

L'impact de l'extrait aqueux de l'anis vert (*Pimpinella anisum L*) lyophilisé chez les rats intoxiqués au plomb: étude neurocomportemental

A. Bekara ^{1*}, N. Ait Hamadouche¹, K. Kahloula ², S. Harouat ¹, D. Tabbas ¹ & A. Aoues ¹

¹ Laboratoire de Bio-Toxicologie expérimentale, Bio-Dépollution et Phyto-remédiation, Département de Biologie, Université Ahmed Ben Bella 1, Oran, 3100(Algérie).

² Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Faculté de Science, Université de Dr. Taher Moulay, Saida 2000 (Algérie).

Received: January 06, 2015; Accepted: April 17, 2015

Corresponding author Email aminabekara@gmail.com

Copyright © 2015-POSL

DOI:10.163.pcbsj/2015.9.2.49

Abstract

Résumé : L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence l'impact de l'extrait aqueux lyophilisé de *Pimpinella anisum L* à une dose de 750 mg/Kg chez des jeunes rats intoxiqués au plomb par une étude comportementale d'une part et le dosage de certains paramètres biochimiques (Lactate Déshydrogénase et protéines plasmatiques). Les rats Wistar sont exposés à 0,2 % de d'acétate de plomb dans l'eau de boisson pendant gestation et lactation. Le traitement par l'extrait aqueux lyophilisé est administré par gavage après sevrage (à J21) et pendant 15 jours. L'exposition au plomb durant développement provoquait un état de d'anxiété et une dépression chez les jeunes rats marqué par une hyperactivité locomotrice ($p < 0.05$) traduite par l'augmentation du nombre de carreaux périphériques traversés dans le test de l'open field . Cependant une augmentation significative ($p < 0.001$) du temps de séjours dans le compartiment éclairé dans le test d'obscurité/lumière ainsi que un temps d'immobilité significativement élevé ($p < 0.05$) dans le test de la nage forcée ont été remarqués chez le groupe intoxiqué par rapport au témoin . Les résultats de dosages biochimiques ont montrés des valeurs plus élevées chez les rats intoxiqués par rapport aux témoins.L'administration de l'extrait aqueux lyophilisé de *Pimpinella anisum L* pendant 15 jours a provoqué une amélioration sur le plan comportementale et n'a aucun effet sur le plan biochimique. Donc , on peut constater que le traitement par l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* peut avoir possiblement un effet bénéfiques sur le système nerveux des jeunes rats intoxiqués par l'acétate de plomb pendant gestation et lactation.

Key Words:

Mots clés : *Pimpinella anisum L*, Extrait aqueux, Intoxication au plomb, comportement anxiété et dépression.

1. Introduction :

Pimpinella anisum Lest une plante qui appartient à la famille des Apiaceae. Elle est annuelle originaire d'Orient et largement cultivé dans le bassin méditerranéen. Elle a été utilisée comme une herbe aromatique et épice depuis l'époque égyptienne (**Hänsel et al., 1999**). Les graines de cette plantes avaient été utilisé comme carminative, antispasmodique, antiseptique, expectorant et comme un médicament contre le stress, la bronchite, l'indigestion et les poux (**Gorji et Ghadiri, 2001**). Aujourd'hui de nombreuses études démontrent que les extraits de fruits d'anis ont des effets thérapeutiques sur plusieurs pathologies telles que les troubles gynécologiques et neurologiques (**Lawless, 1999; Czygan, 1992**) grâce à ces principaux composés ; comme le trans-anéthol , méthylchavicol, estragole, l'eugénol, psedoisoeugenol, anisaldehyde, coumarines(umbelliféron, scopoletin), les dérivés de l'acide caféique (acide chlorogénique), des flavonoïdes, huile grasse , protéines, minéraux , polyènes et polyacetylenes.

Le plomb est un élément chimique non essentiel à l'organisme, toxique et largement répandu dans notre environnement. Cependant, l'exposition néonatale à des niveaux relativement faibles de ce métal a été signalée pour provoquer l'hyperactivité, des difficultés d'apprentissage, et des problèmes de coordination motrice dans les deux modèles humains et animaux(**Barry et al., 1987**). En effet, le système nerveux surtout immature semble être le plus sensible aux effets néfastes de plomb. Pour cela, cette étude a été conduite pour déterminer l'effet d'une administration orale de l'extrait aqueux lyophilisé de *Pimpinella anisum* L sur la neuro-toxicité induite par une exposition au plomb durant gestation et lactation.

2. Matériels et Méthodes :

2.1. Matériel végétale :

Les graines de *Pimpinella anisum* L (anis vert) ont été achetées à partir d'une épicerie locale située au centre de la Wilaya de Chlef(29/11/2013 ; Algérie) ainsi elles ont été identifiées botaniquement et un échantillon a été déposé dans l'herbier de département de Biologie , Faculté de Science , Université d'Oran (Algérie) .

2.1.1. Préparation de l'Extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L :

Les graines sont nettoyées, desséchées puis finement broyées. 100 g de la poudre d'anis vert est immergé dans 1000 ml d'eau distillée pour faire une décoction pendant 15 minutes et à 75°C(**Hosseinzadeh et al ., 2013**).L'extrait obtenu est filtré, congelé à -80°C, puis lyophilisé (lyophilisateur CHRISI, ALPHA 1-2LD, Germany).

2.2. Expérimentation in vivo :

2.2.1. Animaux :

Le modèle animal utilisé est le rat Wistar. Les animaux sont maintenus dans l'animalerie du Département de Biologie à l'université d'Oran dans des conditions environnementales standards (23 ±1° C, 55 ±5 % d'humidité et un cycle de lumière de 12 h jour/nuit).

2.2.2. Répartition des groupes et traitement des rats :

L'intoxication par l'acétate de Plomb se fait par l'administration de 0,2 % d'acétate de Pb dans l'eau de boisson des femelles gestantes ainsi cette exposition poursuit pendant lactation

jusqu'au sevrage. Le lot témoin reçoit l'eau de boisson sans acétate de Pb(**Kahloula et al., 2013**). Au sevrage, les jeunes rats sont divisés en 03 groupes :

Groupe 01 : rats témoin (issus des femelles Témoins).

Groupe 02 : rats intoxiqués (issus de femelles intoxiqués à 0,2% de Pb).

Groupe 03 : rats intoxiqués (issus des femelles intoxiqués) et traités avec 750 mg/kg ((**Al – Attar et Jihad, 2012**) l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L (E.A.P) par gavage pendant 15 jours.

2.3. Tests de comportement :

2.3.1. Test de champ ouvert (Open Field test) :

Il mesure simultanément plusieurs activités : locomotrice, exploratrice et anxiété. Il est réalisé en plaçant l'animal dans une cage ouverte pendant 30 minutes. Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'open field, la tête orientée vers le coin. Les paramètres enregistrés dans ce test sont : le nombre de carreaux traversés, nombre de visites dans les carreaux centraux, nombre totale de redressement ainsi que le nombre de défécation.

2.3.2. Test de la nage forcée (Swimmingforced test) :

La nage forcée est un test pharmacologique prédictif de l'efficacité antidépressive d'une molécule, pendant lequel chaque rat est introduit dans un cylindre (50 cm de hauteur et 20 cm de diamètre) contenant d'eau maintenue à la température de $25 \pm 0,5$ °C. Au bout de quelques minutes (6 min), les paramètres mesurés dans ce test sont : la durée de l'immobilité, et de la nage (mobilité). La proportion de temps passé à nager diminue au profit du comportement d'immobilité, c'est-à-dire que l'animal flotte passivement en n'effectuant que les mouvements nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité est un indicateur de l'état pseudo-dépressif ou résigné de l'animal.

2.3.3. Test Obscurité/Lumière (Dark and Light test):

Le dispositif de ce test est composé de deux arènes liées entre eux par une petite ouverture ; Une arène noir non-éclairé, et l'autre blanche et lumineuse. Les rongeurs ont tendance à éviter le compartiment éclairé donc, les mesures de l'exploration dans cette zone (temps, la locomotion et entrées) sont utilisées comme indices expérimentaux de l'anxiété. Deux paramètres sont enregistrés : temps passé dans le compartiment éclairé et le temps passé dans le compartiment obscur.

2.4. Sacrifice des rats :

Les animaux sont sacrifiés le matin après un jeûne de 12 heures et cela après une injection intra péritonéale d'une solution chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$), à 10%(3ml/Kg de poids corporel). Le sang est prélevé par ponction de l'aorte abdominale dans des tubes héparinés. Les échantillons sont centrifugés (HeraeusLabofugue 200 Centrifuge) à 3000 x g pendant 20 min et le plasma est conservé à -80°C, il servira pour les dosages biochimiques. Ainsi, le cerveau est prélevé, pesé, puis conservé à -80°C.

3. Analyses biochimiques :

Les dosages biochimiques ont été réalisés par des kits commerciaux (CHRONOLAB).

3.1. Dosage de protéines totales

Les protéines forment un complexe bleu-violet intense avec les sels de cuivre dans un milieu alcalin. L'iodure est inclus comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration totale de protéine dans l'échantillon mesuré à une longueur d'onde de 540nm (Lowry, 1956).

3.2. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH) :

LDH catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, ainsi sa diminution est proportionnelle à la concentration de LDH présente dans l'échantillon, cette concentration est mesurée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm.

4. Analyses statistiques des résultats :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE. Ainsi l'analyse statistique a été fait par le test de Student dont $P < 0.05$ est considéré comme statistiquement significatif.

4. Résultats et Discussion :

5.1. Poids cérébral :

Les résultats obtenus montrent que le groupe intoxiqué au Pb possède un poids cérébral significativement inférieur ($p < 0.01$) par rapport au groupe témoin. Cependant les rats intoxiqués et traités par l'extrait aqueux de *P.anisum* présentaient un poids cérébral significativement élevé ($p < 0.01$), (Tableau 01).

Tableau (01) : Evaluation de poids cérébral de différents lots de rats étudiés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de 5 rats par groupe, après analyse de variance, la comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student (** $P < 0,01$)

Lot	T	Pb	Pb+ E.A.P
Poids absolu de cerveau (g)	1,61 \pm 0,054	1,40 \pm 0,099**	1,57 \pm 0,072**

La diminution du poids cérébral peut être expliquée par un retard dans la maturation neuronale du cervelet en raison de la perturbation vasculaire induite par le plomb (Press, 1977), et la réduction du poids des différentes régions du cerveau tel que le cortex cérébral, le cervelet et l'hippocampe (Lampert et al., 1967). Les rats traités par l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L ont un poids cérébral plus élevé par rapport aux rats intoxiqués, cet effet pourrait être attribué aux composés bioactifs tel que l'anéthol, l'eugénol, l'ansaldéhyde, l'estragole et méthylchavicol (Cabuk et al., 2003).

5.2. Champs Ouvert (Open Field) :

Les résultats obtenus par le test de champ ouvert pour les trois groupes, révèlent que le groupe intoxiqué au Pb est hyperactive et plus anxieux par rapport au groupe témoin. Le traitement par

l'extrait aqueux lyophilisé de *Pimpinella anisum* a bien réduit cette hyperactivité, ainsi les valeurs des autres paramètres sont enregistrés dans le tableau ci-dessous (Tableau n°02).

Tableau 02 : Effet de Pb et de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* sur les paramètres de l'open field chez les rats étudiés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de 5 rats par groupe, après analyse de variance, la comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de Student (* $P < 0.05$).

Groupe	Nombre de carreaux traversés	Nombre de visites dans les carreaux centraux	Redressement	Toilettage	Défécation
T	128,2 \pm 29,20	7,8 \pm 2,57	55 \pm 15,61	12,4 \pm 1,46	1 \pm 0,02
Pb	158 \pm 14,13	28,8 \pm 12,2 *	68 \pm 11,71	5,8 \pm 1,23**	2,66 \pm 0,40*
Pb+ E.A.P	141,6 \pm 27,48	24,4 \pm 5,55*	88 \pm 19,01	19,8 \pm 2,98**	1,30 \pm 0,58

Les données de cette étude ont montrés qu'une exposition précoce au Plomb (Pb) est à l'origine des troubles de comportement qui se traduisent par une hyperactivité ce qui concorde avec les études précédentes (Kahloula et al., 2013 ; Azzouz et al., 2009). Ainsi, l'administration orale de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L (E.P.A) a montré des effets correcteurs tout en diminuant l'hyperactivité observée chez le groupe intoxiqué. Cet effet pourrait être du à l'activation des récepteurs GABA (Sahrai et al., 2012). En effet, il a été démontrés que *Pimpinella anisum* L peut améliorer l'activité Na⁺/K⁺ ATPase (Karimzadeh et al., 2012) dont elle joue un rôle important dans la régulation de l'excitabilité neuronal. Donc, il peut être suggéré que les composés bioactifs présents dans l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L tel que les flavonoïdes sont responsable de cette hypo-activité locomotrice.

5.3. Test de la nage forcée :

Les résultats de ce test ont montré une augmentation significative ($p < 0.05$) dans le temps d'immobilité chez le groupe intoxiqué au plomb par rapport au groupe témoin. Cette augmentation de temps d'immobilité est décelée par l'incapacité de l'animal à nager activement ce qui reflète son état dépressif. L'administration orale de *Pimpinella anisum* L a diminué significativement le temps d'immobilité chez le groupe intoxiqué traité ($p < 0.05$) par rapport au groupe intoxiqué (Figure 01).

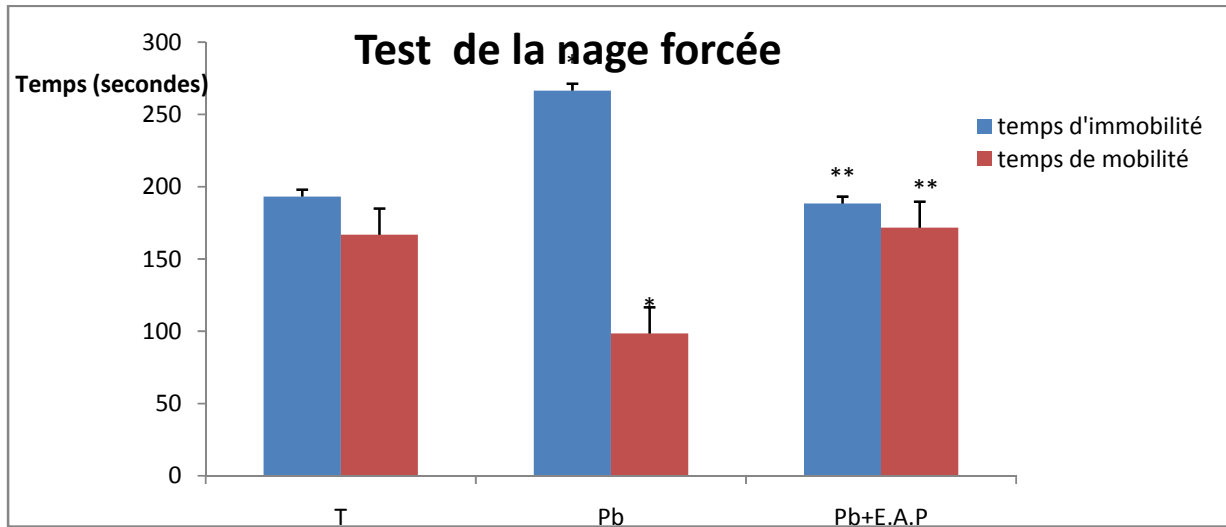


Figure 01 : Résultats de la nage forcée après 06 minutes d'expérimentation. T : groupe Témoin ; Pb : groupe intoxiqué et traité avec l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum*. Les résultats enregistrés concernant ce test d'anxiété révèlent que les jeunes rats exposés au Pb

présentent un temps de séjour dans le compartiment obscur significativement inférieur ($p < 0.001$) à celui des jeunes rats témoins, ce qui reflète que les sujets exposés au Pb pendant la période de développement dévoilent un état d'anxiété élevé par rapport aux sujets témoins. Cependant nous avons enregistré que les sujets traités ont passé un temps plus élevé dans le compartiment obscur par rapport aux autres groupes (**Figure 02**).

Dans le test de la nage forcée, on observe bien que le temps d'immobilité est plus élevé chez les rats exposés au plomb pendant la gestation et la lactation, ce qui reflète un état de dépression. Ces résultats ont été confirmés par le test Obscurité / lumière (Dark Light test) dont les rats intoxiqués ont restés le moins de temps dans le compartiment obscur. Ces effets sont dus principalement à l'action de plomb sur la transmission sérotoninergique et glutaminergique dans le cerveau et qui sont impliqués dans la physiopathologie de stress et de dépression (**De Souza Lisboa et al., 2005**).

De nombreuses études ont montrées que l'extrait et l'huile essentielle d'anis vert peuvent agir potentiellement sur le système nerveux central ; cependant il a été prouvé que *P. anisum* exerce un effet neuro-protecteur qui est probablement dû à l'amélioration de la fonction de NMDA. Ainsi cet effet pourrait être attribué au composé bioactif majoritaire de cette plante : le transanéthole qui est largement utilisé comme un substrat pour la synthèse de nombreuses substances d'intérêt neuro-pharmaceutiques tel que : les anti-convulsants et les médicaments sédatifs (**Waumans et al., 2003**).

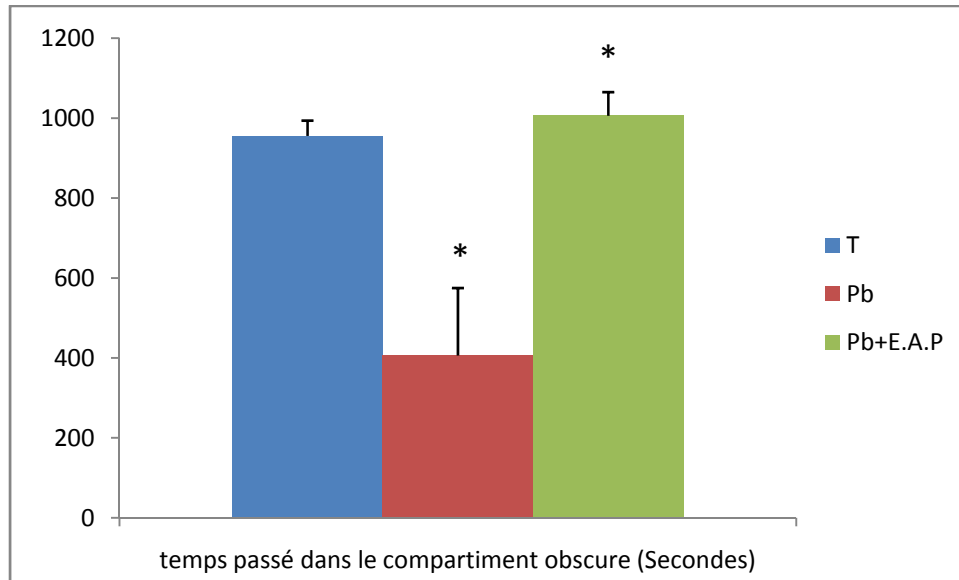


Figure 02 : Résultats de test Obscurité /lumière. T : groupe Témoin ; Pb : groupe intoxiqué au plomb, Pb +E.A.P : groupe intoxiqué et traité avec l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L.

5.5. Paramètres Biochimiques :

Tableau 02 : Effet de Pb et E.A.P sur les paramètres biochimiques des rats étudiés.

groupe	Protéines Totales (g/l)	LDH (U/L)
T	71,32± 3,90	801,95±261,7
Pb	58,24±7,21*	1348±317,1
Pb+ E.A.P	43,12±4,13	1500±391,3

Les résultats de dosage biochimiques chez les trois groupes de rats étudiés montrent que le plomb (Pb) a induit une diminution significative ($p < 0,05$) dans la concentration de protéines plasmatiques chez les rats intoxiqués par rapport au groupe témoin, ainsi le traitement par l'E.A.P n'a pas augmenté cette concentration chez le groupe de rats intoxiqués et traités. En outre, l'intoxication par le plomb durant gestation et lactation a provoqué une augmentation non significative dans le taux de LDH chez les rats intoxiqués par rapport aux rats témoins, cependant l'administration de l'extrait aqueux de graines d'anis vert n'a pas diminué le taux de cette enzyme chez les rats traités.

L'hypo-protéïnémie causée par le plomb est due principalement à la génération de radicaux libres qui peuvent endommager directement la synthèse protéique par l'interaction entre ces radicaux libres et les acides aminés (**Gumieniczek, 2005**). En effet, le plomb provoque aussi une augmentation des taux de LDH ce qui est attribué aux dommages membranaires issus dans les globules rouges, ainsi que l'accumulation des radicaux libres peut agir comme un stimulant pour la libération de cette enzyme.

5. Conclusion :

A travers cette expérimentation, on peut conclure que l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L. possède un effet faiblement bénéfique sur le système nerveux des rats intoxiqués, dont cette plante a agi bien sur le plan comportemental que sur le plan biochimique. D'autres études

doivent être établies dans le futur et avec des techniques plus sophistiqué qui permettent de connaître le (s) mécanisme (s) d'action de cette plante ainsi que le ou les composé(s) responsable(s) de ces effets.

Référence :

1. **Hänsel R**, Sticher O and Steinegger E (1999). *Pharmakognosie Phytopharmazie*, 6th ed, Springer-Verlag Berlin. pp. 692–695.
2. **Gorji A, Khaleghi Ghadiri M** (2001). History of epilepsy in Medieval Iranian medicine. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(5):455–461.
3. **Lawless L (1999)**. *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*, the Bridgewater Book Company Ltd. Shaftesbury. pp. 44–45.
4. **Czygan FC (1992)**. Anis (Ainsi fructus DAB 10) – *Pimpinella anisum*, *Z. Phytother.* 13-101–106.
5. **Barry J**. Hoffer, Lars Olson, Michael R. Palmer A (1987). Toxic Effects of Lead in the Developing Nervous System: In Oculo Experimental Models. *Environmental Health Perspectives Vol 74*, pp : 169-175.
6. **Hossein Hosseinzadeh**, Mohsen Tafaghodi, Shirin Abedzadeh and Elahe Taghiabad Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Pimpinella anisum* L seeds on milk production in rats. *Journal of Apiculture and Meridian studies* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2013.10.004>
- 7.
8. **Kahloula K**, Slimani M, Houari D, Rachidi S, Boumediene D (2013). Neuro beneficial effects of *Pimpinella anisum* against lead exposure. *International journal of green plasmarcy.. IJGP_178_12R8*.
9. **AL- Attar HY et Jihad T. W (2012)**. Effects of *Pimpinella anisum* L and *Foeniculum vulgare* seeds extracts in protect from oxidative stress induced by hydrogen peroxide in Swiss albino Mice.
10. **LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951** Nov;193(1):265-75.
11. **Press M** (1977). Neuronal development in the cerebellum of lead-poisoned neonatal rats. *Acta Neuropathol*; 40:259-68. *Reactions Free Radic Biol Med.* 1: 3-25.
12. **Lampert PW**, Garro F, Pentshew A (1967). Lead encephalopathy in suckling rats: An electron microscopic study. In: Klatzo I, Seitalberges F, editors. *Symposium on Brain Edema*, NV: Springer, p. 207.
13. **Çabuk M**, Alçiçek A, Bozkurt M, Imre N (2003). Antimicrobial properties of the essential oils isolated from aromatic plants and using possibility as alternative feed additives. II. National Animal Nutrition Congress. 18-20 September, pp: 184-187.
14. **Hanan, A. Azzoz 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
15. **H. Sahrai**, H. Ghoshooni, S. Hossein Salimi et al., “The effects of fruit essential oil of the *Pimpinella anisum* on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 80, no. 1, pp. 43–47, 2002.
16. **Karimzadeh F**, Mahmoud H, Mangeng D, Hassan A, Gholam Reza H, Bayat M, Jafarian M, Kazemi H, Gorji A (2012). Anticonvulsant and neuroprotective effects of *Pimpinella anisum* in rat brain. *Karimzadeh et al. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:76.

17. **De Souza Lisboa SF**, Gonçalves G, Komatsu F, QueirozCA, Almeida AA, Moeraira EG (2005). Developmental lead exposure induces depressive-like behaviour in female rats. *Drug Chem Toxicol*; 28:67-77.
18. **Waumans D**, Bruneel N, Tytgat J: Anise oil as para-methoxyamphetamine(PMA) precursor. *Forensic Sci Int* 2003, 133(1-2):159-170.
19. **Gumieniczek, A. (2005)**. Effects of repaglinide on oxidative stress in tissues of diabetic rabbits. *DiabRes Clin Pract*, 68, 89-95.