauwerys r.r. And amery a.(1995) - low-level lead exposure and blood pressure. j hum hypertens, 9, 5, 303-328.

Suradkar, S. G.; Vihol, P. D.; Patel, J. H. Ghodasara, D.J.. Joshi, B.P and Prajapati, K.S. (2010):Pathomorphological changes in tissues of Wistar rats by exposure of Lead acetate. Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary sciences and A.H., Anand Agricultural University, Anand-Veterinary World, 3(2): 82-84.

Tchamdja K.M, (1995), étude de performance d'un extracteur artisanal pour la production d'essence de citronnelle .mémoire d'ingénieur des travaux biologiques, ESTBBA, UB, 95p.

Teisseire P.J. (1991), Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France.480p.

Thylambal r, saroja pm. Therapeutic efficacy of lipoic acid in combination with dimercaptosuccinic acid against lead-induced renal tubular defects and on isolated brush-border enzyme activities. Chem biol. 2004; 147: 259–271.

Verheij EWM, Snijders CHA. *Syzygium aromaticum*(L.)Merrill & PerryIn in Plant Resources of South-East Asia No. 13: Spices. In: deGuzman CC, Siemonsma JS, editors. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publisher; 1999. p. 211–8.

Wepener, V., VanVuren, J.H.J., DuPreez, H.H., 1992. Effect of manganese and iron at aneutral and acidic pH on the haematology of the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49, 613–619.

Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH. 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett* 225:93-96.

Wu t.n., yang k.c., wang c.m., lai j.s., ko k.n., chang p.y. And liou s.h.(1996) - lead poisoning caused by contaminated cordyceps, a chinese herbal medicine : two case reports.*sci total environ*, 182, 1-3, 193-195.

Yuzo Kato, Shoichiro Takimoto, and Hideaki Ogura : Mechanism of Induction of Hypercalcemia and Hyperphosphatemia by Lead Acetate in the Rat *Calcif. Tiss. Res.* 24, 41-46 (1977)

Zelikoff jt, li jh, hartwig a, wang xw, costa m, rossman tg (1988).toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* , 9: 1727-1732.

Zhang, XY, Liu AP, Ruan DY, Liu J (2005) Effect of developmental lead exposure on the expression of specific NMDA receptor subunit mRNAs in the hippocampus of neonatalrats by digoxigenin-labeled in situ hybridization histochemistry. *Neurotoxicol Teratol* 24 : 149–160.

Après une période de nage active les rats s'immobilisent flottant à la surface de l'eau et cette immobilité pourrait, exprimer un état de désespoir comportemental