



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^{ième} Cycle

Spécialité : Biochimie Et Toxicologie Expérimentale

Filière : Sciences biologiques

Présentée par : M^{elle} ARABI Wafaa

Intitulé

Contribution à l'étude de l'effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Pimpinella Anisum* (anis vert) chez les rats wistar en développement intoxiqués au mercure. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale.

Thèse soutenue le 21/10/2019 devant le jury proposé composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	SLIMANI Miloud	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	KAHLOULA Khaled	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	AIT HAMADOUCHE Nadia	Prof	Université d'Oran 1 – Ahmed Ben Bella	Examinatrice
04	OUABED Asmahan	MCA	Université de Tiaret – Ibn Khaldoun	Examinatrice
05	HACHEM Kadda	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur



Remerciements

*Je remercie le Professeur **SLIMANI Miloud** d'avoir présidé ce jury, qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux.*

*Je remercie mon directeur de thèse le professeur **KAHLOULA Khaled** pour sa patience et sa générosité. Je tiens à lui faire part de toute ma reconnaissance pour l'attention qu'il m'a accordée durant ces années d'études, si riches sur le plan scientifique et humain.*

*Je remercie le professeur **AIT HAMADOUCHE Nadia** de l'université d'Oran, le docteur **OUABED Asmahan** de l'université de Tiaret, et le docteur **HACHEM Kadda** de l'université Dr Moulay Tahar Saida de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et d'accepter de faire partie de ce jury.*

*J'adresse également mes vifs remerciements au professeur **BERROUKCHE Abdelkrim**, aux Docteurs **ADLI Djallel Edine**, **AMMAM Abdelelkader** et **ZIANI Kaddour** de l'université Dr Moulay Tahar Saida pour leur précieuse collaboration.*

*Je remercie le docteur **HEMIDA Houari** de l'université Ibn Khaldoun Tiaret pour sa contribution à la réalisation de l'étude histologique.*

*Mes remerciements les plus chaleureux au Docteur **KERMAS Fatima** du laboratoire d'anatomopathologie de Sidi Bel Abbes pour l'accueil et l'aide qu'elle m'a réservés au sein de son laboratoire.*

Merci à tous les enseignants qui m'ont accompagnée pendant mon parcours universitaire, qu'ils trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont accompagné et soutenu durant ce long chemin.

A ma soeur.

A mes frères.

A mes chers neveux et particulièrement Jihane et Abd el jalil.

A tous mes amis et à tous ceux qui me sont chers.

Table des matières :

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introductionp1

Revue bibliographique

Le mercure

I. Historique.....p4

II.Généralités.....p4

III. Propriétés physicochimiques.....p5

IV. Cycle du mercure.....p6

V. Sources d'expositionp6

V.1. Thermomètres et baromètres à mercure.....p6

V.2. Les amalgames dentairesp7

V.3. Les vaccinsp7

V.4. Le poissonp7

V.5. Les industries.....p7

V.6. Du sol.....p8

VI. Les différentes formes du mercure.....p8

VI.1.Le mercure élémentaire.....p8

VI.1.1. Toxicocinétique.....p8

VI.1.1.1. Absorption.....p8

VI.1.1.2. Transport et distribution.....	p9
VI.1.1.3. Excrétion.....	p9
VI.2. Le mercure organique.....	p9
VI.2.1. Toxicocinétique.....	p9
VI.2.1.1. Absorption.....	p9
VI.2.1.2. Transport et distribution.....	p10
VI.2.1.3.Excrétion.....	p10
VI.3. Le mercure inorganique.....	p10
VI.3.1. Toxicocinétique.....	p11
VI.3.1.1. Absorption.....	p11
VI.3.1.2. Transport et distribution.....	p11
VI.3.1.3. Excrétion.....	p11
VII. L'intoxication aiguë.....	p12
VIII. Intoxication chronique.....	p13
IX. Les effets du mercure.....	p13
IX.1. Effet sur le système nerveux	p13
IX.2. Effet sur la fonction rénale.....	p14
IX.3. Effet sur l'appareil cardiovasculaire.....	p14
IX.4 .Effet mutagène.....	p15
IX.5.Effet concérogène.....	p15
IX.6.Effet sur la fonction hépatique.....	p15
L'aromathérapie	
I. Généralité.....	p16

II. Les huiles essentielles (HE).....	p17
II.1. Le mécanisme d'action des huiles essentielles	p17
II.2. Les facteurs déterminant la qualité d'une huile.....	p18
II.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	p18
II.4. La partie de la plante utilisée.....	p19
II.5. Toxicité des huiles essentielles.....	p19
II.6. Les méthodes d'obtentions des huiles essentielles.....	p19
II.6.1. La distillation à la vapeur d'eau.....	p19
II.6.2. L'expression à froid ou expression mécanique.....	p20
II.6.3. Distillation à sèche.....	p20
III. Les extraits.....	p20
III.1. Les méthodes d'obtention des extraits.....	p20
III.1.1. Extraction solide-liquide (soxhlet).....	p21
III.1.2. Extraction liquide-liquide.....	p21
III.1.3. Extraction hydroalcoolique.....	p21
III.1.4. Extraction par un solvant organique.....	p21
III.1.5. L'enfleurage ou macération.....	p22
III.1.6. Infusion.....	p22
III.1.7. Décoction	p22
IV. Méthodes d'identifications	p23
IV.1. La chromatographie en phase gazeuse CPG.....	p23
IV.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	p23
V. Les principaux constituants actifs dans la plante.....	p24

V.1. Les flavonoïdes.....	p24
V.2. Les tanins.....	p24
V.3. Les anthocyanes	p24
V.4. Les anthraquinones.....	p25
V.5. Les coumarines.....	p25
V.6. Les saponines	p25
V.7. Les alcaloïdes.....	p26
V.8. Les polysaccharides.....	p26

Pimpinella anisum

I. Généralité.....	p27
II. Classification botanique.....	p28
III. Composition chimique.....	p28
IV. Pharmacocinétique	p29
V. Les effets de <i>pimpinella anisum</i>	p29
V.1. Effet gastro-intestinal.....	p29
V.2. Effet broncho-dilatateur	p29
V.3. Effet antidiabétique.....	p30
V.4. Effet antifongique	p30
V.5. Effet antioxydant.....	p30
V.6. Effet oestrogénique	p31
V.7. Effet sur le neuro-comportement.....	p31
V.8. Effet sur le système nerveux	p31
VI. Toxicité.....	p32

VI.1.Toxicité aigüe.....	p32
VI.2.Toxicité subchronique.....	p32

Matériels et méthodes

I. Objectif	p34
II. Matériel végétal.....	p34
II.1. L'extraction de l'huile essentielle.....	p34
II.2.Préparation de l'extrait aqueux.....	p35
II.3. La chromatographie en phase gazeuse couplés à la spectroscopie de masse (CPG/SM).....	p35
II.4. Le screening phytochimique.....	p36
III.Animaux d'expérimentation.....	p39
III.2. Détermination du poids corporel et poids des organes.....	p41
IV.Les tests neurocomportementaux	p41
IV.1.Test de la nage forcé.....	p41
IV.2. L'open field.....	p41
IV.3.Test de la piscine de Morris.....	p42
IV.4.Le test du compartiment sombre/ clair.....	p43
V. Dosage du mercure par un spectrophotomètre d'absorption atomique à vapeur froide	p44
VI. 1. Le prélèvement sanguin.....	p45
VI.2.Les dosages biochimiques.....	p45
VI.3.Détermination des paramètres hématologiques.....	p47
VII. L'étude histopathologique.....	p47

VIII. Analyses statistiques.....	p55
----------------------------------	-----

Résultats et interprétations

I.Le rendement.....	p56
II.Résultat de la CPG/SM.....	p56
III.Le screening phytochimique.....	p56
IV.Résultats du traitement par l'huile essentielle.....	p57
IV.1. L'évaluation du poids.....	p57
IV.2. Résultats neurocomportementaux.....	p58
IV.3.Dosage du mercure au niveau sanguin et cérébral.....	p63
IV.4. L'histologie du cerveau.....	p63
IV.5.Les paramètres biochimiques.....	p66
IV. 6.L'histologie du foie et du rein.....	p68
IV.7. Les paramètres hématologiques.....	p73
V. Résultats du traitement par l'extrait aqueux.....	p75
V. 1. L'évaluation du poids.....	p75
V.2. Résultats neurocomportementaux.....	p76
V.3.Dosage du mercure au niveau sanguin et cérébral.....	p81
V.4.L'histologie du cerveau.....	p81
V.5.Les paramètres biochimiques.....	p83
V.6. L'histologie du foie et du rein.....	p86
V.6.Paramètres hématologique.....	p90

Discussion

I. L'effet du traitement par l'anis vert et du mercure sur le poids corporel et le poids des organes.....	p95
II.L'effet du <i>Pimpinella anisum</i> et du mercure sur le neurocomportement.....	p96
III.Dosage du mercure sanguin et cérébral.....	p101
IV.L'histologie du cerveau.....	p102
V.Les paramètres biochimiques.....	p104
VI. L'histologie du foie et du rein.....	p106
VII. Les paramètres hématologiques.....	p108
Conclusion générale	
Conclusion.....	p111

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques physiques de certaines formes de mercure.....	p5
Tableau 2 : Classification de <i>P.anisum</i>	p28
Tableau 3 : La composition de l'huile de l'anis obtenue par hydrodistillation.....	p29
Tableau 4 : Caractéristiques de la technique SAA.....	p45
Tableau 5 : Les différents solvants utilisés avec la durée d'imprégnation.....	p49
Tableau 6 : Les solvants utilisés et le temps de contact durant la coloration.....	p52
Tableau 7 : Les composants identifiés par CPG/SM	p56
Tableau 8 : Les métabolites secondaires présents dans l'anis vert.....	p57
Tableau 9 : Variation du poids corporel.....	p57
Tableau 10 : Variation des poids des organes.....	p58
Tableau 11 : Les paramètres mesurés du test de l'open field.....	p60
Tableau 12 : Evaluation de la mercurémie et du mercure cérébral.....	p63
Tableau 13 : Variation du poids corporel.....	p75
Tableau 14 : Variation des poids des organes.....	p76
Tableau 15 : Les paramètres mesurés du test de l'open field.....	p78
Tableau 16 : Evaluation de la mercurémie et du mercure cérébral.....	p81

Liste des figures :

Figure1 : Cycle de mercure dans l'environnement.....	p6
Figure2 : Toxicocinétique du mercure.....	p12
Figure 3 : Structure chimique des flavonoides.....	p24
Figure 4 : Structure chimique des anthraquinones.....	p25
Figure 5 : La structure des coumarines.....	p25
Figure 6 : Fleurs et le fruit de <i>Pimpinella anisum L.</i>	p27
Figure 7 : Montage d'hydrodistillation.....	p34
Figure 8 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.....	p36
Figure 9 : Schéma représentatif de la répartition des groupe.....	p40
Figure10 : Les étapes qui suivent le traitement	p40
Figure11 : Dispositif de l'open field.....	p42
Figure12 : Dispositif de la piscine de Morris.....	p43
Figure13 : Dispositif du double compartiment sombre/clair.....	p44
Figure 14 : Les étapes effectuées dans la salle de la macroscopie.....	p48
Figure 15 : L'automate d'imprégnation utilisée.....	p49
Figure 16 : Les différentes étapes d'enrobage.....	p50
Figure 17 : La station d'enrobage utilisée.....	p50
Figure 18 : La réalisation des coupes par le microtome.....	p51
Figure 19 : L'automate de coloration utilisé.....	p53
Figure 20 : Le montage des lames.....	p53

Figure 21 : Les lames préparées pour l'analyse microscopique.....	p54
Figure 22 : L'examen microscopique des sections histologiques.....	p54
Figure 23 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins, intoxiqués, témoin.HEA, intoxiqués.HEA.	p59
Figure 24 : L'évaluation de l'effet curatif de l'huile essentielle de <i>Pimpinella anisum</i> sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Hg.....	p61
Figure 25 : Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités.	p61
Figure 26 : Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités.	p62
Figure 27 : Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Hg.....	p63
Figure28 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin avec Gr ×40 ;.....	p64
Figure 29 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B)d'un rat intoxiqué par le HgCl ₂ avec Gr×40 et Gr× 10.....	p64
Figure 30 : Coupe histologique au niveau du cortex cérébral(A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué traité par HE avec Gr×40 et Gr×10.....	p65
Figure 31 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin traité par HE avec Gr×10 ...	p65
Figure 32 : Comparaison entre les valeurs de la glycémie mesurée en des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.	p66
Figure 33 : Comparaison entre les teneurs sériques du ASAT exprimés en des : témoins, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.	p67
Figure 34 : Comparaison entre les teneurs sériques du ALAT exprimés en des : témoins, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.	p67

Figure 35: Comparaison entre les valeurs de l'urée sanguine mesurée en des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.	p68
Figure 36: Comparaison entre les valeurs de la créatinine sanguine mesurée en des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.	p68
Figure 37 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat témoin avec Gr×10.....	p69
Figure 38 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat intoxiqué par le Hg avec Gr × 40	p69
Figure 39 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat Hg-HEA avec Gr×40.....	p70
Figure 40 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat témoin-HEA avec Gr×40.....	p70
Figure 41 : Coupe histologique au niveau du rein d'un rat témoin avec Gr×10.....	p71
Figure 42 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué avec Gr×10.....	p71
Figure43 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué-HEA avec Gr×10.....	p72
Figure 44 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat Témoin-HEA avec Gr×10 et Gr ×40.....	p72
Figure 45 : Comparaison entre le nombre des globules blancs des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.....	p73
Figure 46 : Comparaison entre le nombre des globules rouges des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.....	p74
Figure 47 : Comparaison entre le taux d'hémoglobine exprimé en (g/Dl) des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin.HEA.....	p74
Figure 48 : Comparaison entre le pourcentage d'hématocrite des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA.....	p74
Figure 49 : Comparaison entre le taux des plaquettes des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin- HEA.....	p75

Figure 50 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins, intoxiqués, témoin-EAA, Hg-EAA.....p77

Figure 51 : L'évaluation de l'effet curatif de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Hg.....p79

Figure 52 : Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités (EAA).....p79

Figure 53 : Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités.....p80

Figure 54 : Comparaison de l'effet de EAA sur l'anxiété chez les rats exposés au Hg.....p81

Figure55 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin avec Gr×40.....p82

Figure 56 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué par le HgCl₂ avec Gr×40 et Gr×10.....p82

Figure 57 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué traité par l'extrait avec Gr×40.....p82

Figure 58 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin traité par l'extrait aqueux avec Gr×40p83

Figure 59 : Comparaison entre les valeurs de la glycémie mesuré en des témoins, Hg et Hg-EAA.....p83

Figure 60 : Comparaison entre les Teneurs sériques du ASAT exprimés des : Témoins, Hg et Extrait-Hg.....p84

Figure 61 : Comparaison entre les teneurs sériques du ALAT exprimés des : Témoins, Hg et Extrait- Hg.....p84

Figure 62 : Comparaison entre les valeurs de l'urée sanguine mesuré des témoins, Hg et Hg-EAA.....p85

Figure 63 : Comparaison entre les valeurs de la créatine sanguine mesuré) des témoins, Hg et Hg-EAA.....	p85
Figure 64 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat témoin avec Gr×10.....	p86
Figure 65 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat intoxiqué par le Hg avec Gr × 40	p87
Figure 66 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat Hg-Extrait avec Gr×40.....	p87
Figure 67 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat témoin –Extrait avec Gr×40.....	p88
Figure 68 : Coupe histologique au niveau du rein d'un rat témoin avec Gr×10.....	p88
Figure 69 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué avec Gr×10.....	p89
Figure 70: Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat Hg-EAA avec Gr×40.....	p89
Figure 71: Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat témoin-EAA avec Gr×10.....	p89
Figure 72 : Comparaison entre le nombre des globules blancs des témoins, Hg et.Hg-EAA de l'exposition à l'Hg suite à un traitement curatif par l'extrait de l'anis sur le taux des globules blancs.....	p90
Figure 73 : Comparaison entre le nombre des globules rouges des témoins, Hg et Extrait. Hg	p91
Figure 74 : Comparaison entre le taux d'hémoglobine exprimé en (g/dL) des témoins, Hg et Hg-EAA.....	p91
Figure 75 : Comparaison entre le pourcentage d'hématocrite des témoins, Hg et Extrait. Hg	p91
Figure76 : Comparaison entre le taux des plaquettes des témoins, Hg et Extrait.Hg.....	p92

Liste des abréviations :

ALAT : Alanine aminotransférase

ANOVA : Analyse de variance

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

EAA : Extrait aqueux d'anis

EAA : Extrait aqueux de l'anis

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

Fe Cl₃ : Chlorure de fer

FST : Forced Swimming Test

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCL : Acide chlorhydrique

HCl₂N :Dichloramine

HE : huile essentielle

HEA : huile essentielle d'anis

Hg : mercure

Hg²⁺ : ion mercurique

HgCl₂ : Chlorure de mercure

IP : intrapéritonéal

MeHg : methylmercure

NaOH : Hydroxyde de sodium

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SH : groupement thiol

SNC : système nerveux central

Au cours des dernières années, l'analyse des éléments traces métalliques a connu un regain d'intérêt en raison des risques sanitaires encourus liés à la pollution de l'environnement par certains de ces éléments. Il s'agit d'une pollution naturelle ou anthropogénique. L'exposition professionnelle, ainsi que la présence de métaux lourds dans des médicaments ou des produits de contraste constituent également des sources de danger (**Goullé et al., 2016**). Selon **Clarkson et al., 2003**, le contact humain avec des composés de métaux lourds est corrélé avec des niveaux élevés de toxicités, même à des faibles concentrations (**Mello-Carpes et al., 2013**).

Parmi ces éléments, le mercure (Hg) est un métal lourd qui peut se trouver dans différentes sources telles que les fruits de mer, les produits alimentaires, l'eau, l'air ambiant, les sédiments, le sol, les amalgames dentaires ainsi que les vaccins. Il ne semble pas être essentiel dans une fonction métabolique, mais peut en revanche nuire à plusieurs de ces fonctions (**Chehimi et al., 2012**). C'est l'existence d'intoxications massives chez les travailleurs professionnellement exposés au mercure qui a attiré l'attention sur les effets délétères de ce toxique sur l'organisme humain et sur les conséquences organiques graves (**Nogueira et al., 2003**).

L'exposition chronique au mercure par voie pulmonaire induit des lésions neurologiques, respiratoires et hépatiques dont la sévérité augmente avec la durée d'exposition et la concentration (**Falcy et al., 2014**).

Par ailleurs, depuis l'antiquité un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent l'application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétique et agriculture grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : flavonoïdes, hétéroside, alcaloïdes, saponosides, quinone, vitamines et huiles essentielles (**Fyad et al., 2013**).

Les plantes médicinales sont une large source des molécules bioactives nouvelles avec un potentiel thérapeutique. Une des originalités majeures de plantes médicinales réside dans leur capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules bioactives

utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires sont accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante. Ils sont des produits en très faible quantité, dont plus de 200 000 molécules ont été identifiés. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (**Kosalec et al., 2005 ; Macheix et al., 2005**).

Pimpinella anisum (anis) est une plante appartenant à la famille des ombellifères (Apiacée). C'est une plante aromatique qui est utilisée dans la médecine traditionnelle iranienne (en particulier ses fruits) en tant que carminatif, aromatique et désinfectant. Des études sur *Pimpinella anisum* ont montré divers effets tels que l'effet antimicrobien, antifongique, antiviral, antioxydant, relaxant musculaire, analgésique et anticonvulsivant (**Shojaii et al., 2012**). Elle peut également réduire la dépendance à la morphine (**Simbar et al., 2015**).

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet curatif de l'anis vert à savoir ; huile essentielle et extrait aqueux, face à une exposition subchronique au chlorure de mercure, sur le statut neurocomportemental, biochimique et histopathologique chez les rats wistars.

Le volet neurocomportemental comporte quatre tests à savoir : le test de dépression, open field, test de la mémoire spatiale et test d'anxiété.

Pour le volet biochimique, nous avons exploité les biomarqueurs de la fonction hépatique : ALAT et ASAT. De plus, le dosage des biomarqueurs de la fonction rénale : l'urée et la créatinine et l'évaluation du métabolisme glucidique.

En dernier, nous avons renforcé le travail par l'étude histopathologique des principaux organes étudiés : cerveau, foie et rein.

Revue Bibliographique

1. Le mercure :

1.I. Historique :

Les premiers composés méthyliques de mercure ont été synthétisés dans un laboratoire de chimie à Londres en 1860. Deux techniciens du laboratoire ont trouvé la mort à cause de l'empoisonnement par le mercure méthylique. Cet incident a provoqué un choc au sein de la société et on met fin depuis, à l'utilisation de ce composé.

Cependant, la découverte faite dans le vingtième siècle des propriétés antifongiques efficaces des composés alkyliques à chaîne courte de mercure mènent à une utilisation à un large spectre de ce dernier et en particulier dans les cultures de céréales. L'usage de ce produit permet en effet de protéger les graines contre les infections fongiques. En dépit de cette utilisation répandue, peu de cas d'empoisonnement pendant la première moitié du 20ème siècle ont été enregistrés. Mais, vers la fin des années 1950 et le début des années 1960 des manifestations sérieuses d'empoisonnement de mercure alkylique éclatent dans plusieurs pays en développement (**Clarkson, 2002**).

La pollution par le Hg provenant d'activités anthropiques et de l'industrialisation a donné lieu à plusieurs catastrophes au Japon, en l'Irak et dans le bassin de l'Amazone. En outre, de nombreux sites à haut risque ont été identifiés en Asie. La pollution par ce métal est devenue une préoccupation mondiale de la santé publique (**Wang et al., 2015**).

1.II. Généralité :

Le mercure est considéré comme l'un des métaux lourds les plus toxiques présents dans l'environnement. Plusieurs études ont montré que l'empoisonnement par ce métal peut causer de graves dangers à plusieurs niveaux de l'organisme : cardiovasculaires, respiratoires, rénale, nerveux, reproducteur et immunitaire. L'exposition de la femme enceinte à des niveaux de Hg peut aussi entraîner des dommages au cerveau du fœtus en période de développement. A l'état naturel, le Hg se trouve sous trois formes d'oxydation (0, +I et +II) et peut exister sous différentes formes chimiques ; élémentaire, organique et inorganique. Cette dernière représente la forme la plus rencontrée. Toutes ces substances sont excessivement toxiques pour l'organisme et causent des dommages dans les tissus et les organes. Ces diverses formes sont extrêmement instables, elles peuvent être changées et passer d'une forme à une autre

facilement (Chehimi et al., 2012 ;Goullé et al., 2014 ;Azevedo et al., 2016 : Coulibaly et al., 2016 : Golding et al., 2016).

1.III. Propriétés physicochimiques :

Le mercure est un métal blanc argenté, brillant, inodore, très dense et très mobile. C'est le seul métal liquide à température ambiante, ce qui lui a valu son symbole Hg qui vient du mot grec latinisé hydrargyrum (argent liquide). Il n'est pas oxydé par l'air ni par l'oxygène, néanmoins oxydé en présence de trace de vapeur d'eau. L'oxydation peut se produire lentement, comme elle peut être accélérée par des impuretés métalliques et par l'augmentation de la température (Bensefa-Colas et al., 2011 ; Falcy et al., 2014).

Cet élément a une masse atomique de l'ordre de 200,6, il porte le numéro 80 dans la classification périodique des éléments et pouvant présenter une valence 1 ou 2. C'est un des éléments les plus lourds puisque sa masse volumique est de $13,6 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Tableau1 : Caractéristiques physiques de certaines formes de mercure (Falcy et al., 2014)

	mercure	Oxyde mercurique	Chlorure mercurique	Sulfate mercurique	Sulfure mercurique
Formule	Hg	HgO	HgCl ₂	Hg(SO ₄)	HgS
Masse molaire	200,59	216,61	271,52	296,68	232,68
Point de fusion	38,87°C à 38,48°C	Décomposition à 500°C	276-277°C	Décomposition avant 500°C	Sublimation à 583°C(rouge) Sublimation à 446°C(noir)
Point d'ébullition	356,7°C- 356,9°C		302°C		
Hydrosolubilité à 20°C	0,02- 0,0567m g/L	3mg/L à 25°C	69g/L	Hydrolysé	Insoluble
Hydrosolubilité à 100°C	0,6mg/L	395mg/l	480g/L	Hydrolysé	Insoluble

IV. Cycle du mercure :

Le mercure circule dans l'ensemble des milieux naturels : air, eau, sol, sédiments. L'évaporation à une température modérée du mercure élémentaire (métal) provenant de sources naturelles ou anthropiques, entraîne sa circulation dans l'atmosphère dans tous les points du globe, avec une durée de résidence estimée à une année en moyenne. En milieu aquatique, sous l'action de bactéries et des micro-organismes aquatiques, le mercure est transformé de ses formes inorganiques à sa forme méthylée (MeHg), la plus toxique, et entre alors rapidement dans la chaîne alimentaire aquatique. La production du méthylmercure (MeHg) est particulièrement favorisée par des conditions de température élevée et de dégradation de la matière organique, comme on les rencontre dans les régions tropicales (Cordier,2003).

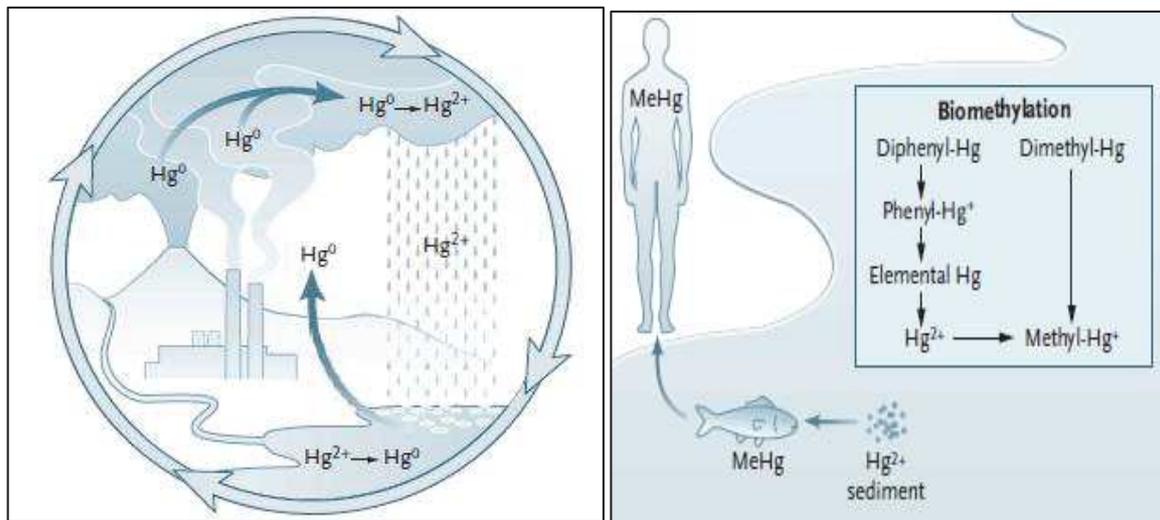


Figure1 : Cycle de mercure dans l'environnement (Clarkson et al., 2003)

V. Sources d'exposition :

V.1. Thermomètres et baromètres à mercure :

Les thermomètres sont une source majeure d'exposition au mercure métalliques et donnant lieu à des intoxications familiales particulièrement sévères pour les enfants en bas âge, les thermomètres médicaux au mercure ont été interdits à la vente en France en 1998. Leur usage hospitalier a été interdit en 1999. Cependant, il est probable que de nombreux foyers en possédant encore (Poupon, 2007).

V.2. Les amalgames dentaires :

Depuis plus de 150 ans, l'amalgame dentaire est constitué d'environ 50% de mercure métallique. Le mercure est libéré sous forme de vapeur de mercure ou d'ions inorganiques provenant du remplissage d'amalgame par abrasion de la surface de l'amalgame. La vapeur de mercure dans la cavité buccale peut être inhalée dans les poumons et absorbée par le système respiratoire. Les ions métalliques peuvent passer dans le liquide buccal et être ingéré dans le tractus gastro-intestinal (**Park et al., 2012**).

V.3. Les vaccins :

Certains vaccins contenant du mercuriothiolate de sodium ou thiomersal comme conservateur sont accusés d'être à l'origine de l'augmentation des cas d'autisme diagnostiqués notamment aux États-Unis. De nombreuses études épidémiologiques menées dans le monde n'ont pas permis d'incriminer ces vaccins, ce qui a conduit l'OMS à une mise au point en 2003. En France, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) a préconisé dès 1999 le remplacement des dérivés du mercure dans les vaccins pour enfants. Cependant, deux vaccins contre l'hépatite B pour enfants et nourrissons en contiennent encore (**Poupon, 2007**).

V.4. Le poisson :

La consommation de poisson constitue une source principale d'exposition au MeHg. L'intensité de l'exposition au MeHg pour le consommateur est directement liée à la quantité de poisson ingérée. Elle dépend aussi de la concentration de mercure dans le poisson, qui elle-même est fonction du niveau trophique qu'il occupe (**Cordier, 2003**).

V.5. Les industries :

Les industries comprennent le mercure dans divers domaines tels que le secteur des soins de santé, dans lequel le mercure est utilisé dans les instruments de mesure ou en tant que désinfectant et en dentisterie, l'industrie minière l'utilise dans les centrales électriques. Ainsi que l'industrie du charbon (**Bose-O'Reilly et al., 2010**).

V.6. Du sol :

Les sources de dépositions du mercure dans la surface du sol peuvent être le dépôt de mercure dans l'air ou bien issu de la diffusion des rejets de déchets de produits, tels que les batteries, les commutateurs et les déchets médicinales, l'épandage des boues d'épuration contenant des contaminants sur les zones cultivées, l'utilisation de produits solides de l'incinération des déchets, et la combustion du charbon en tant que matériau de construction ou de décomposition des corps avec des amalgames (**Bose-O'Reilly et al., 2010**).

VI. Les différentes formes du mercure :

Le mercure existe sous trois formes : le mercure élémentaire ou métallique, le mercure inorganique et le mercure organique. Il peut exister sous deux valences principales +1 et +2, correspondant aux composés mercureux et mercuriques (**Bensefa-Colas et al., 2011**).

VI.1. Le mercure élémentaire :

Le mercure élémentaire est utilisé dans les thermomètres, les amalgames dentaires et est utilisé dans plusieurs autres applications domestiques et industrielles. Le mercure métallique est la forme toxicologique la plus importante parce qu'il se volatilise à température ambiante pour former une vapeur qui est rapidement absorbée par inhalation. Une fois absorbé, cette forme de mercure est soluble dans les lipides. Il peut traverser la barrière hémato-encéphalique et le placenta et peut être oxydé par la catalase et le peroxyde d'hydrogène en mercure inorganique (Hg^{2+}), qui est retenu par le cerveau pendant des années (**Rooney, 2007 ; Bradberry, 2012 ; Syversen et al., 2012**).

VI.1.1. Toxicocinétique :

VI.1.1.1. Absorption :

La vapeur du mercure élémentaire est rapidement et essentiellement absorbée par la voie pulmonaire, le taux d'absorption alvéolaire étant classiquement évalué à 80 %. L'absorption par voie digestive est négligeable, de l'ordre de 0,01 %. Par voie cutanée, le taux d'absorption du mercure métallique sous forme vapeur est faible, évalué à moins de 3 % par certains auteurs (**Bensefa-Colas et al., 2011**).

VI.1.1.2. Transport et distribution :

Le mercure élémentaire après absorption est distribué rapidement dans tous les organes, où il est rapidement oxydé par la catalase cellulaire en ion mercurique (Hg^{2+}) lui permettant de se fixer sur des protéines sanguines et tissulaires ; il reste néanmoins échangeable expliquant l'action chélatrice de certains agents. Après une exposition à des concentrations atmosphériques de mercure élémentaire comprises entre 0,1 et 0,2mg/m³, 74 à 80 % du mercure inhalé est retenu dans l'organisme avec une accumulation ciblée sur le rein où il se lie à la métallothionéine. Le mercure métallique, du fait de son caractère très lipophile, traverse facilement les barrières hématoencéphalique et placentaire avant d'être ionisé en Hg^{2+} sous l'action des catalases (Bensefa-Colas et al., 2011).

VI.1.1.3. Excrétion :

L'élimination du Hg^0 est principalement rénale lors de l'exposition prolongée, dans une moindre mesure, elle peut être biliaire et plus faible par voie cutanée. Le demi de vie biologique du Hg^0 est compris entre 40 et 90 jours (Bensefa-Colas et al., 2011).

VI.2. Le mercure organique :

L'exposition au mercure organique chez les humains se présente sous deux formes principales: le méthylmercure (CH_3Hg^+) issue de la consommation de poisson, éthylmercure ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) qui est un agent conservateur de thimerosal utilisé dans les vaccins. Le mercure organique peut subir une absorption pulmonaire et est bien absorbé par ingestion. Seulement de petites quantités sont absorbées par la peau. Le mercure traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et le placenta, apparaît dans le lait maternel et se concentre dans les reins et le système nerveux central. Le diméthylmercure $2(\text{CH}_3\text{Hg})$ est une forme organique du mercure qui ne se rencontre que dans le laboratoire (Rooney, 2007).

VI.2.1. Toxicocinétique :

VI.2.1.1. Absorption :

Trois voies d'absorption du mercure organique sont possibles (pulmonaire, cutanée et digestive), avec une meilleure absorption des dérivés alkylés à chaîne courte (comme le MeHg). En milieu professionnel, l'absorption est surtout respiratoire et cutanée. L'absorption pulmonaire est de l'ordre de 60 % pour les dérivés alkylés les plus volatils. Très lipophile, il

passer facilement la barrière cutanée. L'exposition au mercure organique est principalement digestive par l'ingestion d'aliments contaminés tel que les poissons, l'absorption digestive du MeHg est de l'ordre 95 % (Lauwerys et al., 2007 ; Bensefa-Colas et al., 2011 ; Bahi, 2015).

VI.2.1.2. Transport et distribution :

Dans la circulation sanguine, le mercure organique se fixe principalement sur les groupements thiols des globules rouges (90 % du mercure organique est intraérythrocytaire) ou forme un complexe hydrosoluble en se fixant sur les groupements thiol d'un ligand (Clarkson, 2007). Très lipophile, le MeHg traverse facilement la barrière hématoencéphalique par le biais d'un transport actif. Les dérivés alkylés se distribuent et s'accumulent préférentiellement dans le cerveau et se concentrent dans les cheveux où ils sont stockés. Dans le système nerveux central (SNC), le mercure se localise préférentiellement dans la substance grise, en particulier les cellules de Purkinje. L'accumulation dans le rein du MeHg est limitée à la différence des ions mercuriques rapidement formés lors de l'exposition à l'éthylmercure (EtHg). L'EtHg diffuse plus lentement dans le cerveau et, à quantité égale, il a une toxicité moindre que celle du MeHg (Bensefa-Colas et al., 2011).

VI.2.1.3. Excrétion :

L'élimination du mercure organique est principalement biliaire. Une partie du MeHg est excrétée par voie biliaire est déméthylée en mercure inorganique par la flore microbienne et une faible partie est réabsorbée. La majeure partie du MeHg est éliminée sous forme déméthylée dans les fèces (Clarkson et al., 2007 ; Bensefa-Colas et al., 2011).

VI.3. Le mercure inorganique :

Le mercure inorganique (Hg^{2+}) se trouve dans plusieurs produits cosmétiques, des produits ménagers et utilisé dans les industries. Il est bien absorbé par ingestion et à travers la peau. Peu de mercure sous forme inorganique traverse la barrière hémato-encéphalique, la plupart sont excrétés dans l'urine ou les fèces, ou sont retenus par les reins. Cependant, le mercure inorganique peut se transformer en une autre forme mercure. Cette dernière peut rester pendant des années au niveau cérébral (Rooney, 2007).

VI.3.1. Toxicocinétique :

VI.3.1.1. Absorption :

La principale voie d'absorption de cette forme de mercure est la voie cutanée. Le taux d'absorption digestive des dérivés inorganiques, tels que le chlorure mercurique, suite à l'ingestion volontaire ou accidentelle peut aller jusqu'à 10 % et peut être à l'origine d'une intoxication aiguë. Le risque d'inhalation de ces dérivés en milieu industriel est faible (**Lauwerys et al., 2007 ; Bensefa-Colas et al., 2011 ; Bahi, 2015**).

VI.3.1.2. Transport et distribution :

Le mercure inorganique se distribue de façon similaire dans tous les organes. L'accumulation des dérivés inorganiques dans le rein et le fœtus est plus faible que le mercure métallique, ce dernier étant plus lipophile. Les ions mercuriques formés se fixent sur les protéines plasmatiques et sont rapidement distribués dans le foie et le rein. Dans le rein, les ions mercuriques sont conjugués à des groupements thiol (-SH) de molécules endogènes pour être ensuite captés par les cellules épithéliales des tubules proximaux et des anses de Henlé, mais peu par les glomérules. Dans les cellules, il s'accumule dans les lysosomes, les mitochondries et les membranes cellulaires. Une partie importante du mercure inorganique se fixe sur une protéine aux propriétés similaires à la métallothionéine (**Bensefa-Colas et al., 2011**).

VI.3.1.3. Excrétion :

Le mercure inorganique est excrété sous forme ionisée ou fixée à des protéines (**Bensefa-Colas et al., 2011**). La principale voie de son élimination est la voie rénale lors d'exposition prolongée, dans une moindre mesure, elle peut être biliaire et plus faible par voie cutanée et salivaire ou dans les phanères (**Lauwerys et al., 2007**)

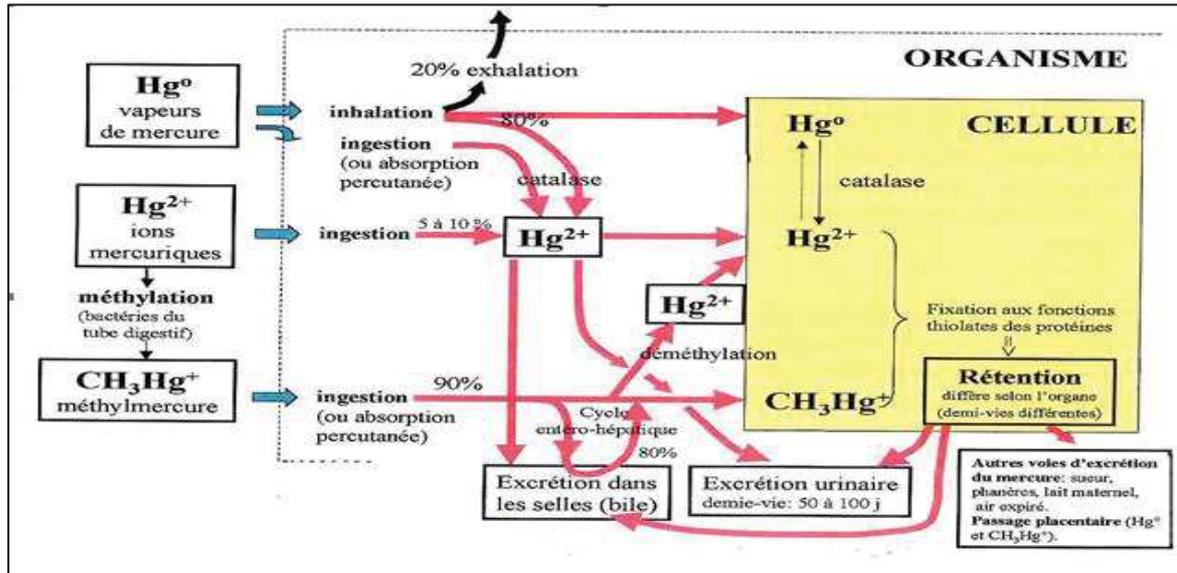


Figure2 : Toxicocinétique du mercure (Jean Jacques Melet, 2000 ; Bahi, 2015).

VII. L'intoxication aigue :

Des expositions aiguës à de fortes concentrations de vapeurs de mercure élémentaire peuvent entraîner la mort chez l'homme par une asphyxie. L'organe cible des vapeurs de mercure est le système nerveux central. Les principaux symptômes consécutifs à une exposition par inhalation de ce dernier sont des convulsions, une diminution de l'activité motrice et des réflexes musculaires, des maux de tête, un électroencéphalogramme anormal et des troubles de la fonction respiratoire. Des cas de réactions allergiques ont été également notés chez certains individus 24 à 48 h après la pose d'un amalgame dentaire (INERIS, 2010).

Pour le mercure inorganique aucune donnée n'est disponible concernant l'effet toxique de cette forme suite à une exposition par voie pulmonaire chez l'homme et la dose létale de chlorure mercurique a été estimée entre 10 et 42 mg de mercure /kg. La mort survenant après une exposition orale au mercure inorganique est la plupart du temps provoquée par un choc hémodynamique, une défaillance cardiovasculaire, une insuffisance rénale ou par des dommages gastro-intestinaux sévères (INERIS, 2010).

Les sels de mercure sont plus corrosifs que le mercure élémentaire, qui améliore la perméabilité et l'absorption gastro-intestinales. L'exposition aigue aux sels mercuriques provoque principalement une brûlure de la poitrine, douleur, décoloration foncée de la muqueuse buccale. Les sels de mercure sont généralement irritants pour la peau. Ils

provoquent une dermatite, une décoloration des ongles et une corrosion des muqueuses et peuvent également causer des brûlures corrosives (**Park et al., 2012**).

Cependant, il est rare d'être exposé aux sels de mercure par inhalation. En raison de leur état généralement solide et non volatil à température ambiante. Concernant l'intoxication par le mercure organique, des cas de décès ont été enregistré chez des employeurs qui ont inhalé des vapeurs d'alkyl mercure (**INERIS, 2010**).

VIII. Intoxication chronique :

L'intoxication chronique mercurielle, ou hydrargyrisme, est classiquement liée à une exposition chronique aux vapeurs de mercure. La plupart des données liées à l'intoxication chronique au mercure métal proviennent d'études épidémiologiques réalisées auprès de salariés d'usines de fabrication du chlore. L'organe cible chez l'homme lors de l'inhalation de vapeurs de mercure est le SNC. Les premières manifestations cliniques lors de l'exposition chronique aux vapeurs de mercure sont peu spécifiques : céphalées, asthénie, troubles de la personnalité et du caractère, troubles de la mémoire et de la concentration, tremblements intentionnels. Lors des expositions chroniques aux dérivés inorganiques du mercure, le rein est l'organe critique. La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de l'intensité et de la durée de l'exposition (**INERIS, 2010 ; Bensefa-Colas et al., 2011**).

IX. Les effets du mercure :

IX.1. Effet sur le système nerveux :

Le cerveau fœtal est plus susceptible aux dommages causés par le mercure que le cerveau adulte. Le mercure méthylique empêche la division et la migration des cellules neuronales et perturbe le développement de la cytoarchitecture du cerveau (**Clarkson et al., 2003**).

Il provoque : une agitation, perte de mémoire, maux de tête, irritabilité, fatigue, confusion, insomnie, labilité d'humeur, erythisme, comportement irrationnel ; faiblesse ; tremblements ; polyneuropathie (**Risher et al., 2005**). Le mercure peut également causer des déficits neurocognitive et incapacités neuromotrice (**Bose-O'Reilly et al., 2010**).

De nombreuses études ont montré que l'exposition à des doses élevées de methyl mercure chez les animaux de laboratoire en stade de développement provoque des déficits de mémorisation et d'apprentissage (**Huang et al., 2011**).

Chez les adultes, les signes et les symptômes d'intoxication au MeHg sont associés à la perte de cellules neuronales dans des régions spécifiques du cerveau, telles que le cortex visuel et le cervelet. Une analyse histopathologique a montré une perte significative de cellules granulaires cérébelleuses avec une préservation relative de la couche cellulaire adjacente de Purkinje. La relation entre le déficit moteur induit par le MeHg et les lésions cérébelleuses est en fait un phénomène bien décrit. Plusieurs études ont montré que l'exposition au MeHg pouvait entraîner des déficits comportementaux liés à l'activité locomotrice et à la performance motrice chez des souris adultes. Les études expérimentales menées ont contribué à la compréhension actuelle des événements responsables de la neurotoxicité induite par le MeHg (**Dos Santos et al., 2016**). Perturbation de l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) ou l'induction du stress oxydatif via la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou la réduction des défenses antioxydantes sont probablement des facteurs critiques dans les dommages cellulaires induits par le MeHg, tout comme les interactions avec les groupes sulfhydryl (-SH). La forte affinité du MeHg pour les groupes -SH sur les acides aminés cystéine et méthionine peut altérer la structure d'un grand nombre de protéines et entraîner la rupture de diverses fonctions intracellulaires (**Dos Santos et al., 2016**).

IX.2. Effet sur la fonction rénale :

Les composés inorganiques du mercure sont néphrotoxiques et peuvent provoquer des lésions rénales chez les enfants. La cible principale dans les reins est les tubules proximaux. Dans une certaine mesure, les cellules tubulaires peuvent se régénérer. Cependant, dans les cas graves d'intoxication par le mercure inorganique, la fonction rénale peut être limitée et la mort peut survenir en raison d'une insuffisance rénale aiguë (**Bose-O'Reilly et al., 2010**).

IX.3. Effet sur l'appareil cardiovasculaire :

Une altération de la fonction cardiaque a été décrite chez des enfants associés à l'exposition au méthylmercure dans les fruits de mer. L'association de l'exposition au méthylmercure et des effets cardiaques étaient remarquables avec diminution de modulation de la variabilité de la fréquence cardiaque (**Bose-O'Reilly et al., 2010**). L'exposition des rats à des niveaux élevés de mercure a entraîné une augmentation de la vasoconstriction et une relaxation réduite dans les aortes de rat (**Azevedo et al., 2016**).

IX.4. Effet mutagène :

Le mercure semble avoir un faible potentiel mutagène. Le thimérosal induit des échanges significatifs de chromatides sœurs, indiquant un effet génotoxique et cytotoxique (**Bose-O'Reilly et al., 2010**). In vivo, le mercure est mutagène et accroît la fréquence des aberrations chromosomiques dans les cellules de moelle osseuse de hamster (**Falcy et al., 2014**).

IX.5. Effet concérogène :

Les études de mortalité, menées à partir des populations de Minamata au Japon, fortement exposées au MeHg, montrent une augmentation de la mortalité par cancer du foie et de l'oesophage, ainsi qu'un risque accru d'hépatopathie chronique et de cirrhose (**Bensefa-Colas et al., 2011**).

IX.6. Effet sur la fonction hépatique :

Le foie est le principal site de métabolisme du mercure. Les ions mercuriques (Hg +2) s'accumule dans le foie provoquant une lésion hépatocellulaire avec stress oxydatif, une surproduction d'espèces d'oxygène, une dépolarisation des mitochondries entraînant une déplétion en ATP, la formation de vacuoles intracellulaires et la mort cellulaire. De plus, HgCl₂ a causé des lésions histopathologiques et des lésions ultrastructurales du foie dues à la dégénérescence des acides gras et à la nécrose cellulaire (**Hazelhoff et al., 2018**).

L'aromathérapie :

I. Généralité :

L'aromathérapie est une science naturelle fascinante et complexe dont l'origine remonte à des milliers d'années. Elle s'inspire des traditions médicales populaires des Egyptiens, des Perses, des Chinois, des Hindous et des Grecs (**Fabrocini, 1999**).

Le terme aromathérapie vient du grec aroma, qui signifie odeur, et de therapia, qui signifie soin (**Couic-Marinier et al., 2013**).

C'est une des croissances les plus rapides des branches complémentaires à la médecine dont elle peut fournir un service médical complémentaire ou alternatif utile dans les milieux de soins de santé et en pratique privée, par exemple dans le traitement du cancer, la démence et de la dépression (**Steflitsch et al., 2008**).

Depuis l'antiquité un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent l'application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétique et agriculture grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : flavonoïdes, hétérosides, alcaloïdes, saponosides, quinones, vitamines et huiles essentielles (**Fyad et al., 2013**).

Au début du XX^e siècle, les travaux des professeurs Gattefossé et Sevelinge démontrent le parallèle entre les propriétés physicochimiques et les « actions » étonnantes et rapides des huiles essentielles sur les maladies et la santé. Leur rapidité d'action et leur efficacité sont maintenant prouvées. Elles sont particulièrement efficaces dans les thérapies, les techniques de soin, le traitement et la prévention des maladies et bien sûr, elles participent au maintien de la bonne santé (**Grosjean, 2013**).

Les plantes aromatiques ont été utilisés dans des milliers des années dans toutes les parties du monde par de nombreuses civilisations qui, entraînées par leur intuition et leur sens de l'observation, étaient en mesure de trouver des réponses à leurs problèmes de santé dans l'environnement de la plante. Le manque de compréhension des mécanismes biochimiques, l'action d'une substance n'a jamais été un obstacle à son utilisation efficace (**Steflitsch et al., 2008**).

Récemment il y a eu un intérêt remplacé en améliorant la santé et la forme physique par l'utilisation des produits plus naturels. Les herbes et les épices sont une part importante du

régime humain. Elles ont été employées des milliers d'années afin d'augmenter la saveur, la couleur et l'arôme de la nourriture (**Chaudhry et al., 2006**).

II. Les huiles essentielles (HE) :

Une huile essentielle est en général un mélange de substances naturelles volatiles odorantes, obtenues à partir d'une matière végétale botaniquement définies par trois procédés : entraînement à la vapeur d'eau, distillation sèche et procédé mécanique approprié sans chauffage à partir de la biomasse végétale. Les huiles essentielles sont fabriquées à partir de molécules aromatiques naturelles, sont douées de tant de propriétés pharmacologiques et physiologiques. Elles se caractérisent par leurs odeurs, leurs goûts, leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Elles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives. Ces essences ont une fonction primordiale non seulement pour la plante, mais aussi pour l'environnement.

L'HE trouvent des applications dans presque tous les domaines de la médecine, non seulement curatif, mais aussi d'un point de vue de médecine préventive (**Steflitsch et al., 2008 ; Kaloustian et al., 2013 ; Fyad et al., 2013**).

II.1. Le mécanisme d'action des huiles essentielles :

Une étude sur les usages des parfums et des huiles essentielles comme médicaments était réalisée par **Buchbauer et Jirovetz, 1994** qui ont suggéré que les huiles volatiles, soit inhalées ou appliquées sur la peau, agissent par leur fraction lipophile réagissant avec la partie lipidique des membranes cellulaires, et par conséquent, modifier l'activité des canaux ioniques de calcium. À certaines doses, les huiles volatiles saturer les membranes et montrent des effets similaires à ceux des anesthésiques locaux. Elles peuvent interagir avec les membranes cellulaires par leurs propriétés physiochimiques et leurs formes moléculaires. Comme elles peuvent aussi influencer sur les enzymes, les transporteurs, les canaux ioniques et les récepteurs des membranes. Les auteurs décrivent diverses études concernant les effets physiologiques sur l'homme. Celles-ci incluent la stimulation cérébrale, la sédation anti-anxiété et les activités antidépressives, ainsi que l'augmentation du débit sanguin cérébral. Les études décrivent les effets des odeurs sur la cognition, la mémoire et l'humeur. Les composés de parfum sont absorbés par inhalation et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et interagir avec récepteurs dans le système nerveux central (**Svoboda et al., 1999**).

II.2. Les facteurs déterminant la qualité d'une huile :

Plusieurs facteurs interviennent dans la détermination de la qualité des huiles essentielles et sont cités comme suit : la garantie de la reconnaissance botanique, l'organe producteur d'huile, le chémotype ou chimiotype de la plante et le mode de culture (**Couic-Marinier et al., 2013**).

II.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

II.3.1. L'état physique :

À température ambiante, les HE sont liquides, hormis quelques cas particuliers : les HE de myrrhe et de santal sont visqueuses et celles de rose et de camphrier peuvent être cristallisées.

À basse température, certaines HE cristallisent : celles d'anis, de menthe des champs ou de thym saturéioïde lorsque les flacons sont stockés au réfrigérateur. Les HE sont volatiles. Cette volatilité explique leur caractère odorant ainsi que leur mode d'obtention par entraînement à la vapeur d'eau (**Couic-Marinier et al., 2013 ; Poirot, 2016**).

II.3.2. La solubilité :

Les HE sont très solubles dans les huiles grasses, les lipides, l'éther, la plupart des solvants organiques aussi que dans l'alcool et ne se dissolvent pas dans l'eau (**Couic-Marinier et al., 2013**). Leur liposolubilité est considérée comme une propriété intéressante en leur donnant la faculté d'être bien absorbé par la peau (**Fabrocini, 1999**).

II.3.3. La couleur :

La plupart d'entre elles sont colorées :bleu clair pour les HE de patchouli et de camomille matricaire, bleu foncé pour l'HE de tanaïsie , rougeâtre pour les HE de cannelle et une variété de thym, rouge sang pour l'HE de certaines sarriettes, orange pour l'HE de sarriette des montagnes, rose pour l'HE de gaulthérie odorante, vert pâle pour les HE de bergamote et d'absinthe ,vert foncé pour l'HE de mandarine verte, jaune pâle pour les HE de sauge sclarée et de romarin officinal (**Couic-Marinier et al., 2013**).

II.3.4. Les HE sont altérables, sensibles à l'oxydation :

Elles ont, en effet, tendance à se polymériser pour former des produits résineux. Leur conservation nécessite de l'obscurité (flacons en verre opaque) et de l'humidité (**Couic-Marinier et al., 2013**).

II.4. La partie de la plante utilisée :

Les huiles essentielles se trouvent dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et leur stockage (**Kaloustian et al., 2013**). Elles peuvent être extraites de différentes parties de la plante tel que : l'écorce, les graines, les feuilles, les fleurs et les racines (**Degryse et al., 2008**).

II.5. Toxicité des huiles essentielles :

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité et cela varie en fonction de la voie d'exposition et la dose prise. Elles ne semblent pas être toxiques par ingestion ou par voie cutanée que si elles sont prises en grandes quantités ou des concentrations importantes sont appliquées. Par ailleurs, l'inhalation des composés émis par les huiles essentielles représente un danger mal connu et cela invite l'homme à la prudence (**Degryse et al., 2008**).

II.6. Les méthodes d'obtentions des huiles essentielles :

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (**Lardry et al., 2007**).

II.6.1. La distillation à la vapeur d'eau :

C'est le processus le plus répandu parce qu'il convient à la majorité des plantes : les végétaux sont déposés sur une grille à travers laquelle circule de la vapeur d'eau. Celle-ci entraîne avec elle des molécules parfumées extraites des plantes. La solution obtenue circule dans un serpentin ou elle se condense en se refroidissant. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau. Elle reste en surface. On obtient ainsi deux phases non miscibles que l'on peut séparer par décantation (**Degryse et al., 2008**).

II.6.2. L'expression à froid ou expression mécanique :

Ce mode d'obtention particulièrement est réalisé uniquement pour les agrumes du genre Citrus. Les poches sécrétrices d'huile essentielle se trouvent dans le péricarpe (la peau colorée des fruits ou zeste). Les fruits entiers sont lavés au départ, sont soumis à une action abrasive sur la peau grâce à des râpes ou des micro-pics métalliques (picots) de manière à faire éclater les cellules contenant l'huile essentielle. La pulpe est récupérée ; elle est constituée par des déchets solides et un liquide hétérogène constitué par une phase aqueuse et une phase hydrophobe non miscible (l'huile essentielle). Après centrifugation, les déchets solides sont éliminés, la phase liquide est récupérée. L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid. Les industries agro-alimentaire récupèrent successivement le jus de fruit et l'huile essentielle pour des applications différentes (**Degryse et al., 2008 ; Kaloustian et al., 2013**).

II.6.3. Distillation à sèche :

Cette distillation est réalisée particulièrement sur le bois ou les écorces. Elle n'utilise pas l'eau ou la vapeur d'eau ajoutée au végétal, contrairement à l'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation. La distillation à sèche conduit à un distillat ayant souvent l'apparence d'un goudron (liquide visqueux noirâtre). Ce mode de distillation est très peu utilisé. Des critiques sur l'éventuelle cancérogénicité de ce goudron ont conduit les industriels à raffiner l'huile, par des distillations fractionnées, afin d'éliminer les produits toxiques (**Kaloustian et al., 2013**).

III. Les extraits :

Dans le cas des extraits, Les plantes sont épuisées, soit par une solution aqueuse, soit par un solvant organique. Le solvant est ensuite distillé laissant la place à un extrait. Cette dernière méthode est utile lorsque les huiles essentielles présentent une densité voisine de celle de l'eau. Selon la nature physique de l'échantillon de départ, les extractions solide-liquide et liquide-liquide seront envisagées (**Kaloustian et al., 2013**).

III.1. Les méthodes d'obtention des extraits :

La tisane, que ce soit infusion, décoction ou macération, est un procédé d'extraction de constituants actifs des plantes médicinales. Le mot tisane vient du grec ptisané qui désignait orge mondé, puis tisane d'orge. L'utilisation de la plante en tisane est retrouvée parmi les

méthodes les plus anciennes à côté des fumigations, des inhalations de vapeur, de l'application d'une solution sur le corps. L'eau chaude permet ainsi de récupérer certains constituants actifs hydrosolubles (Goetz, 2004 ;Benzeggouta, 2014).

III.1.1. Extraction solide-liquide (soxhlet):

La méthode d'extraction en discontinu consiste à mettre l'échantillon solide, sous une forme très finement divisée, en présence du solvant à température ambiante ou à la température d'ébullition du solvant, pendant un temps plus ou moins long, et sous agitation. Le principal inconvénient est qu'il faut, à la fin de l'essai, séparer les parties solide et liquide, soit par centrifugation, soit par filtration (Kaloustian et al., 2013).

III.1.2. Extraction liquide-liquide

Ce type d'extraction est peu utilisé car l'échantillon de plante est toujours sous forme solide. Le principal intérêt sera de purifier les composés respectivement en solution organique ou aqueuse, en utilisant des solvants antagonistes : l'eau pour le premier cas ou un solvant organique hydrophobe pour le deuxième cas (Kaloustian et al., 2013).

III.1.3. Extraction hydroalcoolique :

Cette technique est réalisée de plus en plus pour l'obtention de matières premières d'origine végétale destinées à l'industrie de cosmétique. L'eau pure n'étant pas un bon solvant des terpènes, les industriels lui rajoutent des solvants organiques appropriés (alcools, diols ou polyols) pour améliorer le rendement d'extraction (Kaloustian et al., 2013).

III.1.4. Extraction par un solvant organique :

La plante est utilisée sous une forme divisée : hachée, concassée ou réduite en copeaux, ou en poudre dans le cas de plantes séchées. Le choix du solvant dépend des paramètres techniques et économiques ainsi que de sa toxicité (Kaloustian et al., 2013).

Un solvant polaire extraira plus facilement des molécules présentant un caractère polaire important (fonctions chimiques : alcools, aldéhydes, cétones). En revanche, un solvant apolaire favorise l'extraction de molécules peu polaires (carbures cycliques et acycliques). Les solvants à bas point d'ébullition (éther de pétrole, hexane, solvants chlorés, propane et butane sous pression) sont souvent recommandés. L'aspect économique intervient par le prix du solvant d'extraction, mais également par la présence de solvant résiduaire dans l'extrait

final, qu'il faudra être éliminer pour éviter, l'odeur désagréable du produit final et sa toxicité lorsque le produit est destiné à la pharmacie ou à l'industrie agroalimentaire (**Kaloustian et al., 2013**).

III.1.5. L'enfleurage ou macération :

C'est une ancienne méthode utilisée uniquement pour les fleurs fragiles comme le jasmin. Les parfums sont extraits par contact avec une matière grasse qui est ensuite lavé à l'alcool pure. (**Degryse et al., 2008**). Elle consiste à mettre une plante ou partie de plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction de plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain des sables, leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une gélatinisation s'ils se préparent dans de l'eau bouillante. Egalement utilisée pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (**Kraft et Hobbs, 2004**). Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition (**Baba-Aïssa, 2000 ;Benzeggouta, 2014**).

III.1.6. Infusion :

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinaux. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes : feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (**Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004 ; Benzeggouta, 2014**).

III.1.7. Décoction :

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinaux (**Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004 ; Benzeggouta,2014**).

IV. Méthodes d'identifications :

IV.1. La chromatographie en phase gazeuse CPG :

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse des huiles essentielles et la recherche de l'arôme (**Maurya et al., 2013**). Elle permet de séparer des mélanges de composés volatiles ou susceptibles d'être évaporés. Elle est constituée de trois principales parties.

- L'injecteur : l'échantillon est introduit avec une micro seringue, à travers un septum en élastomère, dans la chambre de vaporisation. L'injecteur a une double fonction : il porte l'échantillon à l'état de vapeur, puis il l'amène dans le flux gazeux en tête de colonne.

- La colonne : elle est placée dans une enceinte à température régulée. Elle se présente sous la forme d'un tube de silice, enroulée sur lui-même et de longueur allant de 1 à plus de 60 m. Entraînés par un gaz vecteur inerte, les analytes étudiés sont séparés en fonction de leur capacité d'interaction avec la phase stationnaire.

- Le détecteur : il s'agit du module qui va permettre de détecter voire d'identifier les composés en sortie de colonne (**INSA, 2015**).

La séparation des composants par CPG s'effectue rapidement et ne nécessite qu'une très faible quantité d'échantillon (**Maurya et al., 2013**).

IV.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

C'est une technique utile pour les huiles essentielles, qui sont thermiquement instables, et ne survivent pas à la haute température de GC (**Maurya et al., 2013**).

Les phénomènes physiques mis en jeu sont : partage, échange d'ions, exclusion-diffusion, adsorption. Le phénomène de partage interviendra dans le cas des huiles essentielles et des extraits végétaux. Les solutés d'un mélange, principalement ceux non volatilisables, présentent une distribution différente entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire liquide ou solide. La technique peut être simple, rapide et éventuellement sélective (**Kaloustian et al., 2013**).

V. Les principaux constituants actifs dans la plante :

V.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils jouent un rôle vital dans la photosynthèse des cellules, ce sont des métabolites secondaires caractérisés par le noyau flavan et le squelette carboné. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales telles que antioxydants, anti-inflammatoires, antivirales et des effets protecteurs sur le foie (Sandhar et al., 2011).

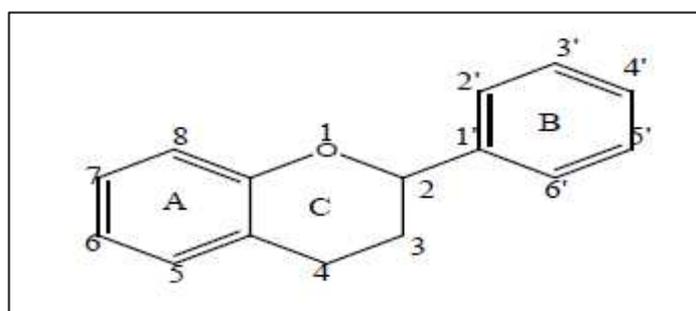


Figure 3: Structure chimique des flavonoïdes (Sandhar et al., 2011)

V.2. Les tanins :

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Iserin, 2001).

V.3. Les anthocyanes :

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanides, qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleue, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux (Iserin, 2001).

V.4. Les anthraquinones :

Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné et la rhubarbe de Chine qui, toutes deux, agissent sur la constipation. Elles ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales (Iserin, 2001).

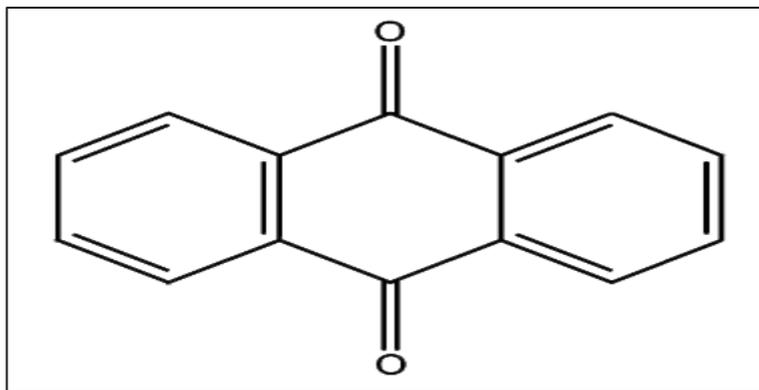


Figure 4 : Structure chimique des anthraquinones (Kaloustian et al., 2013)

V.5. Les coumarines :

Les coumarines se trouvent dans de nombreuses espèces végétales, ils existent plusieurs types de coumarines et possèdent des propriétés tel que, la contribution à la fluidité du sang, le soin des affections cutanées ainsi que la vasodilatation. (Iserin, 2001)

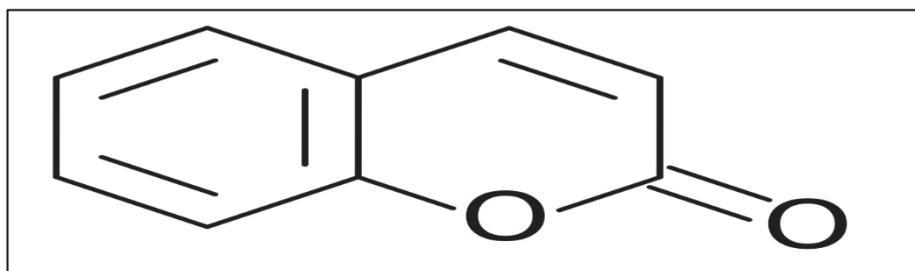


Figure 5 : La structure des coumarines. (Kaloustian et al., 2013)

V.6. Les saponines :

Les saponines sont des principaux constituants de nombreuses plantes médicinales. Elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpenoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un

effet sur l'activité hormonale. Les saponines terpenoïdes ont une activité hormonale moindre, elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (**Iserin, 2001**).

V.7. Les alcaloïdes :

Ils forment un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains d'entre eux sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées tandis que d'autres ont une action directe sur le corps : activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (**Iserin, 2001**).

V.8. Les polysaccharides :

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages « visqueux » et les gommes présents dans les racines, les feuilles et les graines. Ces deux derniers absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés (**Iserin, 2001**).

***Pimpinella anisum* :**

I. Généralité :

Pimpinella anisum est une plante appartenant à la famille des apiaceae et l'une des plus anciennes plantes médicinales. C'est une plante herbacée annuelle avec une hauteur de 30 à 50 cm. Les feuilles de la base sont de couleur vertes, larges et de forme arrondie ou lobée tandis que les feuilles qui sont vers le sommet sont découpées en lanières. Des fleurs blanchâtres disposées en ombelles apparaissent en été, donnant des fruits qui sont représentés par des graines d'environ 0,5 cm. Elles sont ovales, pédiculées, allongées et de couleur vert –grisâtre.

Elle pousse dans l'Est de la région Méditerranéenne, Asie de l'Ouest, le Moyen-Orient, l'Iran, la Turquie, au Mexique, Egypte et en Espagne. *P. anisum* est principalement cultivée pour son fruit (aniseed) qui est récolté aux mois d'août et septembre. Aniseed contient de 1,5-5% d'huile essentielle, qui a plusieurs effets à savoir ; digestif, antiparasitique, antibactérien, antifongique, antipyrétique ainsi que l'effet de relaxant musculaire et convulsivant (**Simsek et al., 2007 ; Yamini et al., 2008 ; Shojaii et al., 2012 ; Bekara et al., 2016**).



Figure 6 : Fleurs et le fruit de *Pimpinella anisum* L

II. Classification botanique :

Tableau 2 : Classification de *P.anisum* (Teuscher et al., 2005 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Julve, 2015)

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i> (Ombellifères)
Genre	<i>Pimpinella</i>
Nom binominal	<i>Pimpinella anisum L.</i>

III. Composition chimique :

Les études chimiques ont montré que les composants essentiels de l'huile volatile de l'anis sont :trans-anéthole, estragole, γ -himachalene, anisaldéhyde, coumarine, Scopolétole, ombelliférone, estrol, terpene,polyene, poly acétylène (Davoody et al., 2012 ; Gamberini et al., 2015).

L'analyse d'huile essentielle des fruits de *Pimpinella l'anisum L.* par la chromatographie en phase gazeuse GC-SM a montré que la teneur en trans-anethole est de 93,9%, de l'estragole 2,4%. D'autres composés qui ont été trouvés avec la concentration plus haute que 0,06% sont :methyleugenol, α -cuparene, himachalene, β -bisabolene, p-anisaldehyde, et cis-anethole. Dans une autre étude pour la détermination de composition d'huile essentielle des fruits obtenus à partir de différentes régions géographiques de l'Europe, en plus des composants principaux (le trans-anethole (76.9-93.7%) et le himachalene de γ - (0.4-8.2%), quelques autres composés tels que le methylbutyrate le trans-pseudoisoeugenyl 2, le p-anisaldehyde et le methylchavicol ont été également identifiés dans huile essentielle (Shojaii et al., 2012).

Tableau3 : la composition de l'huile de l'anis obtenue par hydrodistillation (EMEA, 2008)

Le composant :	Pourcentage
Trans-anethole	76.7-93.0%
Estragole	0.5-6.1%
Anisaldehyde	0.1-3.5%
Linalol	0.1-1.5%
Alpha-terpineol	0.1-1.5%
Cis-anethole	<0.5%

IV. Pharmacocinétique :

Après l'administration orale de trans-anéthol radioactivement marqué, il a été rapidement absorbé. 54-69% de la dose a été éliminée dans l'urine. La majeure partie de l'élimination a eu lieu dans les 8 heures et, quel que soit le niveau d'exposition, le principal métabolite d'élimination est par voie urinaire. Le trans-anéthol, est métabolisé en partie à l'acide 4-méthoxybenzoïque métabolite inactif (EMEA, 2008).

V. Les effets de *pimpinella anisum* :

V.1.Effet gastro-intestinal :

Une étude a été réalisée en utilisant des agents nécrotiques induisant des ulcères gastriques. Le traitement par l'extrait aqueux d'anis a permis l'inhibition des lésions ulcéreuses en diminuant les sécrétions gastriques chez des rats exposés aux agents nécrotiques, ce qui a été confirmé par une étude histologique qui a montré une suppression des sites inflammatoires, des dommages ainsi que des ulcères dysplasiques (Al Mofleh et al., 2007 ; Shojaii et al., 2012). Elle est aussi considérée comme un traitement des nausées (Shojaii et al., 2012).

V.2.Effet broncho-dilatateur :

L'activité des espèces de *Pimpinella* est avérée avoir un effet relaxant sur les muscles isolés trachéales de cobaye. L'effet contractile de l'anéthol sur le muscle lisse iléal de cobaye a été démontré par (Reiter et Brandt, 1985). Dans une autre étude réalisée par (Albuquerque et al., 1995), l'effet relaxant de l'anéthol était représenté sur le muscle squelettique. Boskabady

et **Ramazani-Assari, 2004** ont étudié les mécanismes responsables de l'activité bronchodilatatrice de *P. anisum*, en évaluant l'effet inhibiteur de cette plante sur la contraction des chaînes trachéales de cochon de l'Inde. Selon ce rapport, l'effet inhibiteur de l'extrait d'éthanolique sur les canaux calciques peut contribuer à son effet bronchodilatateur sur les chaînes trachéales. Les chercheurs ont également suggéré l'ouverture du canal potassique sous l'effet de cette plante, qui peut contribuer à son effet relaxant sur le tissu cible. Comme il a aussi été montré que l'effet relaxant de l'extrait de cette plante est dû à son effet inhibiteur aux récepteurs muscariniques (**Tepe et al., 2015**).

V.3.Effet antidiabétique :

L'huile de *P. anisum* a amélioré significativement l'absorption de glucose au niveau du jéjunum de rat et a augmenté l'activité de la pompe Na^+ , K^+ ATPase dans un homogénat jéjunale d'une manière dépendante de la dose (**Kreydiyyeh et al., 2003**). Selon ce rapport, l'huile de *P.anisum* a augmenté l'absorption de glucose en augmentant l'activité de la pompe Na^+ , K^+ ATPase et par conséquent le gradient de sodium nécessaire pour le transport de glucose (**Shojaii et al., 2012 ; Tepe et al., 2015**).

V.4.Effet antifongique :

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'anis sur des isolats cliniques des champignons et des dermatophytes a été testée in vitro. L'huile essentielle d'anis a montré une activité antifongique puissante contre tous les champignons étudiés ainsi que l'inhibition de la croissance des dermatophytes à des basses concentrations. L'activité antifongique peut être un résultat de la synergie des composants d'huile essentielle (trans-anéthol, anisaldéhyde, estragole, anisketone) (**Kosalec et al., 2005**).

V.5.Effet antioxydant :

L'extrait d'anis a montré une forte activité antioxydante. Les activités antioxydantes ont été évalué par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, piégeage des radicaux libres 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), réduction puissante Fe^{3+} ainsi que des divers essais de peroxydation lipidique (**Shojaii et al., 2012**).

V.6. Effet oestrogénique :

Au cours des dernières années, les scientifiques se sont concentrés sur l'exploration de nouveaux composés d'origine végétale, appelés phytoestrogènes, ayant une capacité oestrogénique in vitro et in vivo (Dhar, 1995 ; Diel et al., 1999 ; Howes et al., 2002). L'huile essentielle de *Pimpinella anisum* a pu avoir l'effet oestrogénique et cela est due au plusieurs constituants de son huile et non pas uniquement l'anéthol (Tepe et al., 2015).

V.7.Effet sur le neuro-comportement :

L'extrait aqueux de *P.anisum* joue un rôle dans la régulation de l'activité locomotrice. Cet effet peut être dû à l'activation des récepteurs GABA. Comme il a été démontré que l'huile de graine d'anis exerce ses effets sur les récepteurs opioïdes via l'activation des récepteurs de GABA chez les souris. Ainsi que son pouvoir à améliorer l'activité de la pompe Na⁺, K⁺ ATP ase qui exerce un rôle important dans la régulation de l'excitabilité neuronale (Bekara et al., 2015).

V.8.Effet sur le système nerveux :

Vue la teneur de l'extrait aqueux de *P.anisum* en molécules bioactives ainsi que son pouvoir antioxydant, l'extrait a eu un effet bénéfique sur les dommages biochimiques et histologiques au niveau du cerveau induite par une exposition au plomb. Une certaine amélioration dans la structure générale des cellules suite à la thérapie.

L'observation microscopique au niveau du cervelet a montré une correction des dommages et des lésions induites par l'intoxication (Bekara et al., 2016).

L'extrait de *P.anisum* peut être utile dans le traitement des maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer, car il présente un effet inhibiteur de la cholinestérase, en interagissant avec le système cholinergique centrale pour améliorer la mémoire et les déficits cognitifs des patients en diminuant la dégradation de l'acétylcholine dans la fente synaptique au niveau du cerveau (Menichini et al., 2009).

VI. Toxicité :

VI.1. Toxicité aigüe :

La dose létale (DL50) de l'huile d'anis administré par voie oral a été rapporté pour les êtres humains d'être entre 50 et 500 mg / kg de poids corporel. La DL50 déterminé de l'huile essentielle est de 2,7 g/ kg de poids corporel chez les rats administrée par voie orale. Pour la voie intrapéritonéale, la DL50 de trans-anéthol varie entre 0.65 et 1.41 g / kg chez la souris et de 0,9 à 2,67 g / kg chez le rat (EMEA, 2008).

VI.2. Toxicité subchronique :

Dans des expériences réalisées sur les rats pendant 90 jours, l'administration de 0,1% de trans-anéthol dans le régime alimentaire n'a pas induit des effets toxiques alors que l'administration des doses qui varie entre 0,3 et 3,0% ont provoqué un œdème au niveau du foie. Des rats mâles recevant 0,25% d'anéthol dans leur régime alimentaire pendant un an n'a pas montré d'effets toxiques, alors que ceux recevant 1% anéthol pendant 15 semaines a eu de légères modifications œdémateux dans les cellules du foie (EMEA, 2008).

L'huile essentielle d'anis absorbée par voie orale peut entraîner une dépression du système nerveux central à type d'hypnotique faible et anticonvulsivant due à sa concentration en trans-anéthole. L'isomère cis ou (Z) de l'anéthole est neurotoxique. La dose maximale journalière recommandée par voie orale est de 2,5 mg/kg. Chez l'animal, l'absorption de fortes doses d'estragole, provoque une hépatotoxicité et/ou une hépatocarcinogénèse. Cependant, la concentration de l'anis en estragole reste faible et ces effets n'ont été observé que chez l'animal et sont quasi-inexistants chez l'homme si les posologies sont respectées. L'anis peut entraîner des réactions allergiques occasionnelles de la peau, des voies respiratoires et du tractus gastro-intestinal (Fillat, 2012).

Matériels et Méthodes

I. Objectif :

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet prophylactique de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de l'anis vert chez les jeunes rats wistar suite à une exposition subchronique au chlorure de mercure en période de gestation et lactation, à travers une étude neurocomportementale, biochimique, hématologique et histologique.

II. Le matériel végétal :

La plante avec laquelle nous avons réalisé ce travail est *Pimpinella anisum* (l'anis vert). La partie utilisée de cette dernière est le fruit (les graines). La matière végétale a été achetée d'une épicerie de la ville de Saida (wilaya de Saida). Ensuite, nous avons effectué l'extraction de l'huile essentielle et la préparation de l'extrait aqueux. Enfin, l'identification des composants de l'huile essentielle par une analyse qualitative et quantitative, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM)

II.1. L'extraction de l'huile essentielle :

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation, 50g de graine ont été mis dans 500 ml d'eau distillé (Kahloula et al., 2013). L'ensemble est porté à l'ébullition. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le réfrigérant, qu'est fixé par un support approprié en position inclinée pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ quatre heures. A la fin de l'extraction le distillat est décanté dans une ampoule en ajoutant du chlorure de sodium afin de séparer l'huile de l'hydrolat.



Figure 7 : Montage d'hydrodistillation

II.1.1. Calcul de rendement :

Rendement de l'huile essentielle :

$$R (\%) = (m_{HE}/m_{MV}) \times 100$$

Avec :

m_{HE} : masse de l'huile essentielle obtenue.

m_{MV} : masse de la matière végétale utilisée.

II.2. Préparation de l'extrait aqueux :

L'extrait aqueux a été obtenu par décoction. Nous avons mis 100 g des graines broyées dans 1000 ml d'eau distillée, ainsi le tout est mis à l'ébullition avec une agitation continue pendant 15 minutes (**Hosseinzadeh et al., 2013**). Le mélange est ensuite filtré par le papier whatman n°1 et l'extrait obtenu est lyophilisé par la suite.

II.2.1. Calcul de rendement :

Rendement de l'extrait aqueux :

$$R(\%) = \left(\frac{M_{ext}}{M_{éch}} \right) \times 100$$

Avec :

R : le rendement

M_{ext} : la masse de l'extrait à l'état sec

$M_{éch}$: la masse de l'échantillon végétal

II.3. La chromatographie en phase gazeuse couplés à la spectroscopie de masse (CPG/SM):

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique couramment utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques. Elle consiste à séparer les composés d'un mélange en fonction des vitesses d'entraînement à travers une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile gazeuse (gaz vecteur) (**Arpino et al., 1995**). La possibilité de coupler les chromatographes à divers spectromètres augmente

considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues. En CPG/SM, la comparaison informatique des spectres d'un pic inconnu avec une ou plusieurs références permet son identification (Bruneton, 1995).

II.3.1. Mode opératoire :

Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par CPG/SM. L'analyse a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse du type Varian Saturn 2200 couplée à un spectromètre de masse Varian 2100 T, en utilisant le logiciel Saturn Varian (Version 6, 9, 1). La colonne capillaire était apolaire de 30m de longueur, de 0,25 mm de diamètre et de 0,25 μm d'épaisseur. Le débit du gaz porteur (hélium) était 1 ml/min. 1 μl d'huile essentielle a été injecté, en utilisant le mode split (1/20). La température de la colonne a été maintenue à 50°C pendant 5 min, puis montée de 5°C/min jusqu'à 300°C (5min). Le détecteur était à l'ionisation de flamme (FID). L'énergie d'ionisation était 70électron-volts (eV).

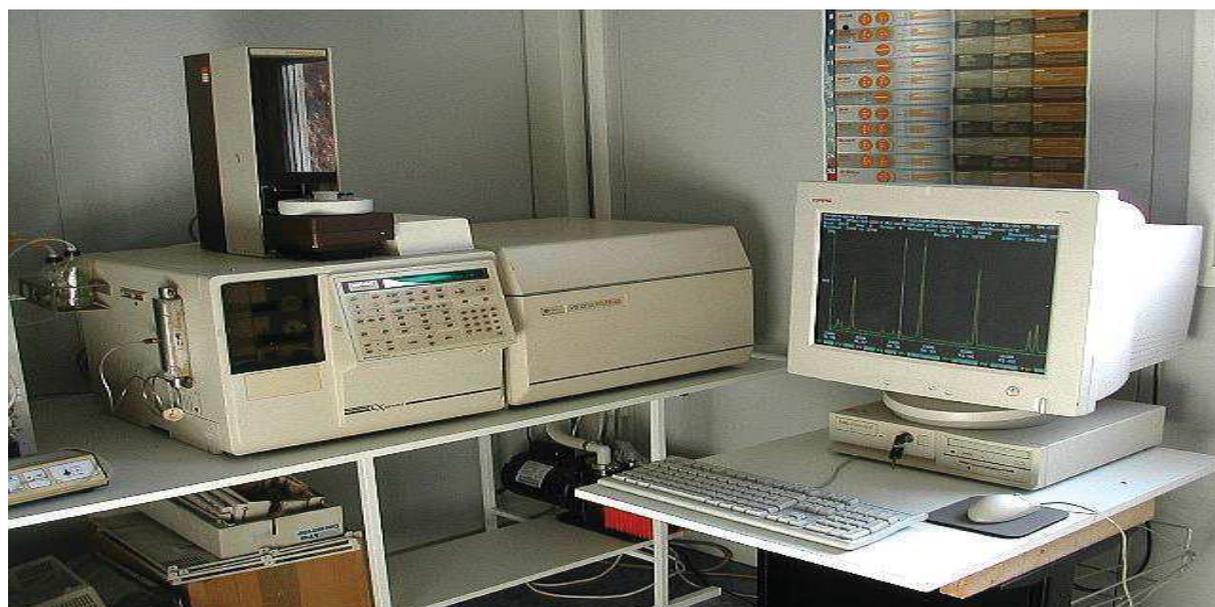


Figure 8 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

II.4. Le screening phytochimique :

Dans le cadre de la recherche des molécules bioactives (métabolites secondaires) qui entre dans la composition de l'anis vert et qui sont responsables des effets biologiques, nous avons réalisé une étude qualitative qui est le screening phytochimique. Les tests réalisés sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

II.4.1. Les différentes classes recherchées :

II.4.1.1. Les tannins :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée (1%). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins catéchiques (Aiyegoro et Okoh, 2010).

II.5.1.2. Les flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence, si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

II.4.1.3. Les anthocyanes :

Un volume de 2 ml d'infusé est additionné à 2 ml de HCl_2N . L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debray et al., 1971).

II.4.1.4. Les coumarines

Une masse de 1gramme de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (Rizk, 1982).

II.4.1.5. Les alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H_2SO_4 dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Paris et al., 1969).

II.4.1.6. Stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

► Essai 1 : Test pour les stérols et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21 °C) (**Trease et Evans, 1987**).

► Essai 2 : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydre acétique/ chloroforme (5/5 : V/V); puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (**Trease et Evans, 1987**).

II.4.1.7. Les saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 gr de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2 jusqu'à 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10ème tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

I= Hauteur de mousse (en cm) dans le 10ème tube x 5 / 0,0 X

X : c'est la hauteur de la mousse

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).

II.4.1.8. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

II.4.1.9. L'amidon

On chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (**Bruneton, 1999 ; Kholkhal, 2014**).

III. Animaux d'expérimentation :

Les expériences sont réalisées sur des rats, albinos, de souche wistar. Ils sont disposés dans une animalerie ventilée, à une température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un éclairage artificiel établit un cycle jour/nuit. Les animaux étaient répartis dans des cages, en raison de 2 femelles et un male par cage, les femelles avaient un poids moyen de $195\text{gr} \pm 0,012$. Les rats ont été divisés en six groupes : témoin, intoxiqué, témoin traité avec l'huile essentielle (HEA), intoxiqué traité avec l'huile essentielle (HEA), témoin traité avec l'extrait aqueux de l'anis (EAA) et intoxiqué traité avec l'extrait (EAA).

L'intoxication des rats a été effectuée pendant la phase de gestation et lactation (à partir du J₀ d'accouplement) avec une dose de 100mg/L de HgCl₂ par voie orale, il est solubilisé dans une eau distillée (**Chehimi et al., 2012**). Ensuite, après sevrage deux groupes de rats (témoin.HEA et Hg.HEA) ont subi la thérapie par l'huile essentielle de *pimpinella anisum* avec une dose de 0,25ml/kg/jr (**Asadollahpoor et al., 2017**) pendant 21 jours par voie intrapéritonéale et deux autres groupes ont été traités par l'extrait aqueux de l'anis vert (Témoin.EAA et Hg.EAA) avec une dose de 500mg/Kg (**Al Mofleh et al., 2007 ; Bekara et al., 2016**) par gavage pendant 15jr. Les expérimentations ont eu lieu dans les locaux du laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes au département de biologie de l'université Dr. Moulay Tahar, Saida.

III.1. La répartition des groupes :

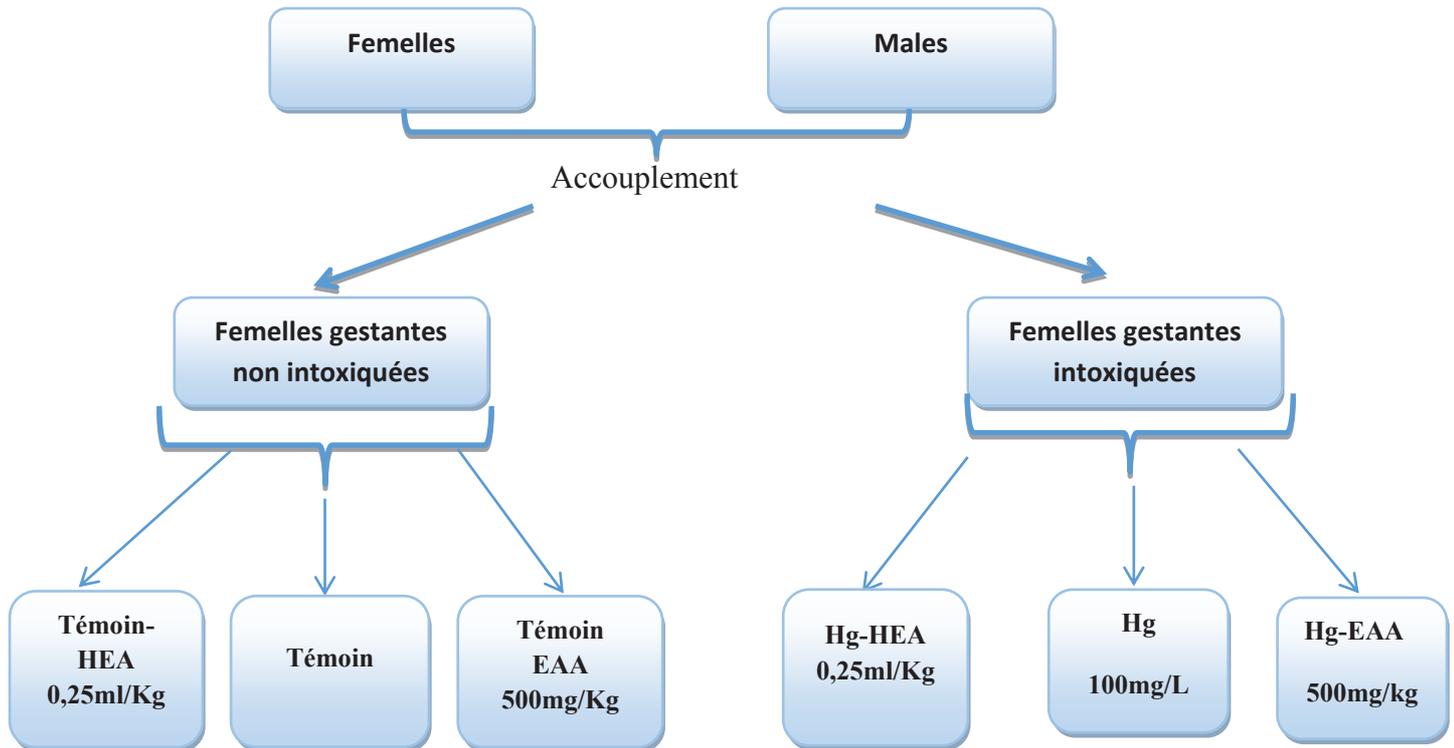


Figure 9 : Schéma représentatif de la répartition des groupes

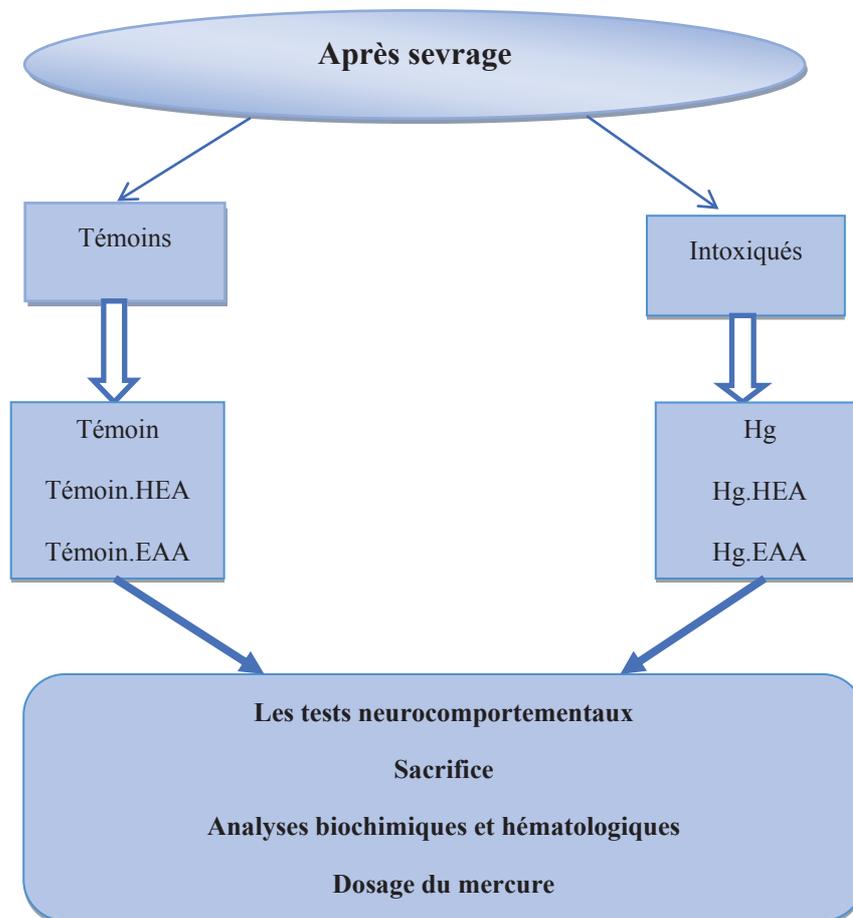


Figure 10 : Les étapes qui suivent le traitement.

III.2. Détermination du poids corporel et poids des organes :

L'évaluation de la croissance pondérale des rats est enregistrée pendant 15 jours de traitement. Le poids des cerveaux, foies et des reins pour les différents groupes sont enregistrés après sacrifice.

IV. Les tests neurocomportementaux :

Nous avons effectué une batterie de test afin d'évaluer les troubles neurologiques causés par l'exposition au HgCl₂ ainsi que l'effet de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum*.

IV.1. Test de la nage forcée :

Le test de la nage forcée est couramment utilisé pour l'évaluation du comportement de résignation. Ce test a été développé par **Porsolt et al., 1977** chez les rats. Il s'effectue à l'intérieur d'un cylindre de 20cm de diamètre et de 39 cm de hauteur, dans une eau à 22°C± 1°C. L'animal est inévitablement forcé de nager et dans cette situation, il commence alors par se débattre, puis abandonne avant de devenir immobile. L'immobilité reflète donc l'état de résignation qu'on peut associer au « désespoir ». La durée du test est 6 min (**Porsolt et al., 1977; Elizalde et al., 2008; Kahloula et al., 2013**)

IV.2. L'open field :

L'open field permet d'évaluer les capacités exploratoires ainsi que l'activité locomotrice des rats dans un contexte stressant. Ce test utilise une large boîte rectangulaire ouverte (90 cm de long, 70 cm de large, et 60 cm de haut), à fond noir et fortement éclairée, des lignes blanches au sol délimitaient des carreaux (10×10 cm). Chaque rat est initialement placé dans un des quatre coins de l'open field, la tête orientée vers un coin. Son comportement est observé pendant 6 minutes. Six paramètres sont mesurés par l'expérimentateur : le temps de latence (exprimé en secondes), qui correspond au temps mis par le rat pour sortir des quatre carreaux formant le coin, le nombre total de carreaux traversés par le rat pendant la durée du test (6min), qui reflète l'activité locomotrice, le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre, le nombre total de redressements, le nombre total de toilettages, le nombre total de défécations (**Kahloula et al., 2014**).

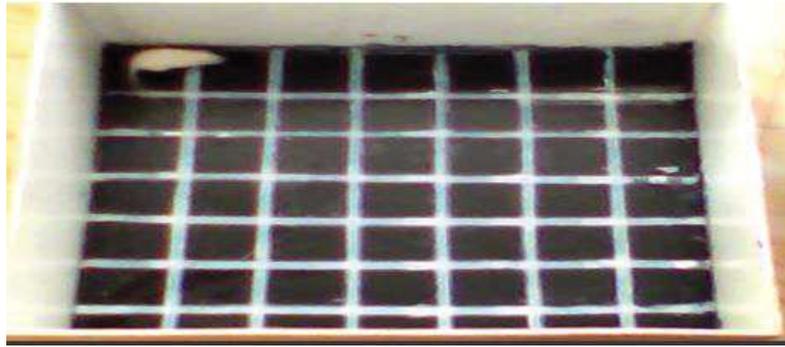


Figure 11 : Dispositif de l'open field

IV.3. Test de la piscine de Morris :

Conçu et mis au point par **Morris (1983)**, ce test est devenu rapidement un test de référence dans les études visant à évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez les rongeurs. Dans les différents types de protocoles utilisés, le principe de base est que l'animal doit apprendre à s'échapper de l'eau d'un bassin (situation aversive) en atteignant le plus rapidement possible une plate-forme. Le dispositif expérimental est un bassin circulaire (diamètre 160 cm ; hauteur 60 cm) rempli d'eau à une hauteur de 30 cm. L'eau a été rendue opaque par un colorant blanc non toxique et maintenue à une température de $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$. Les déplacements de l'animale sont suivis grâce à une caméra vidéo. Le bassin est virtuellement divisée en quatre quadrants par quatre points cardinaux arbitraires (Nord, Sud, Est, Ouest). La plateforme est disposée dans le quadrant NO, immergée dans l'eau et recouverte d'une grille afin de faciliter l'agrippement des animaux. Le dispositif était situé dans une salle expérimentale entourée de repères extérieurs au labyrinthe.

La phase d'acquisition dure 4 jours à raison de 4 essais par jour. Le rat est placé dans le bassin, la tête dirigée contre le mur à l'un des quatre points cardinaux. Le temps mis par l'animal pour atteindre la plateforme est enregistré. Chaque essai dure 60 secondes. Si le rat n'arrive pas à trouver la plateforme à la fin de l'essai, il est placé dessus par l'expérimentateur pendant 20 secondes. Le probe test est effectué le lendemain du dernier jour d'apprentissage. La plateforme est retirée du bassin et l'animal est placé au S. Le temps passé dans le quadrant où la plateforme était située au cours de la phase d'acquisition(NO) est mesuré au cours d'un seul essai de 60 secondes. Après 2 heures du probe test, se déroule la phase de la plateforme visible. La plateforme est placée au milieu du quadrant NO et rendue visible grâce à un drapeau coloré. Quatre essais de 60 secondes pour chacun sont réalisés dans les 4 points

cardinaux. Le temps mis pour atteindre la plate-forme est mesuré (Astur et al., 1998 ; Yassine, 2001 ; Jeltsch et al., 2001 ; Kahloula, 2010).



Figure 12 : Dispositif de la piscine de Morris

IV.4. Le test du compartiment sombre/ clair :

Le test de boîte en noir et blanc (ou boîte de lumière-obscurité) est une procédure expérimentale qui a été développée pour tester l'anxiété chez les rongeurs de laboratoire, décrite à l'origine par **Crawley (1980)**. De nombreux modèles ont été utilisés par les auteurs avec plusieurs modifications structurelles (**Bourin et al., 2003**).

Dans cette épreuve du double compartiment noir/blanc, le degré d'anxiété d'un animal est déterminé à partir de son aversion pour la lumière. Le dispositif est constituée d'une boîte en bois (L = 44 cm ; l = 16 cm ; H = 23 cm), cloisonnée en deux compartiments égaux (L = 22 cm ; l = 16 cm ; H = 23 cm) qui communiquent par un orifice de 6 cm de haut et de 5 cm de large situé à la base et au milieu de la cloison centrale. L'un des compartiments est noir, fermé par un couvercle n'empêchant pas la perception de l'animal par l'analyseur d'image et l'autre est blanc, fortement éclairée (100 lux). L'animal est placé dans le compartiment noir dans le coin de la paroi opposée à la porte. Le paramètre mesuré est le temps de séjour dans chaque compartiment après 3 minutes d'exploration du milieu par le rat. L'expérimentation dure environ 5 minutes. La durée passée dans le compartiment blanc pendant les 5 minutes de l'expérience est comptabilisée (**Kahloula et al., 2017**).

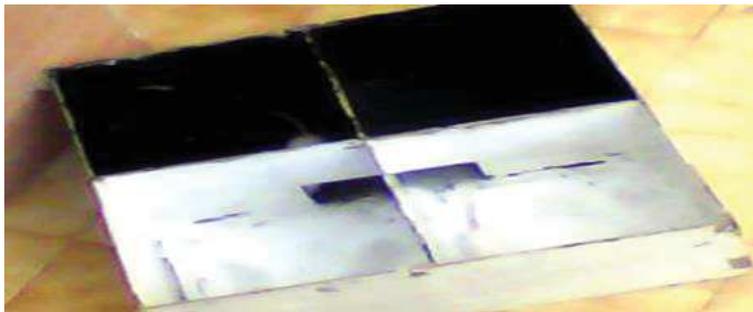


Figure 13 : Dispositif du double compartiment sombre/clair

V. Dosage du mercure par un spectrophotomètre d'absorption atomique à vapeur froide :

L'analyseur de mercure AMA 254 est un spectrophotomètre d'absorption atomique employé pour l'analyse de mercure. Il est destiné à la quantification directe du mercure sur des échantillons. En utilisant la technique de formation de vapeur de mercure, une sensibilité exceptionnellement haute est atteinte indépendamment de la matrice de l'échantillon. Le passeur automatique pour échantillons solides ASS 254 est adapté à l'analyse des échantillons solides, liquides ou pâteux sur l'AMA 254.

V. 1. Description du traitement d'un échantillon dans l'AMA 254

Un échantillon de poids ou de volume connu est placé dans la nacelle qui est elle-même introduite dans le tube catalytique. L'échantillon est alors séché puis décomposé thermiquement ou brûlé. Les produits de décomposition de l'échantillon sont poussés par un flux d'oxygène dans la seconde partie du tube catalytique. C'est ici que l'oxydation est finalisée, les halogènes, les oxydes d'azote et de soufre sont piégés.

Les produits de décomposition sont ensuite poussés jusqu'à l'amalgame pour un piégeage sélectif du mercure, le reste passe dans les cuves de mesure jusqu'à l'évacuation d'oxygène de l'appareil. L'amalgame et les cuves sont thermostatisés à 130°C afin d'empêcher la condensation de l'eau. Après la décomposition d'un échantillon et la stabilisation de la température dans l'amalgame, la quantité de mercure piégé dans l'amalgame est mesurée.

V.2. Caractéristiques de la technique :

Tableau 4: Caractéristiques de la technique SAA

Type de technique	spectrophotomètre d'absorption atomique à vapeur froide
Contrôle et acquisition des données	PC sous Windows 7 + 32 ou 64 bits
Source de lumière	Lampe à vapeurs de mercure basse pression
Longueur d'onde	253,65 nm
Filtre inter-différentiel	Oui diode UV placé dans le détecteur à 254 nm, résolution 9 nm
Limite de détection (L.D) en ng de Hg	0,01 ng (cellule standard) ou 0,003 ng (cellule haute sensibilité)
Répétabilité	> 98,5 %
Temps de chauffe avec 1 ^{ère} analyse	Environ 30 min

VI. 1. Le prélèvement sanguin :

Après une période de 12 heures de jeûne, les jeunes rats sont sacrifiés par décapitation après les anesthésiés par le chloroforme en intrapéritoniale. Le sang a été récupéré dans des tubes à EDTA pour les analyses hématologiques et le dosage du mercure et des tubes à hépariné pour les dosages des différents paramètres biochimiques.

VI.2. Les dosages biochimiques :

VI.2.1. Dosage de la glycémie

La méthode utilisée pour le dosage de la glycémie est une méthode colorimétrique (Kit SPINREACT). Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose sanguin en acide

gluconique en formant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est détecté par le phenol-aminophenazone avec la présence de la peroxydase (POD).

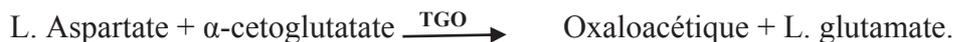


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon, calculé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505nm.

VI.2.2. Exploration de la fonction hépatique :

VI.2.2.1. Dosage des transaminases (ASAT-ALAT)

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.

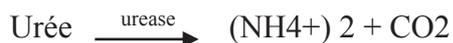


L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de ces enzymes dans le sang, calculé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505nm à l'aide d'un Kit Chronolab.

VI.2.3. Exploration de la fonction rénale :

VI.2.3.1. Dosage de l'urémie

L'urée sanguine est hydrolysée enzymatiquement en ammonium (NH₄⁺) et dioxyde de carbone (CO₂). L'ion ammonium former entre en réaction avec salicylate et hypochlorite (NaClO), dans la présence du catalyseur Nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte, le Kit utilisé est Chrono Lab.



L'intensité de la couleur est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 580nm.

VI.2.3.2. Dosage de la créatinine

La méthode utilisée pour le dosage de la créatinine est une méthode colorimétrique (Kit Chronolab). La Créatinine réagit avec le picrate alcalin en produisant une coloration orangée. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon, la densité optique est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 492 nm.

VI.3. Détermination des paramètres hématologiques :

Les paramètres hématologiques à savoir le taux d'hémoglobine (Hb), d'hématocrite (Ht), le nombre de globules rouges, le nombre de globules blancs et les plaquettes sont déterminés à l'aide d'un Coulter de type Sysmex XE-2100.

VII. L'étude histopathologique :

L'étude histologique a été réalisée au sein de laboratoire de l'institut vétérinaire à l'université Ibn Khaldoun à Tiaret.

Cette technique nous permet d'obtenir des coupes cérébrales fines en facilitant la détection de toute lésion touchant le cerveau et le cervelet, des coupes au niveau du foie et au niveau du rein. Elle comprend plusieurs étapes : la fixation, l'inclusion, la coloration, le montage suivi d'un examen au microscope optique.

VII .1 La fixation :

Elle a pour but d'immobiliser les constituants cellulaires dans un état voisin à l'état in vivo, elle se fait directement après le prélèvement pour empêcher toute putréfaction (altération microbienne), autolyse (destruction tissulaire par les constituants enzymatiques) parallèlement elle entraîne un durcissement de l'organe (pour maintenir en place toute formations tissulaires), une protection contre les distorsions et les rétractions, et une préservation de la morphologie cellulaire et tissulaire en augmentant la consistance du tissu pour faciliter la coupe et de potentialiser la coloration en améliorant la captation des substances colorantes.

Elle s'effectue directement après le sacrifice en immergeant totalement les prélèvements dans le formol à 10% au moins 24 h à une température ambiante et peut durer plusieurs jours même plusieurs semaines.

VII.2 L'observation macroscopique des organes fixés :

Les cerveaux fixés ont été par la suite mesurés (détermination des dimensions) (Figure 14A) et découpés transversalement par un bistouri (en décrivant leur aspect macroscopique) (Figure 14B) puis placés dans des histo-cassettes marquées préalablement (Figure 14C) avant d'être mises dans un panier de l'appareil automate de circulation et subir un processus de déshydratation (Figure 14D).

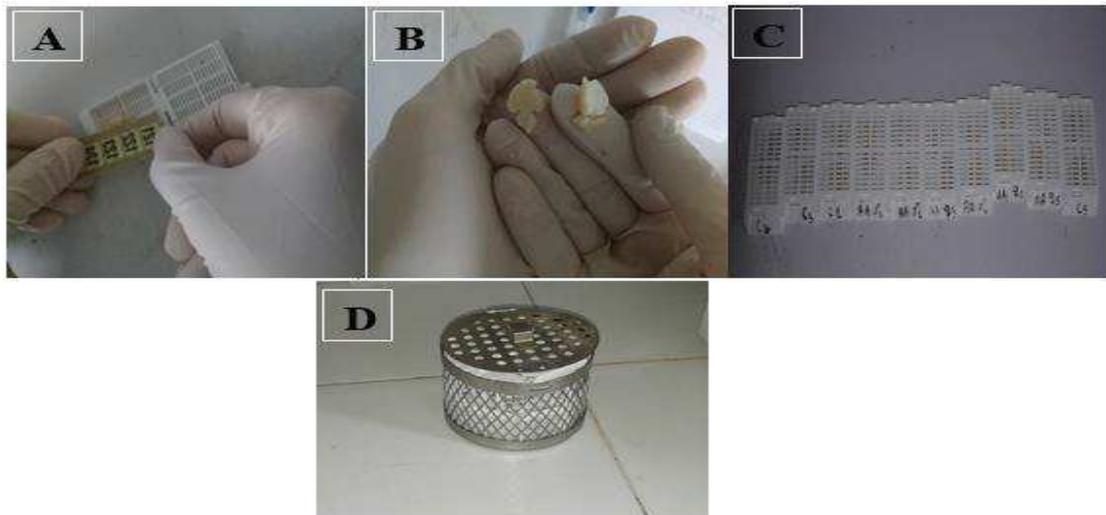


Figure 14 : Les étapes effectuées dans la salle de la macroscopie.

VII.3 La réalisation des blocs de paraffine :

Il s'agit d'un passage obligatoire des tissus du formol à la paraffine pour obtenir des blocs, puis des rubans, étalés enfin sur des lames en verre.

- Première étape : l'imprégnation

L'inclusion des échantillons en paraffine exige qu'en extraire l'eau préalablement (une déshydratation) en suivant les étapes effectuées par un automate d'imprégnation en paraffine (TP1020/Leica) (Figure 15), pendant un cycle de 16h, où les prélèvements sont initialement plongés dans un bain de formol ensuite dans des bains successifs d'éthanol dont leurs concentrations sont croissantes puis rincés dans un bain de solvant organique; le xylène permettant une clarification (éliminer tout traces d'alcool), ils peuvent ensuite être immergés dans un bain de paraffine liquide qui va imprégner profondément ces fragments tissulaires.

Toutes ces réactions ont lieu dans des 12 bacs d'automate (en respectant les durées), comme le suit :

Tableau 5 : Les différents solvants utilisés avec la durée d'imprégnation

Le bain d'automate contenant :	La durée d'imprégnation :
Formol	1h20min
Alcool 95%	1h30min
Alcool 95%	1h30min
Alcool 100%	2h
Acétone	1h30min
Acétone	1h30min
Xylène	1h
Xylène	1h
Xylène	1h
Paraffine	1h
Paraffine	1h30min
Paraffine	1h30min



Figure 15 : L'automate d'imprégnation utilisée.

- Deuxième étape : l'enrobage

Elle sert à inclure totalement les fragments tissulaires déshydratés issu de la première étape dans la paraffine pur (un mélange d'hydrocarbure saturé) (Figure 16A) placées au centre des moules (Figure 16B) et remplis au-dessous du robinet de paraffine liquide (à 58°C) (Figure 16C), puis le tout est ensuite disposé sur une plaque de refroidissement (-7°C) (Figure 16D),

leurs solidifications permettent de démouler les blocs facilement qui acquièrent une consistance (durcissement de façon homogène)(Figure 16E) ils sont menés à la réalisation des sections histologiques minces au microtome(Figure 16F).

Cette technique permet aussi la conservation des échantillons en empêchant leurs fragmentations au fil du temps (conservation durant une période illimitée), et elle avait procédé à une station d'enrobage (Tissue-Tek Dispensing Console) (Figure 17) comprenant trois parties : la plaque chaude (65°C), le robinet de paraffine liquide et la plaque froide (-7°C).



Figure 16 : Les différentes étapes d'enrobage.



Figure 17 : La station d'enrobage utilisée.

VII.4 La microtomie et confection des coupes :

Une fois les blocs de paraffine sont solidifiés, on fixe chaque bloc sur le porte –bloc devant la lame de microtome (Leica RM 2235) (Figure 18A) et on l’oriente convenablement pour réaliser des sections de $3\mu\text{m}$ d’épaisseur formant un ruban plissé (Figure 18B), ces rubans sont étalés par la suite à la surface d’un bain marie (Leica HI 1210) à 48°C (Figure 18C) (pour que la coupe acquière une certaine planéité) ainsi les sections d’intérêt sont pêchées sur des lames en verre (identifiées auparavant à l’aide d’un crayon diamanté) en permettant une meilleure adhésion des coupes sur leurs supports (Figure 18D), ensuite le séchage et le déparaffinage s'effectuent au niveau de l’étuve (Drying Oven TX-11) (56°C) (Figure 18E) en quelque minutes et vers la fin ces lames doit être placer dans un portoir puis immergées dans un bac de xylène(Figure 18F) pour entamer le processus de coloration d'intérêt.



Figure 18 : La réalisation des coupes par le microtome.

VII.5 La coloration des coupes :

La coloration des lames permet de mettre en évidence et de différencier les constituants cellulaires et tissulaires, en routine la coloration à l’Hémalun Eosine (Hématoxyline et Eosine) c'est la coloration la plus répandue en histologie, mais ce processus nécessite une étape préliminaire d'hydratation.

•L'hydratation:

Les lames déparaffinées d'abord doivent être hydratés, elle se fait en les plongeant dans des bains successifs de xylène puis dans bains d’alcool d’ordre décroissant, ensuite on rince avec l’eau.

- **La coloration:**

La coloration offre une lisibilité des sections sous l'analyse microscopique, où la technique utilisée est celle de l'hématoxyline, éosine pour renforcer le contraste des composants cellulaires, l'hématoxyline colore les structures nucléaires (basophiles) en bleu ainsi l'éosine colore les structures cytoplasmiques (acidophiles) en rose à rouge, ce procédé se termine par une déshydratation à l'aide des bains d'alcool de titre croissant suivi par des bains de xylène avant de passer au montage.

Dans ce cas, les lames sont trempées successivement dans les bains d'automate (Leica st 4040) (figure 19) permettant l'hydratation, la coloration et la déshydratation en même temps

Tableau 6 : Les solvants utilisés et le temps de contact durant la coloration

Le bac d'automate contenant :	Le temps de contact :
Xylène	5 minutes
Alcool 100%	1 minute
Alcool 95%	1 minute
Alcool 75%	1 minute
Eau	1 minute
Hématoxyline	4 minutes
Eau	8 minutes
Acide chloridrique	1 minute
Carbonates de lithium	1 minute
Eau	1 minute
Alcool 95%	1 minute
Eosine	1 minute
Alcool 100%	1 minute
Alcool 100%	1 minute
Xylène	2 minutes



Figure 19 : L'automate de coloration utilisé.

VII.6 Le montage des lames :

Les lames colorées doivent subir un montage où on dispose quelques gouttes d'Eukitt sur les coupes (figure 20A) et on les recouvre par des lamelles couvre-objet (figure 20B) de façon que la résine utilisée revête la totalité de la section (aucune bulle d'air ne doit s'insérer), on accélère la polymérisation de la colle biologique en plaçant les lames dans l'étuve (56°C) durant quelques minutes (figure 20C) puis un séchage à l'air libre.

Les lames ainsi préparées (figure 21) peuvent se conserver sans risque d'être altérées pendant une durée illimitée.

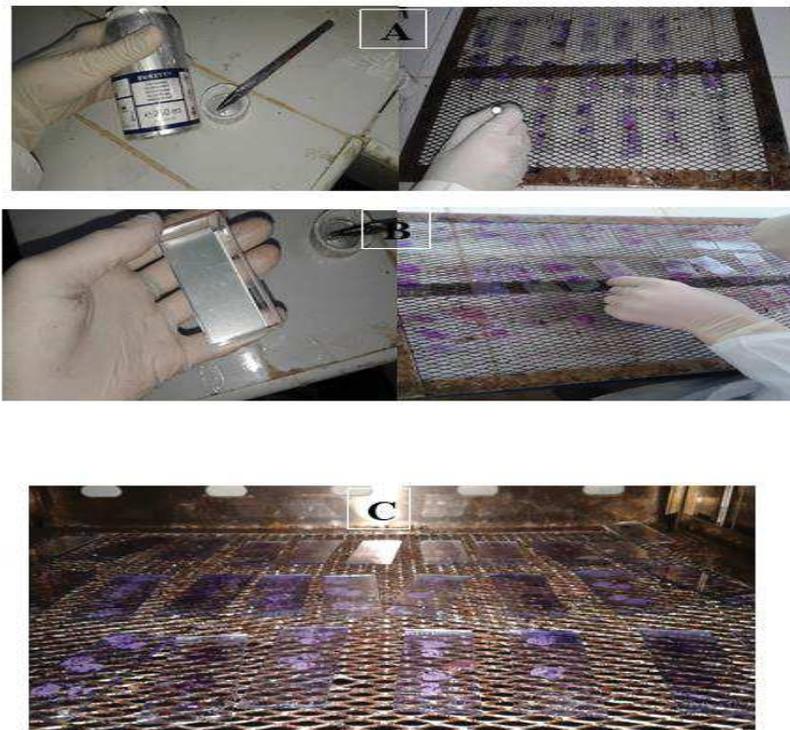


Figure 20 : Le montage des lames.

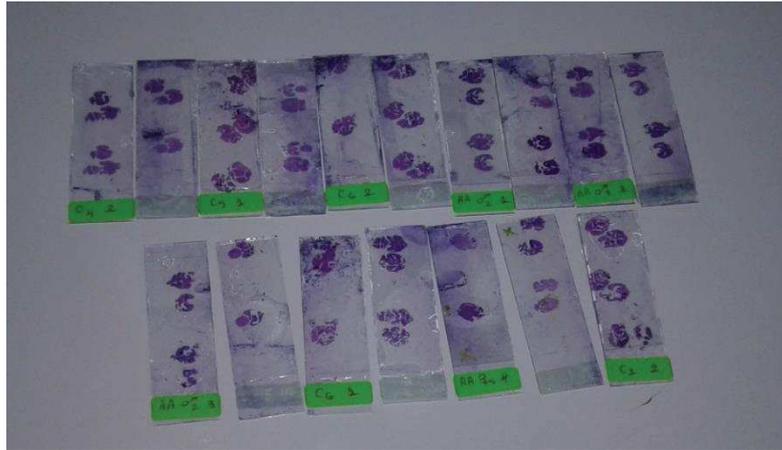


Figure 21 : Les lames préparées pour l'analyse microscopique.

VII.7 L'observation microscopique :

Finalement, les lames sont prêtes pour l'observation au microscope optique (Leica DM 1000) à plusieurs grossissements (x10 puis x40) (figure 22) et les photos ont été prises pour des fins comparatives.



Figure 22 : L'examen microscopique des sections histologiques.

VIII. Analyses statistiques :

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les données ont été analysées par des analyses de variance bidirectionnelles (ANOVA). Lorsqu'une différence significative n'a été observée, le test post-hoc de Student-Newman-Keuls a été mené. Pour toutes les analyses, une différence a été considérée comme significative à $p \leq 0,05$. Le logiciel utilisé sigmastat version 3.5.

Résultats et Interprétations

I. Le rendement :

La méthode d'hydrodistillation nous a permis d'obtenir une huile essentielle avec un rendement d'ordre 1,383%. Par ailleurs, le rendement de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum L* obtenue par décoction est de l'ordre 17.18%.

II. Résultat de la CPG/SM

L'analyse chromatographique en phase gazeuse nous a permis d'identifier 12 composants pour l'huile essentielle de l'anis vert avec l'anéthol comme composant majeur.

Tableau 7 : Les composants identifiés par CPG/SM

Composés identifiés	Temps de rétention (min)	Concentration (%)
α -pinène	8,11	1,81
Camphène	8,56	0,36
Cis-betaocimène	9,72	0,28
α -phellandrène	10,91	0,22
Limonène	11,68	8,01
3-carène	12,91	0,43
Fenchone	14,22	8,99
α -campholène aldéhyde	16,15	0,47
γ -Elémène	18,1	0,11
Estragole	18,81	7,25
Tans-anéthol	20 ,33	55,44
Cis-Anéthol	21,60	0,18

III. Le screening phytochimique :

L'analyse qualitative des extraits de *P.anisum* nous a permis d'identifier les différents métabolites secondaires que comporte cette plante. Nous avons remarqué la présence des tannins cathéchiques, des flavonoides, des anthocyanes, des coumarines, des alcaloides et du stérol.

Tableau 8 : les métabolites secondaires présents dans l'anis vert.

Le constituant	Présence/ absence
Tannins	Cathéchine+
Flavonoïde	+
Anthocyane	+
Coumarine	+
Alcaloïde	M+/W+
Stérol	+
Composés réducteurs	-
Amidon	-
Saponoside	-

(+ : Présence, - Absence)

IV. Résultats du traitement par l'huile essentielle :

IV.1. L'évaluation du poids :

Iv.1.1. Le poids corporel :

L'étude statistique a révélé une diminution significative dans le poids des animaux exposés au Hg en comparaison avec les animaux témoins ($P < 0,001$). De plus, une augmentation très significative dans le poids du lot Hg-HEA en comparaison avec le poids du lot Hg ($p < 0,001$) et une élévation très significative du poids des animaux témoins-HEA par rapport à celui des animaux témoins ($p < 0,001$).

Tableau 9 : Variation du poids corporel. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM :

*** ($P < 0.001$)

Le lot	Le poids corporel (g)
Témoin	48,85 \pm 3,17
Hg	38,28 \pm 0,64***
Hg-HEA	58,42 \pm 1,67***
Témoin-HEA	59,57 \pm 1,54***

IV.1.2. Le poids des organes :

Les résultats relatifs au poids des organes ont révélé une diminution significative du poids de cerveaux des rats exposés au Hg en comparaison à celui des rats témoins ($p < 0,01$).

Par ailleurs, le poids cérébral des animaux du groupe Hg-HEA est significativement élevé à celui des animaux du groupe Hg ($P < 0,05$). Le poids cérébral des rats Hg-HEA est significativement réduit à celui des rats témoins-HEA ($P < 0,05$).

Pour la variation du poids des reins aucune différence significative n'a été remarqué entre les groupes d'animaux exposés au mercure ($p > 0,05$). Cependant, le poids des reins du lot témoin-HEA est significativement élevé par rapport à celui du lot témoin ($P < 0,05$).

Concernant le poids du foie, celui des rats Hg est inférieur à celui des témoins ($p > 0,05$). Tandis que le poids du foie des rats témoins-HEA est significativement élevé à celui des témoins ($P < 0,001$).

Tableau 10 : Variation des poids des organes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** ($P < 0.001$) ; ** ($P < 0.01$) ; * ($P < 0.05$)

Poids (g) Groupes	Cerveau	Rein	Foie
Témoin	1,62 \pm 0,02	1,02 \pm 0,01	4,12 \pm 0,10
Hg	1,51 \pm 0,01**	1,12 \pm 0,03	4,82 \pm 0,22
Hg-HEA	1,57 \pm 0,008*	1,10 \pm 0,06	5,43 \pm 0,37
Témoin-HEA	1,63 \pm 0,02	1,23 \pm 0,08*	6,32 \pm 0,39***

IV.2. Résultats neurocomportementaux :

IV.2.1. La nage forcée :

Le test a permis de mesurer le temps d'immobilité des rats durant les 6 min du test. Les résultats relatifs à ce test ont montré que les animaux intoxiqués par Hg ont un temps d'immobilité significativement élevé à celui des animaux témoins ($p < 0,001$), ce qui reflète un état de désespoir. Cependant, les rats exposés au Hg et traités par HEA ont un temps d'immobilité significativement inférieur à celui des rats exposés au Hg ($p < 0,01$). Par ailleurs,

il existe une différence non significative entre le groupe Hg-HEA et le groupe témoin-HEA ($p > 0,05$).

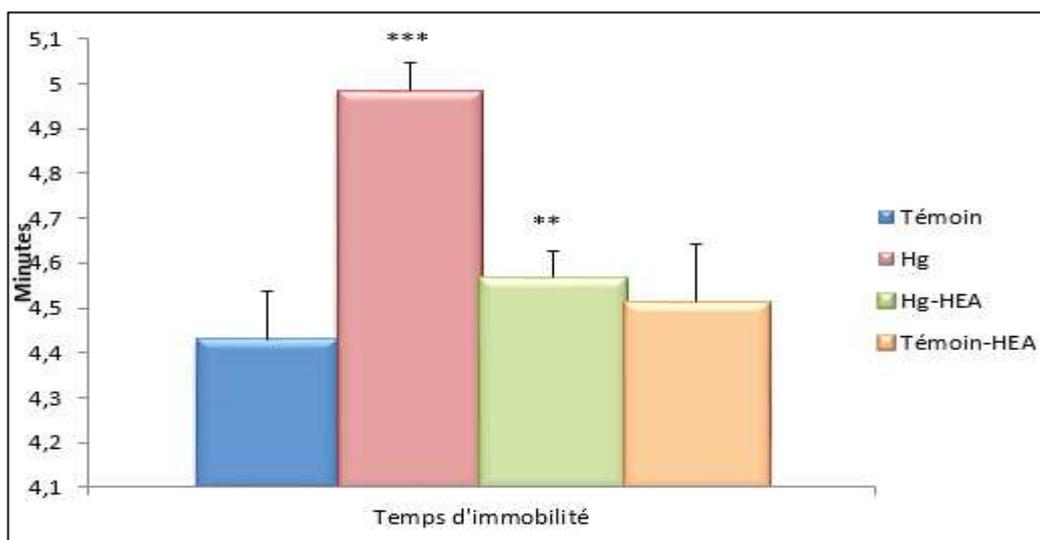


Figure 23: Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins, intoxiqués, témoin-HEA, intoxiqués-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** $P < 0,001$ (Témoin vs. Hg), ** $P < 0,01$ (Hg vs. Hg-HEA).

IV.2.2. Open field :

Les données enregistrées pour ce test ont présenté une diminution significative du nombre des carreaux traversés par les rats issus des femelles exposés au mercure en comparaison avec les rats témoins ($p < 0,01$) de même pour le nombre de visite du centre ($p < 0,01$).

Par ailleurs, le nombre de carreaux traversés par les animaux exposés au mercure et traités par l'HE de l'anis est significativement élevé comparé à celui des animaux exposés au mercure ($p < 0,05$). Par contre pour le nombre de visite du centre, nous avons remarqué une augmentation non significative du nombre de visite chez le lot Hg-HEA en comparaison avec le lot Hg ($p > 0,05$).

Concernant le nombre de redressement, nous avons remarqué une réduction significative de celui-ci chez les rats exposés au Hg et traités par HE par rapport à celui des rats témoins traités par HE ($p < 0,05$), et une élévation non significative de ce nombre chez les Hg-HEA en comparaison avec Hg ($p > 0,05$).

Le nombre de défécation des rats intoxiqués est significativement en hausse par rapport à celui des rats témoins ($p < 0,001$). De plus, ce paramètre est significativement inférieur chez les rats intoxiqués traités par l'HE en comparaison à celui des rats intoxiqués ($p < 0,001$).

Résultats et Interprétations

Le temps de latence du groupe intoxiqué est élevé d'une manière non significative par rapport au groupe témoin ($p > 0,05$). En revanche ce temps chez les lots : Hg-HEA et témoin-HEA est significativement élevé en comparaison avec les lots ; Hg et témoin respectivement ($p < 0,001$).

Tableau 11: Les paramètres mesurés du test de l'open field. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05; **P < 0.01 ; ***P < 0.001

Groupes	Nombre de carreaux traversés	Nombre de visite du centre	Redressement	Toilettage	Défécation	Temps de latence
Témoin	150,85 \pm 10,10	4,14 \pm 1,83	7,71 \pm 2,45	3,57 \pm 0,68	1,28 \pm 0,6	0
Hg	76 \pm 20,28**	0,28 \pm 0,18**	3,85 \pm 0,63	3,71 \pm 0,35	5,42 \pm 0,68***	1,48 \pm 0,67
Hg-HEA	123,57 \pm 14,88*	2,14 \pm 0,34	4,42 \pm 0,29*	3,85 \pm 0,26	1,14 \pm 0,45***	0,13 \pm 0,04***
Témoin-HEA	131,85 \pm 15,17	1,71 \pm 0,18	9,42 \pm 0,64	3,28 \pm 0,86	0,28 \pm 0,18	11 \pm 1,04***

IV.2.3. La piscine de Morris :

Le labyrinthe aquatique permet d'évaluer les capacités exploratoires et l'apprentissage spatial chez les rats. Durant le 1^{er} et le 2^{ème} jour d'apprentissage il existe une élévation significative du temps de latence du lot intoxiqué en comparaison avec le lot témoin ($p < 0,01$). Le temps de latence des jeunes rats intoxiqués ensuite traités par l'huile d'anis est inférieur d'une manière significative par rapport à celui des rats intoxiqués ($p < 0,01$).

Pendant le 3^{ème} et le 4^{ème} jour d'acquisition, nous avons remarqué que le temps de latence des rats intoxiqués est significativement supérieur à celui des rats témoins ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) respectivement. De plus, le temps de latence du lot intoxiqué traité par HE est inférieur d'une manière significative à celui du lot intoxiqué ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) respectivement.

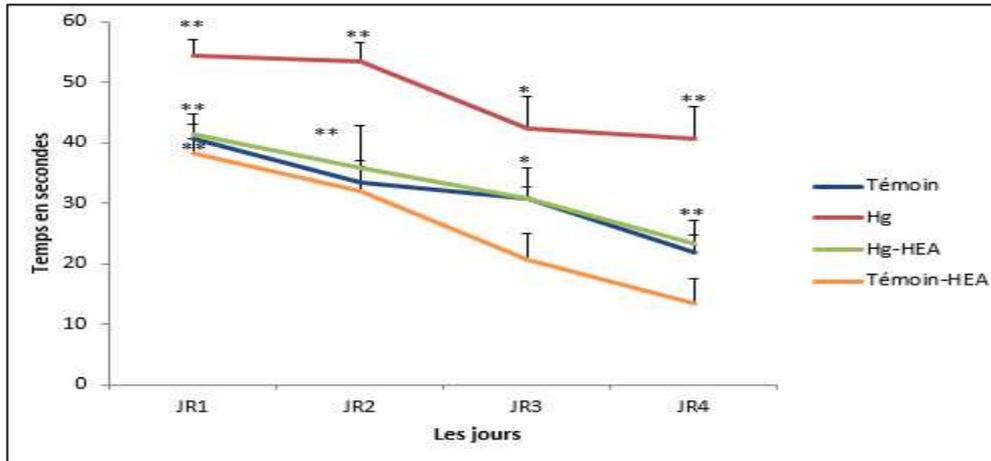


Figure 24 : L'évaluation de l'effet curatif de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : Jr 1 : **P < 0.01(Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs.Hg-HEA) . Jr2 : *P < 0.01(Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs.Hg-HEA). Jr3 : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; *P < 0.05 (Hg vs.Hg-HEA). Jr4 : **P < 0.01(Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs.Hg-HEA).

IV.2.3.1. Le probe test :

Le probe test a révélé une différence significative de temps de latence dans le cadran NO (c'est le cadran cible qui contient la plateforme) entre les rats témoins et les rats Hg. Ces derniers, ont un temps de latence significativement inférieur par rapport à celui des témoins ($P < 0,05$). De plus, le temps de latence du groupe Hg- HEA est significativement élevé comparé à celui du groupe Hg ($p < 0,01$).

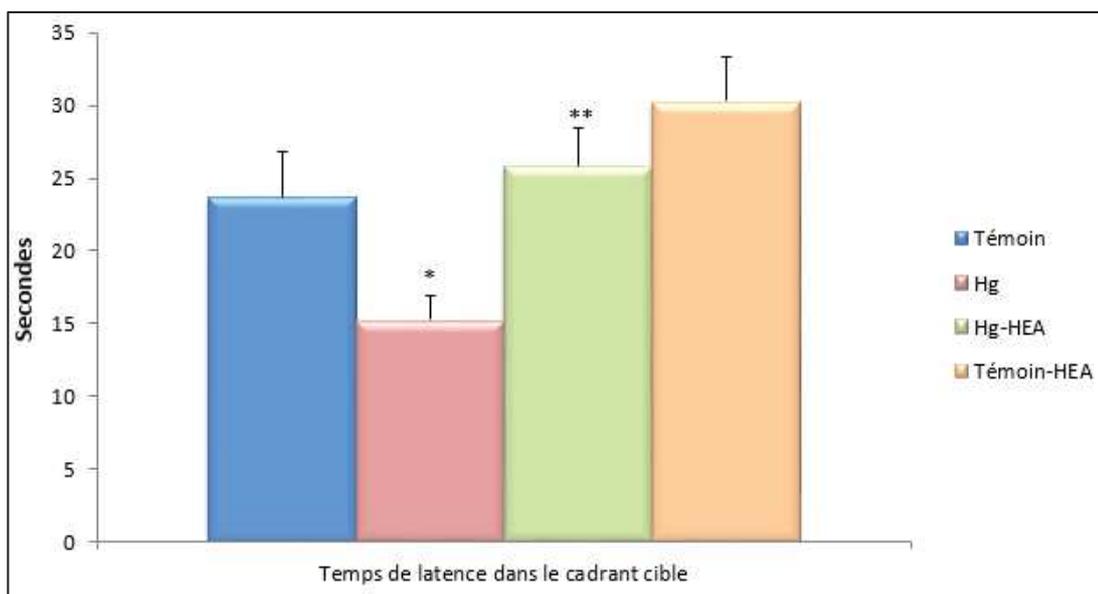


Figure 25: Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs. Hg-HEA).

IV.2.3.2. Test visible :

Durant le test de la plateforme visuelle, les rats exposés au Hg prennent un temps significativement plus élevé afin d'arriver à la plateforme en comparaison avec les rats témoins ($p < 0,05$). Cependant, les animaux intoxiqués traités par l'HE de *P.anisum*, ont mis un temps de latence significativement inférieur pour arriver à la plateforme en comparaison avec les animaux intoxiqués ($p < 0,01$).

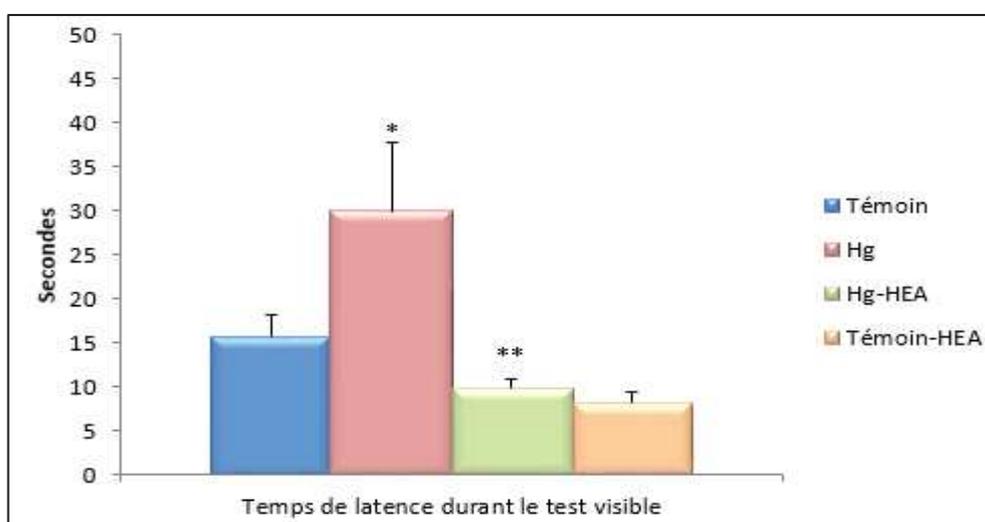


Figure 26: Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05(Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs. Hg-HEA).

IV.2.4. Test du double compartiment obscurité/lumière :

Le test du double compartiment permet d'évaluer l'état d'anxiété chez les rongeurs. Les données obtenues ont révélé que les animaux exposés au Hg ont tendance de passer plus de temps dans le compartiment sombre durant les 5 min du test par rapport aux animaux témoins ($p < 0,001$), ce qui reflète un état d'anxiété due à cet élément chimique. De plus, le groupe des intoxiqués traités par HE passe un temps significativement inférieur à celui du groupe intoxiqué ($p < 0,05$) dans le compartiment sombre. Le lot Hg-HEA a tendance de passer plus de temps dans le compartiment sombre que le lot témoin-HEA ($p < 0,05$). Entre les groupes témoin et témoin-HEA aucune différence significative n'a été remarquée.

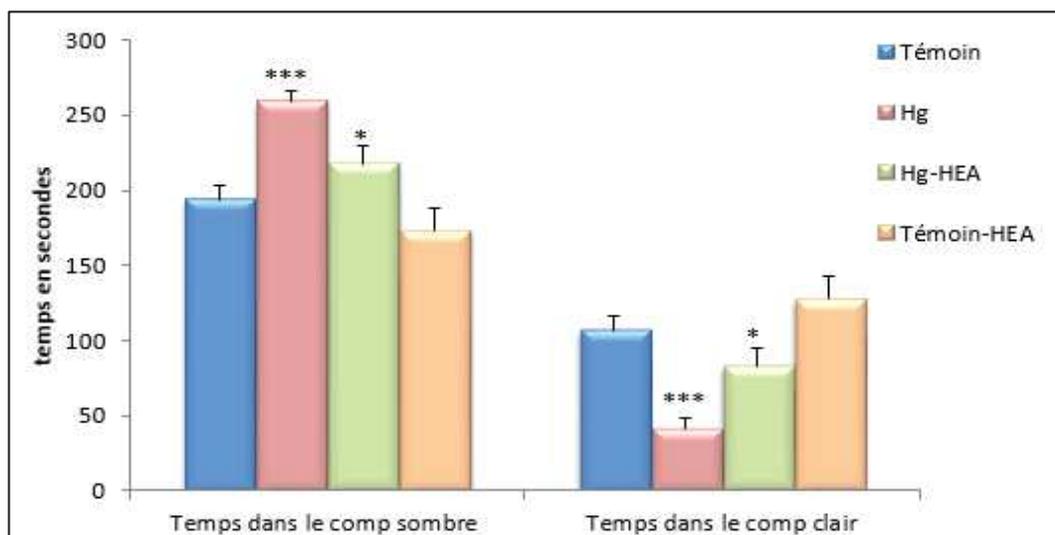


Figure 27: Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** $P < 0.001$ (Témoins vs. Hg), * $P < 0.05$ (Hg vs. Hg-HEA), * $P < 0.05$ (Témoins-HEA vs.Hg-HEA).

IV.3. Dosage du mercure au niveau sanguin et cérébral :

La technique de spectrophotométrie à absorption atomique a montré des variations dans la concentration du mercure au niveau sanguin et cérébral du groupe intoxiqué en comparaison avec le groupe témoin et en comparaison avec le groupe intoxiqué traité. Ces résultats montrent que ces concentrations sont significativement importante chez les rats intoxiqués en comparaison avec les rats témoins. Néanmoins, le traitement avec l'huile essentielle a permis de réduire cette concentration au niveau du sang et du cerveau.

Tableau 12: Evaluation de la mercurémie et du mercure cérébral

	Mercurémie ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Mercure cérébral ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Témoins	0,20	3,10
Hg	8,11	20,09
Hg-HEA	3.66	6,11

IV.4. L'histologie du cerveau :

Les coupes histologiques réalisées au niveau du cerveau et cervelet des jeunes rats exposés au HgCl_2 durant la période de développement ont montré que l'exposition des jeunes rats en période de gestation et lactation au chlorure de mercure a induit une dégénérescence des

Résultats et Interprétations

cellules de purkinje, la présence des microglies, des lésions, des congestions vasculaires et les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles. Cependant, les animaux qui ont subis la thérapie par l'HE de *P.anisum* ont un nombre de cellule de Purkinje réduit en comparaison avec les témoins traités par l'huile essentielle, des noyaux normaux et absence de nécrose et infiltration des cellules en comparaison avec les animaux exposés au mercure.

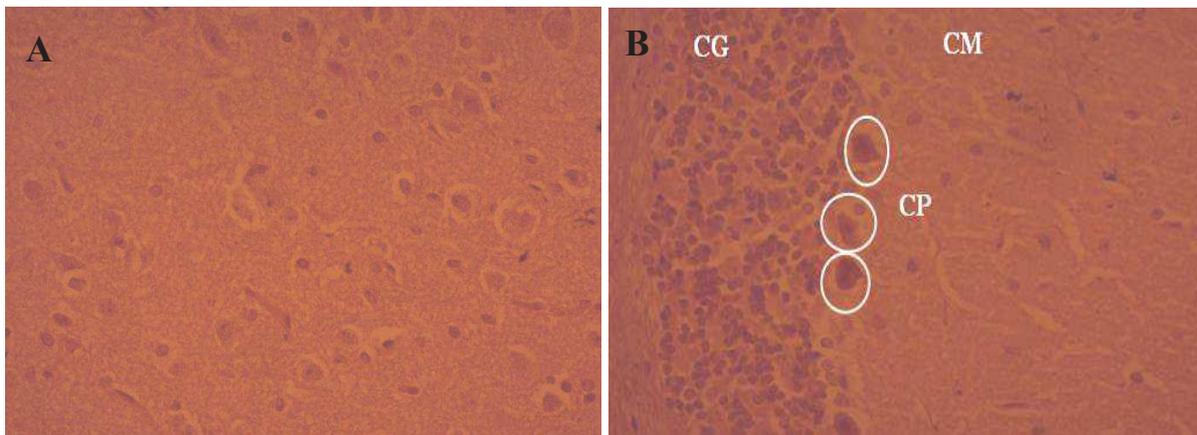


Figure 28 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin avec Gr×40, CG : couche granuleuse, CP : cellule de purkinje, CM : couche moléculaire

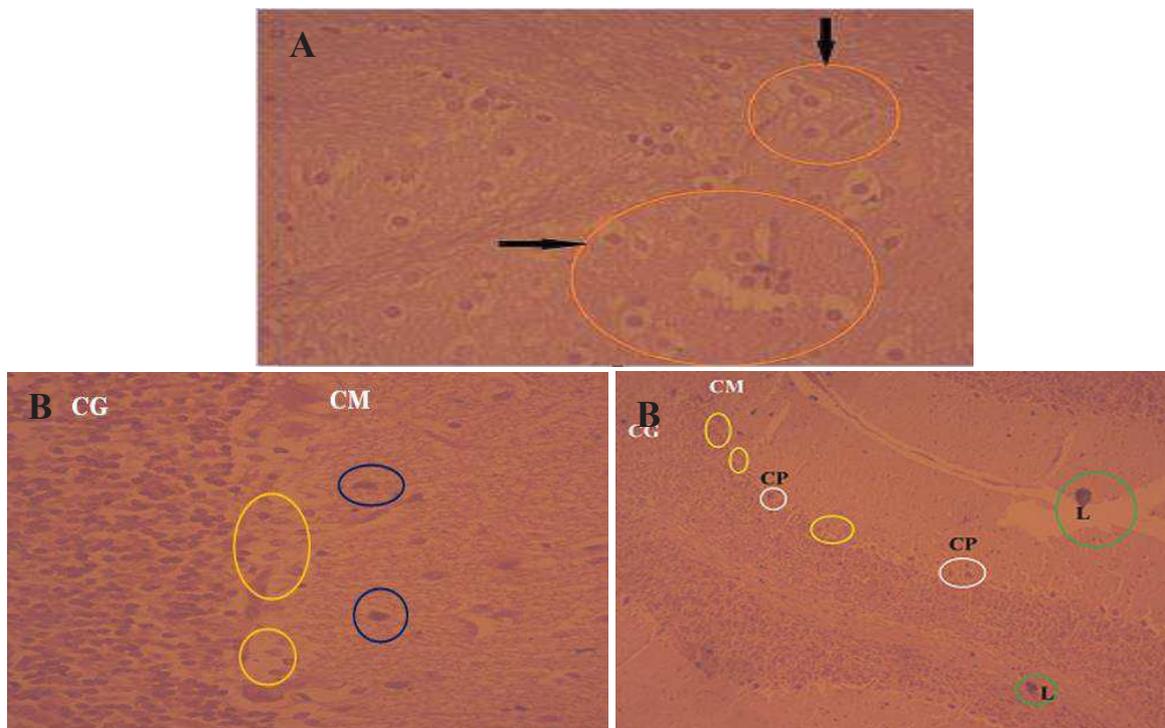


Figure 29 : Des coupes histologiques au niveau du cerebral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué par le $HgCl_2$ avec Gr×40 et Gr×10 , CG : couche granuleuse, CM : couche moléculaire, cercle jaune : dégénérescence de cellules de purkinje, cercle bleu : microglies , cercle vert : congestion vasculaire, cercle orange : vacuolisation des corps cellulaires

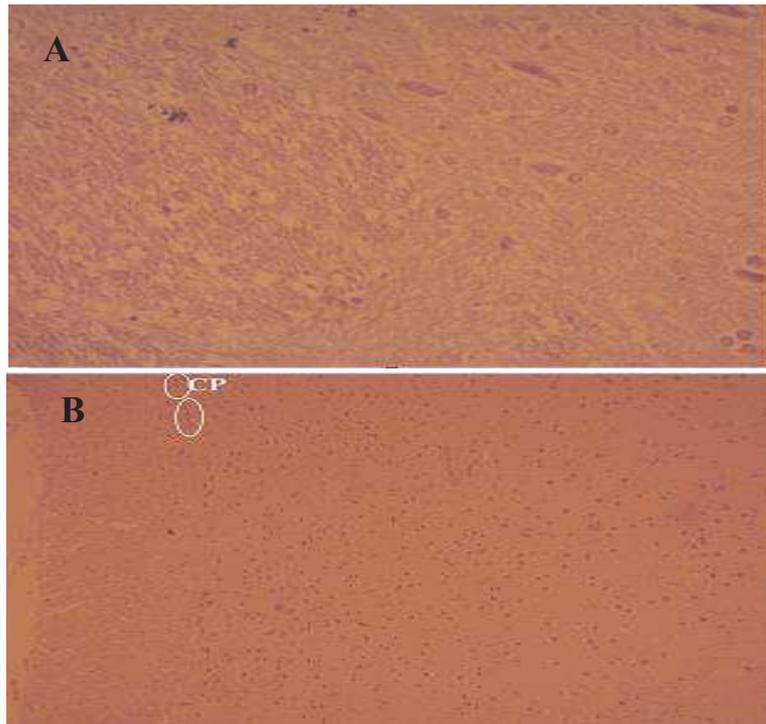


Figure 30 : Coupe histologique au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué traité par HE avec Gr×40 et Gr×10, cercle blanc : cellules de Purkinje qui sont en nombre réduit.

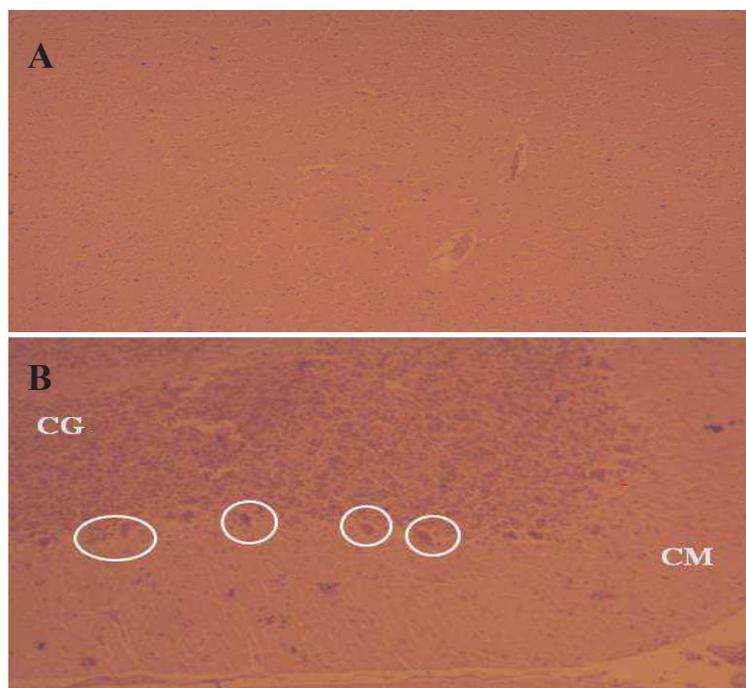


Figure 31 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin traité par HE avec Gr×10, CG : couche granuleuse, CM : couche moléculaire, cercle blanc : cellules de purkinje

IV.5. Les paramètres biochimiques :

IV.5.1. Dosage de la glycémie

Le résultat relatif au dosage de glucose au niveau sanguin a indiqué une diminution significative de la glycémie des rats intoxiqué par rapport aux rats témoins ($P < 0.05$). Par contre, une élévation non significative du taux de glucose du groupe Hg-HEA en comparaison avec le lot Hg ($p > 0,05$) est observée.

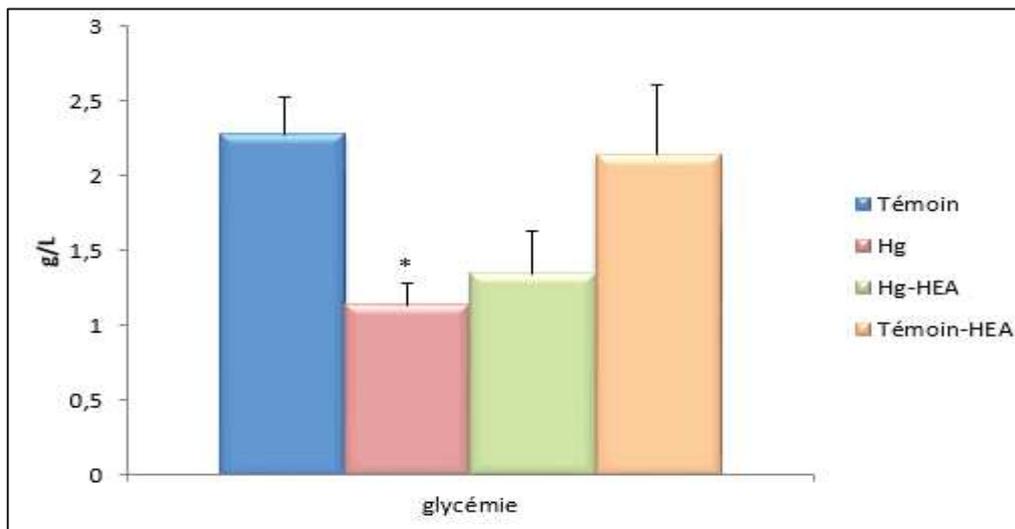


Figure 32 : Comparaison entre les valeurs de la glycémie des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * $P < 0.05$ (Témoin vs.Hg).

IV.5.2. Exploration de la fonction hépatique :

Le dosage des transaminases a révélé une élévation significative dans les taux du ASAT et ALAT chez les animaux exposés au mercure en comparaison avec les animaux témoins ($p < 0,01$), ($P < 0.05$) respectivement. Cependant, les teneurs sériques du ASAT et ALAT des animaux exposés au mercure et traités par HE présentent une diminution significative par rapport à celle des animaux exposés au mercure ($P < 0.05$).

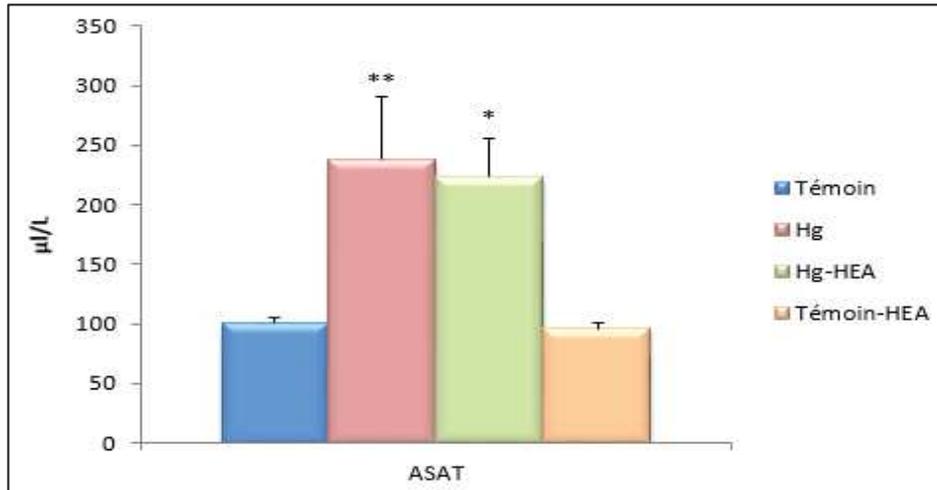


Figure 33: Comparaison entre les teneurs sériques du ASAT des : témoins, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : ** $P < 0.01$ (Témoin vs.Hg) ; * $P < 0.05$ (Hg vs. Hg-HEA)

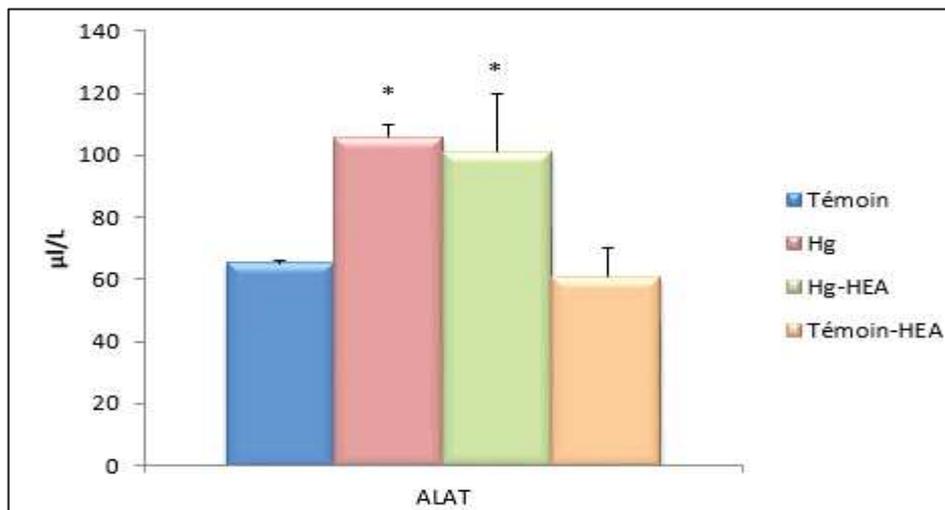


Figure 34: Comparaison entre les teneurs sériques du ALAT des : Témoin, Hg, Hg-HEA et Témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * $P < 0.05$ (Témoin vs.Hg) ; * $P < 0.05$ (Hg vs. Hg-HEA)

IV.5.3. Exploration de la fonction rénale :

Les valeurs enregistrées pour le dosage de l'urée et de la créatinine sanguine indiquent une élévation significative des valeurs de l'urée chez le groupe d'animaux qui a été exposé au Hg en comparaison avec le groupe d'animaux témoins ($P < 0.05$) et une élévation non significative de la créatinine chez le groupe Hg ($P > 0.05$). Cependant, le lot Hg-HEA a révélé une diminution significative des valeurs de l'urée ($P < 0.05$) et une diminution non significative des valeurs de la créatinine par rapport à celle du lot intoxiqué ($P > 0.05$).

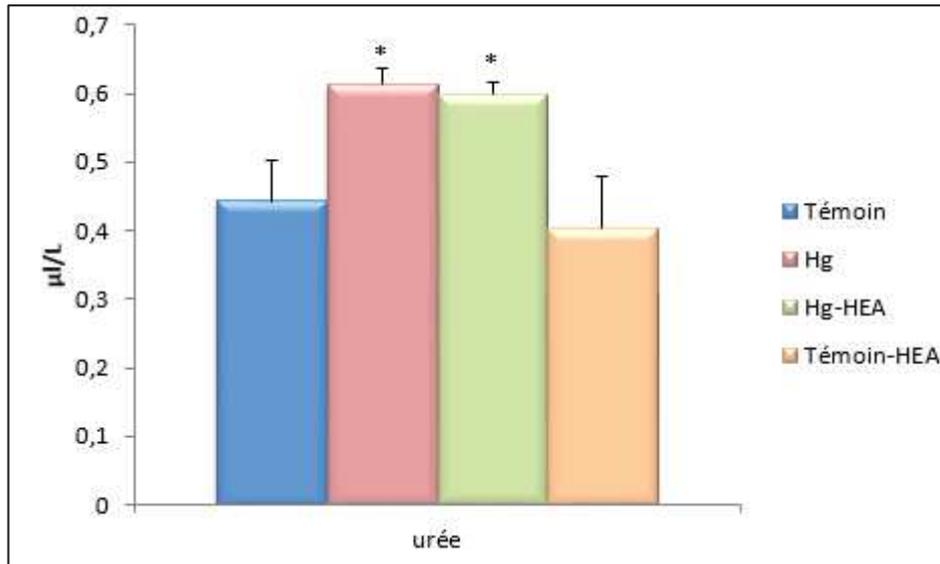


Figure 35: Comparaison entre les valeurs de l'urée sanguine des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ($P < 0.05$)

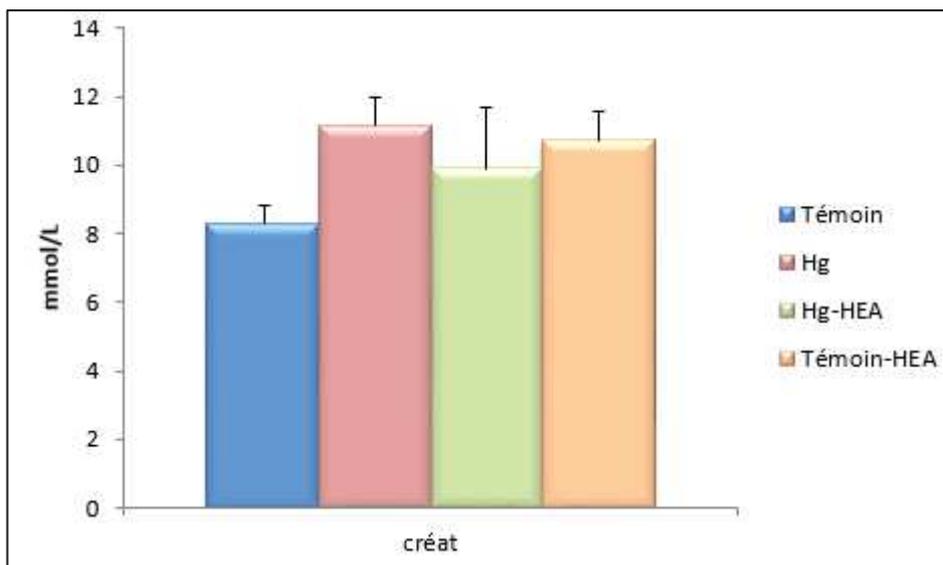


Figure 36: Comparaison entre les valeurs de la créatinine sanguine des lots : Témoin, Hg, Hg-HEA et Témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.

IV. 6. L'histologie du foie et du rein :

L'étude histologique du foie des jeunes rats intoxiqués par le chlorure de mercure a montré que son architecture est conservée avec une congestion vasculaire sévère et une hypertrophie des hépatocytes. Par ailleurs, le foie des rats exposés au HgCl_2 et traité par HE présente une dégénérescence vacuolaire, la présence des foyers binucléaires, la présence des cellules de

Résultats et Interprétations

Kupffer ainsi qu'une légère congestion. En outre, les hépatocytes des rats témoin-HEA présentent une légère congestion et une dégénérescence locale.

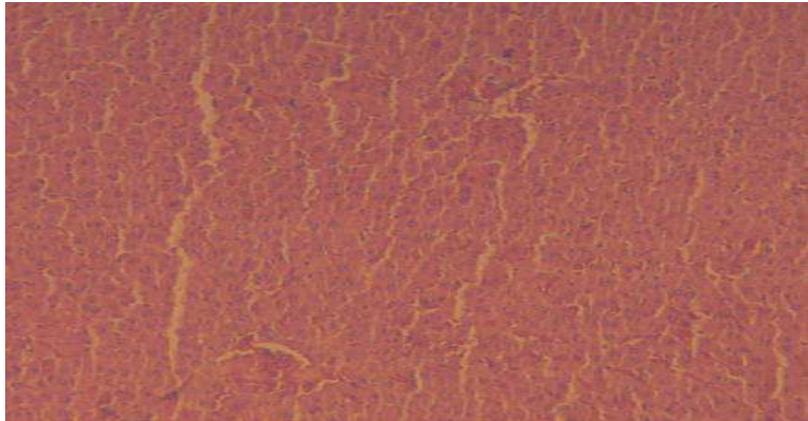


Figure 37 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat témoin avec Gr×10

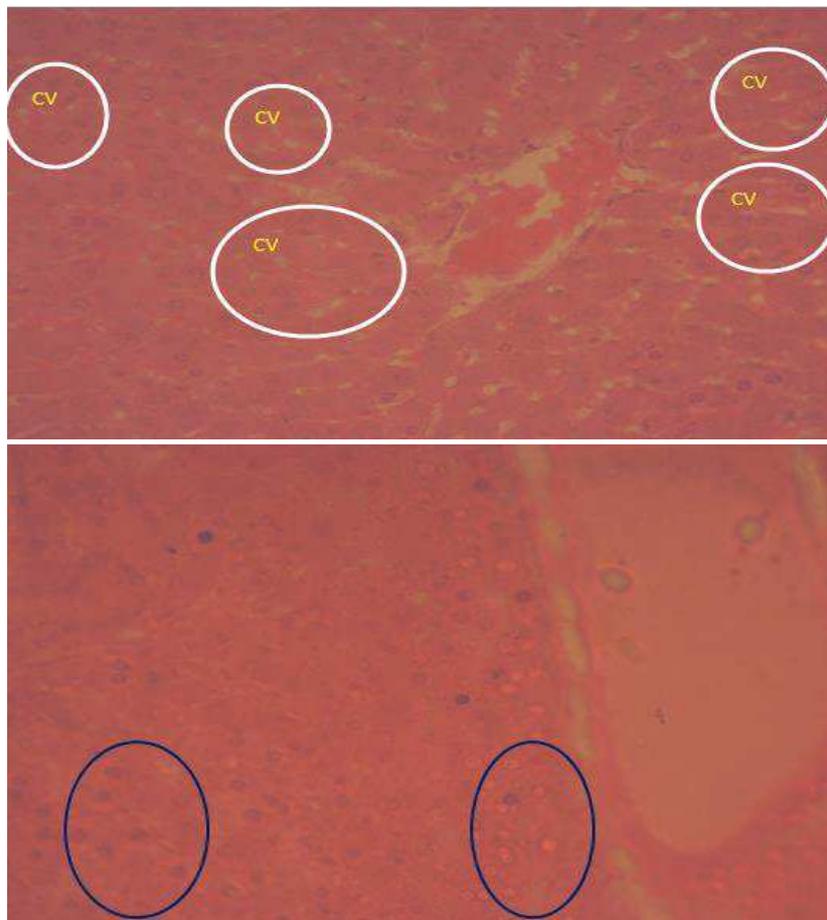


Figure 38 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat intoxiqué par le Hg avec Gr×40.
CV: congestion vasculaire, cercle bleu : hypertrophie des hépatocytes

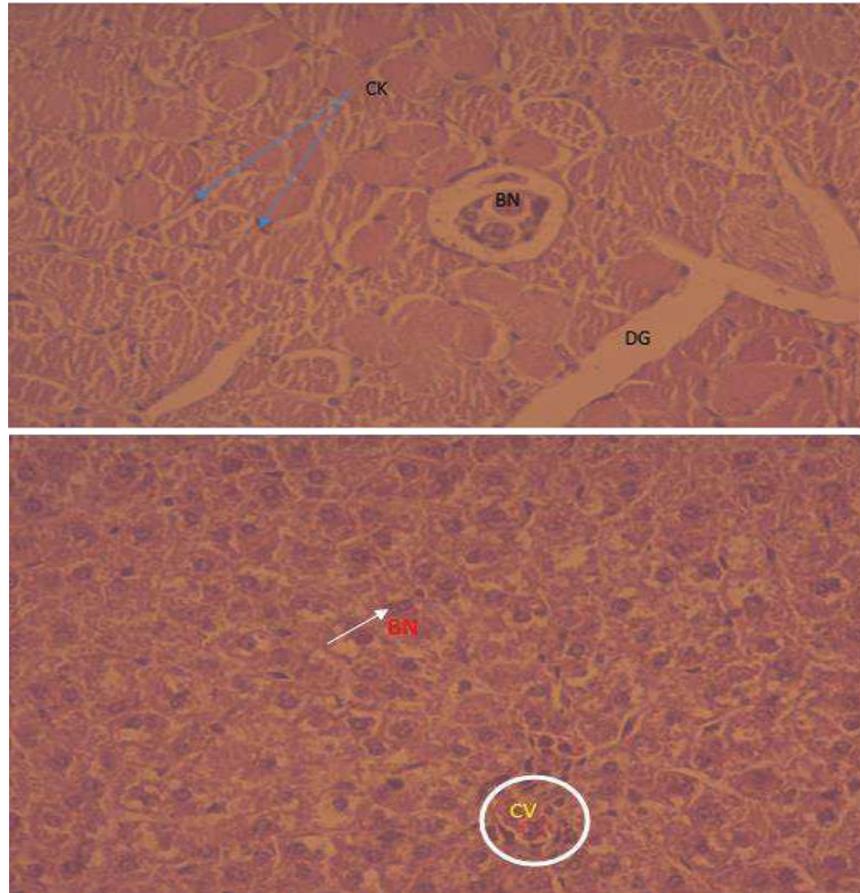


Figure 39 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat Hg-HEA avec Gr×40. DG : dégénérescence, BN : foyer binucléaire, CK : cellules de Kupffer , CV: congestion

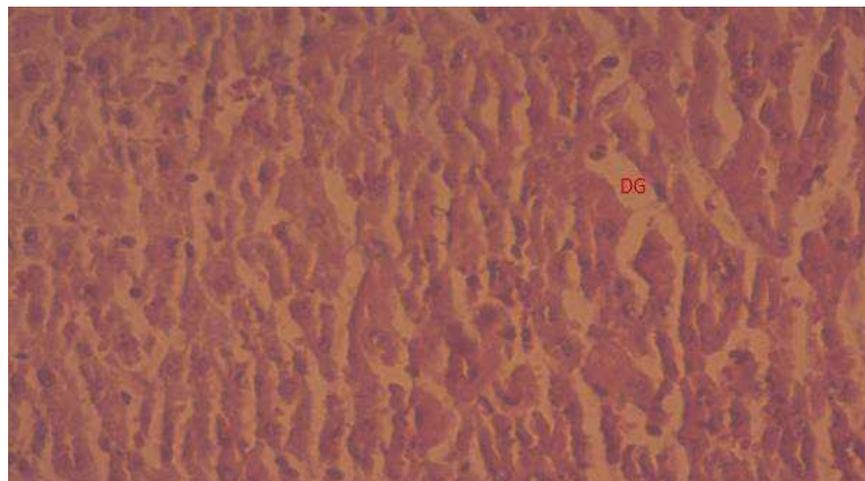


Figure 40 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat Témoin-HEA avec Gr×40. DG : dégénérescence

L'étude histologique du rein a révélé chez le groupe d'animaux intoxiqués des glomérules qui présentent des lésions avec un aspect pain à cacheter. La présence d'une glomérulonéphrite chronique.

Résultats et Interprétations

Par ailleurs, les rats exposés au mercure et traités par l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* présente une lésion tubulaire, dégénérescence avec tuméfaction des cellules des tubes contournés proximaux et distaux. Quelques glomérules présentent une atrophie et la présence d'une légère congestion. En outre, le rein du rat témoin- HEA présente des glomérules et tubules avec un aspect normal ainsi que la présence d'une légère congestion.

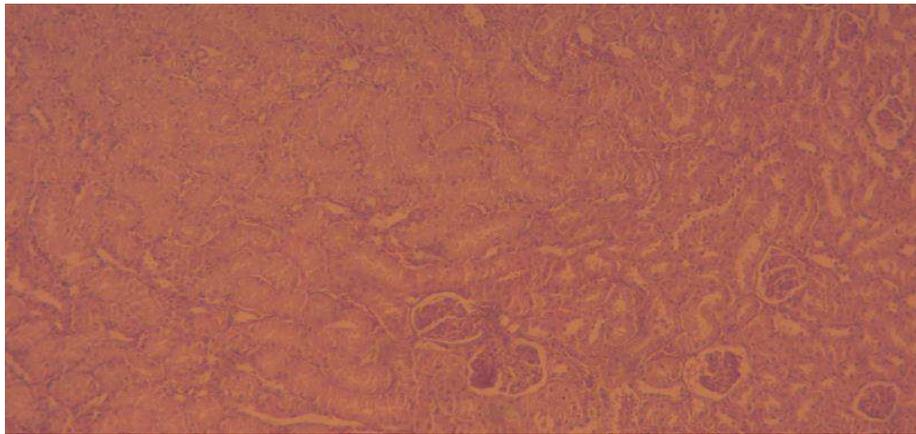


Figure41 : Coupe histologique au niveau du rein d'un rat témoin avec Gr×10.

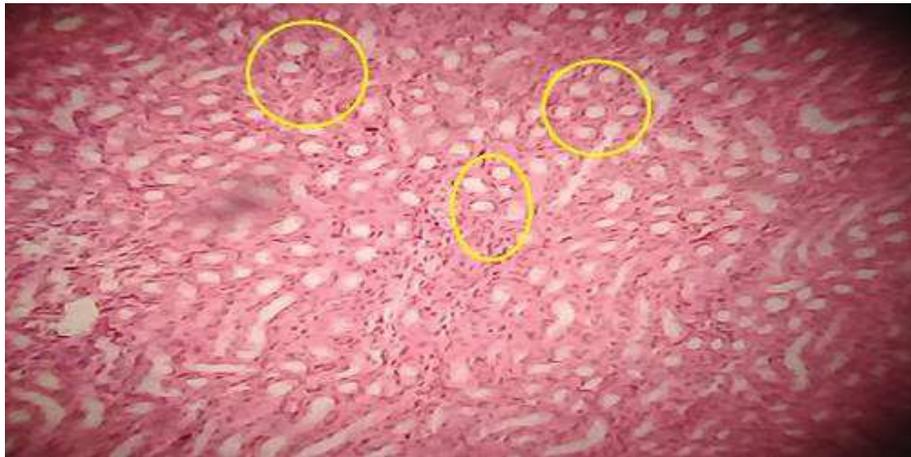


Figure 42 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué avec Gr×10. Cercle jaune : lésion glomérulaire

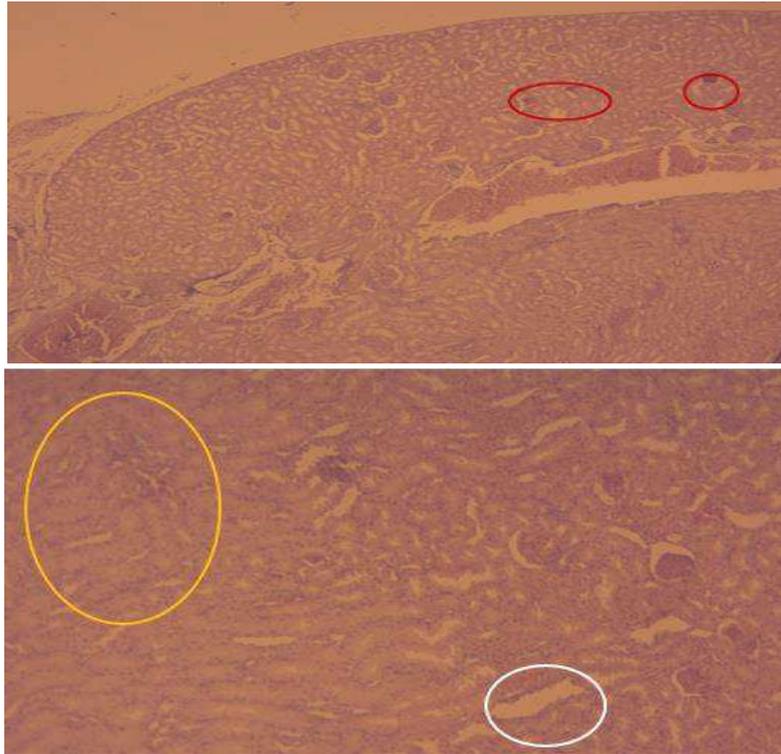


Figure 43 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué-HEA avec Gr×10. Cercle rouge : congestion vasculaire, cercle blanc : dégénérescence tubulaire, cercle jaune : atrophie glomérulaire.

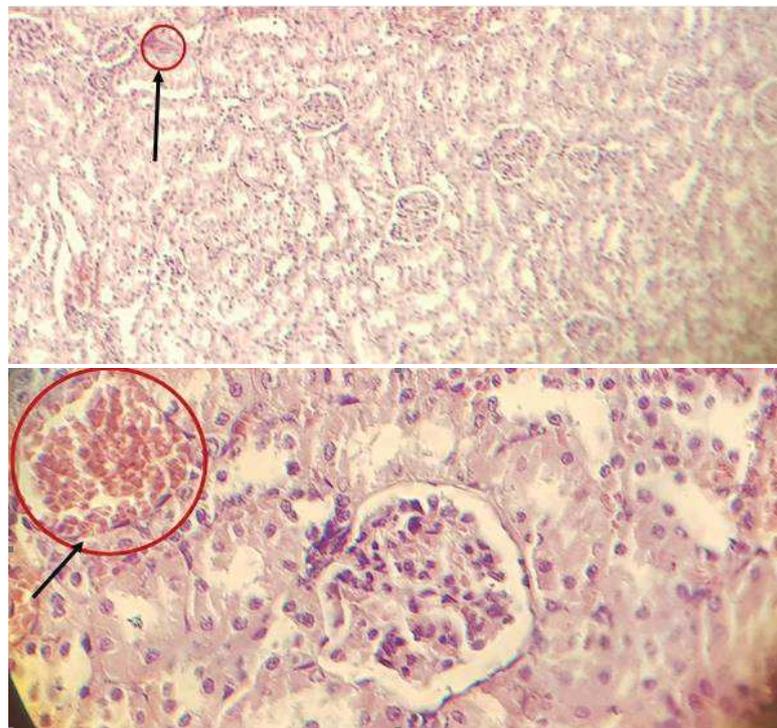


Figure 44 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat Témoin-HEA avec Gr×10 et Gr×40. Cercle rouge : congestion

IV.7. Les paramètres hématologiques :

Le nombre des leucocytes chez les rats intoxiqués est élevé d'une manière non significative par rapport à celui des rats témoins ($p > 0,05$). Une augmentation non significative du nombre des leucocytes ($p > 0,05$) a été enregistrée chez les groupes d'animaux traités : témoin-HEA et Hg-HEA en comparaison avec les groupes d'animaux non traités : témoin et Hg respectivement.

Les taux des globules rouges et d'hémoglobines des animaux exposés au mercure sont significativement inférieurs à ceux des animaux témoins ($p < 0,05$). Par ailleurs, nous avons enregistré une élévation significative des taux des globules rouges et d'hémoglobines du groupe Hg-HEA en comparaison avec le groupe Hg ($p < 0,05$). De plus, une diminution significative du taux des hématies des témoins-HEA a été remarquée par rapport à celle des témoins ($p < 0,05$).

Pour le pourcentage d'hématocrite et le taux des plaquettes, nous avons obtenues une réduction non significative chez le lot exposé au mercure en comparaison avec le lot témoin ($p > 0,05$). En outre, une élévation non significative des taux d'hématocrite et des plaquettes des rats Hg-HEA par rapport aux rats Hg ($p > 0,05$).

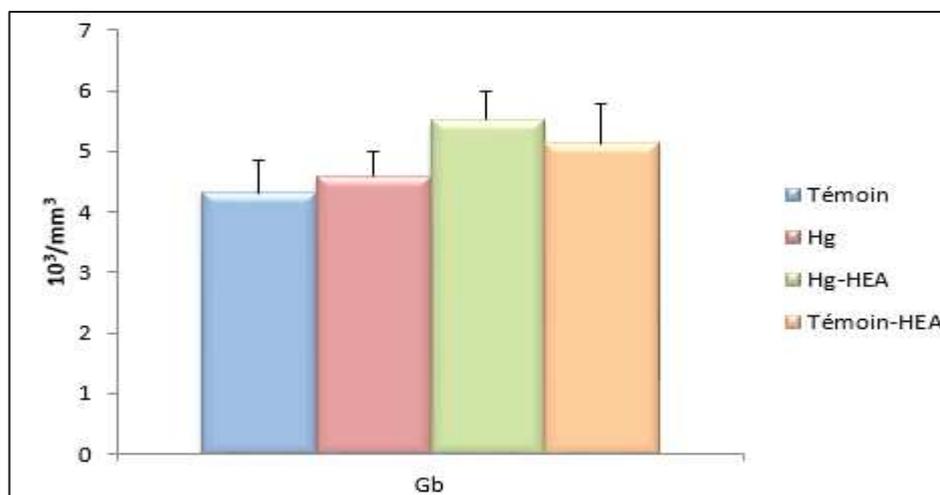


Figure 45 : Comparaison entre le nombre des globules blancs des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM . ($P > 0,05$)

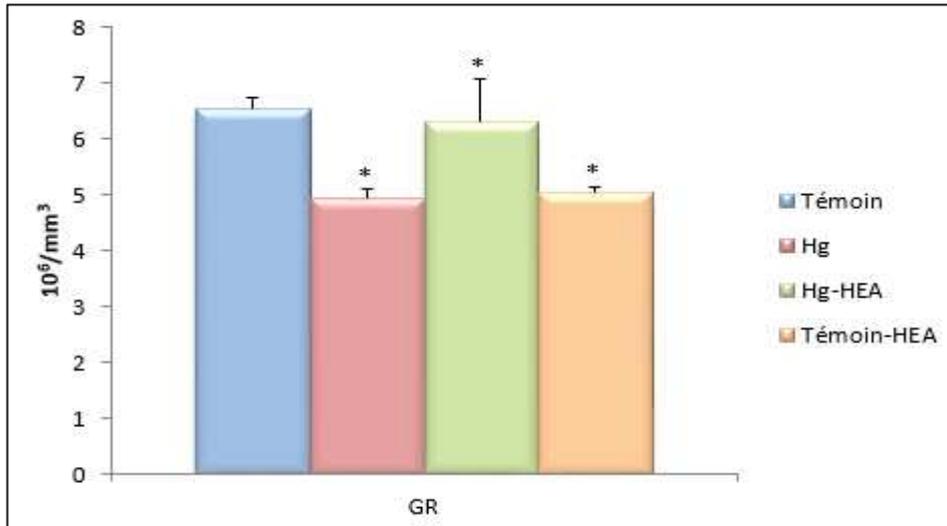


Figure 46 : Comparaison entre le nombre des globules rouges des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; *P < 0.05 (Hg vs. Hg-HEA) ; *P < 0.05 (Témoin vs.Témoin-HEA).

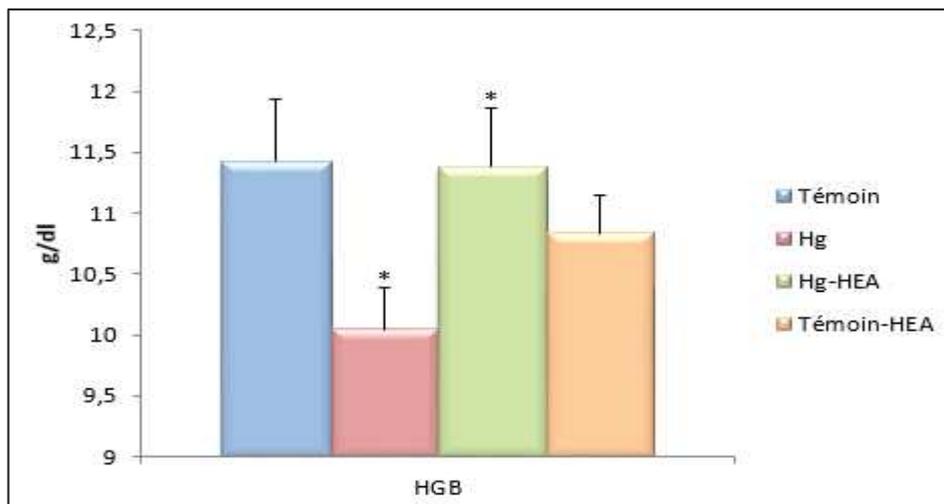


Figure 47 : Comparaison entre le taux d'hémoglobine exprimé des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; *P < 0.05 (Hg vs. Hg-HEA) .

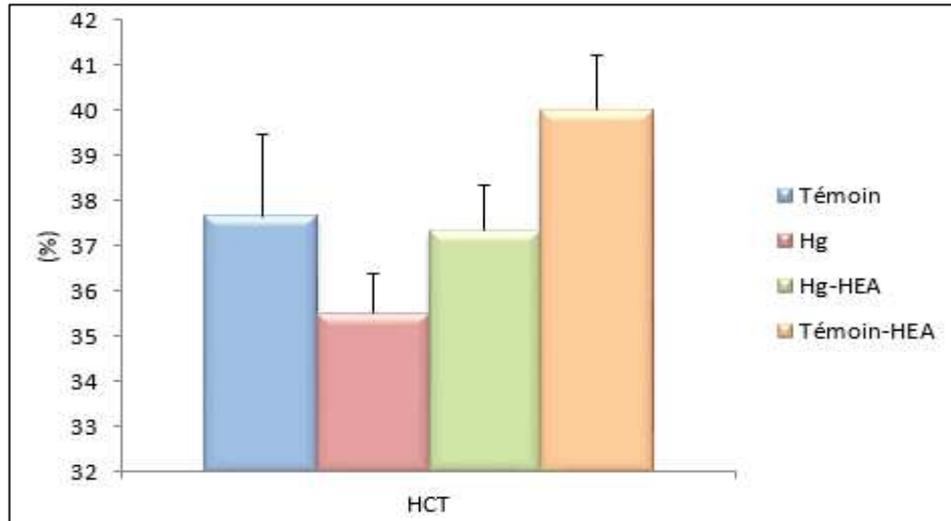


Figure 48 : Comparaison entre le pourcentage d'hématocrite des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ($P > 0.05$)

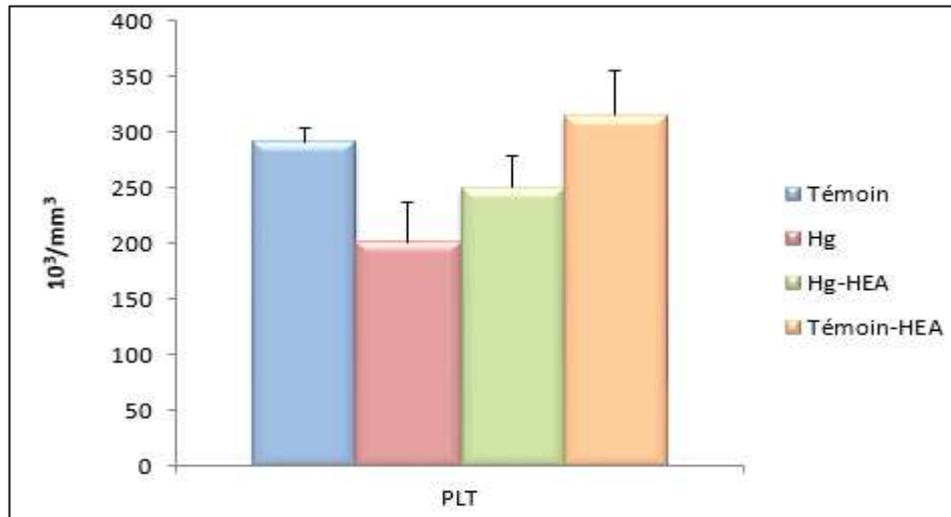


Figure 49 : Comparaison entre le taux des plaquettes des lots : témoin, Hg, Hg-HEA et témoin-HEA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. ($P > 0.05$)

V. Résultats du traitement par l'extrait aqueux :

V. 1. L'évaluation du poids :

V.1.1. Le poids corporel :

L'évaluation du poids corporel a montré que le poids des animaux exposés au mercure est significativement inférieur à celui des animaux témoins ($P < 0.001$). En outre, le traitement

Résultats et Interprétations

par l'extrait aqueux de *P.anisum* a réduit d'une manière significative le poids du lot intoxiqué traité par rapport à celui du lot intoxiqué ($P < 0.001$).

Tableau 13 : Variation du poids corporel. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM :
*** ($P < 0.001$)

Le lot	Le poids corporel (g)
Témoin	48,85 \pm 3,17
Hg	38,28 \pm 0,64***
Hg-EAA	28,85 \pm 0,59***
Témoin-EAA	44,57 \pm 1,13

V.1.2. Le poids des organes :

Les résultats relatifs au poids des organes ont révélé une diminution significative du poids de cerveaux des rats exposés au Hg en comparaison à celui des rats témoins ($p < 0,05$).

Pour la variation du poids des reins, nous avons enregistré une diminution significative du poids des reins des lots Hg-EAA et témoin-EAA en comparaison avec les lots Hg et témoin respectivement ($P < 0.001$).

Le poids hépatique est significativement inférieur chez le Hg-EAA en comparativement avec le lot Hg ($P < 0.01$).

Tableau 14 : Variation des poids des organes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$)

Poids(g) Groupes	Cerveau	Rein	Foie
Témoin	1,62 \pm 0,02	1,02 \pm 0,01	4,12 \pm 0,10
Hg	1,51 \pm 0,01*	1,12 \pm 0,5	4,82 \pm 0,2
Hg-EAA	1,45 \pm 0,038	0,70 \pm 0,04***	3,59 \pm 0,09**
Témoin-EAA	1,38 \pm 0,02***	0,73 \pm 0,04***	4,31 \pm 0,34

V.2. Résultats neurocomportementaux :

V.2.1. La nage forcée :

L'analyse statistique a révélé un temps d'immobilité des animaux exposés au Hg significativement élevé à celui des animaux témoins ($p < 0,001$). Cependant, les rats intoxiqués et traités par EAA ont un temps d'immobilité significativement réduit à celui des rats intoxiqués ($p < 0,001$). De plus, le groupe intoxiqué traité Hg-EAA a un temps d'immobilité significativement inférieur à celui du témoin-EAA ($p < 0,001$). Concernant les animaux témoins-EAA ont un temps d'immobilité significativement élevé par rapport à celui des animaux témoins ($p < 0,01$).

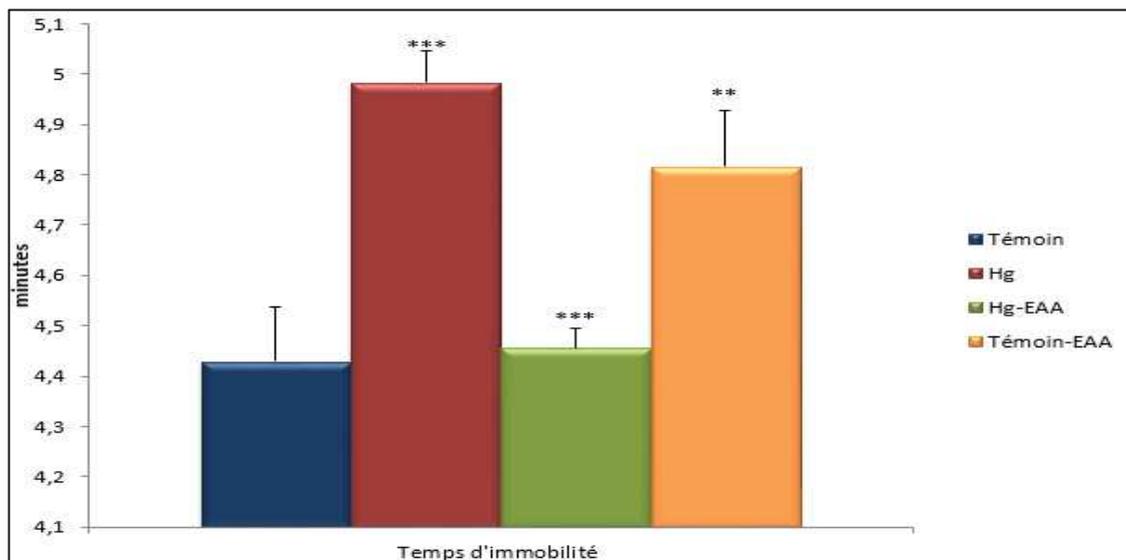


Figure 50 : Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins, intoxiqués, Témoin-EAA, Hg-EAA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** $P < 0,001$ (Témoin vs. Hg), *** $P < 0,001$ (Hg vs. Hg-EAA), ** $P < 0,01$ (Témoin-EAA vs. Hg-EAA), ** $P < 0,01$ (Témoin vs. Témoin-EAA)

V.2.2. Open field :

Les résultats de l'open field présentent un nombre des carreaux traversés par les rats issus des femelles exposés au mercure et un nombre de visite du centre significativement inférieur à ceux des rats témoins ($p < 0,01$), ($p < 0,05$) respectivement.

Cependant, le nombre de carreaux traversés par les rats exposés au mercure et traités par l'extrait Hg-EAA ainsi que le nombre de visite du centre sont élevés d'une manière non significative par rapport à ceux du groupe Hg ($p > 0,05$).

En outre, le nombre de carreaux traversés par le lot témoin-EAA est significativement inférieur à celui du lot témoin ($p < 0,05$). Pour le nombre de visite du centre, une diminution

Résultats et Interprétations

significative a été remarqué chez le lot témoin-EAA en comparaison avec le lot témoin ($p < 0,05$).

Concernant le redressement, aucune différence significative n'a été remarquée entre les groupes ($p > 0,05$).

Le nombre de toilettage des animaux Hg-EAA est significativement élevé à celui des animaux exposés au mercure ($p < 0,001$) de même pour le lot témoin-EAA en comparaison avec le lot témoins ($p < 0,05$). De plus, le nombre de toilettage des Hg-EAA est significativement élevé à celui des témoins-EAA ($p < 0,001$).

Le nombre de défécation des rats intoxiqués est significativement élevé par rapport aux rats témoins ($p < 0,001$). Par ailleurs, le nombre de défécation des rats intoxiqués traités est significativement inférieur à celui des rats intoxiqués ($p < 0,01$).

Pour le temps de latence, les valeurs enregistrées montrent une augmentation non significative de ce paramètre chez le groupe exposé au Hg en comparaison avec le groupe témoin ($p > 0,05$). Cependant, le temps de latence du groupe Hg-EAA est significativement inférieur à celui du groupe Hg ($p < 0,001$). Les rats témoin-EAA présentent un temps de latence significativement élevé par rapport aux rats témoins ($p < 0,001$).

Tableau 15 : les paramètres mesurés du test de l'open field. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001

Groupes	Nombre de carreaux traversés	Nombre de visite du centre	Redressement	Toilettage	Défécation	Temps de latence
Témoin	150,85 \pm 10,10	4,14 \pm 1,83	7,71 \pm 2,45	3,57 \pm 0,68	1,28 \pm 0,6	0
Hg	76 \pm 20,28**	0,28 \pm 0,18*	3,85 \pm 0,63	3,71 \pm 0,35	5,42 \pm 0,68***	1,48 \pm 0,67
Hg-EAA	107,57 \pm 22,44	1,42 \pm 0,68	7,85 \pm 1,10	5,2 \pm 0,18***	1,71 \pm 0,42**	0,85 \pm 0,55***
Témoin-EAA	96,28 \pm 10,05*	0,28 \pm 0,18*	4,42 \pm 0,52	2,14 \pm 0,34*	3,42 \pm 1,25	14 \pm 2,12***

V.2.3. La piscine de Morris :

Résultats et Interprétations

Durant le 1^{er}, 2^{ème} et 4^{ème} jours d'apprentissage il existe une augmentation significative dans le temps de latence des animaux du lot intoxiqué en comparaison avec celui des animaux du lot témoin ($p < 0,001$), ($p < 0,01$), ($p < 0,01$) respectivement.

Pour lot Hg-EAA, le temps de latence durant le 1^{er}, le 2^{ème} et le 4^{ème} jours d'apprentissage est significativement inférieur à celui du lot Hg ($p < 0,001$), ($p < 0,01$), ($p < 0,05$) respectivement.

De plus, le temps de latence des rats témoins EAA est significativement élevé par rapport à celui des rats témoins ($p < 0,001$) durant le 1^{er} jour. Aucune différence significative n'a été remarquée entre ces deux groupes durant le 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jour de la phase d'apprentissage ($p > 0,05$).

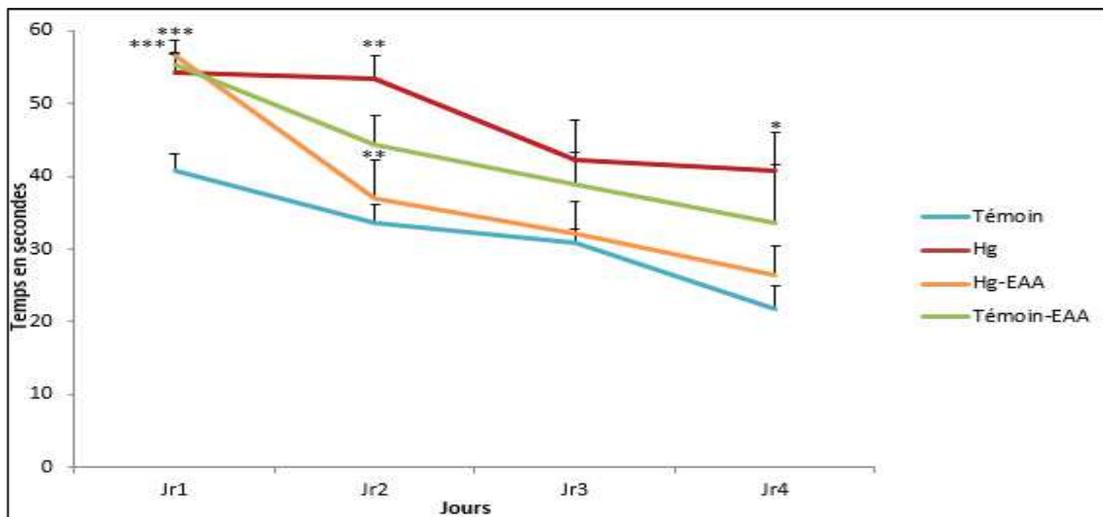


Figure 51 : L'évaluation de l'effet curatif de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : Jr 1 :*** $P < 0,001$ (Témoin vs.Hg). *** $P < 0,001$ (Témoin vs. Témoin-EAA). Jr2 : * $P < 0,01$ (Témoin vs.Hg). ** $P < 0,01$ (Hg vs.Hg-EAA). Jr3 :* $P < 0,05$ (Témoin vs.Hg). * $P < 0,05$. Jr4 :** $P < 0,01$ (Témoin vs.Hg). ** $P < 0,05$ (Hg vs. Hg-EAA)

V.2.3.1. Le probe test :

L'analyse statistique a révélé une réduction significative dans le temps de latence dans le quadrant NO des rats exposés au mercure en comparaison avec celui des rats témoins ($P < 0,05$). De plus, le temps de latence du groupe Hg-EAA est significativement élevé en comparaison avec les Hg non traité ($p < 0,01$).

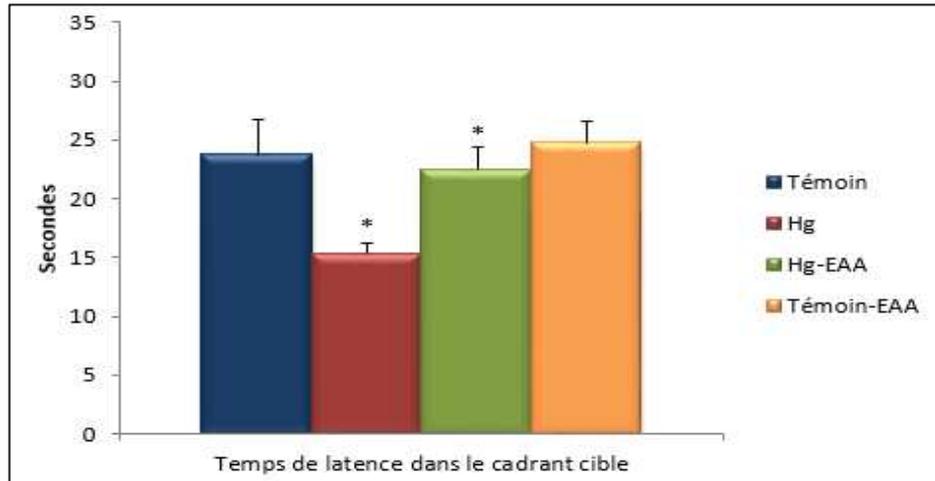


Figure 52 : Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités (EAA). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs. Hg-EAA)

V.2.3.2. Test visible :

Durant ce test, le groupe d'animaux exposés au mercure a un temps de latence significativement élevé afin d'arriver à la plateforme malgré que cette dernière est visible en comparaison avec le groupe d'animaux témoin ($p < 0,05$). Par ailleurs, le lot Hg-EAA, a mis un temps de latence inférieur d'une façon significative pour arriver à la plateforme par rapport à celui du lot intoxiqué ($p < 0,01$). En outre, les témoins qui ont été traité par l'EAA ont un temps de latence significativement très élevé à celui des témoins ($p < 0,001$).

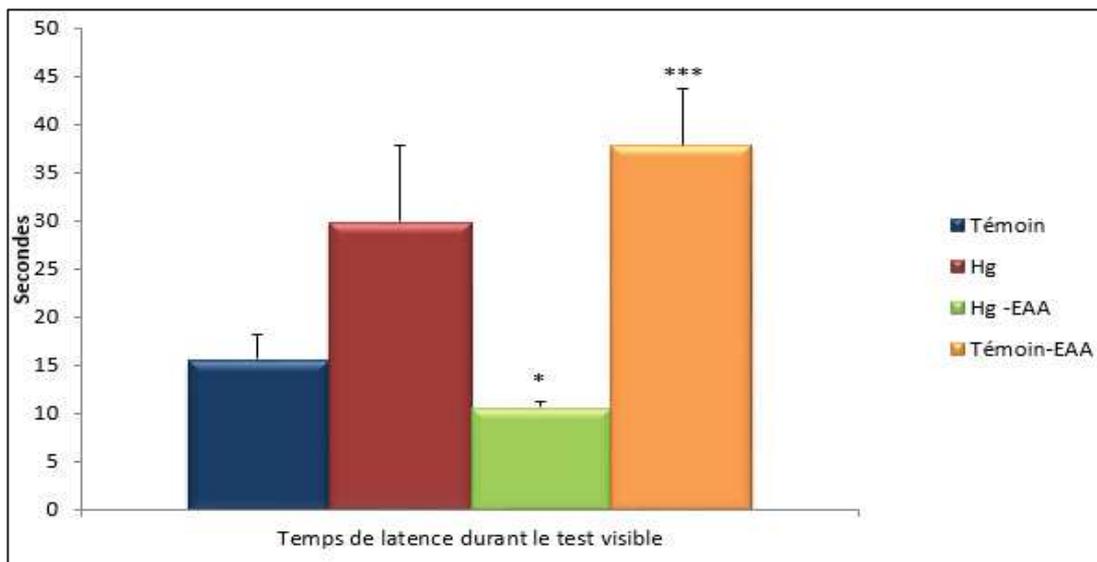


Figure 53 : Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Hg) ; **P < 0.01 (Hg vs. Hg-EAA) ; ***P < 0.001 (Témoin vs. Témoin-EAA)

V.2.4. Le double compartiment obscurité/lumière :

Le paramètre mesuré dans ce test a montré que les animaux intoxiqués passent un temps significativement élevé dans le compartiment sombre durant les 5 min de test ($p < 0,001$) en comparaison avec le temps passé par les animaux témoins.

Cependant, les rats exposés au Hg ensuite traités par EAA ont tendance de passer plus de temps dans le compartiment sombre en comparaison avec les rats exposés au Hg, en terme statistique il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$). En outre, les rats témoins traités par EAA mettent plus de temps dans le compartiment sombre et peu de temps dans le compartiment clair en comparaison avec les rats témoins ($p < 0,05$).

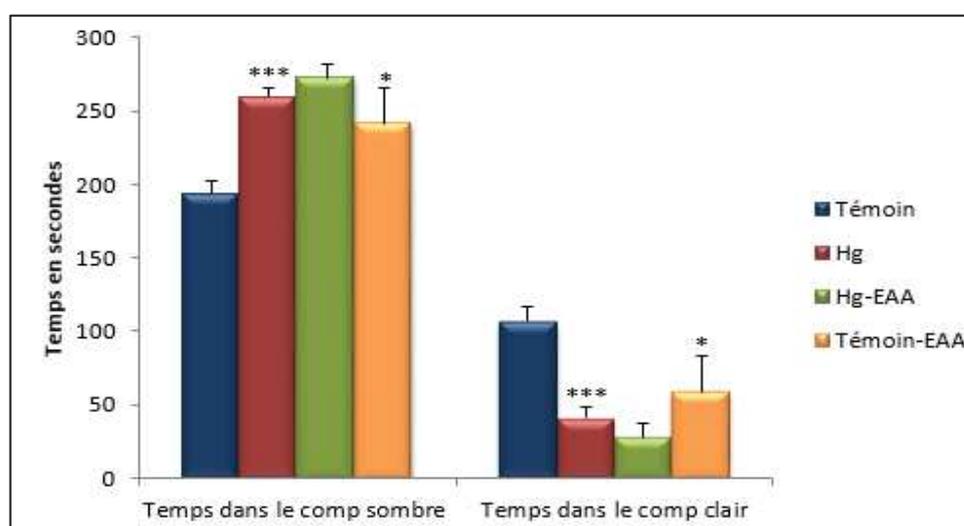


Figure 54 : Comparaison de l'effet de EAA sur l'anxiété chez les rats exposés au Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** $P < 0.001$ (Témoin vs. Hg), * $P < 0.05$ (Témoin. Vs. Témoin-EAA)

V.3. Dosage du mercure au niveau sanguin et cérébral :

Les résultats relatifs au dosage du mercure par la spectrophotométrie à absorption atomique ont révélé des concentrations élevées de mercure au niveau sanguin et cérébral chez le groupe d'animaux qui ont subis l'intoxication en période de gestation et lactation en comparaison avec le groupe d'animaux témoins et en comparaison avec le groupe intoxiqué traité par l'extrait aqueux. Ces derniers montrent le pouvoir de l'extrait de l'anis à diminuer la concentration du mercure au niveau sanguin et cérébral.

Tableau 16 : Evaluation de la mercurémie et du mercure cérébral

	Mercurémie $\mu\text{g.L}^{-1}$	Mercure cérébral $\mu\text{g.L}^{-1}$
Témoin	0,20	3,10
Hg	8,11	20,09
Hg-EAA	2,89	8,64

V.4.L'histologie du cerveau :

L'histologie du cerveau des rats exposés au mercure en période de gestation et lactation et traités par l'extrait aqueux de *P.anisum* a montré la présence d'un nombre important de cellules gliales, les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles ainsi qu'une congestion vasculaire, sachant que l'exposition au mercure a induit une dégénérescence des cellules de purkinje, la présence des microglies, des lésions, des congestions vasculaires et les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles . De plus, le cerveau des témoins traités par l'extrait présente une architecture et un nombre de cellule normal.

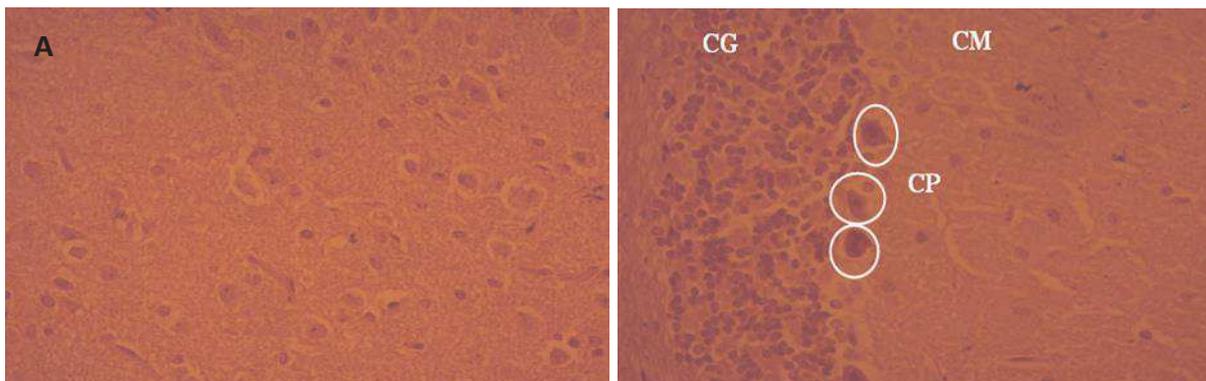


Figure 55 : Des coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin avec Gr \times 40, CG : couche granuleuse, CP : cellule de purkinje, CM : couche moléculaire

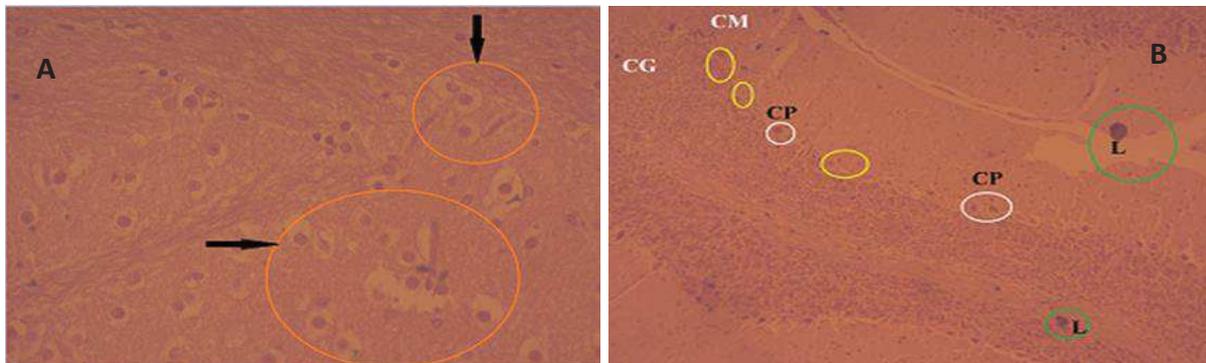


Figure 56 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué par le HgCl₂ avec Gr \times 40 et Gr \times 10 , CG :couche granuleuse, CM : couche

moléculaire, cercle jaune : dégénérescence de cellules de purkinje, cercle vert : congestion vasculaire, cercle orange : vacuolisation des corps cellulaires, cercle blanc : cellule de purkinje

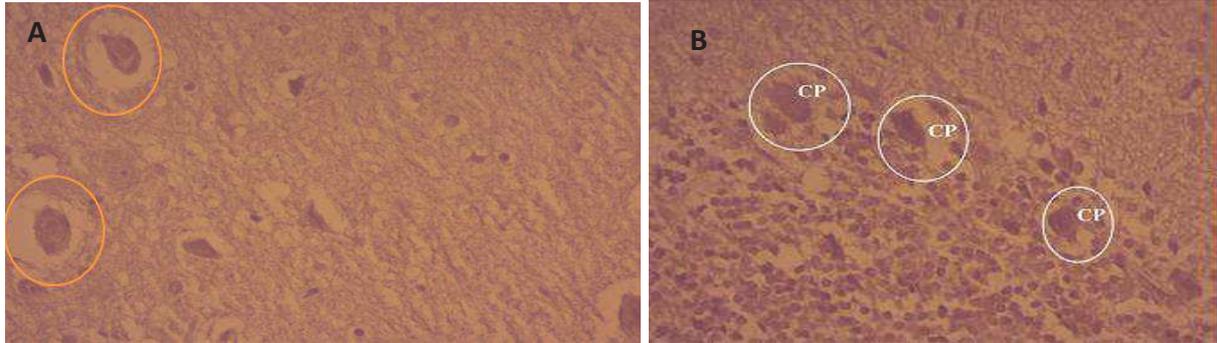


Figure 57 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat intoxiqué traité par l'extrait avec Gr×40, cercle orange : vacuolisation des corps cellulaires, cercle blanc : cellule de purkinje

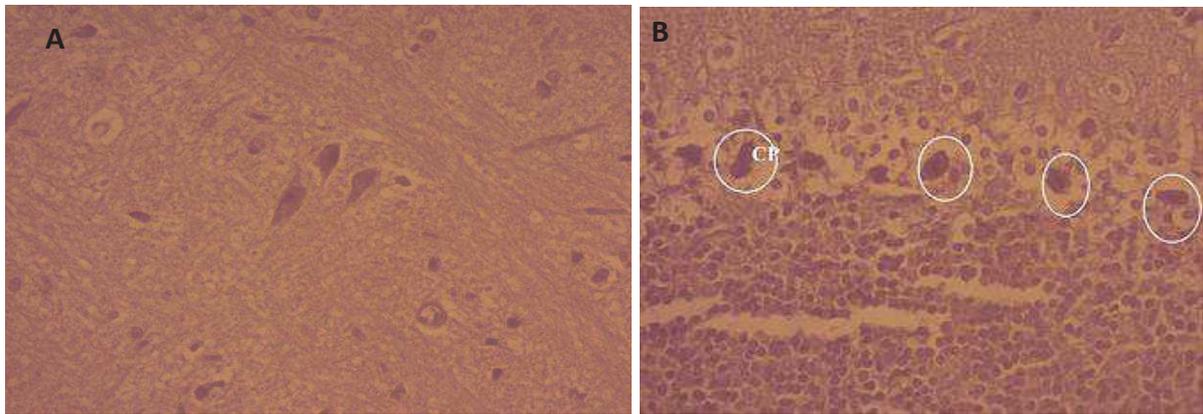


Figure 58 : Coupes histologiques au niveau du cortex cérébral (A) et cervelet (B) d'un rat témoin traité par l'extrait aqueux avec Gr×40 ; Cercle blanc : cellule de purkinje.

V.5. Les paramètres biochimiques :

V.5.1. Dosage de la glycémie

Le résultat de dosage de glucose sanguin nous a montré que les animaux exposés au mercure ont un taux de glucose significativement inférieur à celui des animaux témoins ($P < 0.001$). Cependant, les animaux intoxiqués traités avaient une glycémie significativement élevée à celle des animaux intoxiqués ($P < 0.001$). De plus, le taux du glucose sanguin des rats témoins traités par l'extrait d'anis est significativement inférieur à celui des rats témoins ($P < 0.001$).

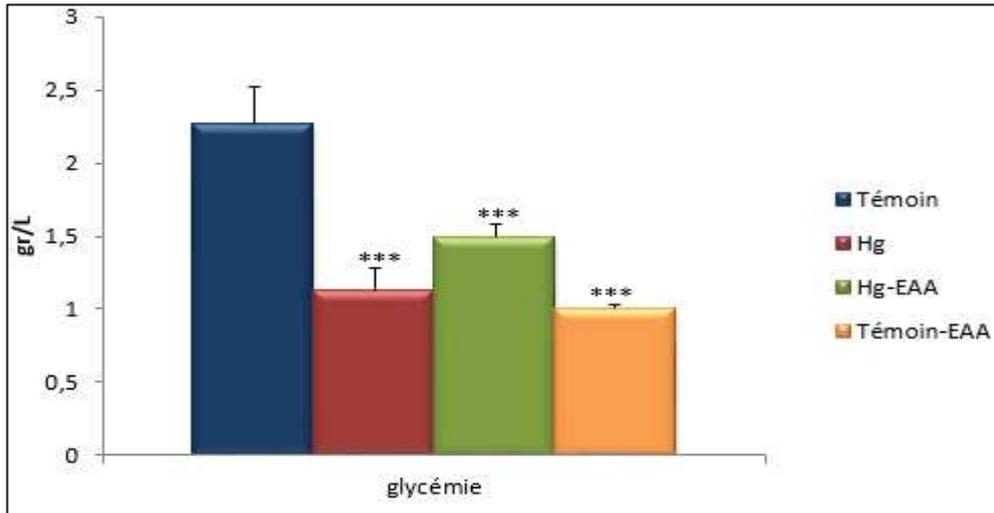


Figure 59 : Comparaison entre les valeurs de la glycémie des témoins, Hg et Hg-EAA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * $P < 0.05$ (Témoin vs.Hg) ; *** $P < 0.001$ (Hg vs. Hg-EAA) ; *** $P < 0.001$ (Témoin vs. Témoin-EAA)

V.5.2. Exploration de la fonction hépatique :

Le dosage des transaminases a révélé une augmentation significative dans les taux du ASAT et ALAT du groupe exposé au mercure en comparaison avec le groupe témoin ($P < 0.01$), ($P < 0.001$). Cependant, pour le groupe intoxiqué traité par EAA nous avons remarqué une diminution significative des taux sériques d'ASAT et ALAT en comparaison avec le groupe intoxiqué ($P < 0.001$). De plus, les valeurs d'ASAT et ALAT ont subis une diminution significative chez le lot Hg-EAA en comparaison avec le lot témoin-EAA ($P < 0.05$), ($P < 0.001$) respectivement.

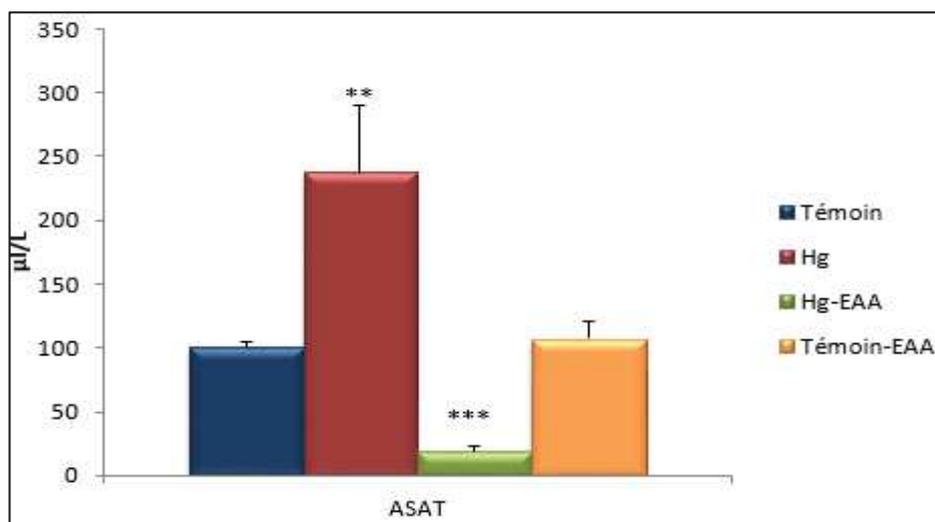


Figure 60 : Comparaison entre les Teneurs sériques du ASAT des : Témoins, Hg et Extrait-Hg . Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : **P < 0.01(Témoins vs.Hg) ; ***P < 0.001 (Hg vs. Hg-EAA)

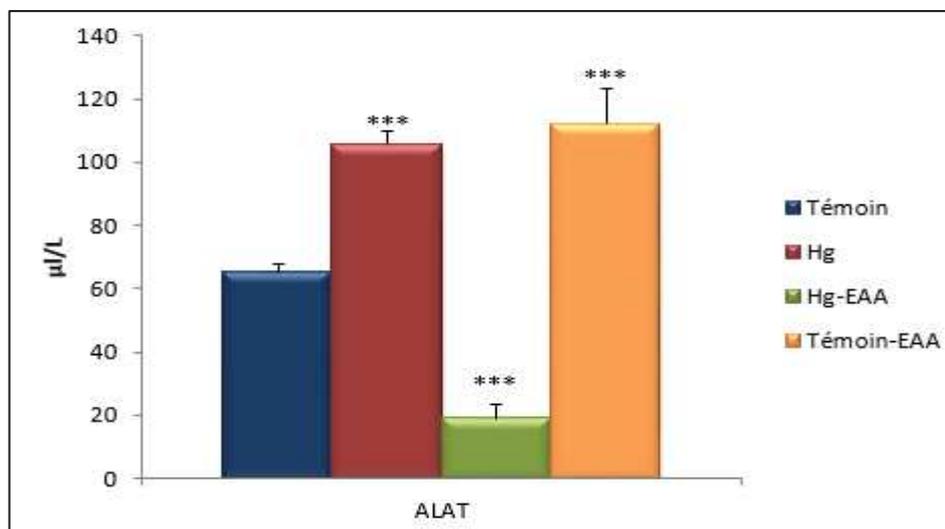


Figure 61 : Comparaison entre les teneurs sériques du ALAT des : Témoins, Hg et Extrait-Hg . Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : **P < 0.01(Témoins vs.Hg) ***P < 0.001(Hg vs. Hg-EAA)

V.5.3. Exploration de la fonction rénale :

Le dosage de l'urée et de la créatinine a révélé que leurs taux sont élevés chez les rats qui ont subi l'intoxication en comparaison avec les rats témoins ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) respectivement. Cependant, les rats exposés au mercure et traité avec l'extrait d'anis ont un taux de l'urée et de créatinine significativement inférieur à ceux des rats intoxiqués ($P < 0.05$), ($P < 0.001$) respectivement. En outre, il existe une différence significative dans le taux de l'urée entre les lots suivants : témoin et témoin-EAA ($P < 0.001$) et entre Hg-EAA et témoin- EAA ($P < 0.05$).

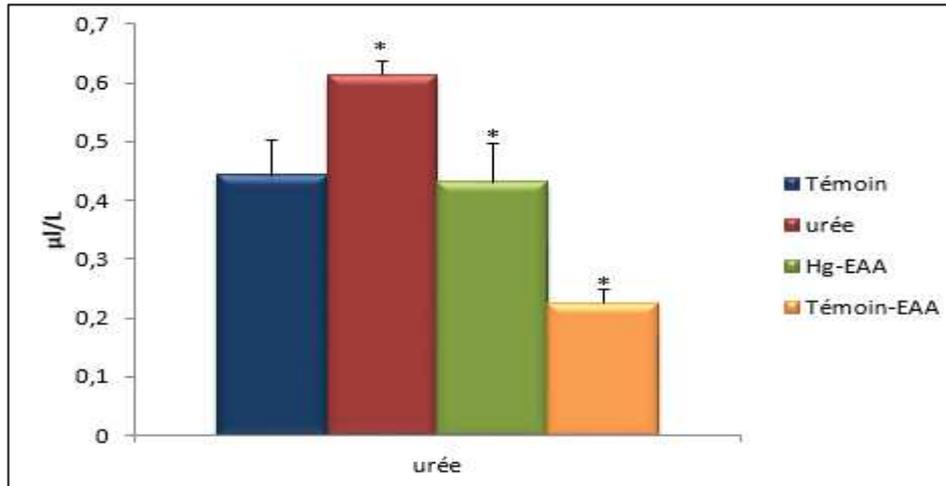


Figure 62 : Comparaison entre les valeurs de l'urée sanguine des témoins, Hg et Hg-EAA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05(Hg vs. Extrait Hg)

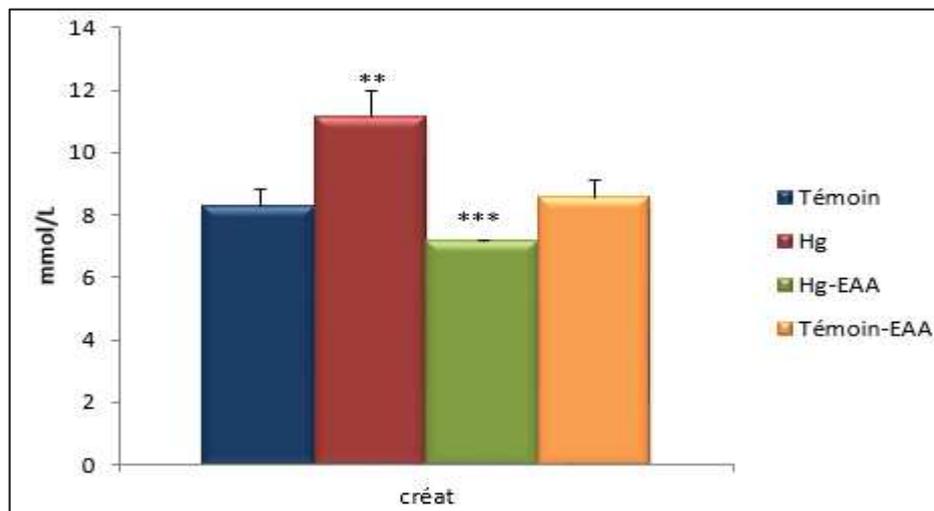


Figure 63 : Comparaison entre les valeurs de la créatine sanguine des témoins, Hg et Hg-EAA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : **P < 0.01(Témoin vs.Hg) ***P < 0.001(Hg vs. Extrait Hg)

V.6. L'histologie du foie et du rein :

Concernant le groupe d'animaux traités par l'extrait aqueux d'anis suite à l'exposition au chlorure de mercure, l'étude histologique a révélé la présence des lésions périphériques, des foyers de nécroses, des capillaires sinusoides normaux et la présence d'un nombre important des cellules de Kupffer en comparaison avec les animaux intoxiqués qui présentaient une congestion vasculaire sévère et une hypertrophie des hépatocytes. En outre, le foie des rats

Résultats et Interprétations

témoin-EAA a montré une éosinophilie de certaines cellules, des cellules qui sont en cours de division et une légère congestion.

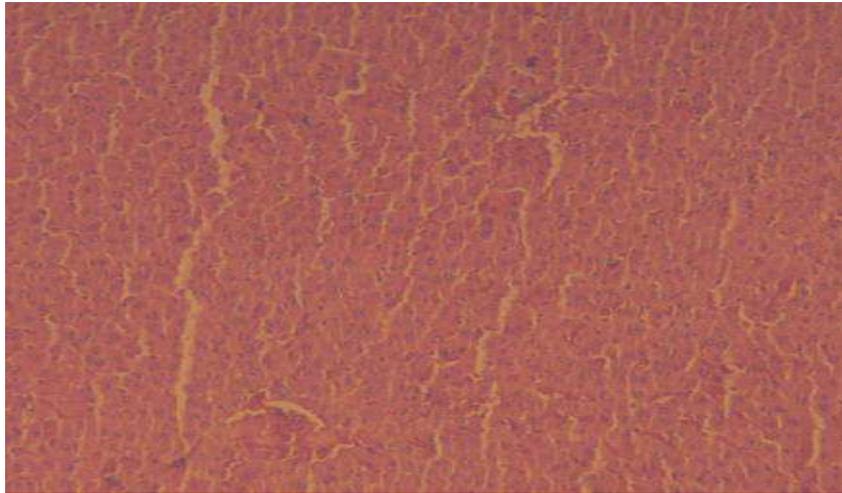
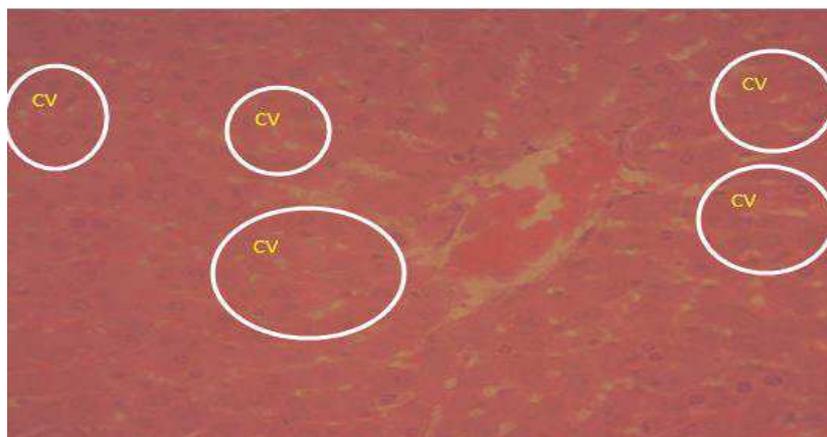


Figure 64 : Coupe histologique au niveau du foie d'un rat témoin avec Gr×10



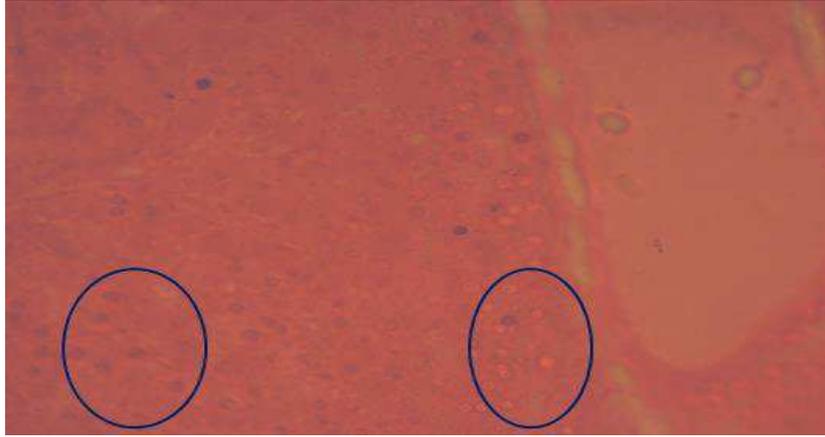


Figure 65 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat intoxiqué par le Hg avec Gr×40.
CV: congestion vasculaire, cercle bleu : hypertrophie des hépatocytes .

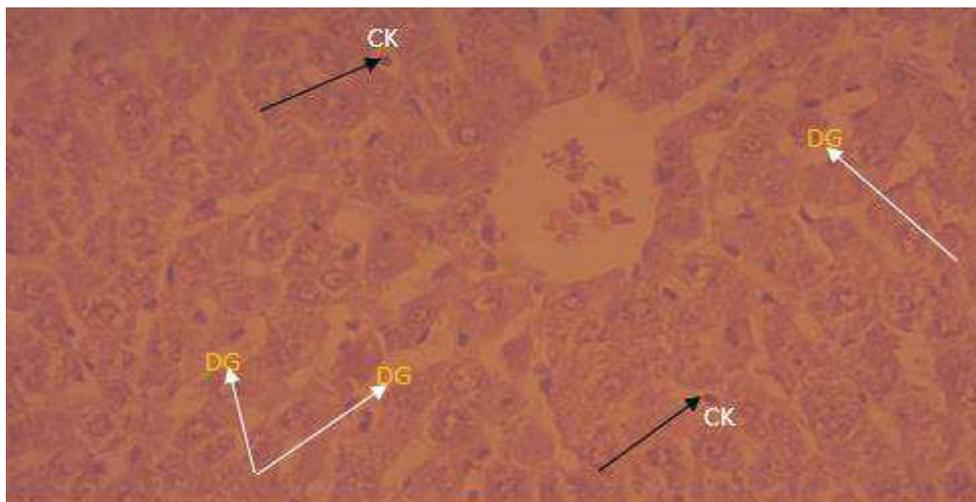


Figure 66 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat Hg-EAA avec Gr×40. CK : cellules de Kupffer, DG : dégénérescence

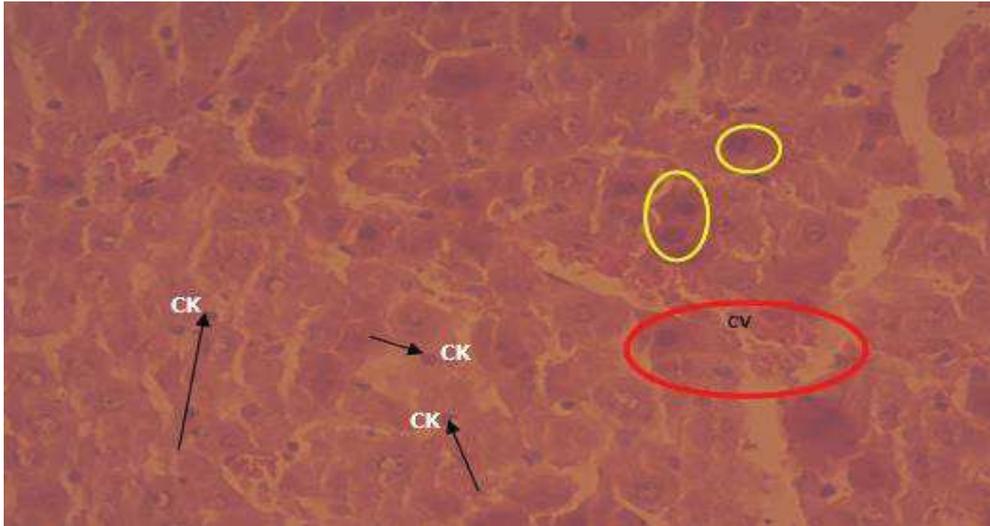


Figure 67 : Coupes histologiques au niveau du foie d'un rat témoin -EAA avec Gr×40. CK : cellules de Kupffer, cercle jaune : cellules en cours de division, CV : congestion vasculaire

L'histologie du rein des rats Hg-EAA a montré une dilatation des glomérules, destruction des tubules et nécrose tandis que les intoxiqués présentaient une glomérulonéphrite chronique. Concernant les témoins-EAA, leurs reins présentent des tubules et des glomérules normaux.

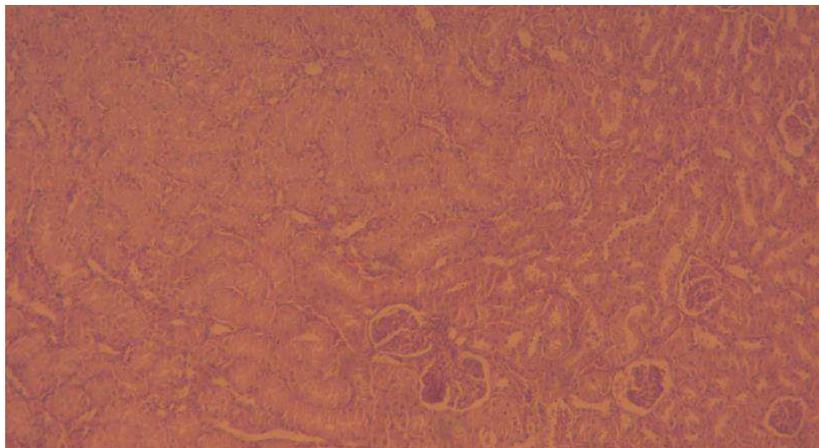


Figure 68 : Coupe histologique au niveau du rein d'un rat témoin avec Gr×10.

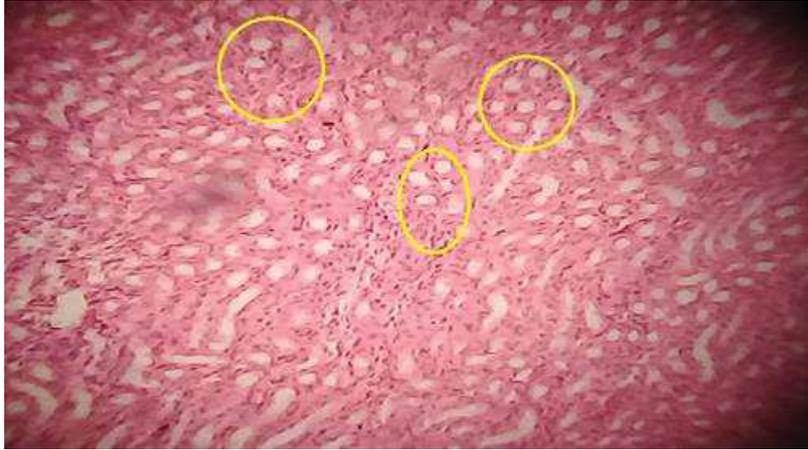


Figure 69: Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat intoxiqué avec Gr×10. Cercle jaune : lésion glomérulaire

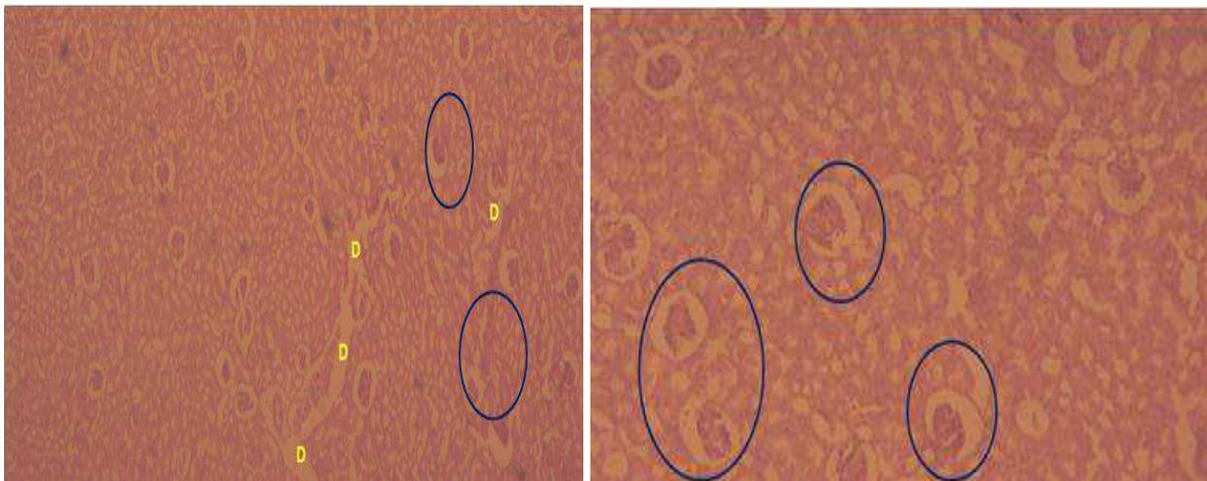


Figure 70 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat Hg-EAA avec Gr×40.D : destruction des tubules, cercle bleu : dilatation des glomérules.

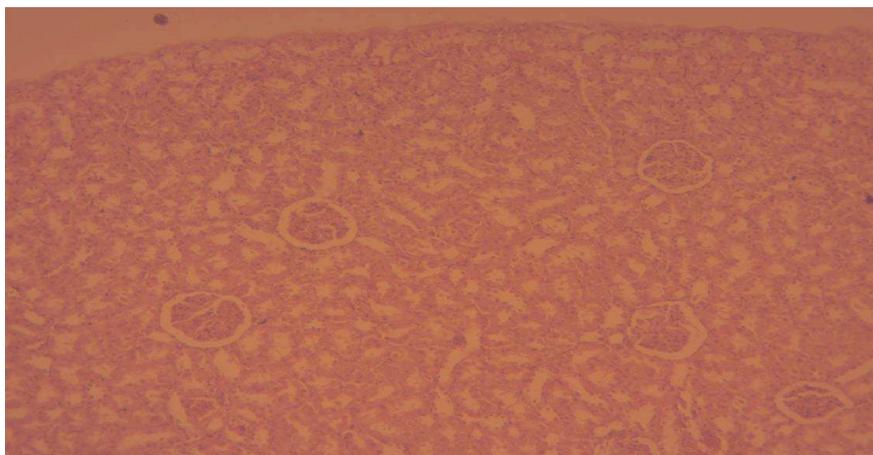


Figure 71 : Coupes histologiques au niveau du rein d'un rat témoin-EAA avec Gr×10.

V.6. Paramètres hématologiques :

Le nombre des leucocytes chez les rats intoxiqués est élevé par rapport à celui des rats témoins mais sans aucune différence significative ($p > 0,05$). De plus, les rats intoxiqués traités ont subi une diminution non significative dans le taux des globules blanc par rapport aux intoxiqués non traiter ($p > 0,05$).

Le taux des globules rouges des rats exposés au Hg est significativement inférieur à celui des rats témoins ($p < 0,001$). Cependant, les animaux intoxiqués traités ont un taux de globules rouges, significativement inférieur à celui des animaux témoins-EAA ($p < 0,05$).

Le taux de l'hémoglobine, d'hématocrite et de plaquette des animaux intoxiqués est inférieur par rapport aux animaux témoins ($p > 0,05$), ($p > 0,05$), ($p < 0,05$) respectivement. Le taux des plaquettes des rats exposés au Hg et traités par EAA est significativement élevé à celui des rats exposés au Hg ($p < 0,05$). Pour l'hémoglobine, l'hématocrite et les plaquettes du groupe Hg-EAA en comparaison avec le groupe Hg il n'existe pas une différence significative ($p > 0,05$).

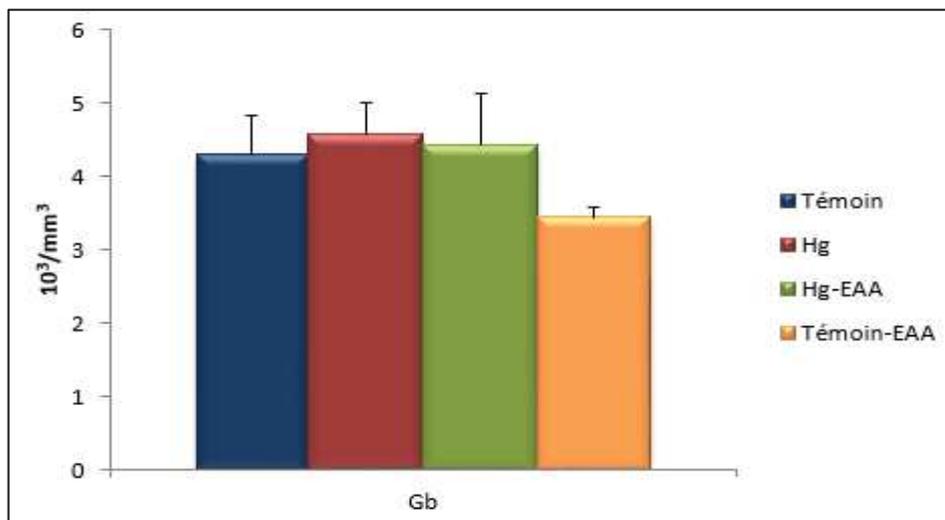


Figure 72: Comparaison entre le nombre des globules blancs des témoins, Hg et Hg-EAA de l'exposition à l'Hg suite à un traitement curatif par l'extrait de l'anis sur le taux des globules blancs. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM

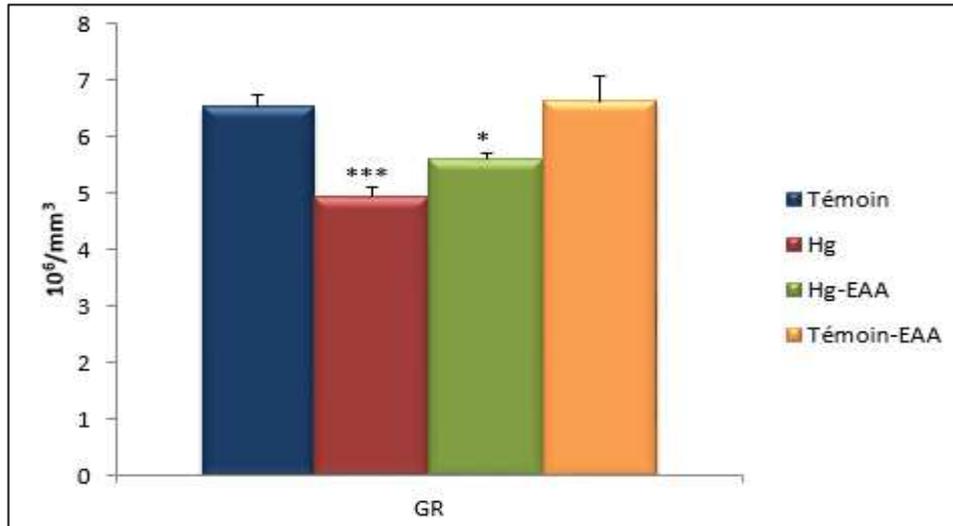


Figure 73 : Comparaison entre le nombre des globules rouges des témoins, Hg et Extrait.Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * $P < 0.05$ (témoin vs.Hg) ; * $P < 0.05$ (Hg vs. Hg-EAA)

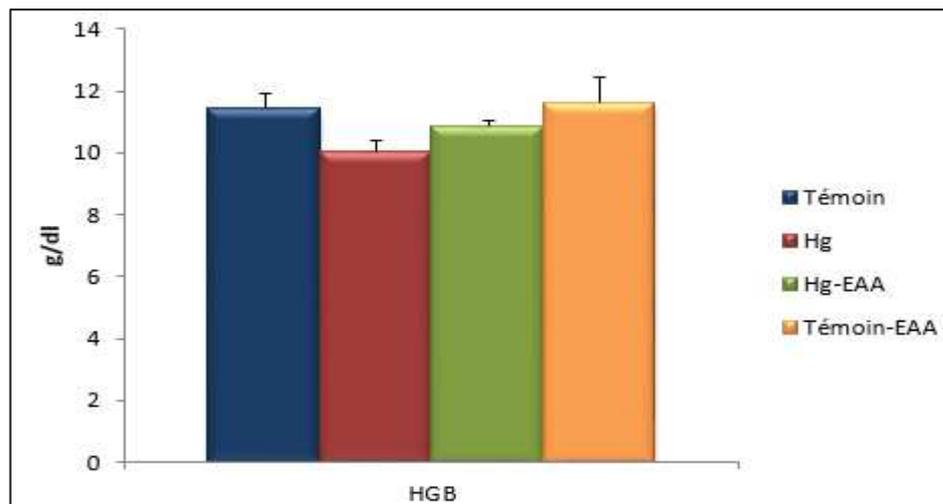


Figure 74 : Comparaison entre le taux d'hémoglobine exprimé en (g/dL) des témoins, Hg et Hg-EAA . Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : $P > 0.05$

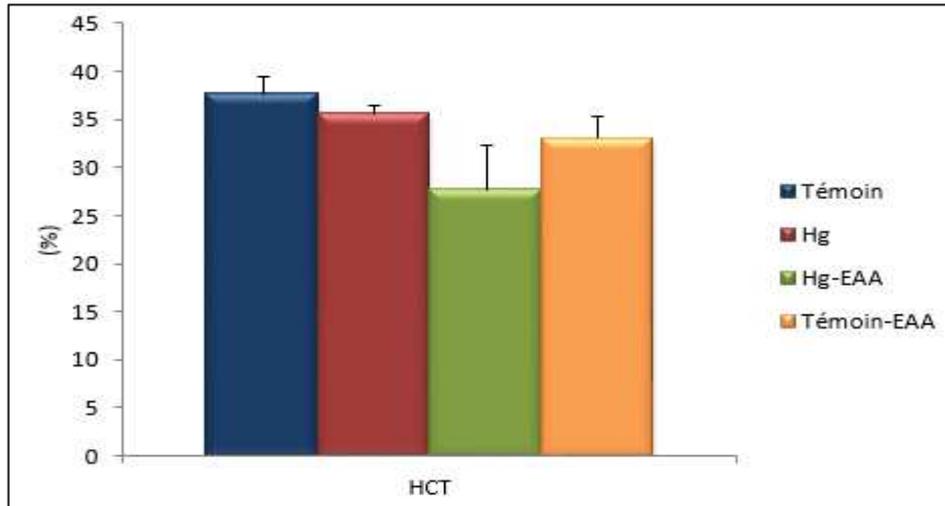


Figure 75 : Comparaison entre le pourcentage d'hématocrite des témoins, Hg et Extrait.Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM $P > 0.05$

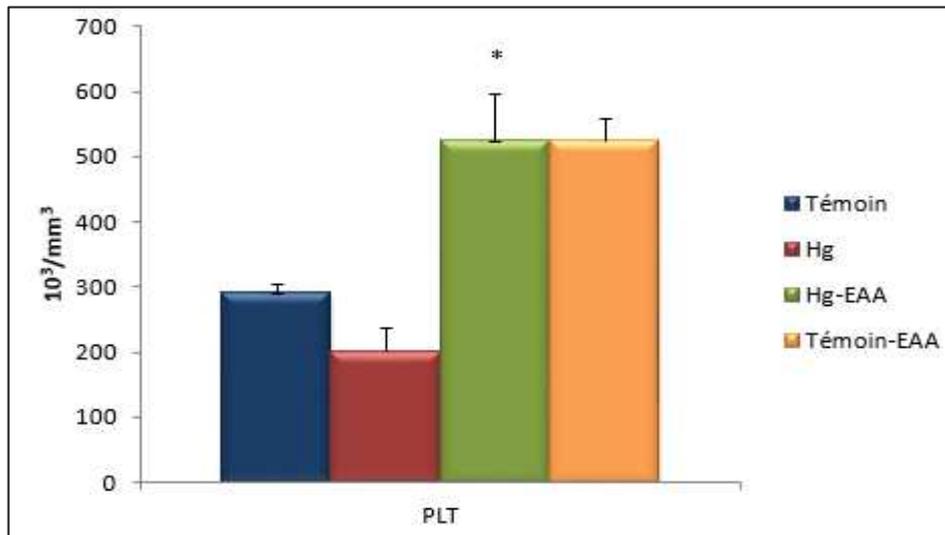


Figure76 : Comparaison entre le taux des plaquettes des témoins, Hg et Extrait.Hg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : * $P < 0.05$ (Hg vs. Hg-EAA)

Discussion

Le mercure (Hg) est un métal largement répandu dans l'environnement. Il est utilisé dans l'industrie, dans le domaine médical, l'agriculture et d'autres domaines (**Abarikwu et al., 2017**). La toxicité du Hg continue de représenter un problème de santé mondiale en raison de l'exposition chronique à de faibles niveaux de composés mercuriels, vu sa concentration en amont de la chaîne alimentaire (**Branco et al., 2017 ; Mahbub et al., 2017**).

Par ailleurs, les plantes sont utilisées comme aliments et à des fins médicinales depuis des siècles, certaines d'entre elles ont joué un rôle important dans le maintien de la santé humaine et l'amélioration de la qualité de la vie humaine depuis des milliers d'années (**Anwar, 2017**). L'huile essentielle de *P. anisum* a été largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies, y compris certains troubles neurologiques (**Kahloula et al., 2013**). De plus, l'extrait des graines d'anis vert renferme des composés bioactifs et a un pouvoir antioxydant moyen (**Bekara et al., 2016**).

La technique d'hydodistillation nous a permis d'obtenir une HE avec un rendement d'ordre de 1.383%. **Asadollahpoor et al., 2017**, ont obtenu une huile essentielle d'anis avec un rendement de 1.5%. De plus, les travaux menés par **Kdam et al., 2017** présentent un rendement d'ordre 2.5%. D'après **Obeid et al., 2017** l'anis contient 3.2% d'huile essentielle.

Le rendement de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L obtenue par décoction est de l'ordre 17.18%. Selon **Kdan et al., 2013** l'obtention d'un rendement de l'ordre de 18% pour l'extrait éthanolique obtenu par macération. De plus, **Bekara et al., 2016** ont obtenu un extrait aqueux avec un rendement de 20.99%. Nos résultats concernant le rendement de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux concordent avec ces travaux de **Asadollahpoor et al., 2017** et **Kdan et al., 2013**.

La chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse a permis d'identifier 12 composés dont le trans-anéthole est le composant majeur de HE de l'anis vert avec un pourcentage de 55.44%. Les autres composants sont : Fenchone avec un pourcentage de 8.99%, limonène avec un pourcentage de 8.01%, γ -Elémène avec un pourcentage de 7.25%, α -pinène avec un pourcentage de 1.81% et autres composants avec un pourcentage inférieure à 1% (α campholène aldéhyde 0.47%, 3-carène 0.43%, camphène 0.36%, Cis-betaocimène 0.28%, α -phellandrène 0.22%, Cis-Anéthol 0.18%).

Ghaouti et al., 2012, ont trouvé dans leur analyse des semences de *Pimpinella anisum* d'Agouray (Maroc) que le trans- anéthole est le composé dominant avec un pourcentage de

81,19, γ -himachalène vient en deuxième position avec un pourcentage de 6,22%. Il est suivi du cis-anéthole 0,59 % et de l'estragole 0,46%. Viennent ensuite des sesquiterpènes (α chamigrène, α -longipinène, aromadendrène) et du quercétol (0,09 %). Dans les travaux d'**Obaid et al., 2017** sur l'anis vert de la Chine le résultat de la CPG/SM a montré que le trans-anéthol est le composant majeur avec un pourcentage de 96,8, Himachalene (1,84%), autres composants qui sont inférieure à 1% comme : Estragol, cyclohexene et 2-Methoxy-5-(1-propenyl) phénol. Les principaux composés chimiques de l'huile essentielle étaient le trans-anéthole (89,24%), le γ -himachalène (2,89%) et le méthylchavicol (2,72%) selon **Asadollahpoor et al., 2017**.

Nos données se rapprochent à ceux des auteurs mise à part la variabilité de certaines proportions qui sont dû essentiellement à la variation des régions, les conditions climatiques et les facteurs physico-chimiques du sol (**Kaloustian et al., 2013**).

En outre, *P.anisum* est riche en métabolites secondaires. Le screening phytochimique a révélé la présence des tannins, des flavonoïdes, des anthocyanes, des coumarines, des alcaloïdes et des stérols. Ainsi que l'absence des composés réducteurs et d'amidon.

Selon une étude réalisée au Maroc par **Ajebli et al., 2019** sur des échantillons d'anis vert récoltés de trois régions différentes, le criblage phytochimique a révélé la présence des tanins catéchiques, des flavonoïdes, du mucilage, des stérols, des triterpènes, des alcaloïdes, des anthocyanes et de saponosides.

I. L'effet du traitement par l'anis vert et du mercure sur le poids corporel et le poids des organes :

Les résultats relatifs aux poids corporels et des organes ont révélé une diminution du poids corporel et cérébral des rats intoxiqués par rapport aux rats témoins due à l'exposition au chlorure de mercure. Cette diminution du poids a été accompagnée par une légère hypertrophie rénale et hépatique.

L'exposition au mercure a permis de réduire le poids des organes des rats de manière dose-dépendante (**Rao et al., 2011**). Selon l'étude de **Vimy et al., 1990** les taux de mercure dans l'hypophyse des fœtus sont révélés très élevés sachant que l'hypophyse est une glande endocrine responsable de la sécrétion de plusieurs hormones, parmi eux l'hormone de croissance (**Vimy et al., 1990**). En outre, l'exposition à une forte dose de chlorure de mercure

(HgCl₂) a montré une réduction du gain de poids de la progéniture à la naissance et pendant la période postnatale (**Chehimi et al., 2012**). D'après **Simmons et al., 1995** l'augmentation des poids relatifs aux organes des animaux est un indicateur de la toxicité par un xénobiotique. Cette augmentation des poids du rein et du foie s'explique par l'accumulation du mercure dans ses organes cibles (**Agarwal et al., 2007 ; Bahi, 2015**).

Cependant, les rats intoxiqués traités par HEA ont un poids corporel, cérébral et hépatique plus élevé que celui des rats intoxiqués. De plus, le poids relatif des animaux des groupes traités par l'extrait aqueux de *P.anisum* (Hg-EAA et Témoin-EAA) présente une baisse des poids corporel, cérébral, rénal et hépatique.

La thérapie à base d'huile essentielle de *pimpinella anisum* a permis une élévation significative du poids du cerveau ainsi que le poids du foie des rats. Par ailleurs, le traitement par EAA a diminué le poids corporel et des organes. **Mahmoud et al., 2014** à travers leurs études suggèrent l'effet bénéfique de l'anis à des doses plus faibles sur les performances des poulets de chair à savoir, le taux de conversion alimentaire, le gain de poids corporel et le poids des organes. L'étude réalisé par **Bekara, 2017** a montré que l'administration de l'extrait de l'anis a permis un gain du poids. D'après les résultats que nous avons trouvés *P.anisum* peut avoir les deux effets appétitif et anorexigène et cela en fonction de la dose administré.

II. L'effet du *Pimpinella anisum* et du mercure sur le neurocomportement :

Les résultats du test de la nage forcée ont montré un temps d'immobilité significativement élevé chez les rats intoxiqués en période de gestation et lactation par rapport à celui des rats témoins ce qui explique que les animaux exposés au HgCl₂ présentent un état dépressif dont leur temps de mobilité est réduit. **Haut et al., 1999** ont indiqué qu'un groupe de travailleur exposé à la vapeur de mercure inorganique, présente des problèmes émotionnels, de dépressions, d'anxiétés et de retrait social. De plus, **Soleo et al., 1990** ont montré que les sujets exposés professionnellement au mercure de façon chronique sont plus dépressifs que les sujets exposés de façon occasionnelle ou non. Parmi les effets de l'empoisonnement du mercure sur le système nerveux, la dépression, irritabilité extrême, hallucinations, incapacité à se concentrer, perte de mémoire, tremblements des mains, perte de poids, somnolence, maux de tête, insomnie et fatigue (**Rice et al., 2014**).

Par ailleurs, les rats traités par l'anis vert y compris huile essentielle avec une dose de 0,25 ml/Kg et l'extrait aqueux avec une dose de 500mg/Kg ont présenté un temps d'immobilité

significativement inférieur à celui des rats exposés au mercure. Cette étude a révélé que les différentes formes et doses de graines de *P. anisum* présentaient une activité semblable à celle d'un antidépresseur.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Kahloula et al., 2013** qui ont prouvé que l'huile d'anis conduit à diminuer le temps d'immobilité des animaux exposés préalablement au plomb. De plus, **Shahamat et al., 2016** apportent les effets antidépresseurs de différent extrait (aqueux et éthanolique) de cette plante a révélé une diminution de temps d'immobilité des animaux dans le test de la nage forcé, l'effet remarqué était proportionnel à la dose administrée. En outre, l'étude réalisé par **Bekara, 2017** sur l'extrait aqueux de *P.anisum* a montré aussi qu'il existe une relation proportionnel entre la dose administré et le temps d'immobilité.

Les données relatives au test d'open field obtenu de cette étude montrent un nombre de carreaux traversés par les rats intoxiqués réduit d'une manière significative à celui des rats témoins ainsi que le nombre de visite du centre. Les animaux intoxiqués présentent une hypoactivité locomotrice en la comparant à celle des rats témoins.

De plus, le temps de latence et le nombre de défécation du lot intoxiqué sont élevés par rapport au lot témoin, ce qui signifie que les animaux exposés au Hg prennent un temps important afin d'explorer un environnement nouveau. Plusieurs études ont montré que l'exposition au MeHg peut produire des déficits comportementaux liés à l'activité locomotrice et les performances motrices chez la souris adulte (**dos Santos et al., 2016**). D'après les résultats de **Peixoto et al., 2007**, l'exposition au chlorure de mercure a montré une déficience des compétences exploratoires dans les tests de labyrinthe en T et l'open field et cela dépend de l'intégrité de plusieurs structures cérébrales et voies neurochimiques.

L'exposition chronique à de faibles doses de mercure inorganique chez le rat adulte entraîne des dépôts de mercure dans le parenchyme cérébral associés au stress oxydatif et à la mort cellulaire par cytotoxicité et induction de l'apoptose, qui altère la fonction motrice (**Teixeira et al., 2018**).

Par contre, suite au traitement des jeunes rats intoxiqués par le HgCl₂ avec la dose de 0,25ml/Kg d'huile essentielle, nous avons remarqué une augmentation significative dans le nombre de carreaux traversés en comparaison avec le groupe intoxiqué et une diminution significative dans le temps de latence et le nombre de défécation. Ce qui démontre que l'huile

a corrigé les effets observés par le mercure sur l'activité locomotrice. En outre, le traitement par l'extrait aqueux a permis d'augmenter le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressement d'une manière non significative. D'après nos résultats le mercure conduit à une hypoactivité et cela est en accord avec les travaux précédents. Par ailleurs, *Pimpinella anisum* a permis de corriger ce déficit de locomotion.

Kahloula et al., 2013 et **Bekara, 2017** ont montré que l'huile essentielle ainsi que l'extrait aqueux de *P.anisum* ont pu corriger l'hyperactivité causé par l'exposition au plomb donc l'anis a pu normaliser l'activité locomotrice. A la lumière de ces résultats nous pouvons dire que l'anis peut avoir un effet correcteur de l'activité locomotrice.

En ce qui concerne les résultats enregistrés pour le test de la piscine de Morris nous avons constaté que le temps d'apprentissage des animaux intoxiqués était élevé d'une manière significative durant la phase d'acquisition par rapport aux animaux témoins. Cela indique que les animaux exposés au mercure ont des difficultés ou des troubles d'acquisition. Concernant le probe test le temps de latence dans le quadrant cible par les rats intoxiqués est significativement inférieur à celui des rats témoins ce qui signifie que les animaux exposés au $HgCl_2$ n'ont pas bien mémorisé la localisation de la plateforme en se référant à des indices spatiaux. Les déficiences neurologiques induites par l'exposition au mercure pendant la vie intra-utérine pourraient être une conséquence des altérations au cours du développement du cerveau, car il est considéré comme le stade le plus sensible à la toxicité du mercure Hg au cours duquel il y'a la prolifération et différenciation des cellules nerveuses (**Chan et al., 2017**).

D'après les travaux de **Drasch et al., 1994**, le mercure est un puissant neurotoxique pour le cerveau du nourrisson et s'accumule dans différentes structures cérébrales en développement, notamment dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet (**Grosman et al., 2010**). En outre, le mercure modifierait l'activité du système cholinergique chez le rat (**Hughes et Sparber, 1978 ; Eccles et Annau 1982 ; Cagiano et al., 1990**), l'un des systèmes qui serait impliqué dans l'apprentissage spatial (**Fibiger, 1991**).

L'exposition des femmes enceintes à des concentrations élevées de mercure a conduit à une réduction des performances des enfants par la suite à savoir le développement et l'intelligence (**Kjellström et al., 1989 ; Grandjean et al., 2008**).

Teixiera et al., 2014 ont observé un dysfonctionnement cognitif. L'apprentissage, la mémoire à court et à long terme ont été réduits chez des rats exposés au HgCl₂ d'après les tests neurocomportementaux et le dosage du mercure au niveau cérébral ont révélé la présence de HgCl₂ dans l'hippocampe malgré sa faible liposolubilité. Des travaux antérieurs ont montré que différentes formes de la mémoire sont médiées par différentes régions du SNC, telles que le cortex préfrontal et les structures limbiques. L'hippocampe est impliqué dans des comportements de type anxiété, ainsi que dans des processus de mémoire et d'apprentissage, en raison de ses connexions avec d'autres zones limbiques impliquées dans des comportements émotionnels (**Teixiera et al., 2014**). De plus, des doses aiguës de mercure inorganique ont provoqué des dommages cognitifs chez la souris (**Yasutake et al., 2010**).

L'exposition chronique au mercure inorganique suggère que les déficiences comportementales observées soient liées à la présence de Hg dans la partie corticale et l'hippocampe pouvant interférer avec l'homéostasie locale. Ou bien liée à la forte affinité de liaison entre le mercure et les composés soufrés, les interactions des composés du mercure avec les protéines du système nerveux central peuvent expliquer certains de leurs effets sur la neurotransmission. Les concentrations micromolaires de mercure inhibaient les systèmes cholinergique, glutamatergique, GABAergique et dopaminergique affectant à la fois le comportement et la cognition (**Teixiera et al., 2014**).

Dans le même contexte de l'apprentissage, durant la phase de la plateforme visible, les rats exposés au Hg mettent plus de temps pour arriver à cette dernière malgré qu'elle est marqué par un indice visuel. Ce qui prouve que les animaux exposés au Hgcl₂ en période de gestation et lactation ont des troubles de visions conformément aux résultats obtenus par **Pletz et al., 2016** qui révèle que le Hg entraîne des troubles de vision et cela est en proportion avec la dose administrée. En outre, une étude neuropsychologique réalisée sur des enfants âgés de 7ans issues des mamans exposées au méthylmercure dans les poissons en période de grossesse a montré une baisse d'attention, de langage, de vitesse motrice et de la fonction visuo-spatiale (**Grandjean et al., 1997 ; Grandjean et al., 2008**).

Par ailleurs, le traitement par l'anis a permis de diminuer significativement le temps de latence pour arriver à la plateforme durant les 4 jours de la phase d'acquisition pour l'huile essentielle et durant le 1^{er} et 2^{ème} pour l'EAA. De plus, durant le probe test, les animaux traités par l'anis (HEA et EAA) ont un temps de latence important dans le quadrant cible par rapport aux animaux exposés au mercure et mettent peu de temps afin de trouver la plateforme dans la

phase de la plateforme visible ce qui suggère l'effet correcteur de l'anis y compris huile essentielle et extrait aqueux des troubles et des dommages causés par le Hg.

De nombreuses vertus médicinales sont attribuées à l'anis qu'une infusion de ses graines ou de quelques gouttes de son huile essentielle peuvent être prescrites pour soigner de nombreux troubles et peut avoir un effet sur le système nerveux (**Samojlik et al., 2012**).

Mushtaq et al., 2019 suggèrent que l'extrait d'anis a augmenté la mémoire et les tâches d'apprentissages en réduisant le taux d'acétylcholinestérase au niveau de la clé synaptique du cerveau. Il peut être utilisé pour la prévention de la maladie d'Alzheimer qui est supposée être causée par la perte d'innervations cholinergiques dans l'hippocampe du cerveau.

L'analyse des données relatives au test du double compartiment obscurité/ lumière a montré que les animaux exposés au Hg en période prénatale ont tendance de passer plus de temps dans le compartiment sombre à l'opposé des animaux témoins ce qui confirme un état d'anxiété des animaux intoxiqués. Certains auteurs ont indiqué que l'exposition au chlorure de mercure présentera par la suite des troubles psychologiques à savoir : des tremblements, une anxiété et une dépression (**Dyall-Smith et Scurry, 1990 ; Ineris, 2010**). L'exposition à ce métal provoque des altérations des enzymes de transport telles que Na^+ / K^+ ATPase. De plus, le mercure inorganique semble avoir un effet particulier et a tendance à s'accumuler dans le cortex plutôt que dans d'autres des régions du cerveau telles que l'hippocampe (**Teixeira et al., 2018**).

Par ailleurs, l'huile essentielle d'anis vert a conduit à une diminution significative du temps passé dans le compartiment sombre du groupe intoxiqué traité par rapport au groupe intoxiqué. Tandis que les rats exposés au mercure et traités par l'extrait aqueux passent plus de temps dans le compartiment obscur par rapport aux rats exposés au mercure. D'après ces résultats, l'HE d'anis peut avoir un effet anxiolytique.

L'étude réalisée par **Kahloula et al., 2013** a montré que l'HE de *P.anisum* a présenté un effet neurocorrecteur de l'anxiété qui a été causé par le plomb. Cet effet est dû à l'amélioration de l'activité de la pompe Na^+/K^+ qui joue un rôle dans l'excitabilité neuronale.

III. Dosage du mercure sanguin et cérébral :

La technique de spectrophotométrie à absorption atomique a révélé une mercurémie importante chez les rats exposés au mercure par rapport à la mercurémie des rats témoins. Le sang est responsable de la distribution de toutes formes de Hg pour cibler des organes et la concentration de Hg dans le sang est considérée comme un biomarqueur fiable de l'exposition (**Branco et al., 2017**). Les ions Hg sont transportés d'une manière équivalente dans le plasma, complexés avec l'albumine et dans les hématies, après liaison avec l'hémoglobine et le glutathion (**Vesterberg et al., 1993 ; Bridges et al., 2016**).

Des études réalisées chez des rats wistar ont montré que suite à une exposition au méthylmercure, 30 % de la dose administrée est détecté dans le sang 24h après l'exposition et environ 99 % de cette quantité est associé aux érythrocytes, tandis que le reste est associé à la fraction plasmatique (**Bridges et al., 2016**). Alors que le mercure inorganique est distribué de manière uniforme entre les globules rouges et le plasma (**Branco et al., 2017**).

Tandis que la concentration du mercure cérébral du groupe intoxiqué a été très élevé en comparaison avec le groupe témoin et même en comparaison avec la mercurémie.

L'organe cible chez l'homme lors de l'inhalation de vapeurs de mercure est le SNC (**Bensefa et al., 2011**). Les dommages tissulaires sont en outre corrélés avec l'augmentation de l'accumulation du toxique dans les régions du cerveau indiquant le développement d'un trouble neurodégénératif causé par l'intoxication au mercure. Ces effets ont été confirmés par l'étude au microscope électronique du cerveau qui a montré une gaine de myéline discontinue autour de l'axone, y compris des mitochondries gonflées, un noyau gonflé ainsi que des modifications de la membrane nucléaire et cela suite à une exposition du cholédoque au mercure (**Rao et al., 2011**). En outre, il a été observé que HgCl₂ s'accumule dans les régions de l'hippocampe et du cortex, mais présente une affinité plus élevée pour le cortex (**Tiexiera et al., 2014**).

Cependant, le traitement par l'HE d'anis a permis de réduire la mercurémie et la concentration du mercure cérébral. De plus, le traitement par l'EAA a diminué la mercurémie et la concentration de mercure cérébrale chez le groupe exposé au mercure et traité en comparaison avec le groupe exposé au Hg. En outre, l'extrait a été plus efficace pour réduire le taux du mercure sanguin que l'huile essentielle et l'HE avait la capacité de chélater le mercure cérébral plus que l'extrait et cela est due à la nature lipophile de l'huile qui lui permet de

franchir facilement la barrière hémato-encéphalique, donc une dose importante arrive au niveau cérébral. Selon **El-Sayed et al., 2015** l'anis vert a une forte capacité de chélater les ions métalliques multivalents, cet effet chélateur contre les minéraux aurait été à l'origine d'un effet correcteur.

IV. L'histologie du cerveau :

Les résultats de l'histologie des trois organes : cerveau, foie et rein montrent que l'exposition au chlorure de mercure pendant la période de gestation et lactation a conduit à des atteintes et altérations tissulaires.

Le mercure a induit une dégénérescence des cellules de Purkinje qui peut en partie expliquer l'hypoactivité motrice observé au cours du test de l'open field, la présence des microglies qui sont les lignes de défense du système nerveux, la présence des lésions, congestion vasculaire et les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles. Tout cela indique que le mercure a pu traverser la barrière hémato-encéphalique et a induit une inflammation au niveau du cerveau et le dosage de mercure au niveau cérébral a bien confirmé cela. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kumar et al., 2012** et **Pereira et al., 2016**.

Kumar et al., 2012 ont trouvé que l'exposition à une dose de 1 mg / kg / jour de HgCl₂ par voie orale chez des rats pendant 28 jours a conduit à une congestion des vaisseaux sanguins, dégénérescence neuronale et nécrose des cellules de Purkinje. De plus, **Pereira et al., 2016** ont mis en évidence des niveaux nocifs de mercure inorganique qui pourraient atteindre le cerveau des poissons après une exposition à des concentrations environnementales dans l'eau, entraînant une perte importante de cellules cérébrales (neurones et cellules gliales) dans des régions spécifiques (hypothalamus, tectum optique et couche moléculaire du cervelet), une diminution du volume du cervelet (couche moléculaire) et altération du comportement des poissons à la nage. En outre, certains auteurs ont rapporté que le mercure inorganique peut atteindre le SNC est dû à la modification de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (**Teixeira et al., 2018**). Le mercure inorganique pénètre dans le cerveau soit par la circulation sanguine après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique (**Korbas et al., 2013**), soit par transport axonal après une absorption sensorielle directe de l'eau (**Rouleau et al., 1999 ; Pereira et al., 2016**). L'exposition chronique à ce métal chez les animaux semble provoquer des accumulations de mercure élémentaire dans le cervelet et les lobes temporaux et frontaux (**Ostertag et al., 2013**). Des études toxicologiques antérieures ont déjà indiqué que la diminution du nombre d'astrocytes et des neurones sont généralement associés à des

dommages fonctionnels observés dans des tests comportementaux suite à une exposition au mercure inorganique (**Teixeira et al., 2018**).

Par ailleurs, les animaux qui ont subis la thérapie par l'HE de *P.anisum* ont un nombre de cellules de Purkinjes réduit par rapport à ceux des témoins traités par l'huile essentielle et un nombre de cellule important par rapport à celui des intoxiqués, des noyaux normaux et absence de nécrose. Vu le caractère lipophile de l'huile essentielle il le permet de franchir la barrière hémato-encéphalique et atteindre le cerveau.

Nos résultats concordent avec ceux de **Abdul-Hamid et al., 2014**, qui ont montré que le traitement des rats à base de l'huile essentielle de *P.anisum* a pu corriger les dommages causés suite à l'exposition à l'aspartame à savoir, les cellules de Purkinjes avaient un contour rétrécis, un perikaryon irrégulier associé à un cytoplasme profondément coloré et des noyaux pycnotiques. Le traitement par l'HE de *P.anisum* a révélé que la majorité des cellules de Purkinjes semblent avoir une architecture normale avec des noyaux bien définis et des nucléoles proéminents.

Cependant, les rats intoxiqués traités par l'extrait aqueux de *P.anisum* présentent un nombre important de cellules gliales, les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles ainsi qu'une congestion vasculaire. Nos résultats sont semblables à ceux de **Bekara et al., 2016**.

Des groupes d'animaux qui ont été intoxiqué par le plomb (0,2%), puis traités par différentes doses d'extrait aqueux d'anis pendant 15 jours ont montré une certaine amélioration de la structure générale des cellules avec persistance de la vacuolisation (**Bekara et al., 2016**).

Dans le même contexte, une étude a été réalisé sur le lien qui existe entre l'œstrogène et le vieillissement cérébral. Les résultats histologiques, des sections du cerveau des rates qui ont subis une ovariectomie montrent des divers changements, y compris le cytoplasme vacuolé et les noyaux condensés des cellules pyramidales, dégénérescence des fibres nerveuses et diminution de l'épaisseur de l'hippocampe. Le traitement par une dose de 500mg/Kg de l'extrait d'anis a révélé le taux élevé d'œstrogènes et l'architecture du cerveau est plus ou moins semblable à celle du groupe témoin avec des cellules pyramidales normales, les cellules gliales et les fibres nerveuses (NF), mais les cellules sont encore légèrement dispersées. Donc, l'anis a pu corriger les dommages qui étaient au niveau du cerveau (**Faried et al., 2017**).

V. Les paramètres biochimiques :

L'exposition des jeunes rats en période de gestation et lactation au chlorure de mercure a induit une diminution significative du taux de glucose sanguin en comparaison avec la glycémie des rats témoins. Ces résultats sont en accords avec les résultats trouvés par **(Peixoto et al., 2007 ; Moumen, 2017)** dont ils ont trouvé une diminution du taux sanguin de glucose qui peut être due à l'augmentation de son utilisation par l'organisme comme source immédiate d'énergie sous l'effet du stress causé par le mercure. Cela peut être dû au mauvais fonctionnement des glomérules et à la détérioration de la fonction rénale **(Kyle et al., 1983)**. En effet, la réabsorption du glucose est affectée dont le processus se produit principalement dans la membrane de la bordure en brosse du segment contourné du tubule proximal, le glucose pénètre dans les cellules tubulaires par un système de transport actif en utilisant une protéine porteuse, qui est dépendante au sodium, le transport du glucose au niveau de la membrane basolatérale survient par diffusion facilitée indépendant au sodium. Dans l'autre sens, si le taux de glucose excrété dépasse plus le taux réabsorbé, le rein est incapable de le résorber, et une grande quantité sera excrété dans l'urine **(Sheikh et al., 2011)**.

Par ailleurs, les animaux exposés au mercure et traités par HE de l'anis ont un taux de glycémie élevé par rapport aux animaux intoxiqués. De plus, l'extrait d'anis a augmenté significativement le taux de glucose sanguin. **Shohaji et al., 2012** ont montré que l'administration de l'huile d'anis a augmenté d'une manière significative l'absorption du glucose dans le jéjunum de rat. Cela est dû à l'augmentation de l'activité de Na^+/K^+ l'ATPase qui hausse le gradient de sodium et engendre le transport de glucose dans la muqueuse intestinale. L'anis améliore la digestibilité iléale des nutriments, augmente l'activité de la lipase et de l'amylase pancréatiques, une activité antioxydante importante qui empêche l'oxydation des acides gras et augmente l'utilisation des nutriments **(Al-Shammari et al., 2016)**.

L'activité enzymatique des transaminases a présenté une élévation significative chez le lot intoxiqué par le mercure par rapport à celle du lot témoin ce qui reflète une hépatotoxicité due à une lésion hépatique et s'explique par la fuite de ces derniers du tissu vers le plasma dû à l'altération de la perméabilité membranaire causé par le mercure, ces résultats sont en accord avec les travaux de **Deepmala et al., 2013 ; Bahi, 2015**. Les rats exposés au chlorure

mercurique présentent des niveaux élevés d'ASAT et ALAT preuve de son accumulation dans le foie (**Kumar et al., 2012**).

De plus, l'élévation de l'activité plasmatique d'ASAT au niveau mitochondrial des hépatocytes et dans le cytoplasme indique des lésions structurelles dans le foie provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité des membranes des hépatocytes conduisant à la libération de l'enzyme dans le sang. En outre, l'ALAT se trouve dans le cytosol des hépatocytes et sa libération provient des cellules endommagées augmentent son activité dans le plasma (**Hazelhoff et al., 2018**). L'élévation d'ASAT indique la dégradation d'hépatocytes. Différentes études ont révélé que ce dernier augmente dans le système circulatoire lorsque des hépatocytes ou d'autres organes sont lésés ou nécrosés (**Nathwani et al., 2005 ; Mumtaz et al., 2019**).

Par contre, les animaux exposés au mercure et traités par l'huile essentielle et l'extrait aqueux *P.anisum* présentent un taux d'ASAT, ALAT significativement réduit à celui des animaux exposés non traités avec plus de signification pour le groupe Hg-EAA. **El-Sayed et al., 2015** ont mentionné un effet hépatoprotecteur de l'huile essentielle de l'anis vert contre une cirrhose hépatique induite par le carbone tetrachloride en se basant sur le dosage des transaminases. L'huile essentielle d'anis a pu restaurer les taux sériques d'ASAT et ALAT qui étaient élevés suite à l'exposition au carbone tetrachloride (**El-Sayed et al., 2015**). La diminution des taux sériques d'AST et d'ALT suggère que l'extrait de *P.anisum* pourrait prévenir les dommages aux cellules hépatique (**Cengiz et al., 2008**).

Concernant les teneurs sériques de l'urée et de la créatinine nous avons remarqué une augmentation significative de ces dernières chez les rats du lot exposé au mercure en comparaison avec celles des rats du lot témoin. Les formes inorganiques et organiques de Hg s'accumulent facilement dans les reins et il est considéré comme site primaire d'accumulation et de toxicité des substances inorganiques (**Bridges et al., 2017**). Selon **Piexoto et al., 2007**, l'hyperurécémie et l'hypercréatininémie sont considérés comme des biomarqueurs d'un dysfonctionnement et du dommage rénal. L'augmentation de taux de l'urée indique des lésions glomérulaires provoqués par le catabolisme protéique et la conversion de l'ammoniaque en urée résultant de l'augmentation de la synthèse de l'arginase ; enzyme impliquée dans la production de l'urée (**Vanholder et al., 1992**).

Cependant, les résultats de la teneur de l'urée et de la créatinine sérique du groupe intoxiqué traité par HEA ont montré une diminution significative de l'uricémie et une diminution non significative de la créatininémie en comparaison avec le groupe exposé au mercure. En outre, l'extrait aqueux de *P.anisum* a réduit significativement les taux de l'urée et la créatinine sanguine. D'après les résultats que nous avons obtenu l'extrait a pu avoir un effet régulateur de la concentration sérique des biomarqueurs de la fonction rénale plus que l'effet remarqué par l'huile essentielle. **Bekara et al., 2015** ont montré que l'extrait aqueux de l'anis vert a diminué la concentration de l'urée et de la créatinine des rats exposés au plomb. Selon **Aiswarya et al., 2018** l'administration de trois doses de l'extrait de *P.anisum* a diminué les valeurs de l'urée et la créatinine chez des rats exposés préalablement à la gentamicine et l'effet remarqué est indépendant de la dose administré.

VI.L'histologie du foie et du rein :

Concernant le foie des jeunes rats exposés au $HgCl_2$, l'architecture est conservée avec une congestion vasculaire sévère et une hypertrophie des hépatocytes. Ces résultats corroborent avec les travaux de **Hosseini et al., 2018** qui confirment la présence au niveau hépatique d'une infiltration de cellules inflammatoires et une inflammation de la veine centrale suite à l'exposition à une dose de 5 mg / kg de $HgCl_2$ dont ce dernier augmente la production de nombreux ROS, tels que le superoxyde et le H_2O_2 , qui provoquent une peroxydation lipidique et par la suite des lésions du tissu oxydant. En outre, l'administration de $HgCl_2$ pendant 21 jours par voie intrapéritonéale a conduit à une grave infection vacuolaire diffuse, dégénérescence des hépatocytes (**Abarikwu et al., 2017**). En effet, des lésions hépatiques dues à l'introduction du mercure et le cadmium est bien connu par des intensités plus élevées d'enzymes hépatiques dans le sérum montrant les dommages causés au niveau du tissu hépatique et la sortie d'enzymes dans le sang (**Mumtaz et al., 2019**). De même, les résultats de l'étude réalisée par **Hazalhoff et al., 2018**, montrent que les rats femelles présentaient une hépatotoxicité induite par $HgCl_2$ plus élevée que les rats mâles, comme en témoignant des altérations plus importantes des marqueurs plasmatiques, des lésions hépatiques et une histopathologie. Les différences liées au sexe observées dans les dommages hépatiques produits par le mercure inorganique peuvent s'expliquer par l'accumulation plus importante de ce métal dans le foie des femelles. A une dose sublétales de chlorure mercurique de 1,23 mg / kg les tissus de rat traité montre des lésions des cellules hépatiques et une altération de ses activités métaboliques par la voie des enzymes marqueurs ASAT et ALAT (**Jagadeesan et**

al., 2014). Après l'exposition au HgCl_2 , le tissu hépatique était complètement endommagé et des modifications qualitatives dégénératives et nécrotiques ont été observé dans presque toutes les structures du tissu hépatique (**Wadaan, 2009**).

Cependant, la thérapie à base de l'HE de *P.anisum* a permis de réduire les dommages dont nous avons remarqué une dégénérescence vacuolaire, la présence des foyers binucléaires ce qui explique que les cellules se régénèrent et entre dans une phase de division , la présence des cellules de Kupffer qui sont les macrophages du foie cela indique la présence d'une défense immunitaire.

De plus, la thérapie par l'extrait aqueux, a permis la présence des lésions périphériques, des foyers de nécrose, des capillaires sinusoïdes normales et la présence d'un nombre important des cellules de Kupffer. Donc le traitement par *P.anisum* y compris HE et extrait aqueux a un effet presque similaire face à l'intoxication par le mercure. Nos résultats sont partiellement différents de ceux de **Asadollahpoor et al., 2017** qui ont trouvé que les examens histopathologiques ont également confirmé une moindre dégénérescence vacuolaire et une diminution de la stéatohépatite macrovésiculaire dans les coupes de tissus d'animaux traités avec des doses élevées de *P.anisum* HE et extrait aqueux chez des rats atteints d'une stéatose hépatique non alcoolique. En outre, l'extrait hexanolique des graines d'anis possède des effets protecteurs in vitro et in vivo contre l'hépatotoxicité induite par le carbone tetrachloride, probablement en raison de ses constituants antioxydants (**Jamshidzadeh et al., 2014**). Aussi, la consommation de l'aspartame a induit une hépatotoxicité, l'utilisation de l'HE de *P.anisum* comme un antioxydant a diminué la toxicité de l'aspartame (**El Haliem et al., 2011**).

Le rein est le principal site de lésion induite par le mercure, du fait de l'absorption d'anions organiques conjugués au Hg (2+) dans le tube proximal, principalement à travers le transporteur d'anions organiques 1 (Oat1) au niveau de la membrane basolatérale (**Hazelhoff et al., 2015**).

C'est un organe qui joue un rôle crucial dans la filtration et l'épuration du sang. Les coupes histologiques au niveau du rein des jeunes rats exposés au mercure en période de gestation et lactation ont montré la présence d'une glomérulonéphrite chronique. Nos résultats sont en accords avec les travaux précédents de **Abarikwu et al., 2017** et **Branco et al., 2017**.

Selon l'étude de **Abarikwu et al., 2017**, l'exposition au HgCl_2 a conduit à une congestion rénale corticale sévère et hémorragie avec diffusion tubulaire et dégénérescence glomérulaire.

De plus, **Branco et al., 2017** ont révélé que les reins sont les principaux organes de l'accumulation de mercure suivant l'exposition à Hg^0 et Hg^{+2} et toutes les formes mercuriques produisent une néphrotoxicité.

Aussi, **Hazelhoff et al., 2012** ont décrit les différences entre les sexes dans la néphrotoxicité induite par $HgCl_2$ chez le rat. Chez les rats femelles, ils ont observé une diminution de la fonction rénale 18 heures après l'administration d'une dose unique de $HgCl_2$ (4 mg / kg, poids corporel, i.p.) par rapport aux rats mâles (**Hazelhoff et al., 2018**). Dans le même contexte, les résultats histopathologiques des reins des rats qui ont inhalé du mercure ont montré la présence d'une nécrose tubulaire et dégénérescence glomérulaire, des changements vacuolaires et les noyaux sont pycnotiques (**Akgül et al., 2016**). Une nécrose tubulaire sévère et une atrophie du tissu rénal ont été également observé chez des animaux exposés au chlorure de mercure (**Hosseini et al., 2018**).

Par ailleurs, le traitement par l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* a montré une légère amélioration morphologique des dommages causés par le Hg. Ces résultats sont en accords avec ceux de **Aiswarya et al., 2018** qui ont indiqué que l'extrait de l'anis a un effet néphroprotecteur dose dépendante d'après l'étude histomorphologie des sections de rein des rats traités avec différentes doses de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* qui a montré des changements histologiques avec présence de tubules en régénérations des cellules qui étaient endommagés par la gentamicine. Selon **Bekara et al., 2016** l'extrait aqueux de la *P.anisum* n'a pas présenté d'effet sur la structure du rein dont il n'a pas corrigé les changements morphologiques du rein tels que la présence de nécrose et des régions hémorragiques dans le tissu interstitiel induit par l'exposition chronique au plomb.

VII. Les paramètres hématologiques :

Les données enregistrées relatives aux paramètres hématologiques ont révélé un nombre de globules blancs chez les rats issus des femelles exposés au mercure supérieur d'une manière non significative à celui des rats témoins. Cette augmentation explique que l'animale mobilise toutes ces capacités de défenses pour lutter contre les infections causées par la présence des xénobiotiques dans l'organisme (**Karmakar et al., 2000**). Ce qui confirme l'importance des globules blancs dans la défense immunitaire contre les substances toxiques.

En ce qui concerne les résultats des globules rouges et d'hémoglobine représentent un taux significativement inférieur chez le lot intoxiqué par rapport au lot témoin. En outre, pour le taux plaquettaire et d'hématocrite nous avons remarqué des taux bas chez le groupe intoxiqué en comparaison avec le groupe témoin.

D'après ces résultats obtenus nous pouvons dire que le mercure a provoqué une anémie qui est due d'une part ; aux effets des radicaux libres générés par le mercure sur les globules rouges, où certains radicaux libres comme, $O^{\cdot-2}$ et OH sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires. De plus en présence de fortes concentrations de ces radicaux, l'hémoglobine peut facilement s'oxyder (**Gurer et al., 1998 ; Hughes, 2002 ; Modi et al., 2006**). Le chlorure mercurique a induit des troubles hématologiques chez le rat (**Hounkpatin et al., 2013**). Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux de **Bahi, 2015** qui ont montré une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite suite à une exposition au Hg.

Cependant, les animaux intoxiqués et traités avec l'HEA et l'EAA ont un pourcentage de globules blancs important à celui des animaux exposés au mercure. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Al-Shammari et al., 2017** qui montrent que les graines d'anis améliorent le profil sanguin en augmentant les taux de globules blancs, globules rouges et l'hématocrite.

De plus, les animaux traités par l'huile essentielle et par l'extrait aqueux présentent des taux significativement élevés de globules rouges et d'hémoglobine par rapport à ceux des animaux intoxiqués. Les valeurs d'hématocrite et des plaquettes sont élevés chez le groupe Hg-HEA en comparaison avec le groupe Hg. En outre, les valeurs d'hématocrite sont inférieures chez le groupe Hg-EAA en comparaison avec ceux du groupe Hg. Selon **Al-Shammari et al., 2017** l'anis vert stimule la synthèse érythrocytaire, la différenciation cellulaire et stimule la circulation sanguine.

Conclusion Générale

Le mercure est un métal lourd qui a un impact sur la santé humaine préoccupant. L'exposition chronique au mercure entraîne des troubles neurologiques progressifs aboutissant à une encéphalopathie, une neuropathie périphérique, troubles du comportement, des performances cognitives et une atteinte rénale.

Cependant, l'anis vert est l'une des plus anciennes épices utilisées depuis l'antiquité. *Pimpinella anisum L.* possède les propriétés biologiques différentes à savoir : antimicrobienne, antifongique, antivirale, antioxydante et analgésique.

Après une intoxication au chlorure de mercure à une dose de 100 mg/L chez des femelles au cours de la période de gestation et lactation, nous avons enregistré chez les jeunes rats une diminution du poids corporel et cérébral ce qui reflète la neurotoxicité du mercure.

Le dosage de la mercurémie a révélé une concentration sanguine très élevée chez le groupe exposé au Hg ce qui confirme son passage transplacentaire et sa présence au niveau du lait maternel chez les femelles gestantes et lactantes.

Concernant le dosage du mercure cérébral nous avons enregistré des concentrations en hausse au niveau des cerveaux des animaux intoxiqués par rapport à ceux des animaux témoins ce qui explique que le mercure traverse la barrière hématoencéphalique.

De plus, l'exposition à ce métal a pu modifier le comportement des rats en induisant une hypoactivité locomotrice observée dans le test de champ ouvert (Open Field Test) avec un état de dépression et d'anxiété enregistré lors de l'épreuve de la nage forcée et le double compartiment sombre/clair et un déficit d'apprentissage spatial (test de la piscine de Morris) en comparaison avec le groupe témoin.

Concernant, les paramètres biochimiques, nous avons constaté que le mercure a provoqué une hypoglycémie avec une élévation des concentrations sériques des transaminases, de l'urée et de la créatinine.

Sur le plan hématologique, nous avons enregistré une réduction importante des globules rouges, d'hémoglobine, des plaquettes et d'hématocrite, par contre une augmentation de leucocytes chez les animaux du lot exposé au Hg par rapport à ceux des animaux du lot témoin.

Concernant l'étude histopathologique du cerveau nous avons constaté une dégénérescence des cellules de purkinje, la présence des microglies, des congestions vasculaires, les corps cellulaires des neurones sont dans des vacuoles. Au niveau hépatique, le mercure a provoqué une congestion vasculaire sévère et une hypertrophie des hépatocytes. En dernier, les reins présentent une glomérulonéphrite chronique.

D'une part, le traitement par injection intrapéritonéale d'une dose de 0,25ml/Kg de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* pendant 21 jours a permis une élévation du poids corporel et cérébral.

Cette huile a permis d'atténuer le degré d'anxiété, la dépression, l'hypoactivité et à renforcer les capacités d'apprentissage et la mémoire spatiale enregistré au cours des tests de comportements. De plus, l'HE a pu avoir un effet chélateur en diminuant la concentration de mercure au niveau sanguin et cérébral. En outre, l'anis a eu un effet régulateur de la glycémie, à diminuer les taux sériques des biomarqueurs hépatique et rénaux et amélioré les paramètres hématologiques.

A travers notre étude, nous pouvons déduire que l'huile essentielle de l'anis, peut avoir un effet curatif sur l'intoxication par le mercure tout en rétablissant certains paramètres biochimiques et hématologiques avec une restauration d'un comportement normal chez les animaux préalablement exposés au Hg. Au niveau hépatique le traitement par HE a permis la présence d'une dégénérescence vacuolaire, des foyers binucléaires, la présence des cellules de Kupffer ainsi qu'une légère congestion. Au niveau rénal nous avons remarqué une lésion tubulaire, dégénérescence avec tuméfaction des cellules des tubes contournés proximaux et distaux.

D'autres parts, le traitement par une dose de 500mg/Kg de l'extrait aqueux de l'anis vert par gavage pendant 15 jr a induit une diminution du poids corporels ainsi que le poids des organes. Le statut neurocomportemental nous a permis d'observé que l'extrait a pu avoir un effet antidépresseur, a amélioré l'activité locomotrice, a pu corriger les déficits d'apprentissages spatial causé par le HgCl₂ mais il n'a pas pu corriger l'état d'anxiété. De plus, l'EAA a conduit à la réduction de la concentration de mercure au niveau sanguin plus que sa concentration au niveau cérébrale et cela est du à la nature de l'extrait (peu lipophile).

Concernant les paramètres biochimiques, l'extrait a pu avoir un effet régulateur de la glycémie comme il a pu diminuer les teneurs sériques des biomarqueurs de la fonction hépatique et de la fonction rénale à savoirs : ALAT, ASAT, urée et créatinine.

Sur le plan hématologique, l'extrait d'anis a permis l'élévation du taux des hématies, d'hémoglobines, d'hématocrites et des plaquettes.

Pour l'histologie, l'extrait de *P.anisum* n'a pas pu corriger les anomalies remarquées au niveau du cerveau et les dommages causés au niveau du foie et du rein.

En conclusion, nous pouvons dire que *Pimpinella anisum* y compris huile essentielle et extrait aqueux peut avoir des effets bénéfiques sur les différents tissus étudiés. L'effet remarqué dépend de la dose administré, l'organe cible et la nature du produit.

A la lumière de ces résultats trouvés, il serait envisageable d'entreprendre un protocole expérimental plus approfondi portant sur :

- L'évaluation du statut oxydatif suite à une exposition subchronique au mercure.
- Détermination du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et l'extrait.
- Etudier l'impact de cette exposition au Hg durant la période de développement sur la neurogénèse et certaine neurotrophine (BDNF, NGF) par immunohistochimie.

Références Bibliographiques

A

Abarikwu, SO., Benjamin, S., Ebah, SG., Obilor, G., Agbam, G. (2017). Effet protecteur de l'huile de *Moringa oleifera* contre l'hépatite et la néphro-toxicité induites par HgCl₂ chez le rat. *Journal de physiologie fondamentale et clinique et pharmacologie* , 28 (4), 337-345.

Abdul-Hamid, M., Gallaly, S. R. (2014). Ameliorative effect of *Pimpinella anisum* oil on immunohistochemical and ultrastructural changes of cerebellum of albino rats induced by aspartame. *Ultrastructural pathology*, 38(3), 224-236.

Agarwal, R., Behari, JR. (2007). Effet du prétraitement au sélénium dans l'intoxication chronique au mercure chez le rat. *Bulletin de la contamination de l'environnement et de la toxicologie* , 79 (3), 306-310.

Aiswarya, N., Chandran, V., Teerthanath, S., Rakesh, K. B. (2018). Nephroprotective effect of aqueous extract of *Pimpinella anisum* in gentamicin induced nephrotoxicity in wistar rats. *Pharmacognosy Journal*, 10(3).

Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I. (2010). Criblage phytochimique préliminaire et activités antioxydantes in vitro de l'extrait aqueux de *Helichrysum longifolium* DC. *BMC médecine complémentaire et alternative* , 10 (1), 21.

Ajebli, M., Zair, T., Eddouks, M. (2019). Étude ethnobotanique, phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne des fruits de *Pimpinella anisum* de diverses zones de culture au Maroc. *Phytothérapie*, 17(1), 31-37.

Akgül, N., Altunkaynak, B.Z., Altunkaynak, M.E., Deniz, Ö. G., Ünal, D., Akgül, H.M. (2016). L'inhalation de vapeur de mercure peut avoir des effets toxiques sur le rein du rat. *Insuffisance rénale* , 38 (3), 465-473.

Al Mofleh, I. A., Alhaider, A. A., Mossa, J. S., Al-Soohaibani, M. O., Rafatullah, S. (2007). Aqueous suspension of anise "*Pimpinella anisum*" protects rats against chemically induced gastric ulcers. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(7), 1112.

Albuquerque, A. A. C., Sorenson, A. L., Leal-Cardoso, J. (1995). Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(1), 41-49.

Al-Shammari, K. I. A., Batkowska, J., & Gryzińska, M. M. (2017). Effect of various concentrations of an anise seed powder (*Pimpinella anisum* L.) supplement on selected hematological and biochemical parameters of broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(1), 41-46.

Anwar, D. I. (2017). Medicinal benefits of anise seeds (*Pimpinella anisum*) and *Thymus vulgaris* in a sample of healthy volunteers. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*, 8(3), 91-95.

Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., & Wittier, P. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed : Masson, Paris,

Asadollahpoor, A., Abdollahi, M., Rahimi, R.(2017). *Pimpinella anisum* L. fruit: Composition chimique et effet sur le modèle de maladie du foie gras non alcoolique chez le rat. *Journal de recherche en sciences médicales: le journal officiel de l'Université des sciences médicales d'Ispahan* , 22 .

Astur, R.S., Ortiz, M.L., Sutherland, R.J. (1998). Caractérisation de la performance des hommes et des femmes dans une tâche virtuelle de Morris: Une différence de sexe importante et fiable. *Recherche comportementale sur le cerveau* , 93 (1-2), 185-190..

Azevedo, B. F., Simões, M. R., Fiorim, J., Botelho, T., Angeli, J. K., Vieira, J. V. A., ... & Vassallo, D. V. (2016). Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(7), 712-719

B

Baba Aissa, F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed Librairie moderne Rouiba, 46.

Bahi, A. (2015). L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat Albinos Wistar.

Bekara, A., Aithamadouhe, N., Kahloula, K., Sadi, N., Aoues, A. K. (2016). Effect of *Pimpinella anisum* L aqueous extract against oxidative stress induced by lead exposure in young rats brain. *J Appl Environ Biol Sci*, 6, 85-93.

Bekara, A., Hamadouche, N. A., Kahloula, K., & Sadi, N. (2016). Etude phytochimique et activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L. *ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 4(2), 299-307.

Bekara, A., Hamadouche, N. A., Kahloula, K., Harouat, S., & Tabbas, D. (2015). Effect of *Pimpinella anisum* L (Aniseed) Aqueous Extract against Lead (Pb) Neurotoxicity: Neurobehavioral Study. *International Journal of Neuroscience and Behavioral Science*, 3(3), 32-40.

Bensefa, C.L, Andujarb P, Descathae A. (2011) Mercury poisoning. *médecine interne* 32:416–424

Benzeggouta, N. (2014). Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinées.

Bose-O'Reilly, S., McCarty, K. M., Steckling, N., & Lettmeier, B. (2010). Mercury exposure and children's health. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 40(8), 186-215.

Boskabady, M. H., Ramazani-Assari, M. (2005). Possible mechanism for the relaxant effect of *Pimpinella anisum*. on guinea pig tracheal chains. *Pharmaceutical biology*, 42(8), 621-625.

Bourin, M., Hascoët, M. (2003). Le test de la souris sur les zones sombres / claires. *European Journal of Pharmacology* , 463 (1-3), 55-65.

Bradberry, S. M. (2012). Lead and mercury. *Medicine*, 40(3), 133-134

Branco, V., Caito, S., Farina, M., Teixeira da Rocha, J., Aschner, M., Carvalho, C. (2017). Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(3), 119-154.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3e édition, Edition *Lavoisier TEC et DOC*.

Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier publishing, 1995.

Buchbauer, G., Jirovetz, L. (1994). Aromatherapy—use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance journal*, 9(5), 217-222.

C

Cagiano, R., De Salvia, MA, Renna, G., Tortella, E., Braghiroli, D., Parenti, C., Zanolli, P., Baraldi, M., Annau, Z., Cuomo, V. (1990). Preuve que l'exposition au méthylmercure pendant la gestation induit des changements comportementaux et neurochimiques chez la progéniture du rat. *Neurotoxicology and Teratology* , 12 (1), 23-28.

Cavé A. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2ème Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris , pp 274-285.

Cengiz, N., Ozbek, H ., Him, A. (2008). Effets hépatoprotecteurs de l'extrait de graine de *Pimpinella anisum* chez le rat. *Pharmacologyonline* , 3 , 870-874.

Chan, MC., Bautista, E., Alvarado-Cruz, I., Quintanilla-Vega , B., Segovia, J. (2017). Le mercure inorganique empêche la différenciation des cellules SH-SY5Y: protéine précurseur de l'amyloïde, protéines associées aux microtubules et ROS en tant que cibles potentielles. *Journal des éléments traces en médecine et biologie* , 41 , 119-128.

Chaudhry, N. M., Tariq, P. (2006). Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(3), 214-218.

Chehimi, L., Roy, V., Jeljeli, M., Sakly, M. (2012). Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor development and later behaviour in rats. *Behavioural brain research*, 234(1), 43-50.

Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental health perspectives*, 110(suppl 1), 11-23.

Clarkson, T. W., Magos, L., Myers, G. J. (2003). The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New England Journal of Medicine*, 349(18), 1731-1737.

Clarkson, T. W., Vyas, J. B., Ballatori, N. (2007). Mechanisms of mercury disposition in the body. *American journal of industrial medicine*, 50(10), 757-764.

Cordier, S. (2003). Retentissement néonatal d'une alimentation maternelle riche en mercure (poisson) pendant la grossesse. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 16(5), 234-239.

Couic-Marinier, F., Lobstein, A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 18-21.

Coulibaly, M., Bamba, D., Zoro, E. G., & El Rhazi, M. (2016). Some aspects of speciation and reactivity of mercury in various matrices. *Comptes Rendus Chimie*, 19(7), 832-840.

D

Davoody, M., Zahedi, G., Biglari, M., Meireles, M. A. A., Bahadori, A. (2012). Expert and gray box modeling of high pressure liquid carbon dioxide extraction of *Pimpinella anisum* L. seed. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 213-222.

Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambao, R. S. (1971). Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar.

Deepmala, J., Deepak, M., Srivastav, S., Sangeeta, S., Kumar, SA., Kumar, SS. (2013). L'effet protecteur du traitement combiné au dithiothréitol, au zinc et au sélénium protège les lésions oxydatives aiguës induites par le mercure chez le rat. *Journal des éléments traces en médecine et biologie*, 27 (3), 249-256.

Degryse, A. C., Delpla, I., & Voinier, M. A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Rapport de stage en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur du génie sanitaire*.

Dhar, S.K.(1995). Antifertility activity and hormonal profile of trans-anethole in rats. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 39, 63–67.

Diel, P., Smolnikar, K., Michna, H. (1999). In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med.* 65, 197–203.

Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.

Dos Santos, A. A., Hort, M. A., Culbreth, M., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J. B., Aschner, M. (2016). Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 38, 99-107.

Drasch, G., Schupp, I., Höfl, H., Reinke, R., Roider, G. (1994). Mercury burden of human fetal and infant tissues. *European journal of pediatrics*, 153(8), 607-610.

Dyall-Smith, D.J., Scurry, J.P. (1990). Pigmentation au mercure et taux élevés de mercure résultant de l'utilisation d'une crème cosmétique. *Medical Journal of Australia* , 153(7), 409-415.

E

Eccles, C.U., Annau, Z. (1982). Exposition prénatale au méthylmercure: I. Altérations de l'activité néonatale. *Toxicologie neurocomportementale et tératologie* , 4 (3), 371-376.

El Haliem, N.G ., Mohamed, D.S., (2011). Effet de l'aspartame sur la structure histologique du foie et du cortex rénal de rats albinos mâles adultes et effet protecteur éventuel de l'huile de Pimpinella anisum. *Egyptian Journal of Histology* , 34 (4), 715-726.

Elizalde, N., Gil-Bea, FJ, Ramirez, MJ, Aisa, B., B. Lasheras, Del Rio, J.,Tordera, RM. (2008). Effets comportementaux à long terme et déficit de mémoire de reconnaissance induit par un léger stress chronique chez la souris: effet du traitement antidépresseur. *Psychopharmacology* , 199 (1), 1.

El-Sayed, M. G. A., Elkomy, A., Samer, S., & ElBanna, A. H. (2015). Hepatoprotective effect of Pimpinella anisum and Foeniculum vulgare against carbon tetrachloride induced fibrosis in rats. *World J Pharm Pharm Sci*, 4(6), 77-88.

EMA: European Medicines Agency .(2008). ASSESSMENT REPORT ON PIMPINELLA ANISUM L.

F

Fabrocini V, Fabrocini C .(1999). Comment se soigner avec l'aromathérapie. Paris, Éditions Vecchi.

Falcy, M., Jargot, D., La Rocca, B., Pillière, F., Robert, S., Serre, P., & Simonnard, A. (2014). Mercure et composés minéraux. Fiche toxicologique FT, 55.

Faried, M. A., & Issa, N. M.(2017). Comparative study on the effect of the pimpinella anisum and estradiol on the hippocampus and dentate gyrus of ovariectomized rats.

Fibiger, HC.(1991). Mécanismes cholinergiques dans l'apprentissage, la mémoire et la démence: examen de données récentes. *Trends in neurosciences* , 14 (6), 220-223.

Filliat, P. (2012). Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. Doctoral paper university Joseph Fourier Grenoble, 139p.

Fyad, K., Cheriti, A., Bourmita, Y., Belboukhari, N. (2013). *PhytoChem & BioSub Journal*. PCBS Journal, 35.

G

Gamberini, M. T., Rodrigues, D. S., Rodrigues, D., & Pontes, V. B. (2015). Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. *Journal of ethnopharmacology*, 168, 45-49.

Ghouati, Y., Belaiche, T., Ouhssine, M., Amechrouq, A., Tahiri, A., Chakir, S. (2012). Composition Chimique Et Activité Antibactérienne De L'huile Essentielle De Fruits D'anis Vert Marocain. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 151(1-4), 25-34.

Goetz, P. (2004). Plaidoyer pour la tisane médicinale. *Phytothérapie*, 2(1), 8-15.

Golding, J., Gregory, S., Iles-Caven, Y., Hibbeln, J., Emond, A., Taylor, C. M. (2016). Associations between prenatal mercury exposure and early child development in the ALSPAC study. *Neurotoxicology*, 53, 215-222.

Goullé, J. P., Guerbet, M. (2014). Le mercure des amalgames dentaires est-il toxique?

Goullé, J. P., Guerbet, M. (2016). Recensement des niveaux d'intoxications mortelles par l'arsenic, le chrome, le mercure, le plomb, le thallium. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 28(1), 16-27.

Grandjean, P., Weihe, P., White, R. F., Debes, F. (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environmental research*, 77(2), 165-172.

Grandjean,P., Perez M. (2008) Development neurotoxicity: implications of methylmercury research. *International Journal of Environment and Health* 2(3-4): 417-428.

Grosjean, N. (2013). *Le grand livre de l'aromathérapie*. Editions Eyrolles.

Grosman, M., Picot, A. (2010). Risques Lies A L'exposition Prenatale Et Postnatale Au Mercure.

Gurer H, Ozunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N. (1998). Antioxidants effects of Nacetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicol.* 120.

H

Haut, M. W., Morrow, L. A., Pool, D., Callahan, T. S., Haut, J. S., Franzen, M. D. (1999). Neurobehavioral effects of acute exposure to inorganic mercury vapor. *Applied Neuropsychology*, 6(4), 193-200.

Hazelhoff, M. H., Torres, A. M. (2018). Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: Potential mechanisms. *Chemosphere*, 202, 330-338.

Hazelhoff, MH, Bulacio, R.P.,Torres, AM.(2012). Différences liées au sexe des lésions rénales induites par le mercure. *Revue internationale de sciences moléculaires* , 13 (8), 10523-10536.

Hazelhoff, M.H., Bulacio, R.P., Chevalier, A., et Torres, A.M. (2018). L'expression rénale des transporteurs d'anions organiques est modifiée après l'exposition au chlorure de mercure: différences liées au sexe. *Lettres de toxicologie* , 295 , 390-396.

Hazelhoff, MH., Trebucobich, M.S., Stoyanoff, T.R., Chevalier, A.A., Torres, AM (2015). Amélioration de la néphrotoxicité au mercure après manipulation pharmacologique du transporteur d'anions organiques 1 (Oat1) et de la protéine 2 associée à la multirésistance aux médicaments (Mrp2) avec le furosémide. *Toxicology Research* , 4 (5), 1324-1332.

Hosseini, A., Rajabian, A., Fanoudi, S., Farzadnia, M., Boroushaki, M. T. (2018). Protective effect of Rheum turkestanicum root against mercuric chloride-induced hepatorenal toxicity in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 8(6), 488.

Hosseinzadeh, H., Tafaghodi, M., Abedzadeh, S., & Taghiabadi, E. (2014). Effect of aqueous and ethanolic extracts of Pimpinella anisum L. seeds on milk production in rats. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 7(4), 211-216.

Hounkpatin, A. S. Y., Etorh, P. A., Guédénon, P., Alimba, C. G., Ogunkanmi, A., Doughton, T. V., ... & Ouazzani, N. (2013). Haematological evaluation of Wistar rats

exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. *African Journal of Biotechnology*, 12(23).

Howes, M.J., Houghton, P.J., Barlow, D.J., Pocock, V.J., Milligan, S.R.(2002).Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. *J.Pharm. Pharmacol.* 54, 1521–1528.

Huang, C. F., Liu, S. H., Hsu, C. J., & Lin-Shiau, S. Y. (2011). Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicology Letters*, 201(3), 196-204.

Hughes MF, Pickering IJ, Prince RC, Younis HS, Winzerling JJ. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanism of action. *Chem Res Toxicol.* 15, 1466–1471.

Hughes, JA et Sparber, SB.(1978). La d-amphétamine démasque les conséquences postnatales de l'exposition in utero au méthylmercure: méthodes d'étude de la tératogénèse comportementale. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* , 8 (4), 365-375.

I

INERIS (Institut National d'Environnement industriel et de risques). (2010). Données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Mercure et ses dérivés, France.

INSA: Institut National des Sciences Appliquées de Rouen. (2015). Mise au point d'une technique de séparation et de quantification des composés présents dans une huile essentielle

Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres.

J

Jagadeesan, G., Bharathi, E. (2014). Restauration in vivo du potentiel hépatique et néphro-protecteur de l'hespéridine et de l'acide ellagique contre des rats intoxiqués au chlorure de mercure. *Biomedicine & Aging Pathology* , 4 (3), 219-222.

Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Razmjou, M., Karimi, F., Moein, M. R., Farshad, O., ... & Shayesteh, M. R. H. (2015). An in vivo and in vitro investigation on hepatoprotective

effects of Pimpinella anisum seed essential oil and extracts against carbon tetrachloride-induced toxicity. Iranian journal of basic medical sciences, 18(2), 205.

Melet, J.J. (2000). Toxicité du mercure. L'Espagne

Jeltsch, H., Bertrand, F., Lazarus, C., Cassel, JC. (2001). Performances cognitives et activité locomotrice après une lésion de cellules granuleuses dentées chez le rat: rôle de l'étendue de la lésion et du type de mémoire testé. Neurobiologie de l'apprentissage et de la mémoire , 76 (1), 81-105.

Julve, Ph.(2015). fiche eFlore de Pimpinella anisum. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Tela Botanica.

K

Kadan, S., Rayan, M., et Rayan, A. (2013). Activité anticancéreuse de l'extrait de graine d'anis (Pimpinella anisum L.). *The Open Nutraceuticals Journal* , 6 (1).

Kahloula, K.(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, thèse de doctorat.

Kahloula, K., Slimani, M., Adli, DEH, Rachdi, S., D. Boumediene, D. (2013). Effets bénéfiques neurologiques de Pimpinella anisum sur l'exposition au plomb. *Journal international de la pharmacie verte (IJGP)* , 7 (1).

Kahloula, K., Adli, D. E. H., Slimani, M., Terras, H., & Achour, S. (2014). Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 26(4), 186-192.

Kahloula, K., Adli, D. E., Slimani, M. (2017). Le précis des techniques neurocomportementales du petit rongeur. Éditions universitaires européennes.

Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2013). La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media.

Karmakar, R., Bhattacharya, R. et Chatterjee, M. (2000). Étude biochimique, hématologique et histopathologique concernant l'hépatotoxicité induite par le cadmium liée au temps chez la souris. *Biometals* , 13 (3), 231-239.

Kdam, R. M. G., Gabra, N. M., & Eltayb, A. A. (2017). Identification of Anise Seed Oils and their Antimicrobial and Antioxidant Activities

Kholkhal, F. (2014). Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*, thèse de doctorat.

Kjellstrom T. (1989) Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2: Interviews and psychological tests at age 6. Report (3642), National Swedish Environmental Protection Board, Solna, Sweden .

Korbas, M., Lai, B., Vogt, S., Gleber, S. C., Karunakaran, C., Pickering, I. J., ... & George, G. N. (2013). Methylmercury targets photoreceptor outer segments. *ACS chemical biology*, 8(10), 2256-2263.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S., & Kuštrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55(4), 377-385.

Kraft K., Hobbs C. (2004) Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.

Kreydiyyeh, S. I., Usta, J., Knio, K., Markossian, S., & Dagher, S. (2003). Aniseed oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat. *Life sciences*, 74(5), 663-673.

Kumar, G., Srivastava, A., Sharma, SK et Gupta, YK. (2014). Évaluation de l'innocuité d'une formulation ayurvédique à base de mercure (Sidh Makardhwaj) sur le cerveau, le foie et les reins chez le rat. *Le journal indien de la recherche médicale* , 139 (4), 610.

Kyle, G.M., Luthra, R., Bruckner , J.V., MacKenzie, W.F., Acosta, D. (1983). Évaluation des tests fonctionnels, morphologiques et enzymatiques de néphrotoxicité aiguë induite par le chlorure de mercure. *Journal de toxicologie et de santé environnementale*, Partie A Actualités , 12 (1), 99-117.

L

Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesithérapie, la revue*, 61(7), 18-23.

Lauwerys RR, Haufroid V, Hoet P, Lison D. (2007) . Mercure. In: Toxicologie industrielle

M

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

Mahbub, K. R., Krishnan, K., Naidu, R., Andrews, S., & Megharaj, M. (2017). Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecological Indicators*, 74, 451-462.

Mahmood, M.S., Ahmad, M.F., Hussain, I., Abbas, R.Z., KHAN, A., Rafiq, A. (2014). Effet stimulant de la croissance de *Pimpinella anisum* (anis) chez les poulets de chair. *Boletín Latinoamericano et Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13 (3), 278-284.

Maurya, S., Kushwaha, A. K., & Singh, G. (2013). Biological significance of spicy essential oils. *Advances in Natural Science*, 6(4), 84-95.

Mello-Carpes, P. B., Barros, W., Borges, S., Alves, N., Rizzetti, D., Pecanha, F. M., ... & Izquierdo, I. (2013). Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(7), 468-472.

Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Marrelli, M., Statti, G. A., ... & Conforti, F. (2009). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig.(Apiaceae). *Fitoterapia*, 80(5), 297-300.

mercuric chloride. *J Toxicol Environ Health*. 12(1): 99-117.

Modi, M., Kaul, R. K., Kannan, G. M., Flora, S. J. (2006). Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(3), 197-204.

Moumen, Y. (2017). Rôle des micromolécules des produits naturels dans la détoxification du mercure chez les mammifères: *Impact sur le métabolisme des minéraux, le système immunitaire et reproducteur* (Doctoral dissertation, Université de Constantine 1).

Mumtaz, S., Ali, S., Khan, R., Andleeb, S., Ulhaq, M., Khan, MA et Shakir, HA. (2019). Le rôle protecteur de l'acide ascorbique dans l'hépatotoxicité du cadmium et du mercure chez le lapin. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (14), 14087-14096.

Mushtaq, A., Anwar, R. et Ahmad, M. (2019). Effet Renforçant De La Mémoire De L'anis (Pimpinella Anisum) En Ce Qui Concerne Son Activité Antioxydante Chez La Souris Albino. *Japs: Journal des sciences animales et végétales*, 29 (2).

N

Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B., Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41(2), 380-382.

Nogueira, C. W., Soares, F. A., Nascimento, P. C., Muller, D., & Rocha, J. B. T. (2003). 2, 3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid increase mercury-and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase. *Toxicology*, 184(2-3), 85-95.

O

Obaid, A. J., Al-Janabi, J. K. A., Taj-Aldin, W. R. (2017). Chemical composition and bioactivity characteristics of Pimpinella anisum essential oil against *Trichophyton rubrum*. *Journal of Global Pharma Technology*, 8(9), 44-56.

Ostertag, S. K., Stern, G. A., Wang, F., Lemes, M., & Chan, H. M. (2013). Mercury distribution and speciation in different brain regions of beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Science of the total environment*, 456, 278-286.

P

Paris, R., Moyses, H. (1969). *Precis de matière médicale*. Ed Masson Paris.

Park, J. D., & Zheng, W. (2012). Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *Journal of preventive medicine and public health*, 45(6), 344.

Peixoto, N. C., Roza, T., Morsch, V. M., Pereira, M. E. (2007). Behavioral alterations induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure. *International journal of developmental neuroscience*, 25(1), 39-46.

Pereira, P., S. Puga, V. Cardoso, F. Pinto-Ribeiro, J. Raimundo, M. Barata, ... et A. Almeida (2016). L'accumulation de mercure inorganique dans le cerveau à la suite d'une exposition à l'eau provoque un déficit du nombre de cellules cérébrales et altère le comportement de nage chez les poissons (dorade blanche - *Diplodus sargus*). *Aquatic Toxicology*, 170, 400-412..

Pletz, J., Sánchez-Bayo, F. Tennekes, H.A.(2016). Analyse dose-réponse indiquant une neurotoxicité liée au temps et causée par le mercure organique et inorganique - Implications pour les effets toxiques sur le cerveau en développement. *Toxicology*, 347, 1-5.

Poirot, Tony. (2016). Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Diss. Université de Lorraine.

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

Poupon, J. (2007). L'exposition au mercure en 2007 toxicité et prise en charge. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(390), 51-56.

R

Rao, MV., Purohit, AR. (2011). Neuroprotection par la mélatonine sur la toxicité induite par le mercure dans le cerveau du rat. *Pharmacology & Pharmacy*, 2 (04), 375.

Reiter, M., & Brandt, W. (1985). Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittel-Forschung*, 35(1A), 408-414.

Rice, K. M., Walker Jr, E. M., Wu, M., Gillette, C., Blough, E. R. (2014). Environmental mercury and its toxic effects. *Journal of preventive medicine and public health*, 47(2), 74.

Risher, J. F., & Amler, S. N. (2005). Mercury exposure: evaluation and intervention: the inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. *Neurotoxicology*, 26(4), 691-699.

Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. I. a chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*.

Rooney, J. P. (2007). The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*, 234(3), 145-156.

Rouleau, C., Borg-Neczak, K., Gottofrey, J., & Tjälve, H. (1999). Accumulation of waterborne mercury (II) in specific areas of fish brain. *Environmental science & technology*, 33(19), 3384-3389.

S

Samojlik,I., Mijatović,V., Petković, S., Škrbić,B., Božin,B . (2012). L'influence de l'huile essentielle d'anis (*Pimpinella anisum*, L.) sur les effets du médicament sur le système nerveux central. *Fitoterapia* , 83 (8), 1466-1473.

Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 25-41.

Shahamat, Z., Abbasi-Maleki, S., & Motamed, S. M. (2016). Evaluation of antidepressant-like effects of aqueous and ethanolic extracts of *Pimpinella anisum* fruit in mice. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(3), 322.

Sheikh ,T.J, Patel, B.J., Joshi ,D.V. (2011). Electrolytes alterations in plasma and urine after

Shojaii, A., Abdollahi Fard, M. (2012). Review of pharmacological properties and chemical constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN pharmaceutics*, 2012.

Simbar, M., Shadipour, M., Salamzadeh, J., Ramezani-Tehrani, F., & Nasiri, N. (2015). The combination of “*Pimpinella anisum*, *Apium graveolens* and *Crocus sativus* (PAC)” is more effective than “mefenamic acid” on postpartum after-pain. *Journal of herbal medicine*, 5(1), 20-25.

Simmons, J. E., Yang, R. S., & Berman, E. (1995). Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organics and metals: advantages and disadvantages of the use of real-world complex mixtures. *Environmental health perspectives*, 103(suppl 1), 67-71.

Simsek, U. G., Ciftci, M., Dalkilic, B., Guler, T., & Ertas, O. N. (2007). The effects of dietary antibiotic and anise oil supplementation on body weight, carcass characteristics and organoleptic analysis of meat in broilers. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158(10), 514.

Soleo, L., Urbano, M. L., Petrera, V., Ambrosi, L. (1990). Effects of low exposure to inorganic mercury on psychological performance. *Occupational and Environmental Medicine*, 47(2), 105-109.

Steflitsch, W., & Steflitsch, M. (2008). Clinical aromatherapy. *Journal of Men's Health*, 5(1), 74-85.

Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, 16, 1-7.

Syversen, T., & Kaur, P. (2012). The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(4), 215-226.

T

Teixeira, F., Fernandes, R., Farias-Junior, P.M.A., Costa, M.N., Fernandes, L.M.P., Santana, L.N., Silva-Junior, A.F., Silva, M.C., Maia, C., Lima, R. (2014). Evaluation des effets de l'intoxication chronique au mercure inorganique sur la mémoire et le contrôle moteur chez le rat. *Revue internationale de recherche environnementale et de santé publique*, 11 (9), 9171-9185.

Teixeira, FB, de Oliveira, AC, Leão, LK, Fagundes, Caroline du Nord, Fernandes, RM, Fernandes, LM, Crespo-Lopez, ME.(2018). L'exposition au mercure inorganique provoque un stress oxydatif, la mort cellulaire et des déficits fonctionnels dans le cortex moteur. *Frontiers in Neuroscience Moléculaire*, 11.

Tepe, A. S., & Tepe, B. (2015). Traditional use, biological activity potential and toxicity of Pimpinella species. *Industrial Crops and Products*, 69, 153-166.

Teuscher E., Anton R., Lobstein A.(2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc, Paris, 522 pp.

Trease, E., Evans, W.C.(1987). Pharmacognosie. Billiare Tindall. *London 13th Edition*. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (*Baume du pomme*). *Journal of Medicine and Scientific*. 1987, Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.

V

Vanholder, R.C., De Smet, R,V., Ringoir, S.M. (1992). Assessment of urea and other uremic markers for quantification of dialysis efficacy. *Clinical Chemistry*. 38: 1429-36.

Vesterberg, O., Alessio, L., Brune, D., Gerhardsson, L., Herber, R., Kazantzis, G., ... et Sabbioni, E. (1993). Projet international de production de valeurs de référence pour les concentrations d'oligo-éléments dans le sang et l'urine humains - TRACY. *Journal scandinave du travail, de l'environnement et de la santé* , 19-26.

Vimy, M. J., Takahashi, Y., Lorscheider, F. L. (1990). Maternal-fetal distribution of mercury (203Hg) released from dental amalgam fillings. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258(4), R939-R945.

W

Wadaan, M. A. (2009). Effects of mercury exposure on blood chemistry and liver histopathology of male rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(3), 126-131.

Wang, Y., Wang, D., Lin, L., & Wang, M. (2015). Quantitative proteomic analysis reveals proteins involved in the neurotoxicity of marine medaka *Oryzias melastigma* chronically exposed to inorganic mercury. *Chemosphere*, 119, 1126-1133.

Wichtl M.,Anton R.(2003).Plantes thérapeutiques, 2e édition, Tec & Doc, Paris, 692 pp.

Y

Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., Saharkhiz, M. J., & Salamifar, E. (2008). Extraction of essential oil from *Pimpinella anisum* using supercritical carbon dioxide and comparison with hydrodistillation. *Natural product research*, 22(3), 212-218.

Yassine, N. (2011). *Lésions sélectives de deux populations de neurones affectées dans la maladie d'Alzheimer: Impact sur les performances cognitives et l'histopathologie des souris tg2576* (thèse de doctorat, Strasbourg).

Yasutake, A., Marumoto M., Yoshida,M. (2010). Action neurotoxique du mercure inorganique injecté dans l'espace intraventriculaire du cerveau de souris. *The Journal of toxicological sciences* , 35 (5), 767-771.

**REGULAR ARTICLE**

***Pimpinella anisum* essential oil enhances spatial learning performance of rats exposed to HgCl₂ during the developmental period**

Arabi Wafaa, Kahloula Khaled, Adli Djallal E.H, Ziani Kaddour, Slimani Miloud

Laboratory of Biotoxicology, Pharmacognosy and Biological recovery of plants (LBPVBP), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Dr Moulay Tahar, Saida, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 11 Jan 2019

Revised: 18 Mar 2019

Accepted: 25 Apr 2019

***Corresponding Author:**

Email: wafaaarabi@yahoo.fr

Telephone: +213 776579555

Keywords: Mercury chloride, *Pimpinella anisum*, Memory, learning performance

ABSTRACT

The essential oil of *Pimpinella anisum* has been widely used in traditional medicine to treat a variety of diseases. This study was aimed to test, *in vivo*, effect of exposition to mercury chloride (100mg/L) in wistar rats during the gestation and lactation period. On the other hand, treatment of pups with essential oil of *P. anisum* (0.25 ml/kg) for 21 days. The behavioural patterns evaluated was spatial memory (Morris water maze) and the determination of mercury concentration in blood and brain. The data were analysed by two way analyses of variance (ANOVAs). When a significant difference was found, the Student Newman Keuls *post hoc* test was conducted. The results of the present study demonstrated that exposure to mercury in developmental period induced, significantly decrease of the learning performance ($p < 0.01$; $p < 0.05$) compared to control rats. Thus, the concentration of mercury in the intoxicated group is high in the blood and brain. However, the administration of *P. anisum* essential oil resulted into an improvement of learning performance ($p < 0.01$; $p < 0.05$) and reduction of mercury blood and brain mercury. In conclusion, our results demonstrate that mercury exposure during the developmental period induces learning disabilities and remains trapped in blood and brain. This could be improved by the treatment with *Pimpinella anisum* essential oil.

1. Introduction

Mercury (Hg) is a widespread heavy metal with potential severe impacts on human health (Bensefa et al., 2011). Exposure to mercury occurs through different pathways and forms including organic mercury, elemental Hg and inorganic mercury form. Once in the brain, all these forms are transformed to inorganic Hg (I-Hg), where it bioaccumulates and remains for long periods. Hg is a well-known neurotoxicant, with its most damaging effects reported during brain development (Chan et al., 2017).

However, medicinal plants have played an im-

portant role in the treatment of diseases (Ali et al., 2017). *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) is a grassy annual herb from the Mediterranean region and western Asia (Gamberini et al., 2015). Essential oil of *P. anisum* (AEO) is used today as an ingredient in cough medicine (Simon et al., 1984). It has been used as carminative, antiseptic, antispasmodic, expectorant, stimulant and stomachic drugs. In Persian medieval medicine, the plant and especially its fruits' essential oil have been used for treatment of some neurological diseases, including seizures and epilepsy (Gorji et al., 2001). Anis oil is also believed to have protective effects against the development

of cerebrovascular diseases (Karimzadeh et al., 2012).

Many studies have shown that the extract and essential oil of green anise can potentially acting on the central nervous system exerts a neuro-protective effect which is probably due to the improvement of NMDA function. Thus, this effect could be attributed to the majority bioactive compound of this plant. Anise essential oil induced neuronal excitability, which was attributed to the activation of Ca²⁺ canals or to the inhibition of Ca²⁺/K⁺ voltage dependent canal (Janahmadia et al., 2008; Bekara et al., 2015).

The aim of the present study is to examine the effect on spatial learning caused by the mercury (HgCl₂) chloride and corrective effect of AEO in vivo, on rat exposed to HgCl₂ during gestation and lactation period.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and preparation of the essential oil

The dry and ripe seeds of *Pimpinella anisum* L were purchased from local herb market in Saida (Algeria) and were identified and authenticated by an expert taxonomist. A voucher specimen was deposited at the herbarium of the department of Biology at Saida University (Algeria). We used 100 g of seeds of *P. anisum* powder that were processed by steam distillation, over a period of four hours, in an all-glass apparatus, to obtain essential oil with 1.383% yield.

2.2. Animals and Treatment

Experiments were carried out on Wistar rats (obtained from the Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Saida) weighing 210±50 g. The animals were housed with free access to water and food in an animal room, with a 12/12-hour light/dark cycle, at 22 ± 2 °C. They were mated one week after their arrival (three females and one male per cage). After one week of cohabitation with males, females were divided into 02 groups

Group 1: Pregnant females received drinking distilled water.

Group 2: Pregnant females received 100mg/L of HgCl₂ in distilled water (Chehimi et al., 2012)

Number and suffering of animals were minimised in accordance with the guidelines of the European

Council Directive (86/609/EEC).

2.3. Experimental Design

At birth, pups issued from intoxicated females, continued to receive HgCl₂ in drinking water until weaning, while control pups received only distilled water. In order to test the capacity of anise essential oil (AEO) to attenuate Hg neurotoxicity which induces cognitive deficits, drug therapy was administered, beginning 24 hours after weaning.

At weaning, we got 03 new groups (n = 7) as follow:

Group C: Control rats (issued from control females) received distilled water only.

Group Hg: received orally solution of HgCl₂.

Group Hg-AEO: intoxicated rats (issued from intoxicated females) that received intraperitoneal injection with 0,25ml/kg of body weight AEO daily for 21 days (Asadollahpoor et al., 2017)

2.4. Morris Water Maze

The Morris water maze task was used to assess cognitive function, in particularly spatial learning and memory abilities. The test was conducted in a round white pool 90 cm in diameter with a 50 cm high wall. The pool was filled to a depth of 30 cm with water made opaque with white, not toxic water based paint. Water temperature was maintained at 21 ± 1 C° with an aquarium heater. The platform of 10 cm in diameter and 28 cm high (i.e., 2 cm below the water's surface) was used as the hidden goal. The pool was located in a room with numerous extra-maze cues that remained constant throughout the experiment. Animals were tested on days 11-15 after weaning, with four trials per day for five consecutive days. On each trial, the animal was placed in the pool, facing the wall, at one of the four start locations (north (N), south (S), east (E) and west (W)). Start location sequences were randomly assigned each day prior to the start of testing. Rats were allowed to swim to the submerged platform placed in the NW quadrant during 60 s. If the platform was not found within the allowed time, the rat was manually placed onto it. Rats were allowed to rest on the platform for 20 s between each trial. A session of four trials was conducted each day from 9:00 to 11:00 A.M.. The experimenter was hidden from the view of the animals. The escape latency (time to find the platform) and path length (distance travelled to the hidden platform) were recorded by using a video track sys-

tem (Viewpoint, France).

A probe test was conducted the day following the end of the training session to further characterize swim task performance. In this test, the platform was removed and the rat was placed next to and facing the S side. Animals were allowed to swim freely for the original training session length of time (60 s) for a single trial. The time spent by animals in the previously correct quadrant (NW) was removed and the rat was placed next to and facing the S side. Animals were allowed to swim freely for the original training session length of time (60 s) for a single trial. The time spent by animals in the previously correct quadrant (NW) was measured.

Visual cue test was performed two hours after the end of the probe test in order to evaluate the visuo-motor abilities and the motivation of the animals. It was conducted by extending a large black flag above the water level from the submerged platform. The maximum time allowed was the same as the original training sessions. The escape latency and path length were measured during a single session of four trials (Kahloula et al., 2014).

2.5. Determination of blood and brain mercury

The mercury present in the mineralized material is volatilized at high temperature (550 ° C). Elemental mercury is formed as vapor by oxygen stream and amalgamated on a trap. After heating the trap to dissociate the amalgam, the mercury vapor is quantified by flameless atomic absorption spectrometry at 253.65 nm.

2.6. Statistical Analysis

Results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analysed by the two-way analyses of variance (ANOVAs). When a significant difference was found, the Student-Newman-Keuls post-hoc test was conducted. For all analyses, a difference was considered significant at p ≤0.05.

3. Results

3.1. Morris water maze test

A two-way ANOVA was conducted to compare the learning performance of rats day by day. There was a significant increase in term of latency to find the hidden platform during the first, second, third and fourth days of training in Hg exposed rats compared to control rats (p≤0.01, p≤0.01, p≤0.05, p≤0.01 respectively). (Fig.1). We recorded a significant reduction of latency to find the hidden

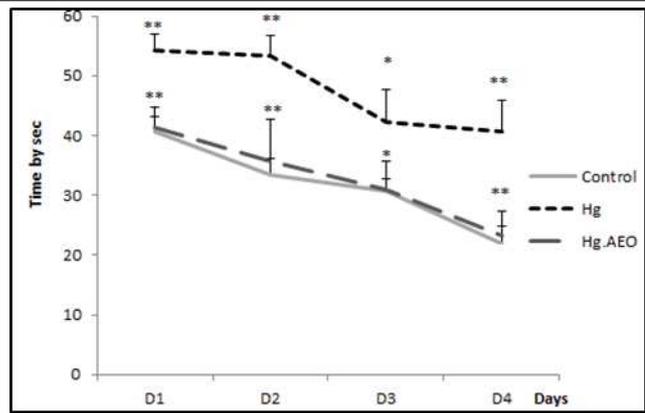


Figure 1: Time latency before finding the platform during the training phase of the Morris water maze task of rats exposed to mercury during gestation and lactation period and treated with anis essential oil.

Data are mean ± S.E.M: First day: **p< 0.01(Hg vs. control); **p< 0.01 (Hg vs. Hg-AEO). Second day: **p<0.01(Hg vs. control); **p< 0.01 (Hg vs. Hg-AEO). Third day: *p< 0.05(Hg vs. control), *p< 0.05 (Hgvs.Hg-AEO). Fourth day: **p < 0.01 (Hg vs. control); **p< 0.01 (Hg vs. Hg-AEO).

platform in Hg-AEO group compared to Hg group for all days of training period (p≤0.01, p≤0.01, p≤0.05, p≤0.01) respectively .

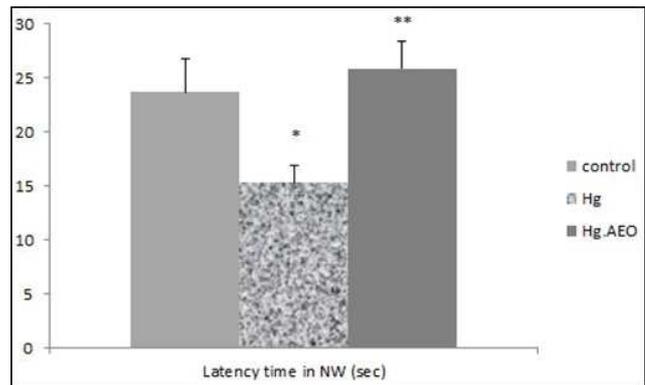


Figure 2: Effect of Hg exposure and anis essential oil on time spent in the training quadrant (NW) during the probe test (swimming pool test).

Data are mean ± S.E.M: *p < 0.05(Hg vs. control) ; **p< 0.01 (Hg vs.Hg-AEO).

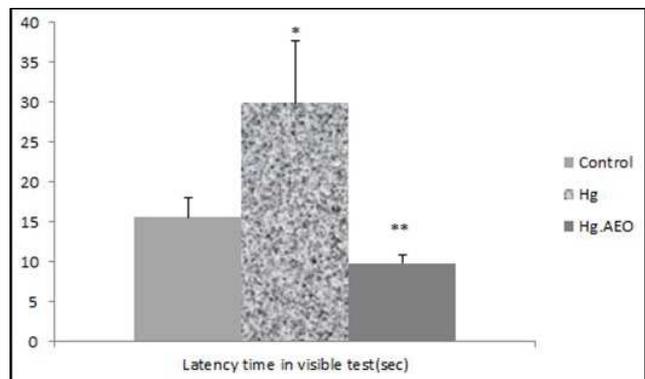


Figure 3: Time latency before finding the platform during the cue phase of the Morris water maze task of rats exposed to Hg and anis essential oil. Data are mean ± S.E.M: *p< 0.05(Hg vs.control) ; ** p< 0.01 (Hg vs.Hg-AEO).

During the probe test, there was a significant decrease of the time spent in the NW quadrant for Hg-vehicle group compared to control and Hg-AEO groups ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ respectively) (Fig.2). During the visual cue test, we noted that mercury poisoning during development period induced a significant decrease of performance compared with the control and Hg-AEO groups in terms of escape latency ($p \leq 0.05$ et $p \leq 0.01$ respectively) (Fig.3).

3.2. Determination of blood and brain mercury

The atomic absorption spectrophotometry technic revealed variations in mercury levels in the blood and brain. These results show that the mercury concentration in the poisoned rats is higher than the control rats. However, treatment with the *P. anisum* essential oil of anise reduced this concentration in the blood and the brain. The results recorded are in the following table 1.

Groups	Mercury Blood ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Brain mercury ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
Control	0,20	3,10
Hg	8,11	20,09
Hg-AEO	3,66	6,11

Table 1: Table of blood and brain mercury analysis.

4. Discussion

Mercury is considered as an environmental pollutant related to high health risk (Azevedo et al., 2016). There is evidence that high levels of mercury exposure to the pregnant woman can result in damage to the brain of the developing fetus (Gamberini et al., 2015). However, essential oil of *Pimpinella anisum* has been widely used in traditional Persian medicine to treat a variety of diseases including some neurological disorders (Karimzadeh et al., 2012).

In addition, the use of anise essential oil can correct the effect of drugs that act on the center of the nervous system (Samjolic et al., 2012). This study was carried out to evaluate the neurotoxic effects caused by mercury and the corrective effects of *P. anisum*.

Regarding the results recorded for the water maze test, we found that the learning time of the exposed animals was significantly elevated during the 1st, 2nd, 3rd and 4th day of learning during the test acquisition phase compared to control animals. This indicated that the intoxicated animals have difficulty or learning disabilities. Similarly, for the probe test which revealed latency in the target frame by the witnesses significantly higher than that of the intoxicated which means that the ani-

mals exposed to the HgCl_2 have not memorized well the platform location by referring to spatial indices. During development, the hippocampus is a region of active neurogenesis. This region is involved in certain types of learning including spatial learning. The exposure to methylmercury induces the degradation of E cyclins involved in cell cycle regulation and therefore in an inhibition of DNA synthesis at the level of the hippocampus which leads to a reduction of his size and alteration of some function (Falluel-Morel et al., 2007). In addition, mercury would alter the activity of the cholinergic system in rats, a system that would be involved in spatial learning (Catin, 2001). In the same context of learning, during the visible test, the raccoons exposed to the Hg took longer time to reach the platform. This proved that animals exposed to HgCl_2 during pregnancy and lactation had visions disorders. The Hg causes vision disorders and this is in proportion to the dose administered (Pletzet al., 2016). Though, treatment with anise reduced significantly the time of acquisition of the localisation of the platform during the 4 days of the learning phase. Moreover, during the probe tests, animals treated with anise have a higher latency time in the target area than the intoxicated animals and take little time to find the platform in the visible test which explained that the anise essential oil corrected disorders and damage caused by Hg. In view of the characterization of the effects on the cognitive system of *P. anisum* including the exploratory activity and the anxiety it is considered that it is taken in people with disabilities such as Alzheimer's disease (Gambriani et al., 2015)

The results of the assay showed that the blood and brain mercury of the poisoned rats is important to that of the controls. The target organ in humans when inhaling mercury vapor is the central nervous system. During chronic exposures to inorganic mercury derivatives, the kidney is the critical organ. The severity and reversibility of lesions depend of the intensity and duration of exposure (Bensefa et al., 2011). Mercury is a powerful neurotoxic redistributed in the body of the infant and accumulates in different compartments of the developing brain, especially in the hippocampus, the cerebral cortex, the cerebellum retina (Grosman et al., 2010). Mercury crosses the placenta and its increase in the brain has led to cognitive deficits. However, treatment with anise oil reduced mercury levels and cerebral mercury levels. *Pimpinella anisum* has a strong ability to chelate multivalent metal ions, this chelating effect against minerals

would have been the source of a protective effect (El sayed et al., 2015).

5. Conclusion

In conclusion, the results of this study shows that exposure to mercury chloride in development period led to a deficient learning and this is due to its high concentration in the brain. However, a treatment with anis essential oil reduced a mercury levels in the brain and improved learning ability.

References

- Bensefa CL, Andujarb P, Descathae A (2011) Mercury poisoning. *médecine interne*32:416–424
- Chan MC, Bautista E, Cruz1 IA, Quintanilla-Vega B, Segovia J (2017) Inorganic mercury prevents the differentiation of SH-SY5Y cells: amyloid precursor protein, microtubule associated proteins and ROS as potential targets. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 41: 119-128.
- Ali ZK, Hasan A, Parray AS, AhmadW (2017) Anisoon (Pimpinella anisum L.):A review of Pharmacological Activities and Clinical Effects. *Hippocratic Journal of Unani Medicine*12: 31-46.
- Gamberini MT, Rodrigues DS, Rodrigues D, Pontes VB (2015) Effects of the aqueous extract of Pimpinella anisum L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. *Journal of ethnopharmacology* 168: 45-49.
- Simon JE, Chadwick AF, Craker LE(1984)Herbs, an indexed bibliography.Elsevier:1971-1980.
- Gorji A, Ghadiri MK (2001) History of epilepsy in Medieval Iranian medicine. *Neuroscience &Biobehavioral Reviews* 25(5): 455-461.
- Karimzadeh F, Hosseini M, Mangeng D, Alavi H, Hassanzadeh G R, Bayat M, Jafarian M, Kazemi H, GorjiA(2012) Anticonvulsant and neuroprotective effects of Pimpinella anisum in rat brain. *BMC Complementary and Alternative Medicine*12:76.
- Janahmadia M, Farajnia S, Vatanparast J, Abbasipour H, Kamalijad M(2008) The fruit essential oil of Pimpinella anisum. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization. *Journal of Ethnopharmacology* 120 :360–365.
- Bekara A, Ait Hamadouche N, Kahloula K, HarouatS, TabbasD, Aoues AEK (2015) Effect of Pimpinella anisum L (Aniseed) Aqueous Extract against Lead (Pb) Neurotoxicity: Neurobehavioral Study. *International Journal of Neuroscience and Behavioral Science* 3(3): 32-40.
- Chehimi L, Roy V, Jeljeli M, Sakly M (2012) Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor development and later behaviour in rats. *Behavioural brain research* 234 (1): 43-50.
- Asadollahpoor A, Abdollahi M, Rahimi R (2017)Pimpinellaanisum L. fruit: Chemical composition and effect on rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Res Med Sci*:22:37.
- Azevedo B, Simões MR, Fiorim J, Botelho T, Angeli J K, Vieira JVA, Vassallo DV (2016) Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43(7): 712-719.
- Samojlik I, Mijatović V, Petković S, Škrbić B, Božin B (2012) The influence of essential oil of aniseed (Pimpinellaanisum, L.) on drug effects on the central nervous system. *Fitoterapia* 83(8): 1466-1473
- Falluel-Morel A, Sokolowski K, Sisti HM, Zhou X, Shors TJ, DiCiccobloom E (2007) Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. *Journal of Neurochemistry* 103(5): 1968-1981.
- Cantin J (2001) Neurotoxicité du mercure méthyle: Effets protecteurs du selenium pendant le développement prénatal murin.
- Pletz J,Sánchez-Bayo F, Tennekes HA (2016) Dose-response analysis indicating time-dependent neurotoxicity caused by organic and inorganic mercury-Implications for toxic effects in the developing brain. *Toxicology*; 347, 1-5.
- Grosman M, Picot A (2010) Risques liés à l'exposition prénatale et postnatale au mercure.
- El-Sayed MGA, Elkomy A, Samer S, El-Banna AH (2015) Hepatoprotective effect of Pimpinella anisum and Foeniculum vulgare against carbon tetrachloride induced fibrosis in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(6): 78-88.
- Kahloula K, Adli DEH, Slimani M, Terras H, Achour S (2014) Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 26(4): 186-192.

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).

Résumé

Ce travail consiste à évaluer les modifications induites par le Mercure (Hg) en employant plusieurs approches ; neurocomportementale, biochimique, hématologique et histologique chez des jeunes rats wistar durant la période de gestation et de lactation, ainsi que testé l'efficacité de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* (Anis vert), à rétablir ou non ces effets délétères en traitant les rats préalablement intoxiqués par une dose journalière d'injection intrapéritonéale de 0,25ml/kg/jr pour l'huile essentielle de cette plante durant 21 jours et par une dose de 500mg/kg/jr d'extrait aqueux par gavage pendant 15 jours.

Toutefois, l'extraction par hydrodistillation, a permis d'obtenir une HE avec un rendement de l'ordre de 1,383%. De plus, le rendement de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* obtenue par décoction est de l'ordre 17.18%. La composition de l'huile essentielle a été analysée par CPG-SM qui a permis d'identifier 12 composants de l'anis vert avec l'anéthol comme composant majeur avec un pourcentage de 55,44%. L'exposition chronique au Chlorure de mercure (HgCl₂) à une dose de 100 mg/l par voie orale en période de gestation et de lactation a permis d'enregistrer une baisse du poids corporel et une réduction du poids cérébral comparés aux témoins. Cependant, l'utilisation de différentes techniques relatives aux tests de comportements : le test de la nage forcée (FST), de l'Open field, du double compartiment obscurité / lumière et le test de la piscine de Morris dévoilent clairement que l'intoxication au HgCl₂ a entraîné la présence d'un état dépressif, une hypoactivité locomotrice, une anxiété et un déficit d'apprentissage spatiale. Cette intoxication au HgCl₂ a conduit à une atteinte de la fonction hépatique (élévation de taux sérique d'ASAT, ALAT et (p<0,01), (P < 0.05)), une insuffisance rénale par augmentation des concentrations sériques de l'urée et de la créatinine ((P<0.05), (P > 0.05)) et une hypoglycémie (p<0,05). Les analyses hématologiques ont présenté une anémie marquée par une diminution significative de taux d'hématies et l'hémoglobine (p<0,05). De plus, l'étude histopathologique a montré des dommages au niveau cérébral, hépatique et rénal causés par le mercure. Par ailleurs, le traitement par l'huile essentielle et l'extrait aqueux de l'anis à améliorer le comportement des rats causés par ce métal ainsi qu'une régulation des différents biomarqueurs de la fonction rénale, hépatique et l'hémogramme.

En conclusion, l'anis vert porte des vertus thérapeutiques non négligeables face à l'effet de cette intoxication par le mercure chez les jeunes rats en période de développement.

Mots clés : Mercure, Anis vert, Dépression, Mémoire, Anxiété, Rein, Foie, Sang

Abstract

This work consists in evaluating the modifications induced by Mercury (Hg) using several approaches; neurobehavioural, biochemical, hematological and histological findings in young wistar rats during gestation and lactation, as well as tested the efficacy of the essential oil and aqueous extract of *Pimpinella anisum* (Green Anise), to restore or not these deleterious effects by treating rats previously intoxicated with a daily intraperitoneal injection dose of 0.25ml/kg/day for the essential oil of this plant for 21 days and with a dose of 500mg/kg/day of aqueous extract by gavage for 15 days.

However, extraction by hydrodistillation allowed to obtain an EO with an efficiency of about 1.383%. In addition, the yield of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* obtained by decoction is about 17.18%. The composition of the essential oil was analyzed by CPG-SM which identified 12 components of green anise with anethole as a major component with a percentage of 55.44%. Chronic exposure to 100 mg/L oral mercury chloride (HgCl₂) during pregnancy and lactation resulted in decreased body weight and reduced brain weight compared to controls. However, the use of different techniques related to behavioural tests: the forced swimming test (FST), the Open field test, the double dark/light compartment test and the Morris pool test clearly reveal that HgCl₂ intoxication has resulted in the presence of depression, locomotor hypoactivity, anxiety and spatial learning deficit. This HgCl₂ intoxication led to impaired liver function (elevated serum ASAT, ALAT and (p<0.01), (P < 0.05)), renal failure by increased serum concentrations of urea and creatinine ((P<0.05), (P > 0.05)) and hypoglycemia (p<0.05). Hematological analyses showed anemia marked by a significant decrease in red blood cell count and hemoglobin (p<0.05). In addition, the histopathological study showed brain, liver and kidney damage caused by mercury. In addition, treatment with essential oil and aqueous anise extract to improve the behaviour of rats caused by this metal as well as regulation of the various biomarkers of renal, hepatic and blood function.

In conclusion, green anise has significant therapeutic properties in the face of the effect of mercury poisoning on young rats during development.

Keywords: Mercury, Anise, Depression, Memory, Anxiety, Kidney, Liver, Blood

ملخص

يتمثل هذا العمل في تقييم التغيرات التي يسببها الزئبق من خلال استخدام عدة طرق؛ النتائج السلوكية العصبية والكيمياء الحيوية والدموية والنسجية لدى فئران ويستار الشابة خلال فترة الحمل والرضاعة، وكذلك فعالية الزيوت العطرية والمستخلص المائي لليانسون أخضر، على تصحيح أو عدم تصحيح التغيرات عن طريق معالجة الفئران التي سبق أن تسمنت بجرعة يومية من الحقن داخل الصفاق تبلغ 0.25 مل / كغ / يوم للزيوت الأساسية لهذا النبات لمدة 21 يومًا وجرعة 500 ملغ / كغ / يوم من المستخلص المائي التغذوية لمدة 15 يومًا ومع ذلك، فإن استخراج زيت اليانسون مكننا من الحصول على مردود يصل إلى 1.383 ٪ بالإضافة إلى ذلك، فإن المردود الذي تم الحصول عليه عن طريق الاستخلاص بالإغلاء هو في حدود 17.18 ٪. تحليل تركيب الزيت العطري عن طريق CPG-SM. حدد 12 عنصرًا من اليانسون الأخضر مع أنتول كمكون أساسي بنسبة 55.44 ٪.

أدى التعرض المزمن لكلوريد الزئبق بجرعة 100 ملغ / لتر عن طريق الفم خلال فترة الحمل والرضاعة إلى انخفاض وزن الجسم وانخفاض وزن المخ مقارنة مع الشواهد. ومع ذلك، فإن استخدام أساليب اختبار السلوك المختلفة: اختبار السباحة القسري، والحقل المفتوح، والمقصورة المزودة الداكنة / الخفيفة واختبار موريس بينت ان الزئبق أدى إلى الاكتئاب ونقص الحركة والقلق ونقص التعلم المكاني.

أيضا إلى اختلال وظائف الكبد (ارتفاع المصل ASAT، ALAT (P < 0.01)، والفشل الكلوي عن طريق زيادة تركيزات المصل من اليوريا والكرياتينين (P < 0.05))، بالإضافة إلى نقص السكر في الدم (P < 0.05) وأظهرت التحليلات الدموية فقر الدم يتسم بانخفاض كبير في مستويات خلايا الدم الحمراء والهيموغلوبين (P < 0.05) بالإضافة إلى ذلك، أظهرت دراسة التشريح المرضي الأضرار التي لحقت المستويات الدماغية والكبدية والكلية الناجمة عن الزئبق. وعلاوة على ذلك، فإن العلاج بالزيوت الأساسية والمستخلص المائي لليانسون لتحسين سلوك الفئران التي يسببها هذا المعدن وكذلك تنظيم مختلف المؤشرات الحيوية لوظيفة الكلى والكبد والهيموغرام في الختام، فإن اليانسون الأخضر يحمل فضائل علاجية كبيرة مقابل تأثير هذا التسمم من الزئبق في الفئران الشابة في فترة النمو.

الكلمات المفتاحية: الزئبق، اليانسون الأخضر، الاكتئاب، الذاكرة، الكلى، الكبد والدم