



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université De Saida– Dr. Moulay Tahar

Faculté Des Sciences, Département De Biologie

Laboratoire De Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation

Biologique Des Plantes

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat 3^{ème} Cycle

Spécialité : Biochimie Et Toxicologie Expérimentale

Filière : Sciences biologiques

Présentée par : M^r BRAHMI Mostapha

Intitulé

Evaluation des Effets prophylactique de l'administration d'un extrait de *Mentha Spicata* (menthe verte) chez les rats wistar Co-exposés au plomb et manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale.

Thèse soutenue devant le jury proposé composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	KAHLOULA Khaled	Prof.	Université de Saida - Dr. Moulay Tahar	Président
02	BOUFADI Yasmina	MCA	Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem	Examinatrice
03	OUABED Asmahane	MCA	Université Ibn Khaldoun - Tiaret	Examinatrice
04	HACHEM Kadda	MCA	Université de Saida - Dr. Moulay Tahar	Examineur
05	ADLI Djallal Eddine H	MCA	Université de Saida - Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
06	SLIMANI Miloud	Prof	Université de Saida - Dr. Moulay Tahar	Co-rapporteur

Année Universitaire 2019-2020



*A ma très chère maman qui est partie aussi vite,
Le 23 janvier 2017*

Remerciement

Je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de mes études et à la réussite de ce travail.

Madame et Messieurs les membres du Jury :

*Monsieur le professeur **KAHLOULA Khaled**, qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Monsieur le professeur **SLIMANI Miloud**, pour avoir d'être mon Co-encadreur*

*Monsieur le Docteur **HACHEM Kadda** pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.*

*Je remercie sincèrement Madame le Docteur **BOUFADI Yasmina**, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je tiens également à lui montrer toute ma reconnaissance pour avoir réalisé les dosages qualitative et quantitative de mon extrait.*

*Je remercie également Madame le Docteur **OUABED Asmahane**, d'avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse.*

*Au Docteur **ADLI Djallal Eddine Houari***

Je ne pourrais jamais retranscrire tout le respect, l'estime et la reconnaissance que j'ai envers lui. Ces quatre années passées à ses côtés furent extrêmement enrichissantes d'un point de vue scientifique mais également humain. En effet le Docteur ADLI Djallal Eddine Houari m'a transmis un savoir scientifique, mais au travers de son encadrement j'ai énormément appris sur moi-même. Même si je n'ai pas amélioré tous mes points faibles, j'ai eu la possibilité auprès de lui de toujours m'améliorer et d'avancer.

Je voudrais sincèrement remercier le Docteur ADLI Djallal Eddine Houari, pour la grande qualité de son encadrement, son implication, sa générosité et sa disponibilité de tous les jours. Il n'a jamais compté son temps, sa porte était toujours ouverte pour des discussions toujours passionnantes. Il m'a également donné la possibilité de participer à de nombreux congrès. Je suis extrêmement fier d'avoir été encadré par le Dr ADLI Djallal et extrêmement reconnaissant de tout ce qu'il a pu m'enseigner.

Un énorme merci.

Résumé :

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet de l'huile essentielle de la plante (*Mentha Spicata*) administrée par la voie intra péritonéale à une dose de 0.1 ml HEM / Kg durant une période de 21 jours chez des rats Co-exposés par le plomb et le manganèse durant la période de gestation et lactation sur l'impact de la Co-exposition chronique à l'acétate de plomb (0.2%) et chlorure du manganèse (4.79 mg Mn/l) selon différentes approches expérimentales (neurocomportementales ,biochimiques et histologique). Ainsi que testé l'efficacité de l'huile essentielle de la menthe verte, (*Mentha spicata*), à rétablir ou non ces effets néfastes en traitant les rats préalablement Co-exposés aux Pb-Mn par une dose journalière d'injection intra péritonéale de 0.1 ml HEM/kg durant une période de 21 jours.

En effet, l'approche neurocomportementale par l'utilisation de différentes techniques relatives aux tests de comportements plus précisément ceux de la dépression (froced swimming test), de l'anxiété (labyrinthe de croix surélevé) et de l'Open field, dévoilent clairement que la Co-exposition aux Pb-Mn provoquent un état dépressif et anxiété ainsi qu'une hypoactivité locomotrice chez les jeunes rats issues des femelles Co-exposés pendant la période de développement.

De plus, la Co-exposition chronique aux plomb et manganèse a permis d'enregistrer un effet anorexigène traduit par une réduction importante dans le poids corporel, et dans les poids relatifs des différents organes étudiés (Cerveau, foie et rein). Ainsi a provoqué une variation des paramètres biochimiques notamment les biomarqueurs hépatiques et rénaux.

D'autre part, Le dosage du plomb dans le sang a montré une plombémie significativement élevée chez les rats Co-exposé aux Pb-Mn comparé à ceux des témoins. Dans le même contexte le dosage du manganèse a montré une augmentation significative du taux de manganèse dans le sang chez les rats intoxiqués aux Pb-Mn par rapport aux rats témoins.

Cependant, L'analyse du statut oxydatif dans le cerveau, foie, rein et au niveau érythrocytaire montre une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydants (SOD,GPx et CAT) chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn par rapports aux rats témoins. En effet, l'étude histologique entreprise a montré des altérations au niveau hépatique et rénal.

En revanche, l'administration de l'huile essentielle de *Mentha Spicata* à une dose de 0,1 ml/kg pendant une durée de 3 semaines à des rats préalablement Co-exposés aux plomb et manganèse, a permis d'observer un regain de poids corporel et le poids des organes (Cerveau, foie et rein). De plus, ces résultats montrent bien que l'huile essentielle de la plante permet de rétablir le comportement des rats. Les résultats des dosages biochimiques rénaux (urée,

créatinine) et hépatique (TGO, TGP, PAL, albumine, cholestérol totale et triglycéride) montrent une régulation des valeurs suite à l'administration de HEM comparativement à ceux des rats Co-exposés aux Pb-Mn. Par ailleurs, l'analyse du statut antioxydant dans le cerveau, foie, rein et érythrocytaire indique que HEM a rétabli l'activité des différentes enzymes antioxydants (SOD, CAT et GPx) chez les rats Co-exposés et traités par HEM. De même l'étude histologique entreprise a illustré une nette amélioration de l'architecture tissulaire hépatique et rénal chez les rats intoxiqué et traité par l'huile ce que justifie le potentiel remédiateur la grande importance de la *Mentha spicata* dans la médecine traditionnelle et ces vertus thérapeutiques.

Mots clés : Cerveau – Foie- Manganèse- *Mentha Spicata* -Plomb - Rein-Stress Oxydant

Abstract:

Our work focused on evaluating the effect of the essential oil of the plant (*Mentha Spicata*) administered intraperitoneally at a dose of 0.1 ml HEM / Kg for a period of 21 days in rats co-exposed to lead and manganese during gestation and lactation on the impact of chronic co-exposure to lead acetate (0.2%) and manganese chloride (4.79 mg Mn/l) according to different experimental approaches (neurobehavioural, biochemical and histological). As well as tested the efficacy of the essential oil of spearmint, (*Mentha spicata*), to restore or not these adverse effects by treating rats previously Co-exposed to Pb-Mn with a daily intraperitoneal injection dose of 0.1 ml HEM/kg for a period of 21 days.

Indeed, the neurobehavioural approach by using different techniques related to behavioural tests, more specifically those of depression (forced swimming test), anxiety (raised cross labyrinth) and Open field, clearly reveal that Co-exposure to Pb-Mn causes depression and anxiety as well as locomotor hypoactivity in young rats from female Co-exposed during the development period.

In addition, chronic co-exposure to lead and manganese resulted in an anorectic effect that resulted in a significant reduction in body weight and in the relative weights of the different organs studied (brain, liver and kidney). This has caused a variation in biochemical parameters, particularly liver and kidney biomarkers.

On the other hand, the blood lead assay showed a significantly high blood lead level in rats Co-exposed to Pb-Mn compared to controls. In the same context, the manganese assay showed a significant increase in blood manganese levels in rats poisoned with Pb-Mn compared to control rats.

However, analysis of oxidative status in the brain, liver, kidney and erythrocyte shows a significant decrease in antioxidant enzyme activity (SOD, GPx and CAT) in rats co-exposed to Pb-Mn compared to control rats. Indeed, the histological study undertaken showed alterations in the liver and kidney.

On the other hand, the administration of *Mentha spicata* essential oil at a dose of 0.1 ml/kg for a period of 3 weeks to rats previously co-exposed to lead and manganese, has led to an increase in body weight and organ weight (brain, liver and kidney). Moreover, these results clearly show that the essential oil of the plant helps to restore the behavior of rats. The results of renal (urea, creatinine) and hepatic (GER, TGP, PAL, albumin, total cholesterol and triglyceride) biochemical assays show a regulation of values following administration of HEM compared to those of rats Co-exposed to Pb-Mn. In addition, analysis of antioxidant status in

the brain, liver, kidney and erythrocyte indicates that HEM has restored the activity of the various antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) in rats co-exposed and treated with HEM. Similarly, the histological study undertaken illustrated a clear improvement in the hepatic and renal tissue architecture in rats intoxicated and treated with oil, which is justified by the great importance of *Mentha spicata* in traditional medicine and its therapeutic properties.

Keywords: Brain – Liver - Manganese - *Mentha spicata* - Lead - Kidney- Oxidative Stress

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Propriétés physico-chimiques du plomb et ses dérivées.....	05
Tableau 02 : Propriétés physico-chimique du manganèse	16
Tableau 03 : Étendues des concentrations moyennes de Mn présentes dans différents types d'aliments	19
Tableau 04 : Classification botanique de <i>Mentha spicata</i> L.....	41
Tableau 05 : La composition chimique de l'HE de <i>Mentha spicata</i> L.....	42
Tableau 06 : Composition du régime d'entretien (régime standard).....	50
Tableau 7 : Répartition des groups.....	51
Tableau 08 : Concentration en % et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	63
Tableau 09 : L'évaluation de la croissance corporelle chez les différents sous-groupes de rats.....	64
Tableau 10 : Effet du plomb et manganèse sur les poids relatifs des Organes.....	68
Tableau 11 : Taux de la plombémie et de manganèse chez les différents sous-groupes de rats.....	68
Tableau 12 : Effet de l'huile essentielle de la plante <i>M. Spicata</i> sur les biomarqueurs rénaux chez des rats Co-exposés par le Pb-Mn comparés aux rats témoins.....	69
Tableau 13 : Effet de l'huile essentielle de la plante <i>M.spicata</i> sur les biomarqueurs de la fonction hépatique chez des rats intoxiqués par le Pb-Mn comparés aux rats témoins.....	70
Tableau 14 : Effets de l'huile essentiel de <i>M.spicata</i> sur le bilan lipidique et protéique chez des rats intoxiqués par le Pb-Mn comparés aux rats témoins....	70
Tableau 15 : Activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires (SOD, CAT, GPx) chez des rats intoxiqués et intoxiqués traités par HEM, témoins et traités.	71
Tableau 16 : Activité des enzymes antioxydants hépatique (SOD, GPx, CAT) chez des rats Co-exposés et Co-exposés traités par HEM, témoins et traités....	73
Tableau 17 : Activité des enzymes antioxydants rénaux (SOD, GPx, CAT) chez des rats Co-exposés et Co-exposés traités par HEM, témoins et traités.....	74

Liste des Figures

Figure 01 : Effets du plomb inorganique sur les enfants et les adultes.....	08
Figure 02 : action du plomb sur la synthèse de l'hème.....	09
Figure 03 : région de la perte de volume s'affichent en couleur sur un modèle d'un cerveau normal.....	10
Figure 04 : Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan.....	29
Figure 05 : Glande simple d'origan entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800×).....	29
Figure 06 : montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	31
Figure 07 : montage d'hydrodistillation	32
Figure 08 : montage d'hydro diffusion.....	32
Figure 09 : schéma descriptif du dispositif d'extraction par CO2 supercritique.....	33
Figure 10 : montage d'extraction assistée par micro-onde.....	33
Figure 11 : Aire de répartitions de la menthe par le monde.....	40
Figure 12 :A Fleur de <i>Mentha spicata</i>	41
Figure 12 :B . Feuilles de <i>Mentha spicata</i>	41
Figure 13 : Molécule de carvone.....	43
Figure14A : <i>Mentha sp</i> à l'état frais	47
Figure1B : <i>Mentha sp</i> sèche.....	47
Figure 14 : C : Le broyat.....	47
Figure 15 : A- Hydrodistillation.....	48
Figure15 B -Ampoule à décantier.....	48
Figure16 : l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> obtenue après l'extraction.....	48
Figure17 :Chronologie du protocole expérimental.....	51
Figure18 : Le test de la nage forcée.....	53
Figure19 : Le test de labyrinthe en croix surélevé (EPM).....	54
Figure20 : Le test d'Open Field.....	55
Figure21 : Le temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins (T), intoxiqués au (Pb-Mn), intoxiqués et traités à l'HEM.....	64
Figure22 : Le temps de séjour dans les Bras ouverts durant le test du labyrinthe en croix surélevée des jeunes rats témoins (T), intoxiqués au (Pb-Mn), intoxiqués et traités à l'HEM.....	65
Figure23 : La comparaison des différents paramètres du test d'Open-field entre les	

jeunes rats témoins, intoxiqués au Pb-Mn, intoxiqués et traités à l'HEM.....	67
Figure24 : Taux du glucose chez les différents sous-groupes de rats.....	69
Figure25 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la SOD cérébral.....	71
Figure26 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la CAT cérébral.....	72
Figure27 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la GPx cérébral.....	73
Figure28 : La microscopie optique de tissu hépatique coloré à l'hématoxyline et à l'éosine.....	75
Figure29 : La microscopie optique de tissu rénal coloré à l'hématoxyline et à l'éosine.....	76

Liste des abréviations

ANOVA : Analysis of variance.

BF : Bras fermé

°C : Degré Celsius.

CAT : Catalase.

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

DPPH : Diphenylpicrylhydrazyl.

DTNB : Acide 5.5'- DiThioNitroBenzoïque.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

FAD: FlavinAdeninDinucleotid.

GPx : Glutathion Peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène.

HE : Huile Essentielle de *S.aromaticum*.

HEM :Huile Essentielle de *Mentha spicata*.

IC 50 : Concentration Inhibitrice à 50%.

IP :Intrapéritonéale.

Kg : Kilogramme.

M : Molaire (mol/L).MDA : Malondialdehyde.

Mn : Manganèse

μL : microlitre.

mm : Millimètre.

Mn : Manganèse

ml : Millilitre

nm : nanomètre.

NADH,H⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide réduit.

NADHP,H⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide Phosphate réduit.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

O₂: Oxygène Singulet.

O₂⁻ : Anion superoxyde.

OH· : Radical hydroxyle.

% : Pourcent.

P : Pression.

PAL : phosphatase alcaline

Pb : Plomb.

pH : potentiel hydrométrique.

SEM : erreur standard moyenne

SOD : SuperOxydeDismutase.

M.spicata : *Mentha spicata*

T°: Température.

TIM : temps d'immobilité.

tr/min : tour/minute

UV : Ultraviolet

V : Volume.

Liste des communications

PUBLICATIONS

- **BRAHMI Mostapha**, Adli Djallal E.H., Slimani Miloud, Arabi Wafaa, Taibi Narimane, Kahloula Khaled.(2019). Evaluation of the therapeutic effects of *Mentha Spicata* essential oil at the liver level in developing wistar rat co-exposed to lead and manganese. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*
- **BRAHMI Mostapha**, Adli Djallal E.H., Slimani Miloud, Arabi Wafaa, Taibi Narimane, Kahloula Khaled.(2019). Evaluation of anti-oxidative effects of *Mentha Spicata* essential oils in rats at the period of gestation and lactation co-exposed to lead and manganese. *South Asian Journal of Experimental Biology (SAJEB)*
- **Nephro beneficial effects of *Mentha spicata* Essential Oil on Developing Wistar Rats Co-exposed to Lead and Manganese.** *En Cours*

COMMUNICATIONS

Liste des travaux exposés lors de colloques nationaux et internationaux présentés par la personne soulignée.

Communications internationales :

BRAHMI M., Adli D.E.H., Kahloula k., Slimani M., Arabi W., Taibi N « Impact des huiles essentielle de la Menthe verte « *Mentha spicata* » chez les rats soumis à un stress par le plomb et manganèse. » VIème Congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources organisé par l'AT-BVBR du **20 au 23 Mars 2018** à Tabarka – Tunisie.

BRAHMI M., Adli D.E.H., Slimani M., Kahloula K. « Evaluation Des Effets Thérapeutiques De L'Huile Essentielle de *Mentha spicata* chez les Rats Wistar co-Exposes au Pb-Mn. Etude Biochimique et Hématologique. » Séminaire International sur la valorisation des ressources naturelles dans les zones semi-arides : potentialités et perspectives d'amélioration (VRNZSA_2016) M'sila. **22-23 Novembre 2016**

BRAHMI M., Adli D.E.H., Slimani M., Kahloula K « Effets Prophylactique de l'Administration d'un Extrait de *Mentha Spicata* chez les Rats Wistar co-Exposes au Plomb et au Manganèse. Etude Biochimique et Neurocomportemental » Fifth International Symposium Medicinal and Aromatic Plants (SIPAM 2016) in Zarzis- Tunisia. **16-18 December 2016**

Taibi N , Kahloula K , Adli D.E H, Slimani M, **BRAHMI M** et Arabi W. <<Evaluation des effets thérapeutiques des huiles essentielles du *Juniperus oxycedrus*

au niveau hépatique chez des jeunes rats wistar préalablement intoxiqués par le manganèse. Vth International Congress of Physiology and Environmental Biomonitoring **18-21 Décembre 2016** Hamammat Tunisia

Arabi W, Kahloula K , Adli D.E.H, Slimani M, Taibi N et **BRAHMI M**. <<Impact des huiles essentielles de clou de girofle « *Syzygium aromaticum* » chez les rats soumis à un stress au nickel. Vth International Congress of Physiology and Environmental Biomonitoring **18-21 Décembre 2016** Hamammat Tunisia

ARABI W, KAHLOULA K, ADLI.D.E.H, TAIBI N, **BRAHMI M**, SLIMANI M « Etude comparative de la composition des huiles essentielles des deux plantes de la région de Saida-Algérie : l'anis vert et fenouil » VIème Congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources organisé par l'AT-BVBR du **20 au 23 Mars 2018** à Tabarka – Tunisie.

Communication nationale :

BRAHMI M., Adli D.E.H., Kahloula k., Slimani M., Arabi W., Taibi N « Effets anxiolytique et antidépresseur de l'huile essentielle de *Mentha Spicata* contre la Co-exposition chronique au plomb et manganèse chez des rats wistar » Journée d'étude « **Les plantes au service de l'homme** » le 26 Avril 2018 Saida. Communication Orale.

BRAHMI M., Adli D.E.H., Kahloula k., Slimani M., Arabi W., Taibi N « Impact of *Mentha Spicata* essential oil in rats under stress with lead and manganèse » 4ème journée scientifique des géosciences de l'environnement « JSGE4, Saida le 26 avril 2018 »

BRAHMI M., ADLI.D.E.H, KAHLOULA K., SLIMANI M. : « Effets Prophylactique de l'Administration d'un Extrait de *Juniperus oxycedrus* chez les Rats Wistar co-Exposes au Pb-Mn. Etude Biochimique et Neurocomportemental » 6 ème journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie-Mostaganem, 27 et 28 Avril 2016

BRAHMI M., Slimani M., Adli D.E.H., Kahloula k., Arabi W., Taibi N « Effets Anxiolytique de L'huile Essentielle de *Mentha spicata* Contre la Co-exposition Chronique Au Pb-Mn Durant le Developpement Chez Des Rats Wistar. » Premier Séminaire National En Biologie « Biodiversité et Gestion des Bio-Ressources en Zones Arides et Semi Arides » Naama. **10-11 Avril 2017**

Arabi w., Kahloula K., Adli D.E.H., Taibi N., **BRAHMI M.**, Slimani. M « Etude neurocomportementale de l'effet curatif de l'huile essentielle de Pimpinella Anisum

(anis vert) chez les rats wistar en développement intoxiqués au mercure » Journée d'étude « **Les plantes au service de l'homme** » le 26 Avril 2018 Saïda.

Taibi N., Kahloula K., Adli D.E.H., Arabi w., **BRAHMI M.**, Slimani. M « L'évaluation de l'effet thérapeutique d'anis vert (*Pimpinella anisum*) suite à une exposition sub-chronique à l'imidaclopride. Etude neurocomportementale » Journée d'étude « **Les plantes au service de l'homme** » le 26 Avril 2018 Saïda.

TAIBI N., Kahloula K., Arabi W., **BRAHMI M.**, Slimani M., Adli D.E.H. ASPECT QUALITATIF ET QUANTITATIF DE L'HUILES ESSENTIELLE ET L'EXTRAIT DE « *PIMPINELLA ANISIUM* » (ANIS VERT) SELON LES TECHNIQUES : L'HYDRODISTILLATION ET LE SOXLET. Premier Séminaire National En Biologie «Biodiversité et Gestion des Bio-Ressources en Zones Arides et Semi Arides » Naama.**10-11 Avril 2017**

ARABI W., Kahloula K., Taibi N., **BRAHMI M.**, Slimani M., Adli D.E.H. Impact Des Methodes D'Extraction Sur La Composition Chimique Et La Teneur En Molécules Bioactives. Premier Séminaire National En Biologie «Biodiversité et Gestion des Bio-Ressources en Zones Arides et Semi Arides » Naama.**10-11 Avril 2017**

ARABI W., Kahloula K., Adli D.E.H., Slimani M., Taibi N., **BRAHMI M** « Etude de l'Effet Antifongique, Antibactérien et Antitoxinogénique des Huilles Essentielles de la plante, *Pimpinella anisum* collectée de la région de saïda.» *VII* émes journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie-Mostaganem. **26-27 Avril 2017**

ARABI W., Kahloula K., Adli D.E.H., Taibi N., **BRAHMI M.**, Slimani M « Etude neurocomportementale des jeunes rats wistar intoxiqués par le mercure» 2^{ème} SNBS-**2017**. Sidi bel abbés

Table des matières

Remerciements	
Résumé	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Liste des communications	
Introduction	
1. <u>Plomb</u>	5
1.1 Généralité	5
1.2 Les propriétés physico-chimiques du plomb.....	5
1.3 Les sources d'exposition	5
1.4 Toxicocinétique du plomb.....	7
1.5 principaux effets toxiques du plomb	7
1.5.1 Intoxication aiguë :	7
1.5.2 Intoxication chronique :	8
1.5.2.1 Effets sur les cellules sanguines :	8
1.5.2.2 Effets Enzymatique :	9
1.5.2.3 Effets sur le système nerveux centrale (SNC):.....	10
1.5.2.4 Effets sur le système nerveux périphérique :	11
1.5.2.5 Effets sur les Os :	11
1.5.2.6 Effets sur la reproduction :	12
1.5.2.7 Effets digestif :	12
1.5.2.8 Effets sur le système rénal :	12
1.5.2.9 Effets sur le système hépatique :	13
1.5.2.10 Effets cardiovasculaires:	14
1.5.2.11 Effets respiratoires :	14
1.5.2.12 Effets cancérogènes :	14

2. Manganèse	16
2.1 Généralité	16
2.2 Propriétés physico-chimique :	16
2.3 Utilisation :	17
2.4 Les sources d'exposition du (Mn) :	17
2.4.1 Sol :	17
2.4.2 L'air :	17
2.4.3 L'eau :	18
2.4.4 Dans L'alimentation :	18
2.4.4 Autres sources :	19
2.5 Toxicocinétique du manganèse :	20
2.5.1 Absorption du manganèse :	20
2.5.1.1 Absorption pulmonaire :	20
2.5.1.2 Absorption digestive	20
2.5.1.3 Autres voies d'absorption.....	20
2.5.2 Distribution :	21
2.5.3 Excrétion:	21
2.6 Principaux effets toxiques du manganèse sur la santé:	21
2.6.1 Toxicité aiguë :	21
2.6.2 Toxicité chronique.....	22
2.6.2.1 Effets sur le système nerveux :	22
A. Effets neuropathologiques :	22
B. Effets sur le comportement :	23
2.6.2.2 Effets sur le système endocrinien :	24
2.6.2.3 Effets sur le système respiratoires:	24
2.6.2.4 Effets sur la reproduction :	24
2.6.2.5 Effets hématologique :	25

2.6.2.6 Effets rénaux :	25
2.6.2.7 Effets hépatique :	25
2.6.2.8 Effets immunologiques :	26
2.6.2.9 Effets cancérogènes:	26
3. <u>Les huiles essentielles</u>	28
3.1 Définition	28
3.2 Aromathérapie	28
3.3 Historique	29
3.4 Localisation et caractères	29
3.4.1 Localisation des HE dans les tissus de la plante	29
3.4.2 Caractères chimiques de HE	30
3.4.3 Caractéristiques et propriétés physique des huiles essentielles	30
3.5 Methodes d'extraction des HE	31
3.5.1 Entrainement à la vapeur	31
3.5.2 Hydro-distillation	31
3.5.3 Hydro-diffusion	32
3.5.4 Extraction par Co ₂ supercritique	32
3.5.5 Extraction assistée par micro-ondes	33
3.5.6 Extraction à froid	33
3.5.7 Extraction par les Ultrasons	34
3.6 Conditions de conservation et de stockage des HE	34
3.7 Analyse des huiles essentielles et critères de qualité	35
3.7.1 La chromatographie en phase gazeuse	35
3.7.2 La chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectroscopie de masse (CPG-sm)	35
3.8 Applications des huiles essentielles	36
3.8.1 En agroalimentaires	36

3.8.2 En cosmétique	36
3.8.3 En médecine	37
3.9 Voies d'utilisation des huiles essentielles	37
3.9.1 Voie cutanée	37
3.9.2 Diffusion atmosphérique	37
3.9.3 Inhalation sèche et humide	37
3.9.4 Voie orale diluée	37
3.10 Toxicité des huiles essentielles	37
4. <u>La Menthe (<i>Mentha Spicata</i>)</u>.....	38
4.1 Généralités.....	38
4.2 Origine.....	39
4.3 Description de la plante.....	40
4.4 Classification botanique	41
4.5 Caractéristiques et composition chimique de l'huile essentielle de la Menthe.....	42
4.6 Principes actifs de la Menthe	43
4.7 Utilisations de la Menthe verte.....	43
4.7.1 Cuisine.....	43
4.7.2 Thérapie.....	43
4.7.3 Cosmétique.....	44
4.8 Interets de <i>Mentha spicata</i> en thérapeutique.....	44
4.8.1 Activités antioxydantes	44
4.8.2 Activités anti-inflammatoires.....	44
4.8.3 Activités cytotoxiques et anti-cancéreses.....	45
4.8.4 Activités antivirales.....	45
4.8.5 Activités antibactériennes et antifongiques.....	45
4.9 Toxicités de la menthe.....	45

5. <u>Matériel et Methode:</u>	47
5.1. Matériel végétale	47
5.1.1 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	47
5.1.2 Conservation de l'HE obtenue	48
5.1.3 Détermination du rendement d'extraction	48
5.1.4 Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG /SM.....	49
5.1.5 Préparation de la solution injectable à base de l'HE.....	49
5.2. L'origine des animaux d'expérimentation.....	49
5.2.1 Répartition des groupes.....	50
5.2.2 La répartition chronologique des protocoles expérimentaux.....	51
5.2.3 Observations macroscopiques.....	52
5.2.4 Evolution du poids corporel et poids des organes	52
5.3. Evaluation comportementale	52
5.3.1 L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test).....	52
5.3.2 Test labyrinthe en croix serulevée	53
5.3.3 Test d'Open Field	54
5.4. Sacrifice des rats	55
5.5. Dosages biochimiques	55
5.5.1 Détermination de la plombémie et le taux de manganèse dans le sang	55
5.5.2 Dosage de la glycémie	55
5.5.3 Evaluation des marqueurs du fonctionnement rénal	56
A. Dosage de l'urémie	56
B. Dosage de la créatinine	56
5.5.4 Evaluation des marqueurs du fonctionnement hépatique	56
A. Dosage des transaminases (TGO-TGP)	56
B. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	56

5.5.5 Evaluation des paramètres lipidiques et proteiques	57
A. Dosage des triglycérides	57
B. Dosage de Cholestérol	57
C. Dosage de l'albumine	57
5.6. Evaluation du statut antioxydant	57
5.6.1 Evaluation du statut antioxydant érythrocytaires.....	57
A. Préparation des érythrocytes	57
5.6.2 Evaluation du statut antioxydant tissulaires (Cerveau,Foie, Rein)	58
B. Préparation des tissus cérébrale, hépatique et rénal	58
• Superoxyde dismutase (SOD).....	58
• Catalase (CAT)	58
• Glutathion peroxydase (GPx)	58
5.7. Etude histologique des organes (Foie, Rein).....	59
5.7.1 Fixation	59
5.7.2 Inclusion.....	59
5.7.3 Coupe,étalement des coupes et coloration	60
5.8. Expression et analyse statistique des résultats	61
6. <u>Résultat et Interprétation</u>.....	63
6.1. Le rendement en l'huile essentielle.....	63
6.2. Principaux composés de l'huile essentielle détectés CPG/SM.....	63
6.3. L'effets du Pb-Mn et HEM sur la croissance corporelle	63
6.4. Tests neurocomportementaux.....	64
6.4.1 Effets du Pb-Mn et HEM sur les performances dépressives mesurées par l'épreuve de la nage forcé (FST)	64
6.4.2 Effets du Pb-Mn et HEM sur les niveaux d'anxiété mesurés dans le tests du labyrinthe en croix surélevée	65
6.4.3 Effets du Pb-Mn et HEM sur les niveaux de l'activités locomotrice mesurés dans l'Open field (OFT).....	66

6.5. Effets du Pb-Mn et HEM sur les poids des organes	67
6.6. Dosages des parametres biochimiques	68
6.6.1 Dosage de la plombémie et du taux de manganèse sanguin	68
6.6.2 Teneur plasmatique en glucose	68
6.6.3 Effets du Pb-Mn et HEM sur les biomarqueurs de la fonction rénal	69
6.6.4 Effets du Pb-Mn et HEM sur les biomarqueurs de la fonction hépatique	70
6.6.5 Effets du Pb-Mn et HEM sur le bilan lipidique et proteique	71
6.7. Evaluation du statut antioxydant	71
6.7.1 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'activités enzymatique du statut oxydatif érythrocytaire	71
6.7.2 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'activités enzymatique du statut oxydatif au niveau du cerveau	71
6.7.3 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'activités enzymatique du statut oxydatif au niveau hépatique	73
6.7.4 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'activités enzymatique du statut oxydatif au niveau rénal	73
6.8. Impact du Pb-Mn et HEM sur l'architecture histologique des organes.....	74
6.8.1 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'architecture structurale du foie.....	74
6.8.2 Effets du Pb-Mn et HEM sur l'architecture structurale du rein.....	75
DISCUSSION	78
CONCLUSION	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	99
ANNEXE.....	127

INTRODUCTION

Introduction :

Les métaux lourds sont un groupe de produits chimiques environnementaux, qui sont universels et non biodégradables. De nombreuses études ont mis en évidence la toxicité des métaux individuels pour les systèmes vivants. (**Basile et al., 2012 ; Zhao et al., 2014**).

En effet, le plomb (Pb) est un métal lourd naturellement abondant dans la croûte terrestre. Il est considéré comme un polluant pour l'environnement et qui demeure un signifiant problème pour la santé publique (**Gidlow, 2004, Oulhote., 2012**). En effet, le plomb n'a aucun rôle biologique bénéfique détectable au contraire ces effets causent des dommages sur le système nerveux, la reproduction, le système rénal, hépatique, le flux sanguin, l'altération de la synthèse de l'hémoglobine, entre autres. Certains dérivés inorganiques du plomb sont également considérés comme cancérigènes probables pour l'homme (**Rania et al., 2014**).

De plus, le Manganèse (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 (**Tiziana et al., 2013**). Il participe à de nombreuses réactions enzymatiques telles que l'hydrolase, kinases, décarboxylases et transférases. De plus, il agit comme un cofacteur pour une série d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et des glucides (**Amany et al., 2015**). En effet, Les principales manifestations de sa toxicité chronique concernent le système nerveux central et se manifestent par des troubles neurologiques de type parkinsonien (**Alexia., 2012**). Mais la pathogénie de la toxicité du manganèse est aussi multifactorielle car le Mn s'accumule dans les tissus osseux, conduit à une anémie microcytaire hypo-chromique, et abaissant l'activité des enzymes antioxydants (**Stefanie., 2014**).

Ces deux métaux cohabitent dans des contextes professionnels, tels que l'exploitation minière, les populations vivant dans les zones à proximité de mines sont exposées à des niveaux plus élevés de ce mélange à travers l'eau, le sol et la contamination des aliments (**Diallo et al., 2009**). Étant donné que le Pb et Mn sont omniprésents dans la nature, la probabilité de la présence simultanée dans de nombreux autres paramètres environnementaux devraient être considérées (**Vanda et al., 2014**).

Par ailleurs, l'importance clinique des thérapeutiques à base de plantes (phytothérapie) a reçu une attention considérable ces derniers temps car elles présentent une riche source de médicaments parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives. (**Small et Catling, 2000**).

Produits comme métabolites secondaires par les plantes, les huiles essentielles interviennent dans plusieurs domaines, ils ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. **(Billerbeck, 2002 ; Ben saad et al.,2017).**

Dans le même contexte, depuis des décennies la menthe verte (*Mentha Spicata*) est utilisée pour ses vertus culinaires et médicinales. De plus, d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple un effet (antidépresseur, anxiolytique) **(Rabiei et al., 2016 ; Maleki et al., 2017)** anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique **(Francianne et al.,2016)**, hépatoprotecteur et anti-oxydants **(Ben saad et al.,2017)**, néphroprotecteur **(Naveed et al.,2014).**

A la lumière de ces données, notre étude vise sur la recherche de l'effet de l'huile essentielle de la plante *Mentha Spicata* chez des rats Co-exposés par le plomb et le manganèse durant la période de gestation et lactation. A ce titre, nous envisageons d'entreprendre une série d'expériences qui porteront sur :

- I. La première série d'expériences porte sur l'extraction, et la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de la plante par CPG /SM.
- II. La deuxième série, consiste à l'évaluation des effets toxiques de l'acétate de plomb à 0.2% et le chlorure de manganèse (MnCl₂) à 4,79mg/ml chez les rats wistar durant la période de gestation et lactation selon :
 - Une approche neurocomportementale qui consiste à évaluer à travers des tests de comportement, l'état de dépression, l'anxiété et de l'activité locomotrice.
 - Une approche biochimique, dans laquelle nous effectuerons les dosages de différents paramètres de fonctionnement des organes (cerveau, foie et reins). Ainsi le dosage enzymatique du statut oxydatif au niveau érythrocytaire et tissulaires
 - Une approche histologique des organes : Foie et Rein
- III. La troisième série d'expériences vise à tester l'effet de l'administration par voie intrapéritonéale de l'huile essentielle de *Mentha spicata* chez les rats Co-exposés aux plomb et manganèse.

PLOMB

1. Le Plomb :

1.1. Généralité :

Fait partie des Eléments en Traces Métalliques (ETM) non essentiels (**Miquel, 2001 ; Turkmen et al., 2005**), il peut être bio-amplifié dans les systèmes biologiques devenant un potentiel contaminant pour les différents maillons trophiques (**Amiard et al., 1987**). Dans l'environnement, le plomb est majoritairement présent dans le compartiment atmosphérique et provient des fonderies, des industries de la métallurgie, de la combustion du charbon, de l'incinération des déchets et des gaz d'échappement des véhicules. Le flux le plus important de plomb à l'océan provient de l'atmosphère (**Gagneux-Moreaux, 2006**). Le plomb apparaît être moins toxique à concentration molaire égale que le cuivre, par la formation de complexes avec les hydroxydes ou les silicates dans le milieu (**Stauber et Florence, 1989**)

1.2. Propriétés physico-chimiques du plomb :

Le plomb est un élément chimique classé dans les « métaux pauvres » : ayant un point de fusion bas (600,61 °K). Il appartient à la catégorie des métaux lourds car sa densité (ou masse volumique) est de 11,3 g.cm⁻³. Sa masse atomique est de 207,2 u (unité de masse atomique), son rayon atomique de 180 pm et son volume molaire de 18,26.10⁻⁶ m³.mol⁻¹. Il existe sous deux états d'oxydation : 2 et 4. Sept isotopes du Pb (202Pb, 204Pb, 205Pb, 206Pb, 207Pb, 208Pb, 210Pb) existent mais seulement quatre se retrouvent à l'état naturel : 204Pb (1,4 %), 206Pb (26,1 %), 207Pb (22,1 %), 208Pb (52,4 %). (**Judicaelle Brunet, 2008**). (**Tableau 01**)

Tableau 01 : Propriétés physico-chimiques du plomb (**Bonnard et al., 2006**)

Symbole	Nombre atomique	Poids atomique	Densité	Point de fusion	Point d'ébullition
Pb	82	207.2	11.34	327.43°C	1740°C

1.3. Les sources d'exposition :

Les quatre grandes sources de contamination au plomb qui conjuguent leurs effets sont les suivantes :

1.3.1. Alimentation

L'ingestion d'aliments contenant du plomb est une voie d'exposition au plomb :

- ✓ Les plantes contaminées par déposition de poussières de plomb ou par le sol

- ✓ Les produits d'origine animale : contaminés par concentration dans les tissus ou les liquides (surtout les rognons et le foie). **(INERIS, 2003)**
- ✓ Les produits industriels contaminés lors de la production ou de la conservation des denrées. **(Lynch et al, 2000)**

1.3.2. Eau :

Les concentrations de plomb dans les eaux de surface ou les eaux souterraines sont généralement faibles en raison d'une faible migration du plomb dans le sol et d'une absorption importante sur les sédiments. L'eau de boisson issue des réseaux de distribution d'eau potable, est chargée de ce métal lors de son séjour dans des canalisations en plomb (conduite ou soudures). L'eau de distribution peut également être une source d'exposition dans les régions où l'eau est acide. **(USFSA, 1998)**

1.3.3. Poussières :

L'inhalation de poussières fines émises dans l'atmosphère à partir de sources générant du plomb est une voie d'exposition au plomb. Les fumées de cigarettes contiennent également de très faibles quantités de plomb.

Le plomb déposé sur les sols demeurant dans les couches superficielles, le sol représente une source permanente d'envol de poussières légères, même dans l'habitat. Les poussières peuvent être transférées du lieu de travail au domicile par les chaussures, les vêtements, les cheveux et les mains sales des salariés du plomb et augmenter ainsi la plombémie de leurs familles. Elles peuvent être remises en suspension dans l'atmosphère par balayage au lieu d'un nettoyage humide et contaminer ainsi les surfaces et les aliments. **(INERIS 2003)**

1.3.4. Peintures :

Les peintures anciennes peuvent contenir de 5 à 40 % de plomb. L'ingestion d'écailles (ou poussières) de peintures déposées par exemple sur le sol en habitat ou en extérieur constitue une voie d'exposition au plomb, et particulièrement pour les enfants. Des travaux de rénovation (destruction ou ravalement d'immeubles anciens, ponçage de peintures dans un logement) mal conduits peuvent également constituer une source de contamination pour le voisinage. **(Jacobs et al, 2002)**

1.4. Toxicocinétique :

Le métabolisme du plomb est important à connaître pour mieux comprendre l'intoxication, notamment les différences observées entre enfants et adultes, ou chez la femme enceinte et le fœtus **(Jouan,2000)**

1.4.1. Absorption du plomb :

L'absorption est surtout respiratoire en milieu professionnel (rétention pulmonaire de (40 à 70%), digestive (= 10% du plomb ingère chez l'adulte mais 50% chez l'enfant ou l'absorption est favorisée / vitamine D, graisses et carence en calcium et en fer). Une résorption cutanée est possible pour les composés organiques du plomb **(Danel, 1997)**

1.4.2. La cinétique du plomb :

Distribution – Stockage : 90% véhicule par le globule rouge (sous forme liée non diffusible). Stockage : plus de 90% du pool de plomb dans l'os (de 10 à 20 ans) (relargage possible si décalcification, fractures, grossesse, ménopause), 5-10% dans les tissus mous. Passage transplacentaire (risque d'intoxication fœtale lorsque la mère est exposée) et hémato-encéphalique (important chez l'enfant). En général, l'élévation du taux de plomb dans le sang traduit une exposition récente au métal **(Chanel *et al.*, 1999)** Le passage plus important du métal à travers la barrière hémato-encéphalique chez l'enfant rend compte de la prédominance des manifestations encéphaliques dans le saturnisme de l'enfant **(Danel, 1997)**

1.4.3. Elimination du plomb :

L'élimination du plomb est essentiellement fécale chez le sujet non expose (Directement ou par voie biliaire). La voie urinaire (80%) est la principale voie d'excrétion du plomb absorbe mais elle est lente, temps de vie dans le sang environ 30 jours ; T. Vie dans les os 10 ans **(Danel, 1997)**.

1.5. Principaux effets toxiques du 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)**.

1.5.1. Intoxication aiguë :

L'intoxication aiguë au plomb se manifeste par des troubles digestifs essentiellement œsophagite et gastrite entraînant des vomissements, des douleurs épigastriques et abdominales mais aussi des diarrhées et selles noires, des troubles rénaux (oligurie et insuffisance tubulaire rénale). Les examens biologiques révèlent une

anémie hémolytique, une augmentation de la créatininémie et parfois une atteinte cytotolytique hépatique (INRS,2006)

1.5.2. 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. (Oulhote, 2012) (Figure 01).

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

Augmenté la fonction ; Diminué la fonction.

Figure 01 : Effets du plomb inorganique sur les enfants et les adultes (Oulhote, 2012)

1.5.2.1. Effets Sur les cellules sanguines :

L'inhibition enzymatique de l'acide amino-lévulinique déshydratase (ALAD) et de la ferrochélatase provoque une diminution de la synthèse de l'hème et L'accumulation des protoporphyrines dans les cellules sanguines (**figure 02**) On observe donc une anémie hypochrome. L'anémie observée est en fait liée à la fois à la perturbation de l'hématopoïèse et à l'hémolyse. (Léa,2007)

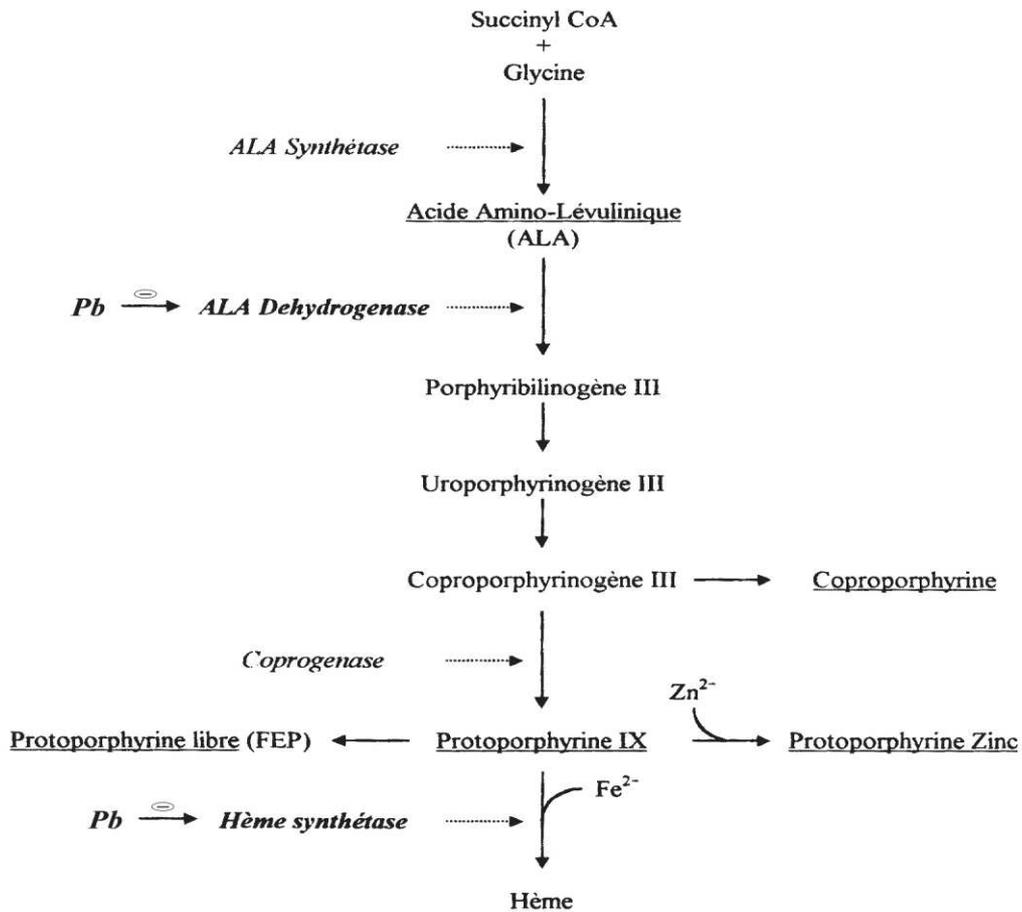


Figure 02 : action du plomb sur la synthèse de l'hème (d'après Duranel, 1999)

(-) : inhibition

L'intoxication par le plomb entraîne une diminution du nombre total de cellules blanches sanguines, surtout les polynucléaires et dans une moindre mesure les lymphocytes et les monocytes, plus marquée chez les mâles que les femelles, car les hormones gonadotrophiques interfèreraient avec l'action des agents immunosuppresseurs. (Léa, 2007)

1.5.2.2. 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).

1.5.2.3. 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). Cette neurotoxicité 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 atteintes asymptomatique fonction neurocomportementale 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 03). 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).

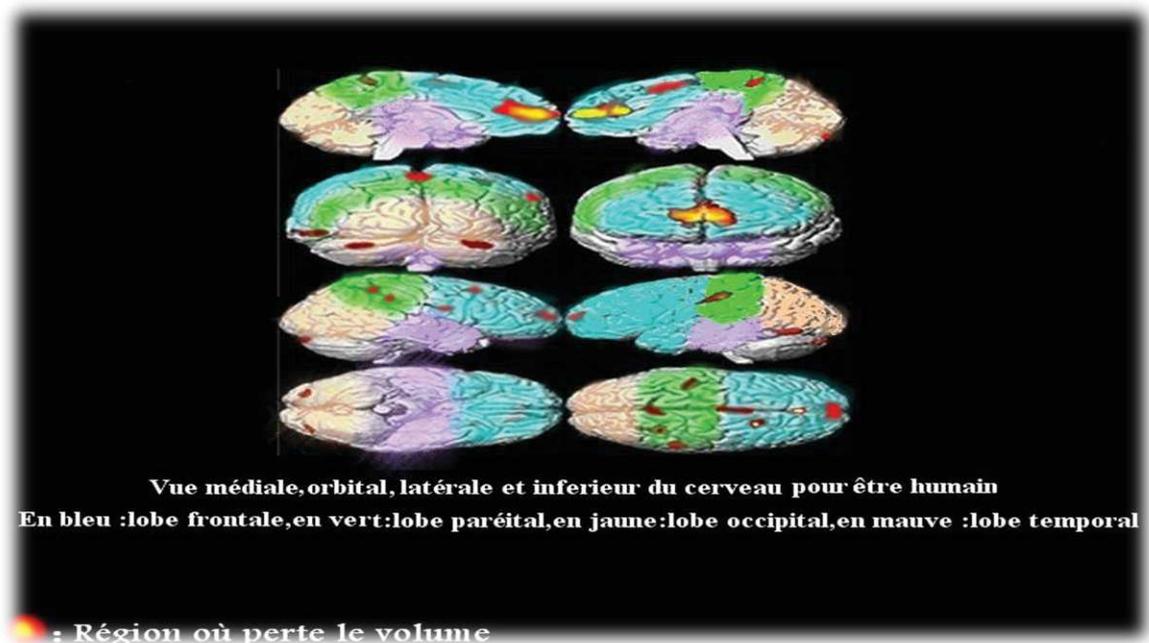


Figure 03 : région de la perte de volume s'affichent en couleur sur un modèle d'un cerveau normal (Cecil et al., 2008).

1.5.2.3.1. Changement dans 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**).

a. 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**).

b. 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**).

c. 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**).

1.5.2.4. 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 caractérisée par une baisse de la conduction nerveuse se traduit sur le plan histologique par un changement pathologique dans ces fibres comprenant démyélinisation segmentaire et dégénérescence des axones. (**Dart et al., 2004**).

1.5.2.5. Effets Sur les os

Le plomb s'accumule principalement dans les os où il exerce un effet toxique sur les ostéoblastes, les ostéoclastes et les chondrocytes. Grâce à sa grande affinité pour l'ostéocalcine, le plomb perturberait la fixation de calcium sur l'hydroxyapatite et la minéralisation osseuse pendant la croissance. Ces hypothèses sont surtout basées sur des observations animales démontrant une diminution de densité osseuse et un retard

de réparation des fractures chez les sujets exposés au plomb via l'alimentation ou l'environnement (**Lauwerijs, 2007**).

Chez l'enfant, le plomb provoque un retard de croissance, mais une réduction de la densité osseuse n'a pas été retrouvée. une accélération de la maturation osseuse pourrait même être responsable d'une prédisposition ultérieure à l'ostéoporose. (**Campbell et al., 2004**)

1.5.2.6. Effets sur la reproduction :

L'intoxication chronique par le plomb perturbe la spermatogenèse, pouvant provoquer une diminution de la fertilité chez l'homme. Des modifications des concentrations sanguines de testostérone ont parfois été retrouvées (**Garnier 2005 ; Anjum et al., 2011**). L'exposition au cours de la grossesse est responsable d'une augmentation dose dépendante de l'incidence des avortements spontanés, de la prématurité et de l'hypotrophie foétale (enfants de petit poids de naissance). Le plomb peut entraîner une éventuelle atteinte du système nerveux central foetal en développement, suspecté surtout pour les plombémies maternelles les plus élevées (**Greenlee, 2003**).

1.5.2.7. Effet digestif

Les signes classiques comportent des dépôts extracellulaires de pb au niveau des gencives (liseré de Burton), Elle est causée par une réaction entre les ions plomb avec circulation de soufre libérés par l'activité bactérienne par voie orale, qui se dépose au sulfure de pb à la jonction des dents et des gencives, ou des taches de Gùbler au niveau des joues, et surtout des douleurs abdominales d'intensité variable. On aboutit parfois aux « coliques de plomb », la douleur intense et brutale s'accompagne alors de nausées et de vomissements ainsi que d'une altération de l'état général avec hyper-tension artérielle. Ces crises sont parfois provoquées par une infection ou la prise d'alcool. Il faut insister sur des phénomènes plus rares comme une discrète cytolysé hépatique et des crises de pancréatite aiguë (**Falcy et al., 1998**).

De ce fait, les troubles digestifs induits par le plomb résultent d'un dysfonctionnement du système nerveux autonome (**Roper, 1991**).

1.5.2.8. Effets sur le système rénal

À long terme, l'exposition au plomb à des doses élevées est considérée comme l'une des causes de la néphropathie chronique, qui peut évoluer vers une insuffisance rénale. La fiabilité du diagnostic de la néphropathie saturnine est principalement basée sur les

antécédents médicaux, l'augmentation de la charge corporelle du plomb, des lésions (telles que néphrite interstitielle, atrophie tubulaire, fibrose interstitielle et une dilatation des tubules, etc), les pathologies associées (par exemple, hypertension, goutte, troubles neurologiques et hématologiques), et un dysfonctionnement rénal se manifestant par une amino-acidurie, glycosurie, phosphaturie, azotémie, augmentation du sodium dans le sang, diminution de l'excrétion d'acide urique et réduction de la filtration glomérulaire (Nuyts et al. 1991). La néphropathie aiguë induite par le plomb est susceptible d'être réversible et survient chez l'enfant (généralement à des niveaux de plombémies supérieures à 800 µg/L) et parfois chez les adultes exposés au travail. (Bonnard et al., 2006).

I.5.2.9. Effets sur le système hépatique

Le foie, par l'intermédiaire de la veine porte, est le premier organe exposé aux aliments absorbés par voie parentérale 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 xénobiotique. 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).

1.5.2.10. Effets cardiovasculaires

À long terme, l'exposition au plomb est associée aux maladies cardiovasculaires, en particulier l'hypertension (**Dingwall-Fordyce and Lane 1963**). Une augmentation moyenne d'environ 1,5 à 3,0 mm Hg de la pression artérielle systolique semble se produire à chaque doublement de la concentration de plomb dans le sang chez les hommes adultes et de 1,0 à 2,0 mm Hg pour les femmes (**US.EPA 1986**). Des événements cardiovasculaires autres que l'hypertension, y compris des anomalies électro-cardiographiques, des changements dégénératifs du muscle cardiaque, une myocardie et l'athérosclérose, etc, ont également été observés (**Navas-Acien et al. 2006 ; US.EPA 2006**). Au-delà de l'hypertension, plusieurs études épidémiologiques récentes sur des populations générales ont identifié une association positive entre l'exposition au plomb et des résultats cliniques cardiovasculaires (maladies cardiovasculaires, coronariennes et mortalité par accident vasculaire cérébral et maladies artérielles). Dans certaines études, ces associations ont été observées à des plombémies inférieures à 50 µg/L (**Navas-Acien et al. 2006**).

1.5.2.11. Effets respiratoires

L'inhalation des dérivés de plomb insolubles (Pb_2O_3) peut provoquer une diminution des macrophages alvéolaires chez le rat qui conduit à un cancer pulmonaire. (**Chanel et al., 1999**). Alors que les dérivés solubles ($PbCl_2$) ne provoquent pas de modifications significatives (**Bingham, 1972**).

1.5.2.12. Effets cancérogènes

La cancérogénicité du plomb et de ses dérivés est discutée par les experts. Certaines études épidémiologiques effectuées chez l'adulte en milieu professionnel suggèrent un effet cancérogène du plomb (poumon, estomac, et probablement vessie) mais le plus souvent il existe une Co exposition (tabac, arsenic, etc.). Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a toutefois classé le plomb et ses composés comme cancérogènes possibles pour l'homme (Groupe 2B) (**IARC 2006**)

MANGANÈSE

2. Le Manganèse :

2.1. Généralités :

Le manganèse est un élément chimique, de symbole Mn et de numéro atomique 25. Le nom dérive de Magnésia, une partie de la province grecque de Thessalie, dont provient également le mot grec pour aimant, magnès. Le mot manganèse est l'abréviation de manganésium, l'ancien nom pour l'élément. Ce nom découle des propriétés magnétiques de la pyrolusite, un minéral qui était déjà connu dans l'antiquité. **(Clozel 2008)**. Le Mn constitue environ 0,10 % de la croûte terrestre et représente le 12ème élément le plus abondant **(Claude et al,2003)**, c'est un oligo-élément nécessaire à l'homme pour survivre mais devient toxique lorsque la consommation est trop importante. **(Clozel 2008)**. Il est notamment impliqué dans le métabolisme des sucres, des acides aminés, des lipides, et des protéines. **(Erikson et al., 2002)**. Il entre dans la fabrication de la vitamine B1 et vitamine E. un excès de manganèse se traduit notamment par des troubles du système nerveux. On le trouve principalement dans le riz, le soja, l'avocat, les haricots verts, les épinards, les noix, l'huile d'olive, le jaune d'œuf, les huitres, le thé et les herbes de Provence. **(Clozel 2008)**.

2.2. Propriétés physico-chimiques du manganèse :

Le manganèse est un métal de transition gris blanc qui ressemble au fer. C'est un métal dur et fragile, Il appartient au groupe 7 de la classification périodique des éléments, Et qui existe à des degrés d'oxydation variant de + I à + 7, mais les plus souvent rencontrés sont +2, + 4 et + 7. **(Keen et al.,2000, Pascale.,2001)**. **(Tableau 02)**

Tableau 02 : Propriétés physico-chimiques du manganèse (INERIS ,2007)

Paramètre(Mn)	Valéur
Numéro atomique	25
Configuration électronique	[Ar] 4s2 3d5
Masse molaire(g/mol)	54.94
Point d'ébullition (C°) (à pression normal)	1985
Point de fusion	2061

Densité	7.47 à 20 °C
Perméabilité cutanée à une solution aqueuse (cm/h)	1.10-3

2.3. Utilisations :

Le manganèse est connu depuis la préhistoire. Des peintures de plus de 17000 ans utilisent le dioxyde de manganèse comme pigment. Les Égyptiens et les Romains utilisaient des composés de manganèse dans la fabrication du verre pour le colorer. Vers le début du XIXe siècle, des scientifiques commencèrent à étudier l'utilisation du manganèse dans la fabrication de l'acier. Etant donné que c'est un micronutrient il est souvent trouvé dans la composition des engrais (Agourakis et al. 2006)

2.4. Les sources d'exposition :

2.4.1. Sol :

Le manganèse est largement répandu dans l'environnement puisqu'il constitue 0,085 % de la croûte terrestre, ce qui en fait le 12ème élément par ordre décroissant d'abondance. A l'état naturel, il n'existe pas sous forme libre mais combinée à divers borates, carbonates, phosphates, oxydes, sulfates et silicates (Ferri et al., 2012).

La pyrolusite (MnO₂) est le principal minerais manganifère Il existe d'autres minerais moins courants tels que la manganite (Mn₂O₃, H₂O), la manganosite (MnO), l'hausmanite (Mn₃O₄), la rhodochrosite (MnCO₃) et les silicates de manganèse (rhodonite, braunite). (Pascale.M,2001)

Le manganèse est présent dans presque tous les types de sol. Les concentrations varient de 40 à 900 mg Mn.kg⁻¹, avec une moyenne de 330 mg Mn.kg⁻¹; toutefois, des taux pouvant aller jusqu'à 7 g Mn.kg⁻¹ peuvent être rencontrés dans des zones à forte activité minière (Herndon et al., 2011).

L'air :

Le manganèse élémentaire et ses différents dérivés ne sont pas ou peu volatils. Leur présence dans l'air est essentiellement particulaire. Par déposition sèche ou humide, cette phase particulaire peut rejoindre la surface terrestre (ATSDR, 2000). Ainsi, même s'ils sont légèrement volatils, le manèbe ou le mancozèbe sont essentiellement présents dans l'atmosphère sous forme particulaire. De même, le MMT est également rejeté dans l'atmosphère (lors de la combustion de l'essence sans plomb où il est additionné en tant qu'anti-détonant) sous forme particulaire (HSDB, 2003). Le manganèse présent dans l'atmosphère sous

forme particulière est principalement (à 80 %) associé à des particules ayant un diamètre équivalent inférieur à 5 µm (50 % de ces particules ayant même un diamètre équivalent inférieur à 2 µm), ce qui favorise le transport aérien de ces particules (INERIS, 2012).

2.4.2. Eau :

Le Manganèse peut être rejeté dans l'eau par les rejets des établissements industriels, la Concentrations de Mn dans l'eau de surface sont généralement rapportées comme Mn dissous. Certains composés de Mn sont facilement solubles, donc une exposition importante peut également se produire par l'ingestion d'eau potable contaminée. Cependant, le Mn dans l'eau de surface peut s'oxyder ou s'adsorber sur les particules de sédiments et se déposent au fond. Ce métal peut exister dans l'eau dans l'un des quatre États d'oxydation (II, IV, VI, VII) (Roberto et al., 2015).

2.4.3. Alimentation :

L'alimentation est la principale source d'exposition de la population générale au Mn. On trouve le Mn à des concentrations moyennes variables selon le type d'aliments (Tableau 03). L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime qu'un adulte consommerait quotidiennement entre 0,7 et 10,9 mg de Mn selon son type d'alimentation (OMS, 2004). Les doses d'exposition les plus élevées sont associées à une alimentation végétarienne ou encore riche en légumes, en céréales, en noix et en légumineuses (Schroeder et al., 1966; Freeland-Graves et al., 1987). Les données suggèrent que l'apport alimentaire quotidien moyen de Mn serait approximativement de 3,0 à 4,0 mg chez la population adulte canadienne (Drolet et Zayed, 1994; Health and Welfare Canada, 1990). Les nourrissons sont aussi exposés au Mn par l'entremise du lait qu'ils consomment. Des concentrations approximatives de 3 à 15 µg/L pour le lait maternel, de 30 à 75 µg/L pour le lait de formule à base de lait de vache et de 100 à 300 µg/L pour le lait de formule à base de lait de soya ont été mesurées (ATSDR, 2012). Certains suppléments minéraux et vitaminiques peuvent contenir d'importantes quantités de Mn ; elles peuvent atteindre jusqu'à 20 mg par comprimé (Aschner et al., 2005). (Tableau 03)

Tableau 03 : Étendues des concentrations moyennes de Mn présentes dans différents types d'aliments (OMS,2004)

Types d'aliments	Étendue des concentrations moyennes (mg/kg)
Noix	18,21 - 46,83
Céréales et produits céréaliers	0,42 - 40,70
Légumineuses	2,24 - 6,73
Fruits	0,20 - 10,38
Jus de fruits et boissons aux fruits	0,05 - 11,47
Légumes	0,42 - 6,64
Desserts	0,04 - 7,98
Aliments pour bébé	0,17 - 4,83
Viandes et substituts	0,10 - 3,99
Boissons chaudes (incluant le thé)	0,00 - 2,09
Soupes	0,19 - 0,65
Lait et produits laitiers	0,02 - 0,49

2.4.4. Autres sources :

Les suppléments alimentaires disponibles dans le commerce fournissent de 1 à 5 mg par jour, sous forme de chlorure ou de carbonate ; toutefois certains peuvent apporter jusqu'à 25 mgMn/j (**Rucker et al.,1994**)

Les liquides de perfusion utilisés pour l'alimentation parentérale d'adultes (voie intraveineuse) apporteraient de 0,15 à 0,8 mg Mn/ jour (**Nagamoto et al.,1999**).

Des complexes du manganèse sont utilisés comme agents contrastants en imagerie par résonance magnétique. (**Misselwitz et al., 1995**)

2.5. Toxicocinétique :

2.5.1. Absorption du manganèse

L'absorption du manganèse dépend de la spéciation (ou espèce chimique), de la solubilité du composé dans le milieu biologique considéré, ainsi que de la granulométrie du composé. La voie principale d'absorption est pulmonaire pour les fumées et les poussières, les sels de manganèse sont plus rapidement absorbés que le dioxyde. L'absorption digestive ne joue qu'un rôle secondaire (5 %). L'absorption cutanée est très négligeable seulement dans le cas des dérivés organiques (INERIS, 2012).

2.5.1.1. Absorption pulmonaire

L'absorption pulmonaire est la voie principale en premier lieu chez les personnes exposées à une haute concentration de manganèse essentiellement les mineurs et les soudeurs, mais également pour toutes personnes vivant sous des grands rejets atmosphériques de ce métal (Aschner, 2005). Chez les travailleurs exposés au manganèse, l'absorption se fait par le foie et le cerveau (Louvain, 1999). Les particules qui se sont déposées au niveau des alvéoles pulmonaires sont quasi complètement solubilisées et absorbées. Une étude sur le rat, visant à évaluer l'influence de la voie d'administration (orale, pulmonaire) et de la forme chimique du manganèse sur l'absorption et la distribution cérébrale du manganèse, a souligné l'importance de la voie pulmonaire et a montré que les dérivés solubles du métal sont plus rapidement absorbés que le MnO₂ (insoluble) (Gabor, 2010). Une autre étude expérimentale suggère que le manganèse présent dans les fosses nasales peut, via les neurones olfactifs, être transporté par voie rétrograde dans le système nerveux central (Dorman et al., 2006).

2.5.1.2. Absorption digestive

L'absorption intestinale du manganèse aurait principalement lieu au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement dans la partie proximale du jéjunum. A ce niveau, le manganèse emprunterait un système de transport actif. Au niveau du colon, seul le processus de diffusion simple interviendrait (Pascale, 2001).

2.5.1.3. Autres voies d'absorption

L'absorption par voie cutanée est faible, mais elle pourrait être l'une des voies de pénétration des dérivés organiques du manganèse tel que le MMT (Weiss, 2006) l'alimentation par voie parentérale peut être également une voie d'exposition au manganèse. (Nagatomo et al, 1999).

2.5.2. Distribution du manganèse

Le Mn est présent dans tous les tissus du corps. Les plus forts taux sont couramment trouvés dans le foie, les reins, le pancréas et les glandes surrénales (**Alexia Daoust,2012**). 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 (**Alexia Daoust,2012**). 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 (**Alexia Daoust,2012**).

2.5.3. Excrétion du manganèse

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, Alexia Daoust,2012**). De plus, le Mn fécal est composé de Mn ingéré non absorbé et de Mn excrété par la bile (**Davis and Greger, 1992, Alexia Daoust,2012**). La sueur, les cheveux et le lait maternel contribuent aussi à l'excrétion du Mn.

2.6. Principaux effets toxiques du manganèse :

2.6.1. Toxicité aiguë

Le manganèse est moins toxique que la plupart des métaux la valeur de la DL50 moyenne varie entre 400 à 800 mg kg⁻¹ (cobayes, souris) et 9000 mg kg⁻¹ (rat) par voie orale à des composés de manganèse soluble et de 38 à 64 mg kg⁻¹ (rat, souris) pour les injections parentérales, manganèse a été établi pour s'accumuler dans le foie maternel et traverser le placenta chez les rats. (**Scgad et al., 2014**)

L'inhalation de fumées d'oxyde de manganèse peut, comme celle des oxydes de la plupart des métaux, engendrer un syndrome pseudogrippal similaire à celui de la fièvre des fondeurs (fièvre, frissons, transpiration, nausée, toux) survenant 2à12heures après le début de l'exposition et durant environ 24 heures lorsque l'exposition a été modérée. En cas d'exposition intense (probablement plusieurs mg/m³) aux fumées ou aux poussières de divers sels de manganèse, peut survenir une pneumonie chimique sévère. Elle se caractérise par de la fièvre, de la toux, de la cyanose, de la dyspnée, une expectoration visqueuse et les signes cliniques et radiologiques habituels de la pneumonie. (**Lauwerys et al., 2001 ; Emmanuelle et al,2009**).

L'intoxication aiguë par voie orale est exceptionnelle et résulte de l'ingestion accidentelle ou volontaire d'un sel de manganèse (par exemple des comprimés de permanganate de potassium). Cette dernière substance est un agent oxydant puissant produisant une brûlure massive des voies digestives, un œdème des voies respiratoires supérieures et un collapsus

circulatoire. Une nécrose hépatique et rénale peut aussi survenir. Signalons que chez l'animal la dose létale 50 de divers composés solubles du manganèse est comprise entre 400 et 830 mg Mn/kg (**Biomnis, 2013**)

2.6.2. Toxicité chronique :

Lors d'exposition chronique au manganèse, ce sont des atteintes du système nerveux central qui prédominent (**manganisme**). Les symptômes sont à la fois des troubles psychiatriques et des atteintes purement neurologiques. Les troubles psychiques précèdent habituellement les déficits moteurs (**Sriram et al., 2012**) Peut également entraîner une réponse inflammatoire au niveau des poumons, avec de la toux, des bronchites, des pneumonites, et parfois des pneumonies (**Rémillard. 2009**).

2.6.2.1. Effets sur le système nerveux

a. Effets neuropathologiques :

Les mineurs de Mn et de soudeurs (**Butterworth, 2010 ; Quadri et al., 2012**). Les personnes concernées développent la neurotoxicité induite par le Mn, appelée manganisme, présentant des symptômes ressemblant à la maladie de Parkinson (**Racette 2014**). Il n'y a de plus en plus des données épidémiologiques suggérant que l'ingestion de Mn peut être neurotoxique, surtout pour les populations plus jeunes (**Woolf et al., 2002 ; Wasserman et al., 2006 ; Bouchard et al., 2011 ; Oulhote et al., 2014**). Une étude sur six patients manganisme professionnellement exposés à Mn comme soudeurs ou fonderies du Guangxi (Chine), a suggéré que l'exposition Mn a conduit à des manifestations cliniques des syndromes parkinsoniens avec des variations considérables. Un patient qui avait un syndrome classique présynaptique et a répondu à la LDOPA était clairement en état d'ébriété par le Mn. Par ailleurs, un cas avec une exposition de Mn 25 ans a montré un syndrome de Parkinson à un âge précoce avec des anomalies de MRI bilatéralement dans le globus pallidus (**Rutchik et al., 2012a ; Rutchik et al., 2012b**). Ainsi, ces observations confirment un chevauchement dans les syndromes entre mouvement induit par la Mn du trouble et la maladie de Parkinson (**Racette et al., 2001 ; Rutchik et al., 2012b**). Alors que le lien entre la maladie de Parkinson et le manganisme est remarquable, les études animales suggèrent que les neurones dopaminergiques dans la substantia nigra et leurs terminaux dans le striatum, qui sont sélectivement lésés dans la maladie de Parkinson, demeure intactes après une intoxication par le Mn (**Guilarte TR.,2010**). Ainsi, les changements dans la neurotransmission, plutôt qu'une perte de cellules neuronales massive de dopamine, probablement sous-tendre observations comportementales (**Stefanie et al., 2015**). Dans une étude humaine en utilisant l'imagerie par résonance magnétique et la spectroscopie (IRM / S) pour étudier les changements dans la neurochimie des travailleurs de la fonderie, l'augmentation des GABA et baisses en myo-inositol

ont été vus dans le thalamus. Changements dans le thalamique GABA associé à une réduction des performances de la motricité fine évaluée par le test de Purdue Pegboard (**Racette et al., 2001**). Ces deux études indépendantes peuvent suggérer un mécanisme moléculaire sous-jacente similaire. Neuropathologie du Mn (**Stefanie et al., 2015**).

b. Effets sur le comportement

Les effets du manganèse sur le comportement ont été étudiés chez des animaux de laboratoire. Les quelques études du comportement chez des primates non humains diffèrent sur le plan méthodologique, entre autres par l'espèce étudiée, la voie d'exposition et la forme chimique du manganèse. Cependant, un dénominateur commun des symptômes neurologiques devient apparent dans ces études sur les conséquences de l'exposition. L'hyperactivité est souvent rapportée comme étant un symptôme de première heure ; les symptômes progressent en incluant des mouvements anormaux, la rigidité musculaire et la flexion des membres (**Eriksson et coll., 1987**). La plupart des études ont aussi signalé l'apparition de tremblements. D'autres ont fait état d'une perturbation de la réponse à l'effort chez les capucins (singes *Cebus*) (**Newland et Weiss, 1992**) et une sensibilité accrue au comportement social chez les singes rhésus nourrissons (**Golub et coll., 2005**). Les effets sur le comportement des primates non humains sont souvent corrélés à des lésions cérébrales, en particulier dans les ganglions de la base, notamment une gliose, une dépigmentation, ainsi qu'une dégénérescence et une perte neuronales (**Erikson et coll., 1987b**). Ainsi, la réponse observée chez les primates non humains à une intoxication par une forte dose chronique de manganèse ressemble à celle observée chez l'être humain (**Newland, 1999**). Par contre, le principal effet rapporté sur le comportement des rongeurs exposés est une modification passagère de l'activité motrice spontanée. Les résultats provenant des études chez les rongeurs ne sont pas entièrement cohérents, probablement en raison de différences méthodologiques, tout particulièrement en ce qui a trait au moment auquel l'activité a été mesurée après le début du dosage. Certaines études ont mis en évidence une activité locomotrice accrue dans la première phase de toxicité (**Pierre et coll., 2001; Salehi et coll., 2003**), alors que d'autres ont détecté une réduction de l'activité locomotrice provoquée par le manganèse sans aucun accroissement initial (**Shukakidze et coll., 2003; Normandin et coll., 2004; Vezér et coll., 2005**). Les études de **Öner et entürk (1995)** et **Vezér et coll. (2005)** ont décelé des troubles d'apprentissage chez les rongeurs, après une exposition au manganèse. Les souris KO MAP6 présentent des déficits du comportement social, de la mémoire de travail à court terme et de l'apprentissage social et spatial (**Bégou et al., 2008**), des problèmes de locomotion, une altération du comportement maternel et une hyper sensibilité à un stress modéré (**Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005; Fradley et al.,**

2005). Les souris présentent aussi un déficit de la reconnaissance d'objet et de la mémoire à long terme (Powell et al., 2007; Fournet et al., 2012).

2.6.2.2. Effets sur le système endocrinien

Dans les années 80/90, deux études de fertilité chez des travailleurs exposés à des poussières de manganèse (fabrication de piles alcalines et production de sels de manganèse à partir de minerais) ont eu des résultats contradictoires. Au cours des deux dernières décennies, certains auteurs ont observé une augmentation de la prolactinémie chez des ouvriers de la production d'alliages au manganèse (en particulier des ferro-alliages) alors que d'autres ont rapporté des résultats négatifs. Dans une récente étude coréenne chez des soudeurs exposés au manganèse les auteurs avançaient l'hypothèse qu'une augmentation de la TRH (hormone de libération de la thyroïdostimuline) et une suppression de l'inhibition dopaminergique au niveau de l'anté-hypophyse pourraient être à l'origine de l'augmentation de la prolactinémie chez les soudeurs (Nadia, et Florence, ; 2010).

2.6.2.3. Effets sur le système respiratoire :

L'inhalation de particules de Mn peut conduire à une réponse inflammatoire au niveau du poumon. Cette situation est caractérisée par une infiltration de macrophages et de leucocytes qui phagocytent les particules déposées. Les dommages au tissu pulmonaire ne sont normalement pas importants mais peuvent inclure des zones d'œdème. Les symptômes et les signes d'irritation pulmonaire peuvent inclure une toux, une bronchite, une pneumotite et des réductions mineures des fonctions pulmonaires. Dans certains cas, une pneumonie chimique peut être observée parmi les travailleurs exposés aux scories et aussi dans les mines de Mn, les usines fabriquant du ferromanganèse et du permanganate de potassium. Elle se caractérise par de la fièvre, de la toux, une expectoration souvent très visqueuse, et les signes cliniques habituels de la pneumonie (irsst, 2003)

2.6.2.4. Effets sur la reproduction

L'impuissance et la perte de libido sont des symptômes observés chez les travailleurs affligés d'un manganisme. Ces symptômes peuvent conduire à un taux de reproduction plus bas. Ont ainsi mis en évidence une baisse de fertilité (nombre moyen d'enfants par couple) chez une cohorte des travailleurs exposés aux poussières de manganèse. Ces données suggèrent que l'altération des fonctions sexuelles chez l'homme pourrait être l'une des manifestations cliniques précoces du manganisme. (Clozel ; 2008)

2.6.2.5. Effets hématologique :

Différentes altérations des paramètres hématologiques ont pu être observées expérimentalement chez l'animal. Ainsi, chez la souris, ont observé une diminution du nombre de globules rouges et de globules blancs et une diminution du taux d'hématocrite. Chez le rat, des injections quotidiennes de chlorure de manganèse par voie intra péritonéale ont conduit à une anémie microcytaire hypo-chromique. Enfin, chez l'agneau, l'exposition à des concentrations excessives de manganèse alimentaire diminuerait la formation de Hémoglobine. **(Pascal., 2001).**

2.6.2.6. Effets rénaux :

Aucune étude ne se trouvaient au sujet des effets rénaux chez l'homme après une exposition par voie orale au manganèse inorganique. Dans les études animales, aucune modification histopathologique rénale importante ont été observées dans ce qui suit : souris et les rats marre à 3,900 ou 1,300 mg de manganèse/kg/jour (comme sulfate de manganèse) pendant 14 jours **(NTP, 1993)**. En outre, **(Avila et coll., 2008)** ne signalé aucune preuve d'une augmentation du stress oxydatif dans les reins chez les rats Wistar, telle que mesurée par la production TBARS, δ -ALA-D activité et carbonylation de protéine, à des doses vers le haut à 1,730 mg manganèse/kg/jour (sous forme de chlorure de manganèse dans l'eau potable) pendant 30 jours. Contrairement à ces résultats, aggravation de la néphropathie progressive chronique a été notée chez les rats mâles nourries de manganèse de 200 mg/kg/jour (comme sulfate de manganèse) pendant 2 ans **(NTP, 1993)**.

2.6.2.7. Effets hépatiques :

Depuis le rapport initial de Klaassen en 1976 décrivant l'excrétion hépatobiliaire de Mn du foie **(Klaassen CD.,1976)**, pas beaucoup de travail a été fait pour décrire l'hépatotoxicité induite par Mn. Le foie est un organe de stockage connu pour Mn ; le taux de participation de Mn se produit dans le foie, seulement deuxième à absorption de cerveau **(Chua et Morgan., 1997)**. Accumulation de Mn hépatique chez des souris injectées par voie intraveineuse avec des nanoparticules de Mn a persisté beaucoup plus longtemps que les autres tissus fortement perfusés tels que les reins et la rate ; Toutefois, aucun dommage histopathologique n'observa **(Bellusci et Barbera., 2014)**.

L'excrétion hépatobiliaire de Mn représente une principale voie de dégagement Mn du corps, soit 80 % d'élimination de Mn. Ainsi, une atteinte hépatique sévère, en raison de diverses maladies chroniques du foie, peut entraîner une accumulation excessive de Mn dans le cerveau qui a suivi les signes et les symptômes cliniquement appelée encéphalopathie hépatique du Mn **(Long et al.,**

2009). Avec l'affaiblissement de la fonction hépatique, il y a également un risque accru de neurodégénérescence avec exposition de Mn continue (Squitti R et al., 2009). Chez les patients présentant une encéphalopathie hépatique chronique, c'est une greffe du foie qui s'est avéré efficace pour réduire les teneurs en Mn du cerveau. Lorsque les patients ont été réexaminées 5 mois après la transplantation, le T1-signaux de MRI pondérés dans les ganglions de la base étaient absents (Long et al., 2009). Ces données suggèrent que la fonction hépatique normale est essentielle pour maintenir l'homéostasie du Mn dans le corps, y compris le système nerveux central (Stefanie et al., 2015)

2.6.2.8. Effets immunologiques :

Le Manganèse appartient à un groupe d'agents appelés métaux de transition, ainsi que le chrome, le cobalt et le nickel, qui sont connus pour provoquer de l'asthme professionnel. La structure chimique similaire de Mn peut ainsi déterminer son potentiel d'asthmogénique. Un rapport de cas sur l'asthme professionnel dus à l'exposition de Mn dans un soudeur non-fumeur âgé de 42 ans avec dyspnée liées au travail est le premier cas documenté d'asthme professionnel induit par Mn. L'argument pour la reconnaissance de l'État comme l'asthme professionnel a été une réponse clinique positive pour le test de provocation spécifique, ainsi que des changements morphologiques dans l'expectoration induite (Wittczak et al., 2008).

2.6.2.9. Effets Cancérogènes :

Un certain nombre d'études sur les humains ont été mené pour étudier les effets génotoxiques de manganèse chez les soudeurs exposés professionnellement ; Toutefois, les conclusions de ces études ne sont pas concluantes depuis coexposition de nickel et de chrome, ainsi que d'autres substances toxiques, n'étaient pas contrôlées), Il n'y a aucun rapports cliniques impliquant de manganèse comme un cancérogène pour les humains, et aucune étude épidémiologique n'ont tenté de relier l'exposition au manganèse au cancer (gunnar f et al., 2014).

LES HUILES ESSENTIELLES

3. Les huiles essentielles :

Les grands berceaux géographiques de la civilisation aromatique sont l'Inde, la Chine et le bassin méditerranéen, Ces berceaux ont montré à l'humanité des procédés et des connaissances dans le domaine des huiles essentielles dont la validité est toujours d'actualité (**Boukhalfa, 2014**). Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigne (**El haib, 2011**).

3.1. Définition :

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. La matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, pulvérisée ou contuse (pulvérisée grossièrement), à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours à l'état frais ».

Selon la norme NF T 75-006 de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) une huile essentielle est définie comme le « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Les Huiles Essentielles (HE) sont le produit de la distillation d'une plante ou d'une partie de plante. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, voire résinoïdes, très odorantes, volatiles, souvent colorées. (**Solène,2012, Soulimani ,2016**)

3.2. Aromathérapie :

L'aromathérapie est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes. Ce terme a été inventé par René Maurice Gatte fossé, pharmacien français dans les années 1910. Ce mot vient du latin « *aroma* » signifiant odeur et du grec « *therapeia* » signifiant traitement. Il s'agit donc de soigner par les huiles essentielles. (**Charles ,2014**)

3.3. Historique :

Le terme « **aromathérapie** » a été formulé en 1928, par *René Maurice GATTEFOSSÉ*, bâtisseur de la recherche scientifique sur les huiles essentielles, commença ses recherches sur le pouvoir de guérison des huiles essentielles après avoir brûlé sa main dans son laboratoire et l'avoir immergée dans huile de lavande. Il a été impressionné de la rapidité de guérison de sa brûlure (**Pitman, 2004**). À partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins, ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques (**Zhiri,2006**).

3.4. Localisation et caractères :

3.4.1. Localisation des HE dans les tissus de la plante

Les constituants des HE peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des cellules banales par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées. Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur des pétales de Rose). Mais généralement les épidermes des Pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (**Alilou 2012**). (**Figures 04 et 05**)



Figure 04 : Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan (**Porter, 2001**)

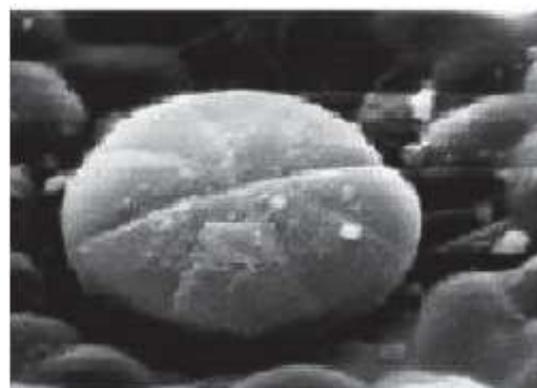


Figure 05 : Glande simple d'origan entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800×) (**Sharma et al., 2003**)

3.4.2. Caractères chimiques des HE

Les HE sont des mélanges très complexes, ces constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote. Du strict point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique, l'isoprène. **(Ayaidia, 2011)**

Selon le nombre de résidus isoprènes que regroupent les composés terpéniques, on distingue :

- Les terpènes simples, formés de deux isoprènes, $C_{10}H_{16}$;
- Les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes, $C_{15}H_{24}$;
- Les diterpènes, formés de quatre isoprènes, $C_{20}H_{32}$.

Ces trois premiers groupes sont à l'origine de très nombreuses essences :

- Les triterpènes (six isoprènes) qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines ;
- Les tétraterpènes (huit isoprènes) qui conduisent aux caroténoïdes ;
- Les polyterpènes (n isoprènes) qui comprennent, en particulier, le caoutchouc et la gutta-percha **(Benayada, 2008)**.

3.4.3. Caractéristiques et propriétés physiques des HE :

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire **(Degryse et al., 2008)**. Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de sassafras, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) **(Desmares et al., 2008 ; Taleb et al., 2015)**.

Les huiles essentielles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille **(Rhayour, 2002; Benini, 2007; Benayad, 2008)**. Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels **(Bruneton, 1999)**.

3.5. Méthodes d'extraction des HE :

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont : l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation simple, la distillation à vapeur saturée, l'hydro-diffusion, l'extraction par CO₂ super critique et l'extraction assistée par micro-ondes. (Bruneton 1993, Sousa *et al.*, 2002, Adio, 2005)

3.5.1. Entraînement à la vapeur

Dans ce type de distillation (**Figure 06**), le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques : le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Marianne, 2008 ; Florence M, 2012).

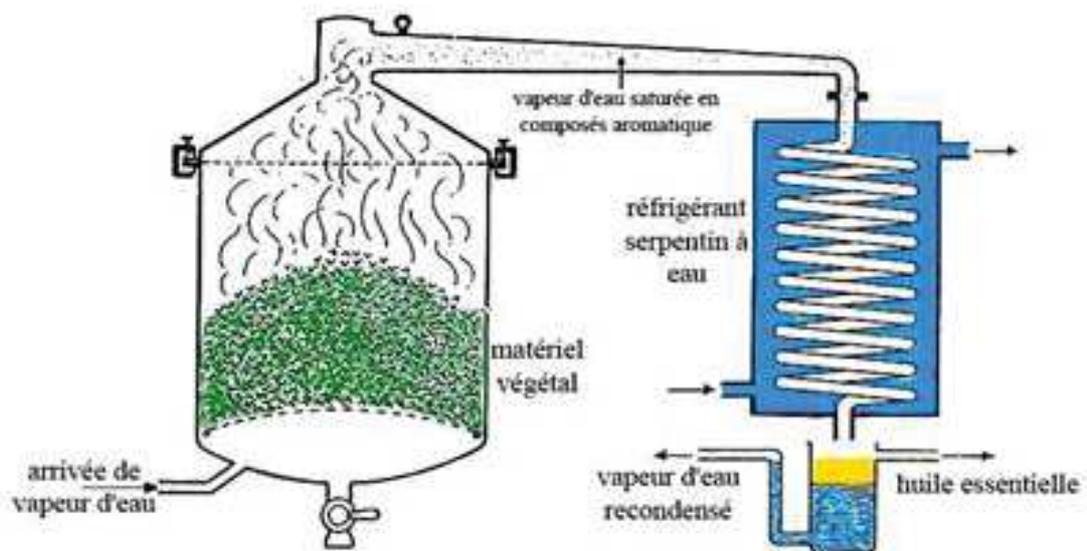


Figure 06 : montage d'entraînement à la vapeur d'eau (Florence M, 2012).

3.5.2. Hydro-distillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée (**Figure07**). Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. (MARIANNE 2008 ; Asbahani *et al.*, 2015)

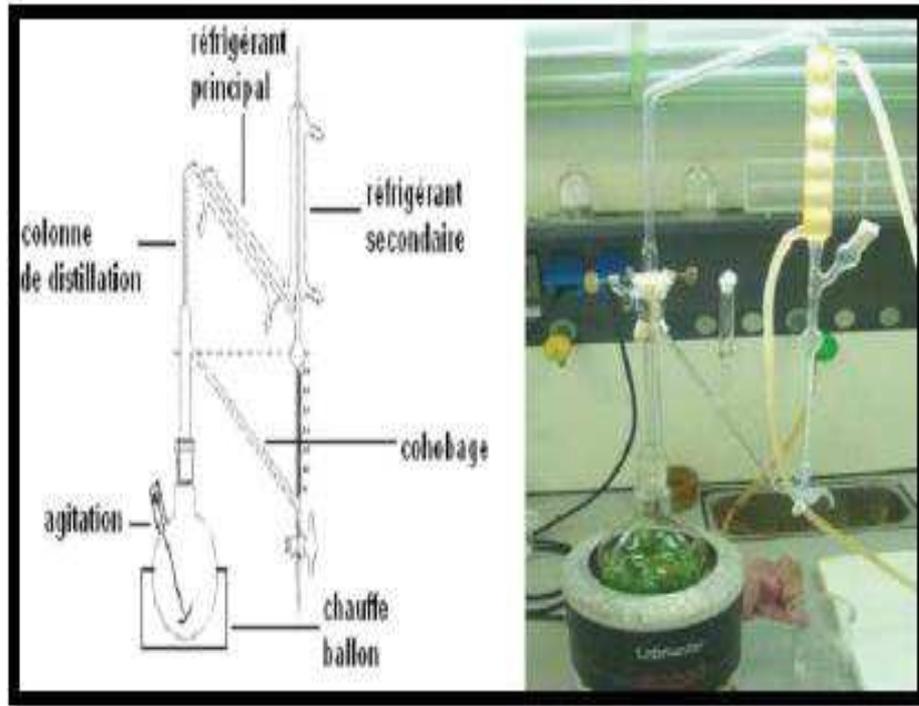


Figure 07 : montage d'hydrodistillation (Boukhalfa , 2014).

3.5.3. Hydro-diffusion

Cette technique relativement récente est particulière (Figure08). Elle consiste à faire Passer, du haut vers le bas (*per descendum*) 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. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale : « essence de percolation » (Benayad, 2008)

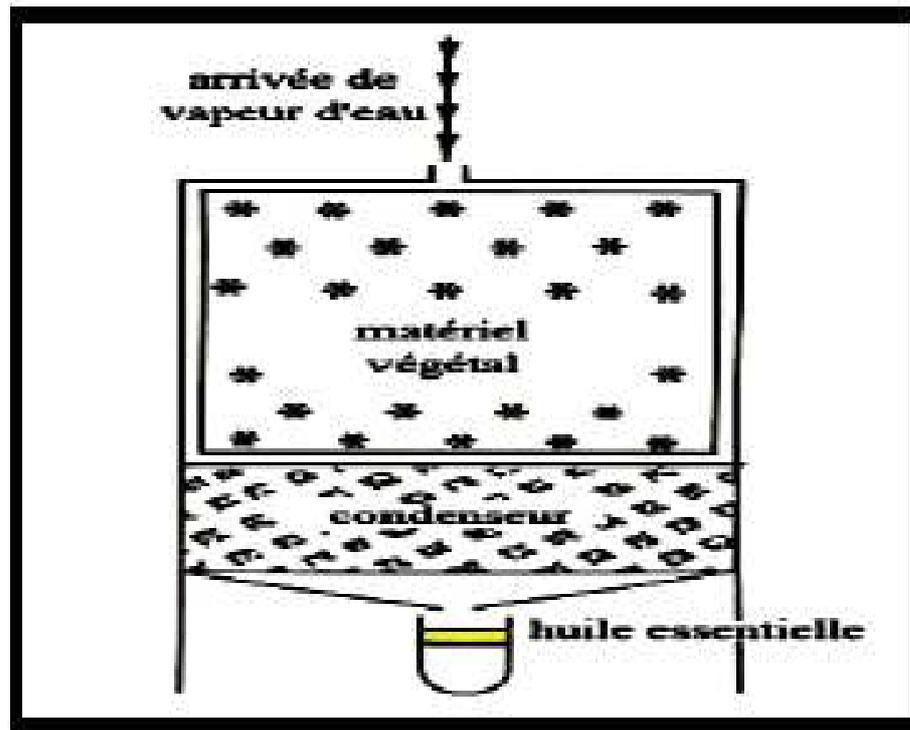


Figure 08 : montage d'hydro diffusion (Benayad, 2008).

3.5.4. Extraction par CO₂ super critique

Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Ensuite, il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après, le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Figure09) (EL-HACI, 2015).

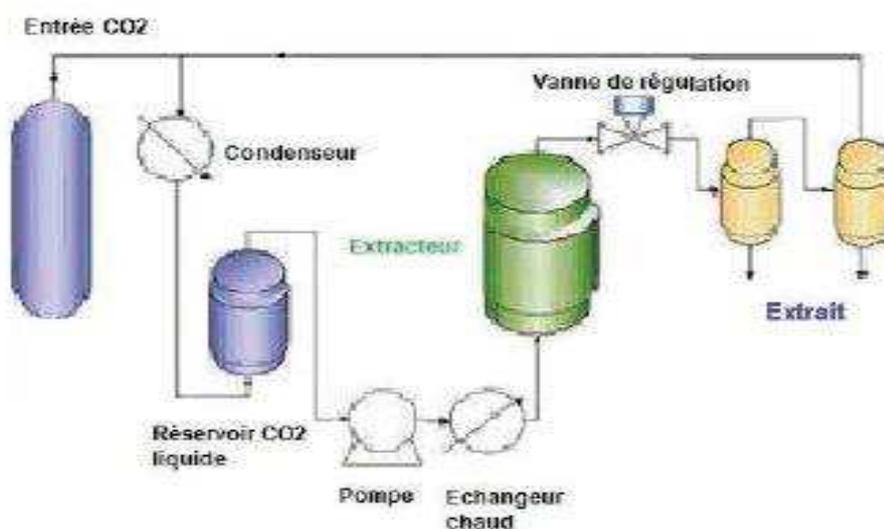


Figure09 : schéma descriptif du dispositif d'extraction par CO₂ supercritique (Fornari *et al.*, 2012)

3.5.5. Extraction assistée par micro-ondes

La technique d'extraction par micro-ondes (**Figure10**) a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie du micro-ondes par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend aussi de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal (**Grigonis et al., 2005 ; Reighard et Olesik, 2006 ; Wang et Waller, 2006**)

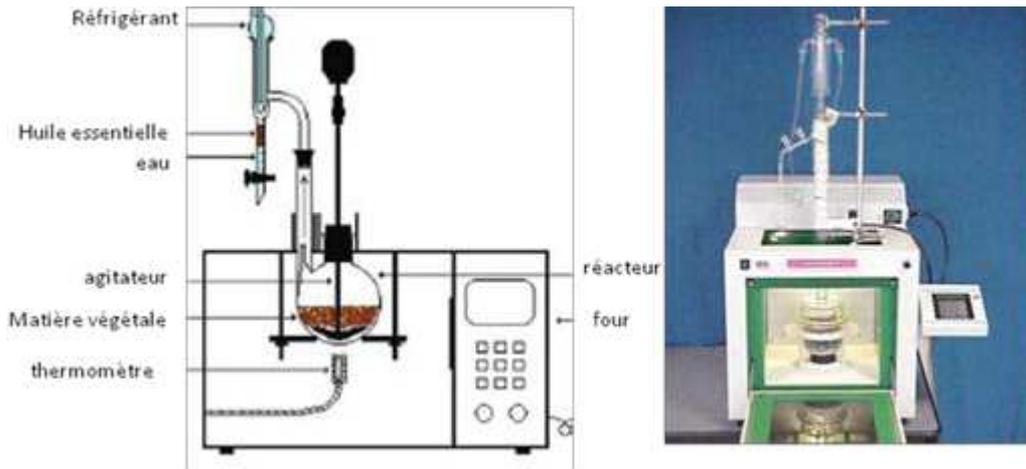


Figure 10 : montage d'extraction assistée par micro-onde (**Vian et al., 2008**).

3.5.6. 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**).

3.5.7. Extraction par les ultrasons

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les micros cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées (**Otmani, 2014**). L'utilisation des ultrasons pendant l'hydrodistillation est vaine. Une unité d'hydrodistillation équipée d'une fontaine d'ultrasons peut produire plus vite des points d'ébullition, mais ne dégonflent pas les bulles (**Vinatoru, 2001**). Par conséquent, les ultrasons ne sont pas une bonne option pour les procédés par ébullition. Cependant, l'extraction assistée par les ultrasons est une

technique de choix pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. De nombreux travaux d'extraction assistée par ultrasons sont décrits, pour des cas récents comme l'extraction des graines de carvipar (**CHEMAT *et al.*, 2004**), de fenouil (*Foeniculum vulgare*), houblon (*Humulus lupulus*), consoude (*Calendula officinalis*), Rue de Syrie (*Peganum harmala*), menthe (*Mentha piperita*), tilleul (*Tilia cordata*), et mule aulnée (*Inula helenium*) par (**ADZET *et al.*, 2001**). L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de permettre on faciliter l'extraction de molécules thermosensibles (**Otmani, 2014**).

3.6. Conditions de conservation et de stockage des HE

La relative instabilité des molécules constitutives des HE implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide...), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité...) et/ou par l'analyse chromatographique. Les conséquences sont multiples par exemple, photo-isomérisation, photo cyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse, transestérification. Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter : utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière. Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Dans ce cas, cet additif est à mentionner lors de la vente ou l'utilisation de l'huile essentielle. Par ailleurs, des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques (**Kedia 2014**). Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des HE (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996).

3.7. Analyses des huiles essentielles et critères de qualité

Seulement une connaissance détaillée des constituants d'huile essentielle mènera à une utilisation appropriée (**Buchbauer, 2000**). Selon la Pharmacopée, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle comme masse volumique, indice de réfraction, indice

d'acide, indice d'ester, etc. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. (Afnor,1996, Iso, 1997).

D'autres types d'analyse qui ont pour but d'identifier les différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique : la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS. (Bourkhiss *et al.*, 2007, bouguerra,2012).

3.7.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est un outil incontournable dans l'analyse des HE. Cette technique d'analyse est utilisée de puis le milieu du siècle dernier. Elle s'est rapidement imposée de par son coût relativement modéré, son automatisation, sa robustesse ainsi que sa large gamme de colonnes et de détecteurs disponibles. Son principe repose sur la séparation de composés volatils selon leurs affinités pour la phase stationnaire (colonne). L'analyse des composés liquides ou solide impose donc la nécessité de les volatiliser à haute température. Ce point étant son inconvénient majeur. Plusieurs détecteurs sont utilisés pour l'analyse des HE, principalement, le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le détecteur à conductibilité thermique (TCD) (EL-HACI, 2015).

3.7.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS

Le détecteur SM permet, via les spectres, de donner des informations sur la structure des composées d'une HE permettant ainsi leur identification. En sortie de colonne (partie CPG), le composé élué est bombardé par un faisceau d'électrons de haute énergie (70eV). La molécule s'ionise et se fragmente en différents ions. Ces ions sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z). Cette séparation se fait dans le quadripôle. Tout le processus se fait à vide afin d'éliminer toutes les entités non chargées positivement et d'augmenter la durée de vie des ions formés (EL-HACI, 2015).

3.8. Applications des huiles essentielles

Les effets biologiques bénéfiques et positifs des huiles essentielles, connus depuis très longtemps dans la médecine traditionnelle et validées par de nombreuses études fiables et sérieuses, ne doivent pas être compromis par les effets nuisibles aussi bien sur l'individu que sur l'environnement (Rakesh K *et al.*,2015 ; Grechea H *et al.*,1999 ; Soualeh *et R. Soulimani*, 2016)

Actuellement, les plantes aromatiques ont un avantage majeur en raison de la découverte progressive des applications des huiles essentielles dans les soins de santé et leurs utilisations

dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreuses utilisations ils savent les marchés mondiaux plus en plus forte de la demande (M. Mehani et al 2015).

3.8.1. En agroalimentaire

En industrie alimentaire, la conservation des aliments sans toucher leurs qualités organoleptiques est un objectif clé. Les HEs sont actuellement valorisées en industrie agroalimentaire due à leur activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes d'altération et les principaux pathogènes, notamment *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157 :H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004). D'un autre côté, les HEs sont également utilisées en agroalimentaire comme des exhausteurs de saveurs (Brud,2010).

3.8.2. En cosmétique

Avant la mise en évidence de leurs propriétés médicinales, les HEs ont été largement exploitées en industrie cosmétique grâce à leurs caractères organoleptiques, principalement leur odeur agréable et persistante. Cette propriété aromatique est attribuée à l'ensemble de molécules volatiles issues des plantes aromatiques. En outre, le potentiel aromatisant des HEs est également appliqué dans des produits pharmaceutiques, notamment dans les solutions et lotions de l'hygiène buccodentaire telles que les dentifrices et les bains de bouche (Brud, 2010). L'utilisation des HEs dans des produits cosmétiques, telles que les crèmes et les gels, est non seulement dans le but de les parfumés, mais aussi pour la conservation de ces produits (M. Mehani et al 2015).

3.8.3. En médecine

Grâce à leurs propriétés aromatisants et antiseptiques, les HEs ont été largement utilisées dans les bains de bouche conçus pour l'hygiène buccodentaire. Les préparations à base du Thymol, d'Eucalyptol et du Menthol sont parmi les plus utilisées depuis longtemps dans le monde, surtout aux États-Unis. Cependant, c'est juste en 1987 que les bains de bouche préparés à base d'HEs ont été approuvés par l'association dentaire américaine (ADA), attribuer à leur efficacité antimicrobienne et leur sûreté (Stoeken et al., 2007). Parmi les bains de bouche les plus connus au monde, on donne l'exemple de la Listerine® qui est une solution constituée d'HE de Thymol et d'Eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et les dents (Kato et al., 1990).

3.9. Voies d'utilisation des huiles essentielles

3.9.1. Voie cutanée

La voie cutanée est une voie classique d'utilisation des huiles essentielles, mais il est rare de les utiliser pures. La plupart du temps, elles sont à diluer à 5% dans 95% d'une huile végétale

(huile de jojoba, d'argan, d'amande douce, d'olive...). Ce sont des corps lipophiles, elles ne restent donc pas en surface, mais traversent les différentes couches de peau et se retrouvent ainsi dans la circulation sanguine (**Buronzo 2012**).

3.9.2. Diffusion atmosphérique

La diffusion est le moyen le plus simple de profiter des bienfaits des huiles pour tout le monde. Les composés actifs entrent par absorption par les poumons. Les activités sont multiples, d'un rôle anti-odeur à une efficacité antivirale, et la diffusion ne doit pas se faire en continu, mais plutôt en 1/4h afin de ne pas irriter les muqueuses. Pour la même raison, les huiles diffusées doivent être choisies avec soin (**Souza 2013**).

3.9.3. Inhalation sèche et humide

L'huile essentielle peut être déposée sur un mouchoir ou sur un oreiller avant d'être inspirée. Elle peut également être respirée après dilution dans un bol d'eau chaude (**Grant 2010**).

3.9.4. Voie orale diluée

Cette voie est réservée aux adultes sur avis médical ou officinal. Il ne faut en aucun cas dépasser 3 gouttes par jour et la durée de traitement ne peut dépasser 1 semaine (**Tayarani 2013**).

3.10. Toxicité des huiles essentielles

Des multiples études de toxicité ont été réalisées et un état des lieux scientifique permet actuellement de mieux maîtriser l'usage de ces huiles essentielles dans différents secteurs de leurs applications en thérapeutiques animale et humaine (**Rakesh K et al,2015 ; Grechea H et al,1999 ; Soualeh et R. Soulimani, 2016**).

Les huiles essentielles sont présentées, généralement comme « sans danger ». Mais ces substances naturelles sont aussi des composés puissants (**DEGRYSE et al, 2008**). Par leur composition chimique complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter des très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome (**BENZEGGOUTA, 2005**). Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature (**TRAORE, 2006**). Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles du thym et de la lavande, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact ; à titre d'exemple, elles sont avérées cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées du cancer (**PIBIRI, 2006**). En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale : une DL50 comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées

(anis, eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.); d'autre ont une DL50 inférieure à 1 g/kg: l'huile essentielle de boldo (0.13g/kg) ; l'essence de moutarde (0.34g/kg) ; les essences d'origan de la sarriette (1.37g/kg) ; les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysope (1.5ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**BRUNETON, 1999; BENZEGGOUTA, 2005**).

4. La Menthe (*Mentha Spicata*)

4.1. Généralités :

Le genre *Mentha* compte un très grand nombre d'espèces et les hybridations successives entraînent une certaine confusion dans leur identification. Il est donc impossible de mettre un nom botanique sur les espèces de Menthe évoquées dans l'Antiquité (**Bourgeois L 2009**).

La menthe, du nom latin *Mentha*, est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues : les archéologues ont découvert ses feuilles dans des pyramides d'Egypte vieilles de 3000 ans, Les menthes sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes (**Sommerard JC 2012**). Que l'on trouve particulièrement dans les milieux humides. (**Brada et al .,2007**) La croissance végétative de la menthe est fortement ralentie à une température minimale inférieure à 10 °C et maximale supérieure à 25 °C. La période de floraison de la menthe qui coïncide avec la saison de l'été est une période optimale pour la production des huiles essentielles. (**Vaverková et al .,2009**). La menthe peut être cultivée dans tous les sols sauf dans les terres trop argileuses, humides et froides en hiver. Sa culture réussit particulièrement bien dans les sols profonds non compacts, car le système racinaire de la menthe est peu profond, riches en humus et bien drainés à pH allant de 5,5 à 8. (**FAO, 2010**) ; et une forte teneur en matière organique. D'ailleurs, il est recommandé de recommencer la plantation après 3 ans de culture. (**Tanji, 2010**), L'huile essentielle de la menthe est produite en grande échelle partout dans le monde. Elle peut contenir jusqu'à 200 composants. Le menthol et la menthone sont les constituants majeurs (70%) des huiles essentielles de la majorité des menthes .Ces composés sont exploités comme matière première dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (**Fournier PV 2010**).Les huiles essentielles de la menthe sont composées d'un certain nombre de composés de différentes origines biosynthétiques allant terpénoïde des hydrocarbures en composés de soufre (**Simoès et al ., 2007**), et de tels composés sont naturellement présents dans des concentrations différentes (**Oliveira et al ., 2014**). Les huiles essentielles du genre *Mentha* ont une haute valeur commerciale, car ils contiennent habituellement le monoterpène menthol dans leurs constitutions, et le menthol est largement

utilisé dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, soins personnels et les produits alimentaires (Santos et al., 2012)

4.2. Origine

Les origines de la menthe sont encore bien imprécises, la zone géographique de départ étant un des rares faits où les auteurs se retrouvent : elle viendrait d'une vaste région englobant le Nord de l'Afrique, le bassin méditerranéen, l'Europe et le Proche-Orient. Elle fut introduite en Grande-Bretagne par les Romains. Elle s'est ensuite diffusée sur l'ensemble du globe, jusqu'en Amérique du Nord, au Japon et en Australie. Elle pousse naturellement au Maroc (Dupont 2012). Elle est aujourd'hui retrouvée partout dans le monde (Figure 11), d'ailleurs elle est parfois considérée comme envahissante. La diversité des sols et les multiplications ont donné de nombreuses espèces, certaines études ont d'ailleurs montré que *Mentha spicata* serait le résultat d'une hybridation entre *Mentha longifolia* et *Mentha suaveolens* (Hussain 2010). Cependant, *M.spicata* est connu localement comme ' Naanaa ', est cultivé dans toute l'Algérie à des fins culinaires ainsi que pour ses propriétés médicinales particulièrement pour traiter les troubles gastriques (Brahmi et al ., 2012).

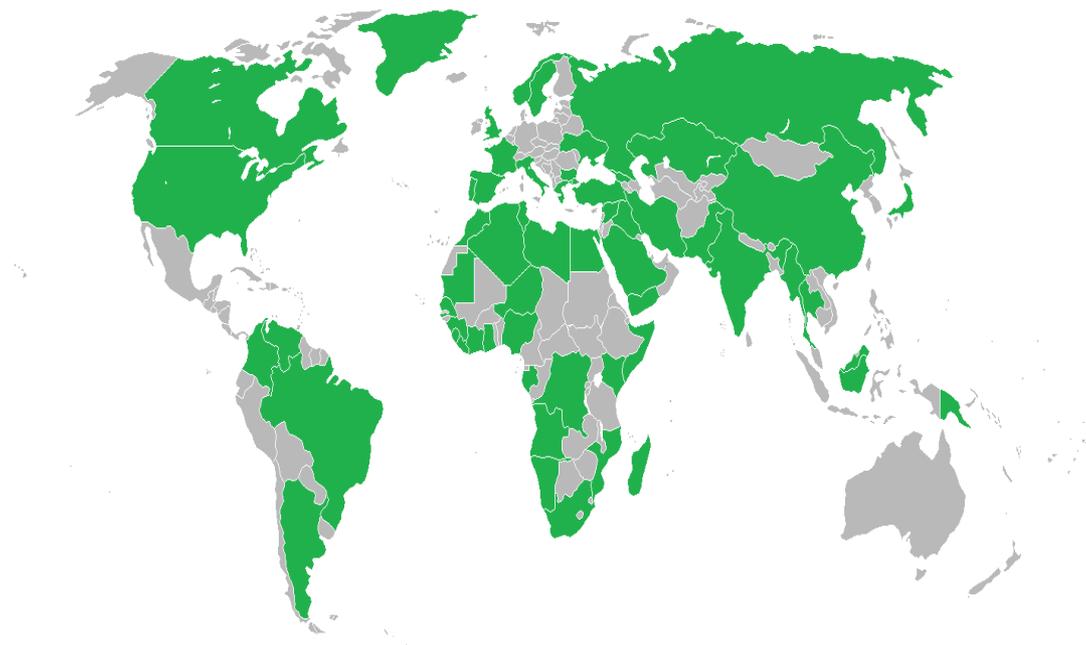


Figure 11 : Aire de répartitions de la menthe par le monde (Tucker et Naczi .,2007)

4.3. Description

La menthe verte appartient à la famille des Lamiacées, qui comprend 6500 espèces dispersées sur une aire géographique très étendue. C'est une famille très homogène : une Lamiacée est facile à reconnaître. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées et des arbustes producteurs d'huiles essentielles, dont l'odeur se dégage par simple attouchement. En effet, la localisation des huiles essentielles est très externe ; elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève (**Dupont 2012**). La forme de la fleur (une corolle zygomorphe avec perte de l'étamine supérieure) et la présence d'huiles essentielles signent donc l'appartenance à cette famille. L'appareil végétatif comprenant une tige à section carrée et des feuilles opposées sont aussi des caractéristiques.



**Figure 12 : A : Fleur de *Mentha spicata*
(Emerso, 2004)**

**B : Feuilles de *Mentha spicata*
(Dani, 2010)**

4.4. Classification botanique :

Les Menthes, formée de près de 3500 espèces réparties sur 8 sous-familles (**Bruneton, 1993**). Près de la moitié (47 %) des Lamiacées sont regroupées dans la sous-famille des nepetoideae. Le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. (**Tucker et Naczi, 2007**)
(Tableau 04)

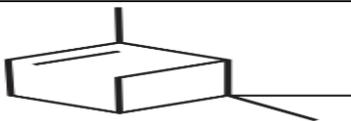
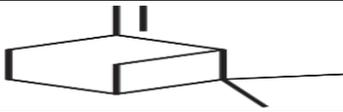
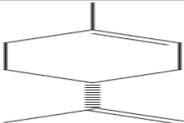
Tableau 04 : Classification botanique de *Mentha spicata* L (Croquist , 1981)

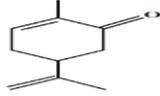
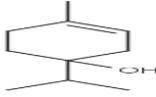
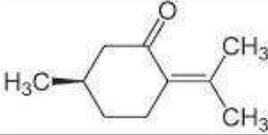
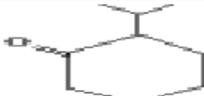
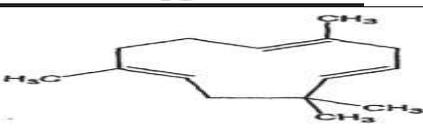
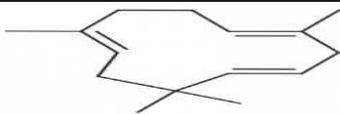
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	Mentha
Espèce	<i>Mentha Spicata</i> L

4.10. Caractéristiques et composition chimique de l'huile essentielle de la menthe :

La composition chimique des huiles essentielles est variable d'une région à une autre. Généralement, l'huile de menthe est composée essentiellement du (-) -carvone qui est le constituant majeur d'essence de menthe verte, un isomère pinene, (-) -limonene, un isomère phellandrene, 1,8-cineole, linalool, un certain dihydrocumyl et des esters dihydrocarveol (Brian, 2007). Le menthol de l'huile essentielle en bon état (40 – 90 %) est un ingrédient le plus important (Doymaz, 2006) (Tableau 05).

Tableau 05 : La composition chimique de l'HE de *Mentha spicata* L. (Boukhobza 2014)

Nom	Famille chimique	Molécule
α -pinene	Hydrocarbure monoterpénique	
β -pinene	Hydrocarbure monoterpénique	
β -myrcene	Hydrocarbure monoterpénique	
Limonene	Hydrocarbure monoterpénique	
1,8 – Cineole	Oxyde monoterpénique	

R-carvone	Cétone	
Terpinen-4-ol	Alcool monoterpénique	
Pulegone	Cétone	
Menthone	Cétone	
β -caryophyllène	Hydrocarbure Sesquiterpénique	
α -humulène	Sesquiterpène monocyclique	

4.6. Principe actif :

Le composant majeur de la menthe c'est la carvone (2-méthyl-5-(1-méthyléthényl)-2-cyclohexén-1-one) (**Figure 13**) appartient à la famille des terpènes et possède un carbone asymétrique. Elle existe sous deux formes, des énantiomères, qui ont les mêmes propriétés chimiques et physiques, mais un pouvoir rotatoire différent. C'est la R- ou L-carvone que l'on retrouve dans la menthe verte. Son énantiomère, la S- ou D-carvone est retrouvée dans les essences des graines de carvi. On observe une particularité entre ces 2 énantiomères : ils n'ont pas la même odeur. Cet exemple connu montre que des odeurs très différentes sont provoquées par une interaction olfactive avec deux terpènes qui ne se différencient l'un de l'autre que par leurs qualités d'énantiomères (**Jouault 2012**).

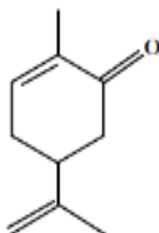


Figure 13 : Molécule de carvone (**Govindarajan 2012**)

4.7. Utilisations de la menthe verte

La menthe est largement utilisée en :

4.7.1. Cuisine :

On l'utilise en infusion, le thé à la menthe étant concocté en laissant infuser environ 100 feuilles de menthe fraîche par litre d'eau. Dans le même esprit, elle est l'un des ingrédients du mojito (à consommer avec modération) ou du sirop à la menthe (en faisant bouillir la menthe avec du sucre dans de l'eau) (**Franchomme 2001**).

4.7.2. Thérapie :

L'usage de la menthe diffère en fonction des espèces mais les propriétés thérapeutiques qu'elle possède sont communes car : elle stimule la sécrétion des sucs digestifs, limite les ballonnements et les diarrhées et stimule la sécrétion biliaire, elle est aussi efficace en cas d'inappétence et recommandée en cas de troubles gastriques et de crampes. D'un autre côté, la menthe pouliot agit en tant que produit digestif, carminatif et désinfectant (**El Fadl et Chtaina ,2010**). Efficace pour le traitement de la chimiothérapie induite par les nausées et les vomissements chez des patients.

4.7.3. Cosmétique :

Le menthol de l'huile essentielle en bon état (40 – 90 %) est un ingrédient de plusieurs produits de beauté telle que les crèmes et de quelques parfums, Les feuilles de la menthe en poudre ont été utilisées pour blanchir des dents, antiseptique, des raines de bouche (**Aghfir et al.,2008**)

4.8. Intérêts de *Mentha spicata* en thérapeutique

Les réactions chimiques des huiles essentielles sont influencées par leur composition chimique, qui peut varier selon la partie de la plante utilisée, les saisons, les méthodes d'extraction, les conditions écologiques et les temps d'extraction (**Isman 2007**). Les variations de chémotypes affectent donc directement leur activité biologique.

Les espèces du genre *Mentha* sont généralement connues sous le nom de « nanaa » en Algérie (**Brahmi, 2016**), elles sont utilisées comme adoucissant et comme protecteur (contre les crevasses et les piqûres d'insectes) ainsi dans le traitement de plusieurs problèmes tel que (circulatoires , gynécologiques , et des problèmes liés au système nerveux ,le choléra , l'hépatite virale , l'haleine , le mal d'humeur , et des maladies causées nominale des parasites intestinaux des vertiges et des problèmes sexuels en les mélangeant avec d'autres huiles essentielles à des doses bien définies . De plus, elles présentent des propriétés bactéricides (**Scherer 2013 ; alimentaire (Bounihi, 2016 ; Johnson et al., 2011)**).

Des travaux menés sur les huiles essentielles provenant d'espèces de *Mentha* ont montré qu'elle possède une forte activité : antioxydante - anti-inflammatoires - cytotoxique et anti-cancéreuses – antivirales – antibactérienne et antifongique (**Martins 2012 ; Brahmi et al ; 2012**).

4.8.1. Activités Antioxydante :

Une étude récente menée par **Brahmi et al., (2015)**, a montré que l'extrait éthanolique et hexanique de *Mentha Spicata* révèle une richesse en composés phénoliques et possède une activité anti-radicalaire élevée (DPPH, ABTS•+ et super oxyde). De plus, une autre étude faite par Javan et al., (**2013**) à indiquer que l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* permet l'inhibition du radical DPPH à une IC50 de 12 µg/ml par rapport à la BHT qui présente une IC50 de 5 µg/ml ; ce qui fait que l'extrait éthanolique de *Mentha spicata* présente une forte capacité antioxydant.

4.8.2. Activités Anti-inflammatoires :

Une étude biologique effectuée sur la plante de *Mentha Spicata*, a montré que l'extrait méthanolique de cette plante à une propriété anti-inflammatoire, ce qui justifie son utilisation en tant que médicament anti-inflammatoire en médecine traditionnelle (**Patwary et al.,2013**). Une autre étude effectuée par Arumugam et al., (**2008**) ont évalué, in-vivo, l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux du chloroforme, d'éthyle acétate et hexanique de l'espèce *M. spicata* L. et ils ont observé que les deux extraits, aqueux et d'éthyle acétate sont les plus efficaces dans la réduction de l'inflammation aiguë et chronique chez les rats.

4.8.3. Activités cytotoxiques et anti-cancéreuses :

Plusieurs études ont indiqué que les menthes contiennent des composants avec des propriétés cytotoxiques, ce qui pourrait être utile dans le développement d'agents anticancéreux. Par exemple, les extraits des espèces *M. arvensis* L. et *M. spicata* L. ont montré un effet antiprolifératif vis-à-vis des cellules cancéreuses, in vitro (**Sharma et al., 2014**).

4.8.4. Activités antivirales :

Les propriétés antivirales ont été approuvées pour plusieurs espèces de menthes. Les huiles essentielles de *M. spicata* et *M.x piperita* ont été évaluées pour leurs activités antivirales contre l'herpès simplex de type-1 (HSV-1) et la para-influenza de type-3. Les deux huiles ont exhibé une activité antivirale plus forte contre l'herpès HSV-1 (**Orhan et al., 2012**).

4.8.5. Activités antibactériennes et antifongiques :

Les activités antibactériennes et antifongiques des menthes ont été testées sur plusieurs bactéries et champignons (**Brahmi et al., 2016 ; De Sousa Barros et al., 2015 ; Riahi et al., 2013 ; Saikh et al., 2014**). Les huiles essentielles des menthes possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes à l'homme, aux plantes et aux aliments (**Tyagi and Malik, 2011 ; Hussain et al., 2010**). Les études portées sur l'activité antibactérienne ou

antifongique des extraits de menthes demeurent nettement inférieures aux huiles essentielles. Néanmoins, les extraits de menthes ont révélé un pouvoir antibactérien (**Biswas et al., 2014 ; Verma et al., 2013**) et un pouvoir antifongique (**Hussain et al., 2010 ; Gulluce et al., 2007**). D'autre étude récente menée par **Barchan et al. (2015)** ont démontré par la technique de diffusion en puits que les souches *Listeria monocytogenes* 4031, *Enterococcus hirae* 4081, *Staphylococcus aureus* 976 sont sensibles vis-à-vis des extraits méthanoliques des feuilles de *Mentha spicata* L avec des diamètres supérieurs à 12 mm

4.10. Toxicité de la menthe :

L'HE de menthe peut causer des brûlures d'estomac. Par exemple, la menthe poivrée peut irriter les muqueuses de la bouche et de rares cas d'allergie cutanée à la menthe ont été rapportés (Société Canadienne de Recherche sur les PSM). Le menthol est moyennement toxique, son utilisation est contre-indiquée chez l'enfant (**Galeotti et al ; 2002, Wasnere et al ; 2004**). la Menthe pouliot a été reliée à des cas de toxicité rénale et hépatique, des convulsions, des dommages neurologiques (**AMPD. 2007**) l'huile essentielle de *M. spicata* s'est montrée inefficace aux faibles doses (**Sellami et al ;2013**)

MATÉRIEL ET MÉTHODE

5. Matériel et méthode

5.1. Matériel végétale

Le matériel végétal a été récolté dans la région de Sidi Maamar de la Wilaya de Saida durant le mois de Décembre 2015. L'identification de l'espèce végétale est réalisée par les botanistes de notre laboratoire de Biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes de l'université de Saida – Algérie

Après la collecte de la plante fraîche, les impuretés ont été enlevées, et la plante a été étalée sur le sol et laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 15 jours. Une fois la plante séchée, les feuilles sont broyées, à l'aide d'un broyeur électrique à usage domestique model (Moulinex). (Fig 14: A-B et C). Puis stockées dans des boîtes pour l'extraction. (Brahmi et al.,2016)



Fig 14 : A : *Mentha sp* à l'état frais B : *Mentha sp* sèche C : Le broyat

5.1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été faite par la méthode de l'hydrodistillation, le protocole de cette méthode consiste à immerger de 30g de broyat de *Mentha Spicata* dans une fiole jaugée thermorésistante, avec 600 ml d'eau distillée, L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 à 4 heures. La vapeur émise sera condensée grâce à un système de refroidissement à eau, puis elle sera collectée dans un flacon opaque. A la fin de l'expérimentation le liquide collecté est mis dans une ampoule a décanté afin de séparer les deux phases (aqueuse et organique) pour obtenir l'huile essentielle (Benayad, 2008 ; Boussad, 2007). (Figure 15)



A- Hydrodistillation

B-Ampoule à décanter

Fig 15 : Photos Originales

5.1.2. Conservation de l'huile essentielle obtenue :

L'huile essentielle (HE) extraite est conservée à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre fermé et bien enveloppé par un papier aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière (Nelly Grosjean, 2007). (Figure 16)



Fig 16 : l'huile essentielle de *Mentha spicata* obtenue après l'extraction

5.1.3. Détermination du rendement d'extraction :

Le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). (Haj ammar et al., 2009). Il est donné par la formule suivante :

$$RHE = M'/M.100$$

RHE : rendement en huile essentielle de *Mentha spicata* (%)

M': masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g)

M : masse de *Mentha spicata* utilisée en gramme (g)

5.1.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG /SM :

L'étude analytique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* a été réalisée, au laboratoire d'analyse de contrôle de la qualité AL-AFFAK d'Oran, par chromatographie en phase gazeuse type VARIAN CHROMPACK - CP 3900 par injection de 0,1 µl d'extrait. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium He d'un débit de 0,5 ml/min. La colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP. Chivasil-Dex CB Fused silica WCOTVF5, de 25 m de longueur et de 0,25 mm de diamètre intérieur. L'épaisseur de la phase stationnaire est de 0,25µm; la programmation de la température de la colonne initiale d'injection est de 70°C pendant 2,50 min, puis s'élève par palier de 15°C/min à 280°C; le détecteur utilisé pour cette analyse est de type spectrométrie de masse (Saturne 20200) avec une température de 280°C. L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés.

5.1.5. Préparation de solution injectable :

L'huile essentielle de *Mentha spicata* est diluée dans de l'eau bi distillée et quelques gouttes de Tween 80 pour la préparation d'une solution de dose 0.1 ml/kg (Halder et al., 2011).

5.2. Origine des animaux d'expérimentations :

Dans notre protocole expérimental, le modèle animal choisi est le rat albinos de la souche *Wistar*, pesant 200±50 grammes, provenant de l'animalerie locale soumise à un cycle de lumière constant 12h (lumière/obscurité) du département de biologie (Université de Dr Moulay Tahar-Saida). Les animaux séjournent dans des cages conventionnelles avec libre accès à l'eau et de nourriture standard (AL ALF) dans une animalerie à une température de 20 à 22°C (Tableau 06)

Tableau 06 : Composition du régime d'entretien (régime standard).

Composition	Quantité (%)
Protéines	17
M. Grasses	3.3
Cellulose	5.5
Humidité	14
Cendre brute	7.5
Additifs	Vitamines

5.2.1. Répartition des groupes

En premier lieu nous avons répartis 18 rats (6 mâles/12 femelles), pesant 200 ± 50 g, en 2 groupes :

Groupe Pb-Mn : 9 rats (3♂, 6♀) constituent le lot des rats exposés au plomb et manganèse, recevant par voie orale l'acétate de plomb ($C_4H_6Pb_2H_2O$) solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 0.2% et du chlorure de manganèse tétrahydraté ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 4.79 mg/ml (**Kahloula et al.,2009 ; Monila et al. ,2011**)

Groupe T : 9 rats (3♂, 6♀) constituent le lot de témoins (T) reçoit d'eau distillée.

Les rats sont groupés par 3 dans des cages à raison de 1 mâle et 2 femelles durant toute la période d'accouplement, qui a duré 7 jours. Ensuite, les femelles ont été séparées des mâles durant leurs périodes de gestation.

Une fois les ratons des deux groupes en mis bas, les ratons ont été sevrés après une période de 21 jours, et séparés en 4 sous-groupes :

Sous-groupe IN : ratons intoxiqués au plomb et manganèse.

Sous-groupe IN-HEM : ratons intoxiqués au plomb et manganèse et traités par l'huile essentielle de *Mentha spicata*

Sous-groupe T : ratons témoins recevant de l'eau distillée

Sous-groupe T-HEM : ratons témoins recevant de l'eau distillée et traités par l'huile essentielle de *Mentha spicata* (**Tableau 07**)

Tableau 07 : Répartition des groupes

	Pb-Mn		Temoin	
Début de l'accouplement	9 rats (3♂ v 6♀)		9 rats (3♂ v 6♀)	
24H après le sevrage	Pb-Mn	Pb-Mn-HEM	T	T-HEM
Nombre de Rat dans chaque lot	7	7	7	7

5.2.2. La répartition chronologique des protocoles expérimentaux

Chronologie du protocole expérimental des quatre lots des rats (Pb-Mn , Pb-Mn-HEM, T et T-HEM) est représenté par la **figure 17**. 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 (**J₇₋₂₈**). Les rats nouveaux nés sont également Co-exposés au plomb et au manganèse jusqu'au **J₇₅** après la naissance. Au **J₅₃**, ces jeunes rats reçoivent une solution injectable d'HEM par la voie intra péritonéale pendant une durée de 21 jours et qui sont soumis à leur tour à différents tests comportementaux au **J₆₈**, à la fin on sacrifie les rats pour récupérer le sang et les organes selon l'ordre chronologique indiqué dans la (**figure 17**).

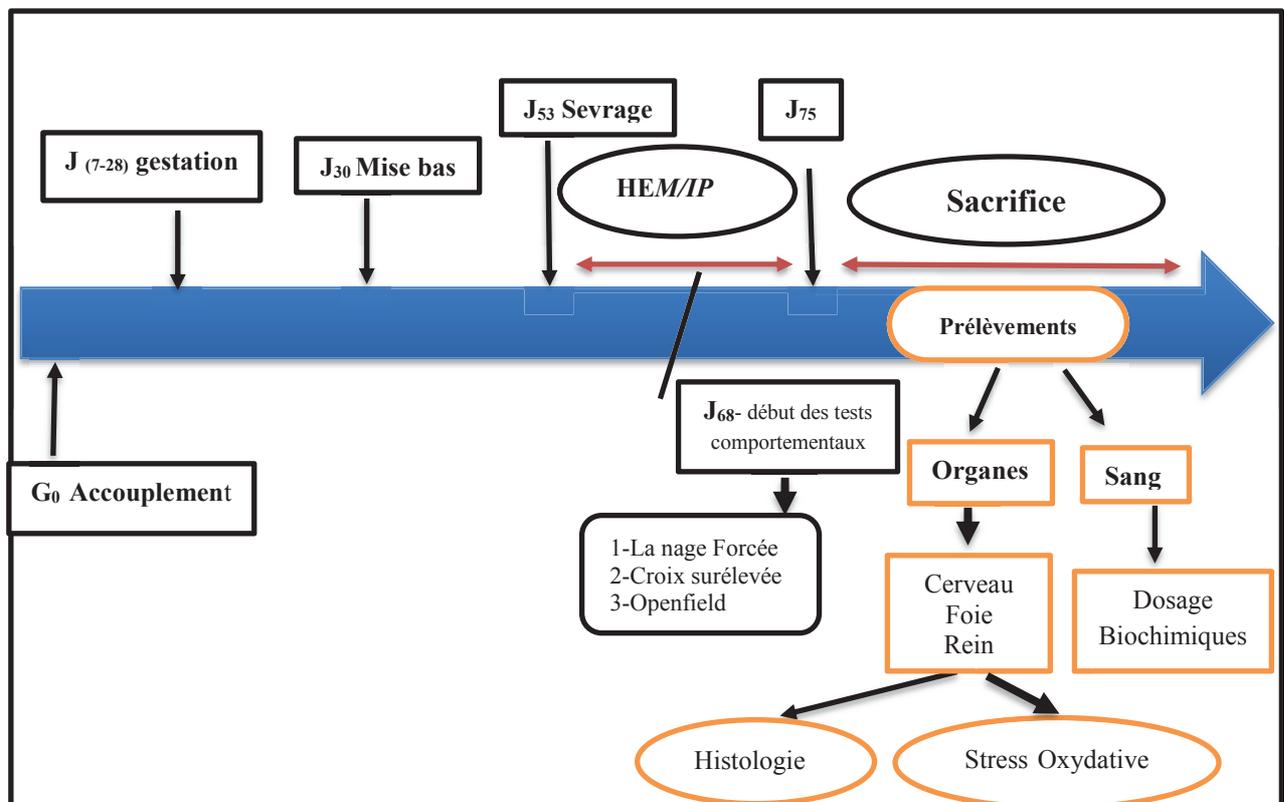


Fig 17 : Chronologie du protocole expérimental

5.2.3. Observation macroscopique :

Aucune mortalité n'a été enregistrée durant la période d'expérimentation, mais plusieurs anomalies ont été détectées au sein des rats intoxiqués par rapport aux rats témoins. Perte de poids, ralentissement dans la croissance des jeunes rats et chute de poils

5.2.4. Evolution du poids corporel et poids des organes

Le poids corporel de chaque rat a été noté chaque jour durant la durée de l'expérience (21 jours) ensuite, après sacrifice des rats, le poids des cerveaux, des foies, et les reins des quatre lots a été enregistré.

5.3. Evaluation comportementale

Le jour du test comportemental, la cage d'hébergement des rats est placée dans la pièce d'expérimentation une heure avant le test, afin que les rats s'habituent à ce nouvel environnement. Les différents groupes effectuent les tests comportementaux suivants : La nage forcée, Croix surélevée et Open Field.

5.3.1. Test de la nage forcée

Le test de la nage forcée (**forced swim test = FST**) est aussi appelé test de **Porsolt**, du nom du scientifique qui l'a découvert, ce test est utilisé pour évaluer l'état dépressif des rats.

Le principe de ce test réside dans sa relation supposée avec un comportement de résignation. C'est un test comportemental surtout utilisé pour prédire l'efficacité d'un traitement antidépresseur (**Porsolt et al, 1978**). Il consiste de déposer délicatement le rat dans un cylindre de 20.7 cm de diamètre et 39 cm de hauteur contenant 15 cm d'eau à 22°C et à les y laisser durant 6 minutes (**Fig. 18**). Au bout de quelques minutes, la proportion de temps passé à nager diminue au profit du comportement d'immobilité, c'est-à-dire que l'animal flotte passivement en n'effectuant que les mouvements nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité est un indicateur de l'état pseudo-dépressif. Après chaque session de nage, l'animal est séché rapidement avec une serviette, puis replacé dans sa cage d'hébergement. L'eau du cylindre est changée entre chaque animal (**Benabid et al, 2008**)



Figure 18 : Le test de la nage forcée

5.3.2. Tests de labyrinthe en croix surélevé (EPM)

Le dispositif consiste en un labyrinthe surélevé à 53 cm au-dessus du sol, ce test utilisé pour évaluer l'état anxieux des rats. Il comporte quatre bras ($L = 50 \text{ cm} \times l = 10 \text{ cm}$) opposés deux à deux ; deux de ces bras sont fermés par des parois latérales de 30 cm de haut tandis que deux autres sont ouverts. Les bras sont reliés par une plate-forme centrale ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). Le sol de l'ensemble est noir. La pièce est faiblement éclairée par une lampe halogène d'intensité réglable. Ce dispositif est surmonté d'une caméra vidéo permettant d'enregistrer le comportement de l'animal pendant la durée du test (**Fig 19**).

Ce test exploite le conflit entre le désir d'explorer le dispositif des rats et leur peur naturelle des espaces ouverts. Chaque rat est placé sur le carré central face à un bras ouvert et son comportement d'exploration est enregistré pendant une période de 5 minutes. Le plancher est nettoyé à l'éthanol 10% entre chaque rat afin d'éviter toute odeur pouvant modifier le comportement de l'animal suivant. Les paramètres analysés sont le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts (BO) et fermés (BF) (**Pellow *et al*, 1985; Alicia *et al*, 2007**).



Figure 19 : Le test de labyrinthe en croix surélevé (EPM)

5.3.3. Tests L'Openfield :

Ce test est utilisé pour évaluer l'état de l'activité locomotrice des rats. L'open field est un paradigme expérimental utilisé pour mesurer l'activité générale des animaux (locomotrice, exploratoire) dans un environnement nouveau. Il est constitué d'une enceinte rectangulaire (75x75x35cm), divisée au sol par des carreaux de 10 cm chacun. Le comportement de l'animal est analysé pendant la durée où l'animal se trouve dans l'open field. **(Fig 20)**

Les rats sont placés dans l'open field, tournés vers un des coins de l'enceinte. Le nombre de carreaux traversés, de redressements, de toilettages, de défécations, le temps de latence et le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre sont comptabilisés pendant 6 minutes. A la fin des 6 minutes, les animaux sont replacés dans leurs cages d'habitation **(Carola et al.,2002)**

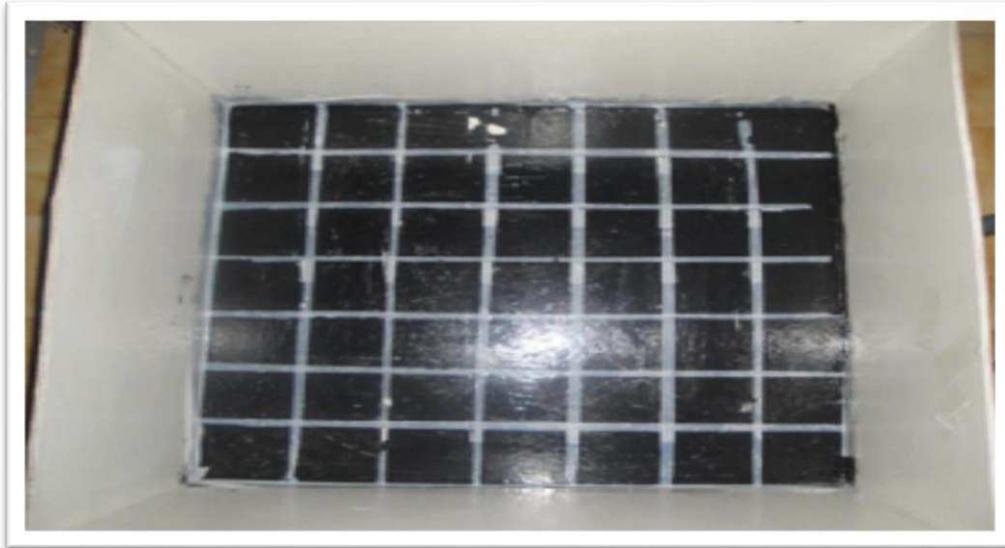


Figure 20: Le test d'Open Field.

5.4. Sacrifice des rats

A la fin de l'expérimentation, 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 récupéré dans des tubes EDTA pour le dosage de la plombémie et le taux de manganèse sanguin et dans des tubes héparines pour les analyses biochimiques. Le corps de l'animal est ouvert les organes (cerveau, foie et rein) sont soigneusement prélevée, rincé avec du l'eau physiologique (NaCl à 0,9%) froid, séché puis mesuré et pesé. Les organes sont fixés dans du formol à 1/10ème pour but de les étudies ultérieurement par les techniques histologiques. (Ait hamadouche, 2009).

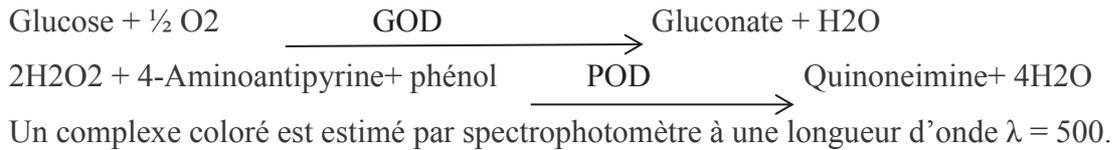
5.5. Dosages biochimiques

5.5.1 Détermination de la plombémie et du taux de manganèse sanguin

Après le sevrage et traitement à l'huile essentielle de *Mentha spicata*, les animaux sont décapités et les échantillons de sang total (100 μ l) sont récupérés dans un tube à hémolyse de 5ml contenant un volume de 100 μ l de triton à 0.1%. Après agitation au vortex pendant 30 secondes, 600 μ l de HNO_3 (1M) est ajouté pour déprotéiniser. Agitation du contenu du tube à hémolyse au vortex pendant 10 minutes à température ambiante. Après une centrifugation pendant 10 minutes à 3000 tours/min, les échantillons sont transvasés dans des godets pour déterminer la plombémie et le taux de manganèse sanguin en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique (SHIMA DZU AA6200).

5.5.2. Dosage de la glycémie :

Le dosage du glucose est effectué sur le sérum après séparation du sang. Le glucose sanguin est estimé en utilisant le kit Bio Systems selon les réactions couplées suivantes :



5.5.3. Evaluation des marqueurs du fonctionnement rénal

A. Dosage de l'urée

L'urée dans le sérum a été déterminée en utilisant le diacetylmonoxime ; l'urée est catabolisée par l'uréase en libérant de 2NH_3 , le glutamate déshydrogène catalyse l'animation réductrice de l' α -cétooglutarate en présence de NH_3 et de NADH , H^+ , pour former le glutamate et le NAD^+ ; la diminution de la concentration de NADH , H^+ , directement proportionnelle à la concentration d'ammoniaque, est évaluée à 340 mn (Kits Biomatérieux).

B. Dosage de créatinine

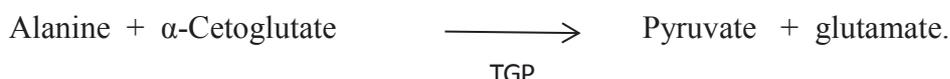
La créatinine a été déterminée dans le sérum par la réaction de Jaffé, selon la description de **Cook (1975)**. La méthode utilisée pour le dosage de la créatinine est une méthode colorimétrique.

Créatinine + acide picrique (pH alcalin) \rightarrow complexe jaune orange
 La réaction s'effectue dans un milieu alcalin, et la créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate formant ainsi un complexe créatinine picrate. Le taux d'augmentation de l'absorbance à 500 nm dû à la concentration de la créatinine dans l'échantillon.

5.5.4. Evaluation des marqueurs du fonctionnement hépatique

A. Dosage des transaminases (TGO-TGP)

L'aspartate aminotransférase ASAT (TGP) et l'alanine aminotransférase ALAT (TGO), font partie d'un groupe d'enzymes, les aminotransférases ou transaminases, qui catalysent la transformation réversible des acides α -cétoniques en acides aminés par transfert de groupes amines. L. Aspartate + α -cetoglutarate $\xrightarrow{\text{TGO}}$ Oxaloacétique + L. glutamate.



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de ces enzymes dans le sang, calculé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505nm à l'aide d'un Kit Chronolab.

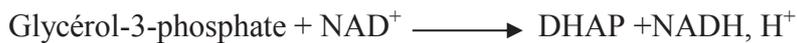
B. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) :

La méthode utilisée pour le dosage de la (PAL) est une méthode colorimétrique Kit Chronolab. En milieu alcalin et sous l'action des phosphatases alcalines, le p-nitrophénylphosphate est hydrolysé en P-nitrophénol et phosphate. La vitesse d'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline.

5.5.5. Evaluation des paramètres lipidiques

A. Dosage des triglycérides

Nous avons utilisé la méthode **Fossati (1974)** pour le dosage des triglycérides dans le sérum respectivement. Elles reposent sur le dosage enzymatique du glycérol libéré après hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines par la lipase.



Elle est effectuée à pH = 9,4 en présence de magnésium et d'hydrazine. On lit l'absorbance à 340nm.

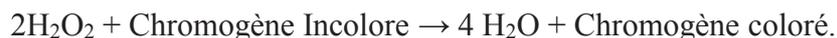
B. Dosage de Cholestérol

Nous avons utilisé la méthode de Thomas (1992) : Une première réaction fait en sorte que les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre par une cholestérol estérase. Le cholestérol qui est entièrement libre réagit avec l'oxygène en présence de cholestérol oxydase pour donner de la cholesténone (l'hydroxyle en position, devient cétone) et du H₂O₂. Le peroxyde formé est réduit en H₂O par un indicateur en présence de peroxydase (on mesure la quinone-imine produite à 500 nm).

Cholestérol estérase : (stérides + cholestérol libre) + H₂O → cholestérol total libre

Cholestérol oxydase : cholestérol total libre + O₂ → Cholesténone + H₂O₂

Peroxydase:



C. Dosage de l'albumine

Le dosage de l'albumine est effectué par la méthode colorimétrique (Kit BioSystems). La réaction de l'albumine avec le vert de bromocrésol en milieu acide, en donnant lieu à un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 630 nm.

5.5.6. Evaluation du statut antioxydant

A. Préparation des érythrocytes :

Les échantillons de sang ont été récupérés et après une centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min. Le sérum est soigneusement prélevé et les cellules du sang sont lavées trois fois par une solution saline à 0.9 g/l, la lyse des cellules est effectuée par addition de l'eau distillée glacée et incubée pendant 15 min dans la glace. Le surnageant employé ensuite pour le dosage des enzymes antioxydants érythrocytaires marqueurs du statut oxydant après centrifugation à 5000tr/min pendant 5min (**Rotruck et al., 1973, Hocine, 2011, Adli, 2015**).

B. Préparation des tissus cérébrale, hépatique et rénal

Le cerveau, le foie et le rein des rats sont lavé, séché puis 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 /4ml 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 recentrifugé 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**).

➤ **Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été déterminée selon la méthode décrite par Kakkar et al., (1984) ; Le principe du dosage de l'activité de la SOD est basée sur l'inhibition de la formation de l'adénine nicotinamide dinucleotide, methosulfate de phenazine et d' amino tetrazolium blue de formazane (NBT).

➤ **Catalase (CAT EC 1.11.1.6)**

L'activité de la CAT a été mesurée par la méthode d'Aebi (1984) et 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)) ; est mesuré par spectrophotométrie à partir des variations de l'absorbance à 620nm. L'activité de la catalase a été exprimée en unités internationales (U.I./g de tissu (c.-à-d. en mol H₂O₂ détruit/min/g de tissu, à 25 C).

➤ **Glutathion peroxydase (GSH-Px, EC 1.11.1.9)**

L'activité de GSH-Px 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 tissue (homogène 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%).

5.6. Etude histologique des organes :

La réalisation des coupes histologiques a été réalisé au niveau du Laboratoire de Pathologie (Cytologie et d'Anatomie) au niveau du CHU Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbes et institut des sciences vétérinaires a université de Tiaret. Les organes prélevés (foie, rein) sont soumis préalablement aux différentes étapes qui sont :

5.6.1. Fixation :

La fixation est immédiate après le prélèvement pour empêcher une putréfaction (altération microbienne) du tissu ou par autolyse (destruction tissulaire par les enzymes qu'il contient en lui-même), ainsi garder les constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant. Le volume du fixateur doit être 20 à 50 fois celui du prélèvement. Les organes séjournent 24 à 48 heures dans le fixateur et doivent être totalement immergés (**Plenat et al., 2007**).

5.6.2. 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. (Ait Hamadouche., 2010)

5.6.3. Coupe, étalement des coupes et coloration :

Le microtome permet d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 3 à 5 μ m. 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 a 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 (**Ait Hamadouche, 2010, Laquet, 2007**).

5.7. 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 (SEM). La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (one way Anova) avec le facteur intoxication (Pb-Mn, T). Les Anova à mesures répétées ont été utilisées pour l'analyse du facteur temps. Une probabilité $p < 0,05$ est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis).

*RÉSULTATS ET
INTERPRÉTATIONS*

6.1. Le rendement en l'huile essentielle :

Après l'hydrodistillation de la matière végétale de *Mentha spicata*. Le rendement calculé par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière végétal utilisé, exprimé en pourcentage (%) est égale à 0,83 %

6.2. Principaux composés de l'huile essentielle détectés CPG/SM :

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier les composants majeurs cité dans le **Tableau 08** par ordre d'élution. 12 composants représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés dont 96,71 % sont des monoterpènes cétones, 1.75 % sont des hydro carburants mono terpénique, 0,05 % des oxydes. Les composants majeurs de cette huile sont : Carvone (42.2%), Menthone (20.89%), Piperitenone (17.41%) and Isomenthone(7.99%).

Tableau 08 : Concentration en % et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

Determination	Temps de rétention (min)	Concentration (%)
α -pinéne	11,200	0,40
Sabinéne	12,080	0,56
β -pinéne	12,440	0,70
Octane-3-one	12,820	1,15
Paracyméne	13,600	0,09
1.8 cineole	14,110	0,05
Menthone	18,230	20,89
Isomenthone	18,710	7,99
Pulégone	21,460	0,05
Carvone	21,480	42,2
Piperiton	22,010	7,02
Piperiténone	23,150	17,41
Total identifiant		98,51

6.3. L'effet du plomb et manganèse et HEM sur la croissance corporelle :

Le poids corporel constitue un bon indicateur de la croissance des rats. Les résultats présentés dans le Tableau (09) montrent une réduction significative (* : $P < 0,05$) du poids corporel chez les rats Co-exposés au plomb et manganèse par rapport aux rats témoins durant toute l'expérience. En outre, nous avons observé une augmentation significative (* : $P < 0,05$) de la croissance des rats intoxiqués et traités par HEM comparativement aux rats non traité (intoxiqué).

Tableau 09 : L'évaluation de la croissance corporelle chez les différents sous-groupes de rats

Groupes (g)	T	HEM	Pb-Mn	Pb-Mn-HEM
Poids corporel(g)	95,03 ±1,70	100,56±0,7	67,88±1,35*	76,17 ±1,28*

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

6.4. Tests neurocomportementaux :

6.4.1. Effet du plomb et manganèse et HEM sur les performances dépressives mesurées par l'épreuve de la nage forcée (FST) :

La figure (21) illustre les effets du Pb-Mn sur le comportement des rats dans le test de la nage forcée. En effet, un seul paramètre mesuré est représenté sous forme d'histogramme dans la figure ci-dessous.

A. Temps d'immobilité (TIM) :

L'analyse statistique a montré que le temps d'immobilité (TIM) est significativement supérieur (p<0.05) chez les jeunes rats intoxiqués au plomb et au manganèse comparé à celui des rats témoins. Dans le même contexte, l'administration de HEM par voie intrapéritonéal a montré une augmentation de TIM des jeunes rats non intoxiqués et traité (HEM) par rapport aux rats témoins. Ainsi qu'une diminution significative (p<0.05) de TIM chez les rats intoxiqués traité par l'HEM (Pb-Mn-HEM) par rapport aux rats intoxiqués (**Figure 21**).

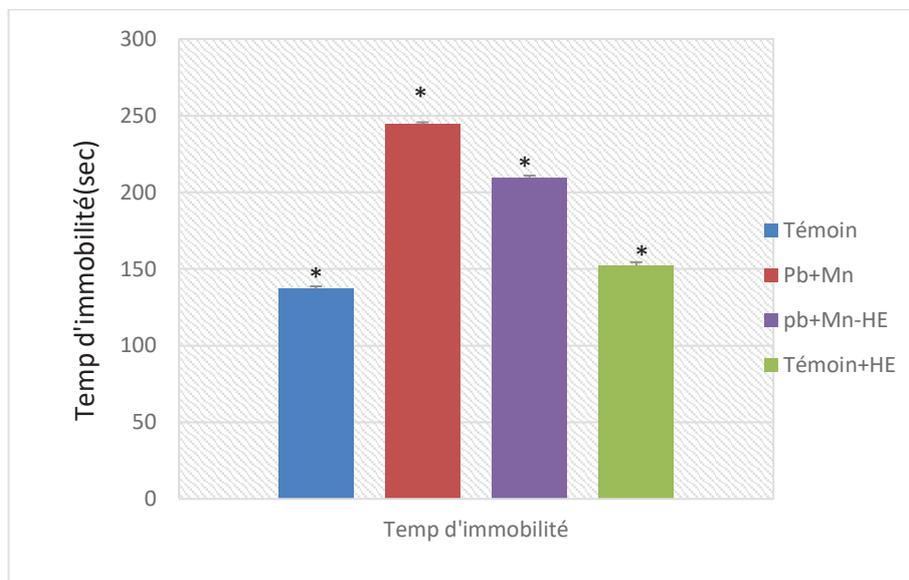


Figure 21 : Le temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins (T), intoxiqués au (Pb-Mn), intoxiqués et traités à l'HEM.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM ; Pb-Mn vs T (*: p<0.05) ; Pb-Mn-HE vs Pb-Mn (*: p<0.05).

6.4.2. Effet du plomb et manganèse et HEM sur les niveaux d'anxiété mesurés dans le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM)

La figure (22) illustre les effets du Pb-Mn sur le comportement des rats dans le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM) en effet, deux paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure ci-dessous.

A. Temps passé dans les bras ouverts (TBO)

L'analyse statistique montre une diminution significative ($p < 0.05$) de la durée de séjour dans les bras ouverts chez les rats intoxiqué par rapport aux rats témoins. Compte tenu que les rats ont une aversion pour les espaces ouverts et la hauteur. Un animal qui explore plus les bras ouverts sera considéré comme étant « peu anxieux », alors qu'un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif, sera lui, considéré, comme étant « anxieux ». Cependant, après le traitement de l'HEM par voie intrapéritonéal nous avons observé une amélioration de l'état de séjour dans les bras ouverts. (Figure 22).

B. Nombre d'entrée dans les bras ouverts (NBO)

L'analyse statistique montre que les jeunes rats intoxiqués aux Pb-Mn présentent une diminution du nombre de visite dans les BO par rapport aux rats témoins. Ces résultats confirment clairement que le plomb et manganèse induisent l'instauration d'un état de stress. D'autre part le traitement par l'HEC montre une augmentation du nombre de visite dans les BO comparativement aux rats intoxiqués.

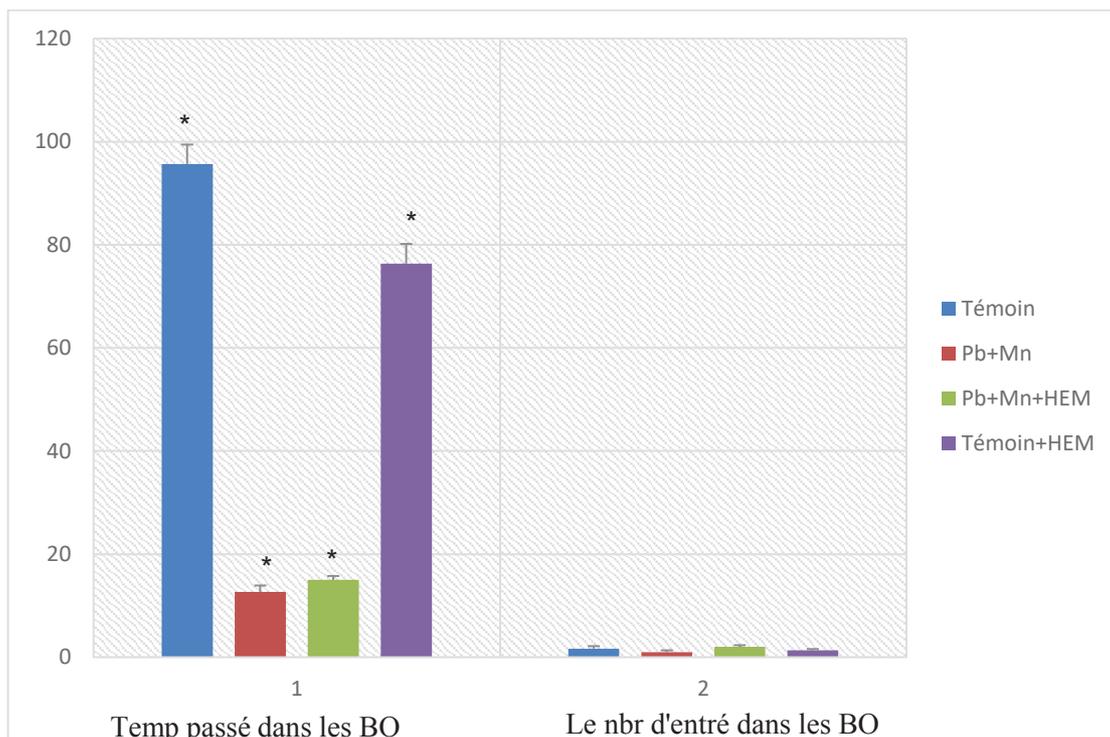


Figure 22 : Le temps de séjour dans les Bras ouverts durant le test du labyrinthe en croix surélevée des jeunes rats témoins (T), intoxiqués au (Pb-Mn), intoxiqués et traités à l'HEM. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p < 0.05$); Pb-Mn-HEM vs Pb (*: $p < 0.05$)

6.4.3. Effet du plomb et manganèse et HEM sur les niveaux de l'activité locomotrice mesurés dans L'Open Field (OFT)

La figure (23) illustre les effets du Pb-Mn sur le comportement des rats dans le test de L'Open Field (OFT). En effet, six paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure ci-dessous.

A. Temps de latence :

L'analyse statistique montre une augmentation significative ($p < 0.05$) du temps de latence chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn comparé aux rats témoins. En revanche, nous avons observé que l'injection de HEM entraîne une diminution significative ($p < 0.05$) du temps de latence chez les rats intoxiqués et traités par rapport aux rats Co-exposés aux Pb-Mn.

B. Nombre de carreaux traversés :

L'analyse statistique montre une hypoactivité locomotrice (horizontale) qui est représenté par le nombre de carreaux traversé chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn comparé aux rats témoins. En outre, l'injection de 0.1mg/kg de HEM montre une légère amélioration significative ($p < 0.05$) de l'activité locomotrice chez les rats intoxiqués et traités par rapport aux rats Co-exposés aux Pb-Mn.

C. Nombre de visite au centre :

L'analyse statistique montre une baisse significative de nombre de visite au centre chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn par rapport aux rats témoins ($p < 0.05$). Par ailleurs, après l'injection d'une dose de 0.1mg/kg de HEM, le nombre de visite au centre chez les rats Co-exposés et traités n'est plus modifier par rapport aux rats intoxiqués.

D. Redressement :

L'analyse statistique montre une hypoactivité locomotrice (verticale) qui est représenté par le redressement chez les rats Co-exposés au Pb-Mn comparé aux rats témoins. De plus, le traitement par HEM ne montre aucune amélioration de l'activité locomotrice chez les rats intoxiqués et traité par rapport aux rats Co-exposés aux Pb-Mn.

E. Parmi toutes les variables mesurées dans ce test, L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative de nombre de toilettages et de défécations entre les 4 groupes des rats.

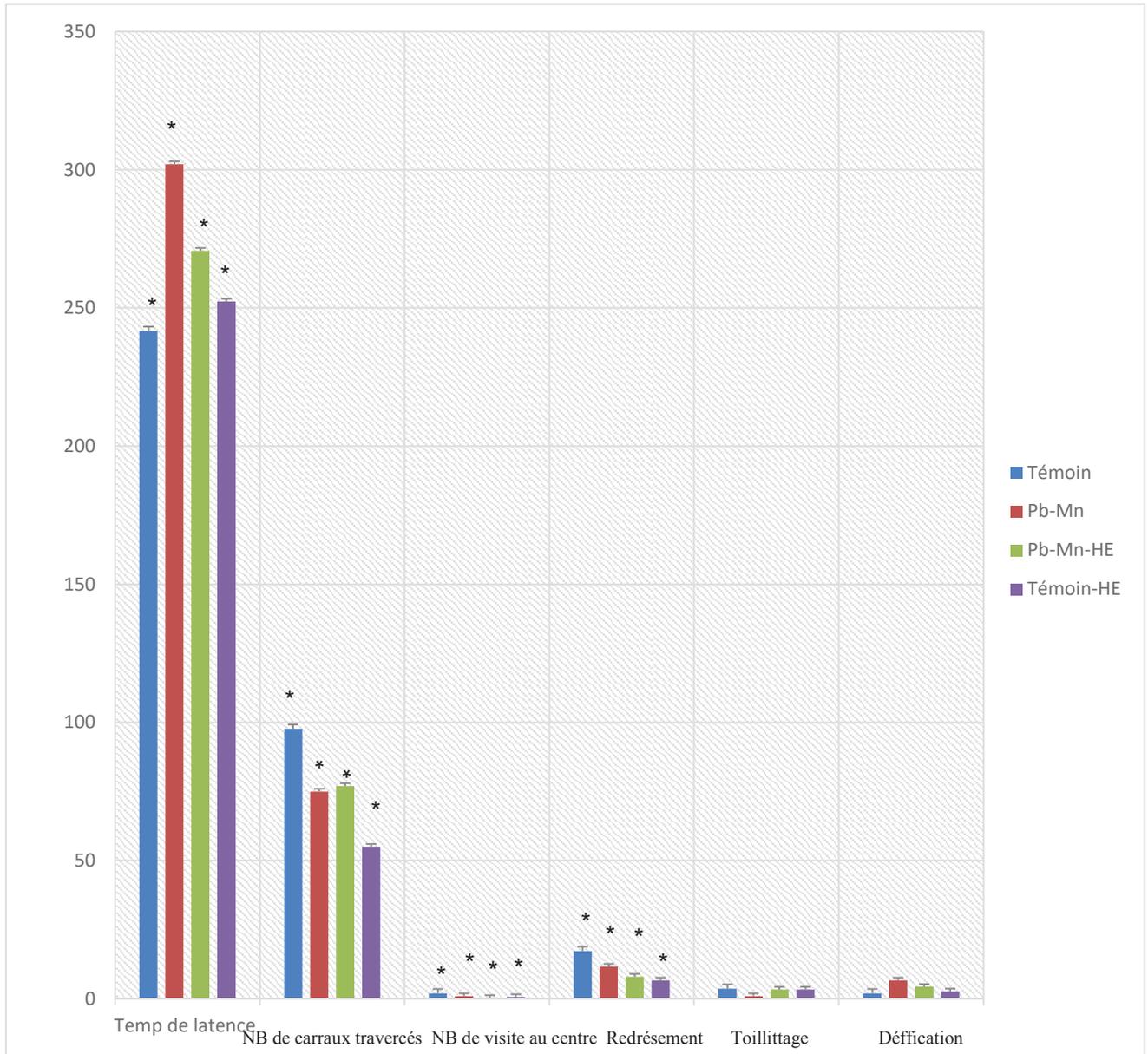


Figure 23 : La comparaison des différents paramètres du test d’Open-field entre les jeunes rats témoins, intoxiqués au Pb-Mn, intoxiqués et traités à l’HEM.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p < 0.05$) ; Pb-Mn-HEM vs Pb-Mn (*: $p < 0.05$).

6.5. Effet du plomb et manganèse sur les poids des Organes

A la fin de l’expérimentation, Les animaux sont sacrifiés par décapitation, les organes (cerveau, foie et rein) ont été prélevés et pesés.

Les résultats du **Tableau (10)** montrent une diminution significative ($P < 0.05$) du poids de cerveau, foie et rein chez les rats intoxiqués par le plomb et le manganèse par rapport aux rats témoins. Alors que l’administration par la voie intra-péritonéale de l’HE de « *Mentha spicata* »

chez les rats Co-exposés aux plomb et manganèse montrent une augmentation du poids des organes comparé aux rats intoxiqués.

Tableau 10 : Effet du plomb et manganèse sur les poids relatifs des Organes

Groupes (g)	Pb-Mn	HEM	Pb-Mn+HEM	T
Cerveau	1.23±0,026*	01.50 ±0,031*	1.39±0,028*	01,49±0,033*
Foie	4,26±0,26**	5.42±0,018	5,18±0,23**	5.48±0,006
Rein	0,354±0,038**	0,830±0,01	0,654±0,24**	0,837±0,02

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

6.6. Dosage Biochimique

6.6.1. Dosage de plombémie et du taux de manganèse sanguin :

Les résultats obtenus de dosages du plomb et manganèse sanguin par l'utilisation de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), montrent une augmentation de la plombémie et le taux de manganèse sanguin chez les rats intoxiqués par rapport aux rats témoins avec un pourcentage très faible du manganèse. En outre l'administration par la voie intra-péritonéale de l'HE de « *Mentha spicata* » chez les rats intoxiqués aux plomb et manganèse montrent une diminution du taux de Plomb et du taux de manganèse comparé aux rats Co exposée aux Pb-Mn (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Taux de la plombémie et de manganèse chez les différents sous-groupes de rats

	Pb-Mn	Pb-Mn+HE	Témoin	HEM
Plombémie (µg/dl)	34,1±0,81*	21,18± 4,01*	0,27±0,028	0,25±0,022
Taux du manganèse (µg/dl)	2,38± 0,02**	1,21±0,1**	1,03±0,1	0,99±0,04

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

6.6.2. Teneur plasmatique en glucose :

Les résultats de la **figure (24)** montrent une augmentation significative (P<0.05) du taux de glucose chez les rats intoxiqués par le plomb et le manganèse par rapport aux rats témoins. De plus une diminution significative (P<0.05) du taux de glucose est observée chez les animaux exposés au plomb et manganèse et traités par l'huile essentielle par rapport aux rats intoxiqués.

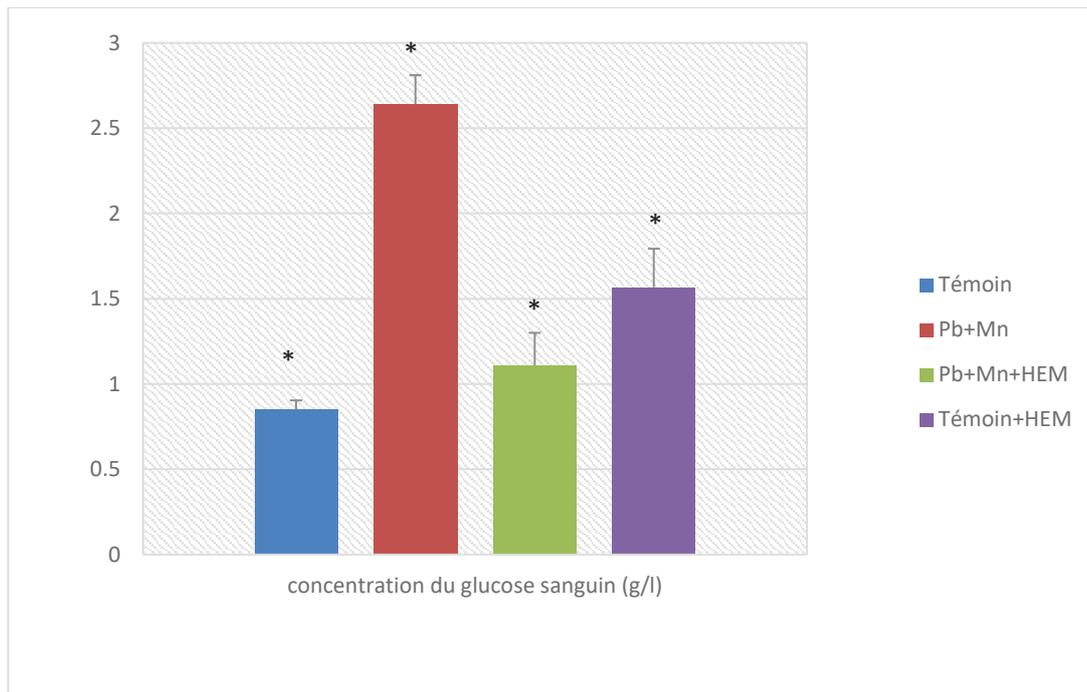


Figure 24 : Taux du glucose chez les différents sous-groupes de rats.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p < 0.05$) ; Pb-Mn-HE vs Pb-Mn (*: $p < 0.05$)

6.6.3. Effets du plomb et manganèse et HEM sur les biomarqueurs de la fonction rénale

L'analyse statistique des biomarqueurs rénaux à la fin de l'expérimentation montre une augmentation significative de la créatinine, et l'urée chez les rats Co-exposés par le Pb-Mn comparés aux rats témoins. Ce qui indique que ces deux métaux provoquent un dysfonctionnement rénal (**Tableau 12**). En revanche une nette correction des teneurs plasmatiques (créatinine et l'urée) est observée après 3 semaines de traitement par HEM chez les rats Co-exposés et traité par rapport aux rats Co-exposés aux Pb-Mn.

Tableau 12 : Effet de l'huile essentielle de la plante *M. Spicata* sur les biomarqueurs rénaux chez des rats Co-exposés par le Pb-Mn comparés aux rats témoins.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HEM	T	HEM
Urée (mg/dl)	4,40 \pm 0,20***	3,99 \pm 0,29***	2,72 \pm 0,18	2,89 \pm 0,20
Créatinine (mg/dl)	10,84 \pm 0,25**	8,33 \pm 0,05**	7,40 \pm 0,38	7,55 \pm 0,22

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

6.6.4. Effets du plomb et manganèse et HEM sur les biomarqueurs de la fonction hépatique

L'analyse statistique des biomarqueurs de la fonction hépatique, montre une augmentation significative de l'activité des enzymes (l'ALT, AST et PAL) chez les rats Co-exposés aux (Pb-Mn) vis à vis aux rats témoins ($p < 0.05$). De plus le traitement par voie intrapéritonéal de HEM chez les rats Co-exposés au Pb-Mn a permis d'observer une diminution significative dans les activités transaminases (ALT, AST) et (PAL) comparée aux rats Co-exposés (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Effet de l'huile essentielle de la plante *M.spicata* sur les biomarqueurs de la fonction hépatique chez des rats intoxiqués par le Pb-Mn comparés aux rats témoins.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HE	Témoin	HEM
ALT (UI/l)	42,10±0,87*	26 ±0,21*	21,08 ±0,8	20,57±0,3
AST (UI/l)	36,79 ±0,4*	13,31 ±0,4*	11,37 ±0,3	10,98±0,1
Phosphatase alcaline (U /l)	59,82 ±0,30*	46,66 ±1,9*	43,39 ±0,10	42,86±0,14

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (*: $p < 0.05$).

6.6.5. Effets du plomb et manganèse et HEM sur le bilan lipidique et protéique

L'analyse statistique montre que la teneur en lipides plasmatiques essentiellement les triglycérides et le cholestérol total sont significativement supérieurs ($p < 0,01$) chez les rats Co-exposés au (Pb-Mn) comparé aux rats témoins. En outre, l'administration par la voie intrapéritonéale de l'HEM chez les rats préalablement exposés au Pb-Mn ont montré une réduction significative ($p < 0,01$) des triglycérides et le cholestérol total comparé au rats Co-exposés. Dans le même contexte une hypoalbuminémie significative ($p < 0,05$) a été observé chez les rats intoxiqué au Pb-Mn par rapport aux rats témoins. Par ailleurs, le traitement de 21j par HEM montre une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les rats Co-exposés et traité comparé aux rats témoins. (**Tableau 14**)

Tableau 14 : Effets de l'huile essentiel de *M.spicata* sur le bilan lipidique et protéique chez des rats intoxiqués par le Pb-Mn comparés aux rats témoins.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HEM	Témoin	HEM
Triglycérides (g /l)	0,89 ±0,02**	0,68 ±0,07**	0,63 ± 0,04	0,59±0,05
Cholestérol total (g/l)	2,66 ±0,02**	1,29 ±0,15**	1,09 ±0,03	1,05±0,02
Albumine (g/dl)	3,05 ±0,2*	4,78 ±0,14*	5,03±0,04	5,15±0,07

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

6.7. Evaluation du statut antioxydant

6.7.1. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'activité enzymatique du statut oxydatif érythrocytaire :

L'analyse statistique montre une diminution significative ($p < 0,05$) du SOD, de la CAT et de la GPx au niveau érythrocytaire chez les rats exposés au Pb-Mn pendant la période de gestation et de lactation par rapport aux rats témoins. De plus, après 21 jours de traitement par HEM chez les rats Co-exposés et traité, on a observé une nette correction de l'activité de ces enzymes comparativement aux rats Co-exposés aux Pb-Mn (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires (SOD, CAT, GPx) chez des rats intoxiqués et intoxiqués traités par HEM, témoins et traités.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HE	Témoin	HEM
SOD (U/mg de protéine)	18,70±0,37*	19,73±0,8*	24,73±1,85	21,73±0,51
CAT (U/mg de protéine)	10,64±1,02*	12,71±0,79*	14,41±0,58	14,56±0,7
GPx (U/mg de protéine)	9,43±0,57*	12,46±0,62*	14,89±0,067	14,94±0,02

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (*: $p < 0.05$).

6.7.2. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'activité enzymatique du statut oxydatif au niveau du cerveau :

a. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) :

L'analyse statistique montre que l'activité de SOD au niveau cérébral chez les rats Co-exposés au Pb-Mn pendant la période de développement est significativement diminuée ($p < 0.05$) par rapport aux rats témoins. En revanche après 21 jours de traitement par l'HEM on a observé une augmentation significative ($p < 0.05$) du SOD chez les rats Co-exposé et traité comparé aux rats Co-exposés aux Pb-Mn (**Figure 25**).

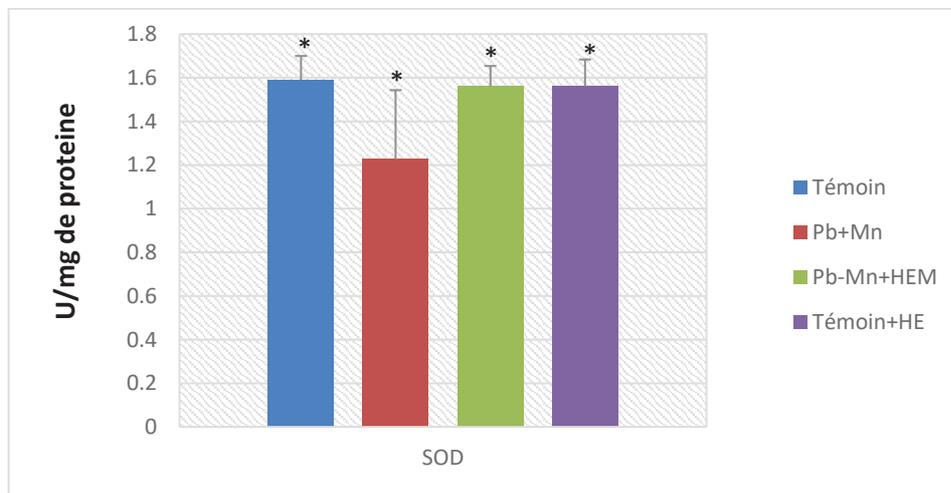


Figure 25 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la SOD cérébral
 Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p<0.05$) ; Pb-Mn-HEM vs Pb-Mn (*: $p<0.05$)

b. L'activité de la Catalase (CAT) :

L'analyse statistique montre une diminution significative ($p<0.05$) de l'activité de la CAT au niveau cérébral chez les rats Co-exposés au Pb-Mn comparé aux rats témoins. De plus le traitement par l'HEM chez les rats Co-exposés montre une nette amélioration dans l'activité de la CAT par rapport aux rats Co-exposés (**Figure 26**).

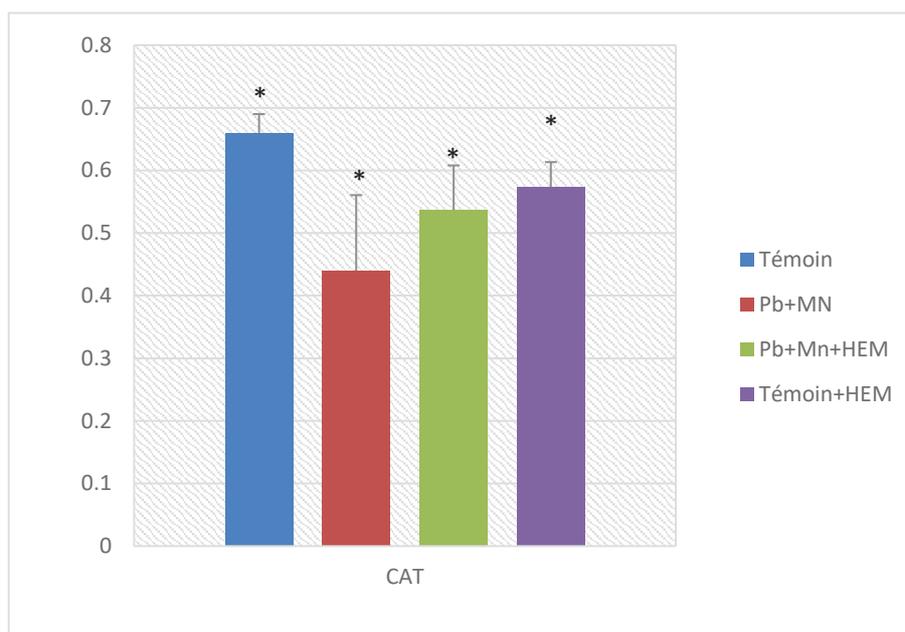


Figure 26 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la CAT cérébral
 Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p<0.05$) ; Pb-Mn-HEM vs Pb-Mn (*: $p<0.05$)

c. L'activité du glutathion peroxydase (GPx) :

Les analyses statistiques indiquent une baisse significative ($p<0.05$) de l'activité enzymatique du GPx chez les animaux Co-exposés au Pb-Mn comparés aux animaux témoins. Cependant, une augmentation significative ($p<0.05$) de l'activité enzymatique du GPx a été observée chez les rats Co-exposés et traités par HEM comparés aux rats Co-exposés (**Figure 27**).

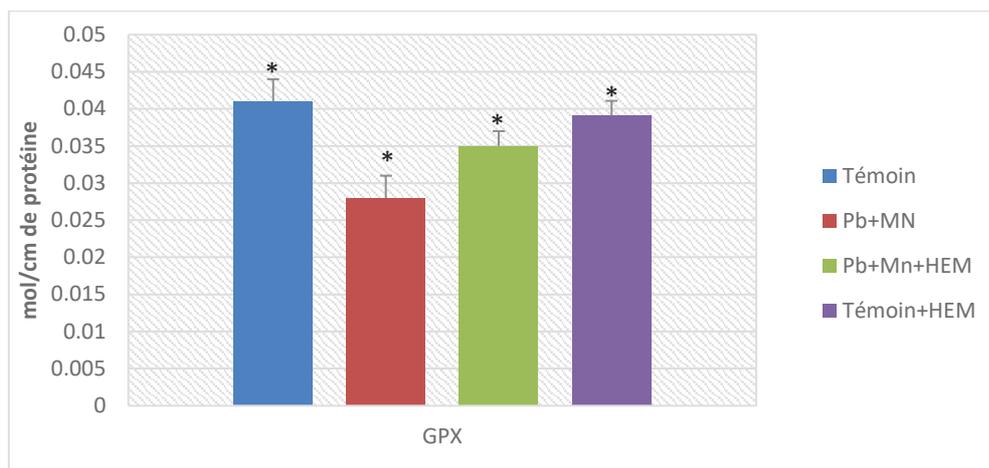


Figure 27 : L'effet de l'HEM sur l'activité enzymatique de la GPx cérébral

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; Pb-Mn vs T (*: $p < 0.05$) ; Pb-Mn-HEM vs Pb-Mn (*: $p < 0.05$)

6.7.3. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'activité enzymatique du statut oxydatif au niveau hépatique :

Après la Co-exposition au Pb-Mn, les analyses statistiques montre une diminution significative ($p < 0.001$, $p < 0.05$) de l'activité de la SOD, CAT et GPx au niveau hépatique chez les rats Co-exposés comparé aux rats témoins. Après 21 jours de traitement par l'HEM chez les animaux Co-exposés, on a observé une nette amélioration dans l'activité de ces enzymes par rapport aux rats intoxiqués (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Activité des enzymes antioxydants hépatique (SOD, GPx, CAT) chez des rats Co-exposés et Co-exposés traités par HEM, témoins et traités.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HEM	Témoin	HEM
SOD (U/mg de protéine)	0,22 \pm 0,14***	0,87 \pm 0,33***	1,03 \pm 0,26***	1,10 \pm 0,06
CAT (U/mg de protéine)	11,38 \pm 0,15*	20,73 \pm 0,97*	25,27 \pm 0,22*	26,08 \pm 0,03
GPx (U/mg de protéine)	25,31 \pm 0,31*	38,62 \pm 0,08*	43,41 \pm 0,12*	40,75 \pm 0,62

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM: (***: $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

6.7.4. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'activité enzymatique du statut oxydatif au niveau rénal :

Les résultats du statut oxydants au niveau rénal montrent une diminution significative de la SOD, CAT et GPx chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Tandis qu'une augmentation significative est observée ($p \leq 0.05$) sous l'action de HEM chez les rats traité suite à la Co-exposition aux Pb-Mn (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Activité des enzymes antioxydants rénaux (SOD, GPx, CAT) chez des rats Co-exposés et Co-exposés traités par HEM, témoins et traités.

	Pb-Mn	Pb-Mn+HE	Témoin	HEM
SOD (U/mg de protéine)	0,51±0.059*	0,79 ±0,019*	1,09±0,02	0,95±0,09
CAT (U/mg de protéine)	0,36 ±0,34*	0,50 ±0,02*	0,65 ± 0,05	0,53 ± 0,07
GPx (U/mg de protéine)	0,73± 0,03**	0,83± 0,05**	1,23± 0,33	0,22±0,005

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

6.8. Impact du Pb-Mn et HEM sur l'architecture histologique des organes :

L'observation microscopique des tissus hépatique et rénal a permis de révéler certaines observations suite à l'exposition au plomb et le manganèse et le traitement par HEM.

6.8.1. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'architecture structurale du foie

L'étude histologique réalisée au niveau du tissu hépatique révèle une architecture normale chez les animaux témoins (**figure 28. A**). Alors que, chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn, l'histologie du foie montre une nécrose et le parenchyme hépatique siège d'un gonflement, d'une ballonnisation des hépatocytes et de vacuoles lipidiques au sein des hépatocytes réalisant des foyers de stéatose, un micro foyer de nécrose (**figure 28.B, B1**) par rapport du foie des rats témoins.

Par ailleurs, chez les rats Co-exposés et traité par HE de *M.spicata*, l'étude histologique montre une structure normale avec la présence modérée de quelques foyers d'inflammation. De même, aucune nécrose ni de lésions épithéliales n'est observé (**Figure 28.C**).

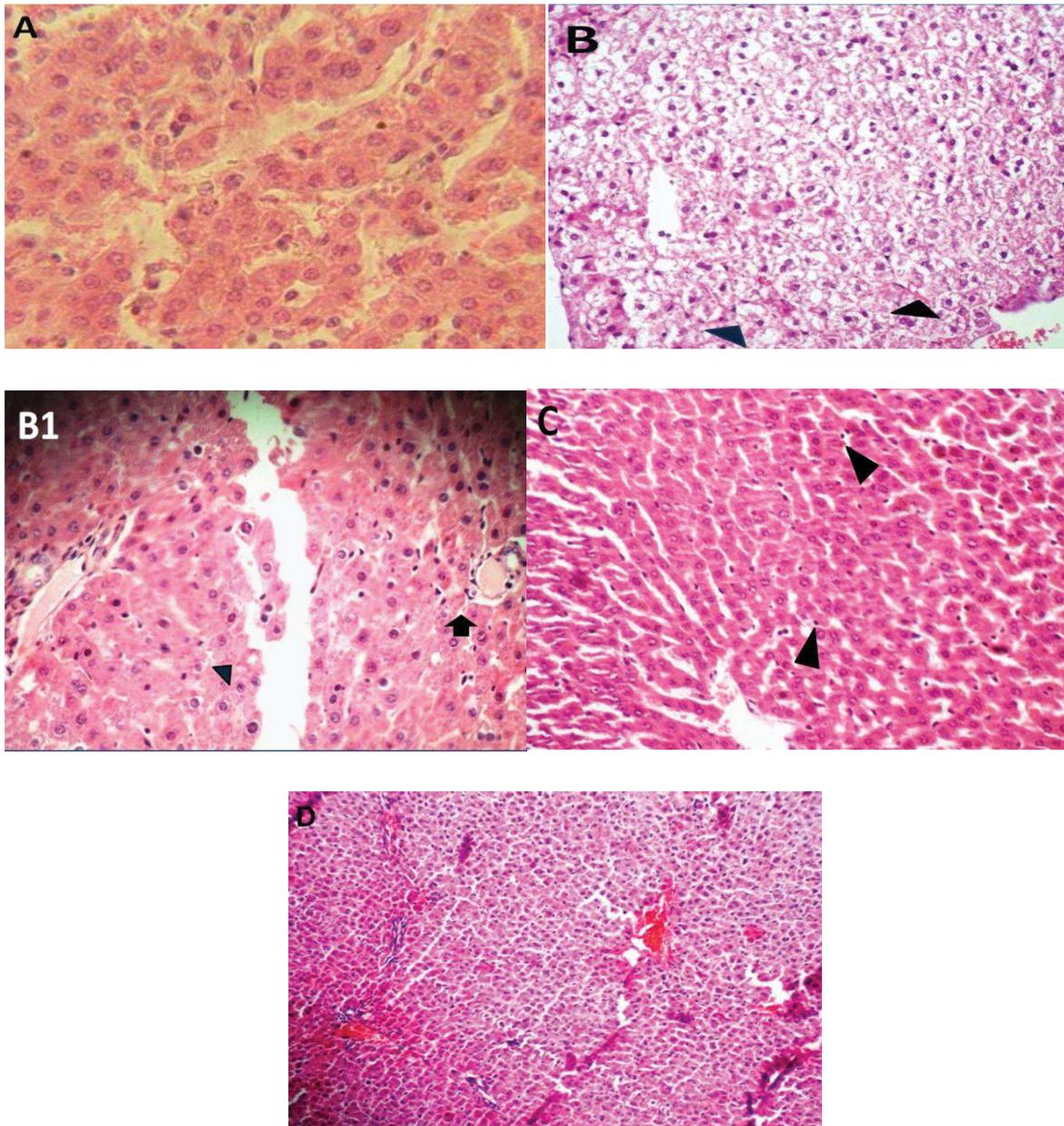


Figure 28 : La microscopie optique de tissu hépatique coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G:(x 40). **(A)**G:(x 100) dans des sections du foie de rats témoins sont apparus avec l'architecture normale. **(B, B1)** Les rats exposés au plomb et manganèse a révélé un microfoyer de nécrose (flèche bleu), inflammation portale (flèche noire). **(C)** des rats intoxiqués au Pb-Mn et traités avec l'HEM illustre une inflammation modérée (flèche noire). **(D)** sections de foie normal des rats traités avec HEM.

6.8.2. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'architecture structurale du rein :

L'étude histologique des tissus rénaux des rats intoxiqués par le Pb-Mn (**Figure 29. B**) montrent une dégénérescence tubulaire considérable avec une atteinte glomérulaire. L'organisation tissulaire présentait un parenchyme rénal remanié par une inflammation faite de

congestion active et un œdème. La présence de nécrose partielle des tubes contournés (présence de cellules à cytoplasme homogène dépourvues de noyau).

Dans le même contexte, les animaux qui sont exposés aux Pb-Mn et traités par l'HEM montrent une régénéscence tissulaire avec un parenchyme rénal marqué par une discrète réaction inflammatoire faite d'un infiltrat inflammatoire discret de type lymphocytaire (**Figure 29. (C)**).

Par ailleurs, l'observation au microscope optique des tissus rénaux des rats témoins et les rats traités avec l'HEM a montré la structure normale des tubules rénaux et les glomérules (**Figure 29. (A ; D)**).

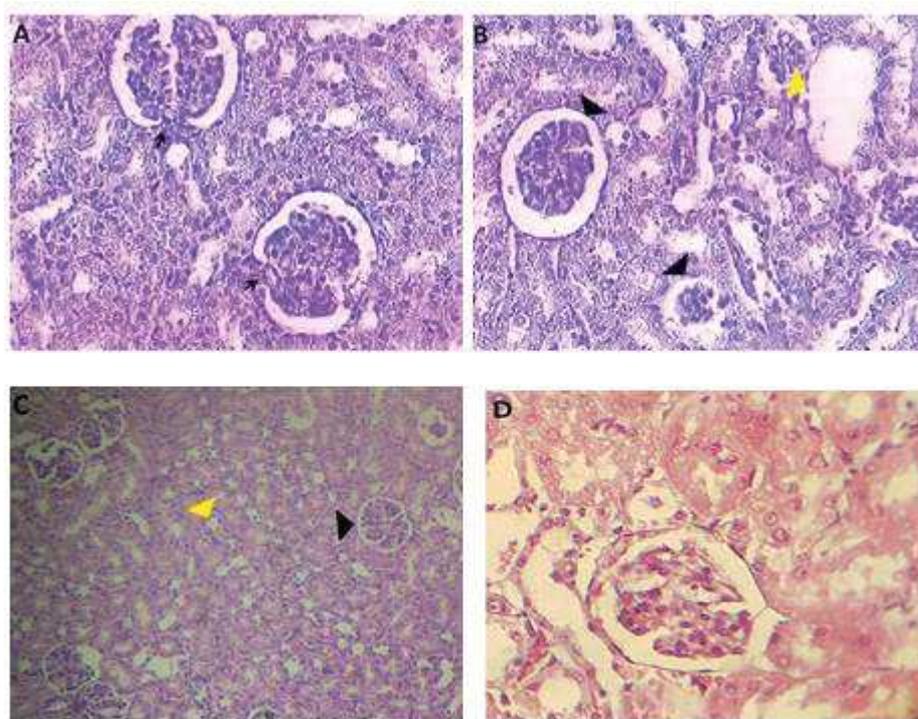


Figure 29 : La microscopie optique de tissu rénal coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G:(x 20). **A** : (T) : architecture et capsule de Bowman normal (—→). **B** : (Pb-Mn) : Présence d'une dégénéscence des capsules Bowman (▲) et présence de nécrose partielle des tubes contournés (△). **C** : (Pb-Mn+HEM) : régénéscation de la majorité des capsules de Bowman (▲), et interstitielle des cellules, avec des tubes convolutés (△). **D** : (T-HEM) : architecture et capsule de Bowman normal

DISCUSSION

Discussion :

Au cours des dernières années, le plomb est devenu une préoccupation réglementaire et objet de beaucoup d'intérêt des pharmacologues, spécialistes de l'environnement et des cliniciens en raison de sa persistance dans les tissus humains et animaux qui a été souvent associée à des risques considérables pour la santé **(Tajudeen et al.,2019)**

De nombreux rapports sont disponibles sur la toxicité du plomb et ses effets délétères dans diverses espèces d'animaux et il y a eu beaucoup de travail effectué sur la toxicocinétique et la génotoxicité **(Suradkar et al.,2009)**

De plus, le manganèse est un élément omniprésent à la vie des humains et des animaux, il joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement du cerveau en tant que cofacteur de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme des neurotransmetteurs, dont la glutamine synthétase, l'arginase **(Shishova et al. 2009)**, la pyruvate décarboxylase et la superoxyde dismutase mitochondrial **(Bouabid et al,2016)**.

En outre, les différents travaux entrepris chez le rat et l'homme ont montré que le plomb est toxique même à des doses relativement faibles par contre le manganèse à des fortes doses a des effets délétères. Ces deux éléments touchent tous les compartiments de l'organisme vivant et les organes les plus vulnérables essentiellement le système neurologique, rénal, et hépatique

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises.

Par ailleurs, beaucoup d'études réalisées sur la plante de *Mentha Spicata*, en raison de leurs effets thérapeutiques, Le *Mentha Spicata* est utilisé comme antidépresseur et anxiolytique **(Rabiei et al., 2016 ; Maleki et al., 2017)** anti-inflammatoire, anti maniaque **(Francianne et al.,2016)**, hépatoprotectrice et anti-oxydants **(Ben saad et al.,2017)**, néphroprotectrice **(Naveed et al.,2014)**.

le présent travail s'inscrit dans le but la mise en évidence des risques de la Co-exposition subchronique a l'acétate de plomb et le chlorure de manganèse chez les rats Wistar, leurs effets néfaste sur l'organisme a été évalué par plusieurs approches : biochimiques, histologiques et neurocomportementale. Cette étude a permis aussi de tester l'efficacité de l'administration de l'huile essentielle de *Mentha Spicata* à rétablir ou non les dommages causé par ses métaux.

1. Rendement et composition chimique

L'huile essentielle de *Mentha spicata* (HEM) a été obtenue par hydrodistillation avec un rendement de 0,83%, ceci est en accord avec les travaux de **Boukhebt et al.,2011** qui ont rapporté une valeur de (0.87%). En effet, des études ont été réalisées par **Priscilla et al.,(2010)** et **Lucchesi et al.,(2004)** ont rapporté une valeur de (0,23±0,04%) et (0,60±0,06-%) respectivement. Cette différence en rendement peut être attribuée à plusieurs facteurs dont essentiellement, l'origine, l'espèce, la période de récolte, la durée de séchage et la technique d'extraction des huiles essentielles **Karousou et al., (2005)** ; de plus **Marotti et al.,(1994)** ont montré que les faibles rendements peuvent être associés à une série de facteurs tels que le génotype, les étapes de développement de la plante et les conditions environnementales qui se produisent dans les régions semi-arides.

2. Etude quantitative et qualitative de l'huile essentielle par CPG (H.E.M) :

L'étude analytique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier plusieurs composants chimiques avec des pourcentages différents, Le composant majeur de notre huile est : la carvone (42. 2%). Nos résultats s'accordent avec les travaux de **Chauhan et al, (2009)** ; **Snoussi et al, (2015)** ; **Nazem et al, (2019)**. Qui démontrent que la composition de l'huile essentielle de *Mentha spicata* présente une grande chimio diversité en fonction de la méthode d'extraction et l'origine géographique. De ce fait une étude menée par **Shahbazi et al,(2015)** indique que la carvone (78,8%), est le composant principal de l'huile essentielle de *M. spicata* de la ville de Gilan-E- Gharb, province de Kermanshah, ouest de l'Iran. D'autres études ont signalé que la différence de teneur en huile essentielle et la composition sont influencées par les conditions environnementales et les saisons de récolte (**Telci et al,2010** ; **Hussain et al, 2010**).

3. Effet du plomb, manganèse et l'HEM sur la croissance de la progéniture du rat

La Co-exposition à l'acétate de plomb et au chlorure de manganèse a permis d'observer chez les jeunes rats wistar une réduction de la croissance pondérale, qui est due à une diminution dans la prise alimentaire durant toute l'expérimentation. En effet, il a été démontré que l'effet anorexigène du Pb-Mn et leurs actions sur les centres nerveux responsable de la régulation de la satiété et de la faim qui est l'hypothalamus. Nos résultats sont en accord avec les travaux entrepris par différents auteurs (**Ibrahim et al.,2012** ; **Nabil et al. 2012**). Nous avons observé également une réduction dans le poids du cerveau, foie et rein chez les rats Co-exposés au Pb-Mn comparés aux rats témoins. Ce qui est en faveur d'une perturbation dans leurs fonctionnements. Nos résultats sont en accord avec les travaux entrepris par (**Smith et al., 2008** ; **Ming et al., 2015**). Ils ont constaté que le plomb et le

manganèse ont entraîné une diminution du taux de croissance chez les rats. Ces résultats peuvent être due à l'effet du Pb et Mn sur la prolifération et la différenciation neuronale au cours du période prénatale. **(Ramesh et al., 2012 ; Adli.,2014)**

En outre, l'administration de *Mentha spicata* par voie intra-péritonéal chez les rats Co-exposée aux Pb-Mn montre une augmentation dans le gain corporel ceci comparé aux rats Co-exposés aux Pb-Mn. Ce regain de poids pourrait être dû à la présence de composés terpénoïdes qui agissent en stimulant le transport du glucose dans les cellules **(Vinay Dwivedi et al.,2011)**. Nos observations sont aussi en accord avec ceux des **Toghyani et al., (2010)** qui ont rapporté que l'ajout de la poudre de la menthe poivrée au régime alimentaire à des niveaux de 4 g / kg augmentait le gain de poids corporel chez les poulets de chair. Ainsi il a été indiqué aussi par **Zargari., (2002)**, que l'ajout de plante médicinale stimule l'appétit, la sécrétion des fluides gastro-intestinaux, et améliore la digestion et l'absorption, produisant ainsi des gains de poids corporel.

4. Tests neurocomportementaux :

4.1.Effet du plomb et manganèse et HEM sur les performances dépressives mesurées par l'épreuve de la nage forcée (FST) :

Le test de la nage forcée est le modèle le plus largement utilisée pour l'évaluation de l'activité potentiel antidépressante chez les rongeurs **(Cryan et al., 2002 ; Emamghoreishi., 2009)**. Tout fois, les résultats obtenus montrent un temps d'immobilité (TIM) significative élevé chez le groupe Co-exposés aux plomb et manganèse par rapport au groupe témoin. Ces résultats se manifeste par une réduction dans la nage et l'installation d'un état de désespoir qui est probablement la conséquence de l'altération des régions responsable de ce comportement et les systèmes sérotoninergique qui provoque dans divers désordres psychiatriques **(Souza et al., 2005 ; Soeiro et al.,2007)**. Cela pourrait être dû aux effets de Pb et Mn qui agissent comme des éléments dépressifs sur le système sérotoninergique particulièrement de systèmes monoaminergiques dans les zones du cerveau entier, principalement dans le cortex cérébral, hippocampe et striatum. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Moreno et al., (2009) ; Bouabid et al. (2014)**. Qui montrent qu'une exposition prolongée au plomb et manganèse pouvait entraîner un manque de stabilité émotionnelle tel que ; la dépression, l'anxiété et la perte de mémoire.

Par ailleurs, l'administration de l'huile essentielle de *Mentha spicata* pouvait entrainer une réduction de temps d'immobilité (TIM) chez les rats Co-exposés et traités par rapport aux rats

Co-exposés. Nos résultats sont en accord avec ceux de **ginseng., (2015)** qui montrent que l'huile essentielle de la menthe possède des propriétés antidépresseur et assure l'équilibre du système nerveux.

De plus, comme la plupart des autres huiles essentielles, la menthe est en mesure de fournir le soulagement du stress, la dépression et l'épuisement mental en raison de sa nature rafraichissante (**lancomega, 2014**). D'autres travaux de Mukherjee, **(2012)** montrent que HEM stimule les nerfs du cerveau et aide contre le stress et la dépression.

Dans le même contexte, Deng et al., **(2015)**. Ont étudié les effets antidépresseurs du thymol (composant de *Mentha pulégium*), sur la dépression due à des facteurs imprévisibles chez la souris et ils ont constaté que le thymol exerçait des effets antidépresseurs en augmentant les neurotransmetteurs dans le cerveau et en inhibant les cytokines inflammatoires (**Rabiei et al., 2016**).

D'autres études menées par Machado et al., **(2013)**. Ont étudié l'effet antidépresseur de l'huile essentielle de romarin et ils ont démontré que le 1,8-cinéol, présent dans l'huile essentielle de romarin, a eu un effet antidépresseur. En ce qui concerne de tels résultats, nous pouvons soutenir que l'antidépresseur de l'huile essentielle de *M. spicata* est dû à son principal effet. le 1,8-cinéol.

4.2.Effet du plomb et manganèse et HEM sur les niveaux d'anxiété mesurés dans le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM)

Le test du labyrinthe en croix surélevées a montré que le temps de séjour des jeunes rats Co-exposés dans les bras ouverts était plus diminuée que celui des rats témoins. Ce comportement anxieux des rats pourrait être traduit par une interaction du plomb avec les neurones sérotoninergiques et dopaminergiques de l'hippocampe. et une diminution du niveau des concentrations de 5-HT dans le cortex, l'hippocampe et le striatum est à l'origine d'un effet d'anxiogène (**Blecharz-Klin et al., (2012) ; Liu et al., (2015)**). De plus, des études récentes rapportent que l'exposition au Mn est également à l'origine de changements dans les niveaux tissulaires des neurotransmetteurs, tels que GABA, glutamate, dopamine, noradrénaline, sérotonine, et ACh (**Delaville et al.2011**). Cependant, **Anderson et al., (2009)** ont montré que l'accumulation du manganèse dans le cerveau conduirait à une dysrégulation de l'activité noradrénergique et des altérations dans la synthèse de la norépinephrine (NE), et provoque en conséquence des troubles comportementale comme l'anxiété. Etant donné que tout comportement dépend d'une commande cérébrale, les désordres comportementaux

observés chez l'animal anxieux orientent la réflexion vers l'existence d'un dysfonctionnement dans la circulation ou le traitement de l'information au sein du système nerveux central (**Slimani et al., 1997**). De plus, la baisse de l'expression du GABA et l'augmentation de sa concentration extracellulaire suite à l'exposition au $MnCl_2$ peut entraîner un changement remarquable dans le comportement relatif à l'anxiété (**Anderson et al., 2008**).

En revanche, l'administration de l'huile essentielle de *Mentha. sp* a des rats préalablement Co-exposés aux l'acétate de plomb et chlorure de manganèse a permis d'observer une nette augmentation dans le temps de séjour ainsi que le nombre d'entrées dans les bras ouverts, Cela montre que l'huile essentielle de *Mentha.S* a des propriétés anxiolytiques (**Francianne et al., 2016**). Nos résultats sont en accords avec les travaux de **Hatano et al., (2012)** qui ont montré que la carvone qui est le principal composé de l'huile essentielle de *Mentha spicata* a un effet tranquilisant et anxiolytique (**Ana catarina et al., 2012**).

4.3. Effet du plomb et manganèse et HEM sur les niveaux de l'activité locomotrice mesurés dans L'Open Field (OFT)

Le dispositif de l'Open Field est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'activité locomotrice et l'anxiété chez les rongeurs. La présente étude montre que, la Co-exposition chronique au Pb-Mn chez des rats *wistar* pendant la gestation et la lactation provoquent une hypoactivité locomotrice, ainsi une augmentation dans les différents comportements stéréotypés (redressement, la défécation et toilette) comparée aux rats témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux **Sabrina et al., (2005)**, qui montre que l'exposition au Pb est associée à un grand nombre d'altérations physiologique dans le système nerveux central. En effet, plusieurs de ces processus pathologiques pourraient potentiellement être impliqués dans l'épigénèse des comportements anxiogènes et l'activité exploratrice (**Moreira et al., 2002 ; Soeiro et al.,2007**).

Par ailleurs, une exposition au Pb peut interférer avec la synaptogenèse, il entraine une réduction de la transmission sérotoninergique, dopaminergique et noradrénergique (**Moreira et al., 2002**). De plus, les résultats obtenus par Chen et al., (**2008**), montrent que ce xénobiotique induit un changement des fonctions du récepteur NMDA (**Cory-Slechta et al., 1997 ; Bellinger, 2000**). Et augmenter les niveaux d'acide D-aminolévulinique (**Meredith et al., 1978 ; Song et al., 2006**), ce qui peut être antagoniste de l'inhibition du GABA (**Zhang et al., 2005**). Cependant, des études rapportent que l'exposition au Mn entraine une perte du

niveau de dopamine dans le cerveau et une détérioration des cellules neuronales. Pourrait se manifester par une diminution de l'activité motrice (**Normandin et al., 2004**)

Cependant, nous avons observé que l'administration de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par voie intrapéritonéal a permis d'enregistrer une nette amélioration dans l'activité locomotrice chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn, ainsi que l'amélioration de leur états exploratoire et émotionnel, ce qui indique que HEM a une activité stimulante directe sur le système nerveux (**Buchbauer et al.,2005**). Nos résultats sont en accord avec ceux de (**Hassan et al., 2013**) qui montrent que l'extrait de *Mentha Piperita* offre une protection suffisante contre les lésions cérébrales induites par l'irradiation-gamma et l'apoptose chez les souris et stabiliser la membrane par des mécanismes qui comprennent une régulation des régulateurs clés apoptotiques (Bcl2 et P53).

De plus, cette huile est caractérisée par son effet stimulant sur le système nerveux : sur la cellule nerveuse (tonique nerveux), le psychisme (combattre la mélancolie), le tonus nerveux et la vitalité (tonique général, permet de faire face à la sensation de fatigue), (**Garneau et Collin, 1993**)

5. Les paramètres biochimiques :

A. La détermination de la plombémie :

Nos résultats montrent que la plombémie chez les animaux Co-exposés aux Pb-Mn pendant la gestation et la lactation est élevée, comparée à celles des animaux témoins, pouvant être due à la perméabilité placentaire par le biais du cordon ombilical qui laisse passer le Pb ou bien à travers le lait pendant la période de la lactation. Nos résultats corroborent avec ceux de **Bellinger, (2000)** qui 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 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 ; Kahloula.,2010**).

Ce transfert peut être le résultat d'une immobilisation du Pb emmagasiné dans le squelette des femelles intoxiquées étant jeunes ou bien à partir des sources environnementales courantes (**Kahloula.,2010**).

B. Le taux du manganèse sanguin :

Dans notre étude nous avons observé que le taux du manganèse sanguin chez les rats Co-exposés par le plomb et le manganèse est supérieur, comparée à celles des animaux

témoins, pouvant être due à des associations entre l'exposition du manganèse à la fois prénatale et postnatale avec une toxicité de l'embryon et le fœtus. Nos résultats s'accordent avec ceux de **Ming-Song et al., (2015)**. Qui ont montré que le taux du manganèse dans le sang est un bio marqueur efficace et représentatif de l'exposition du Mn et que la plus part du Mn sanguin s'accumule dans les érythrocytes (environ 66%) avec une demi-vie de 37 jours (**Lee and Kim, 2011; Milne et al., 1990**). D'autres études ont examiné les concentrations du Mn érythrocytaires à Taiwan. Qui ont choisi les concentrations du Mn érythrocytaires comme bio marqueur à utiliser pour déterminer le taux du Mn maternelle pendant la gestation. Dans cette étude le taux du Mn sanguin de la mère ont tendance a augmenté pendant la gestation, ce qui est cohérent avec les rapports précédents. Pendant la gestation les concentrations du Mn sanguin augmente au cours des trois trimestres, et le Mn pénètre le placenta par le transport actif (**Krachler et al., 1999; Tholin et al., 1993**). L'augmentation du taux de Mn pendant la gestation peut être liée à l'accélération de l'érythropoïèse, l'absorption intestinale (**Das and Chowdhury, 1997; Kaludin and Ganovski, 1981; Kirchgessner et al., 1982; Tholin et al., 1995**).

Au niveau sanguin nous avons entrepris l'analyse d'une série des paramètres biochimiques portant sur le dosage de la glycémie, urée, créatine, TGO, TGP, Cholestérol, Triglycéride, Albumine et la phosphatase alcaline.

5.1.Effets du Pb-Mn et HEM sur le bilan glucidique

L'exposition au Pb-Mn ont permis d'enregistrer une hyperglycémie chez les rats Co exposé comparé aux rats témoins, Nos résultats corroborent avec les travaux réalisés par **Saad et al., (2011)**. Qui ont montré que l'acétate du plomb à un effet néfaste sur le pancréas et plus exactement sur l'excrétion d'insuline par les ilots de Langerhans (**Ahlem et al., 2011**). De plus, les études de **Kasdallah et al. (2005)** confirment que l'exposition au Mn engendre un effet stressant qui se traduit par une hyperglycémie sous l'action des hormones de stress. Dans ce même contexte **Maltankhar et al. (2006)** rapportent que la présence du Mn inhibe la plupart des enzymes glycolytiques et ceux intervenants dans le cycle de Krebs comme l'hexose kinase, pyruvate kinase, LDH et déshydrogénase.

Après l'administration de l'huile essentielle du *Mentha spicata* par voix intra péritonéal (IP) aux rats préalablement Co-exposés au Pb-Mn, on a pu remarquer une diminution du taux du glucose dans le sang, il a été montré que l'extrait de la menthe effectue une activité hypoglycémique due à la présence des composants majeurs comme la carvone et le menthone (**Khodadust et al., 2015**). De plus, les résultats de **Bayani et al. (2017)** ont

indiqué que l'extrait aqueux des feuilles de *M. spicata* possède des propriétés hypoglycémiques, hypocholestérolémies et antioxydantes chez les rats diabétiques.

5.2. Effets du Pb-Mn et HEM sur les biomarqueurs de la fonction rénal

Par ailleurs nous avons observé une augmentation significative du taux de l'urée et de la créatinine sanguine chez les animaux Co-exposée par le Pb-Mn. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Thylambal et Saroja.(2004) ; Abdel Moneim et al., (2011) qui ont montré que les cellules rénales ne sont plus capables de contrôler processus d'excrétion urinaire, car les reins sont parmi les organes les plus sensibles au plomb. De plus, selon l'étude de Saka et al., (2011) l'augmentation de l'urée et de la créatinine sérique chez les rats Co-exposé au Pb-Mn est due à la dégradation des composés protéiques hépatiques où les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Ainsi ces acides aminés formés peuvent se transformer sous l'action des aminotransférases sériques en composés carboxyliques tel que l'acide pyruvique. Selon Michaux et al., (1971) ceci serait la conséquence d'un abaissement de la vitesse de filtration glomérulaire.

Toutefois Sánchez-González et al., (2015) ont trouvé que le Mn joue un rôle dans l'insuffisance rénale chronique ce qui provoque l'augmentation du taux de l'urée et de créatinine ceci est due peut-être à l'effet antagoniste du manganèse sur les ion calcique (Ca^{+2}) durant les processus de filtration glomérulaire (Madlala et al., 2012).

En revanche, après le traitement par HEM sur les rats Co-exposés aux Pb-Mn nous avons remarqué une diminution de l'urée et de la créatinine, nos résultats sont en concordance avec les travaux de Bellassoued et al., (2018) qui ont évalué que l'huile essentielle de la menthe présente un effet protecteur contre hépato-néphrotoxicité.

5.3. Effets du Pb-Mn et HEM sur les biomarqueurs de la fonction hépatique

Dans notre étude l'exploration de la fonction hépatique montrent une augmentation de la concentration ALT, AST et Phosphatase alcaline chez les rats Co-exposés par le plomb et manganèse par rapport aux rats témoins. Ces deux enzymes sont situés dans le cytosol et l'augmentation de leurs concentration au niveau de sérum est due à leur relargage possible à partir du cytoplasme suite à la destruction de la membrane plasmique et au stress subit par la cellule (Shyamala et al., 2003). Ces résultats pourraient résulter d'un dysfonctionnement hépatique. Plusieurs études ont rapporté que le plomb induit une forte hépatotoxicité et provoque des changements dans l'architecture de l'hépatocyte, conduisant à une forte augmentation des transaminases (Dini et al., 1999). Les travaux de Fordahl et al.,(2012) quant à eux indiquent qu'une large exposition au Mn a un effet sur les métabolites hépatiques, en provoquant principalement des perturbation au niveau du

métabolisme des lipides et ainsi la formation excessive de l'acide oléique, l'acide hydroxy-butyrique et les corps cétoniques, ces derniers étant en surplus dans le sang vont être éliminés dans les urines, ajoutant que les altérations des métabolites hépatiques ont été en corrélation avec l'augmentation tissulaire en manganèse.

Par ailleurs, on a observé une baisse significative des transaminases (ALT, AST) suite à l'administration de HE de *M.spicata* ce qui indique une régulation des biomarqueurs de la fonction hépatique. Conformément aux résultats de la présente étude, Rajesh et al. (2013) ont rapporté que les taux élevés de marqueurs biochimiques sériques ALT chez les rats atteints de lésions hépatiques ont été diminués avec l'ajout de l'extrait éthanolique des feuilles de la menthe (*Mentha arvensis*) à 400 mg / kg. De plus, Barbalho et al. (2011) ont étudié les effets de l'administration de jus de la menthe deux fois par jour pendant 30 jours sur certains paramètres biochimiques chez l'homme, les résultats ont montré une réduction de 41,5% de la glycémie, 58,5% des triacylglycérides, 66,9% du cholestérol total, 52,3% des indices LDL, 70% des taux AST, 74,5% des taux d'ALT.

Cependant, d'autres auteurs ont illustré que le traitement par la carvone a rétabli les activités des taux sériques d'ALT et d'AST et PAL chez les rats traités par la streptozotocine, ce qui indique le maintien de la fonction et de la structure des cellules hépatiques (Muruganathan et Srinivasan, 2016). Une autre étude a indiqué que l'administration in vivo d'extrait alcoolique de menthe poivrée atténuait les effets indésirables de CCl₄ sur la fonction hépatique (Khodadust et al., 2015).

5.4. Effets du Pb-Mn et HEM sur le bilan lipidique et protéique

Toutefois, les résultats présentés dans notre étude ont montré une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie chez les rats Co-exposés par rapport aux rats témoins. Nos résultats sont similaires aux travaux de Hanan et al. (2012) ; Sharma et al. (2013) qui ont trouvé une augmentation des taux des triglycérides et le cholestérol au niveau sanguin après l'administration d'acétate de plomb. De plus, la relation entre l'exposition de l'acétate de plomb et le taux du cholestérol permet de suggérer une éventuelle altération du métabolisme des lipides (Moussa et Bashandy, 2008).

En revanche, Zwingmann et al. (2003) ont montré que le Mn peut conduire à la fermeture de la voie biliaire et l'inhibition du transfert d'acides biliaires à la vésicule biliaire et son accumulation dans le foie ce qui conduit à une hypercholestérolémie. Les travaux de Fordahl et al. (2012) quant à eux indiquent qu'une large exposition au Mn a un effet sur les métabolites hépatiques, en provoquant principalement des perturbations au niveau du

métabolisme des lipides et ainsi la formation excessive de l'acide oléique, l'acide hydroxy butyrique et les corps cétoniques.

Alors que, le traitement par l'HEM chez les rats Co-exposés présente une amélioration dans les valeurs de cholestérol et les triglycérides. L'effet hypocholestérolémiant de la menthe pourrait être dû à la teneur en menthol et menthone qui a la propriété de réduire l'activité d'une enzyme hépatique HMG CoA réductase (une enzyme primordiale dans la synthèse du cholestérol dans le foie) et de réduire simultanément le taux de cholestérol. (**Poltowicz et Wesyk, 2005**). Les feuilles de *Mentha arvensis* présentent la plus forte teneur en phénol et en flavonoïdes, ce qui explique qu'elle aurait la plus grande propriété antioxydante et réduirait le taux de cholestérol (**Vishwakarma et al., 2014**)

A travers notre étude, on a observé que l'administration du Pb-Mn induisent une diminution significative de l'albumine chez les rats Co-exposés par rapport aux rats témoins. Nos résultats corroborent avec les travaux du **Abd-El-Reheem, (2008) ; Christensen, (2008)** qui montrent que cette hypo albuminémie pourrait être expliquée par la perturbation de l'activité des cellules hépatiques ou par la diminution de l'apport exogène en protéines et la réduction dans l'absorption des acides aminés causées par le syndrome de malabsorption ou malnutrition.

Cependant, l'administration de l'huile essentielle du *Mentha spicata* par voie intra péritonéal (IP) aux rats préalablement Co-exposés au Pb-Mn, a permis d'observer une augmentation du taux de l'albumine ceci est dû à l'activité anti oxydants et hépato-protecteur de *Mentha Spicata* (**Kooti et al., 2015**).

6. Impact du plomb et du manganèse et HEM sur le statut oxydatif

6.1. Effets du plomb et du manganèse et HEM sur le stress oxydant érythrocytaire :

L'évaluation de la toxicité de Pb et Mn a été exprimée par le dosage des enzymes antioxydants érythrocytaires à savoir les CAT, GPx et SOD. Sachant que ces enzymes antioxydants permettent de maintenir l'homéostasie du potentiel redox (**Chou et al., 2013**).

Dans ce contexte, on a constaté que l'administration orale du Pb-Mn à des rats en développement a provoqué une diminution de l'activité de ces enzymes, ces travaux se concordent avec ceux de **Berrahal et al., (2007)** et **Bhuvaneswari et al., (2013)** qui ont posté que l'administration du Pb et Mn entraîne une baisse de l'activité de ces enzymes, cette diminution peut conduire à un état de stress oxydatif notamment au niveau des globules rouges (**Saka et al., 2011**).

En revanche, L'activité antioxydant de l'HEM est due essentiellement à la présence des composants bioactifs dans l'HE testée (**Vermeriset Nicholson, 2006**). Il semble aussi que

cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (Villanoet., al 2007). Cependant, d'autres études montrent que l'activité anti-radicalaire est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (Mariod et al., 2009).

De plus, ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HEM qui sont responsables de cette activité antioxydant, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Gulcin et al., 2004).

De plus, l'administration de l'HEM par voie intrapéritonéale à la dose de 0,1ml/kg, a permis d'observer une augmentation significative de la teneur en CAT, GPx et SOD chez les rats Co-exposés aux Pb-Mn. Nos résultats sont en accord avec Ben Saad et al., (2017) qui ont montré que l'administration par voie oral de HEM à entrainer une augmentation significative des activités enzymatiques antioxydantes (CAT,GPx,SOD) dans le tissus érythrocytaire chez les rats traités par la nicotine, ce qui indique que la *M. spicata* pourrait atténuer le stress antioxydant.

6.2. Effets du plomb et du manganèse et HEM sur le stress oxydant au niveau de cerveau :

L'exploration des enzymes antioxydants chez le rat Co-exposé par le plomb et le manganèse ont permis d'observer des perturbations considérables dans l'activité des différentes enzymes (CAT, GPx, SOD) chez le groupe intoxiqué comparé au rats témoins, au niveau cérébral.

L'administration orale des rats par le plomb et le manganèse provoque 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). L'activité antioxydante du superoxyde dismutase (SOD) a diminué dans toutes les régions du cerveau après exposition au plomb (Shukla et al., 2003).

En outre, le 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). De plus, 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**)

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

Nos résultats sont en accordent avec **Moreira et al., 2001 ;Khalaf et al.,2012** qui révèlent une diminution significative de l'activité de SOD chez les rats exposés au plomb. Cependant, 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**).

De plus, le plomb ne subissant pas de cycle Oxydo-réducteur, cette peroxydation est due indirectement à son effet sur GPx et les autres enzymes antioxydants, attribué à la forte affinité du plomb pour les groupements sulfhydriles 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 **latronico 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).

Dans le même contexte, **Bhuvaneswari et al., 2013** montrent que exposition à faible ou à forte dose de Mn induit un dommages 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.

Il est suggéré que la première étape dans la production de ROS est la production de O_2^- 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. En présence de Mn ou d'autres métaux de transition (**Martinez-Finley et al, 2013**).

Par ailleurs, l'administration de L'HEM par voie intrapéritonéale à la dose de 0,1ml/kg, a permis d'observer une augmentation significative de la teneur en SOD et activité de la GPx chez les rats Co-exposé aux Pb et Mn. Nos résultats sont en accord avec **(Hassan et al.,2012)** qui indiquent que Le gavage de l'extrait de *Mentha piperita* a entraîné une augmentation significative de la teneur en SOD et activité de la GPx chez les rats préalablement avoir un stress oxydative induites par l'irradiation gamma.

Schlosser, (2007) ; Samman et al., (1998), montrent que l'extrait des feuilles de *Mentha* s'est avéré avoir antioxydant, anti-peroxidant et propriétés antimutagènes.

Des études signalent que cet extrait de la feuille de *Mentha* fournir la protection contre les lésions cellulaires radio-induites par le biais de retard ou de prévenir l'apparition du stress oxydatif induit par la radiation **(Jajetia, 2007)**.

Cependant, le prétraitement pour les souris irradiés par les rayons gamma avec l'extrait de *Mentha piperita* (1g / 1Kg/poids corporel/jour) significativement supprimée l'élévations de NO, H₂O₂, K et niveaux de Fe induit par les irradiations, aussi bien que nettement amélioré le GSH, Gpx, SOD, AchE **(Hassan et al., 2012)**.

6.3. Effets du plomb et du manganèse et HEM sur le stress oxydant au niveau hépatique

Les enzymes antioxydants endogènes sont responsables de la neutralisation du radical libre ainsi que de la prévention de son action responsable de dommage tissulaire. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et défenses antioxydants, qui à son tour provoque une série des événements déréglementer les fonctions cellulaires. Les enzymes antioxydants, telles que la SOD, CAT et GPX constituent une équipe solidaire de la défense contre ROS **(Bandyopadhyay et al., 1999)**.

Nos résultats montrent que le plomb et le manganèse ont provoqué une diminution significative de la concentration de SOD, CAT et GPX au niveau du foie des rats Co-exposé par le Pb-Mn par rapport aux rats témoins. Il est démontré que l'accumulation du plomb dans les différents compartiments des cellules du foie produit des dommages oxydatifs par le renforcement de la peroxydation des lipides membranaires et l'oxydation des protéines, un processus délétère produit uniquement par les radicaux libres **(Villeda-Hernandez et al., 2001)**.

Plusieurs travaux suggèrent que l'exposition au Mn induit une variété de changements cellulaires due à une augmentation du stress oxydatif, et l'insuffisance des systèmes d'énergie

métabolismes et antioxydantes (**Roth et Garrick, 2003**). Des études ont mis en évidence le lien entre stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondriale due à l'exposition à ce métal (Mn) (**Milatovic et al., 2009**).

En revanche, le traitement par l'HEM chez les rats Co-exposé au Pb-Mn présente une amélioration dans les enzymes du statu oxydative (SOD, CAT, GPx) Nos résultats sont en harmonie avec Vinothkumar et al., (**2013**), qui rapportent que le carvone réduit le stress oxydatif en améliorant les activités des antioxydants enzymatiques chez les rats intoxiqués par le 1,2-diméthylhydrazine.

D'autres travaux similaires menés par, Al-Fartosi et al. (**2014**) ont démontré que les composés phénoliques de l'extrait des feuilles de *Mentha longifolia* et de *Mentha spicata* réduit considérablement les radicaux libres générés par l'intoxication qui provoque l'altération cellulaire dans le tissu hépatique (**Muruganathan et Srinivasan, 2016**)

6.4. Effets du plomb et du manganèse et HEM sur le stress oxydant au niveau rénal

Nos résultats montrent que l'acétate de plomb et le manganèse ont provoqué une diminution importante de la concentration de SOD, CAT et GPx dans le rein des rats intoxiqué par le Pb et Mn par rapport aux rats témoins.

Il est démontré que l'accumulation du plomb dans les différents compartiments des cellules du rein produit des dommages oxydatifs par le renforcement de la peroxydation des lipides membranaires et l'oxydation des protéines, un processus délétère produit uniquement par les radicaux libres (**Villeda-Hernandez et al., 2001 ; Kong et al., 2004**).

L'activité de la superoxyde dismutase SOD diminue significativement dans les tissus du rein chez les rats intoxiqués par rapport aux témoins qui pourrait être due à la production massive des anions superoxydes et à une déficience en cuivre comme cofacteur enzymatique (**Matés et al., 2000**). Le SOD joue un rôle très important dans le système antioxydant par la dismutation de l'anion superoxyde pour former H_2O_2 et O_2 (**Mylorie et al, 2001**).

La diminution de la catalase tissulaire (rein) chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins pourraient être due à l'effet du plomb sur les acteurs du système de défense cellulaire par changement de l'activité de cet enzyme (**Alghazall et al., 2008**).

Plusieurs travaux suggèrent que l'exposition au Mn induit une variété de changements cellulaires due à une augmentation du stress oxydatif, et l'insuffisance des systèmes d'énergie métaboliques et antioxydantes (**Dobson et al., 2004**).

Des études récentes ont mis en évidence le lien entre stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondriale due à l'exposition à ce métal Mn (**Milatovic et al., 2007**). En outre, il a été émis une hypothèse selon laquelle la toxicité par Mn est associée à un dysfonctionnement mitochondrial qui s'accumule préférentiellement dans la matrice mitochondriale (**Liccione et Maines, 1988**), reflétant à sa forte affinité avec de calcium (**Gavin et al., 1999**).

Le stress oxydatif généré par des fortes concentrations de Mn conduit à l'induction de l'ouverture des pores et de la perméabilité mitochondriale de ces derniers, dépendant de Ca^{+2} , ce qui entraîne une augmentation de la solubilité aux protons, ions et solutés, la perte potentielle de la membrane mitochondriale interne, dépréciation des actions de phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP et le gonflement mitochondrial (**Yin et al, 2008**).

Plusieurs observations ont démontré que le niveau de GSH intracellulaire dépend la toxicité par Mn, que la déficience de la fonction mitochondriale est un mécanisme clé pour la toxicité par Mn (**Dukhande et al., 2006**). Par exemple, Mn^{+2} peut se substituer à Fe^{+2} dans les cytochromes de la chaîne respiratoire cellulaire (avec structure semblable à l'hémoglobine) (**Missy et al., 2000**), conduisant à la réduction incomplète de O_2 et de la formation des radicaux libre et des composés oxygénés tels que O_2 et H_2O_2 .

Il a été démontré que le Mn inhibe directement les enzymes de la ETC (Electron Transport Chain) mitochondrial (**Singh et al., 1979**). Il pourrait être prévu que cette inhibition peut également améliorer le taux de production de radicaux. L'augmentation de la production de radicaux serait encore aggravée par la réduction GPx et les activités de SOD (**Liccione et Maines, 1988**).

De plus, l'administration de HEM par voie intrapéritonéale à la dose de 0,1ml/kg, a permis d'observer une augmentation significative de la teneur en SOD, CAT et activité de la GPx chez les rats Co-exposé aux Pb-Mn. Nos résultats sont en accord avec Singh et al., (**2014**) ; Azab et al., (**2017**) ; Bellassoued et al., (**2018**) qui indiquent que le gavage de l'extrait hydroalcoolique de la menthe (*M.arvensis*, *M. piperita*) a entraîné une augmentation significative de la teneur en SOD et activité de la GPx chez les rats préalablement intoxiqués par CCl_4 .

7. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'architecture des organes :

7.1. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'architecture du foie

Les résultats obtenus après l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau hépatique chez les rats Co-exposés par le Pb-Mn ont permis d'observer une nécrose et le parenchyme hépatique siège d'un gonflement avec un infiltrat inflammatoire, d'une ballonnisation des hépatocytes et de vacuoles lipidiques au sein des hépatocytes réalisant des foyers de stéatose comparé aux rats témoins. Ces résultats sont similaires avec les études de Jarrar et al. (2012) qui suggèrent que l'exposition subchronique au plomb produit des lésions hépatiques chez les rats. L'apparition de cellules inflammatoires dans le tissu hépatique en raison de l'exposition sub-chronique au plomb peut suggérer que ce dernier pourrait interagir avec des protéines et des enzymes du tissu interstitiel hépatique interférant avec le mécanisme de défense antioxydant et conduit à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui à son tour peut imiter une réponse inflammatoire (Johar et al., 2004). En outre, le foie est l'organe critique pour la régulation de l'homéostasie de Mn dans le corps. Par ailleurs, la toxicité de Mn est rare et se manifeste principalement dans le foie, probablement en raison du rôle primordial que joue cet organe à éliminer le Mn du sang par l'excrétion biliaire (Crossgrove et Zheng, 2004), la consommation de l'eau contaminée par le Mn provoque un débordement du foie qui peut entraîner des lésions hépatiques (Peili et al., 2011). En effet plusieurs études ont rapporté que le Mn induit une altération histopathologique par une nécrose du foie et apoptose péri portale (Rahelié et al., 2006). Ce qui pourrait compromettre la fonction détoxifiante du foie à savoir éliminer le manganèse (Zhang et al., 2003).

On a observé aussi que l'administration de HE de *M.spicata* a une action protectrice des tissus hépatiques qui pourrait s'expliquer par l'effet chélateur et donc antioxydant des composants phénoliques que contient l'HEM, et qui réduit considérablement les radicaux libre générés par l'intoxication qui provoque l'altération cellulaire dans le tissu hépatique. ((Murad et al. 2016). Nos résultats sont en accorde avec ceux de Ben Saad et al, (2017), qui indiquent que l'action protectrice de *Mentha spicata* contre les lésions hépatiques est due à leur capacité antioxydante (Arumugam et al,2009).

7.2. Effet du plomb et du manganèse et HEM sur l'architecture de rein

Dans la présente étude, les résultats de l'examen microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des reins de rats Co-exposés par le Pb-Mn ont montré un parenchyme rénal remanié par une inflammation faite de congestion active et un œdème, La présence de nécrose partielle des tubes contournés par contre les rats témoins présentaient un parenchyme rénal normal comportant des glomérules rénaux et des tubes contournés, le tout dans un tissu interstitiel sans anomalie. Ces résultats sont en accord avec les travaux entrepris par Zhang et al., (2013) ; Abdel Moneim et al., (2011) qui ont montré que le Pb induit des modifications histologiques des reins qui se développent et se caractérisent notamment par la diminution des glomérules du rein, la présence d'une réponse inflammatoire, vacuolisation cytoplasmique et une dilatation de certains tubules rénaux. Ces altérations tubulaires causés par la toxicité par le pourraient être le résultat d'un changement hydrauliques dans le tissu rénal et suggèrent que l'intoxication par le Pb cède à une défaillance partielle des pompes de transport ionique dans les cellules tubulaire qui à son tour produit un gonflement tubulaire et provoque une nécrose et la vacuolisation de la tubules (Karmakar et al., (1986) ;Wei et al., 2001).

L'exposition au chlorure de manganèse provoque des changements dans l'architecture rénale (inflammation, nécrose tubulaire). Cette atteinte invoque l'hypothèse d'un état de stress oxydatif causé par le manganèse aux seins des cellules (Guilherme et al., 2015). Sachant que le manganèse peut se substituer aux différents oligo-éléments de sa même valence aux seins des métalloprotéines (enzymes) qui nécessite la présence de ces oligo-éléments dans leurs activités et induit par la suite des perturbations aux niveaux des différents métabolismes.

Dans le même contexte, les résultats histologiques au niveau rénale chez les rats Co-exposés par le Pb-Mn est traité par HEM ont permis d'observer une nette amélioration par rapport aux rats intoxiqués. L'efficacité de HEM dans le rein était peut-être due à la présence des composés chélateurs (Ullah, et al., 2014). Ces composés biologiquement actifs peuvent chélate le Pb-Mn et renforcé son excrétion de l'organisme, ce qui réduit l'accumulation de Pb et Mn dans le tissu rénal.

Des études suggèrent que la *Mentha Spicata* améliore la fonction rénale et corrige son dysfonctionnement lors d'une atteinte rénale chronique (Thangapandiyan et al., 2013).

Ullah, et al., (2014) a montré également que l'extrait de la menthe (*Mentha piperita*) réduit la nécrose tubulaire dans les reins induite par la gentamicine et offre la protection contre l'insuffisance rénale en agissant comme un antioxydant.

CONCLUSION

Conclusion :

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet de l'huile essentielle de la plante *Mentha Spicata* administrée par la voie intra péritonéale à une dose de 0.1 ml HEM / Kg durant une période de 21 jours chez des rats préalablement Co-exposés au plomb (0.2%) et au manganèse (4.79 mg Mn/l) durant la période de gestation et lactation sur l'impact sur le fonctionnement cérébrale, hépatique et rénale , selon différentes approches expérimentales (neurocomportementales ,biochimiques et histologique) .

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse de l'huile essentielle de *Mentha Spicata*, nous a permis de révéler que les composés majoritaires sont des monoterpènes cétones 96,71%,et des hydro carburants mono terpénique 1.75%.

L'exposition chronique de Pb à la dose (0.2%) et de Mn à la dose de (4.79 mg/l) chez les rats wistar durant la période de gestation et lactation, entraîne une diminution très significative du poids corporel. De même, nous avons enregistré une baisse significative dans les poids des organes : foie, reins et cerveau, ce qui se traduit par une perturbation fonctionnelle. En effet, nous avons observé installation d'un état dépressif et d'anxiété chez les animaux Co-exposés aux Pb-Mn. Avec une baisse dans l'activité d'exploration du milieu.

Le dosage de la glycémie à jeun a révélé une augmentation significative du glucose dans le sang après la période d'expérimentation qui peut être due à l'effet de (Pb-Mn). hyperglycémie est à une demande augmentation dans la glycogénolyse suite à une demande importante en glucose pour réponde aux besoins d'énergie .

Au niveau hépatique , nous avons enregistré une augmentation des enzymes TGO et TGP et PAL au niveau sanguin. Cette augmentation est due à une altération du tissu hépatique et une perturbation dans la perméabilité des membranes hépatocytaires. Ceci a été confirmé par l'étude histologique qui montre que le plomb et le manganèse causent des dommages très sévères au niveau des hépatocytes. Une nécrose partielle apparaît au niveau des hépatocytes.

Dans le même contexte, les résultats ont montré aussi que les deux métaux ont des répercussions sur la fonction rénale chez les rats qui s'est traduite par une augmentation dans l'urée et la créatinine dans le plasma. Ces résultats sont en faveur d'un dysfonctionnement rénal provoqué par le Pb-Mn. En outre, l'étude ana pathologique au niveau des reins a révélé une inflammation faite de congestion active et un œdème. La toxicité rénale est caractérisée par une réduction de la filtration

glomérulaire.

La Co-exposition aux (Pb-Mn) nous a permis d'observer une augmentation significative dans le dosage des triglycérides et le cholestérol comparés aux rats témoins. De plus, l'analyse de stress oxydatif au niveau du cerveau, foie, rein et au niveau érythrocytaire, montre un déséquilibre de labalance oxydative traduite par une diminution de l'activité des enzymes SOD, GPX, CAT chez les rats Co-exposés 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.

En revanche, l'administration de l'huile essentielle de *Mentha spicata* 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 diminution de tous les paramètres analysés y compris les biomarqueurs de la fonction rénale et hépatique ainsi une régénération tubulaire, glomérulaire et hépatocytaire. Ceci se traduit par l'effet de cette l'huile comme un régulateur biochimique, (antidépresseur, anxiolytique) et protecteur contre les lésions rénal et hépatique.

Par ailleurs, l'administration de l'HEM par voie IP aux jeunes rats durant 21 jours a permis de rétablir les activités des enzymes de la CAT, SOD et GPx. Ces résultats montrent que l'HE de *Mentha spicata* a un pouvoir régulateur du statut anti-oxydant. Cette étude a permis d'apprécier l'efficacité de l'huile essentielle de *Mentha spicata* sur la restauration de différentes fonctions physiologique et la préservation des différents organes ciblés.

En termes de perspectives, il serait envisageable d'entreprendre un ensemble de protocoles expérimentaux plus approfondi portant sur différents volets :

- Développer une série d'expériences d'ordre biochimique et d'autres tests neurocomportementaux pour mieux étudier l'impact du plomb et manganèse au niveau du système nerveux central.
- Une étude immunohistochimique tel que les dosages des protéines (C-fos et la DCx) est en cour de réalisation en France.
- Il serait nécessaire de réaliser des nouvelles expérimentations portant sur la définition des mécanismes d'action de *Mentha spicata* sur l'amélioration dans le tissu cérébrale.

- Dosage par HPLC des différents neurotransmetteurs tel que (Dopamine-serotonine)

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adio, AM., 2005. Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from essential oils of some liverworts (Hepaticae). These for the degree of Dr. rer. national à l'institut de chimie organique. Université de Hambourg. 280 p

Adli DEH , Kahloula K , Slimani M, Brahmi M , Benreguieg M. Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse. *Phytothérapie*. 2017

Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, 105, 121–126

AFNOR, 1996. Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p

Aghfir, A., Akkad, S., Rhazi, M., Kane, C. S. E., & Kouhila, M. (2008). Détermination du coefficient de diffusion et de l'énergie d'activation de la menthe lors d'un séchage conductif en régime continu. *Revue des énergies renouvelables*, 11(3), 385-394.

Akoume M.Y., Perwaiz S., Yousef I.M. and Plaa G.L. (2003). Synergistic role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol-7-alpha-hydroxylase in the pathogenesis of manganese bilirubin- induced cholestasis in rats. *Toxicol Sci*; 73(2): 378-385.

Alexandre de Sousa Barros , Selene Maia de Moraes , Pablito Augusto Travassos Ferreira , Ícaro Gusmão Pinto Vieira , Afrânio Aragão Craveiro , Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle , Jane Eire Silva Alencar de Menezes , Francisco Walber Ferreira da Silva , Halisson Araújo de Sousa. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*. 2015 ;76: 557–564.

Alexia. Daoust, E.L. Barbier, S. Bohic, 2013. Manganese enhanced MRI in rat hippocampus: A correlative study with synchrotron X-ray microprobe, *NeuroImage*, Volume 64, Pages 10-18, ISSN 1053-8119, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.09.025>

Alghazal MA, Sutiaková I, Kovalkovicová N, Legáth J, Falis M, Pistl J, Sabo R, Benová K, Sabová L, Váczi P (2008) The induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate. *Journal toxicology and industrial health* 24(9): 587-593.

Alicia, A.; Cheryl, A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 322–328

ALILOU Hakim 2012 ; Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC

Amany M. Mousa, Amal A. Shehab **2015** The effect of manganese on the olfactory bulb of adult male albino rat and the role of meloxicam: A histological and immunohistochemical study *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 3, 8–18

AMIARD J.C., AMIARD –TRIQUET C., BERTHET B., METAYER C., 1987- Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non – essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J.Exp.mar.biol.Ecol.* 106: 73- 89

Ana Navas-Acien; Eliseo Guallar; Ellen K. Silbergeld ; and Stephen J. Rothenberg. 2006. Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives* [Vol. 115, No. 3](#)

Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., Job, D., 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16, 2350–2364.

Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C R Biol.* 2007. ;330(8):581-8.

Anouar Ben Saad,^a Ilhem Rjeibi,^a Hichem Alimi,^a Sana Ncib,^b Talel Bouhamda,^c Nacim Zouar. 2017. Protective effects of *Mentha spicata* against nicotine-induced toxicity in liver and erythrocytes of Wistar rats. *Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme*, 2018, 43(1): 77-83, <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0144>

Arumugam, P., Priya, N. G., Subathra, M., & Ramesh, A. (2008). Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 26(1), 92-95.

Arumugam, P., and Ramesh A. 2009. Protective effects of solvent fractions of *Mentha spicata* (L.) leaves evaluated on 4-nitroquinoline-1-oxide induced chromosome damage and apoptosis in mouse bone marrow cells. *Genet. Mol. Biol.* 32: 84

Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Aït Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari, Essential oils: From extraction to encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 483, Issues 1–2, 2015, Pages 220-243, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>

Aschner JL, Aschner M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med* 26: 353-62

ATSDR (2000) - Toxicological Profiles for manganese. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.

Atsdr. 2012. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for Mn. U.S. Dpt. Health Human Services, Publ Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.

Avila DS, Gubert P, Fachineto R, et al. 2008. Involvement of striatal lipid peroxidation and inhibition of calcium influx into brain slices in neurobehavioral alterations in a rat model of short-term oral exposure to manganese. *Neurotoxicology* 29(6):1062-1068.

Awde S. Relations entre protéolyse hépatique et qualités technologiques et sensorielles du foie gras de canard (Doctoral dissertation). Toulouse – France. 2014

B

Bandyopadhyay U, Das D, & Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current science*. 1999; 658-666.

Banks E. C., Ferretti L. E. and Shucard D. W. (1997). Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: A review of behavioral, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicology*, 18(1), 237-282.

Barbalho SM, Machado FMVF, Oshiiwa M, Abreu M, Guiger EL, Tomazela P, and Goulart RA. Investigation of the effects of peppermint (*Mentha piperita*) on the biochemical and anthropometric profile of university students. *Cienc Tecnol Aliment Campinas*. 2011; 31(3): 584-588.

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., & Laglaoui, A. (2016). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha*: *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie*, 14(2), 88-96.

Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cobianchi, R.C., Trinchella, F., Capasso, C. and Carginale, V. (2012). Toxicity, accumulation, and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes, *Int. J. Phytoremediat.* (14), 374–387.

Bellinger D.C. (2000). Effect modification in epidemiological studies of low level neurotoxicant exposures and health outcomes. *Neurotox Teratol* 22: 133–140.

Bellusci M, La Barbera A, Padella F, Mancuso M, Pasquo A, Grollino MG, et al. Biodistribution and acute toxicity of a nanofluid containing manganese iron oxide nanoparticles produced by a mechanochemical process. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1919–29

Benabid, N.; Mesfioui, A.; Ouichou, A. Effects of photoperiod regimen on emotional behaviour in two tests for anxiolytic activity in Wistar rat. *Brain Res. Bull.* **2008**, *75*, 53–59.

Benayed N. (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 – Université Mohamed 6 – Agdal. Page : [9-36].

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

Benomari FZ , Andreu V, Kotarba J, Dib MA, Bertrand C , Muselli A, Costa J, Djabou N (2017) Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. *Environmental Science and Pollution Research* 1-12.

Ben Saad A, Rjeibi I, Alimi H, Ncib S, Bouhamda T, Zouari N (2017) Protective effects of *Mentha spicata* against nicotine-induced toxicity in liver and erythrocytes of Wistar rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 1–7

Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, *12*(6), 364-371.

Benzeggouta, N. (2005). Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments.

Bhuvaneswari S, Murugesan S, Subha TS, Dharmotharan R, Shettu N (2013). In vitro antioxidant activity of marine red algae. *Chondrococcus hornemanni* and *Spyridia fusiformis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* *5* (3): 82-85.

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

Biomnis, 2013; biologie médicale spécialisée

Bonnard N, Falcy M, Hesbert A, Jargot D, Pilliere F, Schneider O, Serre P (2006) Plomb et composés minéraux fiche toxicologique INRS

Bouabid S. Tinakoua A. Lakhdar-ghazel N. Benazzouz A. (2016) Manganese Neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *Journal of neurochemistry* *136*, 677-691

Boukhalfa M. (2014). Étude de l'activité antioxydante (test d'ABTS) des huiles essentielles et la pédologie haloxylon *Scoparium pomel* (remth) de la région de Naâma. Mémoire de master en production et amélioration végétal, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen. P:22-30.

Boukhobza, F., Goetz, P., Quémoun, A. C., & Lamendin, H. (2014). *Phytothérapie en odontologie*. Editions CdP.

Bouchard M. F., Sauve S., Barbeau B., Legrand M., Brodeur M. E. and Bouffard T. (2011). Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 119: 138–143

Bouchra C, Achouri M, Idrissi Hassani LM & Hmamouchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *Journal of Ethnopharmacolgy*. 2003;89: 165-169.

Bouguerra, A. (2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill.

Boukhebt H, Adel N.C, Hani B, Farida S, Messaoud R, Hocine L and Daoud H (2011) Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre* 3 (4) 267-275

Bounihi, A. (2016). *Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de Melissa officinalis et de Mentha rotundifolia (Lamiacées)* (Doctoral dissertation).

Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., & Chaouch, A. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 3(2).

Brada M, Bezzina M, Marlier M, Carlier A, Lognay G. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc.* 2007; 11 (1), 3–7.

Brahmi F, Madani K, Dahmoune F, Rahmani T, Bousbaa K, Oukmanou S, Chibane M. Optimization of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Phcog Commn.* 2012; 2 (4), 72–86. DOI: 10.5530/pc.2012.4.10

Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., ... & Mohamed, C. (2016). Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.

Brud, A. J. (2010). Assessment of Intracellular Targets with MRI.

Brun, P., Bégou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., Suaud-Chagny, M.-F., 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *Journal of Neurochemistry* 94, 63–73.

Bruneton, J., 1993. *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales*, éditions Techniques et documentations Lavoisier. 915 p.

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

Buronzo, A. M. (2012). *Remèdes naturels Pour les Nuls*. First.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

C

Campbell J.R., Rosier R.N., Novotny L., Puzas J.E. 2004. The association between environmental lead exposure and bone density in children. *Environ. Health Perspective*, 112 (11), 1200-3.

Carola, V.; D'Olimpio, F.; Brunamonti, E.; Mangia, F.; Renzi, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* **2002**, 134, 49–57.

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

Chauhan R.S, Kaul M.K, Shahi A.K, Kumar A, Ram G, Tawa A. (2009) Chemical composition of essential oils in *Mentha Spicata* L. accession (IIIM(J)26) from North-West Himalayan region, india. *Ind Crops Prod*, 29(2-3): 654-656

Chanel Olivier, Catherine Dollfus, Jean-Marie Haguenoer, Philippe Hartemann, Guy Huel, Béatrice Laroque, Dominique Lison, Stéphane Marret, Ghislaine Pinon-Lataillade, Joël Prémont, Hubert de Verneuil, Denis Zmirou, 1999. Expertise collective : Plomb dans l'environnement : quels risques pour la santé ? Inserm, Dossier de presse. Paris, le 13 janvier 1999.

Charles PIERRON;2014; FACULTE DE PHARMACIE, UNIVERSITE DE LORRAINE; ‘Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatifs

Chua AC, Morgan EH. Manganese metabolism is impaired in the Belgrade laboratory rat. *J Comp Physiol B*. 1997;167(5):361–9.

Chou ST, Chang WL, Chang CT, Hsu SL, Lin YC, Shih Y (2013) *Cinnamomum cassia* Essential Oil Inhibits α -MSH-Induced Melanin Production and Oxidative Stress in Murine B16 Melanoma Cells. *Int. J. Mol* 14: 19186-19201.

Claude Ostiguy, Sylvain Malo, Paul Asselin, 2003; IRSST; "Synthèse des connaissances scientifiques sur les risques d'atteinte à la santé suite à une exposition professionnelle au manganèse"

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

Croquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. *New York*.

Crossgrove J. and Zheng. W. Manganese toxicity upon over exposure. *NMR Biomed*. 2004; 17: 544–553.

Curutchet A, Dellacassa E, Ringuelet JA, Chaves AR, Viña SZ. Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha piperita* and *M. spicata*). *Food Chem*. 2014; 143, 231–238.

D

Danel V., 1997. Intoxication par le plomb, physiopathologie, épidémiologie, diagnostic.

Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., & Zhuang, X. (2010). Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, 68(5), 843-856.

Dart R.C., Hurlbut K.M. and Boyer-hassen L.V. (2004). "lead". In dart, rc. *Medical toxicology* (3rd ed.). Lippincott williams& wilkins. Isbn 0-7817-2845-2.

De Oliveira, T. M., de Carvalho, R. B. F., da Costa, I. H. F., de Oliveira, G. A. L., de Souza, A. A., de Lima, S. G., & de Freitas, R. M. (2015). Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical biology*, 53(3), 423-428.

De Sousa Barros, A., de Moraes, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., ... & de Sousa, H. A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557-564.

Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p.

Delphine clozel,2008;EHESP:"école des hautes études en santé publique".ingénieur de génie sanitaire;Atelier santé environnement''évaluation des risques liés a l'exposition aux poussières de manganèse"

Demetrios Chiuratto Agourakis, Iara Maria Carneiro de Camargo, Marycel Barboza Cotrim e Marlene Flues.2006. COMPORTAMENTO DE ZINCO E MANGANÊS DE PILHAS ALCALINAS EM UMA COLUNA DE SOLO. Quim. Nova, Vol. 29, No. 5, 960-964, 2006

Desmares C., Laurent A. & Delerme C., 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.

Diallo.W, Diasse-Sarr.A, Diop.L, Mahieu.B, Biesemans.M, Willem.R, Kociok-Kohn.G and Molloy.K.C.2009.Sci.Study.Res.(3), P:207–212.

Dini A, Giudetti A, Ruzittu M, Gnoni G. and 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.

Dingwall-Fordyce I, Lane RE A Follow-up Study of Lead Workers *Occupational and Environmental Medicine* 1963;**20**:313-315

Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 4563–4569.

Dorman.Dc, Mcelveen.Am, Marshall.Mw, Parkinson.Cu, Arden.James .R, Struve.Mf Et Al Maternal.Fetal.2005.Distribution Of Manganese In The Rat Following Inhalation Exposure To Manganese Sulfate,Neurotoxicology ;(26):625–32.

Doymaz, I. (2006). Thin-layer drying behaviour of mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 370-375.

Drolet C, Zayed J. 1994. Manganese intake of adult men consuming self-selected diets. *J Can Diet Assoc* 55: 184-187.

Duranel A. 1999. Effets de l'ingestion de plombs de chasse sur le comportement alimentaire et la condition corporelle du canard colvert (*Anas platyrhynchos*). Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Nantes. Pp 96.

E

El Fadl, A., & Chtaina, N. (2010). Etude de base sur la culture de la menthe du Maroc. *Programme Régional de lutte intégrée contre les organismes nuisibles (Integrated Pest Management) au Proche Orient*.

El Hacı ; Ilias, F., Bensehaila, S., Medjdoub, K., , I., & Gaouar-Benyelles, N. (2015). The role of phenolic compounds in the defense of sooty mold of olive leaves (*Olea europea* L.). *African Journal of Microbiology Research*, 9(15), 1075-1081.

El Haib A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de doctorat en chimie organique et catalyse, Université Toulouse - Paul Sabatier, 6-25.

Emmanuelle Pourcher et sophie Rémillard 2009; Le Médecin du Québec, volume 44, numéro 10;"le manganèse et l'intoxication professionnelle'

Eriksson, H., K. Magiste, L. O. Plantin, F. Fonnum, K. G. Hedstrom, E. Theodorsson-Norheim, K. Kristensson, E. Stalberg, et E. Heilbronn. 1987. Effects of manganese oxide on monkeys as revealed by a combined neurochemical, histological and neurophysiological evaluation. *Arch Toxicol* 61, no. 1: 46–52.

Erikson, K., Aschner, M., 2002. Manganese causes differential regulation

F

Falcy M., a. Hesbert, d. Jargot, j.c. Protois, m. Reynier, o. Schneider, p. Serre (2003). 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 plomb et dérivés, fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques

FATIHA, Brahmi, DIDIER, Hauchard, NAÏMA, Guendouze, *et al.* Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, 2015, vol. 74, p. 722-730.

Ferri.R, Donna.F and Smith.D.R.2012. J,Environ, Protect. 3, 374–385

F.Z. El Hassani, A. Zinedine, S. Mdaghri Alaoui, M. Merzouki, M. Benlemlih. 2010. Use of olive mill wastewater as an organic amendment for *Mentha spicata* L. *Industrial Crops and Products* 32 : 343–348.

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

Fordahl S, Cooney P, Qiu Y, Xie G, Jia W. and Erikson KM. Waterborne manganese exposure alters plasma, brain, and liver metabolites accompanied by changes in stereotypic behaviors. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 34(1):27–36.

Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48.

Fossati P, Prencipe, L. . Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 1982;28, 2077–2080.

Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J.-C., Hamon, M., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.-P., 2012. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *Journal of Neurochemistry* 121, 99–114.

Fradley, R.L., O'Meara, G.F., Newman, R.J., Andrieux, A., Job, D., Reynolds, D.S., 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behavioural Brain Research* 163, 257–264.

Francianne P. Nogoceke, Inara M.R. Barcaro, Damião P. de Sousa, Roberto Andreatini, Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice, *Neuroscience Letters*, Volume 619, 2016, Pages 43-48, ISSN 0304-3940 <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.013>.

Francisco Flores, Fikri El Yahyaoui, Gustavo de Billerbeck, Felix Romojaro, Alain Latché, Mondher Bouzayen, Jean-Claude Pech, Christian Ambid, Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons, *Journal of Experimental Botany*, Volume 53, Issue 367, 1 February 2002, Pages 201–206, <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.367.201>

Franchomme, P., Jollois, R., & Pénoël, D. (2001). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. *Édition Roger Jollois*.

Freeland-Graves JH, Bales CW, Behmardi. 1987. Manganese requirements of humans. Dans: Nutritional Bioavailability of Manganese, C. Kies, American Chemical Society, Washington DC, p. 90-104

G

GAGNEUX-MOREAUX S., 2006- Les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) dans la production des micro algues sur différents milieux de culture : Biodisponibilité- Bioaccumulation

et impact physiologique. Thèse de Doctorat en biologie marine. Université de Nantes.257p

Galeotti, N., Mannelli, L.D.C., Mazzanti, G., Bartolini, A., Ghelardini, C., 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters* 322, 145–148.

Garnier R. Toxicité du plomb et de ses dérivés. EMC-ToxicolPathol. 2005; 2: 67–88. Viala A, Botta A. Toxicologie. 2e Édition. Paris: Édition Lavoisier, 2005

Ge H, Liu S, Su B, Qin T (2014) Predicting synergistic toxicity of heavy metals and ionic liquids on photobacterium Q67. *Journal of hazardous materials* 268: 77–83

Goullé JP, Saussereau E, Lacroix C and Guerbet M. Traité de toxicologie médico-judiciaire .Re : Chapitre 24; Les Métaux .2012 ; P :733-756.

Grant, A., Townend, M., Mulhern, R., & Short, N. (2010). *Cognitive behavioural therapy in mental health care*. Sage.

Greenlee A.R. (2003). Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology*; 14(4): 429-436.

Grizzo LT and Cordellini S. perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol, Sci.* 2008; 103: 207–214.

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

Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., & Eskilsson, C. S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloa odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 33(3), 223-233.

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

Golub, M. S., C. E. Hogrefe, S. L. Germann, T. T. Tran, J. L. Beard, F. M. Crinella, et B. Lonnerdal. 2005. Neurobehavioral evaluation of rhesus monkey infants fed cow's milk formula, soy formula, or soy formula with added manganese. *Neurotoxicol Teratol* 27, no. 4: 615–27.

Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M., & Yogalakshmi, K. (2012). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology research*, 110(5), 2023-2032.

Guilarte TR. Manganese and Parkinson's disease : a critical review and new findings. *Environ Health Perspect.* 2010 ; 118(8):1071– 80.

Gulcin I, Sat IG, Beydemir S, Elmastas M, Kufrevioglu OI (2004) Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* 87: 393–400.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., ... & Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4), 1449-1456.

Gunnar.f, Nordberg.Bruce. Fowler and Monica Nordberg-handbook on the toxicology of metals, Fourth Edition-Academic, Press, P:369.

G. D. Nuyts, R. A. Daelemans, Ph.G. Jorens, M. M. Elseviers, F. L. Van de Vyver, M. E. De Broe, Does Lead Play a Role in the Development of Chronic Renal Disease?, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 6, Issue 5, 1991, Pages 307–315, <https://doi.org/10.1093/ndt/6.5.307>

H

Halder S, Mehta AK, Kar R, Mustafa M, Mediratta PK, Sharma KK. Clove oil reverses learning and memory deficits in scopolamine-treated mice. *Planta Med.* 2011;77:830–4.

Hanan A. and Riham M. 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.* 2012;6(7): 497-509.

Health and Welfare Canada. 1990. Nutrition recommendations. Scientific Review Committee, Ottawa, Ontario

Herndon.E.M, Jin.L and Brantley.S.L. **2011**. *Environ,SciTechn* 01 45 (1), 241–247

HSDB (2003) - Manganese. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>

Huang CC, Chu NS, Lu CS, Wang JD, Tsai JL, Tzeng JL, Wolters EC and Calne DB. Chronic manganese intoxication. *Arch. Neurol.* 1989; 46: 1104–1106. PMID: 2803069

Huang Z, Pan XD, Wu PG, Han JL, Chen Q (2014) Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control* 36(1): 248-252.

Hussain A.I, Anwar F, Nigam P.S, Ashraf M, Gilani A.H (2010) Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agri*, 90(11):1827-1836

Hussain, S. T., Mahmood, T., & Malik, S. A. (2010). Phytoremediation technologies for Ni⁺⁺ by water hyacinth. *African journal of Biotechnology*, 9(50), 8648-8660.

I

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.

INERIS 2003 : INSTITUT NATIONAL DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET DES RISQUES,(PLOMB ET SES DÉRIVÉS)

INERIS 2012. en ligne, fiche de données toxicologiques et environnementale des substances chimiques

INSERM (1999). Plomb dans l'environnement - Quels risques pour la santé ? Expertise Collective. Les Editions ISBN 2 85598-745-8.

INRS 2006 : institut national de recherche et de sécurité, fiche toxicologique FT 59 (plomb et composée minéraux)

INERIS 2007. en ligne, fiche de données toxicologiques et environnementale des substances chimiques

INERIS 2012. en ligne, fiche de données toxicologiques et environnementale des substances chimiques

irsst 2003 (l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail IRSST) rapport, mai 2003 R-339: Synthèse des connaissances scientifiques sur les risques d'atteinte à la santé suite à une exposition professionnelle au manganèse

Isman, M. B., Machial, C. M., Miresmailli, S., & Bainard, L. D. (2007). Essential oil-based pesticides: New insights from old chemistry. *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*, 201-209.

J

Jacobs DE, Clickner RP, Zhou JY, Viet SM, Marker DA, Rogers JW, Zeldin DC, Broene P, Friedman W (2002) The prevalence of lead-based paint hazards in U.S. housing, *Environ Health Perspect.* 110: 599– 606

Jarrar Bashir M and Noory TT. Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012; (19), 203–210.

Jedi-Behnia B, Abbasi Maleki S, Mousavi E. The antidepressant-like effect of Mentha spicata essential oil in animal models of depression in male mice. J Fasa Univ Med Sci. 2017; 7 (1) :141-149 URL: <http://journal.fums.ac.ir/article-1->

Johar D, Roth JC, Bay GH, Walker JN and Krocak TJ, Los M. Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer, Roczn, Akad, Med, Białymst. 2004; 49, 31–39.

Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, et al (1973) Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. Pharmacology 11:151–69.

JONOT Léa 2007 : Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) ;(Ecotoxicologie du saturnisme lié à l'ingestion de plombs de chasse chez le Canard Colvert (Anas platyrhynchos) dans la Dombes (Ain, France)) ; ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Jouault, S. (2012). *La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

J.L. Stauber, T.M. Florence, The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom Nitzschia closterium and the freshwater green alga Chlorella pyrenoidosa, Water Research, Volume 23, Issue 7, 1989, Pages 907-911, ISSN 0043-1354, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90016-X)

Judicaëlle Brunet. Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse) : réponses phonologique et moléculaire au plomb du Lathyrus sativus L.. Biologie végétale. Université Paris-Est, 2008. Français.

K

Kahloula K, Slimani M, Dubois M, Bonnet J. D-cycloserine enhances spatial learning performances of rats chronically exposed to lead during the developmental period. Afr J Neurological Sci 2009; 28:67-77.

KAHLOULA Khaled ,2010 : 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 glutamatergiques

Karri, Surya K.; Saper, Robert B.; Kales, Stefanos N. 2008. Lead Encephalopathy Due to Traditional Medicines., *Current Drug Safety*, Volume 3, Number 1, 2008, pp. 54-59(6)

Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys.* 1984; 21:130–2.

Karousou R, Koureas DN, Kokkini S. Essential oil composition is related to the natural habitats: Corido *Thymus capitatus* and *Satureja thymbra* in Natura 2000. *Phytochemistry.* 2005; 66:2668–73.

Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Faza S. Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats. *CR Biol.* 2005; 328:463-470.

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2014). Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 168, 1-7.

KEEN C.L., ENSUNSA J.L. & CLEGG M.S., 2000, Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese Metal ions in biological systems,37,89-121.

Khalid G, Al-Fartosi, Haider Radi, Eman A, Al-Rekabi. Lipid Profile of Diabetic Male Rats Treated with Phenolic Compounds of Leaves Extracts from *Mentha longifolia* and *Mentha spicata*. *International Journal of Pharmacy, Biology and Medical Sciences.* 2014;Vol.3. No. 2.

Khodadust MR, Samadi F, Ganji F, Jafari Ahangari Y and Asadi GH. Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) alcoholic extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in broiler chickens under heat stress condition. *Poult Sci J.* 2015;3 (1): 1-16.

Kind, P.R.N., King, E.G., 1954. Colorimetric determination of alkaline phosphatase activity. *J. Clin. Path.* 7, 322.

Klaassen CD. Biliary excretion of metals. *Drug Metab Rev.*1976;5(2):165–96.

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

Krachler M. Trace element transfer from the mother to the newborn ,investigations on triplets of colostrum, maternal and umbilical cord sera. *Eur,J,Clin ;Nutr.*1999;53,486–494.

L

Lauwerys R., Haufrond V., Hoet P., Lison D., 2007. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, 5e édition, Masson, Paris

Lebda MA, El-Neweshy MS, El-Sayed YS (2012) Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. *Neurotoxicology* 33: 98–104.

Lee BK, Kim Y (2011) Relationship between blood manganese and blood pressure in the Korean general population according to KNHANES 2008. *Environ Res* 111:797–803

Loikkanen J, Naarala J, Vähäkangas K. Glutamate increases toxicity of inorganic lead in GT1-7 neurons: partial protection induced by flunarizine. *Arch Toxicol.* 2003;77:66–71.

Long LL, Li XR, Huang ZK, Jian YM, Fu SX, Zheng W. Relationship between changes in brain MRI and 1H-MRS, severity of chronic liver damage, and recovery after liver transplantation. *Exp Biol Med.* 2009;234:1075–85.

Louvain médical, 1999, Evaluation par RMN de l'intoxication cérébrale par le manganèse, 118, p. 165-168.

Loziene K, Venskutonis PR (2005) Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical systematics and ecology* 33: 517-525.

Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr.* 2004; A 1043, 323-327.

Lynch RA, Boatright DT, Moss SK (2000) Lead-contaminated imported tamarind candy and children's blood lead levels, *Public Health Rep* 115 : 537– 543

M

Mahsan Bayani , Mahmood Ahmadi-hamedani and Ashkan Jebelli Javan. Study of Hypoglycemic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Iranian *Mentha Spicata* Leaves Aqueous Extract in Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2017; 16 (Special Issue): 75-82.

MARIANNE PIOCHON 2008: ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ESPÈCES VÉGÉTALES DE LA FLORE LAURENTIENNE: 84 COMPOSITION CHIMIQUE,

ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES ET HÉMI-SYNTÈSE-L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI.

Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, & Ismail N (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116: 306-312.

Marotti M, Piccaglia R, Giovanelli E, Deans SG, Eaglesham E.. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour Fragr.* 1994; J. 9 (3),125–129.

Marques.M, Millás.I, Jiménez.A, García-Colis.E and Rodrigues-Feo.J.A.2001.Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead induced hypertension in rats, *j,am,soc,nephrol*,(12):2594–2600.

Martins, M. R., Tinoco, M. T., Almeida, A. S., & Cruz-Morais, J. (2012). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from Portuguese flora.

Mehani, M., Segni, L., Terzi, V., Morcia, C., Ghizzoni, R., Goudjil, M. B., & Bencheikh, S. E. (2015). Antibacterial, antifungal activity and chemical composition study of essential oil of *Mentha piperita* from the south Algerian. *Der Pharma Chemica*, 7(12), 382-387.

Menut, C., Bessiere, J. M., Samate, D., Djibo, A. K., Buchbauer, G., & Schopper, B. (2000). Aromatic plants of tropical west Africa. XI. chemical composition, antioxidant and antiradical properties of the essential oils of three *Cymbopogon* species from Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 207-212.

MIQUEL M. ,2001.Les effets des métaux lourds sur l'Environnement et la Santé. Rapport office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Rapport Sénat N°261 : 360p 2-

Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y and Aschner M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 240: 219–22

Ming ST, Kai WL, Chia HC, Ling CC, Fang IM, Yen AT, Mei LC (2015) The critical fetal stage for maternal manganese exposure. *Environmental Research* 137: 215–221.

Molina RM, Phattanarudee S, Kim J, Thompson K, Wessling-Resnick M, Maher TJ, Brain JD. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology*. 2011; 32:413–22.

Moussa SA and Bashandy SA. Biophysical and biochemical changes in the blood of rats exposed to lead toxicity. *Romanian. J. Biophys*, 18: 123-133.

MISSELWITZ S., MUHLER A. & WEINMANN H.J., 1995, A toxicologic risk for using manganese complexes? A literature survey of existing data through several medical specialities, *Investigative Radiology*, 30 (10),611-620

M. Reshma Anjum., 2015. Recovery of lead-induced suppressed reproduction in male rats by testosterone. *Andrologia* 47(5);0303-4569 <https://doi.org/10.1111/and.12303>

N

Nabil M Ibrahim¹ et al, 2012 : Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat- *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(1): 41-46

Nadia Nikolova-Pavageau Florence Pilliere , 2010. Exposition Professionnelle Aux Perturbateurs Endocriniens.

NAGAMOTO S., UMEHARA F., HANADA K., NOBUHARA Y., TAKENAGA S., ARIMURA K. & OSAME M., 1999, Manganese intoxication during total parenteral nutrition: report of two cases and review of the literature, *Journal of the Neurological Sciences*, 162,102-105.

Naveed, Ullah., Mir, Azam Khan., Taous, Khan., Afzal, Haq Asif., Waqar, Ahmad., 2014 *Mentha piperita* in nephrotoxicity – a possible intervention to ameliorate renal derangements associated with gentamicin. *Indian Journal of Pharmacology*. Vol 46 | Issue 2.

Nazem V, Sabzalian R.M, Saeidi G, Rahimmalek M (2019) Essential oil yield and composition and secondary metabolites in self-and open-pollinated populations of mint (*Mentha spp*). *Industrial Crops and Product*,130;332-340

Newland, M. C., et B. Weiss. 1992. Persistent effects of manganese on effortful responding and their relationship to manganese accumulation in the primate globus pallidus. *Toxicol Appl Pharmacol* 113, no. 1: 87–97.

Normandin, L., L. Ann Beaupre, F. Salehi, St -Pierre A, G. Kennedy, D. Mergler, R. F. Butterworth, S. Philippe, et J.Zayed. 2004. Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese. *Neurotoxicology* 25, no. 3: 433–41.

NTP. 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of manganese (II) sulfate monohydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). National Toxicology Program. Technical Report Series 428. RISKLINE 94030007.

O

Oner, G., et U. K. Senturk. 1995. Reversibility of manganese-induced learning defect in rats. *Food Chem Toxicol* 33, no. 7: 559–63.

Organisation mondiale de la Santé (OMS). 2004. Manganese in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.

Orhan, İ. E., ÖZÇELİK, B., Kartal, M., & Kan, Y. (2012). Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology*, 36(3), 239-246.

Oulhote, Y. 2012. Contribution de l'environnement résidentiel à l'exposition au plomb des enfants de 6 mois à 6 ans en France, 2008-2009, Thèse de doctorat en biologie, L'université de Lorraine.

P

Pascale MISSY., 2001 "THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ", Spécialité: TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT.; RECHERCHE DE NOUVEAUX CHELATEURS DU MANGANESE, EN Vue de LA DETOXICATION DE L'ORGANISME ETUDES IN VIVO ET IN VITRO

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.

Peili.Huang , Chunxia Chen , Hui.Wang , Guojun Li , Haiming Jing , Ying Han , Na Liu, Yang Xiao, Qihong Yu, Yuting Liu, Pengwen Wang , Zhixiong Shi, Zhiwei Sun. Manganese effects in the liver following subacute or subchronic manganese chloride exposure in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011 ;(74) 615-622.

Pezerat H. Additif au mémoire d'avril sur le projet d'une nouvelle rédaction .La Revue de Médecine Interne. 2006 ; 5 : 1-4.

Pibiri, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles (No. THESIS). EPFL.

Pierre, A., L. Normandin, G. Carrier, G. Kennedy, R. Butterworth, et J. Zayed. 2001. Bioaccumulation and locomotor effect of manganese dust in rats. *Inhal Toxicol* 13, no. 7: 623–32

PITMAN V.; 2004; Aromatherapy: A Practical Approach; Ed: NELSON THORNES; p: 1- 137

Poltowicz K and Wesyk S. Effect of garlic oil supplementation in laying hen nutrition on the level of egg yolk cholesterol. *Materialy XVII Miedzynarodowego symposium Drobiarskiego, Polska*. 2005; pp. 137-138.

Porsolt, R.D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jalfre, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, *47*, 379–391.

Porter, N., 2001. Essential oils and their production. *Crop et Food Research*. n° 39.

Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., & Cañigüeral, S. (2001). Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(1), 93-98.

Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., Robertson, G.S., 2007. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* *121*, 826–835.

Priscilla P, Almeida, Natália Mezzomo and Sandra Ferreira RS. -J. food Bioprocess Technol. 2010; vol. 3, no. 4, pp. 1-12

R

Racette, B.A., 2014. Manganism in the 21st century: the Hanninen Lecture. *Neurotoxicology* *45*, 201e207.

Racette BA, McGee-Minnich L, Moerlein SM, Mink JW, Videen TO, Perlmutter JS. Welding-related Parkinsonism, clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology*. 2001;56:8–13.

Racette BA, Aschner M, Guilarte TR, Dydak U, Criswell SR, Zheng W (2012) Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. *Neurotoxicology* *33*(4): 881-886.

Rabiei, Z., M. Gholami, and M. Rafieian-Kopaei. “Antidepressant Effects of Mentha Pulegium in Mice”. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, Vol. 11, no. 3, Aug. 2016, pp. 711-5, doi:10.3329/bjp.v11i3.27318.

R.Vinothkumar, M. Sudha, P. Viswanathan, J. Kabalimoorthy, T. Balasubramanian, N. Nalini, Modulating Effect of d-carvone on 1,2-dimethylhydrazine-induced pre-neoplastic lesions, oxidative stress and biotransforming enzymes, in an experimental model of rat colon carcinogenesis, *Cell Prolif.* *46* (2013) 705–720.

Rahelié DM, Kujundzié Z, Romié et al. Serum concentration of zinc. Copper. Manganese and magnésium in patients with liver cirrhosis. *Coll Antropol.* 2006;30 (3);523-28

Rajesh K, Vishwanath AH, Shivakmar SI, Joshi V and Kurnool AN. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of *Mentha arvensis* leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2013; 5: 426-430.

Reitman S, Frankle S. Colometric method for determination of serum transaminase activity. *Am. J. Clin. Path.* 1957; 28, 56-68.

Remillard S et Pourcher E., 2009, Le manganèse et l'intoxication professionnelle, p 71
Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.

Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., ... & Mliki, A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 49, 883-889.

Roberto.Lucchini, Michael.Aschner, Yangho.Kim And Marko Sarić. 2015.handbook on the toxicology of metals, volum 274 manganese

Roper B.A. (1991). Surgical treatment for upper motor neurone lesions. *J Hand Surg Br.*;16(2):123-4.

Roth J A, & Garrick M D. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical pharmacology*2003; 66(1), 1-13. PMID: 12818360

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase .*Science.* 1973;179:588–90.

Roux, D. (2008). Conseil en aromathérapie. Wolters Kluwer France. 187 p.

RUCKER et al., 1994, Intestinal absorption of nutritionally, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, Johnson L.R. (Ed.), Raven Press New-York, 2194-2201

Rutchik JS, Zheng W, Jiang YM, Mo XE. How does an occupational neurologist assess welders and steelworkers for a manganese-induced movement disorder? An international team's experiences in Guangxi, China, part II. *J Occup Environ Med.* 2012;54(12):1562–4.

Rutchik JS, Zheng W, Jiang YM, Mo XE. How does an occupational neurologist assess welders and steelworkers for a manganese-induced movement disorder? An

international team's experiences in Guangxi, China, part I. *J Occup Environ Med.* 2012;54(11):1432–4.

S

Saka S, Bahi A, Aouacheri W (2011) The effect of oxidative stress induced by lead acetate on the glutathione enzymatic system in rats. *Ann. Toxicol. Anal* 23: 1-7.

Salehi, F., D. Krewski, D. Mergler, L. Normandin, G. Kennedy, S. Philippe, et J. Zayed. 2003. Bioaccumulation and locomotor effects of manganese phosphate/sulfate mixture in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure. *Toxicol-Appl-Pharmacol* 191, no. 3: 264–71.

Salim Aguni, El Hadia Mansouri, Mohammed Azzouz, Rania Abtroun, Barkahoum Alamir, Mohammed Reggabi, 2015. Khôl : source d'exposition au plomb – détermination du taux de plomb dans 45 échantillons par SAAE, *Toxicologie Analytique et Clinique*, Volume 27, Issue 2, , Pages 59-65, ISSN 2352-0078, <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2014.09.058>

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

Santos, K. K., Matias, E. F., Sobral-Souza, C. E., Tintino, S. R., Morais-Braga, M. F., Guedes, G. M., ... & Menezes, I. R. (2012). Avaliação da atividade anti-Trypanosoma e anti-Leishmania de Mentha arvensis e Turnera ulmifolia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 147-153.

Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L., & da Silva, A. G. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial crops and products*, 50, 408-413.

Schroeder HA, Balassa JJ, Tipton IH. 1966. Essential trace metals in man: Manganese. A study in homeostasis. *J Chron Dis* 19:545-71

Shahbazi Y. (2015) Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Mentha Spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *J Pathog.* P.916305

Sharma S, Shrivastava S and ShuklaS. Reversal of lead-induced toxicity due to the effect of antioxidants. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2013; 32, 177–187.

Sharma, S., Sangwan, NS., Sangwan, RS., 2003. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science.* 84 (4-25), 544-550.

Shishova E. Y., Di Costanzo L., Emig F. A., Ash D. E. and Christianson D. W. (2009) Probing the specificity determinants of amino acid recognition by arginase. *Biochemistry* 48, 121–131.

Shukakidze, A., I. Lazriev, et N. Mitagvariya. 2003. Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats. *Neurosci Behav Physiol* 33, no. 3: 263–7.

Shyamala MP, Venukumar MR, Latha MS. Antioxidant potential of the *syzygium aromaticum* (Gaertn.) LINN (cloves) in rats fed with high fat diet. *Indian Journal of Pharmacology*. 2003; 35: 99-103.

Sinha AK. Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem* 1972; 47:389–94.

SLIMANI .M , BENSAPHLA TALET A., et BOUTIBA .Z (1997). Effet du lindane sur le fonctionnement hépatique et cérébral chez le rat , *Maghreb Médical* , N° 319, Novembre, pp 50-53 (Le contenu de cette revue est analysé dans le fichier du centre de Documentation Scientifique et technique du C.N.R.S , PARIS- France , ISSN 0330 – 258 X).

Small E. and Calting P. M. (2000). Les cultures médicinales Canadiennes. Presses scientifiques de CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. pp 281

Smith,S., Gancarz,D., Rofe,F., Kempson,I.M., Weber, J and Juhasz, A. L.(2012). Antagonistic effects of cadmium on lead accumulation in pregnant and non-pregnant mice, *Journal of Hazardous Materials*, (199) 453–456.

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

Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A, De Feo V. (2015) *Mentha Spicata* essential oil : chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp.strains. *Molecules* 20(8): 14402-14424

Solène JOUAULT;2012 ; FACULTE DE PHARMACIE, UNIVERSITE DE LORRAINE; ‘LA QUALITE DES HUILES ESSENTIELLES ET SON INFLUENCE SUR LEUR EFICACITE ET SUR LEUR TOXICITE’

Squitti R, Gorgone G, Panetta V, Lucchini R, Bucossi S, Albini E, et al. Implications of metal exposure and liver function in Parkinsonian patients resident in the vicinities of ferroalloy plants. *J Neural Transm*. 2009;116:1281–7.

Souliman R et Soualeh N.2016. Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14 1 (2016) 44-57

Sousa, EMBD., Chiavone-Filho, O., Moreno MT., Silva, DN., Marques MOM., Meireles, MAA., 2002. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham using pressurized carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 19 (02), 229-241.

Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 346-352.

Sriram, K., Lin, G.X., Jefferson, A.M., et al., 2012. *Toxicology* 291 (1-3), 73–82.

Stefanie L. O’Neal & Wei Zheng. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Envir Health Rpt* (2015) 2:315–328 DOI 10.1007/s40572-015-0056-x

Stoeken, J. E., Paraskevas, S., & Van Der Weijden, G. A. (2007). The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. *Journal of periodontology*, 78(7), 1218-1228.

Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th Ed. England: Churchill Livingstone. Elsevier. 2013

T

Tajudeen O. Obafemi1*, Amos Onasanya1 , Akinwunmi Adeoye2 , John A. Falode2 , David J. Daniell1 , Ehizode F. Irefo1 , Adeleke O. Ojo1 , Adewale Fadaka1 , Olakunle B. Afolabi1 , Joseph O. Awe1 , Benjamin O. Omiyale1., 2019 : Protective effect of methanolic and flavonoid-rich leaf extracts of *Synsepalum dulcificum* (Danielli) on lead-acetate-induced toxicity in Wistar albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 9(05), pp 065-072*

Tayarani-Najaran, Z., Mousavi, S. H., Tajfard, F., Asili, J., Soltani, S., Hatamipour, M., & Emami, S. A. (2013). Cytotoxic and apoptogenic properties of three isolated diterpenoids from *Salvia chorassanica* through bioassay-guided fractionation. *Food and chemical toxicology*, 57, 346-351.

Taylor B. The mechanism of the inhibitory action of menthol on gut smooth muscle. *British Journal of Surgery*. 1984;71: 902-908.

Taylor VF, Bugge D, Jackson BP, Chen CY (2014) Pathways of CH₃Hg and Hg ingestion in benthic organisms: an enriched isotope approach. *Environmental science & technology* 48(9): 5058-5065

Telci I, Demirtas I, Bayram E, Arabaci O, Kacar O (2010) Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L). *Industrial Crops Product*, 32(3):588-592

Tholin K. Changes in blood manganese levels during pregnancy in iron supplemented and non supplemented women. *J, Trace Elem, Med, Biol* 1995; (9), 13–17

Thomas C, THOMAS L. Labor diagnostik von Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege. Dans: Thomas L, 6^{éd.} Philadelphie: Labor und Diagnose. 1992

Tiziana Latronico, Maria Teresa Branà, Elisabetta Merra, Anna Fasano, Gaetano Di Bari, Elisabetta Casalino, Grazia Maria Liuzzi, Impact of Manganese Neurotoxicity on MMP-9 Production and Superoxide Dismutase Activity in Rat Primary Astrocytes. Effect of Resveratrol and Therapeutical Implications for the Treatment of CNS Diseases, *Toxicological Sciences*, Volume 135, Issue 1, September 2013, Pages 218–228, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft146>

Tong G., Shepherd D. and Jahr C.E. (1995). Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*.267: 1510–1512.

Tucker, A. O., & Naczi, R. F. C. (2007). *Mentha: An Overview of Its Classification and Relationships In: Mint. The genus Mentha. Medical and Aromatic Plants–Industrial Profiles.*

TURKMEN A., TURKMEN M., TEPE Y., AKYURT I., 2005. Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. *Food Chemistry* 91: 167-172 3-

Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22(11), 1707-1714.

U

Udaiyar Muruganathan, Subramani Srinivasan. Beneficial effect of carvone, a dietary

Monoterpene ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 84:1558-1567.

US EPA. 2006. Air Quality Criteria for Lead : Final report. EPA/600/R-05/144aF-bF. Washington, DC. US Environmental Protection Agency

V

Vanda.Andrade, Luisa.Mateus, Camila.Batore, Michael.Aschner and Marreilha.dos.Santos.2014.Changes in rat urinary porphyrin profiles predict the magnitude of the neurotoxic effects induced by a mixture of lead, arsenic and manganese, *NeuroToxicology*,(45),P:168–177.

Vaverková, Š., Mistríková, I., & Hollá, M. (2009). Qualitative properties of *Mentha× piperita* (L.) after application of the fungicide Hat trick DP-50. *Plant soil environ*, 55, 454-459.

Verma, P., Yadav, A. N., Kazy, S. K., Saxena, A. K., & Suman, A. (2014). Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(5), 432-447.

Vermerris W, Nicholson R (2006) Phenolic Compound Biochemistry.USA: Springer. Nueva York, EEUU 3: 151-153.

Vezér, T. A. Papp Z. Hoyk C. Varga M. Naray et L. Nagymajtenyi. 2005. Behavioral and neurotoxicological effects of subchronic manganese exposure in rats. *Environ. Toxicol Pharmacol*. 19: 797–810.

Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F., & Chemat, F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 14-17.

Villano D, Fernandez PMS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia PMC (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.

Villeda-Hernandez J, Barroso-Moguel R, Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Huerta-Romero R, & Ríos C. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain research bulletin*. 2001; 55(2), 247-251

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303-313.

Vishwakarma S, Chauhan K, Jeba R C and Khushbu S. Comparative study of qualitative phytochemical screening and antioxidant activity of *Mentha arvensis*, *Elletaria cardamomum* and *Allium porrum*. Indo-Am. J. Pharma. Res. 2014;4: 2538-2556.

W

Wang, P. Z., & Waller, D. S. (2006). Measuring consumer vanity: A cross-cultural validation. *Psychology & Marketing*, 23(8), 665-687.

Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., Factor-Litvak, P., Kline, J., van Geen, A., Slavkovich, V., LoIacono, N.J., Cheng, Z., Zheng, Y., Graziano, J.H., 2006. Water Manganese Exposure and Children's Intellectual Function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 114, 124–129

Wei. M.C, Zong.W.X, Cheng.E.H, Lindsten.T, Panoutsakopoulou.V, Ross.A, Roth.K.A, Macgregor.G.R, Thompson.C.B, Korsmeyer.S.J, Proapoptotic.B.A.X and Bak.A.2001.Requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *science* :(292) 727-730.

Weiss, B., 2006. Economic implications of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 27,362–368.

Westgard, J.O., Poquette, M.A., 1972. *Clin. Chem.* 18, 647. 23.

WHO (2010). Quantifying environmental health impacts. Geneva, World Health Organization(http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/en/).

Wittczak.T, Dudek.W and Krakowiak.A.2008.*Int,J,Occup,Med,Environ,Health* (21), 81–83.

Woolf, A., Wright, R., Amarasiriwardena, C., Bellinger, D., 2002. A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ. Health Perspect.* 110, 613–616.

X

Xu J., Yan H.C., Yang B., Tong L.S. and Zou Y.X. (2009). Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats. *J. Negative Results Bio Med.*, 8(5): 1-8.

Z

Zhang S, Zhou Z, Fu J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environmental Research* 2003;93(2):149-157.

Zhao, Q., Wang,W., Cao, Y.,Chen,Y., Ren,A., Ge,Y., Yu,Z., Wan ,S., Hu, A and Bo,Q.(2014). Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer,in Anhui province, Eastern China, *Science of the Total Environment*, 470, 340–347.

ZHIRI A. ; 2006 ; Aromathérapie ; Nutranews ; Ed: FONDATION LIBRE CHOIX ; p: 2-16.

Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell A. Role of Manganese in hepatic encephalopathy. Netherlands: Kluwer Academic Press. 2003.

ANNEXE

**REGULAR ARTICLE**

Evaluation of anti-oxidative effects of *Mentha spicata* essential oils in rats at the period of gestation and lactation co-exposed to lead and manganese

Brahmi Mostapha^{*}, Adli Djallal E. H., Slimani Miloud, Arabi Wafaa, Taibi Narimane, Kahloula Khaled

Laboratory of Biotoxicology, Pharmacognosy and Biological Recovery of Plants, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of DrMoulayTahar, Saida, Algeria

ARTICLE INFO*Article History:*

Received: 16 Jan 2019

Revised: 18 Mar 2019

Accepted: 18 Apr 2019

**Corresponding Author:*

Email:

brahmi.mostapha@gmail.com

Telephone: +213 1550677129

Keywords: Lead, manganese, *Mentha spicata*, essential oil, anti-oxidative erythrocytic status

ABSTRACT

The mechanisms in the origin of lead and manganese poisoning (Pb-Mn) are multiple, and potentially touch all the body cells. For this purpose, we are interested in oxidative stress induced by Pb-Mn at the erythrocytic level at a dose of 0.2% (Pb) and 4.79 mg/ml (Mn) during the period of gestation and lactation in wistar rats and the ability of mint essential oil, *Mentha spicata* (MEO) to restore or not this state of stress. The extraction of MEO "HEM" via steam distillation allows us to obtain MEO with an output of 0.49%. Moreover, the analysis of the anti-oxidative erythrocytic status showed that the co-exposure to Pb-Mn significantly increases enzymes activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and significantly reduces the enzyme activity of glutathione peroxidase (GPx), by causing a dysfunction in the anti-oxidative defense system. In contrast, the administration of MEO via intraperitoneal (IP) during a period of 21 days in the previously Pb-Mn intoxicated rats, that MEO contributes significantly in the improvement of the defenses against radical aggression, through a recovery at the level of anti-oxidative enzymes activities by increasing their ability to eliminate radical compounds.

1. Introduction

Heavy metals are a group of environmental chemical products, which are universal and non-biodegradable. However, the undesirable effects of their exposure are largely known, their usage and their concentration in the environment are increasing (Huang et al., 2014). A number of studies have been proven the toxicity of heavy metals on the living systems (Taylor et al., 2014). Nevertheless, these metals do not exist individually, but in the form of mixtures within the environment (GE et al., 2014).

Lead poisoning has been known since ancient times. However, clinical and physiopathological works were, for a long time, confined to the study of toxic effects of high lead concentrations. Clinical descriptions were limited to classical symptoms which are encountered in professional pathology or critical cases of food poisoning (encephalopathy and pseudo radial paralysis, lead colic, insufficient renal and gout, refractory anaemia). Lead modifies cell function by disturbing numerous metabolic routes and different physiological process (Saka et al, 2011). Manganese is an essential element for the living being and at the same time a toxic metal,

which is considered one of the most abundant elements on earth's crust, therefore we can find it in rocks, soil, water, and food (Lebdaet al., 2012). Nonetheless, this metal is toxic at many levels, mainly neurotoxic which induce symptoms similar to those of Parkinson with serious repercussions on numerous organs like the liver, kidney (Racette et al., 2012). Lead and manganese can also alter the anti-oxidative status of the cells (Alghazal, et al., 2008).

For a long time, mint *M. spicata* has been used as powerful fungicides, pesticides, and insecticides, hypotensive, antiposmodic, anti-oxidants, anti-inflammatory, hepatoprotective and anti-microbial (Benomariet al., 2017)

Accordingly, the objective of our work is to evaluate the anti-oxidative effect of the essential oil of mint plant *M. spicata* vis-à-vis the chronic lead and manganese intoxication in wistar rats during the period of development (gestation and lactation).

2. Materials and methods

2.1. Extraction of essential oil

The leaves of spearmint *M. spicata* were harvested in Sidi Maàmar wilaya of Saida in the western Algerian high lands, then identified by taxonomic experts (Pr Hasnaoui and Dr sitayeb) University of Saida– Algeria. The essential oil of mint *M. spicata* was extracted by hydrodistillation which is based on the use of a quantity of 50g of the leaves of mint with 500 ml of distilled water (Priscilla et al., 2010).

2.2. Distribution of lots

The experiments were carried out on Wistar rats, which weighed between 200 and 400 g. The rats are grouped in cages at a rate of 2 females and one male. They are placed in a ventilated animal house, with a temperature of $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ with lighting artificial which establishes a day/night cycle (day between 7 and 19 h). On the first day of gestation, females are divided into two groups:

The intoxication of females begins on the first day of cohabitation with male rats which is represented by D0 and continues during the gestation period. Newborns are also exposed to Pb-Mn until weaning (21 days after birth). Progeny are subject to the same experimental condition.

- **Group Pb-Mn:** consisting of animals which receive orally lead acetate ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) at 0.2% and manganese chloride tetrahydrate

($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) at 4.79 mg/ml in bidistilled water orally from the first day of gestation until weaning (n = 07 male rats) (Kahloula et al., 2009 ; Molina et al., 2011)

- **Group T:** is the control batch (T) that receives the distilled water. Tested offspring are subject to the same conditions as their mother.
- **Group T-HEM:** 24 hours after weaning, animals receiving distilled water are treated with HEM mint essential oil (0.1 ml/kg) with one intraperitoneal injection per day for 21 days (n = 07 male rats)
- **Group Pb-Mn-HEM:** 24 hours after weaning, animals receiving Pb-Mn are treated with HEM mint essential oil (0.1 ml/kg) with one intraperitoneal injection per day for 21 days (n = 07 male rats).
- Number and suffering of animals were minimised in accordance with the guidelines of the European Council Directive (86/609/EEC).

2.3. Body weight evaluation

The follow-up of the young rats required weekly weighing of body weight throughout the experimental period from weaning to the end of the experiment.

2.4. Biochemical tests

2.4.1. Determination of blood lead and the level of manganese in the blood

The samples of total blood (100 μl) are recovered in a hemolysis tube of 5 ml containing 100 μl of triton at a 0.1%. After using a vortex for 30 seconds, 600 μl of HNO_3 (1M) is added to deproteinize. The agitation of the hemolysis tube in the vortex is followed by a 10 minute break at ambient temperature. After centrifugation for 10 minutes at 3000 turns/min, the samples are transferred into cups for the determination of the levels of lead and manganese by using atomic absorption spectroscopy (Perkin-Elmer model 800).

2.4.2. Measuring the activities of anti-oxidative enzymes in the blood

Blood samples were centrifuged at 3000 turns/min for 15 minutes. The serum has been carefully withdrawn and the container which still contains erythrocytes has been washed three times with saline solution at 0.9 g/l, then a lysis of the cells has been done with the addition of iced and cubed distilled water for 15 minutes in ice. The lysate is recovered later on for the dosage of erythrocytic anti-

oxidative enzymes which mark the oxidative status after centrifugation at 5000 turns/min, for 5 minutes (Rotruck et al., 1973). The activities and the anti-oxidative levels at the erythrocytic level including the superoxide-dismutase (SOD), catalase (CAT) and the glutathione-peroxidase (GPx), have been analyzed through the method of Sinha (1972), Rotruck et al. (1973), (Kakkar et al. (1984) and Jol-low et al. (1973).

2.5. Statistical expression and analysis of the re-sults

The results are shown as the average (M) of the individual values, subject to the standard error of the average (SEM). Several means are compared by analysis of variance (ANOVA) to the intoxication factor (Pb-Mn, T). ANOVAs with repeated measurements were used to analyze the time factor. A probability of p <0.05 is considered significant. Sta-tistical analyses were performed using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Essential oil yield

The hydro-distillation of the plant matter *M. spicata* allowed to obtain a yield of 0.49%.

3.2. Body-weight determination

The results show that the animals exposed to Pb-Mn presented a significant reduction (*: P<0,05) in body weight compared to that of the control animals during the experiment. Additionally, the animals exposed to Pb-Mn and treated with MEO showed a significant increase (*: P<0,05) in body weight in comparison with the untreated rats (figure 01).

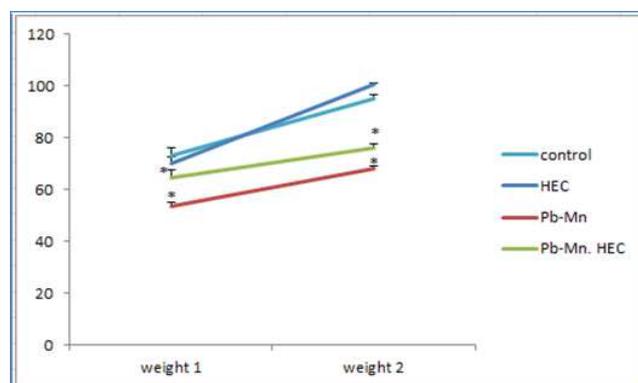


Figure 01: Effect of *M. spicata* oil on the body weights in rats intoxicated (Pb-Mn). Data are average ± S.E.M. * P<0.05; (Pb-Mn vs. control),* P<0.05(Pb-Mnvs.Pb-Mn.HEC)

3.3. Determination of blood lead and manganese levels in erythrocytes

The results show that the concentration of lead and manganese in the Erythrocyte was significantly higher (p < 0.05) in the poisoned rats compared to the control rats. The administration of the essential oil led to a significantly reduced (p <0.05) concentration of lead and manganese in the erythrocyte (Table 02).

	T	HEC	Pb-Mn	Pb-Mn-HEC
Pb (µg/dl)	0,10 ± 0,06	0,09 ± 0,02	09,5 ± 0,10*	3,3 ± 0,17*
Mn (µg/dl)	97,3 ± 1,03	93,5± 1,12	123,2 ± 0,61*	109,1 ± 0,82*

Table 02: Pb and Mn erythrocyte levels in control rats and intoxicated and intoxicated treated rats with HEM. Data are average ± S.E.M.

* P<0.05;(Pb-Mn vs. T)(Pb-Mnvs.Pb-Mn.HEC)

3.4. Erythrocytic oxidative status enzyme activity

After co-exposure with Pb-Mn, the results show a significant (p < 0,05)decrease in GPx, SOD and CAT in the erythrocyte level of the rats exposed to Pb-Mn during the gestation and lactation period in comparison with the control rats. After 21 days of treatment by HEM, a clear improvement in the activity of these enzymes was observed in treated rats compared to intoxicated rats (Table 03).

Concentration	T	HEC	Pb-Mn	Pb-Mn-HEC
CAT (U/mg de protéine)	14,41± 0,58	14,56± 0,7	10,64± 1,02*	12,71± 0,79*
GPx(U/mg de protéine)	14,89± 0,067	14,94± 0,02	9,43± 0,57*	12,46± 0,62*
SOD (U/mg de protéine)	24,73± 1,85	21,73± 0,51	18,70± 0,37*	19,73± 0,8*

Table 03: Activity of erythrocyte antioxidant enzymes (CAT, GPx, SOD) in control, treated, poisoned and poisoned rats treated by HEC. Data are average ± S.E.M.

*P<0.05; (Pb-Mn vs. T) (Pb-Mn vs.Pb-Mn.HEC)

4. Discussion

The *M. spicata* essential oil has been obtained by hydro-distillation with a productivity of 0.49%, this disagrees with the works of Priscilla et al., (2010) who reported an estimation of (0,23±0,04%) and with those of Lucchesi et al., (2004), (0,60±0,06%). This difference in productivity can be attributed to many factors which are mainly the origin, the species, the harvest period, the duration of drying and the technique of essential oil extraction (Loziene et al., 2005). The co-exposure to manganese chloride and lead acetate has demonstrated a decrease in

body weight and a reduction in the gaining weight during the period of experimentation (gestation – lactation) in intoxicated rats with these elements compared to the reference ones. According to many authors, this indicates that these metals move through the placental barrier during the gestation disturbing the embryonic development, and appear in the milk during the lactation (Ming et al., 2015; kahloula et al., 2009). Physiological level of lead in the blood is equal to zero because lead is not necessary for the human life. After digestive absorption, lead moves to blood where it is divided in the red cells, under a non-diffusible form before fixing itself on the tissues where it is disposed in urine. Blood, therefore, is the crossroad for the journey of lead within the organism (Pezerat, 2006). Mn level in the blood is an efficient biomarker and a representative of its exposure. The highest Mn quantity in the blood is contained in the erythrocytes (approximately 60%) with a half-life of 37 days (Lee et Kim, 2011; Ming et al., 2015).

MEO's anti-oxidative activity is mainly owed to the presence of bioactive components in the tested EO (Vermerriset Nicholson, 2006). It also seems that this activity is linked to the presence of phenolic components in the essential oil. The major role of components like free radicals is highlighted in many reports (Villanoet .,al 2007). However, other studies show that anti-radical activity is correlated to polyphenols and flavonoids levels in the medical plants extracts (Mariod et al., 2009). Moreover, not only the major components of MEO are responsible for this anti-oxidative activity, but there are also other components which can interact in a synergetic way in order to create an efficient system vis-à-vis the free radicals (Gulcin et al., 2004).

In this context, the evaluation of Pb and Mn toxicity is manifested through the dosage of erythrocytic anti-oxidative enzymes, namely CAT, GPx and SOD. Given that, these anti-oxidative enzymes allow maintaining the homeostasis of potential redox (Chou et al., 2013). In this respect, we observed that the oral intake of Pb-Mn for rats in development has caused a decrease in the activity of CAT, GPx and SOD. These works conform with those of Bhuvaneswari et al., (2013), which showed that Pb and Mn intake leads to lowering the activity of these enzymes, this reduction may lead to a state of oxidative stress mainly at the level of red blood cells (Saka et al., 2011).

Additionally, administering MEO through intraperitoneal at the dose of 0.1 ml/kg, allows the observa-

tion of a significant increase in the level of CAT, GPx and SOD in rats exposed to Pb-Mn. Our results conform with Ben Saad et al., (2017) who showed that the oral intake of MEO results in a significant increase in the anti-oxidative enzyme activities (CAT, GPx, SOD) in the erythrocytic tissue in rats treated with nicotine, which indicates that *M. spicata* can alleviate the anti-oxidative stress.

5. Conclusion

The exposure of wistar rats, during gestation and lactation, to Pb-Mn revealed a dysfunction in the anti-oxidative defense system, which results in an important alteration in the anti-radical system represented by the different enzymes. The treatment with MEO in previously intoxicated rats leads to a rehabilitation of this system and a rectification of this disorders.

References

- Alghazal MA, Sutiaková I, Kovalkovicová N, Legáth J, Falis M, Pistl J, Sabo R, Benová K, Sabová L, Váczi P (2008) The induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate. *Journal toxicology and industrial health* 24(9): 587-593.
- Taylor VF, Bugge D, Jackson BP, Chen CY (2014) Pathways of CH₃Hg and Hg ingestion in benthic organisms: an enriched isotope approach. *Environmental Science & Technology* 48(9): 5058-5065.
- Benomari FZ, Andreu V, Kotarba J, Dib MA, Bertrand C, Muselli A, Costa J, Djabou N (2017) Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. *Environmental Science and Pollution Research*: 29889-29900.
- Ben Saad A, Rjeibi I, Alimi H, Ncib S, Bouhamda T, Zouari N (2017) Protective effects of *Mentha spicata* against nicotine-induced toxicity in liver and erythrocytes of Wistar rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*: 1-7.
- Bhuvaneswari S, Murugesan S, Subha TS, Dhamocharan R, Shettu N (2013). In vitro antioxidant activity of marine red algae. *Chondrococcus hornemanni* and *Spyridia fusiformis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5 (3): 82-85.
- Chou ST, Chang WL, Chang CT, Hsu SL, Lin YC, Shih Y (2013) *Cinnamomum cassia* Essential Oil Inhibits α -MSH-Induced Melanin Production and Oxidative Stress in Murine B16 Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 19186-19201.
- Ge H, Liu S, Su B, Qin T (2014) Predicting synergistic toxicity of heavy metals and ionic liquids on photobacterium Q67. *Journal of hazardous materials* 268: 77-83.
- Gulcin I, Sat IG, Beydemir S, Elmastas M, Kufrevioglu OI (2004) Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata*-Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* 87: 393-400.
- Huang Z, Pan XD, Wu PG, Han JL, Chen Q (2014) Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control* 36(1): 248-252.
- Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillette JR (1973)

Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 11:151–69.

Kahloula K, Slimani M, Dubois M, Bonnet JJ (2009) D-cyclo serine enhances spatial learning performances of rats chronically exposed to lead during the developmental period. *African Journal of Neurological Sciences* 28:67-77.

Kakkar P, Das B, Viswanathan PN (1984) A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 21:130–2

Lebda MA, El-Neweshy MS, El-Sayed YS (2012) Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopen. *Neurotoxicology* 33: 98–104.

Lee BK, Kim Y (2011) Relationship between blood manganese and blood pressure in the Koreangeneral population according toK-NHANES 2008. *Environmental Research* 111:797–803

Loziene K, Venskutonis PR (2005) Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical systematics and ecology* 33: 517-525.

Lucchesi ME, Chemat F, SmadjaJ(2004) Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*1043:323-327.

Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, & Ismail N (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116: 306-312.

Ming ST, Kai WL, Chia HC, Ling CC, Fang IM, Yen AT, Mei LC (2015) The critical fetal stage for maternal manganese exposure. *Environmental Research* 137: 215–221.

Molina RM, Phattananarudee S, Kim J, et al (2011) Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology* 32:413–22.

Pezerat H (2006) Additif au mémoire d'avril sur le projet d'une nouvelle rédaction .La Revue de Médecine Interne 5 : 1-4.

Priscilla PA, Natália M and Sandra F RS (2010)Extraction of Menthaspicata L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. *Food and Bioprocess Technology* 3 (4):1-12.

Racette BA, Aschner M, Guilarte TR, Dydak U, Criswell SR, Zheng W (2012) Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33(4): 881-886.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase .*Science* 179:588–90.

Saka S, Bahi A, Aouacheri W (2011) The effect of oxidative stress induced by lead acetate on the glutathione enzymatic system in rats. *Annales de ToxicologieAnalytique*23: 1-7.

Sinha AK (1972) Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry* 47:389–94

Vermerris W, Nicholson R (2006) Phenolic CompoundBiochemistry.USA: Springer. Nueva York, EEUU3: 151-153.

Villano D, Fernandez PMS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia PMC (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).



EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF *MENTHA SPICATA* ESSENTIAL OIL AT THE LIVER LEVEL IN DEVELOPING WISTAR RATS CO-EXPOSED TO LEAD AND MANGANESE

Mostapha Brahmi^{1*}, Djallal Eddine Houari Adli¹, Miloud Slimani¹, Wafaa Arabi¹, Narimane Taibi¹, Khaled Kahloula¹

Laboratory of Biotoxicology, Pharmacognosy and Biological recovery of plants, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Dr MoulayTahar, Saida, Algeria

*brahmi.mustapha@gmail.com

<https://doi.org/10.34302/crpfst/2019.11.2.12>

Article history:

Received:

1 January 2019

Accepted:

29 May 2019

Keywords:

GC-MS

Hepatotoxicity

Mentha spicata

Pb-Mn

Oxidative stress

ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate, on the one hand, the changes in hepatotoxicity induced by lead and manganese according to a biochemical and histological experimental approach in developing Wistar rats and, on the other hand, to test the effectiveness of mint essential oil (*Mentha spicata*) in restoring or not the harmful effects of the metals studied. by an intraperitoneal injection of 0,1 ml HEM/kg/day for a period of 21 days. The characterization of this essential oil by gas chromatography coupled with mass spectrometry indicates that the major components are: Carvone (42.2%), Menthone (20.89%), Piperitenone (17.41%) and Isomenthone (7.99%). The results of liver biochemical assays (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, albumin, total cholesterol, and triglyceride) show a correction of values following the administration of essential oil compared with those of co-exposed animals. Analysis of the antioxidant status in the hepatocyte indicates that this oil has restored the activity of the various antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD: 0,87 U/mg), glutathione peroxidase (GPx: 38,62 U/mg), and catalase(CAT: 20,73 U/mg)). In fact, the histological study undertaken illustrated a clear improvement in liver tissue architecture in rats intoxicated and treated with oil, which justifies the great importance of *Mentha spicata* in traditional medicine and these therapeutic virtues.

1.Introduction

The heavy metals are a group of environmental chemicals which are both universal and non-biodegradable. Although the adverse effects resulting from exposure to them are well-known, their use and environmental concentration are increasing (Zhao et al, 2014). Numerous studies have revealed the toxicity of individual metals for living organisms (Basile et al, 2012). However, these metals do not only

exist individually, but also combined in the environment (Smith et al , 2012)

In fact, lead is a non-essential element for the human body, due to its dispersal in the ambient air, as well as in many foods. Its toxicity is closely tied to its accumulation in certain tissues, and its interference with bio-elements, whose role is essential for a number of physiological processes. It has numerous adverse effects, including neurological,

behavioral, immunological, renal, hepatic, and in particular hematologic disorders (Annabi et al., 2007).

On the other hand, Manganese (Mn) is a natural trace element its toxicity is multifactorial, because Mn directly interrupts the activation of enzymes, prevents competitive mineral absorption, changing calcium homeostasis and lowering the level of antioxidants available in the body (Adli, 2017).

Due to the pervasiveness of both metals, Mn and Pb, reducing human exposure to toxic levels remains a global health challenge.

Moreover, aromatic plants produce active compounds (phytochemically having a pharmacological effect on living organisms) consisting in part of essential oils (Curutchet, 2014). Among these plants, *Mentha spicata* L., commonly called "naana" in Algerian medical systems, has many culinary and medicinal uses in the Maghreb. It is popularly consumed in the form of tea and added to several preparations as a flavor enhancer; dry or fresh spearmint leaf is added especially during tea brewing. Biliary disorders, menstrual pain, stomach aches, constipation, gingivitis, and waving are treated with decoction of spearmint leaves (Brahmi, 2012).

All these properties, typical of mint species, have been attributed to the combination of essential oil, essentially based on monoterpenoids (Brada, 2007), and polyphenolic derivatives (Dorman, 2003).

This study examined the impact of chronic co-exposure to lead acetate and manganese chloride at the hepatic level in Wistar rats during intrauterine life, lactation and after weaning, and then evaluated the effect of the essential oil of the plant *Mentha spicata* attenuated this hepatotoxicity in rats intoxicated by these two metals.

2. Materials and methods

2.1. Extraction and determination of the chemical composition of the essential oil by GC/MS

The leaves of spearmint (*Mentha spicata*) were harvested in Sidi Maamar wilaya of Saida in the western Algerian highlands, then identified by taxonomic experts (Pr Hasnaoui department of biology, university Dr Moulay Tahar - saida). The sample was preserved, and the voucher specimen, coded P-200886, was deposited in the herbarium of the Biology Department of the Faculty of Sciences of the University of Saida, Algeria, for future reference.

The essential oil of mint (*Mentha spicata*) was extracted by hydrodistillation. The qualitative and quantitative analysis of this essential oil was then carried out by VARIAN CHROMPACK - CP 3900 gas chromatography by injecting 0.2 µl extract. The carrier gas used is helium (He) with a flow rate of 0.3 ml/min. The column used is a capillary column type VF5 (stationary phase nature: 5% phenyl-polysiloxane and 95% methyl), 30 m long and 0.25 mm inside diameter. The thickness of the stationary phase is 0.25 µm; the temperature of the initial injection column is programmed at 70°C for 2.50 min, then rises in steps of 15°C/min to 255°C for 20 min; the detector used for this analysis is of the mass spectrometry type (Saturn 20200) with a temperature of 250°C. The device is controlled by a menu computer, appropriate software for this type of analysis and a NIST database which allows the identification of the compounds.

2.2. Distribution of lots

The experiments were carried out on Wistar rats, weighing from 200 to 400 g. The rats are grouped in cages at a rate of 2 females and one male. They are placed in a ventilated animal house, at a temperature of 21 ± 1 °C with lighting artificial which establishes a day/night cycle (day between 7 and 19 h). On the first

day of gestation, females are divided into two groups:

The intoxication of females begins on the first day of cohabitation with male rats which is represented by D0 and continues during the gestation period. Newborns are also exposed to Pb-Mn until weaning (21 days after birth). Progeny is subject to the same experimental condition.

the distilled water. Tested offspring are subject to the same conditions as their mother.

Group T-HEM: 24 hours after weaning, animals receiving distilled water are treated with HEM mint essential oil (0.1 ml/kg) with one intraperitoneal injection per day for 21 days (n = 07 male rats)

Group Pb-Mn-HEM: 24 hours after weaning, animals receiving Pb-Mn are treated with HEM mint essential oil (0.1 ml/kg) with one intraperitoneal injection per day for 21 days (n = 07 male rats) (Halder et al., 2011).

2.3. Biochemical tests

2.3.1. Determination of blood lead and manganese levels

After weaning and oil treatment, the animals are decapitated and the whole blood samples (100 µl) are recovered in a 5ml haemolysis tube containing a volume of 100µl of 0.1% newt. After vortex agitation for 30 seconds, 600µl of HNO₃ (1M) is added to deproteinize. Vortex the contents of the hemolysis tube for 10 minutes at room temperature. After centrifugation for 10 minutes at 3000 rpm, the samples are transferred into wells to determine blood lead and manganese levels using an atomic absorption spectrophotometer (SHIMA DZU AA6200).

2.3.2. Determination of liver parameters

The serum samples were used to measure the activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) according to the methods of Reitman and Frankle (1957). Determination of the concentrations of albumin, cholesterol and

Group Pb-Mn: consisting of animals which receive orally lead acetate (Pb(C₂H₃O₂)₂) at 0.2% and manganese chloride tetrahydrate (MnCl₂4H₂O) at 4.79 mg/ml in bidistilled water orally from the first day of gestation until weaning (n = 07 male rats) (Kahloula et al., 2009 ; Molina et al., 2011)

Group T: is the control batch (T) that receives

triglycerides by following the methods of Thomas (1992) and Fossati et Prencipe (1982) respectively.

2.3.3. Measurement of antioxidant enzyme activity

The rat liver was weighed and homogenized in a buffer solution containing 0.32 M sucrose, 0.5 mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) in ice (1mg tissue /4 ml buffer solution) using a glass/glass homogenizer. The fabrics were maintained at 4°C during all dissection and homogenization procedures. The homogenate was centrifuged at 1000xg for 15 minutes at 4°C. The supernatant thus obtained was centrifuged at 10000xg for 15 minutes at 4°C. The pellet constitutes the mitochondrial fraction and supernatant is re-centrifuged at 10,000g/30 minutes Both pellets thus obtained are solubilized in a buffer solution containing 0.32 M sucrose, 0.5 mM EDTA, 10mM Tris-HCl and 0.02% digitonin (pH 7.4), digitonin is added to release all imprisoned mitochondria in the synaptosomes and centrifuged a second time at 10000×g for 15mn at 4°C, the pellet thus obtained constitutes the fraction of the total mitochondria which will be solubilized in a solution containing sucrose (0.32 M at pH 7.4) (Rotruck ,1973).

Super oxidize dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) was analyzed on supernatant using the technique of Kakkar (1984); this method is based on inhibition of formation of adenine nicotinamide dinucleotide, phenazine methosulfate and formazan amino tetra zoliumblue. Activities and levels of antioxidants at the brain level such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) were

analyzed by the (Sinha, 1972), (Rotruck, 1973) methods respectively.

2.4. Histological study

Samples of liver spleen were collected and fixed in 10% buffered neutral formalin solution, dehydrated in gradual ethanol (70-100%), cleared in xylene, and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 μ m thick) were prepared, routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E) dyes (Suvarna et al., 2013), and then examined microscopically.

2.5. Expression and statistical analysis of results

The results are expressed as the mean (M) of the individual values, assigned from the standard error to the mean (SEM). The comparison of several means is carried out by an analysis of variance (one way Anova) with the intoxication factor (Pb-Mn, T). Repeated-measure Anova were used for time factor analysis. A probability $p < 0.05$ is considered significant. Statistical analyses were performed using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussions

3.1. Performance and chemical composition of HEM

The hydro-distillation of the plant matter *Mentha spicata* allowed to obtain a yield of 0.83%. This disagrees with the work of (Priscilla et al., 2010) which reported a value of (0.23 \pm 0.04%) and with those of (Lucchesi et al., 2004), (0.60 \pm 0.06%). This difference in yield can be attributed to several factors, mainly origin, species, harvest period, drying time and essential oil extraction technique (Karousou et al., 2005); moreover (Marotti et al., 1994) have shown that low yields can be associated with a series of factors such as genotype, plant development stages and environmental conditions that occur in semi-arid regions.

The analysis of the essential oil of *Mentha spicata* by gas chromatography identified 12 major compounds listed in Table 1 by order of elution. Twelve components representing the sum of the percentages of the components obtained were identified (98.51%), of which 96.71% are monoterpene ketones, 1.75% are monoterpene hydrocarbons, 0.05% are oxides. The major components of this oil are: Carvone (42.2%), Menthone (20.89%), Piperitenone (17.41%) and Isomenthone (7.99%). The results obtained for the various works show that this oil is essentially made of Carvone (de Sousa Barros et al., 2015).

Table 1. Concentration in % and retention time of the different compounds obtained by gas chromatographic analysis of the essential oil of *M.spicata*.

Compounds	Retention time (min)	Concentration (%)
α -pinene	11.200	0.40
Sabinene	12.080	0.56
β -pinene	12.440	0.70
Octane-3-one	12.820	1.15
Paracymen	13.600	0.09
1.8 cineole	14.110	0.05
Menthone	18.213	20.89
Isomenthone	18.710	7.99
Pulegone	21.460	0.05
Carvone	21.480	42.2

Piperiton	22.010	7.02
Piperitenone	23.150	17.41
Total of identifiers		98,51

Table 2. Effect of the essential oil of the *M.spicata* plant on the various biochemical parameters in rats intoxicated by Pb-Mn compared to control rats.

Parameters	Pb-Mn	Pb-Mn+HE	Control	HEM
Lead levels ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	34,1 \pm 0,81*	21,18 \pm 4,01*	0,27 \pm 0,028	0,25 \pm 0,022
Manganese content ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	2,38 \pm 0,02**	1,21 \pm 0,1**	1,03 \pm 0,1	0,99 \pm 0,04
Glucose (g/l)	1,80 \pm 0,02*	1,42 \pm 0,04*	0,91 \pm 0,06	1,13 \pm 0,01
alanine aminotransferase ALT (IU/l)	42,10 \pm 0,87*	26 \pm 0,21*	21,08 \pm 0,8	20,57 \pm 0,3
aspartate aminotransferase AST (IU/l)	36,79 \pm 0,4*	13,31 \pm 0,4*	11,37 \pm 0,3	10,98 \pm 0,1
Alkaline phosphatase (U /l)	59,82 \pm 0,30*	46,66 \pm 1,9*	43,39 \pm 0,10	42,86 \pm 0,14
Albumin (g/dl)	3,05 \pm 0,2*	4,78 \pm 0,14*	5,03 \pm 0,04	5,15 \pm 0,07
total cholesterol (g/l)	2,66 \pm 0,02**	1,29 \pm 0,15**	1,09 \pm 0,03	1,05 \pm 0,02
Triglycerides (g /l)	0,89 \pm 0,02**	0,68 \pm 0,07**	0,63 \pm 0,04	0,59 \pm 0,05

Values are reported as \pm SEM on average (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

3.2. Results of biochemical parameters

The results obtained from blood lead and manganese assays using atomic absorption spectrophotometry (AAS) are in the order of 2.38 \pm 0.02 $\mu\text{g}/\text{dl}$ for rats intoxicated by Pb-Mn (Table 02). These levels are significantly decreased ($p < 0.01$) following administration of the plant extract (1.21 \pm 0.1) in the batch of previously intoxicated rats (Mn-HEM).

The level of Pb and Mn in the blood are effective biomarkers and representative of their exposure. Physiological blood lead is zero because lead is not necessary for the life of living things. After digestive absorption, lead passes into the blood where it is distributed in red blood cells, in a non-diffusible form before settling in tissues or being eliminated in urine. Blood is therefore the crossroads of all lead pathways in the body (Pezerat, 2006). The use of atomic spectrophotometry allowed us to record lead levels in the order of 34.1 \pm 0.81 $\mu\text{g}/\text{dl}$ in rats exposed to Pb acetate. (Goullé et al., 2012) Recent experimental studies have

determined lead concentrations in intoxicated rats to range from 31.8 to 58.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Grizzo, 2008).

The highest amount of Mn in the blood is contained in erythrocytes (about 66%), with a half-life of 37 days. (Lee et Kim, 2011). The Mn level found in our study is significantly elevated in intoxicated rats compared to control rats. However, studies have shown that during pregnancy, blood Mn concentrations increase over the three semesters and Mn penetrates the placenta by active transport (Krachler et al., 1999). The increase in Mn levels during pregnancy may also be related to the acceleration of erythropoiesis, intestinal absorption or the tissue that mobilizes Mn (Tholin et al., 1995).

Exposure to Pb-Mn resulted in hyperglycemia in poisoned rats compared to control rats. These results are consistent with those of Kasdallah et al. (2005) who confirm that exposure to Mn produces a stressful effect that results in hyperglycemia under the action

of stress hormones. Moreover, Kasdallah et al. (2005) ; Huang et al. (1989) report that chronic administration of lead and manganese during the development period leads to a dysfunction of energy metabolism this increase in blood glucose concentration is probably the result of glycogenolysis, neoglucogenesis which is confirmed by liver damage to cover the body's energy needs.

Analysis of liver function markers indicates that at serum levels ALT and AST activity are significantly higher in intoxicated rats (Pb-Mn) compared to control rats ($p < 0.05$). treatment with *M.spicata* essential oil showed a significant decrease in transaminase (ALT, AST) activity compared to Pb-Mn intoxicated rats. These two enzymes are located in the cytosol and the increase in their serum concentration is due to their possible release from the cytoplasm following destruction of the plasma membrane and stress on the cell (Shyamala et al., 2003). Several studies have reported that lead induces high hepatotoxicity and causes changes in the architecture of the hepatocyte, leading to a sharp increase in transaminases (Dini et al., 1999). The work of (Fordahl et al., 2012) indicates that wide exposure to Mn has an effect on liver metabolites, mainly causing disturbances in lipid metabolism and thus excessive formation of oleic acid, hydroxy-butyrac acid and ketone bodies, the latter being in surplus in the blood will be eliminated in the urine, adding that alterations in liver metabolites have been correlated with tissue increase in manganese. The liver participates in many phases of lipid metabolism, esterification and elimination of cholesterol, only free cholesterol determination and serum esterification has been widely used for the study of liver disease (Awde, 2014). However, the results presented in our study showed hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in poisoned rats compared to control rats. Our results are similar to the work of Hanan et al. (2012) ; Sharma et al. (2013) who found an increase in triglyceride

and cholesterol levels in the blood after administration of lead acetate.

In addition, the relationship between lead acetate exposure and cholesterol levels suggests a possible alteration in lipid metabolism (Moussa et Bashandy, 2008). In contrast, Zwingmann et al. (2003) have shown that Mn can lead to biliary tract closure and inhibition of bile acid transfer to the gallbladder and its accumulation in the liver leading to hypercholesterolemia

The work of Fordahl et al. (2012) indicates that wide exposure to Mn has an effect on liver metabolites, mainly causing disturbances in lipid metabolism and thus excessive formation of oleic acid, hydroxybutyric acid and ketone bodies.

3.3. Activity of enzymes of oxidative status in the liver

Endogenous antioxidant enzymes are responsible for neutralizing the free radical and preventing its action responsible for tissue damage. Oxidative stress results from an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses, which in turn causes a series of events deregulating cellular functions. Antioxidant enzymes, such as SOD, CAT and GPX form a team in solidarity with the defense against ROS (Bandyopadhyay et al., 1999).

After Pb-Mn exposure, SOD, GPx and CAT activity are significantly lower ($p < 0.001$, $p < 0.05$) respectively in intoxicated rats compared to hepatic control rats. After 21 days of treatment with HEM, a marked improvement in the activity of these enzymes was observed in treated rats compared to intoxicated rats (Table 03). It has been shown that the accumulation of lead in the various liver cell compartments produces oxidative damage by strengthening the peroxidation of membrane lipids and the oxidation of proteins, a deleterious process produced solely by free radicals (Villeda-Hernandez et al., 2001).

Several studies suggest that exposure to Mn induces a variety of cellular changes due to

increased oxidative stress, and inadequate energy systems metabolisms and antioxidants (Roth et Garrick, 2003). Studies have shown

the link between oxidative stress and mitochondrial dysfunction due to exposure to this metal (Mn) (Milatovic et al., 2009).

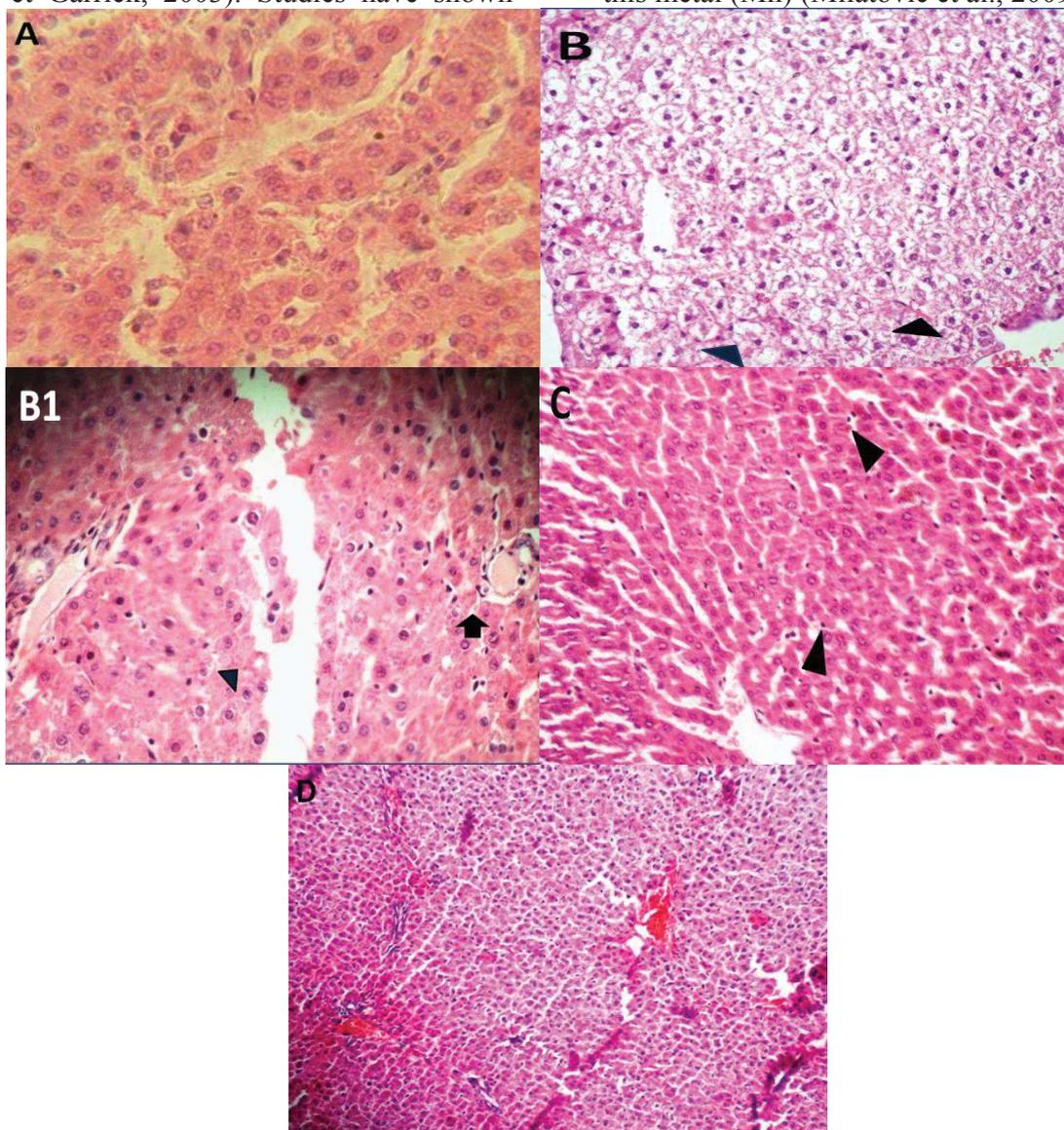


Figure 1: Optical microscopy of hepatic tissue stained with hematoxylin and eosin G :(x40). (A)G :(x100) in sections of the liver of control rats appeared with normal architecture (B, B1) Rats exposed to lead and manganese revealed a necrosis microfocus (blue arrow), portal inflammation (black arrow) (C) of rats intoxicated with Pb-Mn and treated with HEM illustrates moderate inflammation (black arrow). (D) normal liver sections of rats treated with HEM.

Arrows indicate  necrosis microfocus
 Portal inflammation

Table 3. Liver antioxidant enzyme activity (SOD, GPx, CAT) in control rats, Pb-Mn and Pb-Mn-HEM.

Concentration in the liver	Pb-Mn	Pb-Mn-HEM	control	HEM
SOD(U/mg of protein)	0,22± 0,14***	0,87± 0,33***	1,03± 0,26***	1,10± 0,06
GPx(U/mg of protein)	25 ,31± 0,31*	38,62±0,08*	43,41± 0,12*	40,75± 0,62
CAT (U/mg of protein)	11,38± 0,15*	20,73± 0,97*	25,27±0,22*	26,08± 0,03

Values are reported as ± SEM on average (**: p<0.01, *: p<0.05).

3.4. The effect of lead and manganese on the structural architecture of the liver

Histological sections of the liver of rats intoxicated by lead and manganese show necrosis and the hepatic parenchyma site of swelling, ballooning of the hepatocytes and lipid vacuoles within the hepatocytes producing steatosis foci, a necrosis microfocus (Figure 01.B, B1) compared to the liver of the control rats. These results are similar with studies by Jarrar et al. (2012) suggesting that subchronic exposure to lead causes liver damage in rats. The appearance of inflammatory cells in liver tissue due to sub-chronic exposure to lead may suggest that lead may interact with proteins and enzymes in interstitial liver tissue interfering with the antioxidant defense mechanism and lead to reactive oxygen species (ROS) which in turn may mimic an inflammatory response (Johar et al., 2004). In addition, the liver is the critical organ for regulating Mn homeostasis in the body. In the same way, Mn toxicity is rare and occurs mainly in the liver, probably because of the primary role this organ plays in eliminating Mn from the blood through biliary excretion (Crossgrove et Zheng, 2004), consumption of water contaminated with Mn causes liver overflow which can lead to liver damage (Peili et al., 2011). Indeed several studies have reported that Mn induces a histopathological alteration by a necrosis of the liver and apoptoseperiportal (Rahelié et al., 2006) which could compromise the detoxifying function of the liver to know how to eliminate manganese (Zhang et al., 2003). Mint is usually used in the treatment of biliary system disorders, liver problems, irritable bowel syndrome and inflammatory bowel

disease (Bouchra et al.,2003). The effects of mint are related to its effect on bile flow and liver function (Taylor,1984). On the other hand it is observed that blood glucose levels are decreased in rats treated with *Mentha spicata* EHM compared to intoxicated rats. The administration of mint essential oil to rats exposed to Pb-Mn resulted in a decrease in blood glucose levels, it has been shown that mint extract performs hypoglycemic activity due to the presence of major components such as menthol and menthone (Khodadust et al., 2015) In addition, the results of Bayani et al. (2017) indicated that aqueous extract of *M. spicata* leaves possesses hypoglycemic, hypocholesterolemic and antioxidant properties in diabetic rats. In parallel, a significant decrease in transaminases (ALT,AST) was also observed following the administration of *M.spicata* HEM which indicates regulation of liver function biomarkers.Consistent with the results of this study, Rajesh et al. (2013) reported that elevated serum ALT biochemical markers in rats with hepatic lesions were decreased with the addition of ethanolic extract of mint leaves (*Mentha arvensis*) at 400 mg/kg . Barbalho et al. (2011) studied the effects of administration of mint juice twice daily for 30 days on certain biochemical parameters in humans, the results showed a 41.5% reduction in blood sugar, 58.5% in triacylglycerides, 66.9% in total cholesterol, 52.3% in LDL indices, 70% in AST levels, 74.5% in ALT levels.

Treatment with HEM in intoxicated rats showed an improvement in cholesterol values, triglycerides and oxidative status enzymes (SOD,CAT, GPx). These results are similar

with the work of Al-Fartosi et al. (2014) showed that phenolic compounds of *Mentha longifolia* and *Mentha spicata* leaf extract in diabetic rats significantly reduced serum cholesterol levels compared to untreated groups. The cholesterol-lowering effect of mint could be due to the menthol and menthone content which has the property of reducing the activity of a liver enzyme HMG CoA reductase (a primordial enzyme in the synthesis of cholesterol in the liver) and simultaneously reducing cholesterol levels. (Poltowicz et Wesyk, 2005). *Mentha arvensis* leaves have the highest phenol and flavonoid content which explains why it has the greatest antioxidant property and reduces cholesterol levels (Vishwakarma et al., 2014).

It has also been observed that the administration of HEM *M.spicata* protective action of liver tissue that could be explained by the chelating and antioxidant effect of phenolic components contained in HEM, which significantly reduces free radicals generated by intoxication that causes cell damage in liver tissue. (Muruganathan et Srinivasan, 2016) Our results are in harmony with Vinothkumar et al., (2013), which report that carvone reduces oxidative stress by improving enzymatic antioxidant activity in rats poisoned by 1,2-dimethylhydrazine. However, other authors have illustrated that treatment with carvone restored the activities of serum ALT and AST and ALP levels in rats treated with streptozotocin, indicating the maintenance of liver cell function and structure (Muruganathan et Srinivasan, 2016). Another study indicated that in vivo administration of peppermint alcohol extract reduced the adverse effects of CCl₄ on liver function (Khodadust et al., 2015).

4. Conclusions

Exposure of developing wistar rats to Pb-Mn revealed hepatotoxic effects resulting in significant alteration of liver bio markers and the antiradical system represented by different enzymes. Treatment with *M. spicata* HEM clearly demonstrated effective hypoglycemia,

hypolipidemia and remarkable liver protection in rats previously intoxicated with Pb-Mn.

5. References

- Adli, D.E.H., Kahloula, K., Slimani, M., Brahmi, M., Benregueig, M. (2017). Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse. *Phytothérapie*. 1-7 DOI 10.1007/s10298-017-1130-3
- de Sousa Barros, Alexandre & Morais, Selene & Augusto Travassos Ferreira, Pablito & Gusmão Pinto Vieira, Ícaro & Craveiro, Afranio & Fontenelle, Raquel & Eire Silva Alencar de Menezes, Jane & Walber Ferreira da Silva, Francisco & Araújo de Sousa, Halisson. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*. 76, 557-564. 10.1016/j.indcrop.2015.07.004.
- Annabi, B. A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus Biologies*.330(8):581-8.
- Awde, S. (2014). Relations entre protéolyse hépatique et qualités technologiques et sensorielles du foie gras de canard (Doctoral dissertation). Toulouse – France.
- Bandyopadhyay, U., Das, D., & Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current science*, 658-666.
- Barbalho, S.M., Machado, F.M.V.F., Oshiiwa, M., Abreu, M., Guiger, E.L., Tomazela, P., and Goulart, R.A. (2011). Investigation of the effects of peppermint (*Mentha piperita*) on the biochemical and anthropometric profile of university students. *Ciencia Tecnologia de Alimentos Campinas*. 31(3), 584-588.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cobianchi, R.C., Trinchella, F., Capasso, C. and Carginale, V. (2012). Toxicity, accumulation, and removal of heavy

- metals by three aquatic macrophytes, Int. J. Phytoremediat. (14), 374–387.
- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., & Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *Journal of Ethnopharmacology*.89, 165-169.
- Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier, A., Lognay, G. (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnologie. Agronomie. Société et Environnement*. 11 (1), 3–7.
- Brahmi, F., Madani, K., Dahmoune, F., Rahmani, T., Bousbaa, K., Oukmanou, S., Chibane, M. (2012). Optimization of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications*. 2 (4), 72–86. DOI: 10.5530/pc.2012.4.10
- Crossgrove, J., and Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon over exposure. *NMR Biomed*. 17: 544–553.
- Curutchet, A., Dellacassa, E., Ringuelet, J.A., Chaves, A.R., Viña, S.Z. (2014). Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha piperita* and *M. spicata*). *Food Chemistry*. 143, 231–238.
- Dini, A., Giudetti, A., Ruzittu, M., Gnoni, G., and Zara, V. (1999). Citrate Carrier and lipogenic enzyme activities in lead nitrate-induced proliferative and Apoptotic phase in rat liver. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 47, 607-14.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563–4569.
- Fordahl, S., Cooney, P., Qiu, Y., Xie, G., Jia, W., and Erikson, K.M. (2012). Waterborne manganese exposure alters plasma, brain, and liver metabolites accompanied by changes in stereotypic behaviors. *Neurotoxicology and Teratology*. 34(1):27–36.
- Fossati, P., Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*.28, 2077–2080.
- Goullé, J.P., Saussereau, E., Lacroix, C., and Guerbet, M.(2012). Traité de toxicologie médico-judiciaire .Re : Chapitre 24; Métaux ., 733-756.
- Grizzo, L.T., and Cordellini, S.(2008). perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*.103,207–214.
- Halder, S., Mehta, A.K., Kar, R., Mustafa, M., Mediratta, P.K., Sharma, K.K.(2011). Clove oil reverses learning and memory deficits in scopolamine-treated mice. *Planta Medica*.77,830–4.
- Hanan, A., and Riham, M.(2012). 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.
- Huang, C.C., Chu, N.S., Lu, C.S., Wang, J.D., Tsai, J.L., Tzeng, J.L., Wolters, E.C., and Calne, D.B.(1989). *Chronic manganese intoxication*. *Jama Neurology*. 46: 1104–1106. PMID: 2803069
- Jarrar, Bashir. M., and Noory, T.T. (2012).Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (19), 203–210.
- Johar, D., Roth, J.C., Bay, G.H., Walker, J.N., and Krocak, T.J., Los, M. (2004). Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer. *Roczniki Akademia Medyczna w Białymstoku*. 49, 31–39.

- Kahloula, K., Slimani, M., Dubois, M., Bonnet, J. (2009). D-cycloserine enhances spatial learning performances of rats chronically exposed to lead during the developmental period. *African Journal of Neurological Sciences*, 28:67-77.
- Kakkar, P., Das, B., Viswanathan, P.N. (1984). A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 21,130-2.
- Karousou, R., Koureas, D.N., Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: Corido *Thymus capitatus* and *Satureja thymbra* in Natura 2000. *Phytochemistry*, 66, 2668-73.
- Kasdallah, A.G., Mornagui, B., Gharbi, N., Machghoul, S., El-Faza, S.(2005). Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats. *Comptes Rendus Biologies*.328,463-470.
- Khalid, G., Al-Fartosi., Haider, Radi., Eman, A., Al-Rekabi. (2014). Lipid Profile of Diabetic Male Rats Treated with Phenolic Compounds of Leaves Extracts from *Mentha longifolia* and *Mentha spicata*. *International Journal of Pharmacy, Biology and Medical Sciences*.Vol.3. No. 2.
- Khodadust, M.R., Samadi F., Ganji, F., Jafari, A.Y., and Asadi, G.H. (2015).Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) alcoholic extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in broiler chickens under heat stress condition. *Poultry Science Journal*, 3 (1): 1-16.
- Krachler, M. (1999). Trace element transfer from the mother to the newborn ,investigations on triplets of colostrum, maternal and umbilical cord sera. *European Journal of Clinical Nutrition*.53,486-494.
- Lee, B.K., Kim,Y. (2008). Relationship between blood manganese and blood pressure in the Korean general population according to knhanes *Environmental Research*, 111,797-803.
- Lucchesi, M.E., Chemat, F., Smadja, J. (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043, 323-327.
- Mahsan, B., Mahmood, A.H., Ashkan, J.J. (2017). Study of Hypoglycemic,Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Iranian *Mentha Spicata* Leaves Aqueous Extract in Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (Special Issue), 75-82.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., Deans, S.G., Eaglesham, E. (1994). Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 9 (3),125-129.
- Milatovic, D., Zaja, M. S., Gupta, R.C., Yu, Y., Aschner, M. (2009). Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240, 219-225.
- Molina, R.M., Phattananudee, S., Kim, J., Thompson, K., Wessling-Resnick, M., Maher, T.J., Brain, J.D. (2011). Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology*. 32, 413-22.
- Moussa, S.A., Bashandy, S.A. (2008). Biophysical and biochemical changes in the blood of rats exposed to lead toxicity. *Romanian Journal of Biophysics*,18, 123-133.
- Peili,H., Chunxia, C., Hui,W., Guojun, L., Haiming, J., Ying, H., Na,L.,Yang,X.,Qiuhong,Y.,Yuting,L.,Peng wen,W.,Zhixiong,Shi.,Zhi,w. S. (2011). Manganese effects in the liver following subacute or subchronic manganese chloride exposure in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (74) 615-622.
- Pezerat, H. (2006). Additif au mémoire d'avril sur le projet d'une nouvelle rédaction *.La Revue de Médecine Interne*. 5, 1-4.

- Poltowicz, K., Wesyk, S. (2005). Effect of garlic oil supplementation in laying hen nutrition on the level of egg yolk cholesterol. *Materialy XVII Miedzynarodowego symposium Drobiarskiego, Polska*, 137-138.
- Priscilla, P. A., Natália, M., Sandra, F.R.S.(2010). *-journal food bioprocess technology*vol. 3, no. 4,1-12
- Rahelié, D.M., Kujundzié, Z., Romié et al. (2006). Serum concentration of zinc. Copper. Manganese and magnésium in patients with liver cirrhosis. *Collegium Antropologicum.*, 30 (3), 523-28
- Rajesh, K., Vishwanath, A.H., Shivakmar, S.I., Joshi, V., Kurnool, A.N. (2013). Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of *Mentha arvensis* leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *international journal of pharmacy research and technology*. 5, 426-430.
- Reitman, S., Frankle, S. (1957). Coloremtric method for determination of serum transaminase activity. *American Journal of Clinical Pathology*. 28, 56-68.
- Roth, J. A., Garrick, M. D. (2003). Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical pharmacology*, 66(1), 1-13. PMID: 12818360
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179, 588–90.
- Sharma, S., Shrivastava, S., Shukla, S. (2013). Reversal of lead-induced toxicity due to the effect of antioxidants. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 32, 177–187.
- Shyamala, M.P., Venukumar, M.R., Latha, M.S. (2003). Antioxidant potential of the *syzygium aromaticum* (Gaertn.) LINN (cloves) in rats fed with high fat diet. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 99-103.
- Sinha, A.K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry* 47:389–94.
- Smith,S., Gancarz,D., Rofe,F., Kempson,I.M., Weber, J and Juhasz, A. L.(2012). Antagonistic effects of cadmium on lead accumulation in pregnant and non-pregnant mice, *Journal of Hazardous Materials*, (199) 453–456.
- Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D. (2013). Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th Ed. England: Churchill Livingstone. Elsevier.
- Taylor, B. ((1984). The mechanism of the inhibitory action of menthol on gut smooth muscle. *British Journal of Surgery*.71, 902-908.
- Tholin, K. (1995). Changes in blood manganese levels during pregnancy in iron supplemented and non supplemented women. *J, Trace Elem,Med,Biol* (9), 13–17
- Thomas, C., Thomas, L. (1992). *Labor diagnostik v on Erkrankung en der Nier en und ableitendenHar* (hrsg)Dans: Thomas L, 6 éd. Philadelphie, Labor und Diagnose.
- Udaiyar, M., Subramani, S. (2016). Beneficial effect of carvone, a dietary Monoterpene ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine &Pharmacotherapy*. 84, 1558-1567.
- Villeda-Hernandez, J., Barroso-Moguel, R., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Huerta-Romero, R., Rios, C. (2001). Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain research bulletin*.55(2), 247-251
- Vishwakarma, S., Chauhan, K., Jeba, R. C., Khushbu, S. (2014). Comparative study of qualitative phytochemical screening and antioxidant activity of *Mentha arvensis*, *Elletaria cardamomum* and *Allium*

- porrum*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*.4, 2538-2556.
- Zhang, S., Zhou, Z., Fu, J.(2003). Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environmental Research* 93(2), 149-157.
- Zhao, Q., Wang,W., Cao, Y.,Chen,Y., Ren,A., Ge,Y., Yu,Z., Wan ,S., Hu, A and Bo,Q.(2014). Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer,in Anhui province, Eastern China, *Science of the Total Environment*, 470, 340–347.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A. (2003). Role of Manganese in hepatic encephalopathy. Netherlands: Kluwer Academic Press.