

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université Dr. MoulayTaher - Saida

Faculté des Sciences
Département De Biologie



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Biochimie et Physiologie Cellulaire

Intitulé :

*Impact des huiles essentielles de clou de girofle
"Syzygium aromaticum" chez les rats, soumis à un stress par
le plomb et manganèse*

Présenté par :

- GRELE Karima
- LAOUFI Fatima Zohra

Soutenue le 13-06-2015

Devant le jury composé de :

M^{elle} Hadjadj Hasina - Maître assistante « B » U de Saida-Président

Mr Kahloula Khaled-Maître conférence « A » U de Saida-Examineur

Mr Slimani Miloud - Professeur - Encadreur

Mr Adli Djalleddine houari-Maîtreassistant « A » U de Saïda-Co.Encadreur

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier **Dieu** de tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Des remerciements au président de jury **Docteur Kahloula Khaled** et aux examinateurs : **Mme hadjaj** et d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous tenons à remercier en particulier notre très cher Encadreur **Mr Slimani** pour ces conseils précieux, sa patience, son soutien, et sa disponibilité durant tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi pour sa compréhension et sa gentillesse.

Nous remercions tous les enseignants qui ont été attribués à notre formation durant les années d'études en particulier : **Mr Adli. D, Mr kaid M, Mr kerkeb A, Melle Yakho Djamila.**

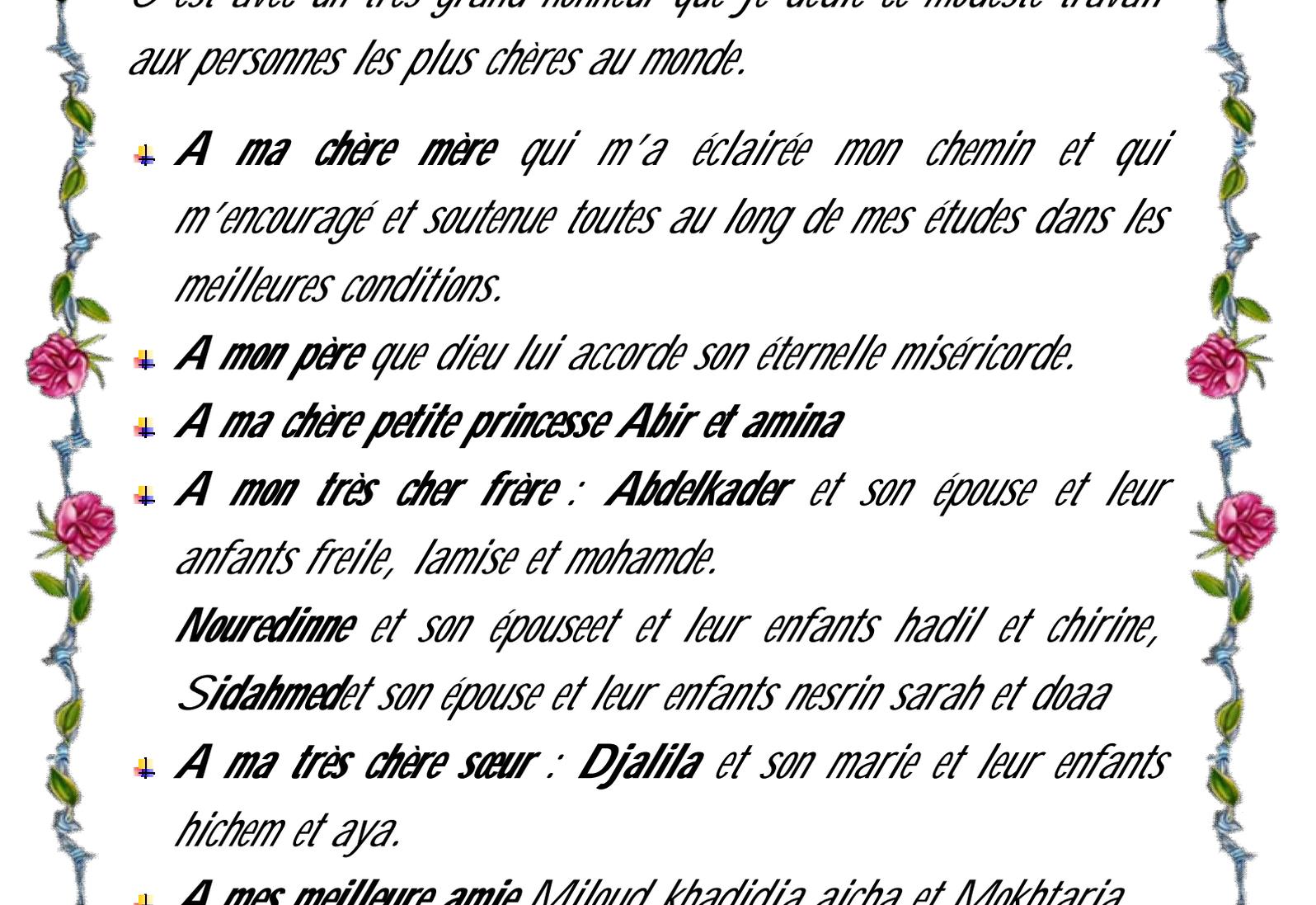
Nous remercier **Mr. fikira M** et **Mme. Bouziane A**, qui nous ont aidés dans notre étude et notre travail et qui nous a donné assez de temps pour étudier.

Nos remercions nos collègues pour les sympathiques moments passés ensemble et surtout **lardjani khadija** qui nous a aidés à faire les analyses biochimiques.

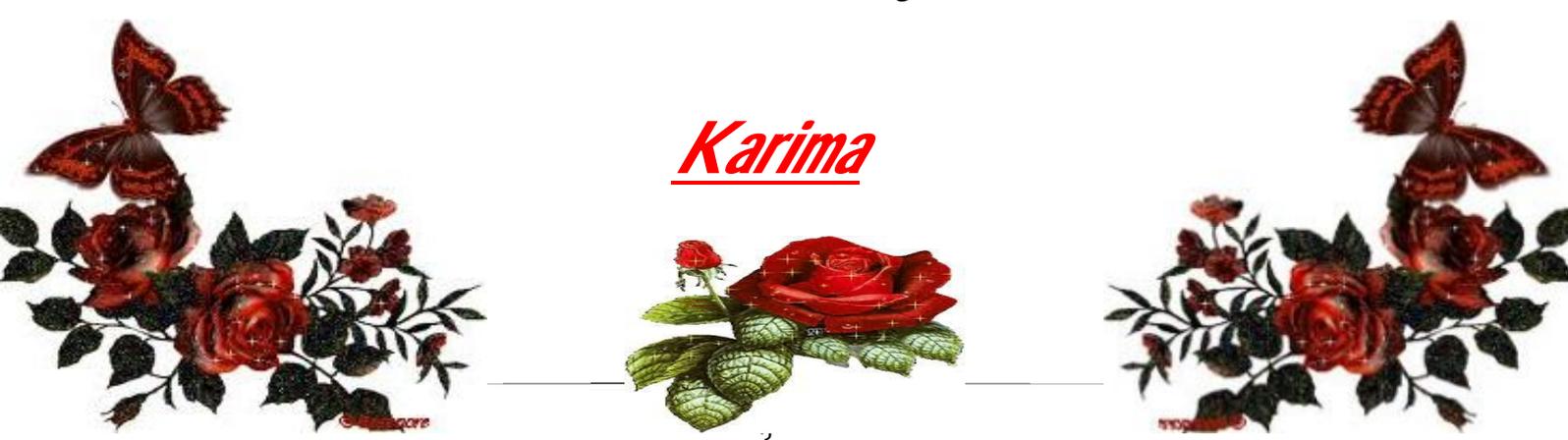


Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde.

- ✚ A ma chère mère qui m'a éclairée mon chemin et qui m'encouragé et soutenue toutes au long de mes études dans les meilleures conditions.*
 - ✚ A mon père que dieu lui accorde son éternelle miséricorde.*
 - ✚ A ma chère petite princesse Abir et amina*
 - ✚ A mon très cher frère : Abdelkader et son épouse et leur enfants freile, lamise et mohamde.
Nouredinne et son épouse et leur enfants hadil et chirine,
Sidahmed et son épouse et leur enfants nesrin sarah et doaa*
 - ✚ A ma très chère sœur : Djalila et son marie et leur enfants hichem et aya.*
 - ✚ A mes meilleure amie Miloud, khadidja aicha et Mokhtaria*
- 

Karima





Dédicace



C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :
Mes très chers frères Mohamed et Abdelkarim
Mes très chères soeurs Hassiba, Nadia et zineb
Ainsi que pour tous mes amis et mes collègues.



Fatima Zohra

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
PLOMB.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Le plomb	5
1.1. Généralité sur Le plomb	5
1.2. Propriétés physico-chimiques du plomb	5
1.3. Principales sources d'exposition	5
1.4. La toxico-cinétique du plomb	6
1.4.1. Les voies d'exposition.....	6
1.4.2. Circulation et rétention	8
1.4.3. Excrétion	9
1.5. La toxicité du plomb.....	10
1.5.1. Toxicité aiguë	10
1.5.2. Toxicité chronique	10
1.5.2.1. Effets hématologiques.....	10
1.5.2.2. Effets digestifs.....	11
1.5.2.3. Effets sur le Système nerveux.....	11
1.5.2.4. Effets sur le système cardio-vasculaire	11
1.5.2.5. Effets sur la reproduction	12
1.5.2.6. Effets sur les os.....	12
1.5.2.7. La toxicité hépatique du plomb	12
1.5.2.8. Atteinte rénale	13
1.5.2.9. Effet Cancérogène	13
2. Le manganèse	14
2.1. Historique.....	14
2.2. Généralités	14
2.3. Propriétés chimiques	14
2.4. Sources et utilisations	15
2.5. Toxicocinétique du Manganèse	16
2.5.1. Absorption et rétention.....	16
2.5.1.1. Absorption digestive	16
2.5.1.2. Absorption pulmonaire.....	17
2.5.2. Le transport du Manganèse	17

2.5.3.	Excrétion	17
2.5.4.	Le stockage dans les tissus	18
2.6.	Le rôle de manganèse dans l'organisme	18
2.7.	La carence du manganèse.....	19
2.8.	Les effets toxiques de manganèse	19
2.8.1.	Effet sur le système nerveux central.....	20
2.8.2.	Effet sur l'appareil respiratoire	20
2.8.3.	Effet sur l'appareil de reproduction.....	21
2.8.4.	Effet sur d'autres systèmes	21
2.8.5.	Génotoxicité et cancérogénicité du manganèse.....	21
3.	Les huiles essentielles	22
3.1.	Généralités	22
3.2.	Répartition.....	22
3.3.	Biosynthèse et composition chimique	22
3.4.	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	22
3.5.	Les techniques d'extraction des huiles essentielles	23
3.5.1.	La distillation.....	24
3.5.1.1.	L'hydrodistillation (water distillation)	24
3.5.1.2.	La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation).....	24
3.5.1.3.	L'hydrodiffusion.....	24
3.5.2.	Extraction par micro-ondes	25
3.5.3.	L'extraction au CO2 supercritique	26
3.5.4.	Extraction par les solvants et les graisses.....	27
3.5.5.	Expression à froid	27
3.6.	Toxicité des huiles essentielles	28
4.	Clou de girofle	29
4.1.	Historique.....	29
4.2.	Généralités	29
4.3.	Nomenclatures et classification botanique	29
4.4.	Habitat et culture	30
4.5.	Description botanique	30
4.6.	Composition chimique de clou de girofle.....	31
4.7.	Huile essentielle de clou	31
4.7.1.	Composition chimique de l'huile essentielle de clou	32
4.7.2.	Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de clou de girofle.....	32

4.8.	Utilisation et propriété de clou de girofle et leur l'huile essentielle	33
4.9.	Toxicité de clou	34
5.	Le stress oxydant	35
5.1.	Définition.....	Erreur ! Signet non défini.
5.2.	Les radicaux libres.....	35
5.2.1.	Différents types des ROS	35
5.2.2.	Synthèse physiologique des radicaux libres.....	36
5.2.3.	Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes.....	36
5.3.	Les maladies liées au stress oxydatif	37
5.4.	Préventions par les antioxydants	37
5.4.1.	Définition.....	37
5.4.2.	Mécanisme d'action.....	37
5.4.3.	Les systèmes de défense antioxydants	38
5.4.4.	Les mécanismes de défense enzymatiques	38
5.4.4.1.	SOD.....	38
5.4.4.2.	Les catalases	38
5.4.4.3.	Les glutathions peroxydases (GSH-Px) et glutathions réductases (GR)	39
5.4.5.	Les mécanismes de défense non enzymatique	39
5.4.5.1.	La vitamine E.....	39
5.4.5.2.	Vitamine C (acide ascorbique)	40
5.4.5.3.	Caroténoïdes.....	40
5.4.5.4.	Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	40
5.4.5.5.	Alumine.....	40
5.4.5.6.	Composés phénolique.....	40
5.4.6.	Risque des antioxydants	41
1.	Préparation de l'huile essentielle de plante	43
1.1.	Matériel végétal	43
1.2.	Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation	43
1.3.	Calcul du rendement.....	44
2.	Animaux d'expériences.....	44
3.	Dosage biochimique.....	48
3.1.	Détermination de la plombémie et manganèse	48
3.2.	Dosage de glucose	48
3.3.	Dosage d'urée	48
3.4.	Dosage de créatinine.....	48

3.5.	Dosage de cholestérol	48
3.6.	Dosage de triglycéride.....	49
3.7.	Dosage des transaminases (TGO – TGP).....	49
4.	Description des méthodes utilisées pour la mesure des marqueurs du stress oxydant	49
1.	Rendement en l'huile essentielle	52
2.	Détermination du poids corporelle	52
3.	Détermination de poids des organes (foie et les reins)	53
4.	Dosage de Plomb et Manganèse dans le sang	53
4.1.	Taux du plomb sanguin.....	53
4.2.	Taux du Manganèse sanguin	54
5.	Dosage des paramètres sériques	54
5.1.	Dosage de glycémie	54
5.2.	Dosage de l'urée.....	55
5.3.	Dosage de créatinine.....	56
5.4.	Dosage des Transaminases (TGO/ TGP)	56
5.5.	Dosage de cholestérol sérique.....	57
5.6.	Dosage des triglycérides	58
6.	Evaluation du pouvoir antioxydant de l'HE de <i>S. aromaticum</i> in vivo.....	58
6.1.	Au niveau érythrocytaire	58
6.1.1.	L'activité de la CAT.....	58
6.1.2.	L'activité du GPx	59
6.1.3.	L'activité du GSH.....	60
6.1.4.	L'activité de la SOD	61
6.2.	Activité des enzymes du statut oxydants au niveau hépatique et rénale.....	61
6.2.1.	Au niveau du foie.....	61
6.2.1.1.	CAT	61
6.2.1.2.	L'activité du GPx	62
6.2.1.3.	L'activité du GSH.....	63
6.2.1.4.	L'activité du SOD.....	63
6.2.2.	Au niveau des reins :	64
6.2.2.1.	Catalase :	64
6.2.2.2.	L'activité du GPx:	65
6.2.2.3.	L'activité du GSH:.....	65
6.2.2.4.	L'activité du SOD:.....	66
	Discussion.....	67

Conclusion.....77

Référence bibliographique.....80

Liste des abréviations

Pb : Plomb

Mn : Manganèse

ERO :Espèces Réactives de l'Oxygène

ROS :Reactive Oxygen Species

CAT : Catalase

GSH :Glutathion réduit

GP_x :Glutathion peroxydase

SOD :peroxide dismutase

HE :Huile Essentielle

HEC : Huile Essentielle de Cloue de girofle

RL : Radicaux Libre

IP : Intrapéritonéale

Liste des figures

Figure 1 : la toxicocinétique du plomb (Manton et Cook, 1984).....	9
Figure 2: les étapes de l'extraction des huiles essentielles (Lucc, 2005).	23
Figure 3 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Lucc, 2005).	25
Figure 4 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi et al.,2004)	26
Figure 5: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique (Pourmortazavi, 2007).	27
Figure 6 : (de gauche à droite) feuille et fleur du giroflier ; quelques boutons floraux, clou séché (Benzeggouta, 2014).	31
Figure 7: voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène).....	36
Figure 8: montage utilisé dans l'hydrodistillation.....	44
Figure 9: le protocole expérimental.....	46
Figure 10: L'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	52
Figure 11 : Evolution du poids corporel des jeunes rats durant la période expérimentale.	52
Figure 12: le dosage de plomb dans le sang chez les rats témoins, traités et intoxiqués.	53
Figure 13: le taux de manganèse érythrocytaire chez rats intoxiqués (Mn), des rats intoxiqués traité par <i>S.aromaticum</i> comparée aux les rats témoins. (***: p<0.001)	54
Figure 14: Comparaison du taux de glycémie entre rats témoins, rats traités par HEC et les rats intoxiqués par l'acétate de plomb et chlorure de manganèse.....	55
Figure 15 : Comparaison entre le taux de l'urée sérique chez les différents lots témoins, traités par HE de <i>S. aromaticum</i> et intoxiqués par Pb et Mn.....	55
Figure 16 : Comparaison du taux de créatinine entre rats témoins, rats traités par HEC et les rats intoxiqués par l'acétate de plomb et manganèse.....	56
Figure 17: Comparaison du taux de TGO/TGP sanguin entre rats témoins, rats traités par HEC de et les rats intoxiqués par la co-exposition de l'acétate de plomb et chlorure de manganèse.(Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***: p<0.001)).....	57
Figure 18: Comparaison du taux de cholestérol sanguin entre les rats témoins, traités par HE de clou de girofle et les rats intoxiqués par Pb+Mn. (Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***: p<0.001))	57
Figure 19 : Comparaison du taux de triglycéride entre rats témoins, rats témoins, traités par HESa et les rats intoxiqués par le co-exposition de plomb et manganèse.(Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***: p<0.001)	58
Figure 20: L'effet de l'HE de <i>S. aromaticum</i> sur l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire chez rats témoins, traité et intoxiqués à l'acétate de plomb et chlorure de manganèse (***p<0.001).	59
Figure 21: L'effet de l'HE de <i>S. aromaticum</i> sur l'activité enzymatique du GPx érythrocytaire chez rats témoins, traités et intoxiqués à l'acétate de plomb et manganèse (***p<0.001).	60
Figure 22: L'effet de l'HE de <i>S. aromaticum</i> sur l'activité enzymatique du GSH érythrocytaire chez rats témoins, traités et intoxiqués à l'acétate de plomb et manganèse (***p<0.001).	60
Figure 23: L'effet de l'HE de <i>S. aromaticum</i> sur l'activité enzymatique du SOD érythrocytaire chez rats témoins, traités et intoxiqués à l'acétate de plomb et manganèse (***p<0.001).	61
Figure 24: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de Catalase de foie chez rats témoin et intoxiqués au (Pb+ Mn) (***P = <0.001).....	62
Figure 25: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase de foie chez rats témoin et intoxiqués au (Pb+ Mn) (***P = <0.001)	62

Figure 26: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit de foie chez rats témoin et intoxiqués au (Pb+Mn) ($P = <0.001$).....	63
Figure 27: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de SOD de foie chez rats témoins et intoxiqués au (Pb+Mn) ($P = <0.001$).....	64
Figure 28: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de Catalase des reins chez rats témoin et intoxiqués au (Pb +Mn) ($P = <0.001$).....	64
Figure 29: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase des reins chez rats témoin et intoxiqués au Pb +Mn ($***P = <0.001$).....	65
Figure 30: l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit des reins chez rats témoins et intoxiqués au Pb+ Mn ($***P = <0.001$).....	66
Figure 31 : Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit des reins par rapport aux rats témoins et intoxiqués par Pb+ Mn ($***P = <0.001$).....	66

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du plomb (Bonnard et al., 2006).....	5
Tableau 2: Propriétés du manganèse (Bisson et al., 2012).....	15
Tableau 3 : L'apport quotidien de manganèse nécessaire (SEMT, 1987).	16
Tableau 4: Production de Clou de girofle en tonne en chiffres (2003-2004) (Crouzet et Richard, 2009).30	
Tableau 5: Composition chimique d'huile essentielle de clou de girofle	32
Tableau 6: propriété physico- chimique de l'huile essentielle de clou de girofle (Trimeta, 2012).....	32
Tableau7: Origine et caractéristique du matériel végétal utilisé (clou de girofle).....	43
Tableau 8: renseignements sur l'extraction.....	44
Tableau 9: Evaluation des paramètres pondéraux	53

Résumé :

Les mécanismes à l'origine de la toxicité du plomb et Manganèse sont multiples et touchent potentiellement toutes les cellules de l'organisme. A cet effet, nous nous sommes intéressés au stress oxydant induit par l'acétate de plomb et le manganèse au niveau érythrocytaire et au niveau tissulaire (foie et rein) à une dose de 2.84 mg/ml et 4.79 mg/ml respectivement durant la période de gestation et lactation chez les rats Wistar et la capacité de l'HE du clou de girofle "*Syzygium aromaticum*" (HEC) à rétablir ou non cet état de stress.

Toutefois, l'extraction par hydrodistillation, a permis d'obtenir une HEC avec un rendement de 11.66%.

Par ailleurs, l'analyse du statut antioxydant érythrocytaire a indiqué que le Pb - Mn augmente significativement ($p < 0.001$) les activités enzymatiques de la catalase (CAT), de l'activité enzymatique du Glutathion peroxydase (GPx) et de l'activité non enzymatique du glutathion réduit (GSH) et une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD). Par contre, l'analyse du statut antioxydant tissulaire a indiqué une augmentation significative ($p < 0.001$) des activités enzymatiques de la catalase (CAT), l'activité enzymatique du Glutathion peroxydase (GPx) et une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité du glutathion réduit (GSH) et superoxyde dismutase (SOD), entraînant un dysfonctionnement du système de défense antioxydant. L'analyse biochimique a révélé que la toxicité par le Pb-Mn entraîne des anomalies métaboliques (hyper-glycémie, hyper-urémie, hyper-créatinémie, et l'augmentation des transaminases....).

En revanche, l'administration de l'HEC par voie IP durant une période de 21 jours à des rats préalablement intoxiqué au Pb - Mn, indique que cette HEC contribue de manière significative dans l'amélioration des défenses contre l'agression radicalaire, par un rétablissement au niveau des activités des enzymes antioxydants en augmentant leurs capacités à éliminer les composés radicalaires.

A la lumière de ces résultats, l'administration du Pb-Mn au cours de la période de développement rend les cellules sanguines et les tissus fragiles aux attaques oxydantes par leurs actions nuisibles. Cependant, l'HEC a la capacité d'améliorer l'activité des enzymes antioxydants et en augmentant leurs capacités à lutter contre le stress oxydant.

Mots clés: Plomb, Manganèse, *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, Glutathion peroxydase, Catalase, Glutathion réduit, Superoxyde dismutase, Stress oxydant.

Abstract:

The mechanisms responsible for the toxicity of lead and manganese are multiple and potentially affect all body cells. To this end, we were interested to oxidative stress induced by lead acetate and manganese in erythrocytes and the tissues (liver and kidney) at a dose of 2.84 mg / ml and 4.79 mg / ml respectively in the period gestation and lactation in Wistar rats and the ability of HE cloves "Syzygium aromaticum" (HEC) to restore or not this state of stress.

However, extraction by steam distillation yielded a HEC with a yield of 11.66%.

Furthermore, analysis of antioxidant status erythrocyte said the Pb - Mn increases significantly ($p < 0.001$) enzyme activities of catalase (CAT), the enzyme activity of glutathione peroxidase (GPx) activity and non-enzymatic reduced glutathione (GSH) and a significant decrease ($p < 0.001$) of the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD). By cons, analysis of tissue antioxidant status showed a significant increase ($p < 0.001$) enzyme activities of catalase (CAT), the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) and a decrease significant ($p < 0.001$) of the activity of reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD), resulting in a malfunction of the antioxidant defense system. Biochemical analysis revealed that toxicity by Pb-Mn causes metabolic disorders (hyper-glycemia, hyper-uremia, hyper-creatinine, and increased transaminases).

However, administration of HEC by the IP route for a period of 21 days previously addicted rats Pb - Mn, HEC indicates that this contributes significantly to improving defenses against free radical attack, by a recovery level of antioxidant enzymes activities by increasing their ability to eliminate radical compounds.

In light of these results, the administration of Pb-Mn during the period of development makes them fragile blood cells to oxidative attack by their harmful actions. However, the HEC has the ability to enhance the activity of antioxidant enzymes and increasing their capacity to fight against oxidative stress.

Keywords: Lead, Manganese, Syzygium aromaticum, essential oil, glutathione peroxidase, catalase, glutathione reduced, superoxide dismutase, Oxidate stress.

INTRODUCTION

I ntroduction

Les métaux lourds sont présents naturellement dans l'environnement et sont utilisés industriellement. Cependant, à des concentrations plus élevées que la normale, ils peuvent entraîner des nuisances plus ou moins graves pour l'être humain, la faune et la flore (**Achour et al., 2014**). Parmi ces métaux lourds en évoquera l'exemple du plomb et manganèse.

En effet, le plomb constitue l'élément non essentiel le plus abondant dans l'organisme humain, en raison de sa dispersion dans l'air ambiant, dans de nombreux aliments, dans l'eau potable, et dans la poussière. Sa toxicité est étroitement liée à son accumulation dans certains tissus et son interférence avec les bioéléments, dont le rôle est essentiel pour plusieurs processus physiologiques. Il a de nombreux effets indésirables, y compris neurologique, comportementale, immunologique, rénal hépatique, et en particulier le dysfonctionnement hématologique (**Annabi et al., 2007**).

De son côté, le manganèse (Mn) est un métal essentiel trouvé dans une variété de tissus biologiques et est nécessaire pour le fonctionnement normal d'une variété de processus physiologiques, y compris acides aminés, des lipides, le métabolisme des protéines et des glucides (**Erikson et al., 2005**). Il joue également un rôle essentiel dans le fonctionnement du système immunitaire, régulation de l'énergie cellulaire, la croissance osseuse et du tissu conjonctif et la coagulation du sang (**Erikson et Aschner, 2003**). Mais en quantités excessives, peuvent causer des dommages au système nerveux et les activités enzymatiques (**Aschner et al., 2007**).

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

Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) a été utilisé pour des centaines d'années comme une épice nutritionnel pour l'alimentation et un remède pour une variété de problèmes de santé (**Bhowmik, 2012**), il a été rapporté que l'huile essentielle de clou de girofle présente une variété de différentes applications telles que un antioxydant, un anti-inflammatoire, un antifongique, antiviral, antibactérien, anticonvulsivant (**Agrawal et al., 2014**).

A la lumière de ces données, notre étude vise sur la recherche de l'effet de l'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum* chez des rats intoxiqués par la co-exposition de plomb et manganèse. A ce titre, nous envisageons d'entreprendre une série d'expériences qui porteront sur :

Introduction

- La première série d'expériences induire un stress oxydant par l'administration de l'acétate de plomb et le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) chez les rats wistar par l'exploration du fonctionnement de deux organes (foie, rein) selon une approche biochimique et enzymatique.

- La deuxième série d'expériences estimer l'influence relative *in vivo* des propriétés antioxydantes naturelles de l'HE de la plante *Syzygium aromaticum* suite au stress oxydant induit par le plomb et manganèse en étudiant les paramètres relatifs au statut oxydant.

Synthèse bibliographique

1. Le plomb :

1.1.Généralité sur Le plomb :

Le plomb est un métal connu depuis plus de 5000 ans (BRGM, 2004). Il est naturellement présent en moyenne à 0,002% dans la croûte terrestre (36^{ème} élément de par son abondance dans la croûte terrestre) (Nriagu, 1978), et peut se présenter sous forme organique ou inorganique ; Presque la totalité des expositions industrielles ou environnementales au plomb impliquent des formes inorganiques (ex. PbO) (Lauwerys, 1990). Les dérivés inorganiques quant à eux sont présents dans les eaux, les sédiments, les sols, l'atmosphère et éventuellement en microtraces chez les organismes vivants (Nriagu, 1978).

Cependant, des particules plombées sont toujours générées dans l'atmosphère sous forme d'effluents gazeux ou particulaires, par des activités industrielles, ou par resuspension à partir des sols contaminés (Ohmsen, 2001).

1.2.Propriétés physico-chimiques du plomb :

Le plomb est un métal grisâtre malléable qu'on retrouve dans la croûte terrestre, on le trouve à l'état naturel, sous forme de minerai dont le plus important est la galène (sulfate de plomb en cristaux) et plus rarement à l'état élémentaire (métal seul) (EMC-toxicologie Pathologie, 2005).

Il n'a ni goût ni odeur caractéristiques. Il appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. De configuration électronique [Xe] 4f¹⁴ 5d¹⁰ 6s² 6p², il possède 2 électrons non appariés sur la dernière couche. Cette configuration électronique autorise les degrés d'oxydation (+2) et (+4), en plus de la forme métal (0) (Sposito, 1989).

Dans les milieux naturels, les espèces inorganiques du plomb incorporent cet élément sous le degré d'oxydation (+2). Le degré d'oxydation (+4) n'est représenté que dans des conditions très oxydantes non rencontrées dans les sols : il se retrouve majoritairement dans les composés organiques dont la source est principalement anthropique (Newland et Daum, 1986)(Tableau 01).

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du plomb (Bonnard et al., 2006).

Symbole	Nombre	Poids	Densité	Point de	Point	Isotopes
Pb	82	207,2	11,34	327,43°C	1740°C	4

1.3.Principales sources d'exposition :

Plusieurs sources de contamination au plomb sont connues :

1.3.1. Naturelles : à des concentrations faibles.

1.3.2. Milieu professionnel : fabrication de batteries d'accumulateur au plomb ou de recyclage ; soudure et découpage de pièces métalliques (fonderie) ; peinture à base de plomb ; cristallerie et verrerie ; récupérations des métaux ; poterie... (Achour et al., 2014).

1.3.3. Environnementale :

1.3.3.1. Air : la pollution atmosphérique par essence à base de plomb (dérivés organiques tétraéthyl, tétraméthyl) reste la cause la plus importante de contamination. Les antidétonants des carburants automobiles constituent la première source d'émission de plomb dans l'atmosphère. Avec la mise en place de l'essence sans plomb, cette source de contamination a faibli. D'autre part, le tabagisme reste une source mineure de contamination (Achour et al., 2014).

1.3.3.2. Eau : la contamination peut être secondaire à l'ingestion d'eau douce desservie par des canalisations en plomb. Selon l'Union Européenne, la valeur limite de concentration du plomb de l'eau destinée à la consommation humaine est de 10 µg/L depuis 2013. L'ingestion de boissons acides (jus de fruits) stockés dans des récipients contenant du plomb peut aussi contribuer à l'imprégnation (Achour et al., 2014).

1.3.3.3. Aliments : légumes cultivés et animaux élevés en zones contaminées ; (Achour et al., 2014).

1.3.3.4. Sols et poussières : la poussière est une importante source d'exposition au plomb. Sa teneur en plomb dépend de l'activité industrielle actuelle ou passée au voisinage. La consommation d'écaïlle de peinture plombifère dans les anciennes demeures par de jeunes enfants en milieu défavorisé et le comportement alimentaire du syndrome "Pica" favorisent les risques ; (Achour et al., 2014).

1.3.4. Autres :

- ❖ Contamination par des vêtements de travail souillés rapportés au domicile par un proche exposé professionnellement ;
- ❖ Utilisation des cosmétiques et de préparations traditionnels à base de plomb à titre d'exemple : le khôl ;
- ❖ Munitions à base de plomb (Achour et al., 2014).

1.4. La toxicocinétique du plomb :

Il est important de connaître le métabolisme du plomb pour mieux comprendre l'intoxication.

1.4.1. Les voies d'exposition :

Le plomb peut pénétrer dans l'organisme humain par trois voies :

1.4.1.1. Voie respiratoire :

La voie respiratoire est également importante surtout s'il s'agit d'oxydes ou de sels pulvérulents, de poussières très fines ou de vapeurs. Les particules dont le diamètre est inférieur à $0,5\mu\text{m}$ sont les mieux absorbées, alors que les particules $>5\mu\text{m}$ se déposent dans l'arbre respiratoire, sont drainées vers le carrefour aérodigestif et finalement dégluties. De plus, 30% du plomb inhalé est absorbé, il peut atteindre 70% si chauffage (**Achour et al., 2014**).

L'absorption pulmonaire peut jouer un rôle important pour les expositions professionnelles ou pour les personnes vivant à proximité d'entreprises polluantes (**Kahloula, 2010**).

Chez l'animal, comme chez l'homme, environ la moitié du plomb retenu est absorbée au niveau du tractus respiratoire inférieur (**Bonnard et al., 2006**). Cependant, les vapeurs et gaz, après migration jusqu'aux alvéoles pulmonaires, passent dans le sang. Les particules métalliques les plus grosses sont éliminées des voies respiratoires hautes par le tapis muco-ciliaire puis dégluties. Les plus fines diffusent à travers la muqueuse des voies aériennes profondes et passent dans le sang (**kahloula, 2010**).

1.4.1.2. La voie digestive :

La principale voie d'absorption du plomb est digestive, les sources étant constituées par les aliments (lait, eau, boissons) mais aussi les écailles de peinture, les poussières présentes en milieu domestique et les poussières présentes dans le sol, ingérées particulièrement par les jeunes enfants (2 à 3 ans) par portage main-bouche (**INERIS, 2003**).

La biodisponibilité du plomb dépend de sa solubilité dans le tractus intestinal. Pour être absorbé, il doit en effet être transformé en sel hydrosoluble (**INERIS, 2003**). Elle s'effectue essentiellement dans l'intestin grêle par un transport actif. L'absorption est fortement augmentée par le jeûne, la carence martiale, le régime pauvre en calcium et en vitamine D (**Achour et al., 2014**).

Chez le rat, l'absorption varie avec la forme chimique : le carbonate de plomb est 12 fois mieux absorbé que le plomb métal. L'absorption diminue avec l'âge (de 83 % pour un rat de 16 j à 16 % pour un rat de 89 j (**Bonnard et al., 2006**) et de 30-40 % chez l'enfant à 5-15% chez l'homme adulte (**Amdur et al., 1996**)), probablement à cause d'un processus de maturation selon lequel l'intestin perd sa capacité d'ingestion des particules par pinocytose (**Venugopal et Luckey, 1974**).

1.4.1.3. La voie cutanée :

Le passage transcutané du plomb est très faible (moins de 0,5%), si la peau est intacte, mais le toxique peut pénétrer en cas de lésions de la peau, et pour certains composés organiques grâce à leur liposolubilité (**Achour et al., 2014**).

Des tests in vitro réalisés sur la peau humaine ont permis de classer différents composés du plomb selon leur taux d'absorption par ordre décroissant : tétrabutyl de plomb > naphthalène de plomb > acétate de plomb > oxyde de plomb (indélectable) (**Bress et Bidanset, 1991**).

Après une application de crème ou de solution contenant de l'acétate de plomb (9 nmol/kg ou 6 nmol/L) pendant 12 heures chez 8 volontaires sains, les travaux de **Moore et al., (1980)** ont montré que le taux d'absorption de l'acétate de plomb était compris entre 0 et 0,3 %.

1.4.2. Circulation et rétention :

1.4.2.1. Transport sanguin :

Après son absorption pulmonaire ou digestive, le plomb passe dans le sang où il se répartit dans les hématies sous forme non diffusible et dans le plasma sous une forme diffusible lui permettant d'aller se fixer dans les tissus ou d'être éliminé dans les urines. Le sang est le « carrefour » de tous les trajets du plomb dans l'organisme. Le plomb sanguin représente environ 2 % du pool total de l'organisme. Le rapport érythro-plasmatique est d'environ 90 à 95 %. Plus les quantités de plomb sanguin sont élevées, plus le taux plasmatique et donc diffusible dans les tissus, est élevé (**Haguenor, 2009**).

La demi-vie sanguine du plomb est estimée à environ 20-30 jours. En cas d'arrêt de fortes expositions, la plombémie diminue de façon constante jusqu'à peu près la 18e semaine, puis subit une légère remontée pour atteindre un plateau (**Haguenor, 2009**).

La concentration totale du plomb dans le sang reflète le plomb contenu dans ce compartiment est considérée comme un indicateur fiable d'une récente exposition. Elle constitue d'ailleurs le test utilise le plus communément pour évaluer l'intoxication par le plomb chez l'homme et les animaux (**Roy et al., 1977**).

1.4.2.2. Transfert aux organes :

1.4.2.2.1. Dans les tissus mous :

L'accumulation du plomb dans les tissus mous dépend de l'âge et des concentrations plasmatiques. Tous les tissus mous sont concernés, le foie, la rate, les poumons mais surtout les reins et le cerveau. En effet, le plomb est capable de passer la barrière hémato-méningée et de s'accumuler dans toutes les zones du cerveau de façon à peu près homogène. La demi-vie dans les tissus mous serait du même ordre de grandeur que la plombémie, soit 20 à 30 jours (**Haguenor, 2009**).

L'absorption du plomb au niveau du foie et des reins est trois fois plus importante que par inhalation (**Barthelemy et al., 1975**). Les autopsies réalisées sur des travailleurs ont révélé une accumulation du plomb, par ordre décroissant, dans le foie > les reins > les poumons > le cerveau

(Gerhardsson et al., 1995). De plus, l'accumulation sélective du plomb notamment dans certaines zones du cerveau (l'hippocampe) et des reins (cortex) a pu être observée chez l'homme (Amdur et al., 1996).

1.4.2.2. Dans les os :

Elle concerne 90% du Pb absorbé et sa demi-vie est supérieure à 10 ans. Le plomb osseux ne constitue pas une toxicité particulière pour l'organisme. Cependant, son métabolisme présente certaines analogies avec celui du calcium. En cas de mobilisation de ce dernier (ostéoporose de la femme enceinte ou des personnes âgées ou traitement corticoïde...), une libération importante du métal stocké peut se produire et se traduit par des manifestations toxiques, même si l'exposition a cessé depuis plusieurs années (Nouaigui, 2009). Dans les os le plomb est sous forme d'un composé relativement non soluble : le triphosphate de plomb. Le plomb est susceptible de continuer à s'accumuler dans les os 6mois après la fin de l'exposition (Hamir et al., 1982).

1.4.3. Excrétion :

Le plomb inhalé non absorbé est éliminé par action mucociliaire trachéo-bronchique vers le tractus gastro-intestinal puis, comme le plomb ingéré, est absorbé ou directement éliminé par la voie urinaire (environ 80 %) (IARC, 1980).

L'élimination principale s'effectue par voie rénale (75–80 %) et en moindre proportion par la bile dans l'intestin. L'élimination par la salive, la sueur, les cheveux, les ongles et le lait maternel est minime (moins de 8 %). La demi-vie de la fraction rapidement échangeable située dans le sang et les tissus mous est d'environ 20 jours, celle de la fraction fixée au squelette de 10 à 20 ans (Pletscher et al., 2007).Le plomb, en raison de sa similarité avec le calcium, est excrété dans le lait(IARC, 1980) (Figure 01).

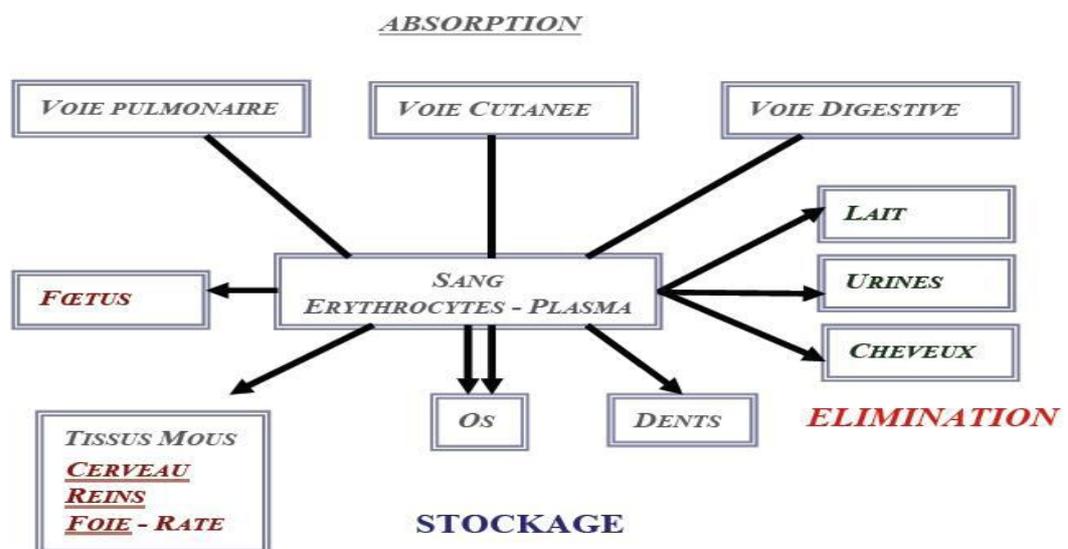


Figure 1 : la toxicocinétique du plomb(Manton et Cook, 1984).

1.5. La toxicité du plomb :

Le plomb après pénétration dans l'organisme va s'accumuler et provoquer une maladie qui est étroitement liée à la charge corporelle totale de l'organisme (**Diouf, 2001**). Leur toxicité est reconnue, même à de très faibles concentrations et peut être attribuée à des interactions inappropriées avec différentes structures intracellulaires (**Roesijadi, 1994**).

1.5.1. Toxicité aiguë :

Elle se rencontre très rarement aussi bien dans l'industrie qu'en milieu non professionnel, elle peut apparaître suite à une inhalation ou à une absorption massive de poussières ou de fumées de plomb (**INERIS, 2003**).

L'intoxication aiguë au plomb donne lieu à des symptômes qui touchent le système digestif : œsophagite, gastrite entraînant des vomissements, douleurs épigastriques abdominales, mais aussi des selles noires et une constipation chez l'adulte, mais chez l'enfant la toxicité aiguë se manifeste par une anorexie, des vomissements, une irritabilité et des troubles du comportement. Ces symptômes se manifestent généralement à partir d'un seuil de plombémie de l'ordre de 30 à 50 mg/dl (**Lauwerys, 1998 ; C.E.P.A, 1997**).

1.5.2. Toxicité chronique :

Le saturnisme peut se manifester de façon extrêmement différente d'une personne à l'autre, chaque atteinte viscérale pouvant être inaugurale (**Achour et al., 2014**). Plusieurs organes et systèmes sont susceptibles d'être affectés à la suite d'une exposition prolongée à des concentrations significatives de plomb. Parmi ceux-ci, on retrouve le système nerveux, les reins de même que les systèmes gastro-intestinal et reproducteur (**GSSE, 2003**).

1.5.2.1. Effets hématologiques :

Le plomb cause des perturbations hématologiques qui touchent principalement les érythrocytes. L'anémie, manifestation classique de l'intoxication au plomb, est proportionnelle à la dose et résulte d'une part de l'inhibition de la synthèse de l'hémoglobine par le plomb, d'autre part d'un effet toxique direct sur les érythrocytes (**Pletscher et al., 2007**).

Le plomb inhibe trois enzymes (enzymes intervenant dans la synthèse de l'hème): l'acide *d*-aminolévulinique deshydratase (ALA-D), la coproporphyrinogène décarboxylase et la ferrochélatase. Il en résulte respectivement une accumulation d'acide *d*-aminolévulinique (ALA), une augmentation des coproporphyrines et une diminution de la quantité d'hème formé accompagnée d'une augmentation du taux de protoporphyrine. La protoporphyrine en excès prend la place de l'hème dans l'hémoglobine et fixe du zinc sur le site occupé habituellement par le fer (**Amdur et al., 1996**).

Le plomb affecte aussi, par rétrocontrôle négatif via l'hème, l'activité de l'ALA synthétase et la synthèse de la partie globinique. En conséquence, l'excrétion urinaire d'ALA et de coproporphyrine est augmentée ; les protoporphyrines et le coproporphyrinogène s'accumulent dans les érythrocytes.

Le plomb provoque une hyperstimulation de l'érythropoïèse objectivée par des érythroblastes de taille variable avec des anomalies nucléaires et une hémoglobine anormale, d'où une production accrue d'érythrocytes anormaux (**Venugopal et al., 1974**).

1.5.2.2.Effets digestifs :

Les effets du plomb sur l'appareil digestif s'observent à la suite d'une exposition élevée au plomb (plombémie = 100 mg/dl ou plus). Les troubles digestifs sont parmi les symptômes les plus précoces, ces effets sont principalement une anorexie, des nausées et vomissements, une perte de poids, des douleurs et crampes abdominales, une constipation tenace ou parfois des épisodes diarrhéiques et des ballonnements (**Beliles, 1994 ; Fu et Boffeta ,1995 ; Goyer, 1993 ; kahloula, 2010**).

1.5.2.3.Effets sur le Système nerveux :

Cet effet est d'autant plus sérieux que le sujet intoxiqué est jeune. Des encéphalopathies surviennent régulièrement chez des enfants ingérant de petites quantités de plomb, celles-ci comportent des signes cliniques parfois graves (coma convulsif) et une altération des fonctions supérieures. En milieu professionnel, on trouve des formes plus discrètes (bien que des effets graves puissent exister), qui se traduisent par une altération des fonctions cognitives, décelable par des tests psychométriques. Elles peuvent apparaître dès 40 µg/100 ml, mais l'importance des perturbations aux tests n'est pas corrélée à la plombémie (**INRS, 2006**).

Il existe par ailleurs une neuropathie sensitivomotrice dont la forme classique est la paralysie pseudoradiale. Cette forme devient rare, les neuropathies qui peuvent toucher les quatre membres sont souvent infracliniques et mises en évidence par la diminution des vitesses de conduction nerveuse. Les neuropathies cliniques apparaissent pour des plombémies supérieures à 60 µg/100 ml alors que, l'on observe une altération des vitesses de conduction dès 40 µg/100 ml (**INRS, 2006**).

1.5.2.4.Effets sur le système cardio-vasculaire :

L'exposition au plomb a été associée à une variété d'effets néfastes sur le système cardiovasculaire. La relation dose-réponse la plus étudiée est l'effet de l'exposition au plomb sur la pression artérielle, et la plus fréquemment rapportée sur la pression artérielle systolique. Une augmentation de la plombémie (**CSAFSCA, 2011**).

À des taux dépassant 300 µg/L (INERIS, 2003) et des concentrations en plomb dans le tibia sont associés à une augmentation de la pression artérielle systolique (CSAFSCA, 2011).

Ces résultats sont cependant largement contredits par de nombreuses études qui ne montrent aucune augmentation du nombre de sujets hypertendus parmi les salariés manipulant des composés inorganiques du plomb (INERIS, 2003).

1.5.2.5. Effets sur la reproduction :

Le plomb peut affecter la fertilité chez l'homme par oligospermie, mais son effet tératogène n'est pas démontré chez l'espèce humaine.

Il faut préciser qu'il a également un effet fœto-toxique et peut être responsable de mort in utero, de prématurité ou de troubles du développement cérébral (Achour et al., 2014).

Expérimentalement : le plomb entraîne un retard d'ouverture vaginale, une atrophie ovarienne, avec diminution de la sécrétion de progestérone et altérations endométriales au moment de l'implantation. De plus, une atteinte des récepteurs œstrogéniques utérins pouvant influencer le maintien de la gestation (INRS, 2006).

1.5.2.6. Effets sur les os :

L'os est le principal lieu de stockage du plomb. Certains événements, comme des fractures ou des traitements chélateurs mal réalisés, peuvent provoquer une mobilisation importante du métal provoquant des symptômes aigus parfois graves en relation avec l'élévation de la plombémie (INRS, 2006).

Donc, le plomb pourrait augmenter la déminéralisation osseuse en inhibant l'activation de la vitamine D, diminuant la fixation du calcium et également en interférant avec la régulation hormonale du métabolisme osseux (Silbergeld, 1991).

1.5.2.7. La toxicité hépatique du plomb :

L'accumulation de quantités significativement élevées de plomb au niveau du foie induit un effort oxydant important, et ce par une peroxydation des lipides avec inhibition concomitante de plusieurs enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase (GSSG) et d'une réduction du rapport GSH/GSSG (Sandhir et Gill, 1995).

Les mécanismes de l'effort oxydant induit par le plomb au niveau des hépatocytes contribuent à la production des lipoperoxydes (LPO) et l'expression des médiateurs des cytokines, y compris α -TNF. Ces médiateurs sont également associés au déclin significatif dans la concentration intracellulaires en triphosphate différents d'adénosine observée dans les cultures d'hépatocytes de rat (Sieg et Billings, 1997) et dans les dommages oxydants de l'ADN et puis finalement suivie

d'une apoptose d'hépatocytes (Milosevic et Maier, 2000). Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que le plomb joue un rôle dans la mort cellulaire des hépatocytes par protéolyse (Pagliara et al., 2003).

1.5.2.8. Atteinte rénale :

Le plomb provoque une néphropathie tubulaire interstitielle, touchant le tube rénal proximal mais aussi le glomérule. Cette altération est d'abord réversible puis passe à la chronicité (INRS, 2006).

Elle se traduit par une protéinurie faible ou nulle, mais surtout une glycosurie, une aminoacidurie et des perturbations des transports ioniques. La néphropathie chronique est souvent tardive et survient chez des sujets dont la plombémie est supérieure à 60 µg/100 ml (INRS, 2006).

Certaines études mettent en évidence une atteinte rénale précoce, dès 30 µg/100 ml, qui peut être révélée par une enzymurie (N-acétylglucosaminidase) et l'émission de protéines de bas poids moléculaire (β2-microglobuline et RBP) (INRS, 2006).

1.5.2.9. Effet Cancérogène :

A forte dose, le plomb induit des tumeurs rénales chez le rat. Une méta-analyse récente des études épidémiologiques publiées a montré des excès discrets mais significatifs des cancers gastriques, broncho-pulmonaires et des voies urinaires chez les travailleurs exposés au plomb ; toutefois, les facteurs de confusion éventuels (tabagisme, co-expositions...) n'étaient généralement pas pris en compte dans les études analysées. En raison des données expérimentales, le Centre International de Recherche sur le Cancer a classé le plomb dans le groupe 2B des substances possiblement cancérogènes pour l'espèce humaine (Fréjaville et al., 2000).

2. Le manganèse :

2.1.Historique :

Le manganèse (Mn) est déjà connu dans l'Antiquité, il était utilisé au temps des pharaons pour fabriquer le verre, et il décrit par Pline au temps des romains, mais il a été considéré jusqu'au XVIIIe siècle comme étant un simple dérivé du fer. Le mot manganèse est l'abréviation de "manganesium", l'ancien nom de cet élément (**Guide oligothérapie, 2006**).

Plus de 90 % du commerce international de manganèse provient de l'Australie, du Brésil, de l'Afrique du Sud et du Gabon (**I.M. I, 2007**).

2.2.Généralités :

Le manganèse (Mn, numéro CAS 7439-96-5) constitue environ 0,10 % de la croûte terrestre et représente le 12eme élément le plus abondant (**Francis et Forsyth, 1995**). Est un élément que l'on ne retrouve pas sous forme métallique libre dans la nature (**Adriano, 2001**), est un métal qui se retrouve naturellement dans l'air, l'eau, le sol et dans les systèmes vivants. Au plan biologique, le manganèse est un minéral essentiel qui est indispensable au fonctionnement d'un bon nombre de familles enzymatiques. En plus de son rôle essentiel dans le corps, de nombreuses études publiées indiquent qu'à des doses d'exposition suffisamment élevées, le manganèse est une substance toxique chez l'être humain. Alors que le manganèse peut s'avérer toxique pour un certain nombre de systèmes de l'organisme, y compris les appareils reproducteur et respiratoire, l'organe cible critique est le système nerveux central (SNC), où le manganèse s'accumule dans les ganglions de la base du cerveau (**SC, 2010**).

2.3.Propriétés chimiques :

Le manganèse est un élément chimique, de symbole Mn et de numéro atomique 25 (**Hurlbut et Klein, 1982**). Est un métal lourd, faisant partie des éléments de transition. Argenté, dur et cassant, il possède des propriétés magnétiques. Le métal est chimiquement réactif : il s'oxyde à l'air mais il ne réagit pas avec l'eau en conditions normales. Son électronégativité le conduit à former des liaisons ioniques avec les oxydes, les hydroxydes et les carbonates (**Schäfer, 2004**). Il forme ainsi des complexes peu stables (oxydes, silicates, carbonates) dont la plupart sont moins solubles que ses hydroxydes. Le manganèse possède des propriétés communes avec le cobalt et le fer et les similitudes entre leurs comportements respectifs sont nombreuses (**Lide, 1999**). Il peut être retrouvé à plusieurs états d'oxydation de -3 à +7, la forme la plus répandue dans l'environnement étant le +4 (**Keen et Leach, 1988**)(Tableau02).

Tableau 2: Propriétés du manganèse (Bisson et al., 2012).

Paramètre	Valeur
Couleur	Gris-blanc
Etat ordinaire	Solide
Point de diffusion	1246°C
Point de d'ébullition	1985°C
Energie de fusion	12,05 kJ·mol ⁻¹
Energie de vaporisation	226 kJ·mol ⁻¹
Volume molaire	7,35×10 ⁻⁶ m ³ ·mol ⁻¹
Masse atomique	54,938045 ± 0,000005 u
Rayon atomique	140pm
Densité	7,47 à 20 °C

2.4.Sources et utilisations :

Les plus importantes sources de manganèse environnemental reliées à l'activité industrielle proviennent des usines de production de ferro-alliages, les fonderies de fer et d'acier, des centrales thermiques, des fours à coke et de poussières provenant d'opérations minières (EPA, 1983; ATSDR 2000).

Les composés du manganèse sont couramment utilisés aux plusieurs applications :

- Le chlorure de manganèse est utilisé comme catalyseur mais aussi comme supplément alimentaire animal.
- Le dioxyde de manganèse de même que le chlorure entrent tous deux dans la fabrication de piles sèches.
- Le dioxyde de Mn trouve aussi plusieurs autres applications : feux d'artifice, allumettes et porcelaine.
- Le sulfate de Mn sert de fertilisant, dans la céramique, les glaçures et les vernis, comme supplément alimentaire ainsi que comme fongicide (ACGIH, 2001).
- Certaines opérations de soudage nécessitant l'emploi d'électrodes dont l'enrobage ou l'alliage constitutif contient du manganèse (Kaiser, 2003).
- Les composés organiques du Mn ont trois principales utilisations : le MMT (méthylcyclopentadiényl manganèse tricarbonyle) comme additif antidétonant dans l'essence, deux pesticides, le maneb et le mancozeb ainsi que le mangafodipir utilisé dans le diagnostic de certaines formes de cancers hépatiques (ATSDR, 2000).

➤ En addition le permanganate de potassium est puissant agent oxydant utilisé pour la purification de l'eau de boisson (**Chin-Chang, 2007**).

2.5.Toxicocinétique du Manganèse :

Le corps humain contient de petites quantités de Mn et, dans des conditions normales, notre système homéostatique contrôle très bien les quantités présentes (**ATSDR, 2000**), le mécanisme essentiel du contrôle de l'homéostasie du manganèse est sa vitesse d'élimination, essentiellement biliaire (élimination urinaire < 2 %) (**Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991**).

La toxicocinétique d'une substance chimique représente son absorption, sa distribution, son métabolisme et son excrétion chez les organismes vivants (**SC, 2010**).

2.5.1. Absorption et rétention :

Chacun d'entre nous est exposé à des traces dans l'air et en consomme par voie orale à travers la nourriture et l'eau (**Eckel et Langley, 1988 ; US EPA, 1993**)(Tableau 03).

Tableau3 : L'apport quotidien de manganèse nécessaire (**SEMT, 1987**).

	Moyennes (mg)	Etendue (mg)
Aliments	3.0	2.7- 1.0
Eau de boisson	0.005	0.0- 1.0
Air	0.002	0.0-29

2.5.1.1.Absorption digestive :

Certains aliments sont très riches en manganèse (céréales, noix, condiments...) (**Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991**). L'apport quotidien à travers la nourriture est de l'ordre de 1 à 10 mg (**ATSDR, 2000 ; Who, 1997**).L'absorption digestive ne joue qu'un rôle secondaire, moins de 5% du manganèse ingéré est absorbé (**GNM, 2012**).

L'omniprésence du manganèse dans les aliments de même que la nature essentielle de cet élément ont entraîné le développement de mécanismes d'homéostasie pour le manganèse de source alimentaire (**Davis et al, 1993**).

Le métabolisme du manganèse chez l'homme est rigoureusement contrôlé par des mécanismes d'homéostasie qui s'exercent principalement sur l'absorption gastro-intestinale et l'excrétion. Le manganèse absorbé par voie gastro-intestinale est séquestré par le foie. La majeure partie est excrétée par voie biliaire et est susceptible de subir un cycle entérohépatique. Le manganèse est principalement éliminé par voie fécale (**ATSDR, 2000**).

De même, l'absorption et la rétention du manganèse présent dans l'alimentation augmentent dans des conditions de bilan faible en fer (**Arnich et al., 2004; Finley, 1999**), probablement à

cause du partage de la molécule de transport, le transporteur de métaux divalents, par le fer et le manganèse (**Gunshin et al., 1997**). D'autres facteurs capables d'influencer l'absorption et la rétention du manganèse comprennent d'autres constituants alimentaires tels que les oligo-minéraux, les phytates ou l'acide ascorbique (**Davidsson et al., 1991**), ainsi que la solubilité du composé de manganèse (**Roels et al., 1997**). Plusieurs études animales démontrent que le facteur déterminant l'efficacité d'absorption est la voie de pénétration dans l'organisme de même que la solubilité dans les fluides biologiques de la substance sous laquelle le Mn est présent (**Smith et al., 1995**).

2.5.1.2. Absorption pulmonaire :

L'absorption est principalement respiratoire pour les poussières et les fumées, fonction de la spéciation et de la granulométrie des particules en suspension dans l'air (**GNM, 2012**). L'absorption respiratoire est estimée à moins de 2 µg/jour (**Who, 1981**).

En revanche, le manganèse inhalé absorbé par les poumons n'est pas directement transporté au foie, il est disponible pour un transport direct au cerveau. On ne croit pas que l'absorption dans les voies respiratoires soit soumise aux mécanismes homéostatiques; elle est plutôt influencée par des facteurs contribuant au dépôt des particules à l'intérieur du système respiratoire de l'humain, notamment la taille des particules, les paramètres chimiques et physiques de la molécule de manganèse, ainsi que les caractéristiques du sujet (**SCEC, 1999**), puisque les particules déposées dans les alvéoles sont probablement absorbées, alors que les particules déposées dans la partie supérieure des voies respiratoires sont soumises aux mécanismes de clairance mucociliaire; elles peuvent alors être transportées vers l'appareil digestif (**ATSDR, 2000**).

2.5.2. Le transport du Manganèse :

Une fois absorbé, le Mn est transportée vers les organes riches en mitochondries où il est rapidement concentré (**SC, 2010**).

Aucun transporteur unique de manganèse n'est connu chez les mammifères. Dans le plasma, plus de 80 % du manganèse se lie à la globuline b et à l'albumine, une petite fraction est sous forme de manganèse trivalent lié à la transferrine (**Critchfield et Keen, 1994 ; Ueda et al., 1993**) et une petite quantité est sous forme d'ion libre (**Harris et Chen, 1994**).

2.5.3. Excrétion :

Indépendamment de l'absorption de Mn, le système homéostatique maintient généralement un niveau de concentration stable en régulant l'excrétion (**EPA, 1984a et 1984b**). Une réserve de l'ordre de 20 mg de Mn est normalement conservée dans le foie et l'excès est excrété dans

l'intestin via la bile. De petites quantités sont aussi excrétées dans l'urine, les phanères et la transpiration (EPA, 1993).

Les taux d'élimination peuvent être modifiés par les taux d'apport en manganèse alimentaire et inhalé (Dorman et al., 2001b, 2002b). Par exemple, plus les taux d'ingestion de manganèse sont élevés, plus la constante de vitesse d'élimination de l'étape rapide et la proportion de la dose de traceur éliminée pendant l'étape rapide augmenteront (Suzuki, 1975).

L'excrétion biliaire est la principale voie d'excrétion et, une fois que le manganèse entre dans les intestins, une forte proportion de l'élément est ultimement excrétée dans les fèces (Davis et al., 1993; Malecki et al., 1996), excrétion urinaire du manganèse est généralement faible (Dorman et al., 2004c).

Le manganèse absorbé est retiré du sang par le foie, où il est conjugué avec la bile et excrété dans l'intestin (Vitarella et al., 2000b; Dorman et al., 2001a).

2.5.4. Le stockage dans les tissus :

Le manganèse se distribue dans tous les tissus de l'organisme et peut traverser les barrières hémato-encéphalique et placentaires (GNM, 2012).

Les érythrocytes sont riches en manganèse, le rapport des concentrations sérique/globulaire étant d'environ 1/25. Le stockage se fait dans les tissus riches en mitochondries (foie, pancréas). Le rein, les intestins et le cerveau en sont également riches (Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991) dans le cerveau, Il s'accumule en particulier dans les noyaux gris centraux de la base du cerveau ce qui explique la toxicité en relation avec une exposition prolongée (GNM, 2012).

Les hormones thyroïdiennes augmentent le stockage intramitochondrial du manganèse. Les glucocorticoïdes en diminuent la captation hépatique (Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991).

2.6. Le rôle de manganèse dans l'organisme :

Le manganèse fait partie des oligo-éléments qui présentent une très large palette de propriétés :

- Rôle dans plusieurs systèmes enzymatiques (Guide oligothérapie, 2006) joue le rôle de cofacteur enzymatique de certaines hydrolases et de certaines transférases (glycosyl- transférase, pyruvate-carboxylase, phosphoénolpyruvate- carboxylase, glutamine-synthétase) et des enzymes de la synthèse des acides nucléiques et il inhibe l'activation de l'adénylate-cyclase par l'hormone antidiurétique et interviendrait aussi dans la coagulation (Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991).
- Rôle dans la régulation du métabolisme des glucides (Guide oligothérapie, 2006).

- On a souligné son rôle dans le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des stérols et dans la phosphorylation oxydative (**Missy et al., 2000**).
- Le manganèse entre dans le cycle de fabrication et de conservation des os (**Missy et al., 2000**), en effet, ce sont les os qui en retiennent le plus, soit environ 25% du total corporel. Il a été montré que l'association de la glucosamine et du manganèse permet d'optimiser la production des glycosaminoglycannes, et donc des protéoglycannes, un des constituants principaux du cartilage articulaire (**Das et Hammad, 2000**).
- Le Mn possède un rôle dans le fonctionnement cérébral.
- Lutter contre les radicaux libres et donc de s'opposer aux effets néfastes du stress oxydatif (**Guide oligothérapie, 2006**) telle que le manganèse augmente l'activité de la superoxyde dismutase à manganèse qui intervient dans les mécanismes de protection mettant en jeu la production de radicaux oxygénés (**Cambar, 2006**).
- En pratique, le manganèse est préférentiellement utilisé pour son rôle de régulateur de la fonction immunitaire et d'antioxydant. Ces deux propriétés lui permettent à la fois de contribuer au renforcement des systèmes de défense de l'organisme et de s'opposer aux lésions cellulaires et tissulaires, occasionnées par toutes les situations de conflit se déroulant au sein du corps humain (**Guide oligothérapie, 2006**).
- Utilisation en thérapeutique dans toutes les formes d'allergie, marquées par un conflit entre l'organisme et les agents responsables des allergies (allergènes type pollens, moisissures, pollution atmosphérique, poils d'animaux, ...), occasionnant de surcroît des lésions cellulaires et tissulaires de type oxydatives (**Guide oligothérapie, 2006**).

2.7. La carence du manganèse :

Les états de carence en manganèse sont très rares et entraînent chez l'animal un ralentissement de la croissance, une atrophie testiculaire. Le manganèse a été impliqué dans des troubles neurologiques (épilepsie) en cas de carence (**Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991**).

Une carence en Manganèse se traduit par des affections allergiques ORL, des palpitations, de la tachycardie, des atteintes articulaires, de l'irritabilité et de l'agitation (**Gunnar et al., 2007 et Bisson, 2007**).

2.8. Les effets toxiques de manganèse :

Les principaux effets à la santé reliés à l'exposition au manganèse sont les effets respiratoires (inflammation pulmonaire, pneumonie, fonction respiratoire réduite), le syndrome neurologique extrapyramidal de manganisme et des effets neurologiques précliniques de même que des problèmes au niveau reproducteur (impuissance et fertilité réduite). Le Mn ne semble pas être un carcinogène et les effets sur les autres organes ne seront pas décrits ici (**Claude et al., 2003**).

2.8.1. Effet sur le système nerveux central :

De nombreuses études sur des animaux de laboratoire ont examiné les effets du manganèse sur les amines du cerveau, en particulier la dopamine. Bon nombre d'études sur des primates non humains ont mis en évidence une certaine altération de la fonction dopaminergique après une exposition au manganèse, notamment une réduction du contenu en dopamine, une dégénérescence des terminaisons nerveuses dopaminergiques ou une liaison réduite aux récepteurs de dopamine (**Eriksson et al., 1987; 1992a; 1992b**).

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

L'intoxication chronique est dominée par les désordres neurologiques dont l'issue est proche de la maladie de Parkinson (Parkinson manganique) en raison d'une atteinte du système extrapyramidal (stimulation du « turn-over » dopaminergique) (**Barceloux, 1999 ; Biotox, 2005 ; Lafond, 1991**), s'installant en quelques mois ou années (jusqu'à plus de 10 ans), les troubles nerveux du manganisme chronique ne rétrocedent généralement pas. Pour des expositions à concentration modérée et/ou limitée, l'atteinte se limite à des perturbations neuro-psychiques d'apparition insidieuse : asthénie, anorexie, acouphènes, apathie, troubles du sommeil, émotivité, irritabilité, diminution de la libido, tremblement fin des extrémités (mains, doigts) (**GNM, 2012**).

2.8.2. Effet sur l'appareil respiratoire :

L'appareil pulmonaire a été relativement bien étudié. Il n'existe pas de données probantes montrant que le manganèse provoque des changements dans la fonction ou la morphologie respiratoire aux niveaux examinés, tandis que les données sur la mesure dans laquelle le manganèse provoque une inflammation des poumons ne sont pas toujours constantes (**SC, 2010**).

Les dommages au tissu pulmonaire ne sont normalement pas importants mais peuvent inclure des zones d'oedème (**Lloyd et Harding, 1949**). Les symptômes et les signes d'irritation pulmonaire peuvent inclure une toux, une bronchite, une pneumotite et des réductions mineures des fonctions pulmonaires (**Roels et al., 1997**).

2.8.3. Effet sur l'appareil de reproduction :

Les études publiées montrent que l'exposition in utero des rongeurs et des lapins à des concentrations suffisamment élevées de manganèse exerce de nombreux effets sur le fœtus (SC, 2010).

ATSDR (2000) rapporte que Jiang et al., (1996) ont réalisé une étude épidémiologique de reproduction sur 314 hommes travaillant dans des usines de Mn et avec une ancienneté allant jusqu'à 35 ans. La moyenne géométrique en Mn dans les poussières totales aéroportées était de 0,145 mg Mn/m³ sous forme de MnO₂. Les chercheurs n'ont trouvé aucune différence statistiquement significative au niveau reproducteur entre les travailleurs et les contrôles appariés mais l'impuissance et le manque de désir sexuel étaient plus élevés chez le groupe exposé.

2.8.4. Effet sur d'autres systèmes :

Les effets du manganèse sur d'autres systèmes que le système nerveux, l'appareil pulmonaire et l'appareil reproducteur n'ont pas été étudiés en profondeur parce qu'ils ne sont pas jugés comme étant les principaux organes cibles de ce métal. L'exposition au manganèse n'a pas été liée de façon concluante à d'importants effets hématologiques ou cardiovasculaires dans les quelques études menées chez les animaux. Il n'y a pas beaucoup de données liant le manganèse inhalé à d'importants effets nuisibles sur d'autres organes tels que le foie, le rein ou le pancréas (SC, 2010).

2.8.5. Génotoxicité et cancérogénicité du manganèse :

Aucune étude sur les effets génotoxiques et cancérigènes de l'inhalation de manganèse n'a été répertorié dans la littérature, mais ces paramètres ont été examinés in vitro et in vivo pour d'autres voies d'exposition. La United States Environmental Protection Agency a classé le manganèse « non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'humain (Groupe D) ». De plus, le Centre international de recherche sur le cancer n'a pas encore évalué le risque cancérigène du manganèse. Dans l'ensemble, la mesure dans laquelle le manganèse a des effets génotoxiques demeure incertaine et on ne peut tirer aucune conclusion définitive concernant la cancérogénicité de ce métal en se fondant sur les études publiées, qui sont limitées et équivoques (SC, 2010).

3. Les huiles essentielles :

3.1.Généralités :

Une huile essentielle est un extrait liquide très complexe qui contient les principes actifs d'une partie d'un végétal, c'est le résultat de l'extraction de l'essence d'une plante aromatique (Calvet, 2012).

Une huile essentielle est définie comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physique ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par des distillations sèche » (Duval, 2012).

3.2.Répartition :

Les huiles essentielles peuvent être stockées, dans tous les organes végétaux : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), bois (bois de rose,,santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou grains (carvi). Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes (Ochoa, 2005).

3.3.Biosynthèse et composition chimique :

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc (Garnéro, 1996). Il en résulte que les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes de composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (Lahlou, 2004). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Le groupe des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (Clarke, 2008).
 - Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents.
- Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

3.4.Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (Degryse et al., 2008).Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très

rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de sassafras, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (Bruneton, 1999 ; Desmares et al., 2008).

Elles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol ...) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (Bernadet, 2000).

Elles sont liposolubles, entraînant à la vapeur d'eau. En ce qui concerne leurs propriétés chimiques (Benayad, 2008). Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles sont constituées de différents composants : Terpènes, aldéhyde esters, cétones, lactones....

3.5. Les techniques d'extraction des huiles essentielles :

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quel que soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (Lucc, 2005) (Figure 02).

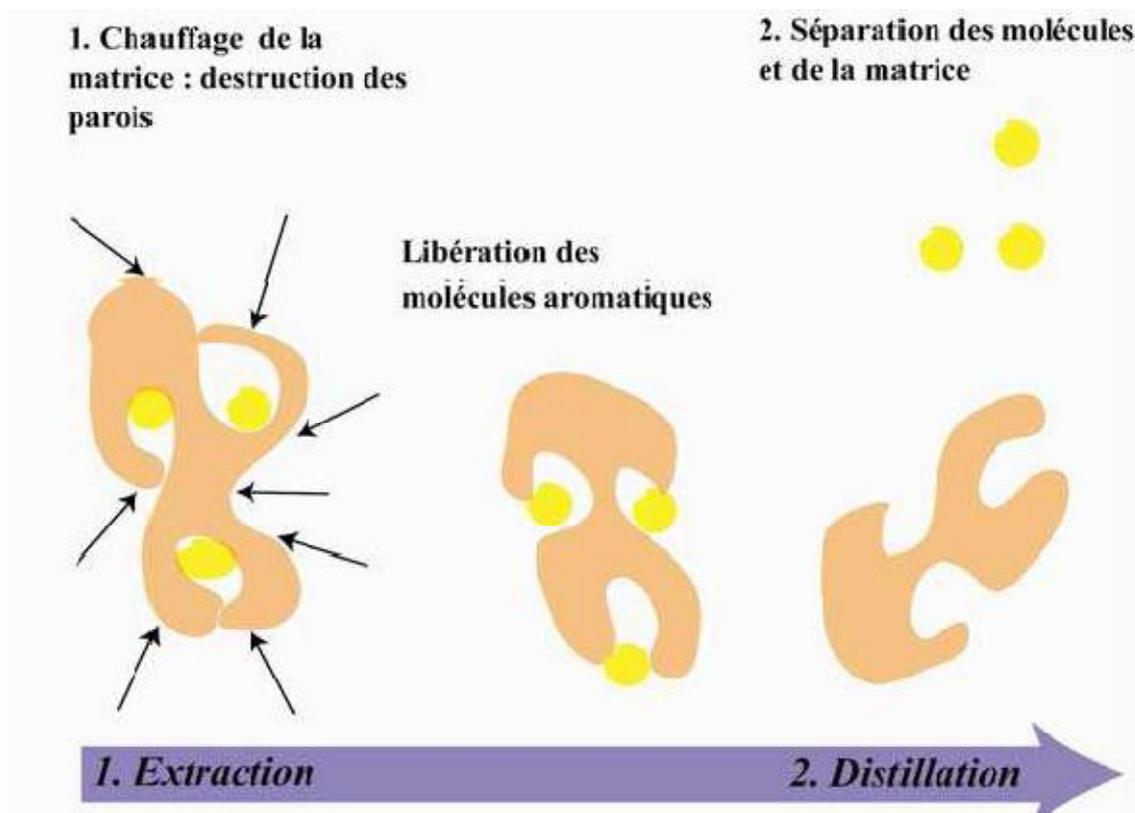


Figure 2: les étapes de l'extraction des huiles essentielles (Lucc, 2005).

3.5.1. La distillation :

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par Sa vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (**Franchomme et al., 1990**). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc (**Lucchesi, 2005**).

3.5.1.1.L'hydrodistillation (water distillation) :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (**Lucchesi, 2005**).

3.5.1.2.La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation) :

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le principe de la distillation à la vapeur d'eau consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la plante à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide formant un mélange «eau + huile essentielle». Recueillies dans un essencier, l'huile essentielle et l'eau florale se séparent par simple différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**Neffati, 2010**).

3.5.1.3.L'hydrodiffusion :

Est une variante de l'entraînement à la vapeur (**Figure 03**). Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau.

Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Lucc, 2005).

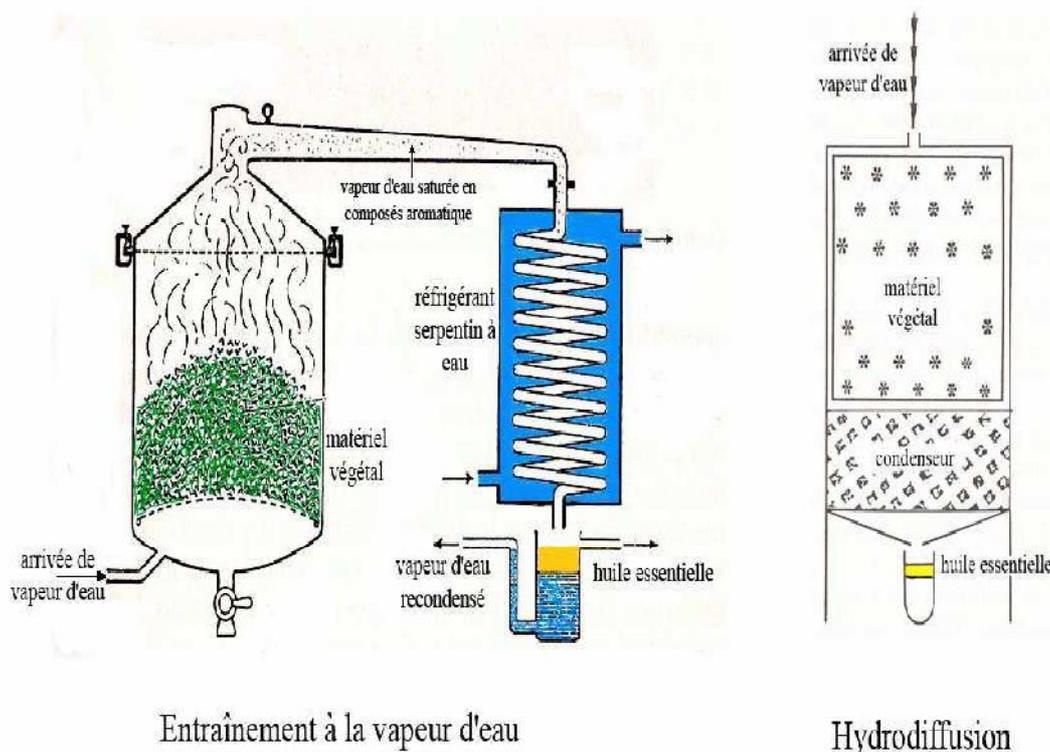


Figure 3 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante(Lucc, 2005).

3.5.2. Extraction par micro-ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelé Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants : rapidité, gain de temps, d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvants résiduels (Chemat, 2009 ; Brian, 1995 ; Mompon, 1994)(Figure 04).

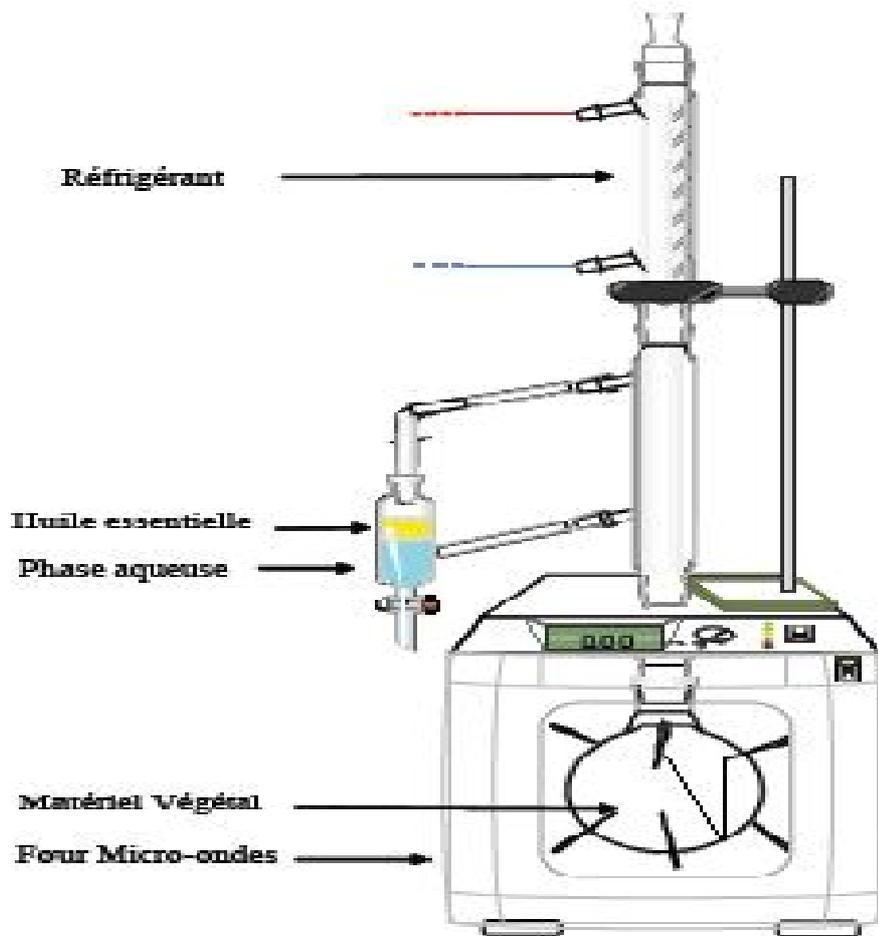


Figure 4: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi et al.,2004)

3.5.3. L'extraction au CO₂ supercritique :

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ} = 31,1$ ° C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Piochon, 2008)(Figure 05).

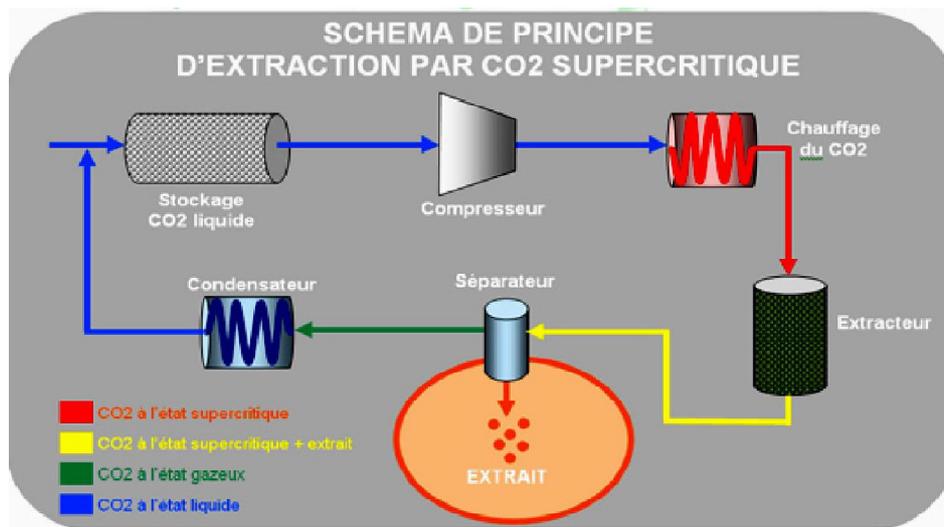


Figure 5: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique (Pourmortazavi, 2007).

3.5.4. Extraction par les solvants et les graisses :

Il s'agit d'extraits des plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre des composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Richard, 1992 ; Robert, 2000). Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à -10 °C pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle (Proust, 2006).

L'extraction à l'aide des solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (Bruneton, 1999).

3.5.5. Expression à froid:

Le procédé de l'expression à froid est plus rentable que l'hydrodistillation pour l'obtention d'huiles essentielles de zestes d'hespéridés. Le principe en est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois, via une gamme variée d'appareillage (Roux, 2008 ; Florent, 2011).

3.6. Toxicité des huiles essentielles :

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue ; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes (**Bruneton, 1993**). La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le safrole, l'estragole, la β -arasonne, et le méthyl-eugénoï (**Guba, 2001**).

4. Clou de girofle :

4.1. Historique :

Le clou de girofle compte parmi les épices les plus anciennes. On peut lire dans des écrits antiques qu'il a été introduit il y a plus de 2000 ans en Chine, en Inde, et plus tard dans l'Empire romain. En Chine, les courtisanes avaient coutume de mâcher un clou de girofle lorsqu'ils adressaient la parole à l'empereur. Les Arabes ont apporté le clou de girofle en Europe. Mais on ignorait à l'époque quelle était son origine exacte. Les premières indications plus précises datent du 13^e siècle. Le gouverneur français Poivre a réussi en 1769 à acclimater le giroflier aux îles africaines Maurice et de la Réunion. La désignation botanique *Syzygium* vient du grec *syzygos*, qui veut dire «assemblé» et se réfère aux feuilles assemblées par paires d'une espèce jamaïcaine (EGK, 2013).

4.2. Généralités :

Le Clou de Girofle est issu d'un arbre (le Giroflier) à feuilles effilées vert foncé, qui pousse dans les régions tropicales, les boutons floraux vont de la couleur crème à la couleur rouge, et ses baies sont pourpres. Les clous sont en fait les boutons floraux séchés au soleil (Morigane, 2012). Bouton floral (clou de girofle) à odeur caractéristique et à saveur chaude et piquante. La plante renferme 15 à 20% d'HE extraite à partir des boutons floraux desséchés du giroflier. L'essence du girofle est officinale, elle est utilisée en médecine dentaire comme antiseptique caustique et analgésique. Elle entre dans la préparation d'alcoolats (alcoolats de mélisse composée). En alimentation, le clou de girofle est une épice très utilisée (Rhayour, 2002).

4.3. Nomenclatures et classification botanique :

Giroflier, *Syzygium aromaticum* (*S. aromaticum*), *Eugenia caryophyllus*, *Eugenia caryophyllata* ou *Caryophyllus aromaticus* (USDA, 2010), ou connu par le nom populaire : clou de girofle, antofle, griffe de girofle (Betty Bossi, 2001) appartient à la famille des myrtacées (Auzias et al., 2008). La famille des Myrtaceae comprend plus de 1000 espèces d'arbres, et ce genre comprend environ 500 espèces d'arbres persistants au feuillage vernissé (Clotilde, 2008).

Selon Aouadhi, 2010, le clou de girofle est classé selon la détermination botanique suivante :

- **Régne** : Plantae
- **Embranchement** : Magnoliophyta (angiospermes)
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Myrtales
- **Genre** : *Syzygium*
- **Espèce** : *Syzygium aromaticum*

4.4.Habitat et culture :

Originaire des îles Moluques, en Indonésie (**BGJF, 2000**), et du sud des philippines (**Neu, 2011**). Il est cultivé aujourd'hui dans de nombreux pays tropicaux, particulièrement dans les îles de Zanzibar, Madagascar, Pemba et Grenade (**Betty Bossi, 2001**).

Les espèces les plus fines sont les clous de girofle des Moluques, archipel de l'est de l'Indonésie, ainsi que celles de Penang, Zanzibar et Madagascar. Les clous de girofle américains sont réputés être de qualité inférieure à cause de leur plus faible teneur en huile essentielle (**EGK, 2013**)(Tableau 04).

Tableau4: Production de Clou de girofle en tonne en chiffres (2003-2004)(**Crouzet et Richard, 2009**).

Pays	Tonnes	%
Indonésie	88000	71
Madagascar	15500	12
Tanzanie	12500	10
Sri Lanka	4100	03
Comores	3000	02

4.5.Description botanique:

Le giroflier est un grand arbre au tronc gris clair de 12 à 15 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut. Il présente un port érigé et pyramidal. C'est un arbre à croissance rapide, qui se plante au printemps, dans un sol humifère, frais, acide ou neutre, fertile ou riche et bien drainé. Il peut se planter au soleil ou à mi-ombre. Le girofle commence à fructifier vers la 5^{ème} ou 6^{ème} année, ce n'est que vers 8 à 10 ans que la récolte de clous commence à être appréciable. La pleine production est atteinte vers 20 ans. Dans les plantations soignées, la production se maintient jusque vers l'âge de 75 ans. Les rendements moyens sont de l'ordre de 6 à 16 kg de clous frais par arbre et par an. Les rendements à l'hectare en clous varient de 900 kg à 2 tonnes. Malheureusement, la production des girofliers est très irrégulière et on ne peut compter sur une bonne production qu'une fois tous les 3 à 4 ans (**Clotilde, 2008**). L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau (**Richard, 1974 ; Richard et Loo,**

1992). Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre, légèrement ponctuée. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. L'inflorescence comprend de petites cymes (4–5 c) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de trois à cinq petites fleurs parfumées m, au calice tubulaire blanc cassé, puis rouge (quatre sépales rouges charnus et persistants) et à la corolle blanc rosé (quatre dialypétales blancs) (Ghedira et al., 2010)(Figure 06).



Figure 6:(de gauche à droite) feuille et fleur du giroffier; quelques boutons floraux, clou séché(Benzeggouta, 2014).

4.6.Composition chimique de clou de girofle :

Les clous de girofle renferment des hétérosides de chromones, glucosides des stérols (sitostérol, stigmastérol et campestérol), acide oléanolique, camphérol, 6 % protéines, 20 % lipides, 61 % carbohydrates, vitamines et entre 15 à 18% d'huile volatile, les tiges entre 4 à 6% et les feuilles ont un rendement de 2 à 3 % (Leung, 1980 ; Bruneton, 1999). Les clous de girofle contiennent aussi des molécules phénoliques comme : l'acide gallique, flavonols glucosidiques, tannins, eugéniin, dehydrodieugénol, O, O'-dimethyldehydrodieugeno (Kurokawa et al., 1998; Shan et al., 2005; Pisano et al.,2007).

4.7.Huile essentielle de clou:

L'huile essentielle de clous, obtenue après distillation de l'épice. Les clous fournissent entre 11 et 13% d'huile essentielle à 78-98% d'eugénol. Elle est de couleur jaune à jaune pâle, caractérisée par une odeur épicée, puissante, aromatique et aldéhydée montante de tête (Demangel, 2011). Il est aussi possible de l'obtenir par extraction du clou par un solvant organique mais l'huile est généralement dans ce cas de qualité inférieure est raison de traces résiduelles du solvant. On pourra noter qu'une étude menées en 2006 à montrer qu'une extraction par le dioxyde de carbone supercritique est tout à fait possible avec un rendement maximum dans les conditions suivantes : pression de 10 MPa (méga pascal) et température de 50°C (Clotilde, 2008).

4.7.1. Composition chimique de l'huile essentielle de clou :

L'huile essentielle contient, selon une étude récente, 28 composés avec l'eugénol comme composé majoritaire à 80.95%, eugényl acétate 5.01%, β -caryophyllène 3.14%, Myrcène 1.84%, terpinène 1.65%, comme principaux constituants (Fayemiwo et al., 2014).

Une même espèce botanique, en fonction de différentes conditions (sol, ensoleillement, saison de cueillette, partie de la plante), peut fournir des huiles essentielles de compositions différentes (Lamendin et al., 2004)(Tableau 05).

Tableau 2: Composition chimique d'huile essentielle de clou de girofle (Crouzet et Richard, 2009).

Composés (%)	Madagascar	Indonésie
Eugénol	77.5	79.87
β -caryophyllée	4.6	6.91
α -humulene	0.50	0.83
Acétate d'eugénol	16.01	9.56
Oxyde caryophyllée	0.22	0.19
α -copaene	0.05	0.21
Méthyle d'eugénol	0.02	0.06
Iso-eugénol	0.04	0.08
chavicol	0.13	0.15
Méthyle de salicylate	0.15	0.10

4.7.2. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de clou de girofle :

D'après (Treiner, 2000), l'une des caractéristiques fondamentales de l'H.E. des clous de girofle est sa densité élevée ($d = 1,066 > d_{\text{eau}} = 1.00$), ce qui nous permet de les séparer par simple décantation (Tableau 06).

Tableau 3:propriété physico- chimique de l'huile essentielle de clou de girofle(Trimeta, 2012)

Odeur	épicée, caractéristique de l'Eugénol
Liquide	mobile, très légèrement visqueux
Densité	1.042 à 1.065 à 20°C
Solubilité	insoluble dans l'eau ; soluble dans l'alcool 70°
Point éclair:	>93.3°C
Point	251.00 °C
Explosion	Aucun risque d'explosion à la température ambiante
Combustion	Ne contient pas de substance comburante connue, susceptible de s'enflammer

4.8. Utilisation et propriété de clou de girofle et leur l'huile essentielle :

Pharmacologie de la Plante Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulences (**Van Wyk et Wink, 2004; Ghedira et al., 2010**).

Dans les études scientifiques modernes les clous de girofle extraits avec différentes méthodes sont étudiés pour leurs vertus médicinales: l'extrait supercritique possède un effet antioxydant puissant en le comparant aux antioxydants de synthèse mais un effet antibactérien modéré (**Ivanovic et al., 2013**); l'extrait obtenu par ultrasons possède un effet antioxydant important et une grande quantité de composés phénoliques par rapport à l'extraction hydroéthanolique classique (**Alexandru et al., 2013**); l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation classique et les polyphénols présentent un bon effet antioxydant par rapport aux témoins (**Gülçin et al., 2012; Liu et al., 2008**); l'extrait aqueux possède un effet antibactérien important en le comparant avec celui de cannelle (**Al-dhaher, 2008**); effet antibactérien puissant mais inférieur à celui de la cannelle en phase vapeur (**Kloucek et al., 2012**); antifongique (**Guynot et al., 2005**); anti-aspergillose et anti-dermatophytose par l'inhibition de la kératinase et de l'élastase des champignons (**Khan et Ahmad, 2011**); effet larvicide de l'huile sur les moustiques *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*, vecteurs principales de la dengue, de la fièvre jaune, fièvre du Nil (virus du Nil occidental) et le paludisme aviaire (**Fayemiwo et al., 2014**); effet hypoglycémiant de l'huile avec réduction des dommages du cristallin, du muscle cardiaque et du foie (**Shukri et al., 2010**); l'infusion administrée par voie orale inhibe significativement la progression du cancer de poumon chez l'animal (**Banerjee et al., 2006**). L'eugénol est antiviral anti-herpès (**Khan et al., 2005**); anti-inflammatoire, analgésique, antioxydant et anticancéreux (**Kamatou et al., 2012**), les propriétés antiagrégantes plaquettaires de l'eugénol impliquent une grande prudence lors de l'utilisation d'huile essentielle ou d'infusion de clou de girofle chez un patient traité par anticoagulant ou antiagrégant. On a également rapporté des cas de coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) après ingestion accidentelle d'huile de clou de girofle (**Neu, 2011**). En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons (**Tworowski, 2002; Dayan et al., 2009**), effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks (**Viteri et al., 2014**). En alimentation, les clous de girofle entiers, mais aussi en poudre, servent à aromatiser les conserves de légumes, le chou rouge ou la choucroute, les compotes de pommes et autres fruits

(EGK, 2013), et leur huile essentielle est communément utilisée comme épice alimentaire et comme préservatif d'aliments (Ferland, 2011).

4.9.Toxicité de clou :

L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Le clou de girofle peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques, des colites ou le syndrome du côlon irritable. Dans les surdoses, les clous de girofle peuvent causer des nausées, des vomissements, des diarrhées et de fortes hémorragies digestives. La surutilisation peut conduire à une insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique, une dyspnée, une perte de conscience, des hallucinations et même la mort. L'huile de clou de girofle, riche en eugénol peut irriter la peau et les muqueuses. En usage externe elle est potentiellement dermo-caustique. Son emploi dépend de la dose ; 100g de clous de girofle en une fois est mentionné toxique (Aouadhi, 2010).

5. Le stress oxydant :

5.1. Définition :

Le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre la production d'oxydants et les mécanismes de défenses antioxydantes (**Morena1 et al., 2002**), ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (**Sergent et al., 2000**).

5.2. Les radicaux libres :

Un radical libre (RL) est une espèce chimique neutre ou chargée dont la couche périphérique contient un électron non couplé. Cet électron célibataire confère aux RL une certaine instabilité. (**Corinne, 2010**). Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (**Finaud et al., 2006b ; Mac Laren, 2007**). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (**Goto et al., 2008**).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

1. Addition d'un électron libre à un non radical ($NR + e^- \rightarrow R^\cdot$) ;
2. Perte d'un électron par un non radical ($NR - e^- \rightarrow R^\cdot$) ;
3. Scission homolytique d'une liaison covalente ($A : B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$) (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

5.2.1. Différents types des ROS :

Les espèces réactives oxygénées ERO L'appellation dérivés réactifs de l'oxygène (ROS dans la littérature internationale, pour reactive oxygen species) n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde ($\cdot O_2^-$), radical hydroxyl ($\cdot OH$), monoxyde d'azote ($NO\cdot$)...), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (**Fontaine et al., 2002**) (**Figure 07**).

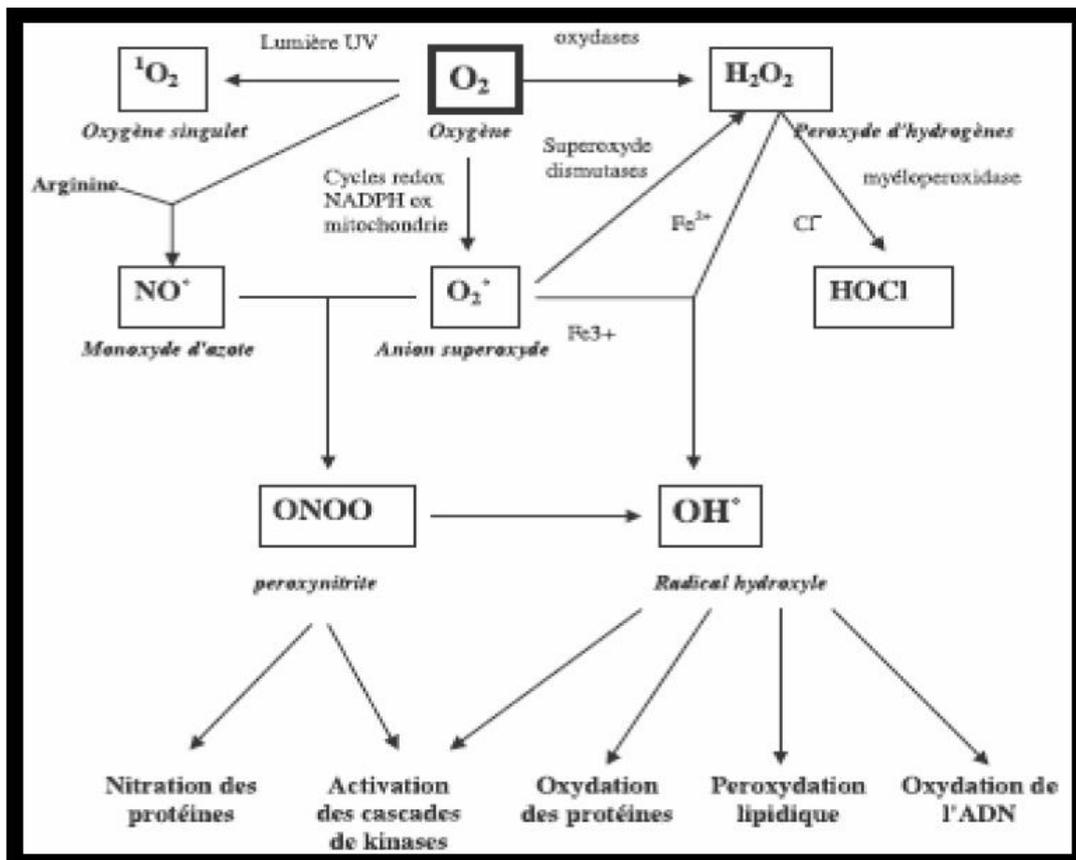


Figure 2: voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène) (Favier, 2003).

5.2.2. Synthèse physiologique des radicaux libres :

La formation de ces RL survient essentiellement de la façon suivante : c'est l'activation de l'oxygène qui va amorcer la réaction soit par un gain d'énergie (rare), soit par un gain unitaire d'électron (voie de la réduction univalente de l'oxygène). Il s'agit là de formes dites activées de l'oxygène (radicaux libres oxygénés : RLO). Cette voie est la conséquence de l'auto-oxydation de nombreuses substances intracellulaires (épinéphrine, ferrédoxine, hémoglobine) ou lors de processus d'oxydo-réduction le long des chaînes respiratoires des mitochondries ou des membranes des polynucléaires ou des macrophages (Corinne, 2010).

5.2.3. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes :

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Sies, 1991). Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (Favier,

2003), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (Ardestani et Yazdanparast, 2007).

5.3. Les maladies liées au stress oxydatif :

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Favier, 2003).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti et al., 2003).

5.4. Préventions par les antioxydants:

5.4.1. Définition :

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. A la fin du XIX^e siècle et au début du XX^e siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire, par exemple, la corrosion des métaux. Les antioxydants, dans le cas présent, sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant. La production des entités oxydantes est constamment en équilibre avec les systèmes de défenses antioxydantes (Auberval, 2010).

5.4.2. Mécanisme d'action :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de préventions, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capable de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres

antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

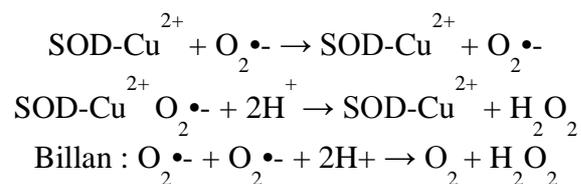
5.4.3. Les systèmes de défense antioxydants :

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces afin de diminuer la concentration des entités oxydantes dans l'organisme (Auberval, 2010). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Bonfont et al., 2003). Il existe différents types de molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques et dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non (molécules piègeuses d'électrons) (Auberval, 2010).

5.4.4. Les mécanismes de défense enzymatiques :

5.4.4.1.SOD :

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La structure des superoxydes dismutases est bien conservée lors de l'évolution et présente un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. La nature du métal situé au centre de l'enzyme permet de distinguer les superoxyde dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, de celles à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules épithéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (Zelko et al., 2002). Les superoxydes dismutases à cuivre-zinc catalysent les réactions suivantes :



5.4.4.2.Les catalases :

Le H₂O₂ formé, intermédiaire dangereux pour la cellule, est partiellement éliminé par les catalases localisées dans les peroxysomes. Cette localisation est stratégique puisque c'est là que des enzymes à flavines, l'urate oxydase, la glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent le H₂O₂ (Lehucher et al., 2001).



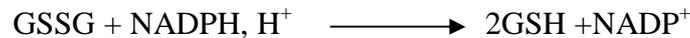
5.4.4.3. Les glutathions peroxydases (GSH-Px) et glutathions réductases (GR) :

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous unités contenant chacune un atome sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes. Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, des hydroxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH), selon le mécanisme suivant :

Gpx (Se)



Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée GSSG est obtenue. Pour que cette réaction perdure, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR). Elle catalyse la réduction du GSSG en GSH, à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H⁺). Le NADPH, H⁺ provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par le glucose -6- phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphate (Auberval, 2010).



5.4.5. Les mécanismes de défense non enzymatique :

Certaines molécules présentes dans l'organisme ont des propriétés antiradicalaires. Ces antioxydants sont pour la plupart apportés par l'alimentation, d'où l'attention portée aux aliments dans le renforcement du système de défense contre le stress oxydant. Ces molécules agissent par échange ou appariement d'électron célibataire. Elles sont capables d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène par des processus d'oxydoréduction. Il s'agit en quelque sorte de substance à effet tampon : lorsqu'elles sont présentes dans des zones de risque, comme les membranes cellulaires, certaines protéines et l'ADN, elles les protègent en orientant l'espèce réactive vers une voie métabolique précise. Les acides ascorbique et urique présentés précédemment, ces molécules sont essentiellement la vitamine E, le bêta-carotène, les flavonoïdes, les thiols, les quinones, les chélateurs de métaux et les oligo-éléments (Lehucher-Michel et al., 2001).

5.4.5.1. Vitamine E :

La vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble majeur des lipides. Elle protège in vivo les structures moléculaires particulièrement sensibles à l'oxydation (double liaisons des acides

gras polyinsaturés, bases nucléotidiques des brins d'ADN) et les structures condensées riches en lipides (membranes, lipoprotéines). La régénération de l' α -tocophérol se fait en permanence par les quinones et la vitamine C au niveau des sites d'action de la vitamine E, à l'interface entre les lipides et l'eau. Le potentiel antioxydant de l' α -tocophérol est important malgré sa faible concentration membranaire. La teneur en vitamine E membranaire et son stockage adipeux, hépatique et musculaire sont d'ailleurs peu influencés par les apports nutritionnels (**Guillang et Lhuissier, 1996**).

5.4.5.2. Vitamine C (acide ascorbique) :

Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxydes) (**Valko et al., 2006, Van Antwerpen, 2006**).

5.4.5.3. Caroténoïdes :

L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (**Mortensen et al., 2001**). Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROOH, RH) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (**El-Agamey et al., 2004**).

5.4.5.4. Acide lipoiïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; $C_8H_{14}O_2S_2$) :

Cet acide est aisément absorbé et converti rapidement dans de nombreux tissus à la forme réduite dithiol, l'acide dihydrolipoïque (**Smith et al., 2004**). Il joue un rôle important dans le piégeage des ERO, la régénération des antioxydants endogènes et exogènes tels que les vitamines C et E et le glutathion, la chélation des métaux Cu^{2+} et Fe^{2+} (**Valko et al., 2006**).

5.4.5.5. Alumine :

Il se trouve en grande quantité dans le plasma possède une fonction thiol qui lui permet de jouer un antioxydant puissant à fixer les différents métaux (Cu^{2+} , Fe^{3+} ...) et de prévenir leur effets oxydants (**Halliwell et Gutteridge, 1990**).

5.4.5.6. Composés phénoliques :

Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al., 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001**). Vu leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Cook et Samman, 1996 ; Valko et al., 2006**).

5.4.6. Risque des antioxydants :

Un antioxydant peut devenir pro-oxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante. Ainsi, lors des suppléments, il ne faut pas dépasser les doses indiquées. De plus, les antioxydants ingérés dans le bol alimentaire n'ont pas la même biodisponibilité que s'ils sont ingérés sous forme purifiée. Par exemple, une ingestion de 100 mg de quercétine par l'alimentation augmente son taux sanguin, mais la prise de 100 mg de quercétine purifiée augmente 10 fois son taux sanguin, dose qui devient alors toxique. Ainsi le catabolisme oxydant de la quercétine conduit à la formation de produits secondaires, qui facilitent la formation des anions superoxydes et diminuent le GSH (Metodiewa et al., 1999). Des études ont également montré que l'oxydation des polyphénols antioxydants génère des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des complexes qui sont potentiellement toxiques (Sang et al., 2005).

Matériels et méthode

1. Préparation de l'huile essentielle de plante :

1.1. Matériel végétal :

La plante utilisée dans notre étude se trouve sur le marché tout au long de l'année, pour son importance majeure dans la culture Algérienne comme épice culinaire et même médicale, il s'agit du clou de girofle "*Syzygium aromaticum*". Elle a été achetée sous forme séchée d'un magasin d'épices située à cité castor dans la wilaya de Saida (**Tableau 08**).

Les clous de girofle sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique (à usage domestique) jusqu'à l'obtention d'une poudre qui sera conservée dans un bocal en verre hermétiquement fermé pour préserver sa qualité initiale.

Tableau 4: Origine et caractéristique du matériel végétal utilisé (**clou de girofle**).

Quantité de la plante achetée	250g
Prix	650 D.A
Partie utilisée	Bouton floral
État	Sèche
Lieu d'achat	épicerie
La date d'achat	28/12/2014
Apportez de	Oran

1.2. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation :

Le protocole d'hydrodistillation (**Figure 08**) consiste à Peser dans une capsule 30 g de clous de girofle broyés. Les placer dans le ballon de 1000 mL, à l'aide de l'entonnoir ajouter 700 mL d'eau distillée et 2 grains de pierre ponce puis positionner le ballon sur le montage d'hydrodistillation. Alimenter le réfrigérant en eau et faire chauffer à ébullition douce pendant 04 heures. La vapeur émise sera condensée grâce à un système de refroidissement à eau, puis elle sera collectée dans un flacon opaque. A la fin de l'expérimentation le liquide collecté est mis dans une ampoule à décanté à fin de séparé les deux phases (aqueuse et organique) pour obtenir l'huile essentielle (**Boubrit et Boussad, 2007**).

L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4 °C (**Laib et Barkat, 2011**).



Figure 3: montage utilisé dans l'hydrodistillation.

1.3. Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé (Bssaibis et al., 2009) (Tableau 08).

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

- **R (%) :** Rendement en h
- **M :** Quantité d'huile récupérée exprimée en g.
- **M₀ :** Quantité de la matière sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Tableau 5: renseignements sur l'extraction.

M₀ (quantités de la matière sèche utilisée)	120 g (30 ×4 =nombre d'extraction effectué)
M (quantité d'huile récupéré)	14 g

2. Animaux d'expériences :

Les expériences utilisées dans cette étude sont réalisées sur des rats de la souche Wistar pesant 190 à 320g à leur arrivée à l'animalerie. Les rats sont groupés par 3 à raison de 1 mâle et 2 femelles dans des cages conventionnelles en contrôlant un cycle nyctéméral (Lumière / obscurité) de 12/12h et une température de 20 à 22C° dans l'animalerie de l'Université de Moulay Tahar- Ain elhdjar. Les animaux ont un accès libre à une nourriture standard adéquate et un biberon rempli d'eau de boisson (Missoun, 2010).

2.1. Préparation de solution d'HE injectable :

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

2.2. La répartition des groupes :

- A J₀ de l'accouplement, les rats sont divisés en deux lots (Figure 09) :
- **Lot I (Intoxiqués) :** regroupe les rats intoxiqué par l'acétate de plomb à mesure de 2.84 mg/ml et 4.79 mg/ ml de manganèse dilué dans l'eau bidistillée (Monila et al., 2011), cette opération a duré du premier jour de l'accouplement jusqu'au sevrage.
- **Lot T (Témoin) :** les rats de ce lot recevaient de l'eau de robinet.
 - A J₂₁ après le sevrage :
- **Lot I (Intoxiqués) :** les rats de ce lot sont divisés en deux sous-groupes :
 - ❖ **Sous-groupe non traité :** constitué par des jeunes rats issus du premier accouplement, et reçoivent de l'acétate de plomb à une dose 2.84 mg/ml et de manganèse à une dose 4.79 mg/ml.
 - ❖ **Sous-groupe traité par l'HE :** constitué par des jeunes rats qui abreuvent par le même mélange que le groupe précité (acétate de plomb à 2.84 mg/ml et manganèse à 4.79 mg/ml dilués dans une eau bidistillée), et traité en parallèle avec une solution d'HE à raison 0.1ml/kg par voie IP (intrapéritonéale) pendant 21 jours après le sevrage.
- **Lot T (témoins) :** comporte les jeunes rats sevrés et abreuvent avec l'eau du robinet.

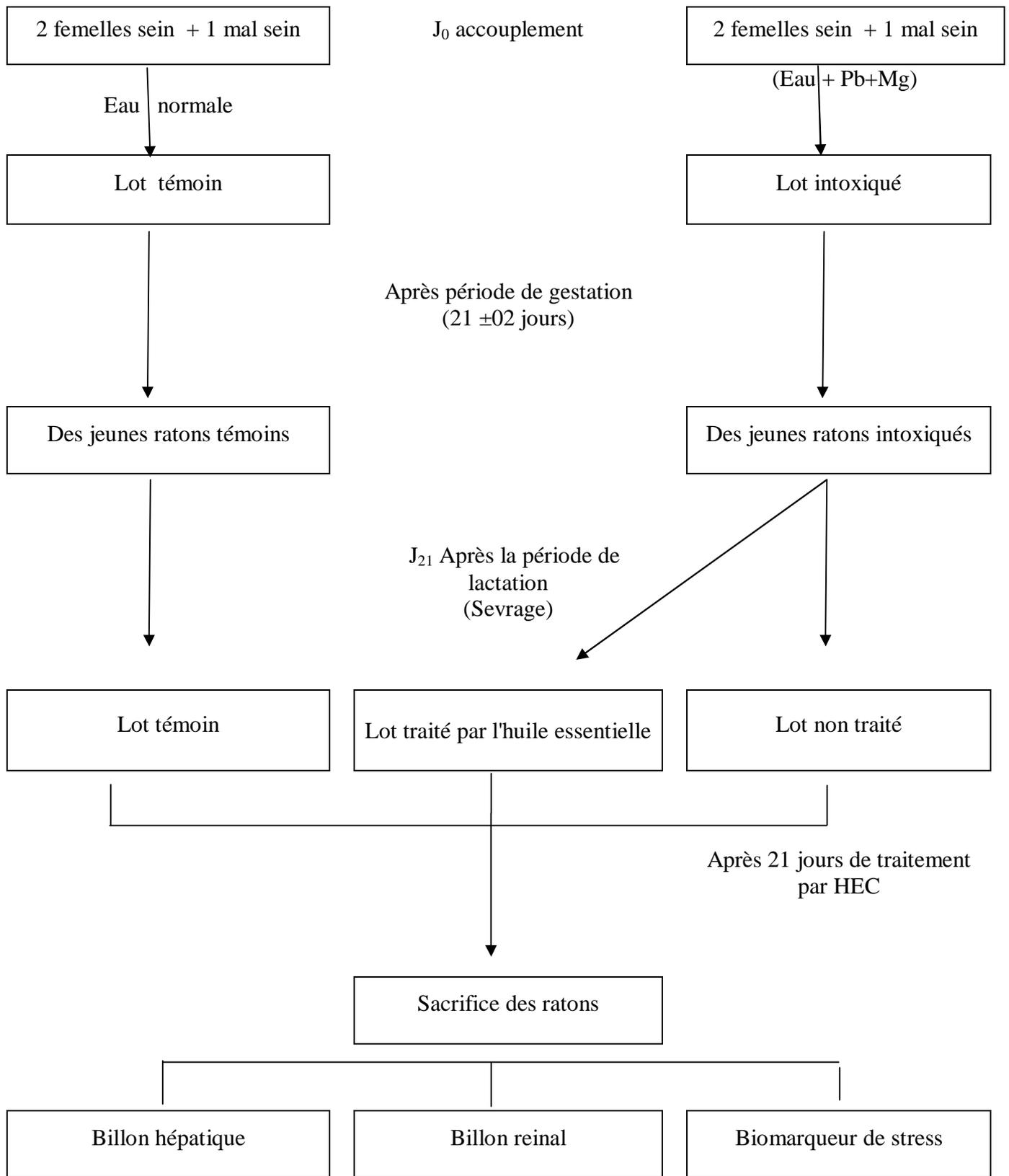


Figure 4: le protocole expérimental.

2.3. Evolution du poids corporel :

Le poids corporel de chaque raton a été quotidiennement noté pendant la durée de l'expérimentation du traitement (21 J). Le poids du foie et des reins des différents groupes respectifs d'animaux a été relevé à la fin de l'expérience de traitement à l'HE(kharoubi, 2010).

2.4. Prélèvement du sang et des organes :

A la fin de la troisième semaine du traitement avec l'HE de clous de girofle ; 05 rats de chaque lots ont été sacrifiés, après une nuit de jeune par injection intrapéritoniale d'une solution de chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$) à 10% (4mg/Kg de poids corporel) pour éviter l'effet du stress.

- Le sang des rats sacrifiés a été recueilli dans des tubes à analyse.
- Le foie et les reins sont prélevés rapidement sur la glace rincés avec une solution de NaCl à 0.9 % puis pesés(kharoubi, 2010).

2.3.1. Préparation des érythrocytes :

Suite à la récupération des échantillons du sang, une prise aliquote a été prélevée pour le dosage de l'hémoglobine. Ensuite, le reste des échantillons ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min. Le sérum a été soigneusement prélevé et le culot restant contenant les érythrocytes a été lavé trois fois par une solution saline à 0.9 g/l, puis une lyse des cellules a été effectuée par addition de l'eau distillée glacée et incubée pendant 15min dans la glace. Le lysat est récupéré ensuite pour le dosage des enzymes antioxydants érythrocytaires marqueurs du statut oxydant après centrifugation à 5000tr/min pendant 5min (Hocine, 2011).

2.3.2. Préparation des organes :

Le foie et les reins sont lavés, séché et pesé à raison de 0.5g de chaque échantillon puis homogénéisés dans une solution isotonique contenant 0.32 M saccharose, 0.5mM d'EDTA, 10mM Tris (pH 7.2) par l'utilisation d'un homogénéisateur verre/verre. Les homogénats ont été centrifugés à 1000xg pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu a été centrifugé à 10.000xg pendant 30 minutes à 4°C .Le surnageant ainsi obtenu constitue la fraction mitochondriale qui a été utilisée dans les différents analyses.

Le culot de cette dernière opération est récupère dans du tampon (0.32 M saccharose, 0.5 mM d'EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.2), puis centrifugé à 10000xg pendant 15mn à 4°C ; le culot contenant les mitochondries est récupère avec une solution de saccharose (0.32M à pH 7.2).

Un autre gramme de tissus a été homogénéisé dans une solution contenant du chloroforme/méthanol (2 :1 ; v/v), en employant un homogénéisateur en verre/verre. Les homogénats ont été centrifugés à 1000xg pendant 10mn puis filtré. Le surnageant ainsi obtenu servira pour l'analyse des lipides(kharoubi, 2010).

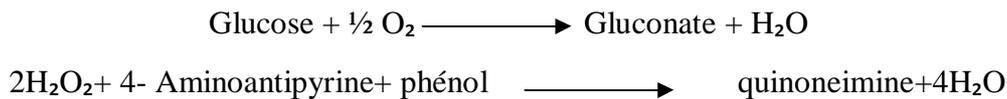
3. Dosage biochimique :

3.1. Détermination de la plombémie et manganèse :

Le dosage de la plombémie et manganèse été réalisé au sein du laboratoire de contrôle de qualité et analyse (QAC).

3.2. Dosage de glucose :

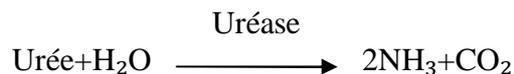
Le dosage du glucose est effectué sur le sérum après séparation du sang. Le glucose sanguin est estimé selon les réactions couplées suivantes :



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

3.3. Dosage d'urée :

Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur vert (Dicarboxyl indophénol) dont la densité est proportionnelle à la concentration en urée selon la réaction suivante :



Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 590 \text{ nm}$.

3.4. Dosage de créatinine :

La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine. Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 492 \text{ nm}$.

3.5. Dosage de cholestérol :

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du 4-aminoantipyrine en présence de phénol et de peroxydase.

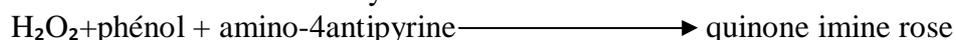
Cholestérol estérase



Cholestérol oxydase



Peroxydase



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol. Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 505 \text{ nm}$.

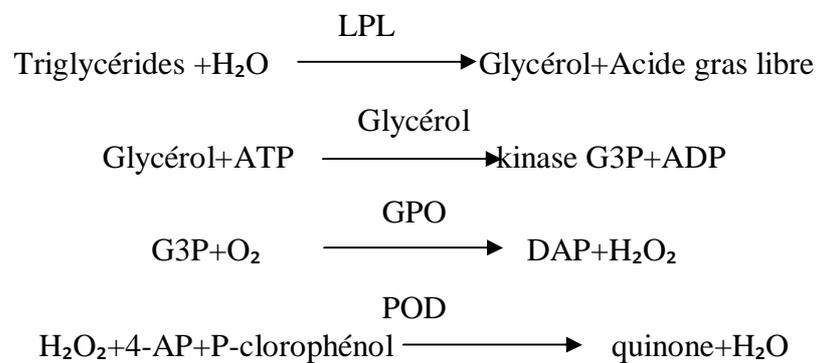
3.6. Dosage de triglycéride :

Les triglycérides incubés avec la lipoprotéine lipase (LPL) libérant ainsi l'acide gras.

Le glycérol est phosphorylé par la glycérophosphatase déshydrogénase (GPO) et l'ATP en présence de glycérol kinase (KG) pour produire glycérol 3 phosphate (G3P) et l'adénosine 5- diphosphate (ADP).

Le G3P est converti en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'intervention du GPO.

En fin le H_2O_2 réagit avec le 4-aminophénazone et p-chlorophénol. Cette réaction est catalysée par la peroxydase (POD), on obtient une coloration rouge selon les réactions couplées suivantes :



Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 505 \text{ nm}$.

3.7. Dosage des transaminases (TGO – TGP) :

Ce sont l'aspartate aminotransférase (ASAT) ou transaminase glutamoxaloacétique (TGO) et l'alanine aminotransférase (ALAT) ou transaminase glutamopyruvique (TGP). Elles sont normalement présentes en faible quantité dans le plasma ou le sérum. Leur activité est élevée dans certains tissus, en particulier le foie (TGP, ou TGO à un degré moindre), le cœur et le muscle (principalement TGO). En cas de nécrose de ces tissus, les enzymes sont libérées dans la circulation et leur activité sérique augmente (**Guyader, 2005**).

Les dosages ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Mina plus

- RAC 040 Aind. C. les réactifs utilisés sont :
- TGO U.V Kinetic test code HBE06 IFCC;
- TGP U.V Kinetic test code HBE07 IFCC;

4. Description des méthodes utilisées pour la mesure des marqueurs du stress oxydant :

4.1. Le superoxyde dismutase SOD :

Le Superoxyde dismutase (SOD) au niveau des érythrocytes, au niveau tissulaire a été déterminé

par la méthode décrite par **Winterbourn et al, (1975)**. Le mélange réactionnel contient essentiellement 0.2 ml Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) à 0.1 M, 0.1 ml Nitroblue tetrazolium (NBT) 0 1.5 Mm, 1.2 ml de Tampon Potassium phosphate à 0.067 M, 0.5 de l'extrait enzymatique. Le mélange a été incubé 5-8 minutes. La lecture a été faite ensuite à 560 nm.

4.2. Catalase (CAT) :

CAT a été analysé par méthode de **Sinha (1972)**. Le mélange de la réaction (1.5 ml, vol.) contenant 1.0 ml de tampon phosphate à 0.01 M pH 7.0, 0.1 ml de l'échantillon et 0.4 ml d' H_2O_2 à 2 M. La réaction a été arrêtée par l'addition de 2.0 ml d'acide dichromate acétique (5% de dichromate de potassium et l'acide acétique glacial ont été mélangés avec un rapport de 1:3 (V/V)) ; l'absorbance est déterminé à 620nm.

4.3. Glutathion peroxydase (GSH-Px):

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

4.4. Le glutathion réduit (GSH) :

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

5. Analyse statistique :

Les résultats sont représentés par mean+SEM. One-way analyse de variance (ANOVA) suivie par le test de Bonferroni ont été appliquées pour l'analyse statistique, avec le niveau de signification fixé à 0,05.

Résultats et interprétations

1. Rendement en l'huile essentielle :

L'huile essentielle HE de *Syzygium aromaticum* (Figure 10) a été extraite par hydrodistillation à partir de la matière sèche broyée. Le rendement obtenu est de l'ordre de 11.66%.

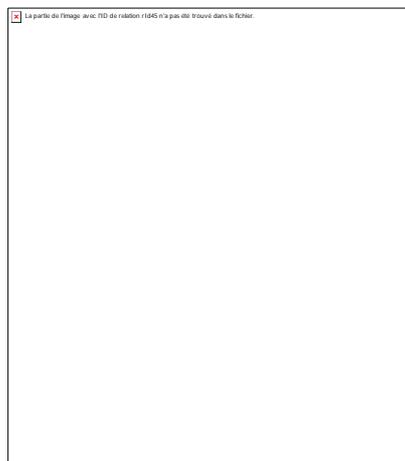


Figure 5: L'HE de *Syzygium aromaticum*

2. Détermination du poids corporelle:

Les résultats de (Figure 11) montrent une différence hautement significative ($P < 0.05$) entre le poids des jeunes rats issus des femelles intoxiquées au cours de la gestation et de la lactation par le plomb et manganèse par rapport aux jeunes rats témoins recevant seulement de l'eau distillée (une diminution de 20.5%), et qu'avec les rats intoxiqué et traité par l'huile de *S. aromaticum*. Ceci peut être expliqué par une baisse de la prise alimentaire (food intake), ou par l'effet compétitif du manganèse sur l'absorption intestinal des éléments nécessaires à la croissance corporelle (calcium, phosphore, fer ...etc).

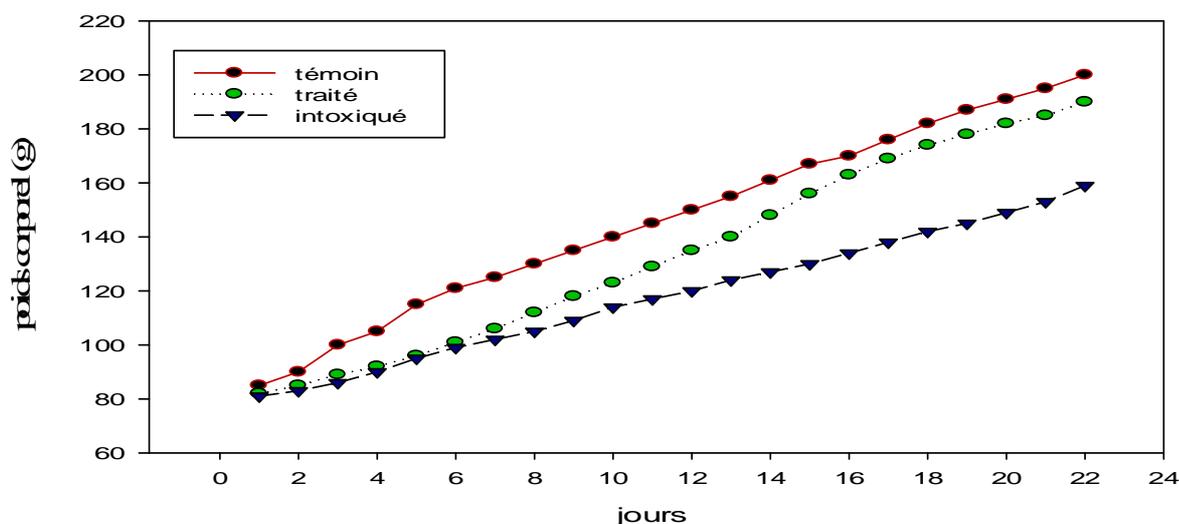


Figure 6: Evolution du poids corporel des jeunes rats durant la période expérimentale (** $P \leq 0.05$).

3. Détermination de poids des organes (foie et les reins) :

L'évaluation des poids des organes révèle une baisse significative des poids des organes ; foie, rein, (Tableau 10). Ceci montre qu'il y a un effet sur la croissance des organes chez les rats exposés au mélange de l'acétate de plomb et manganèse par rapport aux groupe des rats témoins et ceux traités par l'huile essentielle de *S.aromaticum*.

Tableau 6: Evaluation des paramètres pondéraux.

Le poids	Poids corporelle (g)	Poids de foie (g)	Poids des reins (g)
Témoin	200.5±12.13**	11.209±0.05	1.837±0.02
Intoxiqué traité	190.75±13.25**	10.560±0.35	1.654±0.24
Intoxiqué non traité	159.5±19.5**	09.015±0.25	1.354±0.038

4. Dosage de Plomb et Manganèse dans le sang :

4.1. Taux du plomb sanguin :

Ce résultat (Figure 12) montre une augmentation significative ($p < 0.001$) du taux de plomb au niveau sanguin chez les rats intoxiqués par rapport aux rats témoins qui présentent une valeur de plombémie proche de 0. Tandis que les rats traités à l'extrait de la plante qui sont préalablement intoxiqués montre une diminution significative des taux de plomb au niveau sérique comparés aux rats intoxiqués.

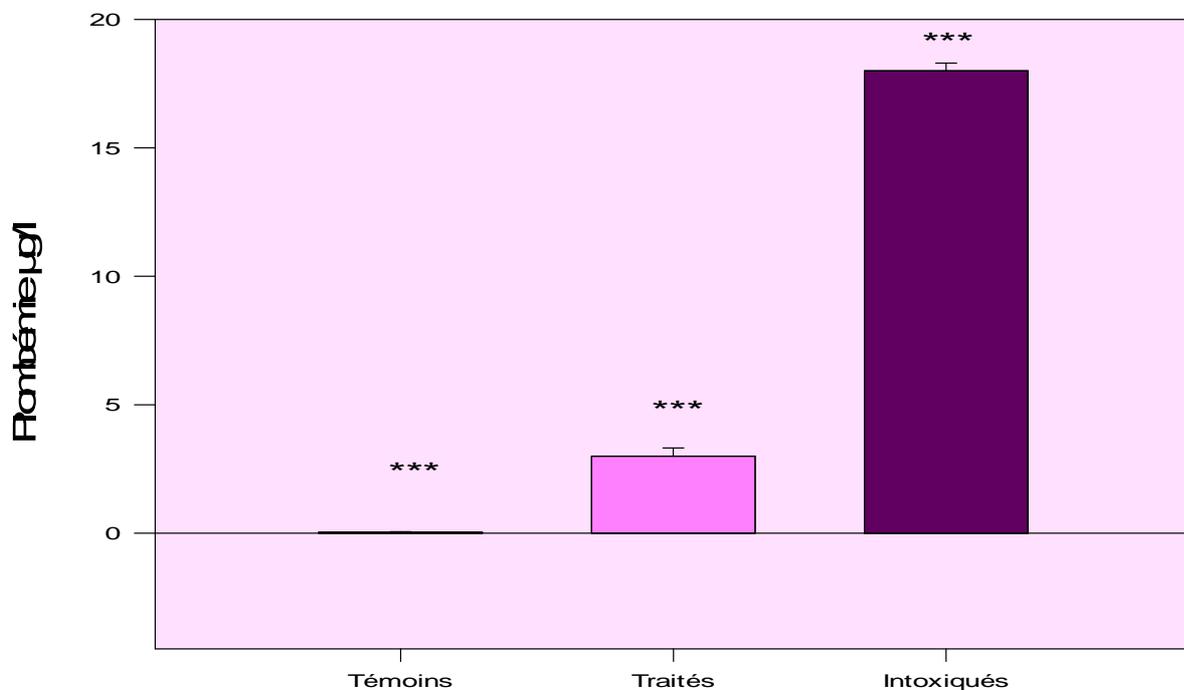


Figure 7: le dosage de plomb dans le sang chez les rats témoins, traités et intoxiqués. Les valeurs sont exprimées au moyenne ± SEM. (***) : $p < 0.001$

4.2. Taux du Manganèse sanguin :

L'exposition des femelles gestantes et lactantes à une dose de 4.79 mg/ ml de manganèse, permet d'enregistrer un taux de manganèse de l'ordre $17 \pm 0.05 \mu\text{g/l}$ chez les jeunes rats témoin, $75 \pm 1.5 \mu\text{g/l}$ chez les jeunes rats intoxiqués, et $50 \pm 2.25 \mu\text{g/l}$ chez les jeune rats traités par l'huile essentielle de clou de girofle ($p < 0.001$) (**Figure13**).

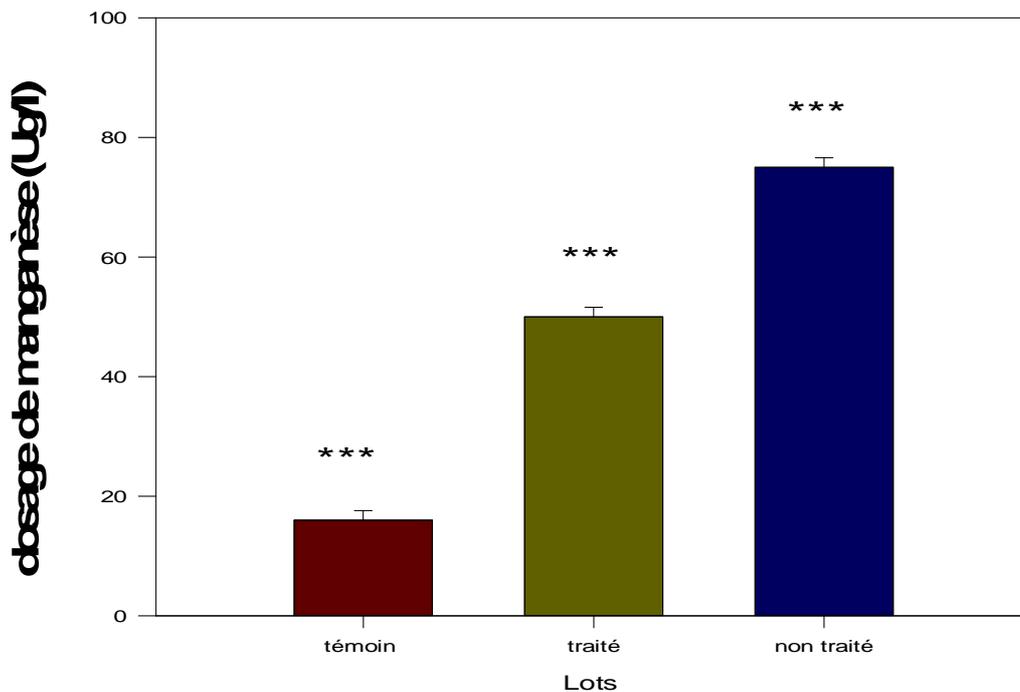


Figure 8: le taux de manganèse érythrocytaire chez rats intoxiqués (Mn), des rats intoxiqués traité par *S.aromaticum* comparée aux les rats témoins. (***: $p < 0.001$)

5. Dosage des paramètres sériques :

Les résultats des différents paramètres biochimiques (glucose, urée, créatinine, TGO / TGP, cholestérol et triglycérides) sont présentés dans les figures (14 ,15 ,16 ,17 ,18 ,19).

5.1. Dosage de glycémie :

Afin de justifier ces données expérimentales nous avons procéder à la détermination du taux de glycémie chez les rats des trois lots (témoins, traités, intoxiqués par Pb+Mn) sachant que le glucose est un bon marqueur de stress.

Les résultats (**Figure 14**) indiquent une différence significative ($p < 0,001$) du taux de glucose sanguin chez les rats exposés à l'acétate de plomb et chlorure de manganèse par rapport à celle des animaux témoins. D'autre part on observe que taux de glucose sanguin est diminué chez les rats traités par l'HE de *S. aromaticum* comparant aux rats intoxiqués.

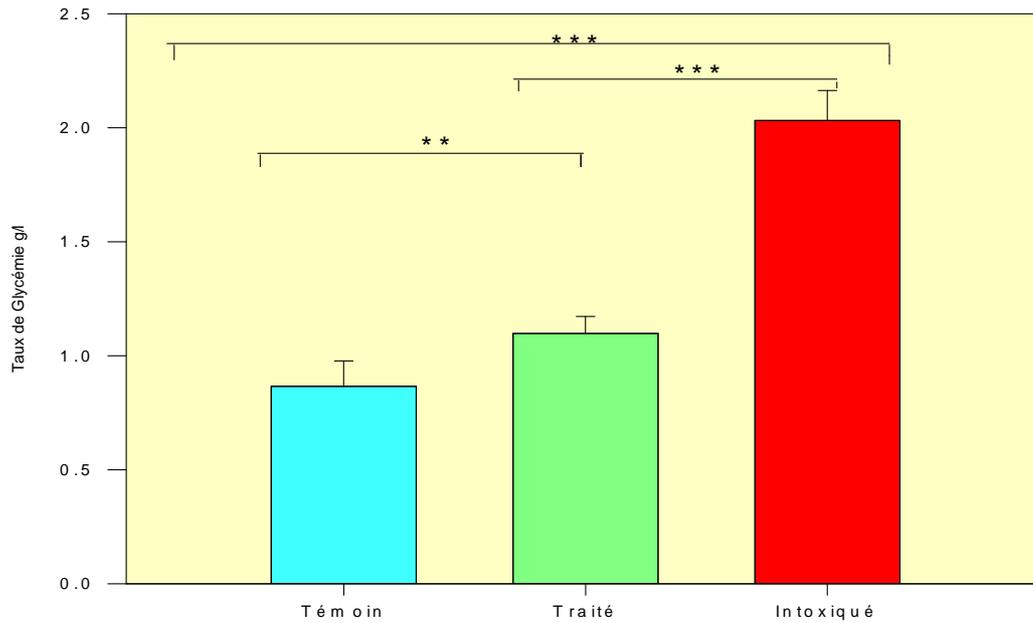


Figure 9: Comparaison du taux de glycémie entre rats témoins, rats traités par HEC et les rats intoxiqués par Pb-Mn.

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

5.2. Dosage de l'urée :

Les résultats (**Figure 15**) montrent une augmentation significative ($p < 0.001$) de l'urée sérique des rats intoxiqués à l'acétate de plomb et chlorure de manganèse par apport aux rats témoins. D'autre part on observe que taux de l'urée sanguin est diminué chez les rats traités par l'HE de *S. aromaticum* comparant aux rats intoxiqués. Ce qui suggère que l'HE utilisée parvient à réparer les tissus rénaux endommagés.

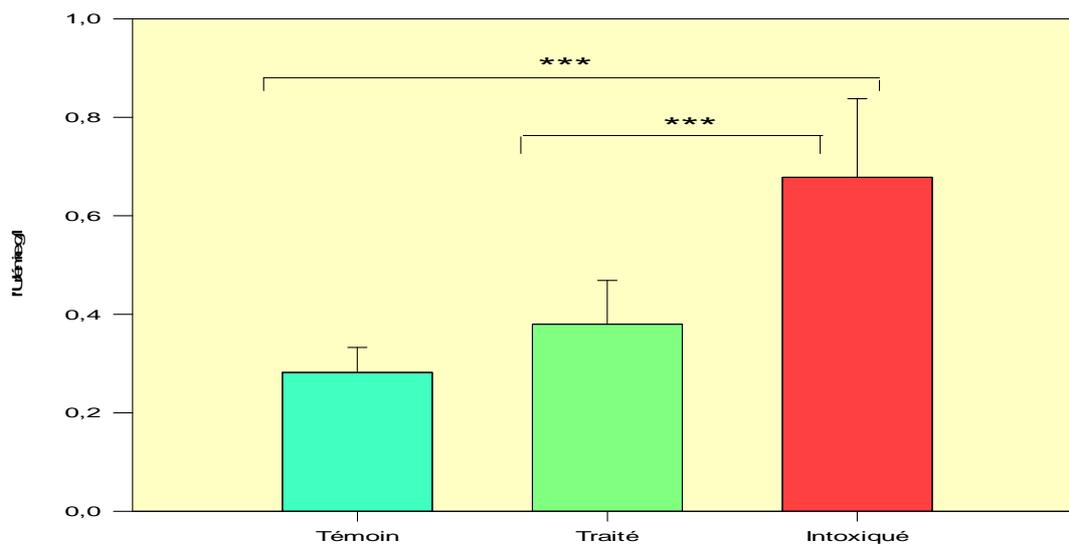


Figure 10 : Comparaison entre le taux de l'urée sérique chez les différents lots témoins, traités par HE de *S. aromaticum* et intoxiqués par Pb - Mn.

Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) $p < 0.001$

5.3. Dosage de créatinine :

On relève ici une augmentation significative ($p < 0,001$) des taux de créatinémie dans le lot de rats intoxiqués en comparant aux rats témoins. Tandis que le taux de créatinine sanguin est diminuée chez les rats traités par l'HE de *S. aromaticum* par rapport à celle des rats intoxiqués. Ce qui traduit sans doute un effet positif de l'HE de *S. aromaticum* sur les reins des rats du deuxième lot (Figure 16).

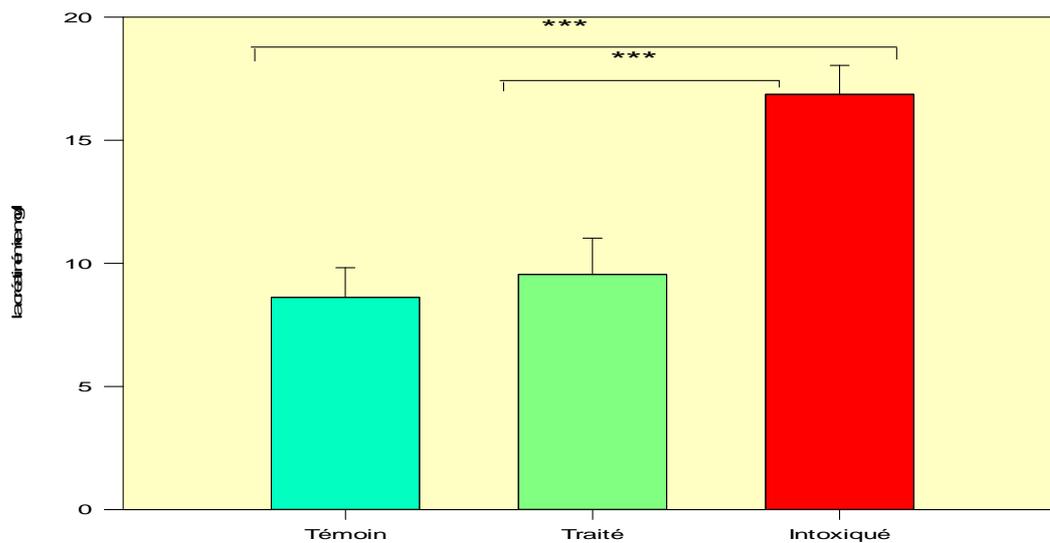


Figure 11 : Comparaison du taux de créatinine entre rats témoins, rats traités par HEC et les rats intoxiqués par Pb-Mn. (Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) : $p < 0,001$)

5.4. Dosage des Transaminases (TGO/ TGP)

Les résultats (Figure 17) montrent une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de TGO/TGP chez les rats intoxiqués par co-exposition de plomb et manganèse par rapport à celle des rats témoins. D'autre part on observe une diminution aux taux de TGO/TGP chez les rats traités en comparant avec les rats intoxiqués.

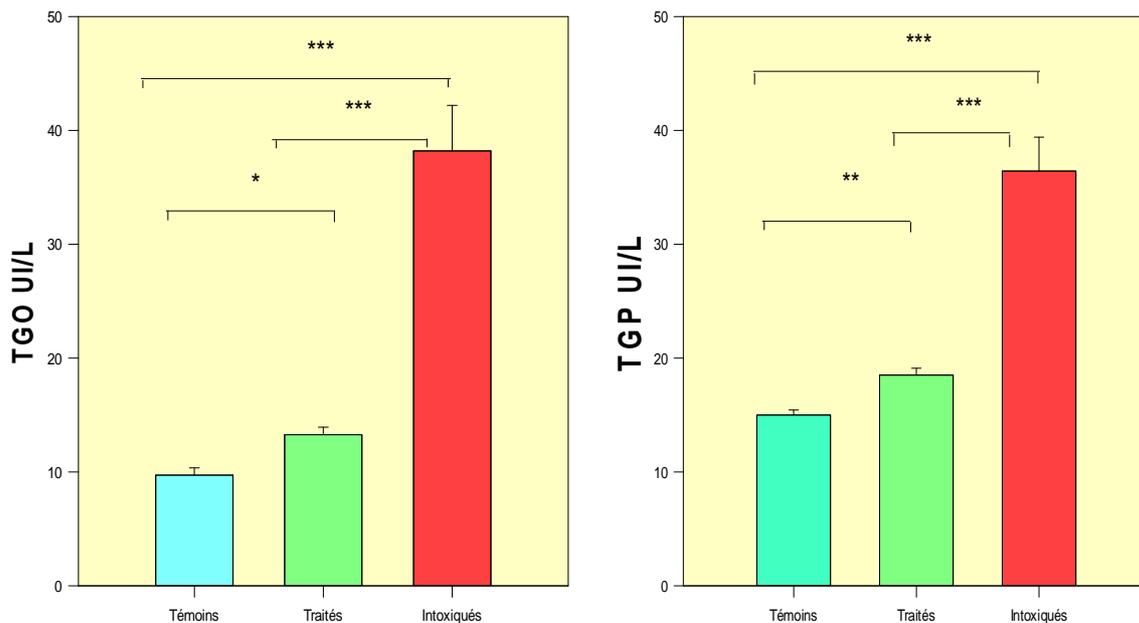


Figure 12: Comparaison du taux de TGO/TGP sanguin entre rats témoins, rats traités par HEC de et les rats intoxiqués par la co-exposition au Pb-Mn. (Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) : $p < 0.001$)

5.5. Dosage de cholestérol sérique :

Le graphique révèle une augmentation significative ($p < 0,001$) des taux de cholestérol sanguin chez les animaux intoxiqués par rapport à celle de lot témoin. Tandis que le taux sérique de cholestérol est diminué dans le lot traité en comparant aux rats intoxiqués (**Figure 18**).

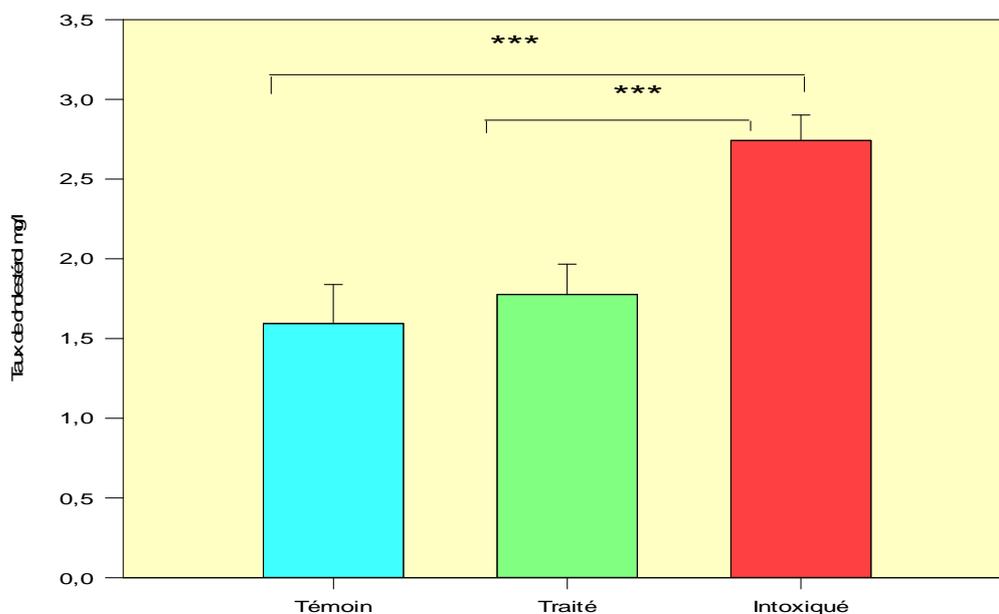


Figure 13: Comparaison du taux de cholestérol sanguin entre les rats témoins, traités par HEC et les rats intoxiqués par Pb-Mn. (Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) : $p < 0.001$)

5.6. Dosage des triglycérides :

Les résultats (**Figure 19**) trouvés montrent une augmentation significative ($p < 0.001$) des taux de triglycérides sérique dans le lot qui regroupe les rats intoxiqués à l'acétate de plomb et chlorure de manganèse par rapport à celle des rats témoins. Tandis que le taux de triglycéride sanguin est diminué dans le lot traité en comparant à des rats intoxiqués.

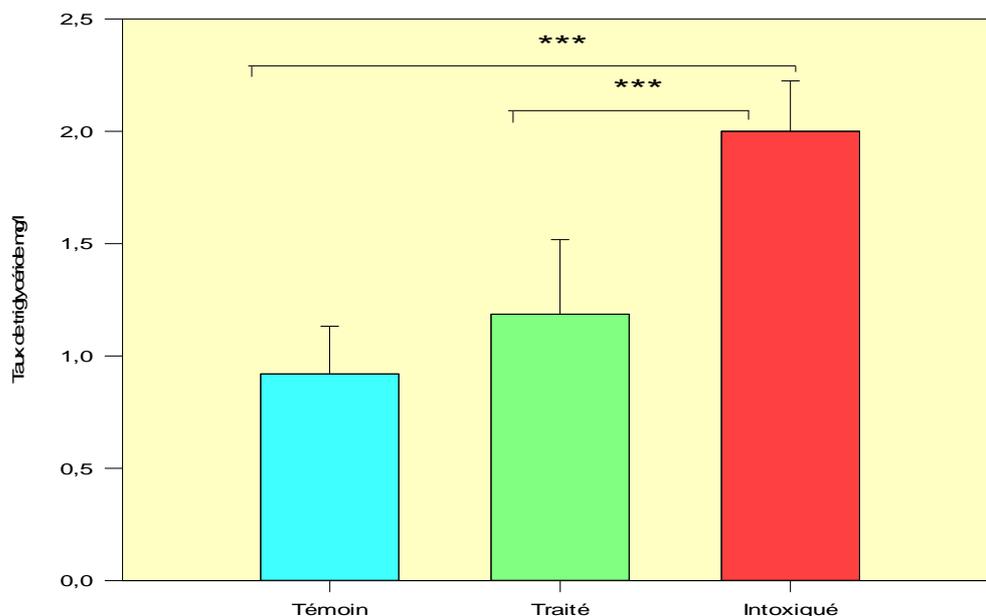


Figure 14 : Comparaison du taux de triglycéride entre rats témoins, rats témoins, traités par HEC et les rats intoxiqués par la co-exposition au Pb-Mn. (Les valeurs sont exprimées au moyenne \pm SEM. (***) : $p < 0.001$)

6. Evaluation du pouvoir antioxydant de l'HE de *S. aromaticum* in vivo :

Afin d'évaluer l'effet antioxydant l'HE de clou de girofle «*Syzygium aromaticum*» suite à un stress oxydant induit chimiquement par la co-exposition de Pb et Mn au niveau érythrocytaire, tissulaire (foie et rein), nous avons mesuré l'activité de la CAT, GSH, GPx et SOD qui sont des molécules dotées d'un pouvoir antioxydant important.

6.1. Au niveau érythrocytaire :

6.1.1. L'activité de la CAT :

Les résultats de l'activité de la catalase érythrocytaire (**Figure 20**) montrent que cette enzyme est surexprimée chez les rats intoxiqués par la co-exposition de Pb et Mn par rapport aux rats témoins. Toutefois, l'administration de l'HE de *S. aromaticum* chez les rats intoxiqués a réduit significativement ($p < 0.01$) l'activité enzymatique de la CAT par rapport aux rats intoxiqués non traités au HE utilisé.

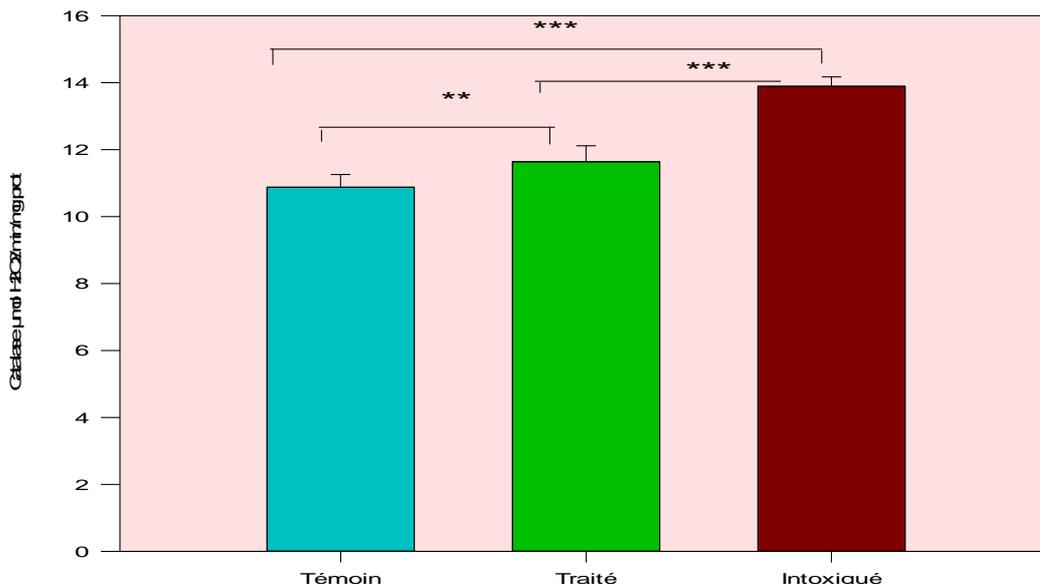


Figure 15: Comparaison de l’effet de HEC sur l’activité enzymatique de CATérythrocytaire par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (**P = <0.001).

6.1.2. L’activité du GPx :

Le Glutathion peroxydase qui constitue l’un des plus importants systèmes enzymatiques de protection qui assurent la détoxification du peroxyde d’hydrogène dans les conditions physiologiques normales. Les résultats obtenus relatifs à son action indiquent qu’il s’agissait d’une augmentation significative (p<0.001) de l’activité enzymatique du GPx chez les rats exposés à la co-exposition de Pb - Mn comparés aux rats témoins. Cependant, les tests statistiques présentent une baisse significative de l’activité enzymatique du GPx chez les rats traités au HE étudié comparés aux rats intoxiqués (**Figure 21**).

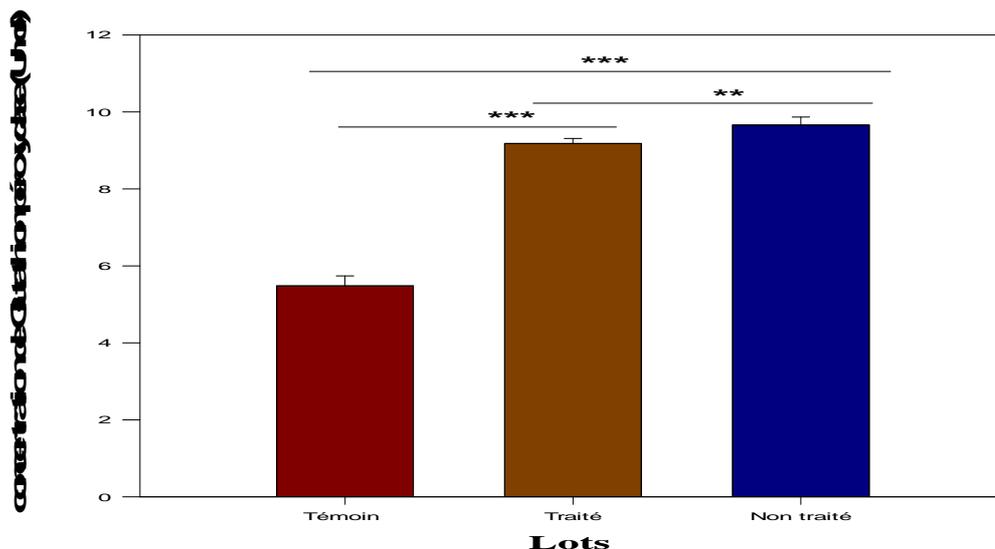


Figure 16: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de GP_xérythrocytaire par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (**P = <0.001).

6.1.3. L'activité du GSH :

Selon les résultats relatifs à l'activité érythrocytaire du GSH (**Figure 22**), nous avons remarqué qu'il s'agit d'une augmentation significative (p<0.001) de la teneur en glutathion réduit chez le lot représentatif des rats intoxiqués au Pb - Mn par rapport des rats témoins, et d'une diminution significative de GSH chez le lot traités par l'HE de *S. aromaticum* de cette activité par rapport les rats intoxiqués au Pb+Mn.

Figure 17: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de GSHérythrocytaire par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (**P = <0.001).

6.1.4. L'activité de la SOD :

Les superoxydes dismutases (SOD) sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Les résultats associés (**Figure 23**) montrent une diminution significative de la SOD chez les rats intoxiqués à l'acétate de plomb et manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins et rats traités.

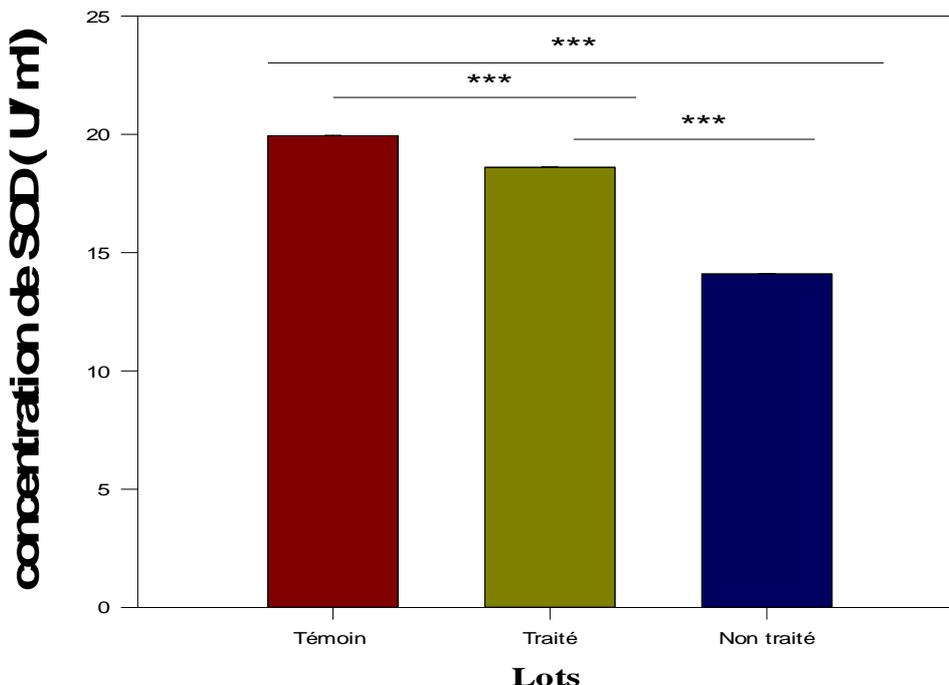


Figure 18: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de SODérythrocytaire par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (***)P = <0.001).

6.2. Activité des enzymes du statut oxydants au niveau hépatique et rénale :

6.2.1. Au niveau du foie :

6.2.1.1. CAT :

Selon les résultats relatifs à l'activité de foie du catalase (**Figure 24**), nous avons remarqué qu'il s'agit augmentation significative (P = <0.001) de cette activité chez les rats intoxiqués par rapport au lot témoin et au lot intoxiqué. Tandis qu'une diminution est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HEC chez le lot traité suite à une intoxication.

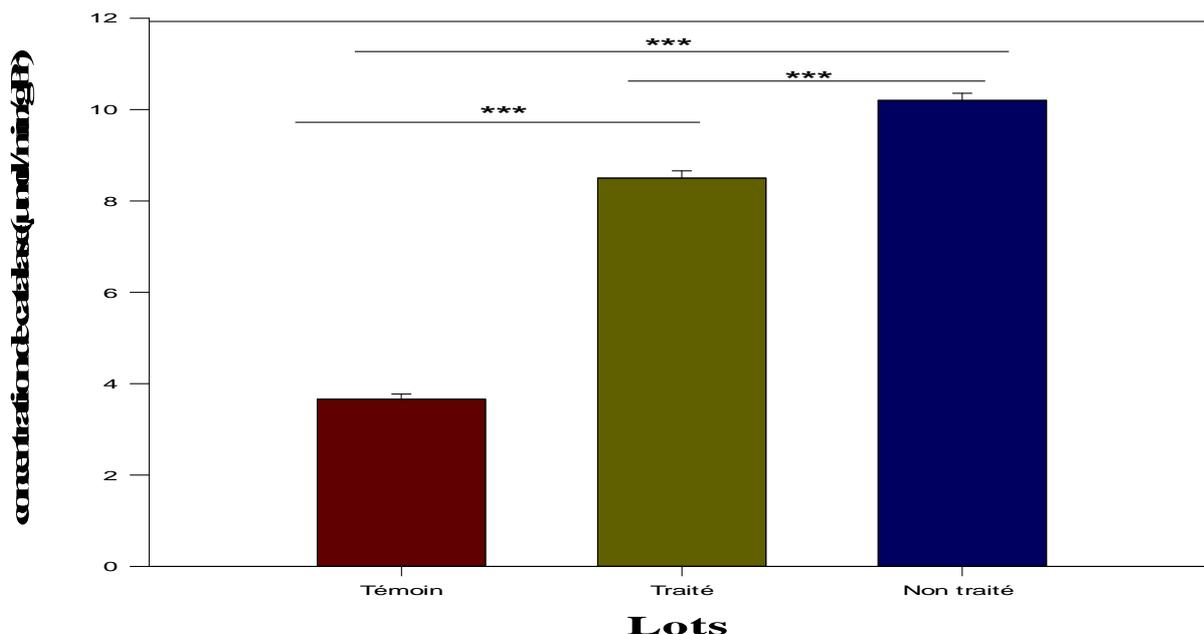


Figure 19: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de Catalase de foie par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (***) $P = <0.001$.

6.2.1.2. L'activité du GPx :

Les résultats associés (Figure 25) montrent une augmentation surexpression significative de la glutathion peroxydase de foie chez les rats exposés au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Tandis qu'une réduction significative est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HE chez le lot traité suite à une intoxication.

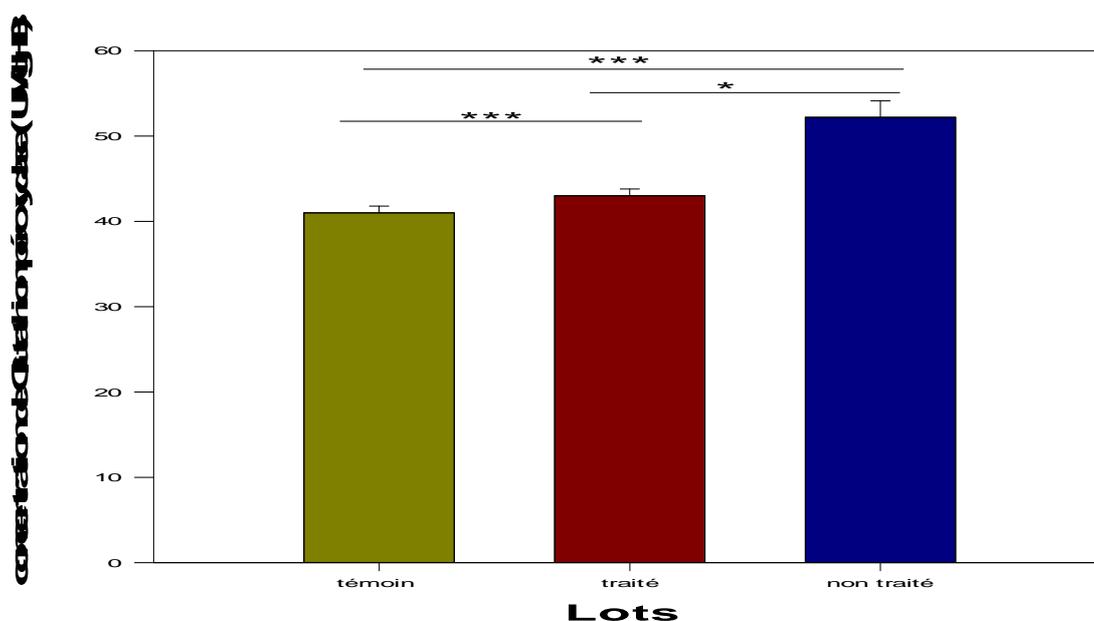


Figure 20: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase de foie chez par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb- Mn) (***) $P = <0.001$

6.2.1.3.L'activité du GSH:

Les résultats adjoints (**Figure 26**) montrent une diminution significative de la glutathion réduit au niveau de foie chez les rats exposés au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Tandis qu'un accroissement significative est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HE chez le lot traité suite à une intoxication.

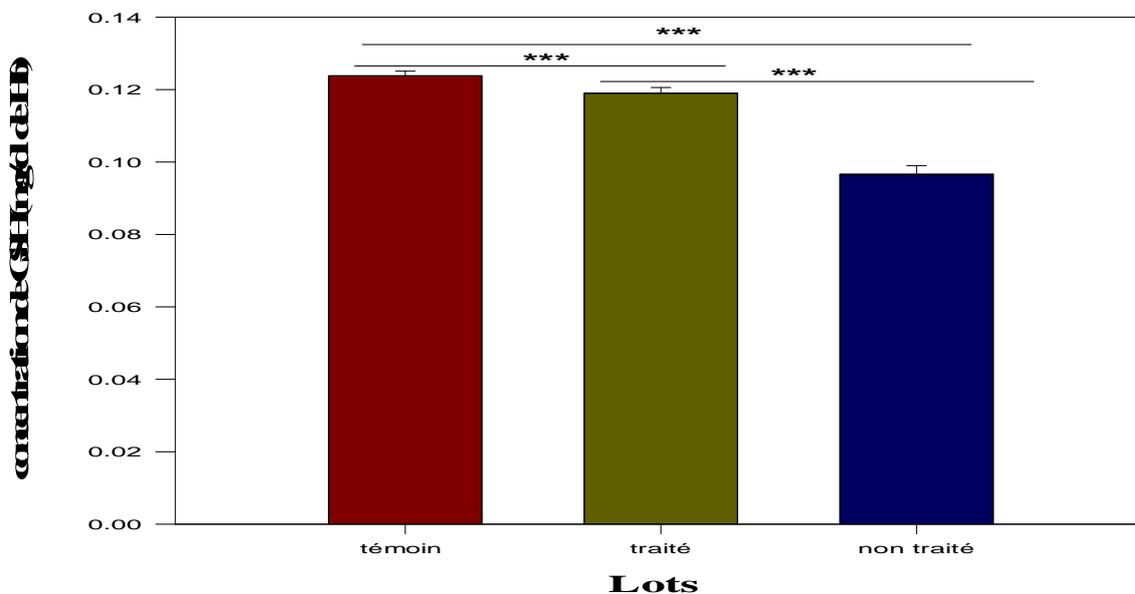


Figure 21: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit de foie par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb-Mn) ($P = <0.001$).

6.2.1.4.L'activité du SOD:

Selon les résultats relative à l'activité de foie du SOD (**Figure 27**), nous avons remarqué qu'il s'agit d'une baisse significative (<0.001) d'activité de cette enzyme chez le lot représentatif des rats intoxiqué au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse et d'une augmentation (p) de cette activité chez les rats traité au HE de girofle.

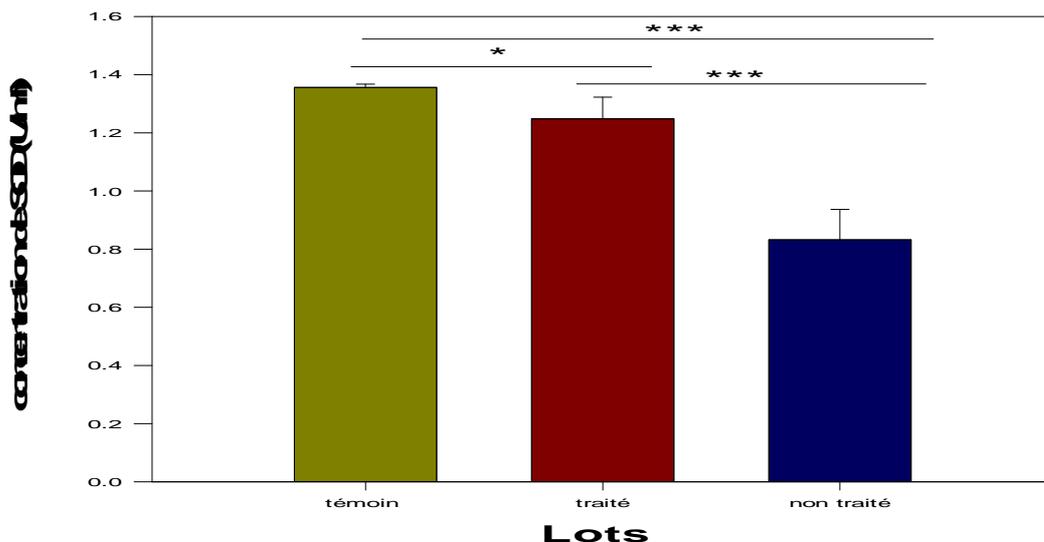


Figure 22: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de SOD de foie par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb-Mn) ($P = <0.001$).

6.2.2. Au niveau des reins :

6.2.2.1. Catalase :

Les résultats collaborateurs (Figure 28) montrent une augmentation surexpression significative decatalase desriens chez les rats exposés au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Tandis qu'une réduction significative est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HE chez le lot traité suite à une intoxication.

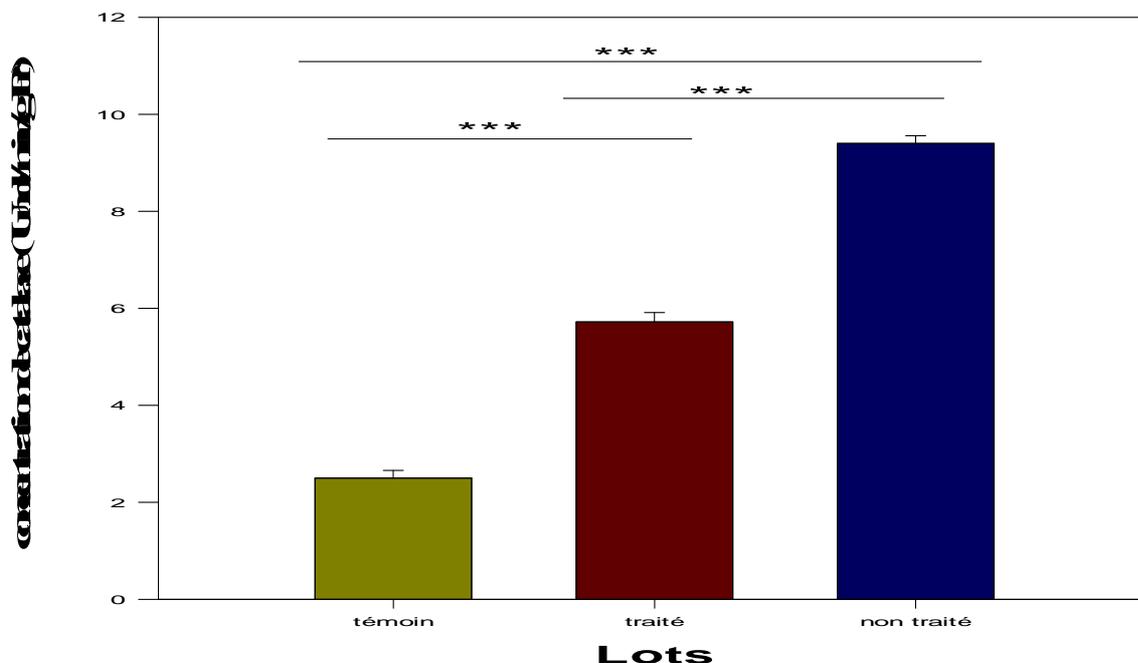


Figure 23: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de Catalase des reins par rapport aux rats témoins et intoxiqués par (Pb +Mn) ($P = <0.001$).

6.2.2.2.L'activité du GPx:

Les résultats illustrés dans la **Figure 29** montrent une augmentation significative de la glutathion peroxydase des reins chez les rats exposés au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Pendant qu'une réduction significative est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HE chez le lot traité suite à une intoxication.

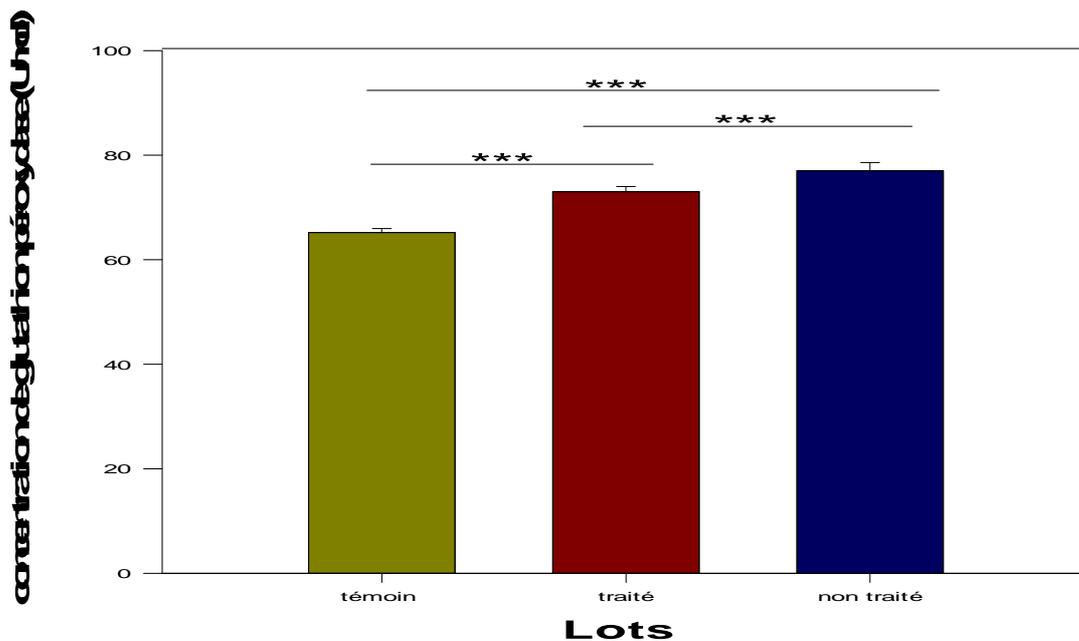


Figure 24: Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase des reins par rapport aux rats témoins et intoxiqués par Pb +Mn (***) ($P < 0.001$).

6.2.2.3.L'activité du GSH :

Les résultats associés (**Figure 30**) montrent une réduction de la glutathion réduit au niveau des reins chez les rats exposés au mélange d'Acétate de Plomb et Manganèse durant la période de développement par rapport aux rats témoins. Contrepartie qu'un accroissement significative est observée ($p \leq 0.001$) sous l'action de l'HEC chez le lot traité suite à une intoxication.

Figure 30 : Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit des reins par rapport aux rats témoins et intoxiqués par Pb +Mn (***P = <0.001).

6.2.2.4.L'activité du SOD :

Selon les résultats relative à l'activité des reins du SOD (**Figure 31**), nous avons remarqué qu'il s'agit d'une diminution significative (<0.001) d'activité de cette enzyme chez le lot représentatif des rats intoxiqué au l'Acétate de Plomb et Manganèse et d'une augmentation de cette activité chez les rats traité au HE de girofle suite à une intoxication.

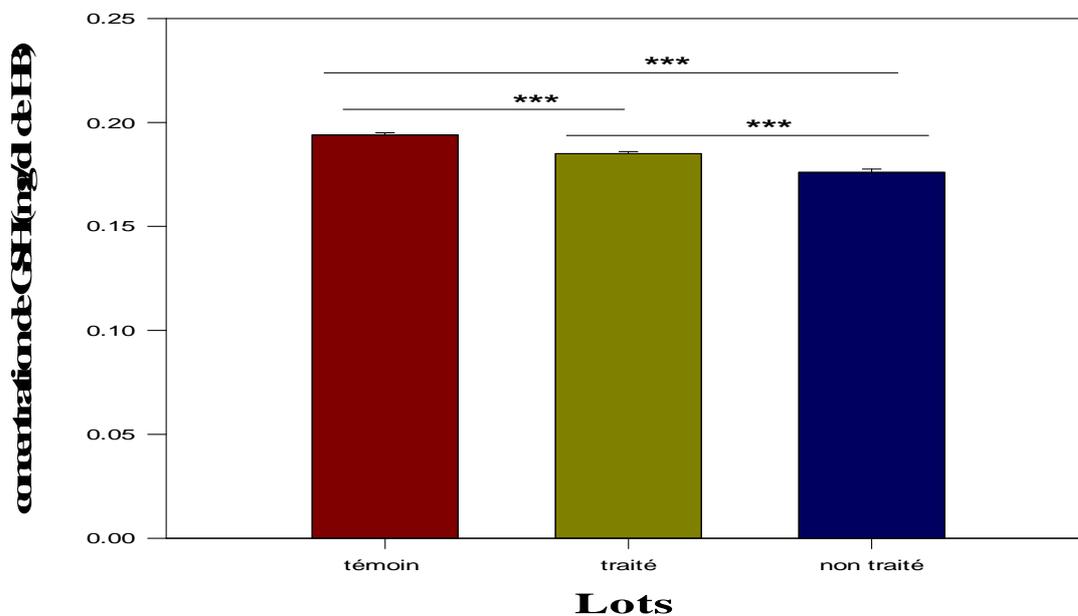


Figure 31 : Comparaison de l'effet de HEC sur l'activité enzymatique de la glutathion réduit des reins par rapport aux rats témoins et intoxiqués par Pb+ Mn (***P = <0.001)

DISCUSSION

L'exposition au plomb peut entraîner des effets nocifs sérieux sur la santé, et peut même être mortelle à de fortes doses. Le plomb peut s'accumuler dans le corps, et son exposition, même à de très faibles doses, peut s'avérer dangereuse (**Varet Jacques, 1999**).

Bien qu'était un élément essentiel, le manganèse est une substance ayant un effet toxique bien documenté chez l'homme à des niveaux d'exposition suffisamment élevés(**SC, 2010**).

Beaucoup d'épices et de plantes aromatiques en particulier les bourgeons de clou de girofle et leurs huiles essentielles ont été appelés à soutenir diverses activités biologiques telles que les propriétés antimicrobiennes et antioxydants (**Fu et al, 2007**).

La croissance pondérale et croissance des organes :

Les résultats obtenus après l'exposition au plomb et manganèse ont permis d'observer chez les jeunes rats une baisse significative dans le gain corporel par rapport aux témoins, on a également observé une baisse dans le poids des différents organes étudiés (foie, rein) ce qui traduit par une perturbation dans leurs fonctionnements respectifs.

Franciscato et al., (2009) suggèrent que le plomb aurait des conséquences sur la fonction de nutrition comme cela a été proposé pour la plupart des substances environnementales toxiques. L'inhibition du gain de poids corporel pourrait être due à l'induction par le plomb d'une déficience dans le métabolisme qui serait due à la présence de radicaux libres (**Merry, 2002**).

Il a été également démontré que l'intoxication par le Mn induit des changements considérables dans la prise alimentaire (food intake) selon la dose administré et la durée d'exposition au chlorure de manganèse (**Horváth et al., 2012**). Dans le même contexte, l'exposition chronique au manganèse peut provoquer des effets délétères sur la structure et le fonctionnement des organes, travaux entrepris par **Ajibade et al., (2011)**, qui indiquent une baisse significative des poids des organes de rats exposés à des concentration de 5, 15 à 25mg Mn/Kg par voie orale.

Toutefois, l'administration de l'huile essentielle de *S.aromaticum* à des rats préalablement exposés au plomb et manganèse a permis d'observer une nette augmentation dans le gain corporel en comparaison aux animaux exposés seulement au Pb et Mn et non traité par l'huile . Ce regain de poids enregistré pourrait être dû à la présence de composés terpénoïdes qui agissent en stimulant le transport du glucose dans les cellules. Vu que, les variations de sucre et de l'hormone d'insuline dans le sang sont liées à l'appétit, à la faim et à différents besoins en nourriture, particulièrement des besoins en hydrates de carbone. En contrôlant le taux de ces paramètres dans le sang, elle constitue donc un complément efficace pour corriger la perte de poids chez l'animal (**Judpentiene et Mockutė, 2004**).

Dosage de plombémie et Manganèse sanguin :

La plombémie, ou dosage du plomb dans le sang, est un bon indicateur du plomb biologiquement actif et est reflet de l'exposition du mois précédent (**Laperche et al., 2004**). Nos résultats montrent une augmentation significative du taux de plomb au niveau sanguin chez les rats intoxiqués pendant la gestation et la lactation par rapport aux rats témoins qui présentent une valeur de plombémie proche de 0. Tandis que les rats traités à l'extrait de la plante et qui sont préalablement intoxiqués montre une diminution significative de plombémie comparés aux rats intoxiqués. Les développements récents suggèrent que la période de gestation et de la lactation est une période sensible pour l'exposition à de faibles niveaux de Pb (**Lanphear et al., 2000; Rumbeiha et al., 2001**), Donc cet résultat peut être dû au passage de l'acétate de plomb à travers la barrière placentaire via le cordon ombilical au fœtus (**Pletscher et Liechti, 2007**), ou parexcrétion du plomb dans le lait pendant la période de la lactation (**Roquet-Noël, 2002**). Pendant ces périodes il y'a une mobilisation du plomb au niveau osseux, ce qui explique que l'essentiel du plomb sanguin des enfants allaités peut provenir du squelette de la mère (**Roquet-Noël, 2002**). Par ailleurs, Après son absorption, le plomb passe dans le sang où il se répartit dans les hématies sous forme non diffusible et dans le plasma sous une forme diffusible lui permettant d'aller se fixer dans les tissus ou d'être éliminé dans les urines. Alor le sang est le « carrefour » de tous les trajets du plomb dans l'organisme(**Haguenoer, 2009**).

De ce côté, L'exposition des rats femelles gestantes et lactantes à une dose de 4.79 mg/ ml de manganèse, permet d'enregistrer des proportions déférentes de manganèse sanguin chez les jeunes rats témoin, traités, intoxiqués. **ATSDR (2000)**, montre que dans les conditions normales le corps humain contient de petites quantités de Mn, Sur cette base on observe un taux de manganèse de l'ordre 17 ± 0.05 µg/l chez les jeunes rats témoin, En plus de cela on a observé une augmentation significative du taux de manganèse sanguin chez les rats intoxiqué, **Zlotkin et al., (1995); Dörner et al., (1989)**, ont confirmé que l'absorption et la rétention du manganèse ingéré sont très élevées chez les nourrissons et qu'elles sont supérieures aux niveaux normaux observés chez les adultes. De plus, il y'a une corrélation positive et significative a été découverte entre les concentrations de manganèse dans le placenta et le sang ombilical chez des mères et leurs nourrissons (**Takser et al., 2004a**). Donc Le manganèse sanguin a été considéré comme un indice de la « charge totale », correspondant davantage à des conditions d'exposition prolongée plutôt qu'immédiate (**SC, 2010**).

Le bilan biochimique :

Au niveau sanguin, nous avons entrepris une série d'expériences portant sur le dosage du plomb et manganèse, l'analyse des teneurs en glucose, urée, créatinine, TGO/TGP, cholestérol et triglycéride, L'analyse sur l'activité des enzymes antioxydant (CAT, SOD et GSH-Px).

Dosage de glycémie :

Les résultats indiquent une différence fortement significative ($p < 0,001$) du taux de glucose sanguin chez les rats subit à une intoxication par la co-exposition de Pb et Mn par rapport à celle des rats témoins. Ceci est peut être lié directement aux effets néfastes d'acétate de plomb sur le pancréas et plus exactement sur l'excrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (**Saka et al., 2011**).

On pourrait faire valoir que l'administration chronique de Mn au cours de la période de développement provoque un dysfonctionnement du métabolisme énergétique qui se manifeste par l'augmentation des niveaux de glucose dans le sang est probablement le résultat de la glycogénolyse hépatique et musculaire pour couvrir les besoins énergétiques du cerveau. Nos résultats montrent que l'effet du stress résultant en hyperglycémie est expliqué par l'action d'hormones de stress à savoir le facteur de libération de corticotropine, la corticotropine et cortisone dans l'hypothalamus, de l'hypophyse et la glande surrénale, respectivement, l'activation des enzymes du métabolisme du glucidique(**Kasdallah et al., 2005**).

D'autre part on observe que taux de glucose sanguin est diminué chez les rats traités par l'HE de *S. aromaticum* comparant aux rats intoxiqués. L'administration de l'huile essentielle de clou de girofle à des rats exposés au Pb et Mn entraîné une diminution de niveau de glucose dans le sang, il a montré que cette huile essentielle effectue une activité hypoglycémique, entre autres choses (**Prasad et al., 2005**).Il réprime l'expression de gènes de phosphore-énol pyruvate-carboxy-kinase (PEPCK) et le glucose 6- phosphatase (G6Pase), qui codent pour des enzymes contrôlent la gluconéogenèse hépatique.

Bilan rénal :

Les résultats montrent une augmentation significative du taux d'urée et créatinine sérique des rats intoxiqués au Pb-Mn par rapport aux rats témoins et rats traités.Ces résultats montrent bien que le Pb et le Mn agissent sur la filtration glomérulaire en provoquant des variabilités au niveau de la concentration de l'urée et la créatinine dans le sang(**Albahary et al., 1965 ; Ponnappakkam et al., 2003**).

Hammond et al (1980), Ont montré l'existence d'une relation étroite entre la concentration de plomb sanguin et le niveau de l'urée et de la créatinine. Lorsque la concentration de plomb sanguin approche de 60 µg/mL, ceci conduit à une augmentation sérique du taux d'urée et de la créatinine. Cette augmentation est consécutive de la dégradation des protéines totales.

Fowler (1991) a confirmé que l'insuffisance rénale chez des rats traités par l'acétate de plomb peut être interprétée par l'augmentation des concentrations de ces deux paramètres biochimiques d'exploration de la fonction rénale par rapport aux témoins.

Donc l'augmentation de ces paramètres sérique est due à l'effet direct du plomb sur le métabolisme de l'acide urique et des troubles morphologiques au niveau des néphrons (**Saka et al., 2011**). Ainsi que le Mn agit sur la filtration glomérulaire et le débit plasmatique rénal induisant une élévation du niveau de la concentration de l'urée et la créatinine dans le sang. Ceci est dû à l'effet antagoniste du manganèse sur les ions calcique (Ca^{+2}) durant les processus de filtration glomérulaire (**Dorman et al., 2006**).

Néanmoins les rats qui ont été traité par l'HEC ont montré un taux d'urée et créatinine significativement bas qui s'explique par les propriétés inhibitrices de l'eugénol de l'enzyme cyclo-oxygénase. Ce qui induit une diminution de la synthèse de prostaglandine de sa concurrence avec l'acide arachidonique (**Hamdard, 2014**). Donc L'HE de *S. aromaticum* répare les tissus rénaux endommagés.

Bilan hépatique (TGO – TGP) :

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de TGO/TGP chez les rats intoxiqués par la co-exposition du plomb et manganèse par rapport aux rats témoins. Ces transaminases sont des enzymes hépatocytaires (originaire du foie) dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide alphacétonique (**Guyader, 2005**).

Notez que le foie constitue une cible importante du plomb. Ce dernier possède une grande affinité pour les groupements thiols protéiques des membranes cellulaires hépatiques, ce qui conduit à des nécroses hépatiques et la sortie des aminotransférases dans le sérum (**Saka et al., 2011**). En outre, cette augmentation peut être signifier par l'effet du plomb qui induit une forte hépatotoxicité et provoque des changements dans la prolifération des cellules du foie, et de synthèse d'ADN indiquant une hyperplasie hépatique conduisant à une forte augmentation des transaminases (**Dini et al., 1999**).

Upadhyay et al., (2009) ont démontré que les rats nourris par des aliments contaminés par le plomb subissent un état de stress oxydatif lié à une élévation sérique des aminotransférases. Ce phénomène est dû à l'accumulation des acides aminés tels que l'alanine et l'acide glutamique résultant de la dégradation des protéines somatiques. Ces acides aminés se transforment sous l'action des aminotransférases en corps cétoniques puis en glucose (néoglucogénèse).

En conséquence l'élévation des aminotransférases sériques confirme le résultat précédent concernant l'hyperglycémie chez les rats traités par Pb-Mn. en effet plusieurs études ont rapporté que le Mn induit une altération histopathologique par une nécrose du foie et apoptose périportale (**Rahélié et al., 2006**) ce qui pourrait compromettre la fonction détoxifiante du foie à savoir éliminer le manganèse (**Zhang et al., 2002**).

Les travaux de **Fordahl et al., (2012)** quant à eux indiquent qu'une large exposition au Mn a un effet sur les métabolites hépatiques, en provoquant principalement des perturbation au niveau du métabolisme des lipides et ainsi la formation excessive de l'acide oléique, l'acide hydroxybutyrique et les corps cétoniques.

On a observé aussi une baisse significative des transaminases suite à l'administration de HE de *S. aromaticum* ce qui indique une action protectrice des tissus hépatiques qui pourrait s'expliquer par l'effet chélateur et donc antioxydant des composants phénoliques que contient l'HE, qui réduit considérablement les radicaux libre générés par l'intoxication qui provoque la mort cellulaire dans le tissu hépatique (**Ola El-Segaey et al., 2007**).

Rompelberg et al., (1993) indiquent que l'alkylbenzènes eugénol un des composés du clou de girofle est un bon régulateur des différents enzymes hépatique.

Bilan lipidique (cholestérol et triglycéride) :

Le foie participe à de nombreuses phases du métabolisme des lipides, l'estérification et l'élimination du cholestérol, seul le dosage du cholestérol libre et estérifié du sérum a été largement utilisé pour l'étude des affections hépatiques (**Awde, 2014**).

Nos résultats ont montré une augmentation significative des taux de cholestérol et triglycéride entre les rats intoxiqués (taux élevé) d'une part et celui des rats traité à l'HE de *S. aromaticum* et les rats témoins. Nos résultats sont similaire au travaux de **Hanan et al., (2012)** qui illustrent que l'association entre les taux de lipides sériques élevés et l'exposition au plomb est pourrait être due soit à la synthèse de l'augmentation ou la diminution de l'élimination des lipoprotéines. La diminution de l'élimination peut se produire à la suite de la modification des récepteurs de surface cellulaire pour une lipoprotéine (**Tarugi, et al., 1982**) ou à la suite de l'inhibition de l'activité de la

lipoprotéine lipase hépatique (**Chajet et al., 1980;Fordahl et al.,2012**) quant à eux indiquent qu'une large exposition au Mn a un effet sur les métabolites hépatiques, en provoquant principalement des perturbation au niveau du métabolisme des lipides et ainsi la formation excessive de l'acide oléique, l'acide hydroxybutyrique et les corps cétoniques.

Le traitement par l'HEC chez les rats intoxiqués présente une amélioration dans la valeur de cholestérol et les triglycérides, ces résultats sont similaires avec le travail de (**Anbu et Anuradha., 2012**), qui montre que l'eugénol pourrait être efficace pour la prévention aux effets toxiques qui provoque l'augmentation des taux de lipides induite par l'éthanol. De plus, l'eugénol présent un effet d'abaissement du taux de triglycéride.

L'effet de Pb-Mn sur le stress oxydant :

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

Nos résultats montrent que l'acétate de plomb et le manganèse on provoqué une diminution importante de la concentration de SOD et augmentation significative de la catalase, de la glutathion peroxydase et de glutathion réduit dans le sang des ratons intoxiqué par le Pb et Mn par rapport aux ratons témoins, et au niveau des organes étudiés (foie et rein), nos résultats arborent une diminution importante de la concentration de GSH, de SOD et une augmentation de la glutathion peroxydase (GP_X) et de catalase.

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

Nos résultats sont similaires au travaux d'**Adebayo et al., (2009)** qui rapportant que la catalase et le glutathion réduit augmenté de façon significative dans le sang chez les rats intoxiqué par le plomb. La diminution de l'activité de la SOD dans le sang chez les rats intoxiqués par le plomb peut être due à la diminution de la concentration de cuivre dans le sérum (**Farmand et al., 2005; Sujatha et al., 2011**).Les radicaux produisent une diminution de la fluidité de la membrane cellulaire, et une augmentation du taux d'hémolyse des érythrocytes, l'exposition au plomb réduisant

le niveau de sélénium dans le sang en formant un complexe sélénium-plomb hautement lié, qui est excrété par le corps (**Flora et al., 1982**).

Cette baisse de GSH peut être expliquée par sa participation dans les réactions de détoxification des ROS (La détoxification des métabolites toxiques se fait par le balayage du glutathion réduit (GSH). Cependant, les quantités élevées des métabolites toxiques conduisent à un épuisement de glutathion hépatique suite à l'augmentation des radicaux libres. Ces oxydants entraînent une nécrose au niveau des cellules hépatiques induisant l'augmentation de la concentration des aminotransférases (**Upadhyay et al., 2009**), Le plomb possède une grande affinité pour les groupements thiols protéiques des membranes cellulaires hépatiques, ce qui conduit à des nécroses hépatiques et la sortie des aminotransférases dans le sérum (**Gurer et Ercal, 2000**). L'augmentation sensible de l'activité enzymatique de la GPx après réception l'acétate de plomb peut être expliquée par la participation du glutathion réduit dans les réactions de réduction des peroxydes formés (**Zhu et al., 1994**). La baisse de la concentration de GSH est en concordance avec l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. L'augmentation de l'activité de cette enzyme (GPx) montre que les cellules du foie peuvent probablement contenir une forte concentration d'eau oxygénée et d'hydroperoxydes organiques (**Aouacheri et al., 2009**).

L'activité de la superoxyde dismutase SOD diminue significativement dans les tissus étudiés (foie et rein) chez les rats intoxiqués par rapport aux témoins qui pourrait être due à la production massive des anions superoxydes et à une déficience en cuivre comme cofacteur enzymatique (**Matés et al., 2000**). Le SOD joue un rôle très important dans le système antioxydant par la dismutation de l'anion superoxyde pour former H₂O₂ et O₂ (**Mylorie et al., 2001**).

L'augmentation de catalase tissulaire (foie et rein) chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins pourrait être due à l'effet du plomb sur les acteurs du système de défense cellulaire par accélération de l'activité de ce enzyme (**Alghazall et al., 2008 ; Annabi et al., 2007 ; Bondy et al., 1996 ; Costa et al., 1997**).

Effet de manganèse sur les enzymes de stress :

Plusieurs travaux suggèrent que l'exposition au Mn induit une variété de changements cellulaires due à une augmentation du stress oxydatif, et l'insuffisance des systèmes d'énergie métabolismes et antioxydantes (**Kitazawa et al., 2002; Roth et Garrick, 2003; Dobson et al., 2004; Hirata et al., 2004; Olanow, 2004**).

Des études récentes ont mis en évidence le lien entre stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondriale due à l'exposition à ce métal (Mn) (**Milatovic et al., 2007**).

En outre, il a été émis une hypothèse selon laquelle la toxicité par Mn est associée à un dysfonctionnement mitochondrial qui s'accumule préférentiellement dans la matrice mitochondriale (**Liccione et Maines, 1988 ; Brown et Taylor, 1999**), reflétant à sa forte affinité avec de calcium (**Gavin et al., 1999**).

Le stress oxydatif généré par de fortes concentrations de Mn conduit à l'induction de l'ouverture des pores et de la perméabilité mitochondriale de ces derniers, dépendant de Ca^{+2} , ce qui entraîne une augmentation de la solubilité aux protons, ions et solutés, la perte potentielle de la membrane mitochondriale interne, dépréciation des actions de phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP et le gonflement mitochondrial (**Gavin et al., 1990; Yin et al, 2008a; Zoratti et Szabo, 1995**).

Plusieurs observations ont démontré que le niveau de GSH intracellulaire dépend la toxicité par Mn, que la déficience de la fonction mitochondriale est un mécanisme clé pour la toxicité par Mn (**Desole et al., 1997; Stredrick et al., 2004; Dukhande et al., 2006**). Par exemple, Mn^{+2} peut se substituer à Fe^{+2} dans les cytochromes de la chaîne respiratoire cellulaire (avec structure semblable à l'hémoglobine) (**Missy et al., 2000**), conduisant à la réduction incomplète de O_2 et de la formation de la libre des radicaux et des composés oxygénés tels que O_2 et H_2O_2 .

Il a été démontré que le Mn inhibe directement les enzymes de la ETC (Electron Transport Chain) mitochondrial (**Husain et al., 1976; Singh et al., 1979**). Il pourrait être prévu que cette inhibition peut également améliorer le taux de production de radicaux. L'augmentation de la production de radicaux serait encore aggravée par la réduction GPx et les activités de SOD (**Liccione et Maines, 1988**).

Thérapie par l'huile essentielle :

Eugénol, un antioxydant d'origine naturelle qui peut piéger le radical libre produit par l'éthanol, ce qui pourrait être la raison de produit peroxydation lipidique diminué chez les rats traités avec l'eugénol. Il a été rapporté que de l'éthanol affecte le système antioxydant des tissus en proportion de la quantité d'éthanol ingestion (**Scott, 2000**).

Nos résultats ont démontré que le traitement par l'huile essentielle de clou de girofle corrige les altérations enzymatiques induit par l'intoxication du Pb + Mn, selon **Saxena et Flora, 2004** l'eugénol compris parmi les antioxydants phénoliques, qui inhibe la peroxydation des lipides en agissant comme chaîne rupture antioxydant, ainsi que l'amélioration les activités des enzymes antioxydants. Eugénol possède propriété antioxydant caractérisé par son groupe hydroxyle

Discussion

phénolique dans sa structure qui donne des électrons à éteindre les radicaux libres. Elle empêche également l'oxydation de Fe^{+2} par H_2O_2 dans la réaction de Fenton(**Saxena et Flora, 2004**).

Eugénol, un agent hautement libre de piégeur de radicaux, offre une protection contre l'insuffisance rénale aiguë, en agissant comme un inhibiteur antioxydant de la chaîne rupture de la peroxydation lipidique, l'amélioration de l'activité enzymatique antioxydant, en préservant les niveaux de glutathion intracellulaire et la réduction de l'hypoxie tissulaire(**Scott, 2000**).

En fin, eugénol empêche l'épuisement des taux de GSH ainsi que les activités de la SOD et CAT, normalisée l'activité de SOD, empêchant ainsi l'accumulation de H_2O_2 et réduisant ainsi la production cytotoxique(**Scott, 2000**).

Conclusion

Conclusion

Un large soutien des études expérimentales et épidémiologiques l'implication du stress oxydant entraîne plusieurs maladies.

Les descriptions cliniques se limitaient aux symptômes classiques, rencontrés en pathologie professionnelle ou dans les intoxications graves d'origine alimentaire due au plomb (encéphalopathie et paralysie pseudo radiale, coliques de plomb, insuffisance rénale et goutte, anémie réfractaire).

En plus, les différents travaux entrepris chez l'animale et l'homme ont permis de démontrer que le manganèse à forte dose induisait des effets délétères sur les différents compartiments de l'organisme.

Notre travail a porté sur l'impact de l'intoxication chronique au Pb-Mn et leur pouvoir toxique. En employant plusieurs accès ; biochimiques, dosage des enzymes de stress au niveau érythrocytaire et tissulaires (foie et rein), ainsi qu'a testé l'efficacité de l'administration de l'huile essentielle de *S.aromaticum* à rétablir ou non les dommages causés par ces métaux.

Les résultats montrent que l'administration de l'acétate de Pb à une dose de 2.84 mg/ml et 4.79 mg/ml de manganèse, durant la période gestation et la lactation chez les rats entraîne une diminution très significative du poids corporel, et poids des organes étudiés (foie et le rein), Tandis qu'au niveau sanguin, nos résultats montrent que l'exposition chronique au plomb et manganèse entraîne des anomalies métaboliques (hyper-glycémie, hyper-urémie, hyper-créatinémie, et l'augmentation des transaminases....) et des anomalies enzymatiques (augmentation de catalase , glutathion peroxydase , la diminution de l'activité de glutathion réduit et SOD aux tissus étudiés) chez les rats Wistar.

Par ailleurs, on a remarqué que ces différentes perturbations causées par ces métaux sont corrigées par l'administration de l'huile essentielle de *S.aromaticum*. Ce qui est traduit par son pouvoir régulateur des différents métabolismes, à ses propriétés anti-inflammatoires, à son pouvoir antioxydant contre l'attaque radicalaire et à la diminution de la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines au niveau hépatique et rénale.

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

- Elargissement de la période du traitement par l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* pour une plus grande efficacité dans les tissus qui nécessitent une période de convalescence plus longue « exemple tissus hématopoïétique ».

Conclusion

- Il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expérimentations portant sur la définition des rôles de chaque constituant de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, à rétablir les dommages induits par ces métaux.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **ACGIH, 2001.** Manganese and Inorganic Compounds, Documentation of TLV's. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH.
- **Achour, S, Iken, I et Amarti, A. 2014.** L'intoxication au plomb : caractéristiques toxicologiques et clinico-biologiques. [éd.] S Dr Benchekroun. Toxicologie Maroc. 2014, 21, pp. 9-12.
- **Adebayo, O.L., B.O. Adegbesan and G.A. Adenuga, 2009.** Comparison of the effects of low protein diet versus chemical neurotoxins on brain weight, brain lipid per oxidation and antioxidant status of rats. Asian Journal of Biological Sciences, 2(1): 7-13.
- **Adriano, D. C. 2001.** Manganese. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2nd Ed. Springer Verlag.
- **Ajibade A. J., P. B. Fakunle, O. O. Fatoba and O. T. Olayemi,** "Some Effects of Manganese Dichloride Administration on the Body Weight, Purkinje Cell Population, Brain, and Cerebellar Weights of Adult Wistar Rats," Journal of Neuroscience and Behavioral Health, Vol. 3, No. 7, 2011, pp. 87-90.
- **Albahary C., Richet G., Guillaume J. and Morel Maroger L. (1965)** - Le rein et le saturnisme professionnel. Arch Mal Prof, 26, 5.
- **Al-dhaher Z.A., 2008.** The Antibacterial Activity of Aqueous Extract of Cinnamon and Clove Against Staphylococcus aureus, Journal of Al-Nahrain University, 11, 131-135.
- **Alexandru L., Cravotto G., Giordana L., Binello A., Chemat F. ,2013.** Ultrasound-Assisted Extraction of Clove Buds Using Batch- and Flow-Reactors: A Comparative Study on a Pilot Scale, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 20, 167-172.
- **Alghazal, M.A., I. Sutiakova, N. Kovalkovicova, Legath, M. Ji Falis, Pistt, Ji Sabo, K. Ri Benova, Sabova, Li and P. Vaczi, 2008.** The induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate. Journal toxicology and industrial health, 24(9): 587-593.
- **Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(1996)** Lead. Casarett and Doull's Toxicology. New York, McGrawhill. 5th Ed.
- **Anbu S and anuradha :** protective effect of eugenol against alcohol-induced biochemical changes in rats international journal of research in biotechnology and biochemistry 2012. and lactation. Environ Health Perspect, 91, 63-70.

Références bibliographiques

- **Annabi Berrahal Alya, Afef Nehdi, Naoufel Hajjaji, Najoua Gharbi, Saloua El-Fazâa.** Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead , Laboratoire de la physiologie des agressions, effets métaboliques et endocriniens,département de biologie, faculté des sciences de Tunis, université El-Manar, 1060 Tunis, Tunisia Received 10 April 2007; accepted after revision 25 May 2007.
- **Aouacheri W, Saka S, Djafer R, Lefranc G.** Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez les rats. *Ann Biol Clin.* **2009**; 67(6): 619–627.
- **AOUADHI Samia /** Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Faculté de médecine de Tunis - Master spécialisé en toxicologie **2010**.
- **aromaticum Against Mosquitoes, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4, 30-34.**
- **Ardestani, A., Yazdanparast, R.** (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 104: 21-29.
- **Arnich N, Cunat L, Lanhers MC et Burnel D.**2004 comparative in situ study of the intestinal absorption of aluminium manganese, nickel and lead in rats. *Biol Trace Elem Res* 99, no, 1-3:157-71.
- **Atawodi S.E.** Antioxidant potential of African plants.*African J. of Biotec.* 2005, Vol.4 (2); pp 128-133.
- **ATSDR, 2000.** Toxicological Profile For Manganese (updated). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services. PB2000108025, September.
- **Auberval Nathalie, 2011.** Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Université de strasbourg. Ecole Doctorales des sciences de la vie et de la santé.2010.
- **AUZIAS DOMINIQUE., LABOURDETTE JEAN-PAUL., LAFONT ELODIE et METENIER ETIENNE.**2008- Petit futé. Tanzanie, Zanzibar. 4^{ème} éditions, p270.
- **Awde. S. 2014.** Thèse de doctorat de l'université de Toulouse : Relation entre protéolyse hépatique et qualités technologiques et sensorielles du foie gras de canard. 202 pages.
- **Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK.** Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* **1999**;77:658-65.
- **Banerjee S., Kr.Panda C., Das S., 2006.**Clove (*Syzygium aromaticum* L.), A Potential Chemopreventive Agent for Lung Cancer, *Carcinogenesis*, 27, 1645-1654.

Références bibliographiques

- **Barceloux DG.** Manganese. Clin Toxicol **1999** ; 37 : 293-307.
- **Barthelemy C., Prost G., Tolot F. and Neulat G. (1975)** - A propos d'un cas de pancréatite au cours d'une crise de colique de plomb. *Arch Mal Prof*, 36, 357-360.
- **Benayad N.**, 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
- **Benzeggouta Naïrouz, 2014/ 2015.** Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux De Plantes Médicinales Seules et Combinées. Université Mentouri-Constantine, Faculté des Sciences Exactes, Département de Chimie
- **Bernadet M.**, 2000. Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Ed. Dangles. In Benzeggouta N., 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, 110p.
- **Berset C et Cervelier ME., 1996.** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. Sciences des aliments, 16, 219-245.
- **Betty Bossi. 2001.** GUIDE SANTE Remèdes de grand-mère.
- **BGJF, 2000** .Séminaires de Phytothérapie Moderne, Association Haïti-Cosmos novembre
- **Biotox.** Manganèse et composés. Manganèse sanguine et Manganèse urinaire. Mise à jour mai **2005.** Disponible sur : http://www.inrs.fr/htm/manganese_sanguin.html.
- **Bisson M.** fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Manganèse et ses dérivés. Ineris. 25 Avril **2007**.
- **BISSON. M; J. BUREAU ; N. HOUEIX ; B. JOLIBOIS ; G. GAY ; J.P. LEFEVRE ; K. TACK, 2012.** manganèse et ses dérivés, I N E R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, DRC-11-117259-10310B Version N°-2.3 juillet 2012.
- **Bonnard N, Falcy M, Hesbert A, Jargot D, Pilliere F, Schneider O, Serre P(2006)** Plomb et composés minéraux fiche toxicologique INRS.
- **BONNEFONT-ROUSSELOT, D., THEROND, P., DELATTRE, J., 2003.** Radicaux libres et anti-oxydants. In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires : 59-81. Médecine-sciences Flammarion Paris, 2003.
- **Boubrit S, Boussad N, 2007.** Détermination "in vitro" du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clou de girofle et sarriette, et leurs application à la conservation

Références bibliographiques

de la viande hachée. Ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses. Université de Mouloud Mammeri de Tizi –ouzou.

- **Bress WC and Bidanset JH (1991)** Percutaneous in vivo and in vitro absorption of lead. *Vet Hum Toxicol* 33(3) 212-214.
- **BRGM. (2004)**. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport final, BRGM/RP-52881-FR.
- **Brian, M.L.** The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), 1995, 57-148.
- **Brown, S., Taylor, N.L., 1999**. Could mitochondrial dysfunction play a role in manganese toxicity? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7, 49–57.
- **Bruneton J. (1993)**. Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} éd. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France. 915p.
- **Bruneton J., 1999**. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3^{ème} édition, Paris.
- **Bssaibis, F., Gmir, N., et Meziane M. (2009)**. Activité antibactérienne de *Dittrichiaviscosa* (L.) W, Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 3(1), 44- 55.
- **C.E.P.A (California Environmental Protection Agency). (1997)** Public health goal for lead in
- **Calvet C. (2012)** ; Quelques définitions pour mieux comprendre les Huiles Essentielles (HE).p 1/11
- **Cambar Jean, 2006**, Étude du potentiel chondroprotecteur d'éléments traces des eaux minérales et des dérivés thermaux (strontium et manganèse) sur culture de chondrocytes articulaires humains Laboratoire de biologie cellulaire, EA 3672, Université Victor-Ségalen Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux.
- **Chajet, S. T, Friedman, G.; Stein, O.; Shiloni, F.; Etienne, J. and Stein, Y. (1989)**: Mechanism of the hypertriglyceridemia induced by tumor necrosis factor administration to rats. *Biochim. Biophys. Acta*; 1001: 316 – 324.
- **Chemat F.** Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311 pages. ISBN : 978-81-905771-3-7, 2009.
- **Chin-Chang Huang, MD, 2007**. Parkinsonism Induced by Chronic Manganese Intoxication– An Experience in Taiwan, Correspondence to: Dr. Chin-Chang Huang, Department of Neurology, Chang Gung Memorial Hospital. 5, Fusing St., Gueishan Township, Taoyuan County 333, Taiwan (R.O.C.) Tel.: 886-3-3281200 ext. 8413; Fax: 886-3-3287226; E-mail: cch0537@adm.cgmh.org.tw.

Références bibliographiques

- **Clarke S.**, 2008. Chemistry of essential oil. 1st edition ELSEVIER. British, 302p.
- **Claude Ostiguy; Sylvain Malo ; Paul Asselin.mai ,2003.** Etudes et recherches : synthèse des connaissances scientifiques sur les risques d'atteinte à la santé suite a une exposition professionnelle au manganèse. IRSST - Direction des communications 505, boul. De Maisonneuve Ouest Montréal (Québec) H3A 3C2.
- **CLOTILDE MAZEROLLES, 2008.** Legiroflier.
- **Comite scientifique de l'agence federale pour la securite de la chaine alimentaire. 2011.** Réévaluation des risques liés à l'exposition de la population belge au plomb
- **Cook, N.C., Samman, S., 1996.** Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J.Nutr Biochem*, 7(2): 66 76.
- **Corinne Amar, 2010.** Société française d'hydrologie et de climatologie médicales, 2010p121-122/138
- **Costa V, et al. (1997).** Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* 143 (Pt 5):1649-56
- **Critchfield J W et Keen CL.1992.** Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in humain plasma. *Metabolisme* 41, no 10: 1087-92.
- **CROUZET J 1 et RICHARD H 2.2009.** professeurs honoraires : 1- polytech montpellier- 2- agroparistech massy, université de Montpellier- France.
- **Das A, Jr, Hammad TA.** Efficacy of a combination of FCHG49 glucosamine hydrochloride, TRH122 low molecular weight sodium chondroitin sulfate and manganese ascorbate in the management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8:343–50. [PubMed]
- **Davidsson, L., A. Cederblad, B. Lonnerdal, et B. Sandstrom. 1991.** The effect of individual dietary components on manganese absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 54 , no. 6:1065–70.
- **Davis, C. D., L. Zech, et J. L. Greger. 1993.** Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses. *Proc Soc Exp Biol Med* 202, no. 1:103–8.
- **Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O., 2009.** Natural Products in Crop Protection, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034.
- **Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- **DEMANGEL ALICE, 2011.** Faisabilité de la mise en place d'une Indication Géographique sur le Clou de girofle à Madagascar, ISTOM , Ecole supérieure d'Agro-Développement International. Efficacies and Chemical Composition of Essential Oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium*

Références bibliographiques

- **Desmares C., Laurent A. & Delerme C., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.
- **Desole, M.S., Esposito, G., Migheli, R., Sircana, S., Delogu, M.R., Fresu, L., Miele, M., deNatale, G., Miele, E., 1997.** Glutathione deficiency potentiates Manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. *Pharmacol. Res.* 36 (4), 285–292.
- **DINI L, GIUDETTI AM, RUZITTU M, GNONI GV, ZARA V. (1999).** Citrate carrier and lipogenic enzyme activities in lead nitrate-induced proliferative and apoptotic phase in rat liver. *Biochem Mol Biol Int* 9; **47**: 607-14.
- **DIOUF A. (2001).** Pollution automobile et sante. SSATP mobilite urbaine. Comite d'orientation ACCRA.
- **Dobson, A.W., Erikson, K.M., Aschner, M., 2004.** Manganese neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012, 115–128.
- **Dorman, D C, M F Struve, R A James, M W Marshall, C U Parkinson, et B A Wong. 2001a.** Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicol-Appl-Pharmacol* 170, no. 2: 79–87.
- **Dorman, D. C. R. A. James M. W. Marshall C. U. Parkinson M. F. Struve et B. A. Wong. 2004c.** Pharmacokinetics of manganese sulfate in juvenile male rhesus monkeys following subchronic (13-week) inhalation exposure, CIIT Final Report 02005. US EPA docket OAR-2004-0074-0126.
- **Dorman, D. C., M. F. Struve, et B. A. Wong. 2002b.** Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake. *Neurotoxicology* 23, no. 2: 185–95.
- **Dorner, K., S. Dziadzka, A. Hohn, E. Sievers, H. D. Oldigs, G. Schulz-Lell, et J. Schaub. 1989.** Longitudinal manganese and copper balances in young infants and preterm infants fed on breast-milk and adapted cow's milk formulas. *BrJ Nutr* 61, no. 3: 559–72.
- **Dukhande, V.V., Malthankar-Phatak, G.H., Hugus, J.J., Daniels, C.K., Lai, J.C., 2006.** Manganese-induced neurotoxicity is differentially enhanced by glutathione depletion in astrocytoma and neuroblastoma cells. *Neurochem. Res.* 31, 1349–1357.

Références bibliographiques

- **Duval Laurent.** Les huiles essentielles _a l'o_cine. Pharmaceutical sciences. 2012. <dumas-00713158>
- **Eckel WP et Langley WD.1988.** a background- based ranking technique for assessment of elemental enrichment in soils at hazardous waste site. In : superfund 88: proceeding of the 9 th national conference. Washington, DC, 282-286.
- **EGK-Caisse de Santé. 2013.** Siège principal, Brislachstrasse 2, 4242 Laufon , Tél. 061 765 51 11 , Fax 061 765 51 12 , E-mail: info@egk.ch , www.egk.ch.
- **El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J. Mortensen, V., Phillip, D.M., Truscott, T.G. ,2004.** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch.Biochem. Biophys*, 430 (1): 37–48.
- **EMC-toxicologie Pathologie 2 (2005) 67-88.**
- **EPA, 1984a.** Health assessment document for manganese. Final draft. Cincinnati, OH: U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA-600/8-83-013F.
- **EPA, 1984b.** Health effects assessment for manganese (and compounds). Cincinnati, OH: U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA/540/1-86/057.
- **EPA, 1993.** Drinking water criteria document for manganese. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH.
- **EPA. 1983.** Human exposure to atmospheric concentrations of selected chemicals. Vol. II. Report to U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC, by Systems Applications, Incorporated, San Rafael, CA. NTIS No. PB83-265249.
- **Erikson, K.M., Aschner, M., 2003.** Manganese neurotoxicity and glutamate–GABA interaction. *Neurochem. Internat.* 43, 475 – 480.
- **Eriksson, H., J. Tedroff, K. A. Thuomas, S. M. Aquilonius, P. Hartvig, K. J. Fasth, P. Bjurling, B. Langstrom, K. G. Hedstrom, et E. Heilbronn. 1992b.** Manganese induced brain lesions in *Macaca fascicularis* as revealed by positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Arch Toxicol* 66, no. 6: 403–7.
- **Eriksson, H., P. G. Gillberg, S. M. Aquilonius, K. G. Hedstrom, et E. Heilbronn. 1992a.** Receptor alterations in manganese intoxicated monkeys. *Arch Toxicol* 66, no. 5: 359–64.
- **Farmand, F.; Ehdai, A.; Roberts, C. K. and Sindhu, R. K. (2005):** lead – induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and efunylate cyclase. *Environ. Res.*; 98: 33 – 39.

Références bibliographiques

- **Favier Alain**, 2003 Intert conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutique .l'actualité chimique p : 109-110/115
- **Fayemiwo K.A., Adeleke M.A., Okoro O.P., Awojide S.H., Awoniyi I.O. ,2014.** Larvicidal
- **Ferland-Legault C E. 2011.** Caracterisation d'un modele animal de douleur articulaire associee a l'arthrose du genou chez le rat Sprague-Dawley. These (Ph.D.) Universite de Montreal.p ; 85.
- **Finaud J, Lac G, Filaire E.** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. Sports med 2006b, Vol. 36 (4); pp 327-58.
- **Finley, J. W. 1999.** Manganese absorption and retention by youngwomen is associated with serum ferritin concentration.Am-J-Clin-Nutr 70, no. 1: 37–43.
- **Flora, S.J., V.K. Jain, J.R. Behari and S.K. Tandon, 1982.** Protective role of trace metals in leadintoxication. Toxicol. Lett., 13 P 52.
- **Florent, D.G. (2011).** Caracterisation de nouvelles molecules et variabilite chimique de trois plantes du continuum corse-sardaigne: Chamaemelum mixtum, Anthemis maritima et Eryngium maritimum. Thèse de doctorat en chimie. Universite de Corse- Pascal Paoli. France
- **Fontaine.E, D. Barnoud, C. Schwebel, X. Leverve , 2002** Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS p :412/420
- **Fordahl Steve, Paula Cooney,*Yunping Qiu, Guoxiang Xie, Wei Jia, and Keith M. Erikson/** Waterborne manganese exposure alters plasma, brain, and liver metabolites accompanied by changes in stereotypic behaviors. Neurotoxicol Teratol. 2012 January; 34(1): 27–36. Published online 2011 October 21. doi: 10.1016/j.ntt.2011.10.003
- **Fowler BA, Du Val G.** Effects of lead on the kidney: Roles of high-affinity lead binding proteins. Environ Health Perspect. 1991; 91: 77–80.
- **Franchomme, P.;** Pénoël, D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- **Francis AA et Forsyth C, 1995.** Toxicity summary for manganese. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, préparé pour le US Department of Energy, July 1995.
- **Franciscato C, Goulart FR, Lovatto NM, Duarte FA, Flores EM, Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME (2009).** ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 27:459-468.

Références bibliographiques

- **Fréjaville J.-P., Garnier R., Jaeger A.**, Flammarion Médecine-Sciences, 5ème édition, Paris, 2000.p 5/6, Les effets du plomb sur la santé.
- **FU Y. J., ZU Y. G., CHEN L. Y., SHI X. G., WANG Z., SUN, S., EFFERTH T., 2007.** Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, **21**: 989-994.
- **Garnéro J.**, 1996. Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques ; K 345-1, 39p.
- **Gavin, C.E., Gunter, K.K., Gunter, T.E., 1990.** Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria Relevance to manganese toxicity. *Biochem. J.* 266, 329–334.
- **Gavin, C.E., Gunter, K.K., Gunter, T.E., 1992.** Mn²⁺ sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992 (115),1–5.
- **Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V.** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* 2003, Vol. 5 (2): pp 5.
- **Gerhardsson L., Englyst V., Lundstrom N.G., Nordberg G., Sandberg S. and Steinvall F. (1995)** - Lead in tissues of deceased lead smelter workers. *J Trace Elem Med Biol*, 9, 3, 136-143.
- **Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. 2010.** *Syzygium Aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie* 8:37-43.
- **GNM- ST BTP, 2012.** Article sur Manganèse –Mn - Bioxyde de manganèse –MnO₂ ; 07/06/2012.
- **Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazawa K. (2008).** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* 45: 1318-1325.
- **Groupe scientifique sur l'eau. 2003.** Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. INSPQ Centre d'expertise et de référence en santé publique
- **Guba, R. (2001).** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential, *International Journal of Aromatherapy*, 11, 76-83.
- **Guide oligothérapie 3/11/06 ;** Édité par : PALAIS ROYAL 91, rue du Faubourg Saint-Honoré 75008 Paris, SIRET 450 275 656 00012, www.oligomed.com.

Références bibliographiques

- **Guillang J. C., M. Lhuissier, 1996.** *Vitamine E et activité sportive*. Cah. Nutr. Diet., 31 (1996)267-276.
- **Gülçin I., Elmastas M., Aboul-Enin H.Y., 2012.** Antioxidant Activity of Clove Oil – A
- **GUNNAR, F. NODBERG. BRUCE, A. NODBERG F, W. FRIBERG L.** Handbook on the toxicologie of metals. 3^{eme} edition. Academic Press, 25 juin 2007. 1024 p. ISBN: 978 0123694133.
- **Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S , Gllan JL et Hediger MA.1997.** cloning and characterization of a mammalian proton – coupled metal- ion transporter .Nature 388, no. 6641: 482-8.
- Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? Free Radical Biol Med. 2000; 29(10):927–945.
- **Guyader.D,** Sémiologie biologique hépatique, Septembre 2005.
- **Guynot M.E., Marin S., Seto L., Sanchis V., Ramos A.J., 2005.** Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products, Food Science and Technology International, 11, 25-32.
- **Haguenoer, J M. 2009.** DOCUMENT DE SYNTHÈSE : Les conséquences sanitaires de l'exposition aux dérivés du plomb. Pour un abaissement des seuils d'intervention en santé publique et en milieu professionnel. POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE. OCTOBRE-DÉCEMBRE 2009, 204, pp. 433-450.
- **Halder S, A K Mehta, R Kar, M Mustafa, P K Mediratta, K K Sharma (2011).** Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. *Planta Med* ; 77: 830–834
- **Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989).** Free radicals in biology and medicine. 2nd edition. Clarendon Press, Oxford. 543p.
- **Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1990.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.
- **HAMIR A N, N.D. SULLICAN, and P.D. HANDSON(1982).** The effects of age and diet on the absorption of lead from the gastrointestinal tract of dogs. *Aust Vet. J.* 58:266-268.
- **Hammond PB, Lerner SI, Gartside P.S, Hanenson IB, Roda SB, Foulkes EC et al.** The relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. *J Occup Med.* 1980; 22(7): 475–484.

Références bibliographiques

- **Hanan, a. Azoz and riham, m. Raafat** : effect of lead toxicity on cytogenicity, biochemical constituents and tissue residue with protective role of activated charcoal and casein in male rats, *australian journal of basic and applied sciences*, 6(7): 497-509, 2012.
- **Harris, W. R., et Y. Chen. 1994.** Electron paramagnetic resonance and difference ultraviolet studies of Mn²⁺ binding to serum transferrin. *J Inorg Biochem* 54, no. 1: 1–19.
- **Hirata, Y., Furuta, K., Miyazaki, S., Suzuki, M., Kiuchi, K., 2004.** Anti-apoptotic and proapoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells. *Brain Res.* 1021, 241–247.
- **Hocine, L. (2011).** Détermination des marqueurs du stress oxydatif chez la progéniture de rats « Wistar » obèses sous régime hypergras. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en agronomie. Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie.
- **Horváth Edina,¹ Zsuzsanna Máté,¹ Szabolcs Takács,¹ Péter Pusztai,² András Sági,² Zoltán Kónya,² László Nagymajtényi,¹ and András Papp,^{2012.}** General and Electrophysiological Toxic Effects of Manganese in Rats following Subacute Administration in Dissolved and Nanoparticle Form, Academic Editors: N. Futrakul and J. L. Labandeira-García
- **Hurlbut Jr., C.S. et Klein, C., 1982.** *Manual de Mineralogía de Dana*. Editorial Reverté, Barcelona, 564pp.
- **Husain, R., Seth, P.K., Chandra, S.V., 1976.** Early inhibition of succinic dehydrogenase by manganese in rat gonads. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16 (1), 118–121.
- **IARC.** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some metals and metallic compounds. Lyon, Centre international de recherche sur le cancer, 1980, vol. 23, pp. 325-415
- **IMI (International Manganese Institute). 2005.** Website: <http://www.manganese.Org/index.php>.
- **Institut National De L'environnement Industriel Et Des Risques(2003)** Plomb et dérivés fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques p 4-90. Iserin Paul. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse .paris, France.2001, p 07- 08- 10. Investigations of Lead-Induced Hyperactivity. *Neuropharmacology*; 14: 431- 444,

Références bibliographiques

- **Institut National de recherche et de sécurité(2006)** Plomb et composés minéraux fiche de données toxicologiques ft 59 p 7/12
- **Ivanovic J., Dimitrijevic-Brankovic S., Mistic D., Ristic M., Zizovic I.,2013.**Evaluation and Improvement of Antioxidant and Antibacterial Activities of Supercritical Extracts From Clove Buds, *Journal of Functional Foods*, 5, 416-423.
- **Jiang, Y. J. Lu H. Mai. 1996.**[Effects of manganese on the sexual function and reproductive outcome of male exposed workers]. *Chi J Ind Hyg Occup Dis* 14: 271–73.
- **Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N., et Gillette, J.R. (1974).** Bromobenzeneinducedliver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite, *Pharmacology*, 11(3):151-69.
- **Judpentiene, A and D. Mockute, 2004.** Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius. *Chemija*, 15(4): 64-68.
- **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..
- **Kaiser J .2003.**Manganese: a high-octane dispute. *Science* 300: 926–928.
- **Kamatou G.P., Vermaak I., Viljoen A.M. , 2012.**Eugenol—From the Remote MalukuIslands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule,*Molecules*, 17, 6935-6981.
- **Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Faza S (2005).** Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats. *CR Biol* 328:463-470.
- **Keen CL et Leach RM, 1988.** Manganese, In: *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, H.G.Seiler and H. Sigel eds., New-York, Marcel Dekker Inc., pp. 405-415.
- **Khan M.S.A., Ahmad I., 2011.**In Vitro Antifungal, Anti-Elastase and Anti-Keratinase Activity of Essential Oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-Species Against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*, *Phytomedicine*, 19, 48-55.
- **Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D., Gambari R., 2005.**Extracts and Molecules From
- **Kitazawa,M., Wagner, J.R., Kirby, M.L., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2002.** Oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in dopaminergic cells exposed tomethylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 26–35.
- **Kolesnikov, M.P., Gins, V.K., 2001.** Phenolic substances in medicinal plants. *Appl.Biochem. Micro*, 37 (4): 392-399.

Références bibliographiques

- **Kong L.D., Christopher H., Cheng K., Tan R.X.** Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. *J. Ethnopharmacol.* (2004) 91 351–355.
- **Kurokawa M., Hozumi T., Basnet P., Nakano M., Kadota S., Namba T., Kawana T., Shiraki K. , 1998.** Purification and Characterization of Eugenol as an Antiherpesvirus Compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 728-735.
- **Lafond JL.** Le manganèse. In : Chapuis Ph. – Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris : Lavoisier, 1991 ; pp. 523-541.
- **Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils.
- **Laib et Barkat, 2011.** COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FLEURS SECHES DE *LAVANDULA OFFICINALIS*, Institut de Nutrition, d'Alimentation et des Technologies Agro alimentaires, Université de Constantine Mentouri, Algérie, *E-mail :mina.laib@gmail.com
- **Lamendin H., Toscano G., Requirand P. ,2004.** Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Dentisterie 1*: 179-192.
- **Lanphear, B.P., Dietrich, K., Auinger, P., Cox, C., 2000.** Cognitive deficits associated with blood lead concentrations 10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep.* 115, 521–529
- **Laperche. V, Dictor. M.C, Clozel-Leloup. B, Baranger. P.** 2004. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. BRGM/RP-52881-FR. 136 p.
- **Lauwerys RR(1990)** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, 3ème édition. Masson p 198-228.
- **Lauwerys RR(1998)** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Paris Masson, 4th Ed.
- **Lean LP, Mohamed S.** 1999. Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemon-grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and *Garcinia atriviridis* on buttercakes. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1817–1822.
- **Lehucher-Michel M. P., J. F. Lesgards, O. Delubac, P. Stocker, P. Durand, M. Prost, 2001.** *Stress oxydant et pathologies humaines.* *Press Med.*, 30 (2001) 1076-1081.

Références bibliographiques

- **Léon Raul HERNANDES OCHOA** octobre 2005 substitution de solvants et matières actives de synthèses par un combine solvant/actif d'origine v végétale thèse de l'institut nationale polytechnique. Toulouse, France
- **Leung A. Y., 1980.**Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs andCosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.
- **Liccione, J.J., Maines, M.D., 1988.** Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. J. Pharm. Exp. Ther. 247, 156–161.
- **Lide Davide R, 1999.** Proprieties of organic compounds. Lavoisies Librairie professionnelle international.
- **Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R., 2008.**Polyphenols Contents and Antioxidant Capacity of 68 Chinese Herbals Suitable for Medical or Food Uses, Food Research International, 41, 363-370.Medicinal Plants Against Herpes Simplex Viruses, Antiviral Research, 67, 107-119.
- **Lloyd Davies T.A. , et H. E. Harding. 1949.** Manganese pneumonitis:further clinical and experimental observations.82–90.
- **Lucc ME,** thèse sur : Extraction sans solvasnt assistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université de la reunion, 13 juillet 2005, 59-71.
- **Lucchesi ME.** (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en chimie. Faculté des Sciences et Technologies. Universite de la Reunion.
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., 2004,** «An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices», Flavour and Fragrance Journal, 19, 134.
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., 2004,** «An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices», Flavour and Fragrance Journal, 19, 134.
- **Mac Laren D.** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. 2007
- **Malecki, E. A., G. M. Radzanowski, T. J. Radzanowski, D. D. Gallaher, et J. L. Greger. 1996.** Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat. J Nutr 126, no.2: 489–98.
- **Manton wi, Cook jd. (1984)** High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead Med Uni Assoc; 3 (4): 230-235. Medicine 52:73-81
- **Matés J.-M.,** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, Toxicology 153 (2000) 83–104.

Références bibliographiques

- **Merry BJ (2002)**. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34:1340-1354.
- **Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickançaité E, Segura-Aguilar J., 1999**. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol Med.*, 1999, 26(1-2):1107-16.
- **Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R.C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J.L., Aschner, M., 2007**. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* 98,198–205.
- **MILOSEVIC N, MAIER P(2000)**.Lead stimulates intercellular signaling between hepatocytes and Kupffer cells, *Eur J Pharmacol*, 401,317-328.
- **Missoun, F., M. Slimani and A. Aoues, 2010**. Toxic effect of lead on kidney function in rat wistar. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(2): 21- 27.
- **MISSY P., LANHERS M.-C., CUNAT L., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000**. Effects of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of three essential elements in rats, *International Journal of Toxicology* 19, 313-321.
- **Missy, P., Joyeux, M., Lanhers, M.C., Cunat, L., Burnel, D., 2000**. Effects of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of three essential elements in rats. *Int. J. Toxicol.* 19, 313–321.
- **Mompon, B.** Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^{ème} rencontre internationale de Nyons, 1994, 149-166.
- **Moore MR, Meredith PA, Watson WS, Sumner DJ, Taylor MK, Goldberg A (1980)** The percutaneous absorption of lead-203 in humans from cosmetic preparations containing lead acetate, as assessed by whole-body counting and other techniques. *Food Cosmet Toxicol*, 18 (4) : 399-405.
- **Morena M et al, 2002**. Stress oxydant, hémocompatibilité et complications de la dialyse au long cours *Néphrologie* Vol. 23 n° 5, pp. 201-208
- **Morigane, 2012**. Grimoire des Plantes, Ce livre est publié sous la licence libre Creative Commons BY-NC-ND : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/be/>
- **Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G., 2001**. The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys*, 385 (1) : 13–19.

Références bibliographiques

- **Molina, R. M., Phattanarudee, S., Kim, J., Thompson, K., Resnick, M. W., Maher, T. J., Brain, J. D. (2011):** Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology*. 2011; 32(4): 413–422.
- **Mylorie A.A., H. Collins, C. Umbles, J. Kyle.** Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82 (1986) 512–520.
- **Neffati, A.,** Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*, 2010.
- **NEU Christian. 2011**les interactions entre les antithrombotiques et les plantes medicinales Universite henri poincare - nancy 1 theses.sante@scd.uhp-nancy.fr. obtectus Say, In *Small Storage Units, Industrial Crops and Products*, 56, 27-34.
- **Newland L, W, Daum ka.** Hanbook of environmentalchemistry. of cognitive functioning in lead workers. *Br J Ind Med.*; 48 (11): 739-749.
- **Nouaigui Habib, 2009.** Protocoles de Prevention en cas d'ExpositionProfessionnelle au Plomb. Guide de prevention N°3.p7/32.
- **NRIAGU J O. (1978).** The biogeochemistry of lead in the environment. Ed JONriagu, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- **OHMSEN G S. (2001).** Characterization of fugitive material within a primary lead smelter. *J Air Waste Manag Assoc.* 51(10): 1443-1451.
- **Olanow, C.W., 2004.** Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann.NY Acad. Sci.* 1012, 209–223.
- **PAGLIARA P, CHIONNA A, CARLA EC, CAFORIO S, DIND L(2003).** Lead nitrate and gadolinium chloride administrations modify hepatocytes cell surfaces. *Cell Tissue Res*, 312, 41-8. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.
- **Piochon M.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiaues et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. 2008.
- **Pisano M., Pagnan G., Loi M., Mura M.E., Tilocca M.G., Palmieri G., Fabbri D., Dettori M.A., Delogu G., Ponzoni M., Rozzo C. (2007)**Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activityof Eugenol-Related Biphenyls on Malignant Melanoma Cells, *Molecular Cancer* ,6, 8. **Powerful Antioxidant Source**, *Arabian Journal of Chemistry*, 5, 489-499.

Références bibliographiques

- **Pletscher, C et Liechti, B. 2007.** Plomb et risques professionnels. 6 Suva Pro - Le travail en sécurité. Lausanne : s.n., Avril 2007. Référence: 2869/06.f.
- **Ponnapakkam T, Iszard M , Henry-sam, 2003.** Effects of oral administration of manganese on the kidneys and urinary bladder of Sprague-Dawley rats. 22(3): 227-32.
- **Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S.** “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis” Journal of Chromatography A, **2007**, Vol. 1162; pp 2- 24.
- **Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M (2005).** An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. Journal of Ethnopharmacology 96(1):295-301.
- **Proust, B. 2006.** Petite Géométrie des Parfums. Éditions du Seuil. Paris. 126p.
- **Rahelié.D, Kujund`i.M, Romié.Z, Brkié.K. Petroveéki. M. 2006.** Serum concentration of zinc, Copper, Manganese and magnesium in patients with liver cirrhosis. 30 (2006) 3: 523–528.
- **Rhayour Khadija, 2002.** Etude du mécanisme de l’action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah- Faculté des Sciences Dhar Mehraz -Fès-UFR : Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l’environnement et la santé.
- **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. ,1996.** Structure–antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*, 20: 933–956.
- **Richard H. ,1974.** Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. In Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires. Ialine Agorial – Normandie St-LÖ.
- **Richard H., Loo A. ,1992.** Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, Apria.
- **Richard, H. 1992.** Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- **Robert, G. 2000.** Les Sens du Parfum. Osman Eroylle MultiMedia Paris.224p.
- **Roels, H., G. Meiers, M. Delos, I. Ortega, R. Lauwerys, J. P. Buchet, et D. Lison. 1997.** Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl₂, MnO₂) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats. *Arch Toxicol* 71, no. 4: 223–30.
- **Roesijadi G. 1994.** Metallothionin induction as a mesure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health. Perspect.* 102: 91-95
- **Rompelberg CJ, Verhagen H, van Bladeren PJ. (1993)** Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver TNO

Références bibliographiques

Toxicology and Nutrition Institute, Department of Biological Toxicology, Zeist, The Netherlands.

- **Roquet-Noël.A.v, 2002.** Thèse de doctorat vétérinaire: Neurotoxicité du Plomb pendant le développement. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.109-p
- **Roth, J.A., Garrick, M.D., 2003.** Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1–13.
- **Rotruck, J.T., Pope, A.L ., Ganther, H.E ., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., etHoekstra, W.G. (1973),** *Science*,179, 588-590.
- **Roux, D. (2008).** Conseil en aromathérapie. Wolters Kluwer France. 187 p.
- **ROY BR; (1977).** Effect of particle sizes and solubilities of lead sulphide dust on milk.
- **Rumbeiha, W.K., Braselton, W.E., Donch, D., 2001.** A retrospective study on the disappearance of blood lead in cattle with accidental lead toxicosis. *J. Vet. Diagn. Invest* 13, 373–378.
- **Saka. S, Bahi. A, Aouacheri.w. (2001).**L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats, *Annales de toxicologie analytique.* P :4-7.
- **SANDHIR R, Gill KD(1995).**Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol Trace Elem .Res*, 48-91-7.
- **Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee MJ, Stark RE, Ho CT, Yang CS., 2005.** Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-) epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, 18 (11): 1762-9.
- **Saxena G, Flora SJS.** Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* **2004**; 18(4): 221–233.
- **Saxena G, Flora SJS.** Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats.*J Biochem Mol Toxicol.* **2004**; 18(4): 221–233.

Références bibliographiques

- **SC (Santé Canada), 2010** ; Ottawa (Ontario) K1A 0K9, Tél. : 613-954-5995, Téléc. : 613-941-5366 Courriel : info@hc-sc.gc.ca © Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par la ministre de la Santé, 2010. La présente publication peut être reproduite sans autorisation dans la mesure où la source est indiquée en entier. SC Pub.: 100123 Cat.: H128-1/10-600F -ISBN: 978-1-100-94057-1.
- **SCCE (Santé Canada et Environnement Canada). 1999**. Objectifs nationaux de qualité de l'air ambiant quant aux matières particulaires Rapport d'évaluation scientifique. Ministre, Travaux publics et Services gouvernementaux Canada.
- **Schäfer U. 2004**. Manganese in elements and their compounds in the environment. Eds. Merian . ank, Inke, Ihnat et Stoepler. 2 eme édition , Willy- VCH Weinheim(D) . vol 2, Metals and their compounds, 901-930.
- **Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM** . Dose response of ethanol o antioxidant defence system of liver, lungs and kidney in the rat, *pathophysiology* **2000**; 7:25-32.
- **Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM** . Dose response of ethanol o antioxidant defence system of liver, lungs and kidney in the rat,
- **SEMT (Santé de l'environnement et du milieu de travail), 1987**. Canada 1979 (révisé en novembre 1987)
- **Sergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J.** (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49: 689-695.
- **Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H.** ,2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- **Shukri R., Mohamed S., Mustapha N.M.** ,2010. Cloves Protect the Heart, Liver and Lens of Diabetic Rats, *Food Chemistry*, 122, 1116-1121.
- **SIEG DJ, BILLINGS RE**(1997) .Lead /cytokine –mediated oxidative DNA damage in cultured mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142, 106-15.
- **Sies H.** (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69(21-23): 965-968.
- **Silbergeld E.K.** (1991) - Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy
- **Singh, S., Shukla, G.S., Srivastava, R.S., Chandra, S.V., 1979**. The interaction between ethanol and manganese in rat brain. *Arch.Toxicol.* 41, 307–316.

Références bibliographiques

- **Sinha, AK. (1972).** Colorimetric assay of catalase, *Analytical Biochemistry*, 47(2),389-394.
- **Smith MO, Sherman IL, Miller LC, Robbins KR et Halley JT, 1995.** Relative biological availability of manganese from manganese proteinate, manganese sulfate, and manganese monoxide in broilers reared at elevated temperatures. *Poultry Sci* 74:702-707
- **Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M., 2004.** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med.Chem*, 11: 1135– 1146.
- **Sposito G., (1989).** The chemistry of soils. Oxford University Press, New York.
- **Stredrick, D.L., Stokes, A.H., Worst, T.H., Freeman, W.M., Johnson, E.A., Lash, L.H., Aschner, M., Vrana, K.E., 2004.** Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. *Neurotoxicology* 25, 543–553.
- **Sujatha, K., C.H. Srilatha, Y. Anjaneyulu and P. Amaravathi, 2011.** Lead acetate induced nephrotoxicity in wistar albino rats. A pathological immunohistochemical and ultrastructural studies. *International Journal of and Bio. Sciences*.
- **Suzuki, Y., T. Mouri, Y. Suzuki, K. Nishiyama, et N. Fujii. 1975.** Study of subacute toxicity of manganese dioxide in monkeys. *Tokushima J Exp Med* 22: 5–10.
- **Takser, L., J. Lafond, M. Bouchard, G. St-Amour, et D. Mergler. 2004a.** Manganese levels during pregnancy and at birth: relation to environmental factors and smoking in a Southwest Quebec population. *Environ Res* 95, no. 2: 119–25.
- **Tarugi, P., S. Calandra, P. Borella and G.F. vicvoli, 1982.** Effect of lead intoxication on rabbit plasma lipoproteins S. *Atherosclerosis*, 45: 221- 234.
- **TREINER J. 2000.** Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.
- **Trimeta .** Agro food –spice my your life. 30 octobre 2012.
- **Tworkoski T. ,2002.** Herbicide Effects of Essential Oils, *Weed Science*, 50, 425-431. Africa. Pp 43, 349.
- **U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency) .1993.** “Reference Concentration for Chronic Inhalation Exposure: Manganese. IRIS Database.” <http://www.epa.gov/iris/subst/0373.htm#refinhal>.

Références bibliographiques

- **Ueda F, Raja KB , Simpson RJ , Trowbridger IS et Bradbery MW. 1993.** Rate 59 Fe uptake into brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor. *J Neurochem* 60, no .1: 106-13.
- **Upadhyay AK, Mathur R, Bhadauria M, Nirala SK.** Therapeutic influence of zinc and ascorbic acid against lead induced biochemical alterations. *Thérapie.* **2009**; 64(6): 383–388.
- **USDA. 2010-** United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Beltsville Area. Use of Clove and Cinnamon Essential Oils to Control the Bean Weevil, *Acanthoscelides*
- **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40.
- **Van Antwerpen, P. ,2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. *Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques*, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
- **Van Wyk B.-E., Wink M., 2004.** Medicinal Plants of The World. Briza Publication, South
- **Varet Jacques, BRGM.** Communication au colloque « Santé-Environnement, les risques cachés. 29 septembre 1999.
- **Venugopal B and Luckey TD(1974)** Toxicology of non-radioactive heavy metals and their salts. In: Coulston F, Korte F. (eds) Heavy metal toxicity safety and hormonology 1: 4-74.
- **Villeda-Hernandez J, Barroso-Moguel R, Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Huerta-Romero R.** Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull* **2001**;55(2):247–51.
- **Vitarella, D., B. A. Wong, O. R. Moss, et D. C. Dorman. 2000b.** Pharmacokinetics of inhaled manganese phosphate in male Sprague-Dawley rats following subacute (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 163, no. 3: 279–85.
- **Viteri Jumbo L.O., Faroni L.R.A., Oliveira E.E., Pimentel M.A., Silva G.N. ,2014.** Potential
- **WHO, 1981.** Environmental health criteria 17: Manganese. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- **WHO, 1997. Manganese.** In: Air quality guidelines for Europe, 2nd Edition. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, WHO Regional Publications, European Series. Internet address: <http://www.who.int/peh/air/airguides2.htm>. Accessed November 11, 1999.
- **Winterbourne, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M and Carrel, R.W. (1975).** The estimation of red cell superoxide dismutase activity, *J. Lab.chem.Med*, 85, 337-341.

Références bibliographiques

- **Yin, Z., Aschner, J.L., dos Santos, A.P., Aschner, M., 2008.** Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 1203, 1–11.
- **ZELKO IN, MARIANI TJ, FOLZ RJ. 2002.**Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002, 33 (3): 337-49.
- **Zhang S, Huang P, Li G, Chen C, Wang H, Han Y, , Xiao Y, Zhang M, LiuN, Chu J, Zhang L,Sun Z.** Differential toxicity of Mn²⁺ and Mn³⁺, 2002.
- **Zhu BT, Liehr JG.** Quercetin increases the severity of estradiolinduced tumorigenesis in hamster kidney. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1994**; 125: 149–158.
- **Zlotkin, S. H., S. Atkinson, et G. Lockitch.** 1995. Trace elements in nutrition for premature infants. *Clin Perinatol* 22, no. 1: 223–40.
- **Zoratti, M., Szabo, I., 1995.** The mitochondrial permeabilitytransition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.
- **Hamdard Nagar, 2014.** Nanoemulgel (NEG) of Ketoprofen with eugenol as oil phase for the treatment of ligature-induced experimental periodontitis in Wistar rats.