

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Djillali Liabes de Sidi Bel-Abbès
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et physiologie de la reproduction

INTITULE

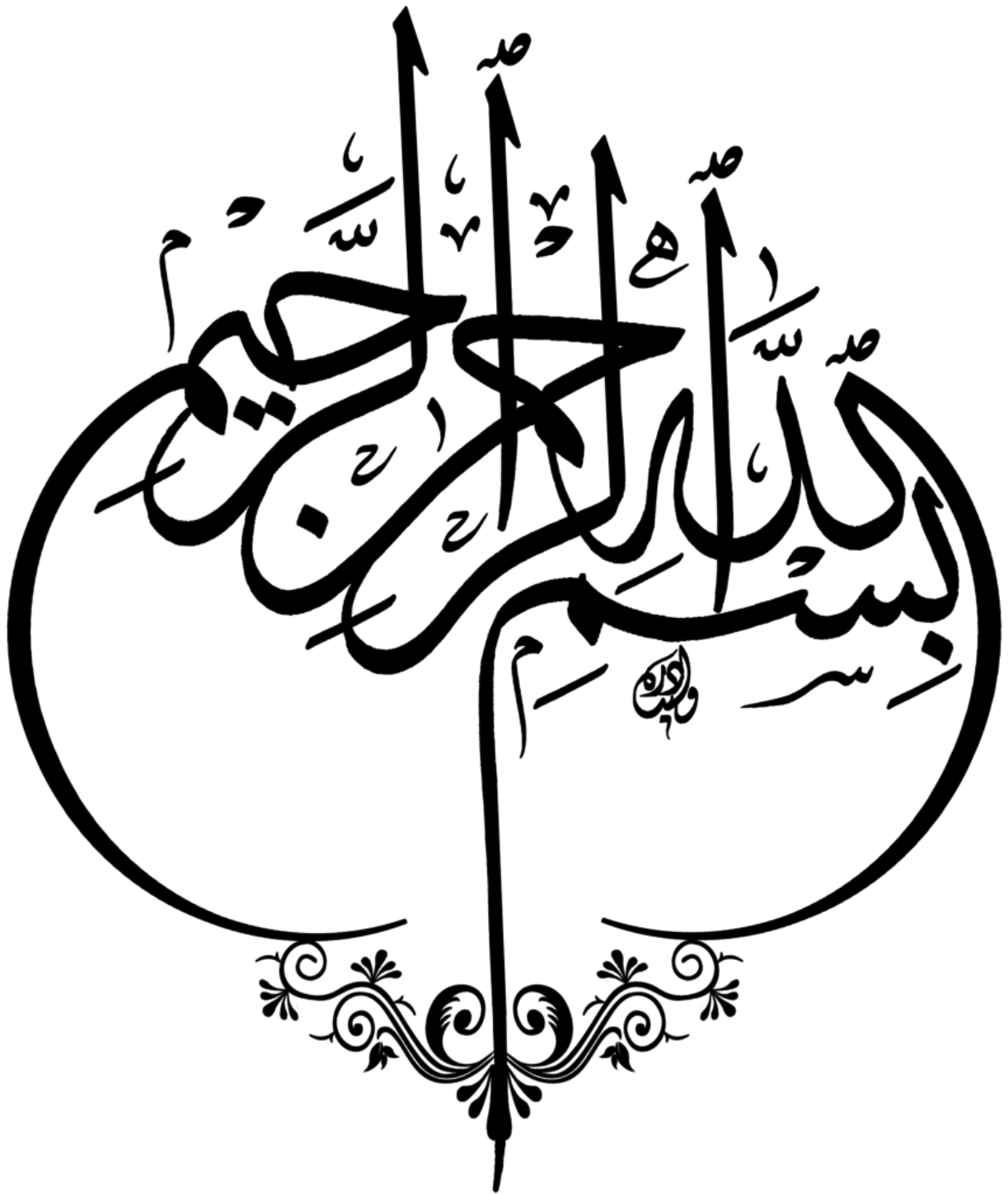
EFFET THERAPEUTIQUE DE *CURCUMA LONGA* SUR LA FONCTION REPRODUCTRICE DES RATS MALES WISTAR EXPOSES AUX METAUX LOURDS (CAS DE L'ALUMINUM)

Présenté par :
M^r. BOUDOU Farouk

Soutenu le : 16 /12 / 2021
Devant le jury composé de :

Président	M ^r . MENADI Nouredine	MCA	UDL de Sidi Bel Abbès
Directeur de thèse	Mme. BENDAHMANE Malika	Professeur	UDL de Sidi Bel Abbès
Co-directeur de thèse	M ^r . BENABDERRAHMANE Mokhtar	MCA	UDL de Sidi Bel Abbès
Examineur	Mme. LAMRI-SENHADJI Myriem	Professeur	Université d'Oran 1
Examineur	M ^r . BERROUKCHE Abdelkrim	Professeur	Université de Saïda
Examineur	M ^r . BEGHADALI Benali	Professeur	UDL de Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2021-2022



Dédicace

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :

A ma mère : Avec tout mon amour pour ton soutien et tes encouragements. J'espère rester à la hauteur de tes espoirs. Ta bonté n'a égal que ta sagesse. Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie.

A mon père : A mon cher père qui n'a cessé de m'épauler, qu'il trouve ici ma reconnaissance à travers ce modeste travail.

A mon épouse et à mon petit ange : Je vous aime, vous êtes l'essence de ma vie. Merci.

A Mon Frère : On a tous besoin d'un Grand Frère... Merci pour tout.

A Mes Sœurs : Je vous remercie avec toute mon affection. Vous êtes toujours là pour moi.

A Mes Neveux et Mes Nièces : Avec tout l'amour que je vous porte, « petits diables ».

A Tous Ceux Dont Ma Réussite Leur Tiens A Cœur.

Remerciements

Louange à *ALLAH*, seigneur de l'univers, le tout puissant et Miséricordieux, qui m'a inspiré et comblé de bienfaits, je lui rends grâce.

Par la présente, je tenais vivement à remercier *M. Bendahmane M.*, Professeur, à *l'UDL de Sidi Bel Abbés*, Pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de diriger cette étude.

Pour sa gentillesse, sa générosité, et son soutien
Pour tous les conseils dont j'ai pu bénéficier au cours de ces quatre dernières années que j'ai eu le privilège et l'opportunité de passer à ses côtés.

Merci beaucoup.

Mes sincères remerciements et reconnaissances s'adressent aussi au *Dr. Benabderrahmane M.* enseignant à *l'UDL de Sidi Bel Abbés*, pour son soutien et d'avoir accepté de codiriger cette thèse.

J'adresse aussi mes vifs remerciements au *Dr. MENADJEN*. D'avoir accepté la présidence du jury malgré ses lourdes tâches au niveau de la faculté des sciences de *l'UDL de Sidi Bel Abbés*.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du jury qui n'ont pas hésité un instant pour juger mon travail:

Mes sincères remerciements sont adressés à *Madame Lamri-Senhadij M.* Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bell, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'évaluer ce travail.

*Mes vifs et chaleureux remerciements, à Monsieur le Pr. Berroukche A.,
enseignant et doyen de la faculté des sciences à l'Université Dr. Taher Moulay de
Saida, d'avoir accepté d'être un membre du jury, malgré ses lourdes tâches au niveau
de la faculté des sciences.*

*Mes plus sincères remerciements s'adressent aussi à Monsieur le Dr. Beghdadli
B., Pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce travail.*

Cordialement.

Résumé

Introduction : La fertilité masculine est, au cours de ces dernières décennies, en net déclin à cause de certains facteurs environnementaux, en particulier l'exposition au tabagisme, aux perturbateurs endocriniens et principalement aux métaux lourds. Pour y remédier, le recours aux plantes médicinales représente une thérapie alternative qui est actuellement la plus utilisée.

Objectif : Notre étude vise à évaluer les effets d'un extrait aqueux de *Curcuma longa L.* sur la fonction reproductrice des rats mâles exposés à l'Aluminium ($AlCl_3$) en se basant sur des approches phytochimique, biochimique, cytologique (spermogramme et spermocytogramme) et histologique.

Matériels et méthodes : La première étude *in vitro* consiste à analyser, par screening phytochimique (spectrophotométrie et chromatographie) la composition de l'extrait aqueux de curcuma (EAC) et de déterminer son potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. La deuxième étude *in vivo* consiste à évaluer l'effet d'une exposition subaiguë à l' $AlCl_3$ (34 mg/kg P.C/jour) pendant un mois sur des rats mâles de souche Wistar (n=24 : 6/groupe), après administration de l'extrait de Curcuma (200 mg/kg P.C/jour) une heure au préalable. Cette étude s'appuie sur différentes analyses : dosage biochimique (taux des protéines et les indicateurs du stress oxydatif), hormonal (androgénique et gonadotrophique), examen cytologique des paramètres spermatiques (numération, vitalité, morphologie et l'intégrité de l'ADN spermatique) et histologique de la structure testiculaire et des glandes annexes (épididymes, prostate et vésicule séminale).

Résultats : Les résultats de la première étude révèle que le taux des polyphénols, flavonoïdes et tanins sont importants (26,63±0,06 mg GAE/g M.S, 17,56±0,77 mg CE/g M.S, et 41,59±0,62mg GAE/g M.S respectivement). L'analyse spectroscopique décèle la présence des curcuminoïdes dans l'EAC, et la séparation par CCM a permis d'identifier trois composants bioactifs : la curcumine (C), la déméthoxycurcumine (DMC) et la bisdéméthoxycurcumine (BDMC). Quant à l'analyse par HPLC a révélé les proportions non négligeables de ces curcuminoïdes (DMC= 5,12 %, BDMC= 2,39 % et C=4,92 %). L'évaluation de l'activité antioxydante révèle que l'extrait de *C. longa L.* a un potentiel élevé de piégeage des radicaux libre ($IC_{50\%}=5,58\pm0,14\text{mg/mL}$), et de réduction du fer ($EC_{50}=3,46\pm0,11\text{mg/mL}$). Tandis que, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire montre une capacité importante d'inhibition de la dénaturation de la protéine albumine ($IC_{50\%}=4,97\pm0,33\ \mu\text{g/mL}$) qui est supérieure à celle de l'aspirine ($IC_{50\%}=7,66\pm0,54\ \mu\text{g/mL}$). Le traitement des rats exposés à l' $AlCl_3$ a entraîné une régulation des niveaux de testostérone, une amélioration des paramètres spermatiques, une diminution importante du niveau du stress oxydatif tissulaire, et une amélioration de la structure histologique des organes étudiés avec une réduction du nombre de cellules apoptotiques et de l'infiltration des mastocytes révélée par des tests histochimiques.

Conclusion : l'utilisation de l'extrait de *C. longa* se révèle bien efficace dans le traitement des troubles de la reproduction chez les rats mâles causés par l'exposition subaiguë à l' $AlCl_3$ et ce par l'intermédiaire de mécanismes antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques.

Mots-clés : Fertilité, *Curcuma longa L.*, Aluminium, Antioxydant, Anti-inflammatoire, Testostérone, Apoptose, Rat.

Abstract

Introduction: Male fertility has been declining in recent decades due to certain environmental factors, in particular exposure to smoking, exposure to endocrine disruptors and mainly heavy metals. To remedy this, the use of medicinal plants represents an alternative therapy that is currently the most used.

Objective: Our study aims to evaluate the effects of an aqueous extract of *Curcuma longa L.* on the reproductive function of male rats exposed to Aluminium (AlCl_3) based on phytochemical, biochemical, cytological (spermogram and spermocytogram) and histological approaches.

Materials and methods: The first *in vitro* study consists in analyzing, by phytochemical screening (spectrophotometry and chromatography), the composition of this aromatic plant and to determine its antioxidant and anti-inflammatory potential. The second *in vivo* study consists in evaluating the effect of a sub-acute exposure to AlCl_3 (34 mg/kg B.P /day) during one month on male rats of Wistar strain (n=24: 6/group), after administration of Curcuma extract (200 mg/kg B.P /day) one hour before. This study is based on different analyses: biochemical (protein levels and oxidative stress indicators), hormonal (androgenic and gonadotrophic), cytological examination of spermatic parameters (count, vitality, morphology and integrity of spermatic DNA) and histological of the testicular structure and annexed glands (epididymides, prostate and seminal vesicle).

Results: The results of the first study revealed that the level of polyphenols, flavonoids and tannins were significant (26.63±0.06 mg GAE/g M.S, 17.56±0.77 mg CE/g M.S, and 41.59±0.62mg GAE/g M.S respectively). Spectroscopic analysis detected the presence of curcuminoids in Curcuma extract, and TLC separation identified three bioactive components of curcumin (C), demethoxycurcumin (DMC) and bisdemethoxycurcumin (BDMC).As for HPLC analysis revealed the non-negligible proportions of these curcuminoids (DMC= 5.12%, BDMC= 2.39% and C=4.92%). The evaluation of antioxidant activity reveals that the extract of *C. longa L.* has a high potential of free radical scavenging (IC_{50} =5.58±0.14mg/mL), and iron reduction (EC_{50} =3.46±0.11mg/mL). While, the evaluation of anti-inflammatory activity shows a significant ability to inhibit protein denaturation (CI_{50} =4.97±0.33 µg/mL) which is higher than that of aspirin (CI_{50} =7.66±0.54 µg/mL). Treatment of rats exposed to AlCl_3 resulted in regulation of testosterone levels, improvement of sperm parameters, significant decrease in the level of tissue oxidative stress, and improvement of the histological structure of the organs studied with a reduction in the number of apoptotic cells and mast cell infiltration revealed by histochemical tests.

Conclusion: The use of *C. longa* extract has been shown to be effective in the treatment of reproductive disorders in male rats caused by subacute exposure to AlCl_3 through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms.

Key words: fertility, *Curcuma longa L.*, Aluminum, Antioxidant, Anti-inflammatory, Testosterone, Apoptosis, Rat.

مُلخَص

مقدمة: انخفضت خصوبة الذكور بشكل حاد في العقود الأخيرة بسبب بعض العوامل البيئية ، لا سيما التعرض للتدخين. التعرض لمضادات الغدد الصماء والمعادن الثقيلة بشكل أساسي. لعلاج هذا، يمثل استخدام النباتات الطبية علاجاً بديلاً هو الأكثر استخداماً حالياً.

الهدف: تهدف دراستنا إلى تقييم تأثير المستخلص المائي من الكركم (*Curcuma longa L.*) على الوظيفة التناسلية للذكور الجرذان المعرضة للألمنيوم ($AlCl_3$) بناءً على التحاليل الكيميائية النباتية والكيمياء الحيوية والخوية (فحص الحيوانات المنوية) و استكشاف الأنسجة.

المواد والطرق: تتمثل الدراسة الأولى في المختبر في التحاليل عن طريق القياس الطيفي والكروماتوجرافي ، لمعرفة تكوين هذا المستخلص النباتي وتحديد إمكاناته كمضاد للأكسدة و كمضاد للالتهابات. في حين أن الدراسة الثانية في الجسم الحي هي تقييم تأثير التعرض تحت الحاد للألمنيوم ($AlCl_3$ 34 ملغ / كلغ / يوم) لمدة شهر باستعمال ذكور الجرذان من سلالة Wistar (العدد = 24: 6 / مجموعة) ، بعد إعطاء المستخلص من الكركم (200 ملغ / كلغ / يوم) قبل ساعة واحدة. تعتمد هذه الدراسة على تحليلات مختلفة: المقايسة البيوكيميائية (مستويات البروتين ومؤشرات الإجهاد التأكسدي) ، الهرمونية (الذكورية والغدد التناسلية) ، الفحص الخلوي لمعايير الحيوانات المنوية (العد والحوية وسلامة الحمض النووي للحيوانات المنوية) ودراسة النسيجية لبنية الخصية والغدد الملحقة (البربخ والبروستاتا والحويصلة المنوية).

النتائج: كشفت نتائج الدراسة الأولى أن مستوى البوليفينول والفلافونويد والعفص مهم (26.63 ± 0.06 ملغ / غ ، 17.56 ± 0.77 ملغ / غ ، و 41.59 ± 0.62 ملغ / غ على التوالي . يكشف التحليل الطيفي عن وجود curcuminoids في مستخلص الكركم ، وحدد فصل TLC ثلاثة مكونات نشطة بيولوجياً من الكركمين (C) وديميثوكسيكوركومين (DMC) و bisdemethoxycurcumin (BDMC) كشف تحليل HPLC عن النسب المهمة لهذه الكركمينات ($DMC = 5.12\%$ ، $BDMC = 2.39\%$ و $C = 4.92\%$). كما أظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة أن مستخلص الكركم له قدرة عالية على إزالة الجذور الحرة ($IC_{50} = 5.58 \pm 0.14\%$ ملغ / مل) ، واختزال الحديد ($EC_{50} = 3.46 \pm 0.11$ ملغ / مل). بينما أظهر تقييم النشاط المضاد للالتهابات قدرة كبيرة على تثبيط تمسخ البروتين ($IC_{50} = 4.97 \pm 0.33\%$ ملغ / مل). وهو أكبر من الأسبرين ($IC_{50} = 7.66 \pm 0.54\%$ ميكروغرام / مل). أدى علاج الفئران المعرضة لـ $AlCl_3$ إلى تنظيم مستويات هرمون التستوستيرون ، وتحسين معاملات الحيوانات المنوية ، وانخفاض معنوي في مستوى الإجهاد التأكسدي للأنسجة ، وتحسين التركيب النسيجي للأعضاء المدروسة مع تقليل عدد الخلايا. تم الكشف عن تسلل الخلايا البدينة عن طريق الاختبارات الكيميائية النسيجية.

الخلاصة: تبين أن استخدام مستخلص الكركم فعال للغاية في علاج الاضطرابات التناسلية في ذكور الجرذان الناتجة عن التعرض تحت الحاد لـ $AlCl_3$ وذلك عن طريق آليات مضادات الأكسدة ومضادات الالتهاب ومضادات الاستماتة.

الكلمات المفتاحية: الخصوبة ، الكركم ، ألومنيوم ، مضاد للأكسدة ، مضاد للالتهابات ، هرمون التستوستيرون ، موت الخلايا المبرمج ، الفئران.

SOMMAIRE

Dédicace

Remerciements

RESUME

ABSTRACT

مُلَخَّص

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVEATIONS

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

INTRODUCTION..... 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Chapitre I : Physiopathologie de l'infertilité masculine</i>	3
1. Généralités	4
2. Rappels anatomophysiologiques	5
2.1. Testicules	5
2.2. Epididyme	7
2.3. Prostate	7
2.4. Vésicule séminale	8
2.5. Pénis	9
2.6. Scrotum	9
3. Mécanismes de l'infertilité masculine	10
3.1. Causes «pré-testiculaires»	10
3.2. Causes testiculaires	11
3.2.1. Causes génétiques et chromosomiques	11
3.2.2. Causes physiques, chimiques et infectieuses	13
3.3. Causes post-testiculaires (par obstacle des voies excrétrices)	15
3.4. Infertilités masculines idiopathiques	16
<hr/>	
<i>Chapitre II : Généralités et toxicologie de l'Aluminium</i>	17
<hr/>	
1. Aluminium	18
1.1. Propriétés physico-chimiques	18
1.2. Histoire de l'aluminium	18
2. Sources d'exposition à l'aluminium	19
2.1. Aluminium dans l'air	19

2.2. Aluminium dans l'eau	19
2.3. Aluminium dans les aliments.....	20
2.4. Aluminium dans les produits pharmaceutiques et agrochimiques.....	20
3. Toxicologie de l'aluminium.....	21
3.1. Absorption	21
3.1.1. Peau.....	21
3.1.2. Nez.....	22
3.1.3. Poumons	23
3.1.4. Intestin.....	23
3.2. Distribution.....	24
3.3. Elimination.....	25
4. Les principaux effets toxiques de l'aluminium.....	26
4.1. Effets sur le système nerveux central.....	27
4.2. Effets sur le système respiratoire.....	28
4.3. Effets de l'Aluminium sur la peau.....	28
4.4. Effets hépato-rénaux et pancréatiques.....	38
4.5. Effets sur le tissu osseux et le système musculo-squelettiques.....	29
4.6. Effets de l'Aluminium sur le système gastro-intestinal.....	30
4.7. Effets de l'Aluminium sur les tissus hématopoïétiques.....	31
4.8. Effets sur la glande mammaire	32
4.9. Effets sur la reproduction et le développement.....	32
5. Mécanismes de la toxicité de l'Aluminium.....	34
5.1. Induction du stress oxydatif.....	34
5.2. La perturbation de la signalisation intracellulaire.....	35
5.3. Induction de réactions inflammatoires	36
5.4. L'altération des fonctions enzymatiques.....	36
5.5. L'altération de la fonction membranaire.....	37
5.6. L'induction d'effets immunogènes.....	38
5.7. L'induction d'effet mutagène, cancérigène et tératogène.....	38

Chapitre III : Phytothérapie et plantes médicinales

1. Définitions et concepts de base.....	41
1.1. Phytothérapie	41
1.2. Aromathérapie.....	41

1.3.Plante médicinale.....	41
1.4.Notion de totum.....	42
1.5.Drogue végétale ou substance végétale.....	42
1.6.Médicament à base de plantes.....	42
2. L'évolution des connaissances de l'homme sur l'utilisation des plantes.....	42
3. Les différents modes d'extraction des plantes.....	44
3.1.Extraction par homogénéisation	44
3.2.Extraction par épuisement exhaustive en série.....	44
3.3.Extraction au Soxhlet.....	44
3.4.Macération.....	45
3.5.Décoction.....	45
3.6.Infusion	45
3.7.Digestion.....	45
3.8.Percolation.....	45
3.9.Sonication.....	46
4. Le choix du solvant d'extraction	47
4.1.Eau	47
4.2.Acétone.....	47
4.3.Alcools.....	48
4.4.Chloroforme, Ether et Dichlorométhane.....	48
5. Composition chimique des plantes.....	49
5.1. Les métabolites primaires et secondaires.....	49
5.2.Principales classes de métabolites secondaires.....	50
5.2.1. Les composés phénoliques.....	50
5.2.2. Les tanins	53
5.2.3. Les alcaloïdes.....	54
5.2.4. Les terpénoïdes.....	56
6. Le curcuma (<i>Curcuma longa</i> Linn.)	57
6.1. Généralités	57
6.2.Composition chimique du rhizome de <i>Curcuma longa</i> L.	59
6.2.1. La fractions volatiles (Les huiles essentielles)	59
6.2.2. La fraction non volatile.....	59
6.2.3. Les autres composants.....	59

7. Propriétés médicinales et pharmacologiques	61
7.1. Propriétés anti-inflammatoires	61
7.2. Propriétés antioxydantes	61
7.3. Propriétés hépatoprotectrices	62
7.4. Propriétés anticarcinogènes	62
7.5. Propriétés antidiabétiques	63
7.6. Propriétés antimicrobiennes	64
7.7. Propriétés antidépressives	64

Chapitre IV : Matériels et méthodes

66

1. Objectif du travail	67
2. Matériels utilisés	67
2.1. Matériel végétal	67
2.2. Matériel animal	67
2.3. Matériels et appareillages de laboratoire	67
2.4. Produits chimiques	68
3. Méthodes	69
3.1.1. Préparation de l'extrait aqueux de <i>Curcuma longa L.</i>	69
3.2. Analyses spectrophotométriques et colorimétriques	70
3.2.1. Détermination de l'absorbance maximale (λ_{max})	70
3.2.2. Dosages des métabolites secondaires	70
3.2.2.1. Dosage de la teneur totale en polyphénols (TTP)	70
3.2.2.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT)	72
3.2.2.3. Dosage de la teneur des tannins condensés (TTC)	73
3.3. Techniques chromatographiques	74
3.3.1. La chromatographie CCM	74
3.3.2. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	75
3.4. Evaluation du potentiel antioxydant	76
3.4.1. La capacité antioxydante totale (TAC)	76
3.4.2. L'activité de piégeage des radicaux DPPH	77
3.4.3. Dosage du pouvoir antioxydant par réduction ferrique (FRAP)	78
3.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	79
4. Répartition et traitement des animaux	80
4.1. Technique d'administration des traitements	81

4.2. Le suivi des rats	82
4.3. Nécropsie.....	82
4.4. Collecte du sang et analyse hormonale.....	82
4.5. Evaluation des paramètres biochimiques	82
4.5.1. Préparation des homogénats des organes	82
4.5.2. Dosage des protéines totales (méthode de Bradford)	83
4.5.3. Evaluation du statu oxydatif	83
4.5.3.1. Dosage du maldondialdéhyde (MDA)	83
4.5.3.2. Dosage de la catalase (CAT)	84
4.5.3.3. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)	85
4.6. Etude de la qualité du sperme (Le spermogramme)	86
4.6.1. Préparation des suspensions spermatique	86
4.6.2. Comptage des spermatozoïdes	87
4.6.3. Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes	89
4.6.4. Détermination du pourcentage des spermatozoïdes vivants.....	90
4.6.5. Analyse de l'intégrité de l'ADN spermatique	91
4.7. Etude histologique (Histomorphologie)	92
4.7.1. La fixation	93
4.7.2. Techniques macroscopiques.....	93
4.7.3. Inclusion de paraffine	93
4.7.4. Technique d'enrobage à la paraffine	94
4.7.5. Coupes au microtome	95
4.7.6. Technique de coloration	95
4.7.7. Montage des lames.....	96
4.7.8. Observation microscopique	97
4.8. Etudes histochimiques	97
4.8.1. Mise en évidence du phénomène d'apoptose	97
4.8.2. Mise en évidence des dépôts d'Aluminium.....	97
4.9. Analyses statistiques.....	98

Chapitre IV : Résultats et Interprétation

99

1. Rendement d'extraction, teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés.....	100
2. Résultat de la détermination de la longueur d'onde maximale.....	100

3. Résultats de la séparation et de l'identification des curcuminoïdes par CCM.....	101
4. Profile chromatographique de l'EAC par HPLC.....	103
5. Résultats de l'activité antioxydante in vitro.....	104
6. Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	105
7. Evaluation du développement pondéral	107
8. L'index des poids et tailles des testicules et des glandes annexes.....	109
9. Effets des différents traitements sur les paramètres spermatiques.....	112
10. Evaluation des hormones sexuelles (Testostérone, LH et FSH)	115
11. Evaluation des paramètres biochimiques et indicateurs du stress oxydatif	118
11.1. Estimation du taux des protéines tissulaires totales	118
11.2. Taux du Malondialdéhyde (MDA)	119
11.3. Evaluation de l'activité catalasique tissulaire	120
11.4. Evaluation de l'activité de la SOD tissulaire.....	122
12. Etude histologique.....	123
12.1. Exploration du tissu testiculaire.....	123
12.2. Exploration du tissu épидидymaire.....	127
12.3. Exploration du tissu prostatique.....	130
12.4. Exploration histologique de la glande coagulante et de la vésicule séminale...	134
13. Mise en évidence du phénomène d'apoptose au niveau tissulaire	137
13.1. Mise en évidence de l'apoptose au niveau testiculaire.....	137
13.2. Mise en évidence de l'apoptose au niveau épидидymaire.....	138
13.3. Mise en évidence de l'apoptose au niveau prostatique.....	140
14. Mise en évidence de l'Aluminium par histochimie au niveau tissulaire.....	141
15. Analyses statistiques.....	142
15.1. Résultats de l'évaluation du potentiel antioxydant.....	143
15.2. Résultats de l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire	143
15.3. l'évolution du poids pondérale, du gain corporel et de l'index de poids des organes sexuels.....	143
15.4. Résultats de l'étude cytologique du sperme.....	143
15.5. Résultats de l'étude du dosage hormonal.....	144
15.6. Résultats des dosages biochimiques	145
15.6.1. Résultats du dosage du Malondialdéhyde tissulaire.....	145
15.6.2. Résultats du dosage de la Catalase tissulaire.....	147

15.6.3. Résultats du dosage du superoxyde dismutase tissulaire.....	148
<i>Chapitre V : Discussion</i>	150
<i>Chapitre VI : Conclusion & Perspectives</i>	162
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	
<i>Glossaire</i>	
<i>Publications scientifiques</i>	

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Coupe sagittale de l'appareil reproducteur masculin (Heffner, 2003).....	5
Figure 2.	(a) : Coupe d'un testicule et de son épидидyme ; (b) : Schéma de la barrière hémato-testiculaire. (Heffner, 2003).....	6
Figure 3.	Organisation schématique de l'épididyme du rat. Trois régions de l'épididyme: caput, corpus et cauda - ainsi que le segment initial, sont représentés (Guo <i>et al.</i> , 2007).....	7
Figure 4.	Coupe d'une prostate (Martin, 2008).....	8
Figure 5.	Coupe transversale d'un pénis (Jones <i>et Lopez</i> , 2013).....	9
Figure 6.	Représentation schématique du chromosome Y, des loci AZF et de gènes impliqués dans l'infertilité masculine (Schlosser <i>et al.</i> , 2007).....	13
Figure 7.	Schématisation des voies de pénétration et d'accumulation locale et systémique de l'Al à travers la peau	22
Figure 8.	Illustration de la voie possible de pénétration de l'Al à travers l'épithélium olfactif, avec à droite une vue globale de la cavité nasale et à gauche une vue détaillée des tissus qui recouvrent le toit de la fente olfactive (Girerd <i>et al.</i> , 2018).....	23
Figure 9.	Facteurs affectant l'accumulation et la toxicité de l'Aluminium dans les tissus (Igbokwe <i>et al.</i> , 2019).	26
Figure 10.	Pathogenèse de la maladie osseuse liée à la toxicité de l'Aluminium (Igbokwe <i>et al.</i> , 2019).....	30
Figure 11.	Schéma de l'extraction d'un extrait brut par percolation (Mukherjee 2019).....	46
Figure 12.	Structures de base des flavonoïdes et de leurs principales familles (Laura <i>et al.</i> , 2019).....	51
Figure 13.	Structures des acides phénoliques (Laura <i>et al.</i> , 2019).....	52
Figure 14.	Autres composés phénoliques non flavonoïdes (Laura <i>et al.</i> , 2019).....	53
Figure 15.	Structure des tanins (A) hydrolysables et (B) condensés (Raja <i>et al.</i> , 2014).....	54
Figure 16.	Structures de certains types d'alcaloïdes.....	55
Figure 17.	Les structures de certains terpènes importants de chaque classe (Saxena, Saxena <i>et al.</i> , 2013).....	57
Figure 18.	Image représentant la partie aérienne (1) et sous-terrainne (2) de la plante ' <i>Curcuma longa Linn</i> '.....	58
Figure 19.	Structure de la Curcumine et de ses principaux dérivés (Tung <i>et al.</i> , 2019).....	60
Figure 20.	Procédures de préparation de l'EAC. (a) broyat des <i>rhizomes sec</i> de <i>C. longa L.</i> ;(b) montage d'un système à reflux ; (c) concentration à sec de l'extrait à l'aide d'un évaporateur rotatif (modèle heidolph laborota 4000) ; (d) aspect du résidu d'extraction après évaporation rotative.....	70
Figure 21.	(a) Réaction entre les composés phénoliques et les dérivés des acides phosphotungstique et phosphomolybdique en milieu alcalin, entraînant la formation d'une couleur bleue par la méthode de Folin-Ciocalteu ; (b) Variation de couleur observée dans le test à une longueur d'onde de 765nm (Munteanu <i>et Apetrei</i> 2021).....	71
Figure 22.	(A) Formation d'un complexe flavonoïde-Al; (B) formation d'un complexe de curcumine-Al (Sepahpour <i>et al.</i> , 2018).....	72
Figure 23.	(a) Formation d'un complexe vanillin avec les tannins condensés. La flèche	

	pointe vers un second site potentiellement réactif. (b) formation du complexe catechine-vanilline (Schofield <i>et al.</i> ,2001).....	74
Figure 24.	Système HPLC-UV (Agilent Series 1100) utilisé pour l'identification des composants phénoliques de l'EAC.....	76
Figure 25.	Mécanismes de piégeage du DPPH par un antioxydant (AH).....	77
Figure 26.	A : cage d'élevage des rats Wistar (A). B : alimentation spéciale rongeurs (SIM).....	80
Figure 27.	A : Aspect de la solution de l'EAC. B : Techniques de manutention et de gavage des rats.....	81
Figure 28.	Observation macroscopique de l'épididyme de rat et ses trois parties anatomiques (Tête, corps et queue) ainsi qu'un petit fragment du canal déférent.....	87
Figure 29.	A : zone de comptage d'un hémacytomètre (cellule Thoma). B : carré secondaire d'une cellule Thoma où les flèches blanches indiquent les spermatozoïdes qui seront comptés et les flèches noirs indiquent les spermatozoïdes qui ne seront pas comptés (G×400).....	89
Figure 30.	Observation microscopique d'un frottis spermatique après coloration à l'Eosine-Nigrosine montrant un spermatozoïde coloré en rose (mort) et un spermatozoïde incolore (vivant) (G×1000).....	91
Figure 31.	Observation microscopique d'un frottis spermatique montrant des spermatozoïdes au bleu de toluidine boraté (BT+) (G×1000).....	92
Figure 32.	Fixation des organes dans du formol dilué au 1/10.....	93
Figure 33.	Appareil d'inclusion de paraffine (modèle LEICA EG1160).....	94
Figure 34.	L'appareil d'enrobage, avec deux compartiments chauds (A, B), et un compartiment froid (c) (LEICA EG 1160).....	94
Figure 35.	Technique de découpage au microtome (LEICA RM 2235).....	95
Figure 36.	Automatique pour coloration à l'Hématoxyline-éosine (LEICA EG 4040).....	97
Figure 37.	Séchage des coupes des coupes montées entre lames et lamelles.....	97
Figure 38.	Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) de l'EAC.....	101
Figure 39.	Choix de la phase mobile de la Chromatographie en Couche Mince.....	102
Figure 40.	Chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>Curcuma longa L.</i> Identification des pics. Pic N°5 : Bisdéméthoxycurcumine (BDMC), pic N°6 : Deméthoxycurcumine (DMC) ; pic N°7 :Curcumine (C).....	103
Figure 41.	Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage des radicaux DPPH de l'EAC par rapport à l'acide ascorbique.....	104
Figure 42.	Evaluation du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de l'EAC par rapport à l'acide ascorbique.....	105
Figure 43.	Effets des différents traitements sur l'évolution pondérale chez les rats des différents groupes expérimentaux.....	108
Figure 44.	Evaluation du gain de poids corporel (g).....	108
Figure 45.	Le calcul des tailles effectué par le logiciel ImageJ (Fiji).....	110
Figure 46.	photographies lors de la prise des mesures des organes étudiés.....	111
Figure 47.	Evaluation des tailles des organes sexuelles étudiés des différents groupes	112
Figure 48.	La classification des anomalies spermatiques par catégorie selon la partie du spermatozoïde affectée (tête, pièce intermédiaire et flagelles).....	114
Figure 49.	Photographies montrant l'aspect des spermatozoïdes au microscope optique grossissement (×40). (a) : spermatozoïde normal ; (b-c) : anomalies de la pièce	

	intermédiaire (angulée); (d); spermatozoïde à flagelle amputé; (e): spermatozoïdes collés; (f): spermatozoïde sans tête; (g): spermatozoïdes à flagelle angulé; (h) spermatozoïde court.	115
Figure 50.	Evaluation du taux de testostérone sérique (ng/mL).....	116
Figure 51.	Evaluation du taux de LH (U/mL).....	117
Figure 52.	Evaluation du taux de FSH (mU/mL).....	117
Figure 53.	Evaluation du taux des protéines tissulaires totales des différents organes étudiés des quatre groupes expérimentaux.....	119
Figure 54.	Evaluation du taux du malondialdéhyde tissulaires des différents organes étudiés des quatre groupes expérimentaux.....	120
Figure 55.	Evaluation de l'activité catalasique tissulaire des différents organes étudiés chez les quatre groupes expérimentaux.....	121
Figure 56.	Evaluation de l'activité de la SOD tissulaire des différents organes étudiés chez les quatre groupes expérimentaux.....	122
Figure 57.	A: Observation macroscopique d'un testicule de rat et la position de la coupe transversale (trait rouge); B: Observation microscopique des coupes transversales d'un testicule et de ses tubes séminifères (1). Coloration H&E (G×40).....	123
Figure 58.	Observation microscopique de la structure histologique des testicules des groupes témoin et EAC. Coloration H&E (G ×100 & G×400).....	125
Figure 59.	Observation microscopique de la structure histologique des testicules du groupe exposé à l'Al. Coloration H&E (G ×100 & ×400).....	126
Figure 60.	Observation microscopique de la structure histologique des testicules (G4). Coloration H&E (G ×100 & ×400).....	127
Figure 61.	(a): photographie montrant les 3 segments epididymaires; 1: tête de l'épididyme, 2: le corps de l'épididyme, et 3: la queue de l'épididyme; (b): photographie prise directement de la lame histologique montrant l'aspect de la coupe longitudinale de l'épididyme. Coloration H&E.....	128
Figure 62.	Observation microscopique de la structure histologique de l'épididyme des groupes témoin et EAC Coloration H&E (G×400).	129
Figure 63.	Observation microscopique de la structure histologique de canal epididyme. Coloration H&E (G×400).	130
Figure 64.	A: Observation macroscopique montrant les 3 paires de lobes prostatiques; 1: lobe dorsal, 2: lobe latéral, et 3: lobe ventral; B: Observation microscopique de la coupe longitudinale de la prostate. Coloration H&E (G×40).....	131
Figure 65.	Observation microscopique de la structure histologique du canal epididymaire Coloration H&E (G×400).....	132
Figure 66.	Observation microscopique de la structure histologique du canal epididymaire Coloration H&E (G×400).....	133
Figure 67.	Observation macroscopique de la vésicule séminale (1) et de la glande coagulante (2) et de la position de la coupe transversale (trait rouge); B: Observation microscopique de la coupe longitudinale de la vésicule séminale et de la glande coagulante. Coloration H&E (G×40).....	134
Figure 68.	Observation microscopique de la structure histologique des glandes coagulantes. Coloration H&E (G×400).....	135
Figure 69.	Observation microscopique de la structure histologique de la glande coagulante Coloration H&E (G×400).....	136
Figure 70.	Observation microscopique des coupes histologiques testiculaires après coloration bleu de toluidine boraté (G× 400).....	138
Figure 71.	Observation microscopique des coupes histologiques de l'épididyme après	

	coloration au bleu de toluidine boraté (G× 400).....	139
Figure 72.	Observation microscopique des coupes histologiques de la prostate après coloration au bleu de toluidine boraté (G× 400).....	140
Figure 73.	Observation microscopique des coupes histologiques de testicules après coloration à l'Aluminon (G× 400).....	141
Figure 74.	Observation microscopique des coupes histologiques des épидидymes (A) (G× 400), prostates (B) (G×100), et vésicules séminales (C) après coloration à l'Aluminon (G× 400).....	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Les différents solvants utilisés pour l'extraction des composés bioactifs (Cowan, 1999 ; Lapornik <i>et al.</i> , 2005 ; Wang <i>et al.</i> , 2010 ; Bimarkr <i>et al.</i> , 2011).....	49
Tableau 2.	Les différentes dénominations de <i>Curcuma longa linn.</i> (Loap, 2008).....	58
Tableau 3.	Composition chimique du rhizome de <i>Curcuma longa L.</i> (Jayaprakasha <i>et al.</i> , 2005).....	60
Tableau 4.	Liste des principaux matériels et appareillages utilisés lors de la réalisation des expériences.....	68
Tableau 5.	Gamme d'étalonnage pour la détermination de la catalase.....	58
Tableau 6.	Rendement d'extraction, teneurs TTP, TFT et TTC de l'extrait aqueux de <i>C. longa L.</i>	100
Tableau 7.	Résultats du balayage spectrophotométrique de l'EAC.....	101
Tableau 8.	Résultats de la séparation des curcuminoïdes par CCM.....	102
Tableau 9.	Données HPLC de l'extrait aqueux de <i>C. longa L.</i>	103
Tableau 10.	Activité antioxydante totale, activité de piégeage des radicaux DPPH et dosage du pouvoir réducteur du fer de l'EAC.....	105
Tableau 11.	Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'EAC.....	106
Tableau 12.	Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'aspirine, ou l'acide acétylsalicylique (ASA).....	106
Tableau 13.	L'effet des différents traitements sur l'index des organes sexuels.....	110
Tableau 14.	Evaluation des différents paramètres séminologiques séminologiques.....	113
Tableau 15.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la concentration spermatique.....	144
Tableau 16.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la vitalité spermatique.....	144
Tableau 17.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la morphologie spermatique.....	144
Tableau 18.	Comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) des résultats du dosage de la FSH.....	145
Tableau 19.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la testostérone.....	145
Tableau 20.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA testiculaire.....	146
Tableau 21.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA épидидymaire.....	146
Tableau 22.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA prostatique.....	146
Tableau 23.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA au niveau de la vésicule séminale.....	146
Tableau 24.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du CAT au niveau testiculaire.....	147
Tableau 25.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau épидидymaire.....	147
Tableau 26.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau de la prostate.....	147

Tableau 27.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau de la vésicule séminale.....	148
Tableau 28.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau testiculaire.....	148
Tableau 29.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau epididymaire.....	149
Tableau 30.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau prostatique.....	149
Tableau 31.	Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau de la vésicule séminale.....	149

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>AAHS : Amorphous Hydroxyphosphate Sulfate</i>	<i>Aluminium</i>	<i>HHI : Hypogonadisme Hypogonadotrope Idiopathique</i>
<i>ADN : Acide désoxyriboNucléique</i>		<i>HPLC : High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>Al : Aluminium</i>		<i>IL : InterLeukine</i>
<i>Al₂(SO₄)³ : Sulfate d'Aluminium</i>		<i>iNOS : Oxyde nitrique Synthase inductible</i>
<i>Al₂O₃ : Alumine, ou Oxyde d'Aluminium</i>		<i>IP3 : Inositol TrisPhosphate</i>
<i>AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium</i>		<i>K⁺ : Ion potassium</i>
<i>AlF₃ : Fluorure d'Aluminium</i>		<i>LH : Hormone lutéinisante</i>
<i>AlO₂²⁺ : Superoxyde d'Aluminium</i>		<i>MA : Maladie d'Alzheimer</i>
<i>AlOH : l'Hydroxyde d'Aluminium</i>		<i>MCF7 : Cellules tumorales mammaires (Michigan Cancer Foundation – 7)</i>
<i>AlPO₄ : Phosphate d'Aluminium</i>		<i>MDA : Malondialdéhyde</i>
<i>AMP : Adénosine MonoPhosphate</i>		<i>Mg : Magnésium</i>
<i>ARN : Acide RiboNucléique</i>		<i>MIP-1a : Protéine Inflammatoire du Macrophage-1 alpha</i>
<i>ATP : Adénosine triphosphate</i>		<i>MN : Maladies Neurodégénératives</i>
<i>ATPase : ATPase enzyme hydrolysant l'ATP</i>		<i>MP : maladie de Parkinson</i>
<i>AZF : Facteur d'Azoospermie</i>		<i>Na₂CO₃ : Carbonate de sodium</i>
<i>BHE : Barrière Hémato-Encéphalique</i>		<i>Na₃AlF₆ : Sodium Hexafluoroaluminate</i>
<i>BP : Barrière Placentaire</i>		<i>NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</i>
<i>BT : Bleu de Toluidine</i>		<i>NF-kB : Nuclear Factor-kappa B</i>
<i>Ca : Calcium</i>		<i>NO : Monoxyde d'Azote</i>
<i>cAMP : Adénosine Monophosphate Cyclique</i>		<i>O₂ . : Radical Superoxyde</i>
<i>CAT : Catalase</i>		<i>OH . : Radical Hydroxyle</i>
<i>COX-2 : Cyclo-oxygénase-2</i>		<i>OMS : Organisation Mondiale de la Santé</i>
<i>Cu : Cuivre</i>		<i>pAkt : Anticoprps Phospho-Akt</i>
<i>DMPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine</i>		<i>pGSK-3β : Glycogène Synthase Kinase 3 Bêta</i>
<i>DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>		<i>pH : potentiel Hydrogène</i>
<i>EAC :Extrait aqueux de Curcuma</i>		<i>SEP : Sclérose En Plaques</i>
<i>EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique</i>		<i>SK : Syndrome de Klinefelter</i>
<i>ERN : Espèces réactives de l'azote</i>		<i>SKM : Syndrome de Kallmann de Morsier</i>
<i>ERO : Espèces réactives de l'oxygène</i>		<i>SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique</i>
<i>Fe : Fer</i>		<i>SO: Oxydatif Stress</i>
<i>FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power Assay</i>		<i>SOD : SuperOxyde Dismutase</i>
<i>FSH : Hormone Folliculo-Stimulante</i>		<i>TNF-α : Nécrose Tumorale-Alpha</i>
<i>GFAP : Protéine Acide Fibrillaire Gliale</i>		
<i>GMPc : Cyclique Guanosine MonoPhosphate Cyclique</i>		
<i>GMP : Guanosine MonoPhosphate</i>		
<i>GPx : Glutathion Peroxydase</i>		
<i>GSH : Glutathion</i>		
<i>GSSG : Glutathion Disulfure Réductase</i>		
<i>H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène</i>		
<i>HH : L'Hypogonadisme Hypogonadotrope</i>		

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications parues :

1. **BOUDOU, F.,** BENDAHRMANE-SALMI, M., BENABDERRAHMANE, M., BELAKREDAR, A., BENALIA, A., & BEGHADALI, B. (2020). Effect of Curcuma longa Aqueous Extract on Male Fertility in Aluminum Exposed Wistar Rats. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5), 11-17. DOI <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4275> / ISSN: (Print) 2250-1177
2. **Boudou, F.,** Bendahmane-Salmi, M., Benabderrahmane, M., Benalia, A., & Beghdadli, B. (2020). THE IMPACT OF ALUMINUM CHLORIDE SUB-ACUTE EXPOSURE ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS. *Journal of Experimental Research*, 8(4). Article No.: JER-2020-0514/ ISSN: (Print) 2315-9650 ISSN: (Online) 2502-0524

Communications internationales:

1. **BOUDOU, F.,** BENDAHRMANE-SALMI, M., BENABDERRAHMANE, M., BELAKREDAR, A., BENALIA, A., & BEGHADALI, B. Effect of curcuma longa on Aluminum-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. The 1st international symposium “environment and sustainable development”. (10-11/02/2020). Relizane-Algeria.
2. **BOUDOU, F.,** BENDAHRMANE-SALMI, BELAKREDAR, A. Protective effect of curcuma longa aqueous extract against aluminum-induced reprotoxcity. 1st international seminar of new visions in the sustainable amortization of the biodiversity of uncertain areas. (07-08/04/2021). Naama-Algeria.

Communications nationales:

1. **BOUDOU, F.,** BENDAHRMANE-SALMI, M., BENABDERRAHMANE, M., BELAKREDAR, A., & KANDOUCI B. The benefic effect of Curcuma longa against the reprotoxcity of Aluminum in Wistar rats. 3rd national seminar of biology and health (3eme SNBS 2019). (07/12/2019). Sidi bel-abbès- Algeria.
2. **BOUDOU, F.,** BENDAHRMANE-SALMI, M., BENABDERRAHMANE, M., BELAKREDAR, A., BENALIA, A., BEGHADALI & KANDOUCI B. The ameliorative effect of Curcuma longa solution on sperm parameters and histology of male rats exposed to Aluminum chloride. 1st national conference on environment and sustainable development (CNEDD). (22-23/01/2020). Mascara-Algeria.

Introduction

D'origine naturelle ou synthétique, les polluants peuvent altérer le fonctionnement du système hormonal des animaux et des hommes. Ces substances pourraient donc induire des effets néfastes sur les organes reproducteurs de la population, et constituer un danger sanitaire qui est encore aujourd'hui mal étudié (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Notre société est de nos jours confrontée à une baisse de fertilité de la population, qui ne cesse de s'accroître depuis ces dernières décennies (Fizazi *et al.*, 2020). On estime aujourd'hui que 10% des couples consultent au moins une fois dans leur vie pour un problème d'infertilité (OMS, 1999; Inhorn et Patrizio, 2015).

L'environnement et le mode de vie sont pour beaucoup responsables de cette baisse de fécondité, notamment avec l'omniprésence de polluants de tout genre (Bala *et al.*, 2021).

La reproduction humaine peut être affectée négativement par l'exposition à l'aluminium (Al). Des études ont montré que le sperme humain peut contenir de l'Al et les patients atteints d'oligospermie ont une concentration d'Al plus élevée que les individus sains (Klein *et al.*, 2014 ; Mouro *et al.*, 2018).

L'Al est un élément abondant dans la croûte terrestre et est largement dispersé dans l'environnement. De nos jours, les sels d'Al sont inclus dans les cosmétiques, la transformation et le stockage des aliments et sont également utilisés dans divers médicaments en vente libre (Mestaghanimi *et al.*, 2002). Il a longtemps été considéré comme un élément indifférent d'un point de vue toxicologique. Cependant, actuellement il est connu comme une neurotoxine qui peut provoquer certaines maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la démence par dialyse, le parkinsonisme et la sclérose latérale amyotrophique (Abbasali *et al.*, 2005). En plus de sa neurotoxicité, l'Al affecte d'autres structures corporelles comme le système squelettique (Mestaghanmi *et al.*, 2002), les cellules sanguines, le foie et les reins (Mestaghanmi *et al.*, 2002 ; Mahieu *et al.*, 2005). L'ingestion d'Al en quantité excessive entraîne une accumulation dans les organes cibles et est associée à des lésions des tissus testiculaires chez l'homme et l'animal, avec une altération de l'histologie des testicules (Kutlubay *et al.*, 2007 ; Buraimoh *et al.*, 2012), une détérioration de la spermatogenèse et de la qualité du sperme, une augmentation des radicaux libres et des altérations des enzymes antioxydantes (Yousef *et al.*, 2005 ; Yousef *et al.*, 2007 ; Yousef et Salama, 2009) des interruptions dans la sécrétion des hormones sexuelles (Shahraki *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2005) et des changements biochimiques dans le testicule et d'autres organes reproducteurs accessoires (Chinoy *et al.*,; Chinoy *et al.*, 2005) sont quelques-uns des aspects suggérant que l'exposition à l'Al nuit à la fonction de reproduction masculine.

Actuellement, l'utilisation des plantes médicinales est une grande contribution pour traiter les problèmes médicaux primaires. Une variété de plantes s'est avérée avoir des propriétés de régulation de la fertilité (Boudou *et al.*, 2013). L'une de ces plantes est le *Curcuma longa* L. Il appartient à la famille des Zingiberaceae et a été largement utilisé comme médicament, condiment et cosmétique dans le monde entier et apprécié comme aliment fonctionnel en raison de son potentiel de promotion de la santé. Le rhizome de *C. longa*, utilisé depuis des siècles dans le sous-continent indien, a été scientifiquement validé pour ses activités antioxydantes, antimicrobiennes, antiarthritiques, anticancéreuses, carminatives, stomachiques, toniques, analgésiques, hémostatiques et anti-inflammatoires (Bagad *et al.*, 2013). Les propriétés bénéfiques de *C. longa* ont été associées à une activité antioxydante (Ramirez-Tortosa *et al.*; Patil *et al.*, 2011). La plupart des études réalisées sur *C. longa* se sont concentrées sur les composants curcuminoïdes qui comprenaient la curcumine, la diméthoxycurcumine et la bisdeméthoxycurcumine (Devasagayam *et al.*, 2001). La caractéristique la plus importante de la curcumine est qu'elle n'a pas d'effets secondaires bien qu'elle soit un agent thérapeutique aux multiples fonctions bénéfiques. Elle agit comme un piègeur de radicaux libres (Slemmer *et al.*, 2008). La curcumine est considérée comme un antioxydant efficace contre les dommages oxydatifs des tissus. Elle peut inhiber de manière significative la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à la fois *in vitro* et *in vivo* (Joe et Lokesh, 1994).

Sur la base de ces données bibliographiques, ce travail de recherche tend à évaluer les effets bénéfiques d'un extrait aqueux à base de *Curcuma longa* sur les dommages induits par l'exposition subaiguë au chlorure d'aluminium sur le système reproducteur mâle du rat Wistar, en suivant une approche méthodologique scindée en deux parties:

- Une première partie qui concerne l'étude « *in vitro* » consacrée à la caractérisation de la plante par le biais de dosages phytochimiques et d'analyses chromatographiques et à l'optimisation de ses pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires.
- Une deuxième partie consacrée à l'étude expérimentale « *in vivo* », sur le rat wistar, qui comprend une évaluation de la qualité du sperme, le dosage sérique des hormones sexuelles, le dosage du degré du stress oxydatif tissulaire par le biais du dosage de certains marqueurs et enzymes relatifs au stress oxydatif, et au final une étude histologique et histochimique pour évaluer la structure et le niveau d'atteinte des gonades mâles et des glandes annexes.

Chapitre I : Physiopathologie de l'infertilité masculine

1. Généralité

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité est définie par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009 ; Barratt *et al.*, 2017). Elle est dite "primaire" si le couple n'a jamais conçu auparavant, et elle est dite "secondaire" si au moins une grossesse a déjà eu lieu (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Du fait du manque de données précises à l'échelle planétaire il est difficile d'établir sa prévalence exacte. Néanmoins, un certain nombre d'études estiment que le nombre de couples infertiles à travers le monde atteindrait des valeurs comprises entre 50 et 130 millions (Mascarenhas *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2015). Ce qui correspond, selon l'OMS, à plus de 10 ou 15% des couples dans le monde dont la majorité est issu des pays en voie développement (OMS, 1999; Inhorn et Patrizio, 2015). L'Afrique à elle seule en compte entre 20 et 35 millions de personnes, dont le plus grand nombre est situé dans l'Afrique subsaharienne (Belhachemi *et al.*, 2020). La prévalence de l'infertilité en France est d'environ 15 %, ce qui signifie qu'un couple sur six cherchera une aide médicale pour l'infertilité à un moment donné de sa vie reproductive (Ben Messaoud *et al.*, 2020). Parmi les couples en âge de procréer en Chine, la prévalence de l'infertilité est de l'ordre de 25 %, et près de la moitié des couples en situation d'infertilité n'avaient pas cherché d'aide médicale (Zhou *et al.*, 2018). On estime que 11 à 16% des couples canadiens ont des problèmes d'infertilité (Belhachemi *et al.*, 2020). Au Maroc comme en Tunisie, l'infertilité est estimée à environ 15% de la population (Frini et Muller, 2017; Benksim *et al.*, 2018). En Algérie, malgré la croissance démographique, le ministère de la Santé estime que le taux d'infertilité est de 10,6% (Belhachemi *et al.*, 2020). Le terme "stérilité" ne devrait être utilisé que pour décrire une incapacité totale et irréversible à concevoir, un diagnostic qui ne peut être posé que lorsque l'infertilité est due à une cause claire et incurable (Bellaïche-Attal, 2003; Hérault, 2015). Au sein d'un couple, l'infertilité peut être d'origine entièrement féminine ou masculine, mais elle est aussi fréquemment le résultat de l'hypofertilité des deux membres du couple, qui compromet leur capacité à procréer par synergie. Le rôle de l'homme dans l'infertilité d'un couple est très variable, de total à partiel. Dans 20 à 70 % des cas, une composante masculine est présente (Agarwal *et al.*, 2015). L'infertilité masculine a des causes variées, dont beaucoup sont complexes, à savoir : le tabagisme (63%), le stress (12%) et Certains antécédents médicaux tels que les oreillons (25%) ont été également incriminés (El-haina *et al.*, 2015). Une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme est présente dans 61 % des cas (Kumar *et Singh*, 2015).

2. Rappels anatomophysiologiques

Afin de mieux comprendre les problèmes liés à l'infertilité masculine, il est essentiel d'aborder certains éléments clés de la fertilité masculine. En effet, L'appareil reproducteur masculin se compose de deux ensembles d'organes (figure 1). D'abord, les organes génitaux internes qui comprennent les testicules (gonades masculines). Ils ont une fonction à la fois exocrine (production de spermatozoïdes) et endocrine (sécrétion de testostérone). On y trouve aussi les organes génitaux annexes, à savoir les conduits et les glandes qui concourent au transport des spermatozoïdes à l'extérieur de l'organisme ou dans les voies génitales de la femme. Ensuite, les organes génitaux externes qui se composent du scrotum et du pénis (Heffner, 2003).

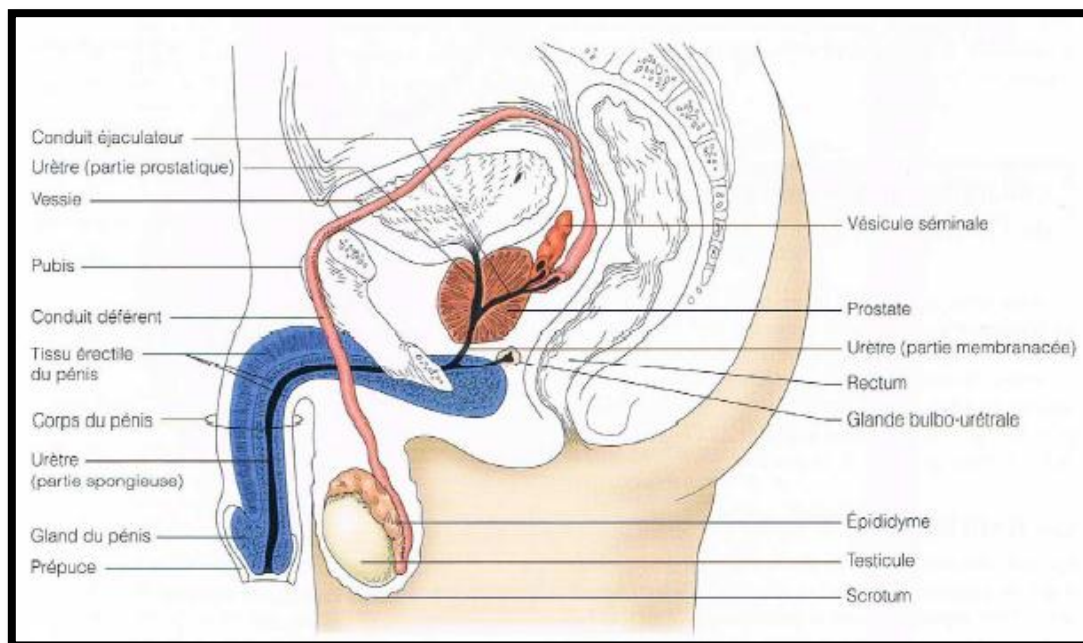


Figure 1. Coupe sagittale de l'appareil reproducteur masculin (Heffner, 2003).

2.1. Testicules

Les testicules (figure 2-A) sont enfermés par la capsule de la tunique albuginée dans le sac testiculaire. Ils sont composés de deux parties morphologiquement et fonctionnellement séparées. Les composants tubulaires comprennent les tubules séminifères (lieu de la spermatogénèse) et les portions inter-tubulaires entre les tubules séminifères qui participent à l'approvisionnement en sang et aux réponses immunitaires (Orman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Les cellules de Leydig sont l'une des cellules les plus importantes du testicule. Elles sont la source de la testostérone testiculaire et du facteur 3 analogue à l'insuline. Outre les cellules de Leydig, les composants intercellulaires comprennent les cellules immunitaires, les vaisseaux lymphatiques et sanguins, les nerfs, le tissu conjonctif et les fibroblastes (Chang *et*

al. 2017; Ye *et al.*, 2017). Les tubules séminifères sont des unités fonctionnelles du testicule, représentant 60 à 80 % du volume testiculaire (Shah *et al.*, 2015; Bhushan, Aslani *et al.*, 2016). L'épithélium des tubes séminifères est constitué par les cellules de soutien de Sertoli et par les cellules germinales. Les cellules de Sertoli forment une couche unistratifiée qui s'étend de la membrane basale à la lumière des tubes. Avec leurs prolongements cellulaires, elles encerclent plus ou moins les différents types de cellules germinales. La spermatogenèse se déroule à proximité des cellules de Sertoli, qui ont une fonction sécrétoire et phagocytaire en plus d'une fonction de soutien et de nutrition (figure 2-B) (Zhang *et al.*, 2015; Duan, Hu *et al.*, 2016). Ces cellules produisent deux types d'hormones, l'inhibine et l'activine, qui ont un effet positif et négatif sur l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Loveland et Hedger, 2015; Vickers, 2017). Des jonctions serrées (ou zonula occludens) présentes en périphérie des cellules de Sertoli permettent la mise en place d'une barrière hémato-testiculaire (figure 2-C), qui isole le compartiment germinal de la circulation systémique sanguine et de la circulation lymphatique. Cette barrière confère une protection des cellules germinales vis-à-vis du système immunitaire, qui ne tolère pas les antigènes spermatiques et qui peut alors sécréter des anticorps antispermatiques.

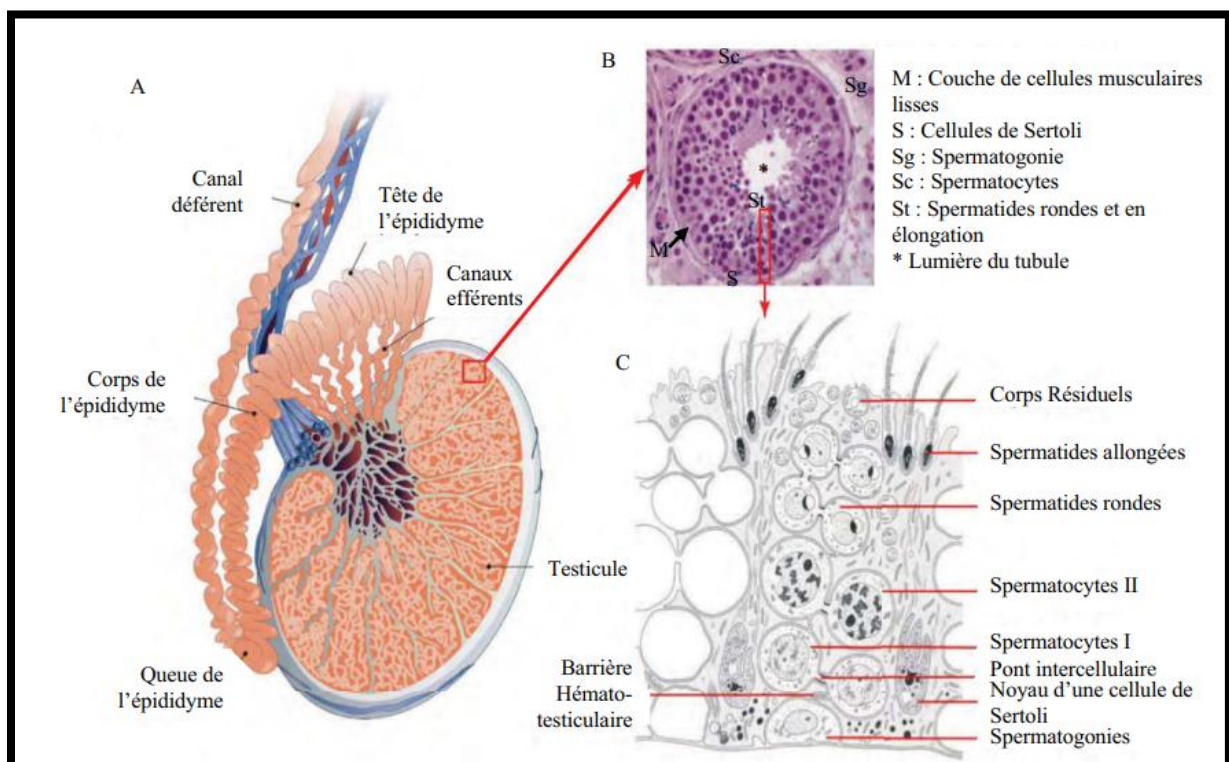


Figure 2. A: Coupe d'un testicule et de son épидидyme ; B : Coupe histologique transversale de testicule humain montrant un tubule séminifère composé des cellules de Sertoli et de la lignée germinale ; C : Schéma d'un tube séminifère montrant la barrière hémato-testiculaire (Champroux, 2018).

2.2. Epididyme

L'épididyme est un organe situé dans l'appareil reproducteur mâle des espèces vertébrées pratiquant la fécondation interne. Il est situé entre le canal efférent quittant le testicule et le canal déférent. Il est divisé en une tête (caput), un corps (corpus) et une queue (cauda) (figure 3). Il remplit de multiples fonctions telles que le transport, la concentration, la protection et le stockage des spermatozoïdes. Bien que les spermatozoïdes soient entièrement différenciés lorsqu'ils quittent le testicule, ils sont immobiles et incapables de féconder. Ils acquièrent leur fonctionnalité au cours d'un processus de maturation qui se déroule dans l'épididyme. L'épididyme est un unique tubule convoluté. L'épithélium qui borde le compartiment intraluminal de l'épididyme est formé de multiples types de cellules dont les fonctions dans la physiologie du sperme sont régies par une diapasonie complexe (Skinner, 2018; Maynard et Downes, 2019).

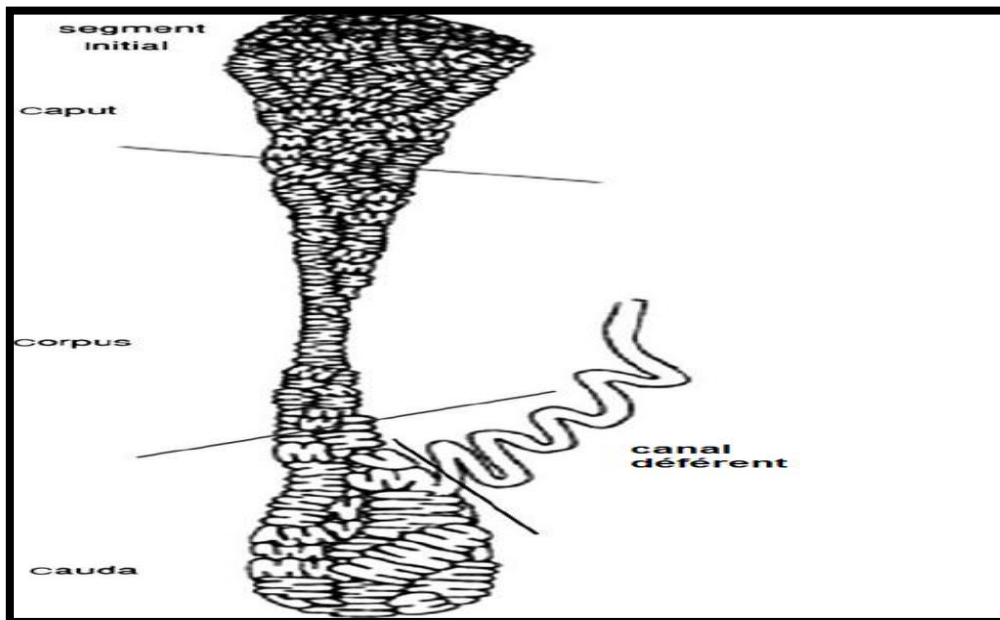


Figure 3. Organisation schématique de l'épididyme du rat. Trois régions de l'épididyme: caput, corpus et cauda - ainsi que le segment initial, sont représentés (Guo *et al.*, 2007).

2.3. Prostate

La prostate est une glande pelvienne située sous la vessie et devant le rectum. Elle est composée de structures glandulaires et non glandulaires entourées d'une même capsule. Elle se compose principalement de tissu musculaire et fibreux, subdivisé en environ 50 glandes tubulaires-alvéolaires, au niveau des segments latéraux et postérieurs de l'urètre, qui se drainent vers 20-30 petits canaux prostatiques s'ouvrant dans la prostate, ou près de la paroi postérieure de l'urètre prostatique. La sécrétion prostatique, qui représente environ 20% du

liquide séminal, confère une odeur caractéristique à cet écoulement, et participe à l'activation des spermatozoïdes. Les conduits des glandes prostatiques s'ouvrent dans un sillon situé de part et d'autre de la crête urétrale, appelé sinus prostatique. La prostate est traversée par la partie prostatique de l'urètre, de la base à l'apex, avec un parcours légèrement incurvé dans le sens antéro-postérieur, et plus proche de sa face antérieure (figure 4) (Simoes, *et al.*, 2018).

2.4. Vésicule séminale

Chez l'homme adulte, les vésicules séminales sont des structures paires situées en arrière de la vessie et adjacentes au rectum (Figures 4). Situées latéralement à l'aspect postérieur de la prostate, les lumières des vésicules séminales se joignent à la région ampullaire du canal déférent, formant ainsi les canaux éjaculateurs qui traversent la zone centrale de la prostate et se jettent dans l'urètre postérieur de chaque côté du verumontanum. Les vésicules séminales mesurent chacune 5 à 7 cm de long et ont un volume d'environ 13 ml. Contrairement à la prostate, les vésicules séminales ne sont pas des structures ramifiées et ne contiennent qu'une seule lumière commune ; cependant, le tissu glandulaire est fortement convoluté et plissé, ce qui lui confère une grande capacité de sécrétion. Comme dans le cas de la prostate, l'épithélium des vésicules séminales est constitué de cellules sécrétrices colonnaires surmontant une couche discontinue de cellules basales ; toutefois, on ne trouve pas de cellules neuroendocrines. L'épithélium est entouré d'une épaisse couche de cellules musculaires lisses innervées par les nerfs sacrés S2-S4, et se contracte pendant l'émission pour expulser le contenu de la lumière dans les canaux éjaculateurs (Edition, 2015).

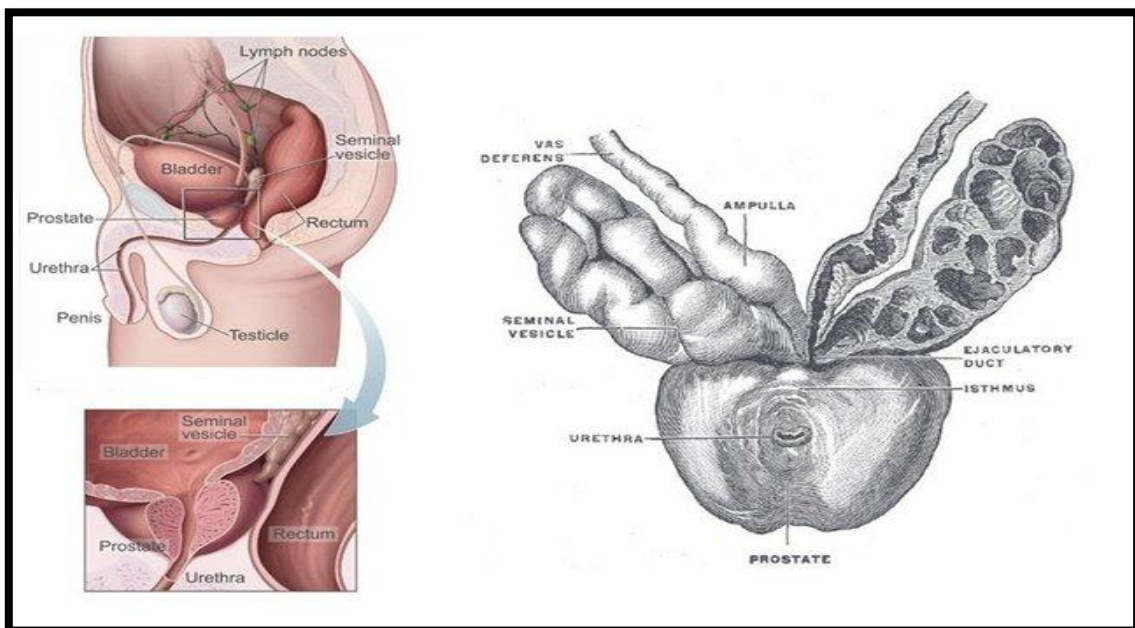


Figure 4. Vue d'ensemble de l'appareil génital masculin, avec schéma de la prostate et de la vésicule séminale (Martin, 2008).

2.5. Pénis

L'anatomie du pénis est complexe et se compose principalement de trois cylindres distincts. Les cylindres jumelés, appelés corps caverneux, contiennent le tissu érectile. Chaque colonne est constituée d'un réseau de grands sinus veineux, qui sont séparés par des septums de tissu conjonctif dense, appelé trabéculaire. La surface coupée des corps caverneux ressemble à une éponge. Chaque corps caverneux est entouré par la gaine fibreuse de la tunique albuginée. Le troisième cylindre du pénis est appelé corpus spongiosum et contient l'urètre. Le corps spongieux possède une tunique albuginée beaucoup plus fine et plus élastique qui permet la distension du corps spongieux pour le passage de l'éjaculat dans l'urètre. La tunique albuginée plus fine du corps spongieux permet également au corps de devenir moins rigide pendant l'érection. Les trois corps érectiles, les corps caverneux appariés (séparés par le septum pénis) et le corps spongieux unique sont recouverts du fascia de Buck. Le fascia de Colles est le fascia superficiel du périnée qui recouvre le pénis. La tige pénienne est recouverte d'une peau glabre (Jones *et* Lopez, 2013).

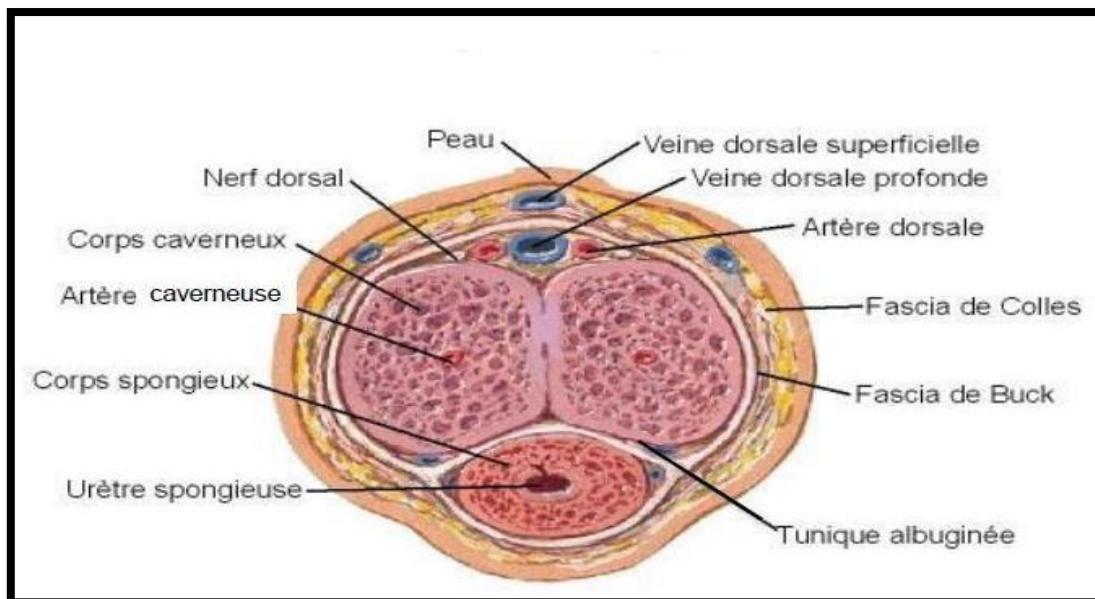


Figure 5. Coupe transversale d'un pénis (Jones *et* Lopez, 2013).

2.6. Scrotum

Le scrotum, dans le système reproducteur masculin, est une fine poche externe de peau qui est divisée en deux compartiments ; chaque compartiment contient l'un des deux testicules, les glandes qui produisent le sperme, et l'un des épидидymes, où le sperme est stocké. Le scrotum est une caractéristique anatomique unique de l'homme et de certaines autres espèces de mammifères terrestres. Il est en continuité avec la peau de l'abdomen inférieur et est situé directement derrière le pénis et devant l'anus. La paroi scrotale est une

fine couche de peau bordée de tissu musculaire lisse (fascia dartos). La peau contient plus de pigments que celle des zones environnantes et comporte de nombreuses glandes sébacées et des glandes sudoripares. Les deux compartiments du scrotum se distinguent extérieurement par une crête médiane appelée le raphé. À l'intérieur, le raphé est relié à une cloison musculaire, le septum, qui sert à diviser le scrotum en deux parties (Cheng *et al.*, 2019).

3. Mécanismes de l'infertilité masculine

L'infertilité masculine peut s'expliquer par trois mécanismes principaux, dont chacun a une fréquence différente (Dimitriadis *et al.*, 2017; Swee *et* Quinton, 2019).

- Un hypogonadotropisme sévère qui empêche ou interrompt l'activation testiculaire, nécessaire au développement des spermatozoïdes : on parle alors de cause " pré-testiculaire ";
- Des Maladies testiculaires primaires qui affectent le processus de la spermatogenèse ;
- Des affections ou lésions qui empêchent les spermatozoïdes de quitter ou d'être acheminés en dehors du testicule, également appelées causes " post-testiculaires ".

Il existe également des infertilités masculines dites "idiopathiques" dont l'étiologie est difficile à déterminer (Ray *et al.*, 2012).

3.1. Causes «pré-testiculaires»

L'altération de la fonction testiculaire, c'est-à-dire l'hypogonadisme, peut résulter d'un trouble testiculaire primaire (hypergonadotrope) ou être secondaire à un dysfonctionnement hypothalamo-hypophysaire (hypogonadotrope) (Young, 2012; Grinspon *et al.*, 2020). L'hypogonadisme hypogonadotrope (HH) peut être congénital ou acquis (Silveira *et* Latronico, 2013). L'hypogonadisme hypogonadotrope congénital se divise en hypogonadisme hypogonadotrope anosmique (syndrome de Kallmann, SK) et en hypogonadisme hypogonadotrope isolé congénital normosmique (hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique, HHI) (Bianco *et* Kaiser, 2009; Dodé *et* Hardelin, 2010). L'incidence de l'HH congénital est d'environ 1-10:100 000 naissances vivantes, et environ 2/3 et 1/3 des cas sont causés par le SK et l'HHI, respectivement (Lodh *et* Mukhopadhyay, 2016). L'HH acquis peut être causé par l'exposition à certains médicaments, des lésions hypophysaires infiltrantes ou infectieuses, une hyperprolactinémie, un traumatisme encéphalique, une irradiation

hypophysaire ou cérébrale, un exercice physique épuisant, une consommation abusive d'alcool ou de drogues illicites (Pirola *et al.*, 2010; Mikhael *et al.*, 2019), et des maladies systémiques telles que l'hémochromatose, la sarcoïdose et l'histiocytose X (Young, 2007; Han *et Bouloux*, 2010). Les caractéristiques cliniques de l'hypogonadisme hypogonadotrope sont une carence en androgènes et une absence, un retard, ou un arrêt de la maturation sexuelle pubertaire (Roger *et Lahlou*, 2002). Des taux de testostérone sanguins bas et des taux d'hormones hypophysaires bas confirment le diagnostic d'hypogonadisme hypogonadotrope (Valdes, 2015). Un test de GnRH intraveineux stimulé prolongé peut être utile (Priyadarshi *et al.*, 2020). Dans le syndrome de Kallmann, l'IRM cérébrale peut montrer une morphologie anormale ou même l'absence du bulbe olfactif (Bensafi *et Rouby*, 2021). Le traitement de l'hypogonadisme hypogonadotrope dépend du désir de fertilité future du patient. La substitution hormonale par la testostérone est le traitement classique de l'hypogonadisme (Bhasin *et Basaria*, 2011). La substitution androgénique est indiquée pour les hommes qui ont déjà des enfants ou qui n'ont aucun désir d'en avoir d'autres, et la thérapie à la testostérone est utilisée pour inverser les symptômes et les signes de l'hypogonadisme (Bhasin *et Basaria*, 2011). À l'inverse, les thérapies à la GnRH ou aux gonadotrophines sont les meilleures options pour les hommes qui souhaitent avoir des enfants (Zitzmann *et Nieschlag* 2000). L'HH est l'une des rares conditions dans lesquelles un traitement médical spécifique peut inverser l'infertilité. Lorsqu'une grossesse non assistée n'est pas obtenue, des techniques de procréation assistée allant de l'insémination intra-utérine à la fécondation in vitro en passant par l'acquisition de spermatozoïdes viables à partir de l'éjaculat ou directement à partir des testicules par extraction de sperme testiculaire ou microdissection testiculaire peuvent également être utilisées, en fonction du potentiel de grossesse de la femme et de la qualité et de la quantité de spermatozoïdes (Oldereid *et al.*, 2010; Prior, Stewart *et al.*, 2018).

3.2. Causes testiculaires

3.2.1. Causes génétiques et chromosomiques

La production quantitativement et qualitativement normale de spermatozoïdes de qualité à partir de cellules souches spermatogoniales est aussi, indépendamment de sa régulation hormonale, un processus extrêmement complexe et sensible (Weinbauer *et al.*, 2010). La spermatogenèse entraîne l'expression d'un grand nombre de gènes dans les testicules, mais seuls quelques-uns sont connus pour être impliqués dans les causes héréditaires de l'infertilité masculine (Hoog, 2003). Les facteurs génétiques sont à l'origine de 15 à 30 % des cas d'infertilité masculine. La formation des spermatozoïdes se déroule de manière séquentielle

avec des phases de différenciation mitotique, méiotique et post-méiotique, chacune d'entre elles étant contrôlée par un programme génétique complexe. Les gènes contrôlent une variété de processus physiologiques, tels que l'axe hypothalamus-pituitaire-gonadal, le développement et la différenciation des cellules germinales (Shamsi *et al.*, 2011). Les mutations ou les délétions de certains de ces gènes pourraient entraîner une modification de la spermatogenèse en raison d'un arrêt d'une ou de plusieurs étapes conduisant à la création d'un spermatozoïde haploïde à partir d'une spermatogonie diploïde (Nishimune *et Tanaka*, 2006; Nuti *et Krausz*, 2008). Le chromosome Y (Figure 6) est l'un des plus petits chromosomes humains (60 Mb) et sa longueur est hautement polymorphe. Il est spécifique à l'homme et est le seul composant haploïde du génome humain. Jusqu'à présent, 156 unités de transcription, 78 gènes codant pour des protéines et 27 protéines distinctes (9 sur Yp et 18 sur Yq) codées par le chromosome Y ont été identifiés (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Les microdélétions du bras long du chromosome Y, qui sont observées chez plus de 10 % des hommes atteints d'azoospermie non obstructive et chez près de 5 % des hommes atteints d'oligospermie significative, figurent parmi les troubles génétiques les plus fréquents et les plus connus (Krausz *et al.*, 2015). Cette région est définie comme le facteur d'azoospermie (AZF) car le phénotype le plus grave associé à sa délétion était l'azoospermie. La région AZF est subdivisée en trois régions non chevauchantes appelées AZFa, AZFb et AZFc. Six gènes situés dans les régions AZF sont exprimés exclusivement dans les testicules et sont donc connus sous le nom de "gènes candidats AZF" (Shamsi *et al.*, 2011). D'autres causes monogéniques extrêmement rares de troubles de la spermatogenèse ont été découvertes. Il s'agit notamment d'anomalies rares du récepteur de la FSH qui empêchent cette gonadotrophine de stimuler les cellules de Sertoli (Oduwole *et al.*, 2018). Le chromosome X des mammifères est enrichi en gènes exprimés dans la spermatogenèse précoce, ce qui lui confère un rôle essentiel dans le développement des cellules germinales (Vockel *et al.*, 2019). Les mutations du gène TEX11 hémizygote lié au chromosome X sont les causes fréquentes d'arrêt méiotique et d'azoospermie chez les hommes infertiles (Yatsenko *et al.*, 2015). Ainsi, un chromosome X surnuméraire entraîne une modification du renouvellement des cellules souches spermatogoniales et de l'apoptose des spermatogonies dans le syndrome de Klinefelter (SK) (Oates, 2012). L'SK (ou 47, XXY) survient chez à peu près un homme sur 650. Au plan phénotypique les individus atteints du KS présentent souvent des caractéristiques physiques spécifiques, notamment une grande taille, un hypogonadisme avec parfois une gynécomastie et des problèmes de fertilité. Outre les résultats médicaux, la présence du chromosome X supplémentaire peut entraîner des déficits cognitifs et

linguistiques caractéristiques, de gravité variable (Boada, Janusz *et al.*, 2009). Environ un garçon sur 1 000 naît avec un chromosome X supplémentaire (47,XXY), le caryotype à l'origine du SK est détecté à la naissance ou avant chez 10 % des garçons atteints, et il est retrouvé à l'âge adulte chez 25 % des hommes atteints. Presque tous les hommes présentant un caryotype 47,XXY seront infertiles ; le SK représente 3 % des cas d'infertilité masculine. Ce syndrome est fréquent chez 5 à 10 % des hommes infertiles présentant une oligospermie ou une azoospermie (Wattendorf *et Muenke*, 2005).

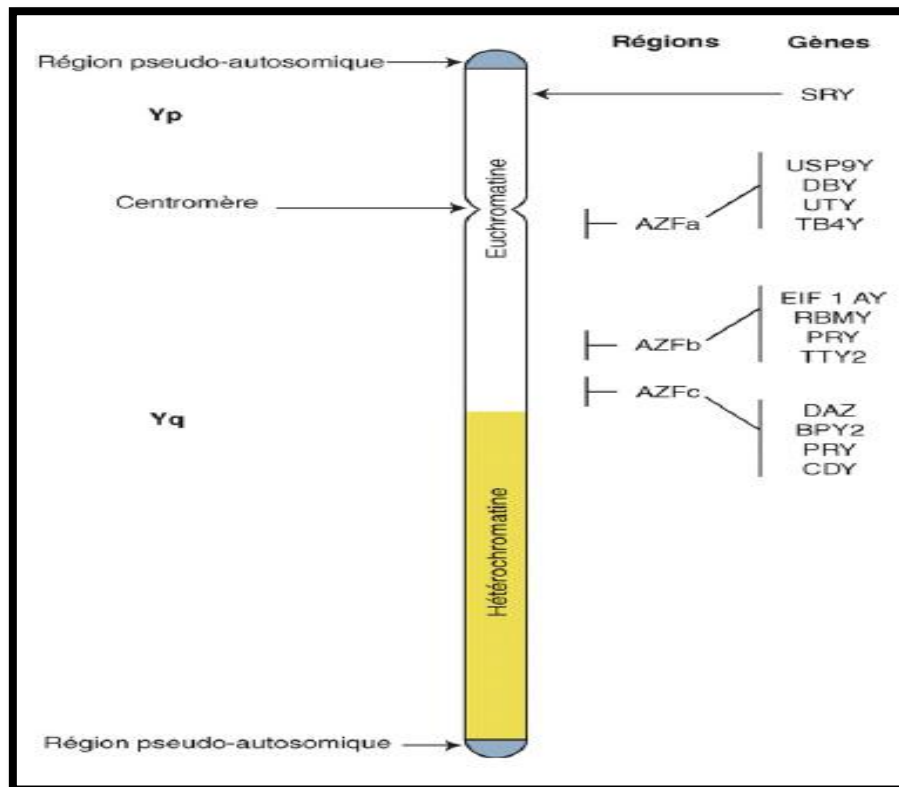


Figure 6. Représentation schématique du chromosome Y, des loci AZF et de gènes impliqués dans l'infertilité masculine (Schlosser *et al.*, 2007).

3.2.2. Causes physiques, chimiques et infectieuses

A côté des causes génétiques et chromosomiques, la spermatogenèse peut être affectée considérablement et directement par des agressions physiques, chimiques et infectieuses (Schuppe *et al.*, 2017; Perheentupa, 2019). Tout type de traumatisme testiculaire (traumatisme scrotal, torsion testiculaire, etc.) peut altérer considérablement la spermatogenèse. Une étude démontre que la durée minimale (de 3 à 30 jours) et le degré de torsion peuvent provoquer une perte de la spermatogenèse chez le rat en entraînant également une réduction significative de la production d'androgènes testiculaires à long terme (Turner *et al.*, 2005). Le lien entre les

varicocèles et l'infertilité masculine fait l'objet d'un débat depuis plus d'un demi-siècle. La varicocèle est considérée comme la cause corrigible la plus courante de l'infertilité masculine (Jensen *et al.*, 2017). Le stress oxydatif semble jouer un rôle central dans la pathogenèse de l'infertilité induite par la varicocèle (Tsoumanis *et al.*, 2018). La cryptorchidie est le trouble génito-urinaire le plus fréquent de l'enfance. Sur les 3 % d'enfants nés à terme qui en sont atteints, la plupart auront des testicules qui descendront normalement en quelques mois, tandis que les 1 % restants, dont la cryptorchidie persiste, doivent envisager une intervention médicale ou chirurgicale (Trussell *et Lee*, 2004), car les principales complications associées à la cryptorchidie sont l'infertilité et le cancer (Bitran *et al.*, 2020). Une variété de médicaments délivrés sur ordonnance peut altérer la fertilité par un effet toxique direct sur les cellules germinales ou interférer avec l'axe reproducteur. Le kétoconazole et la spironolactone perturbent la stéroïdogénèse testiculaire et abaissent les taux sériques de testostérone. La cimétidine agit comme un antagoniste des androgènes (Tanagho *et McAninch*, 2008). Certaines chimiothérapies anticancéreuses, la radiothérapie touchant la sphère pelvienne et scrotale. Les dysfonctionnements sexuels sont une conséquence fréquente du traitement du cancer. Ils touchent au moins la moitié des hommes traités pour des tumeurs malignes pelviennes et plus d'un quart des personnes atteintes d'autres types de cancer (Schover *et al.*, 2014). Les oreillons, due à un virus ARN du groupe des paramyxoviridae dont l'homme est le seul hôte naturel, est une maladie qui émerge à nouveau du fait de la diminution de la couverture vaccinale, peuvent se compliquer d'une l'orchi-épididymite qui concerne 15 à 30 % des hommes pubères. L'atteinte est bilatérale dans 25% des cas. Les anomalies du spermogramme sont assez fréquentes, la stérilité est rare (Vaccinés, 2014; Cohen *et al.*, 2020). Les maladies sexuellement transmissibles telles que la gonorrhée et la chlamydia peuvent également entraîner l'infertilité chez l'homme en raison d'une obstruction de l'épididyme (Tsoumanis *et al.*, 2018). L'épididymite peut provoquer une réaction inflammatoire intense dont les pathogènes associés sont les suivants : chlamydia, gonorrhée, brucellose, trichomonas, mycoplasme, uréaplasme, adénovirus, bactéries coliformes et entérovirus (Baker *et Sabanegh*, 2013). Les agents pathogènes bactériens présents dans le plasma séminal peuvent réduire la motilité des spermatozoïdes, induire une apoptose ou une nécrose, altérer la morphologie des spermatozoïdes et ainsi affecter directement la qualité du sperme. Les principaux organismes bactériens des maladies sexuellement transmissibles qui affectent le sperme sont *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae gonorrhoeae*, *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.* et *Treponema pallidum*. Les autres agents pathogènes comprennent les infections protozoaires, principalement *Trichomonas vaginalis*, et les infections virales telles

que le papillome humain, le virus de l'herpès simplex, les virus de l'hépatite B et C et le cytomégalo virus humain (Lorusso *et al.*, 2010; Rybar *et al.*, 2012).

3.3. Causes post-testiculaires (par obstacle des voies excrétrices)

La déficience post-testiculaire, acquise ou congénitale, est due à soit à un dysfonctionnement éjaculatoire, soit à une obstruction à la délivrance des spermatozoïdes. Le site d'obstruction peut être situé dans l'épididyme, le canal déférent ou le canal éjaculateur (Lee *et Seo*, 2012). L'obstruction épидидymaire est la cause la plus fréquente de déficience post-testiculaire. Parmi les formes acquises, celles secondaires à une infection épидидymaire sont considérées comme les plus fréquentes. L'obstruction acquise du canal déférent peut être le résultat d'une infection, d'une vasectomie ou d'une hernie inguinale (Jungwirth *et al.*, 2012). L'absence bilatérale congénitale du canal déférent (ABCD) se retrouve chez 1 sur 1 600 hommes et chez la plupart des hommes atteints de fibrose kystique (FK) (Kassogué *et al.*, 2014). Le syndrome de Young, également connu sous le nom d'azoospermie sinopulmonaire, de syndrome de sinusite-infertilité et de syndrome de Barry-Perkins-Young, est une affection rare qui englobe une combinaison de syndromes tels que la bronchectasie, la rhinosinusite et une fertilité masculine réduite en raison d'une obstruction fonctionnelle du transport des spermatozoïdes dans l'appareil génital (Mohammed *et Jan*, 2019). L'obstruction du canal éjaculatoire se retrouve dans 1-3% des cas de déficience post-testiculaire (Huang *et al.*, 2018). Ces obstructions peuvent être classées comme kystiques ou post-inflammatoires. Les obstructions kystiques sont généralement congénitales (kyste du conduit de kyste du canal müllérien ou kystes du sinus urogénital/utriculaire) et sont situées médialement dans la prostate, entre les canaux éjaculateurs. L'obstruction post-inflammatoire du canal éjaculateur est généralement secondaire à une prostatite urétrale. Les obstructions complètes congénitales ou acquises des canaux éjaculateurs ou des vésicules séminales sont généralement associées à un faible volume de sperme, une diminution ou une absence de fructose séminal, et un pH acide du liquide séminal (Jungwirth *et al.*, 2012). De plus, l'incapacité de mener à terme un rapport sexuel avec une éjaculation intravaginale interdit toute fécondation à partir des spermatozoïdes déposés dans la glaire cervicale, en période périovulatoire féminine. À l'insuffisance érectile, l'anéjaculation ou l'éjaculation rétrograde s'ajoutent les troubles ballistiques de l'éjaculation dus aux malformations péniennes et pelviennes importantes (Schlosse *et al.*, 2007).

3.4. Infertilités masculines idiopathiques

Le dysfonctionnement testiculaire peut être subdivisé en défaillance testiculaire congénitale, acquise ou idiopathique (Vander *et Wyns*, 2018). L'infertilité idiopathique se caractérise par une oligospermie, une asthénospermie, ou une tératospermie sans cause observable et concerne environ 30 % des hommes infertiles (Hamada *et al.*, 2012). Environ la moitié des hommes infertiles qui consultent n'ont pas de cause spécifique pouvant être déterminée pour l'anomalie séminale. Ces hommes sont souvent soumis à un certain nombre de thérapies médicales dont l'efficacité est douteuse. Le traitement médicamenteux de l'infertilité masculine idiopathique est au mieux empirique. Il n'y a pas de bénéfice clair à utiliser un quelconque médicament chez ces patients. De plus, les androgènes ne doivent pas être utilisés car ils peuvent en fait supprimer la spermatogenèse (Kumar *et al.*, 2006). Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la santé reproductive masculine, l'infertilité masculine idiopathique, qui se caractérise par une altération des caractéristiques du sperme sans cause identifiable et l'absence de facteur d'infertilité féminine, reste un problème difficile à diagnostiquer et à gérer. Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que le stress oxydatif (SO) joue un rôle indépendant dans l'étiologie de l'infertilité masculine, 30 à 80 % des hommes infertiles présentant des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène dans le sperme (Agarwal *et al.*, 2019). Le SO peut avoir un effet négatif sur la fertilité par le biais de plusieurs voies, notamment en interférant avec la capacitation et en endommageant éventuellement la membrane et l'ADN des spermatozoïdes, ce qui peut compromettre leur capacité à féconder un ovule et à se développer en un embryon sain. Une évaluation adéquate du potentiel reproductif masculin devrait donc inclure une évaluation du stress oxydatif des spermatozoïdes (Bisht *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2019). De nombreuses études ont indiqué que les modifications épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN dans les gènes impliqués dans le développement, les modifications de la queue des histones et les ARN non codants courts dans les spermatozoïdes peuvent jouer un rôle dans l'infertilité masculine idiopathique (Bisht *et al.*, 2017). En outre, les polluants environnementaux et les caractéristiques du mode de vie peuvent également détériorer la qualité du sperme. Les conséquences d'une activité physique réduite, de l'obésité, de l'alcoolisme, du tabagisme, du stress psychologique et de l'utilisation de téléphones portables sur l'infertilité masculine idiopathique ont aussi été incriminés (Dimitriadis *et al.*, 2017).

Chapitre II : Généralités et toxicologie de l'Aluminium

1. Aluminium

1.1. Propriétés physico-chimiques

L'aluminium (Al) est le treizième élément du tableau périodique. 8,3% de la croûte terrestre est composée d'Al. L' Al^{27} est l'isotope naturel bien qu'il existe un Al^{26} radioactif artificiel avec une demi-vie de $7,2 \times 10^5$ ans. En raison de sa longue demi-vie et le fait qu'il s'agit d'un émetteur β et γ , l'utilisation de cet isotope comme sonde scientifique est limitée. Dans la plupart des systèmes naturels, une très petite fraction de l'aluminium se trouve sous forme d'ion simple Al^{3+} . Ainsi, la toxicocinétique de l'aluminium dépendra des propriétés physiques, chimiques et biologiques des divers complexes d' Al^{3+} (Harris *et al.*, 1996). À pH 6,2 la solubilité de l' Al^{3+} est faible mais augmente avec des solutions acides ou alcalines, par ailleurs, la solubilité de l'Al peut être considérablement augmentée en présence de ligands organiques et inorganiques (Soni *et al.*, 2001). Étant donné que l'aluminium a un rapport charge / rayon élevé, thermodynamiquement, il est prédit que le métal préfère la liaison électrostatique plutôt que covalente (Berthon, 1996). En solution aqueuse, l'hydrolyse libre de l' Al^{3+} permet de former une large gamme de complexes avec l'eau. Le pH de la solution détermine les espèces d'Al et ses formes ioniques présentes (Corain *et al.*, 1996). Ainsi, dans les milieux basiques, l'Al existe sous la forme anionique tandis que dans les solutions acides, il est trouvé sous forme cationique. Puisque l'aluminium est un très puissant accepteur d'oxygène, il a également tendance à se lier à d'autres donneurs d'oxygène tels que le citrate, le phosphate, acide lactique, acide oxalique, acide citrique et catécholamines (Harris *et al.*, 1996).

1.2. Histoire de l'aluminium

L'utilisation de l'aluminium en tant que métal tel qu'on le connaît actuellement est un concept relativement nouveau dans notre histoire. Ses propriétés à former des composés extrêmement stables avec d'autres éléments chimiques, généralement sous forme de cation $3+$, et sa réaction avec l'oxygène de l'atmosphère pour former de l'oxyde d'aluminium, Al_2O_3 , font de lui un élément qui n'est pas disponible facilement sous sa forme élémentaire, la raison pour laquelle il n'a été isolé que relativement tard (Brough *et* Jouhara, 2020). La dénomination « Aluminium » a été proposée pour la première fois en 1808 par Humphry Davy lorsqu'il a émis l'hypothèse que l'aluminium serait un produit de la réduction électrolytique de l'oxyde d'aluminium (Witte, 2010). Ce dernier n'a pas prouvé cette théorie; il a fallu attendre 1845 pour que le chimiste allemand, Friedrich Woehler, produise le premier échantillon d'aluminium pur (Kragh 2019). En 1856 le chimiste français, Saint-Claire Deville, développe la première

application industrielle pour ne produire en 36 ans que 200 tonnes d'aluminium (Ashkenazi, 2019). Ce n'est qu'en 1886 que la méthode actuelle de production d'aluminium primaire a été établie. Dans la même année, mais indépendamment sur différents continents, Paul Héroult et Charles Hall ont découvert pour la première fois la réduction de l'oxyde d'aluminium fondu dans la cryolite (Na_3AlF_6) comme méthode de production moins chère en partageant le brevet et en nommant le processus Héroult-Hall (Le Roux, 2015). Karl Joseph Bayer, a découvert en 1887 que l'alumine pouvait être extraite du minerai, la bauxite, (du nom de la province des Baux en France) et être utilisée comme matière première bon marché pour le procédé Héroult-Hall. Le processus d'extraction consiste à utiliser une solution alcaline (Na_2CO_3) pour dissoudre sélectivement Al_2O_3 des autres impuretés dans le minerai, puis le recristalliser sous une forme plus pure (Brough et Jouhara, 2019).

2. Sources d'exposition à l'aluminium

2.1. Aluminium dans l'air

Les activités humaines, telles que l'exploitation minière et l'agriculture, constituent la plus grande source de particules contenant de l'Al en suspension dans l'air (Rout *et al.*, 2001). Environ 13% de l'aluminium atmosphérique est attribué à l'émissions anthropiques dont les principales sources de particules contenant de l'Al sont la combustion du charbon, la production d'Al et d'autres produits industriels (Ingerman *et al.*, 2008). En plus d'être des composants de la croûte terrestre, les oxydes d'aluminium se retrouvent dans les émissions anthropiques. Ces émissions comprennent celles provenant des processus industriels et métallurgiques, de la combustion de combustibles fossiles, des moyens de transport tels que les véhicules diesel, l'usure des pneus, et la poussière de route (Sanderson *et al.*, 2014). Une gamme de concentrations d'Al de 100 à 1000 ppm/m³ est issue des émissions de particules atmosphériques des fonderies de fer et d'acier et des raffineries de laiton et de bronze.

2.2. Aluminium dans l'eau

L'Aluminium est omniprésent dans les eaux naturelles en raison de l'érosion chimique des roches ce qui libère ces éléments chimiques de la roche sous forme d'ions dissous dans l'eau conduisant à une mobilisation du milieu terrestre au milieu aquatique (Theodore et Theodore), mais aussi par une oxydation de la roche ou son hydratation, là où il en résulte par exemple des sols argileux ou de latérites (roches rouges composées d'oxydes de fer et d'aluminium) (Mishra *et Gostu*, 2017). Cette mobilisation d'Al est souvent de nature saisonnière et est associée au pH des dépressions (acidification) survenant pendant la fonte

des neiges printanières ou associés à l'érosion suite aux pluies acides (Oludare 2017; Houben *et al.*, 2019). Les concentrations d'Al dans les eaux de surface peuvent être augmentées directement ou indirectement par les activités humaines à travers les rejets municipaux, ruissellement de surface, infiltration des eaux souterraines et dépôts atmosphériques humides et secs (Water, 1998). L'utilisation des composés d'Al comme des agents coagulants tels que le sulfate d'aluminium dans le traitement de l'eau potable pourrait aussi augmenter sa teneur en Al (Krupińska, 2020). Dans l'eau pure, l'Al a une solubilité minimale dans la gamme de pH allant de 5,5 à 6,0 alors que les concentrations d'Al dissous augmentent à des valeurs de pH supérieures ou inférieures à cette gamme (Abdullah, 2014).

2.3. Aluminium dans les aliments

L'Al est présent dans les aliments naturellement ou après l'utilisation d'Additifs alimentaires contenant de l'Al (Yokel 2012). Ses concentrations dans les aliments et les boissons varient considérablement, selon le produit alimentaire, le type de transformation utilisées, et les zones géographiques dans lesquelles les cultures vivrières sont cultivées (Aguilar *et al.*, 2008). Les aliments les plus riches en Al sont ceux qui en contiennent sous forme additifs (Saiyed et Yokel, 2005). L'utilisation d'ustensiles de cuisine et d'emballages en Al peut augmenter la concentration de ce métal dans les aliments (Stahl *et al.*, 2018; Koo *et al.*, 2020). La migration de l'Al des ustensiles de cuisine aux aliments augmente avec l'acidité de la nourriture et la durée de l'exposition (Ranau *et al.*, 2001; Schäfer et Seifert, 2006). Certains aliments se trouvent naturellement riches en Al tels que les pommes de terre, les épinards et le thé (Pennington et Schoen, 1995; Mandal et Kaur, 2020). Les apports quotidiens en Al chez les humains provenant de la nourriture varient de 3,4 à 9 mg / jour (González-Weller *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

2.4. Aluminium dans les produits pharmaceutiques et agrochimiques

La voie d'intoxication avec des produits pharmaceutiques et agrochimiques peut être due à l'inhalation d'aérosols, ingestion de médicaments ou par administration parentérale (Cutler *et al.*, 1999). L'hydroxyde d'aluminium est largement utilisé dans les produits pharmaceutiques tels que les antiacides, l'aspirine tamponnée, les antidiarrhéiques, les antiulcéreux et comme adjuvant dans certains vaccins, ainsi que dans certains produits de soins personnels tels que les antiseptiques de premiers soins, crèmes solaires et de bronzages (Niu, 2018). D'autres articles de consommation tels que les dentifrices, désinfectants, fumigants, pesticides, les anti-transpirants et certains cosmétiques peuvent être considérer

comme de potentielles sources d'exposition à l'Al (Pineau *et al.*, 2014; Borowska et Brzóška, 2015). L'hydroxyde d'Al, Phosphate d'Al, sulfate de potassium d'Al (alun) et le silicate d'Al (zéolite) sont utilisés dans la préparation d'un certain nombre de vaccins pour adsorber les composants antigéniques et servir de adjuvant qui améliore la réponse immunitaire (Pavelić *et Hadžija*, 2003; Krewski *et al.*, 2007). Il est peu probable que les administrations parentérales d'aluminium soient une source d'exposition à l'Al pour le bétail ou les animaux de compagnie. La nourriture et l'eau pour bétail pourrait aussi être contaminée par l'Al lorsque le $Al_2(SO_4)_3$ et la zéolite sont appliqués sur la litière et les déchets lagunaires pour réduire la perte de phosphore des terres fertilisées avec les déchets et pour réduire les fumées d'ammoniac dans les installations (Moore *et al.*, 2000; Codling *et al.*, 2002).

3. Toxicologie de l'aluminium

3.1. Absorption

Toutes les surfaces externes du corps, principalement la peau, le nez, les poumons et le tractus gastro-intestinal constituent des voies potentielles d'absorption d'Al dans le corps en contribuant directement à élever la charge corporelle globale de l'aluminium (Exley *et al.*, 1996).

3.1.1. Peau

L'épiderme externe ou *Stratum corneum* de la peau est une couche énucléée de cellules riches en kératine maintenues dans une matrice intercellulaire à prédominance lipidique. Le transport de l'Al appliqué localement, tel qu'un antisudorifique ou un écran solaire, à travers cette couche impliquerait une diffusion passive par les voies trans- et paracellulaires (Flarend *et al.*, 2001). De plus, la couche cornée est ponctuée de canaux sudoripares apocrines et eccrines ainsi que de follicules pileux et ceux-ci permettent à l'aluminium d'accéder à l'épiderme, au derme et à l'hypoderme (Yanagishita *et al.*, 2012). Bien que les preuves à ce jour montrent que seule une très petite proportion d'Al dans l'antisudorifique appliqué localement pénètre dans la circulation sanguine pour être finalement excrété par le rein (Rochman *et al.*, 2021), ceci n'exclut pas l'hypothèse de la persistance de l'Al dans les structures de la peau (Guillard *et al.*, 2012), et ça n'exclut pas non plus son entrée dans le système lymphatique (Mold *et al.*, 2018). La nature des composés à base d'Al présents dans les applications topiques, la quantité du métal appliquée et la régularité et la fréquence des applications contribuent significativement dans la charge de la peau en Al (Flarend *et al.*, 2001).

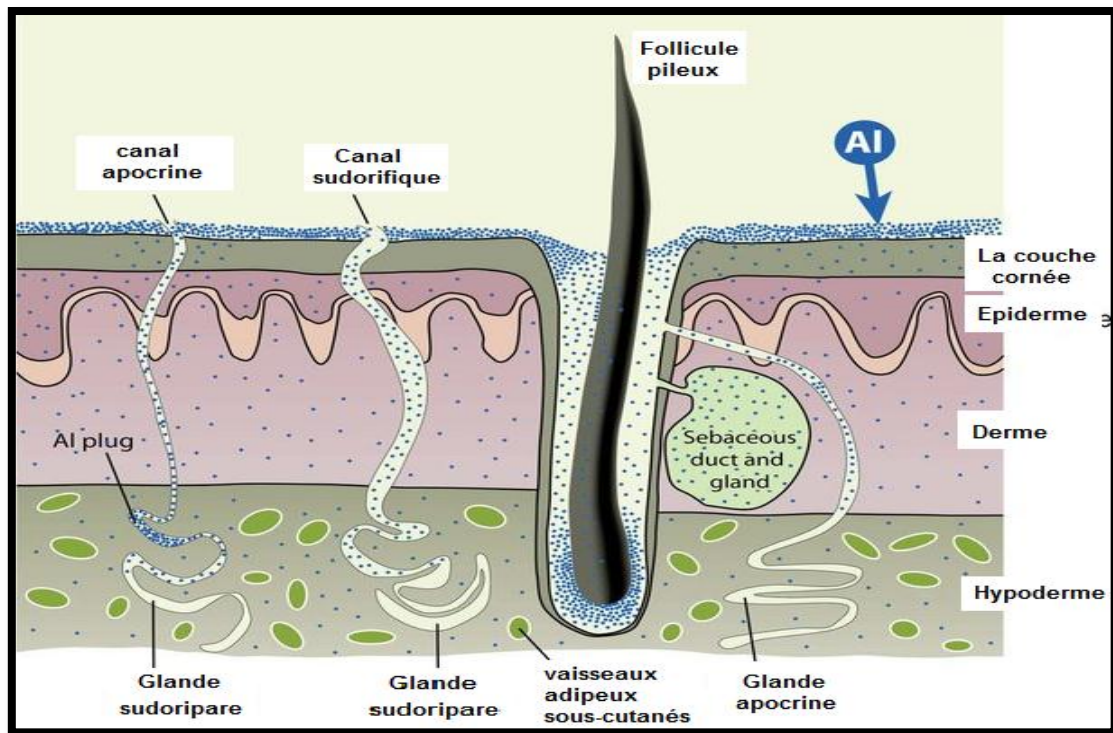


Figure 7. Schématisation des voies de pénétration et d'accumulation locale et systémique de l'Al à travers la peau (Exley, 2013).

3.1.2. Nez

Lorsque l'Al pénètre dans la cavité nasale, comme aérosol des anti-transpirant ou sous forme de particules en suspension dans l'air, il est dirigé soit vers l'épithélium respiratoire ou vers l'épithélium olfactif et ensuite vers le bulbe olfactif et les neurones sensoriels olfactifs de la cavité nasale pour atteindre le système nerveux central par une voie directe, en contournant la circulation systémique (figure 8) (Divine *et al.*, 1999; Abbasali *et al.*, 2005). L'Al qui entre en contact avec l'épithélium respiratoire se dissout dans les couches de mucus et sera transporté par les cils qui tapissent l'épithélium vers l'arrière de la gorge par la clairance mucociliaire en le déplaçant vers l'intestin. Tandis que, l'Al qui traverse les couches du mucus restera à l'intérieur de l'épithélium respiratoire et peut être une source à la fois locale et systémique de biodisponibilité de l'Al (Chalansonnet *et al.*, 2018).

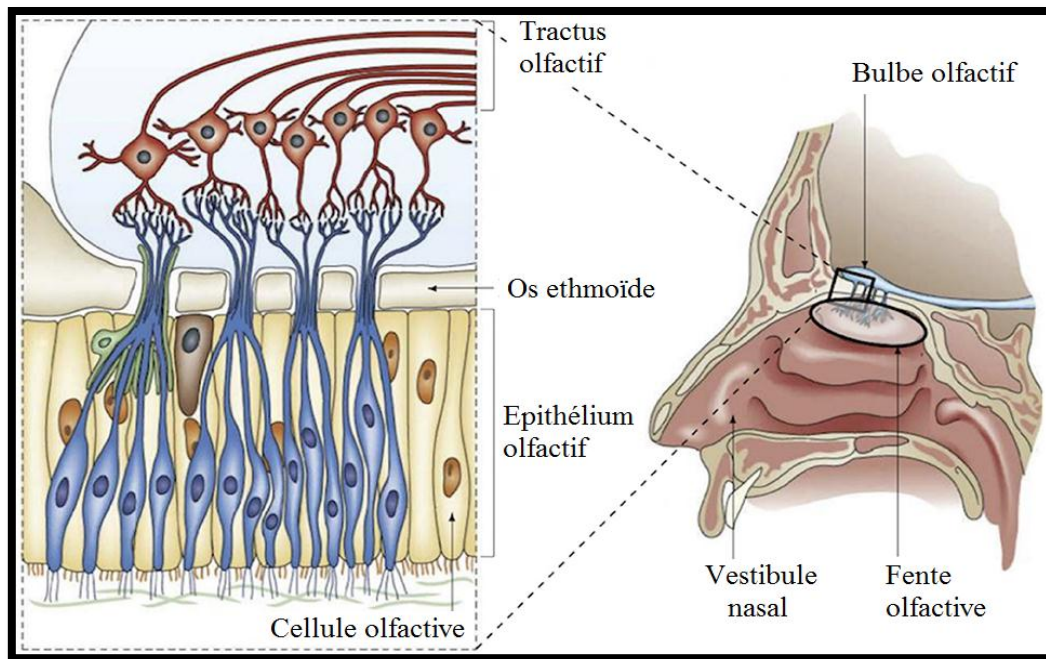


Figure 8. Illustration de la voie possible de pénétration de l'Al à travers l'épithélium olfactif, avec à droite une vue globale de la cavité nasale et à gauche une vue détaillée des tissus qui recouvrent le toit de la fente olfactive (Girerd *et al.*, 2018).

3.1.3. Poumons

L'inhalation et l'ingestion sont les deux principales voies par lesquelles l'Al peut pénétrer dans le corps (Yang et Massey, 2019). Les poumons en permanence reçoivent l'Al principalement sous forme de particules de silicates d'aluminium et autres composés peu solubles (Martin, 2007; Wu *et al.*, 2010). La concentration d'Al dans les poumons a tendance à augmenter avec l'âge et peut entraîner des anomalies respiratoires dans les lieux de son accumulation (Kongerud et Søyseth, 2014; Li *et al.*, 2018). L'Al est un composant important dans de nombreuses formulations cosmétiques en particulier comme aérosol dans les agents antisudorifiques, ce qui contribue de manière significative à l'exposition à l'Al par voie aérienne (Exley, 2013). Les épithéliums pulmonaires sont diversifiés en ce qui concerne leur composition cellulaire dont l'épithélium alvéolaire en particulier composé d'une myriade de protéines et de canaux de transport. La nature hautement dynamique de l'épithélium pulmonaire fait de lui un site d'accumulation et d'absorption de l'Al dans les tissus pulmonaires et d'accès à la circulation systémique (Riihimäki *et al.*, 2012).

3.1.4. Intestin

Le régime alimentaire est un autre contributeur important à la charge corporelle en Al (Filippini *et al.*, 2019). Le tractus gastro-intestinal est le récepteur immédiat de l'Al ingéré ou

de celui éliminé du nez et des poumons par la clairance mucociliaire (Exley, 2009). Le tractus gastro-intestinal présente un large spectre de milieux d'exposition pour l'Al, qui sont significativement influencés par les différences de pH lumineaux, et offre ainsi des opportunités pour son absorption, sa rétention dans les tissus et les muqueuses, ou son élimination dans les selles (Powell *et al.*, 1999). L'absorption d'Al par voie gastro-intestinale est complexe et est influencée par divers facteurs, y compris les différences individuelles, âge, pH, le contenu de l'estomac et le type de composé d'Al (Vignal *et al.*, 2016). L'absorption d'Al des prises d'eau est supérieure (environ 0,3%) à celle de la nourriture (environ 0,1%). Cela a été attribué aux ligands organiques dans les aliments tels que les phytates et les polyphénols qui peuvent former des complexes avec l'ion Al et inhibent son absorption (Reto *et al.*, 2007). L'absorption de l'Al via le tractus gastro-intestinal peut être améliorée en présence de citrate, de maltol, de lactate et de fluorure dans l'eau ou les aliments, et en cas de maladies rénales chroniques, tandis que l'absorption est réduite chez les personnes surchargées de fer, ou lorsqu'il est ingéré avec du phosphate, du silicium, polyphénols et acide sialique (Zhou *et al.*, 2008; Yokel, 2012).

3.2. Distribution

Le sang est probablement le principal réseau de distribution de l'aluminium systémique, bien qu'il n'existe pas de données qui excluent la présence de ce métal dans la lymphe (Jeffery *et al.*, 1996; Exley *et al.*, 2011). Certaines données montrent des concentrations importantes d'Al dans la sueur, ce qui suggère que le système lymphatique pourrait jouer un rôle dans le transport de cet élément dans l'organisme (Genuis *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2012). L'Al présent dans le sang est associé à des fractions sériques et cellulaires (Beardmore *et al.*, 2007; Exley *et al.*, 2007). La chimie de l'Al est similaire à celle du fer et le métal est transporté vers les tissus principalement par la transferrine, une protéine liant le fer. Environ 90% de l'Al total est lié à cette protéine de transport et comme elle n'est que partiellement saturée, tout l'aluminium présent dans le sérum est lié à la transferrine (Harris 1996; Karaš *et al.*, 2020). Les 10 % d'Al qui ne sont pas liés à la transferrine seraient associés à des espèces chimiques de faible masse moléculaire formant des biocomposés d'Al dont le complexe Al-citrate semble être l'espèce prédominante de faible masse moléculaire dans le sérum (Cabezuelo *et al.*, 1997; Weisser *et al.*, 2019). La charge corporelle totale d'Al chez les humains en bonne santé a été rapportée à environ 30-50 mg/kg de poids corporel et les niveaux normaux d'Al dans le sérum sont d'environ 1-3 µg/L (Krewski *et al.*, 2007). Le principal mécanisme par lequel l'Al pénètre dans les cellules est l'endocytose médiée par les

récepteurs de la transferrine (Tsialtas *et al.*, 2020). Une étude a rapporté que les concentrations en Al chez les patients hémodialysés étaient dix fois plus élevées que celles des personnes non hémodialysées (Chen *et al.*, 2010). Chez des lapins injectés par voie intramusculaire avec de l'hydroxyde de Al^{26} ou du phosphate de Al^{26} , le métal a été distribué à de multiples organes y compris le cerveau (Flarend *et al.*, 1997). Le cerveau est un organe cible important de la toxicité de l'aluminium et ce métal est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Banks *et al.*, 2006). Néanmoins, l'élimination de l'aluminium du cerveau est beaucoup plus lente que celle des autres organes. Sa demi-vie d'élimination du cerveau humain est calculée comme étant de sept ans. Il est peu probable que les complexes Al-protéines traversent directement la BHE en raison de leur grande taille, mais un mécanisme possible est l'endocytose médiée par les récepteurs de la transferrine sachant que ces récepteurs sont présents sur les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, les cellules épithéliales des plexus choroïdes, les neurones et les cellules gliales (Moos et Morgan, 2000; Yokel et McNamara, 2001). L'Al a également été trouvé dans la peau humaine, le tractus gastro-intestinal inférieur, les ganglions lymphatiques, les glandes surrénales, les glandes parathyroïdes et dans la plupart des organes des tissus mous (Greger *et al.*, 1997; *et al.*, 2015). Des études indiquent que les niveaux d'aluminium augmentent avec l'âge dans les tissus et les organes (os, muscles, poumons, foie et reins) des animaux de laboratoire (Krewski *et al.*, 2007). Le statut du fer est négativement corrélé avec l'accumulation d'Al dans les tissus et les expériences sur les animaux ont montré qu'une carence en calcium et en magnésium peut contribuer à l'accumulation de l'aluminium dans le cerveau et les os (Jeffery *et al.*, 1996; Wenwen *et al.*, 2019). Il a également été signalé que l'Al peut atteindre le placenta et le fœtus et, dans une certaine mesure, passer dans le lait lors de l'allaitement (Dórea et Marques, 2010; Pi *et al.*, 2019).

3.3.Élimination

Comme l'Al forme des composés hydroxydes hautement insolubles à pH neutre, une quantité importante de l'Al alimentaire est excrétée dans les fèces sans jamais être absorbée. des études démontrent qu'une grande partie de l'Al ingéré par voie orale est éliminé dans les fèces dans un intervalle de sept jours (Priest *et al.*, 1998; Nie, 2018). L'Al est excrété par l'organisme par un certain nombre de voies, notamment par les fèces, l'urine, la sueur, la peau, les cheveux, les ongles, le sébum et le sperme (Klein *et al.*, 2014; Inan-Eroglu, et Ayaz 2018). L'Al présent dans la circulation sanguine est principalement éliminé par les reins (environ 95 %) dans l'urine, sous forme de citrate d'Al (Shirley et Lote, 2005). L'Al est

également excrété dans le lait, la bile et les fèces (Al-Ashmawy, 2011; Hall *et al.*, 2018). L'excrétion urinaire de l'Al est améliorée par des chélateurs chimiques tels que la déféroxamine et les acides malique, malonique, citrique, oxalique et succinique (Andersen, 2004; Yokel, 2012). Pour des niveaux normaux d'exposition à l'aluminium par voie alimentaire, le système biliaire semble être la principale voie d'excrétion, mais à environ 1 mmol d'Al, ce système est saturé et l'excrétion rénale commence à jouer un rôle important. Ainsi, une charge importante d'aluminium, comme celle qui est souvent utilisée dans les milieux expérimentaux, nécessite l'excrétion de l'Al par les reins. Environ 90 % de de l'excrétion de l'aluminium par les reins se produit dans les 48 heures après l'exposition (figure 9) (Shirley *et Lote*, 2005; Orr *et Bridges*, 2017).

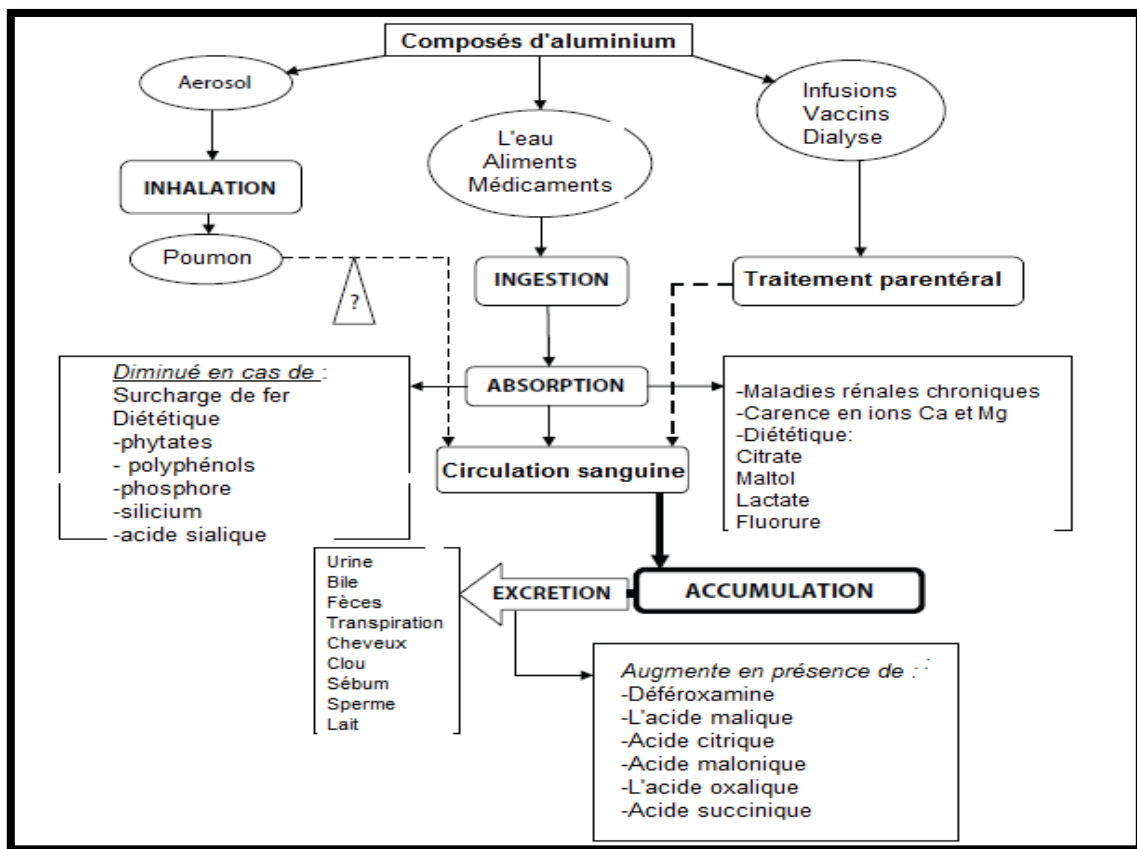


Figure 9. Facteurs affectant l'accumulation et la toxicité de l'aluminium dans les tissus (Igbokwe *et al.*, 2019).

4. Les principaux effets toxiques de l'aluminium

Les expérimentations sur les animaux et les plantes ainsi que les expériences sur des cultures cellulaires végétales, animales et humaines ont permis de mieux comprendre la toxicologie de l'aluminium dont principaux effets sont cités ci-dessous :

4.1. Effets sur le système nerveux central

L'aluminium figure en tête de liste d'éléments inorganiques neurotoxiques et de leurs composés. Il est lié au développement de maladies neurodégénératives, notamment l'autisme, les troubles de l'attention, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer, la démence, le syndrome de la guerre du Golfe et le parkinsonisme (Rondeau *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2016). L'Al est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire (Sharma *et Mishra*, 2006). Dans les années 70, la communauté néphrologique a été alertée pour la première fois de l'apparition d'une pathologie humaine épidémique induite par une intoxication aiguë à l'aluminium chez des patients sous hémodialyse qui recevaient régulièrement des chélateurs à base de phosphate d'Al (Seidowsky *et al.*, 2018). Des symptômes d'une encéphalopathie sévère et d'une concentration élevée d'Al dans le cerveau ont également été signalés chez un garçon urémique qui n'était pas sous dialyse, mais qui était traité avec de l'hydroxyde d'Al par voie orale (Campbell, 2002). Une autre étude de cas a impliqué l'Al comme facteur causal d'un syndrome d'encéphalopathie de dialysé en démontrant que les symptômes ont complètement disparu après l'arrêt de la prise d'Al par voie orale (Malaki, 2013). En juillet 1988 les habitants de Camelford (sud-ouest de l'Angleterre) ont subi des dommages considérables de leur fonction cérébrale, qui n'étaient pas liés à l'anxiété, après être exposés à de l'eau potable contaminée par 20 tonnes de sulfate d'Al (Altmann *et al.*, 1999). Les niveaux d'Al ont été évalués chez 118 patients atteints de maladies neurodégénératives : sclérose en plaques (SEP), SLA, maladie de Parkinson (MP) et maladie d'Alzheimer (MA), ainsi que chez 73 sujets sains. La SEP a été diagnostiquée dans 85,6 % de l'ensemble des maladies neurodégénératives (MN). L'Al était présent dans 44,8% des cas comprenant des MN. Le niveau d'Al était significativement plus élevé chez les patients atteints de maladies neurodégénératives que chez les sujets sains. Le traitement par chélation à l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) a réduit la charge en Al chez les patients atteints de MN et améliore leur état clinique (Fulgenzi *et al.*, 2014). Bien que la neurotoxicité de l'aluminium soit documentée, il est communément admis que les adultes en bonne santé peuvent tolérer des expositions orales répétées à l'aluminium (jusqu'à 3500-7200 mg/jour à partir d'antiacides et d'aspirine tamponnée) sans aucun effet toxique. Cela s'explique par la faible absorption et l'excrétion rapide et principalement urinaire de l'Al. Néanmoins, de faibles doses quotidiennes d'aluminium peuvent provoquer une intoxication systémique chez les patients souffrant d'insuffisance rénale, les prématurés et les jeunes enfants (Krewski *et al.*, 2007).

4.2.Effets sur le système respiratoire

La poussière d'Al a un effet dangereux sur le système respiratoire des travailleurs de la production d'aluminium. Il est démontré qu'ils souffrent de symptômes respiratoires tels que la toux, la respiration sifflante, la dyspnée et l'oppression thoracique. Les ouvriers qui respirent de grandes quantités de poussières d'Al peuvent souffrir d'un large éventail de maladies pulmonaires : bronchite chronique, maladie pulmonaire obstructive chronique, asthme, alvéolite, pneumoconiose et même maladies respiratoires oncologiques (Donoghue *et al.*, 2011; Shaaban *et al.*, 2016).

4.3.Effets de l'aluminium sur la peau

Les sels d'Al, en particulier le chlorhydrate d'aluminium, sont utilisés dans divers produits cosmétiques anti-transpirants, car ils bloquent la sécrétion de sueur (Pineau *et al.*, 2012). Il a été montré que la pénétration du chlorhydrate d'aluminium était très faible (environ 0,01 %) après une application cutanée (Flarend *et al.*, 2001). La peau intacte est une barrière efficace contre l'exposition à l'Al et ses effets sur les kératinocytes humains sont supposés être minimes. Cependant, l'étude des interactions entre les nanoparticules d'Al et les kératinocytes de l'épiderme humain a montré que ces particules sont localisées dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules et qu'il existe des interactions avec les cytokines (Monteiro-Riviere *et al.*, 2010). Des quantités cutanées d'Al de l'ordre de 0,5 à 1,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ont été mises en évidence après l'application de trois formulations antiperspirantes différentes sur une peau intacte. Tandis que l'absorption d'Al après application topique d'un antisudorifique, à travers la peau pré-endommagée (peau dénudée) était significativement plus élevée (11,50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Pineau *et al.*, 2012).

4.4.Effets hépato-rénaux et pancréatiques

Le foie est le principal carrefour métabolique de l'organisme. Ce qui fait de lui un organe cible de multiple agent xénobiotiques. Il est parfaitement connu que l'Al peut s'accumulé dans la plupart des organes et tissus mous y compris le foie (Greger *et al.*, 1997; Muselin *et al.*, 2015). Son accumulation dans les tissus et les organes est à l'origine de leur dysfonctionnement et leur toxicité (Pandey *et Jain*, 2013). Des changements morphologiques et morphométriques hautement suggestifs d'une hépatite toxique ont été enregistrés chez des rats Albino Wistar traités avec du AlCl_3 dissous dans de l'eau distillée par voie intragastrique pendant 21 jours. Des modifications histologiques ont été observées ainsi que des

changements dégénératifs au niveau cellulaire : variations nucléaires telles que caryorrhexis et pyknose (Agarwal *et* Gupta, 2010). Une augmentation significative des taux plasmatiques des transaminases, ainsi qu'une réduction significative du taux de protéines totales, et un niveau significatif de stress oxydatif dans le tissu hépatique ont également été enregistrés chez des rats traités à l' AlCl_3 (Cheraghi *et* Roshanaei, 2019). Une augmentation de l'excrétion de la transferrine dans la bile, ainsi qu'une accumulation d'acides biliaires dans le sérum des rats ont également été constatés après exposition à l'Al (Klein *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2017). L'Al provoque également des lésions oxydatives au niveau des reins et du foie, entraînant une dégénérescence et une nécrose de ces tissus, et des perturbations biochimiques sériques associés (Yan-fei *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017). Des rats traités par voie intrapéritonéale avec du chlorure d'Al à raison de 10 mg/kg pendant 30 jours présentaient une augmentation significative de la glycémie à jeun, insuline sérique et l'indice de résistance à l'insuline aux jours 10 et 20 du traitement (Wei *et al.*, 2018). Une étude de cas a révélé que l'ingestion de granulés de phosphore d'Al a provoqué une pancréatite aiguë chez un patient (Verma *et al.*, 2007). Une autre étude a démontré une nécrose modérée des îlots pancréatiques, associée à une altération de la glycémie à jeun, après exposition orale (50 mg/kg pendant 28 jours) des rats au chlorure d'Al (Igwenagu *et al.*, 2020).

4.5. Effets sur le tissu osseux et le système musculo-squelettiques

L'Al s'accumule le plus facilement au niveau du tissu osseux en créant des interférences avec le phénomène de minéralisation osseuse, là où il va former des cristaux aux endroits habituels où se dépose le calcium nécessaire à la minéralisation (Chappard *et al.*, 2016). L'étude des effets de divers composés d'Al administrés par voie orale à des souris sur la distribution de l'Al dans les tissus et les concentrations tissulaires des éléments essentiels (Ca, Fe, Cu et Mg), montre que l'accumulation d'Al s'accompagne de changements dans les concentrations de ces éléments au niveau osseux (Długaszek *et al.*, 2000). On trouve également des dépôts d'Al dans les cas d'hydroxyapatite de la matrice osseuse chez les patients atteints de maladies cœliaques en raison d'une perméabilité intestinale accrue, et en cas d'utilisation à long terme de médicaments antiacides à base d'Al (Chappard *et al.*, 2016; Klein, 2019). Des études ont constaté le développement de multiples troubles chez des patients souffrant d'une insuffisance rénale due à l'effet toxique de l'Al dans le liquide de dialyse à savoir : une ostéomalacie, une ostéodystrophie, une anémie microcytaire et une encéphalopathie de dialyse (Chappard *et al.*, 2016). L'administration d'Al à des rats souffrant d'insuffisance rénale chronique a entraîné une réduction de la synthèse et de la libération de la

parathormone (Díaz-Corte *et al.*, 2001). Une étude faite sur des cultures de tissus d'ostéoblastes de rats néonataux, a démontré que l' AlCl_3 détruit l'homéostasie calcique, ce qui active la voie de signalisation de la protéine kinase II dépendante du Ca^{2+} /calmoduline et favorise ainsi l'apoptose des ostéoblastes (Cao *et al.*, 2016). La principale myopathie induite par l'exposition à l'Al est une myofasciite macrophagique (granulome aluminique) associée à l'arthromyalgie chronique et au syndrome de fatigue chronique (Gherardi *et Authier* 2003; Santiago *et al.*, 2015). Une étude révèle qu'après l'injection intrapéritonéale de lactate d'Al une nécrose des muscles squelettiques s'est produite dans le diaphragme et les muscles abdominaux des rats (Levine *et al.*, 1992). Une inhibition de la contraction des muscles lisses est observée après exposition à l'Al en inhibant les ions K^+ (Hosseini *et al.*, 2020). La fonction myocardique peut être altérée chez les personnes diabétiques par l'exposition à l'Al, dans la mesure où la toxicité de l'aluminium potentialise le déclin de l'absorption du calcium dans le réticulum sarcoplasmique des fibres myocardiques de ces personnes (figure 10) (Levine *et al.*, 1990; Novaes *et al.*, 2018).

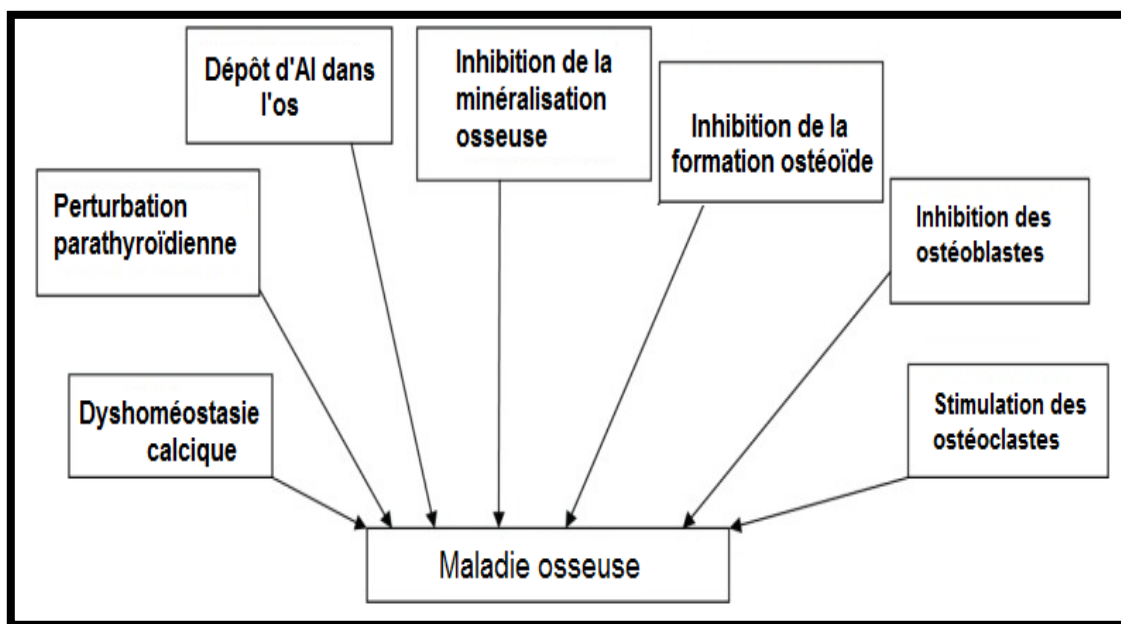


Figure 10. Pathogenèse de la maladie osseuse liée à la toxicité de l'aluminium (Igbokwe *et al.*, 2019).

4.6. Effets de l'aluminium sur le système gastro-intestinal

Comme il a été déjà mentionné, une grande partie de l'Al n'est pas absorbée par le corps et séjourne dans l'intestin avant d'être éliminée dans les fèces. Cet Al peut affecter le microbiote intestinal, la perméabilité et la réponse immunitaire qui influencent à leur tour les

conditions inflammatoires locales de l'intestin (Vignal *et al.*, 2016). L'Al est aussi lié à l'induction et à la persistance de l'inflammation intestinale chronique récurrente chez les personnes génétiquement prédisposées à la maladie de Crohn (Lerner, 2007). L'Al est susceptible d'induire des granulomes *in vitro* et de provoquer des lésions granulomateuses des intestins, l'entérite granulomateuse *in vivo* chez les souris (De Chambrun *et al.*, 2014). L'exposition orale au $AlCl_3$ a provoqué une dégénérescence épithéliale, une prolifération des cellules caliciformes et une infiltration lymphocytaire dans la muqueuse de l'intestin grêle de rats Wistar (Eltahawy *et al.*, 2016). La colite aiguë et la colite chronique induites par des produits chimiques chez souris transgéniques dépourvues d'interleukine 10 ont été aggravées par une exposition orale à l'Al (De Chambrun *et al.*, 2014).

4.7. Effets de l'aluminium sur les tissus hématopoïétiques

L'aluminium joue un rôle dans la toxicité sanguine constatée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (Anandh *et al.*, 2020). Les patients urémiques sous dialyse chronique et sous un régime tampon peuvent souffrir d'une grave intoxication par l'Al et une anémie microcytaire sans carence en fer (Becaria *et al.*, 2002). L'Al peut également provoquer une hémolyse en causant des dommages peroxydatifs à la membrane cellulaire des érythrocytes (Cheng *et al.*, 2018). L'intoxication chronique à l'Al provoque une anémie hypochrome microcytaire chez les patients dont la fonction rénale est compromise (Means, 2019; Chang *et al.*, 2020). Les facteurs pathogéniques responsables de l'anémie induite par l'Al sont dus à la réduction de la durée de vie des érythrocytes en raison de la diminution de l'intégrité de la membrane érythrocytaire, l'inhibition de l'acide δ -aminolévulinique déshydratase, et réduction de l'absorption du Fe par la transferrine en raison d'une interaction compétitive entre le fer et l'aluminium (Jeffery *et al.*, 1996; Bojanić *et al.*, 2020). Un effet mitodépressif a été entraîné dans la moelle osseuse en raison de la génotoxicité de l'exposition à l'Al chez des souris (D'Souza *et al.*, 2014). Les causes de l'anémie semblent être multifactorielles et comprennent une production défectueuse d'hémoglobine due à l'inhibition des enzymes de la synthèse de l'hème, une altération de la structure et de la fragilité de la membrane érythrocytaire, une réduction de la durée de vie des globules rouges due à des lésions éryptotiques et oncotiques, et une carence en fer suite à une interaction compétitive entre le Fe et l'Al (Pérez *et al.*, 2002; Vota *et al.*, 2012).

4.8.Effets sur la glande mammaire

Le chlorure d'aluminium présent dans les produits antisudoraux et d'autres produits cosmétiques appliqués aux niveaux des aisselles peut constituer une source importante d'exposition locale à l'Al (Lmaroudia *et* Mehdi 2018; Martini 2020). Les cancers et les kystes du sein sont des affections des glandes mammaires pour lesquelles des preuves émergentes suggèrent que l'Al pourrait être impliqué dans leur causalité (Darbre, 2016). L'utilisation de produits cosmétiques pour les aisselles contenant de l'Al était significativement associée à l'incidence du cancer du sein et les niveaux d'aluminium dans les tissus mammaires étaient significativement plus élevés chez les cas de cancer du sein que chez les témoins (5,8 contre 3,8 nmol/g). Les patientes atteintes d'un cancer du sein présentaient les taux d'Al les plus élevés dans les tissus mammaires que dans le sérum sanguin (Darbre *et al.*, 2013; House *et al.*, 2013). Pineau *et al.*, (2014) déclarent que l'Al qui s'accumule dans le tissu mammaire peut influencer les caractéristiques biologiques des cellules épithéliales du sein et la carcinogenèse est considérée comme une issue probable. Des preuves actuelles suggèrent que l'Al peut induire des dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales mammaires humaines et ensuite induire la prolifération des cellules (Becaria *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2016).

4.9.Effets sur la reproduction et le développement

La baisse de la fertilité, observée au cours des dernières décennies, est une question très actuelle dans la science contemporaine. Le vingtième siècle connaît une diminution de 50 % de la fertilité masculine suite à la grande révolution industrielle et les effets néfastes de l'aluminium sur la fertilité masculine sont restés très longtemps méconnus (Guo *et al.*, 2001; Yousef *et al.*, 2007). La reproduction humaine peut être affectée négativement par l'exposition à l'Al. Des études montrent que le sperme humain peut contenir de l'Al et les patients atteints d'oligospermie ont une concentration d'aluminium plus élevée que les individus sains (Klein *et al.*, 2014; Mouro *et al.*, 2018). Une exposition pendant 60 jours à l'Al dans le régime alimentaire des rats a montré une accumulation de 3,35 µg/g dans les testicules, accompagnée d'une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation, à une diminution de la production quotidienne de spermatozoïdes, à une réduction de leur nombre et de leur mobilité et à une augmentation des spermatozoïdes anormaux (Martinez *et al.*, 2017). Il a été aussi démontré que l'Al est capable de compromettre la fertilité masculine en induisant un état de stress oxydatif dans les testicules (Guo *et al.*, 2001; El-Demerdash 2004). Des déformations des cellules de Sertoli, une desquamation épithéliale, une atrophie tubulaire et des cellules

germinales anormales ont été observé chez des souris albinos suisses mâles traitées par voie intrapéritonéale avec de l' AlCl_3 (Abdel-Moneim, 2013). Une diminution significative des glandes accessoires sexuelles : vésicules séminales, prostates, glandes bulbo-urétrales et des tubules séminifères ont été enregistré chez des rats Wistar traités au sulfate d'aluminium dans l'eau de boisson (Trif *et al.*, 2007). Un déséquilibre du métabolisme des oligo-éléments s'est produit dans les testicules, les niveaux testiculaires de fer et de zinc augmentent et ceux du cuivre diminuent pendant l'exposition. En outre, une inhibition métabolique dans le testicule a été signalée en ce qui concerne les fonctions de la phosphatase acide, de la succinate déshydrogénase, du lactate déshydrogénase et de ses isoenzymes, ainsi qu'un dysfonctionnement de la membrane testiculaire dû à l'inhibition des activités de l'ATPase membranaire chez les rats exposés à l'Al (Zhu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018). Une diminution du poids des testicules et des épидидymes ainsi qu'une baisse des taux sériques de testostérone (Oyeyipo *et al.*, 2010). Le développement testiculaire a été altéré par l'exposition à l'Al, associé à une réduction des taux sériques de testostérone et de l'hormone lutéinisante (LH) et à une diminution de l'expression de la protéine du récepteur des androgènes, alors qu'aucun effet n'a été observé sur l'hormone folliculo-stimulante (FSH) sérique (Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2018). L'injection du chlorure d'aluminium (4,125 pmole) dans le liquide céphalorachidien chez les rats a induit une diminution significative des taux sériques de FSH, de LH et de testostérone, ainsi qu'une réduction du nombre de spermatozoïdes dans les canaux déférents et les épидидymes (Shahraki *et al.*, 2004). L'accouplement de rats femelles non traitées à des mâles traités par voie intrapéritonéale avec 100 ou 200 mg/kg/jour de nitrate d'aluminium pendant 4 semaines a montré une diminution du taux de gestation (Mestaghanimi *et al.*, 2002; Domingo, 2011). Une diminution du nombre de femelles gravides et le nombre de fœtus avec des changements histopathologiques dans les ovaires des souris ont été enregistrés après 12 semaines d'administration d' AlCl_3 à des doses allant de 1000 à 1400 mg/kg. L'exposition par voie nasal des nanoparticules d'aluminium pendant la période de gestation des souris femelles a montré une augmentation significative des taux d'Al dans l'hippocampe des ratons et une toxicité neurodéveloppementale a été enregistrée chez la progéniture à l'âge d'un mois sous la forme d'une augmentation significative du comportement anxieux avec une altération des performances d'apprentissage et de mémoire (Zhang *et al.*, 2018).

5. Mécanismes de la toxicité de l'aluminium

L'ensemble des études cliniques et expérimentales menés dans ce cadre de recherche suggèrent plusieurs mécanismes d'action de la toxicité de l'Al sur le plant moléculaire, cellulaire, et tissulaire. Il s'agit de la production accrue de stress oxydatif, de l'altération de la fonction des membranes cellulaires, de la perturbation de la signalisation intracellulaire et de l'altération ou de l'inhibition des fonctions enzymatiques. Tous ces mécanismes contribuent à la toxicité de l'Al.

5.1. Induction du stress oxydatif

Le stress oxydatif est un événement résultant de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ces espèces sont générées par la fuite d'électrons des enzymes impliquées dans la chaîne de transport des électrons mitochondriale, qui contiennent des ions de métaux de transition au niveau de leurs sites actifs (Addabbo *et al.*, 2009). La plupart des dommages cellulaires causés par les EROs sont dus à leur conversion en un intermédiaire à durée de vie relativement courte mais très réactif, tel que le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), qui peut endommager l'ADN, ainsi que les macromolécules cytosoliques et membranaires (Sanders *et Greenamyre*, 2013; Fleming *et Burrows*, 2020). Un grand nombre d'études ont démontré qu'il existe un lien entre l'augmentation des concentrations d'Al et le stress oxydatif (Sharma *et Dubey*, 2007; García-Medina *et al.*, 2010). En général, il existe plusieurs mécanismes qui produisent un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système de défense antioxydant. Il a été démontré que l'Al participe à la perturbation de l'homéostasie des ions métalliques et au stress oxydatif potentiel par la génération d'EROs et d'espèces réactives de l'azote (ERN) (Flora *et al.*, 2008; Jomova *et Valko*, 2011). Le stress oxydatif a des effets multiples sur la structure et la fonction des molécules, et entraîne une peroxydation des lipides, des modifications des protéines et des dommages à l'ADN. Il a été démontré que le stress oxydatif induit par l'Al entraîne l'apoptose des cellules germinales et la diminution du niveau d'ATP intracellulaire (Turner *et Lysiak*, 2008). Bien qu'il soit décrit comme étant "inactif du point de vue de l'oxydoréduction", l'Al est un puissant pro-oxydant et peut exercer cette activité par le biais de la formation d'un cation radicalaire semi-réduit le superoxyde d'Al (AlO_2^{2+}) (Exley 2004; Mujika *et al.*, 2011). L'Al peut favoriser l'oxydation biologique induite par le fer en formant du superoxyde d'Al et catalyse la formation de H_2O_2 tout en réduisant le Fe^{+3} (Mahdi *et al.*, 2010). L'Al peut également déplacer d'autres cations biologiques, tels que le calcium, le zinc, le cuivre et le magnésium, de leurs sites de liaison. Les ions ainsi libérés peuvent

catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en un radical hydroxyle hautement réactif et provoquer la peroxydation des lipides (Yokel, 2002). **Guo *et al.*, (2005)** indiquent que l'aluminium également lié à la production des ERN par l'induction de sous-produits du monoxyde d'azote (NO) en formant du peroxydinitrite toxique. Il augmente de manière significative la production de NO et diminue l'adénosine 3, 5-cyclique monophosphate (cAMP) et la testostérone. Plusieurs études montrent que l'Al peut provoquer des changements dans l'activité des enzymes antioxydants, tels que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPx) /réductase (GR). Il est démontré que l'administration durant un mois d'AlCl₃ diminue significativement les activités de la SOD, ce qui suggère que l'Al a une activité catalytique pour la production de EROs (Moumen *et al.*, 2001; El-Gendy, 2011). Les déséquilibres oxydatifs induits par l'aluminium sont associés au processus de peroxydation des lipides. Le malondialdéhyde (MDA), un indicateur de la peroxydation lipidique, augmente dans les testicules et les épидидymes après une exposition à l'Al (Hala *et al.*, 2010). En diminuant l'activité de la glutathion synthétase, l'Al pourrait ralentir la synthèse du glutathion (GSH), l'un des antioxydants les plus importants des cellules. L'hypothèse est que ce processus se produit par l'épuisement de l'ATP. En raison de grande affinité de l'Al avec les ions phosphate il forme un complexe fort avec l'ATP et réduit sa disponibilité dans la cellule (Pandey *et Jain*, 2013). Un autre mécanisme de la diminution du GSH est suggéré, par l'approvisionnement en NADPH, dû à l'inhibition de la génération de NADPH par l'Al. L'aluminium inhibe la NADP-isocitrate déshydrogénase, la seule enzyme fournissant du NADPH dans les mitochondries (Murakami *et Yoshino*, 2004).

5.2. Perturbation de la signalisation intracellulaire

Plusieurs voies de signalisation intracellulaire sont signalées comme étant modifiées par les ions Al. On a constaté que l'aluminium perturbe la signalisation des messagers secondaires, notamment l'AMPc, le Ca²⁺, le phosphoinositide et l'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP3), qui sont tous impliqués dans divers processus, allant de la croissance et de la différenciation cellulaires à l'apoptose (Mundy *et Shafer* 2001; Wang *et al.*, 2014). L'Al modifie les niveaux d'AMP cyclique et de GMP cyclique. Le mécanisme supposé est que l'Al stimulation la protéine G de l'adénylate cyclase en remplaçant le Mg²⁺ qui confère la structure au triphosphate de GMP. L'Al bloque les canaux calciques sensibles au voltage. Il bloque l'entrée du Ca dans la cellule et inhibe la séquestration du Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase (sur le réticulum endoplasmique) dépendante du Ca²⁺ du cytosol (Shahraki *et al.*, 2004). L'Al perturbe en outre l'homéostasie du Ca en interférant avec l'IP3 dont la déplétion intracellulaire

repose sur l'affinité beaucoup plus grande de l' Al^{3+} pour la surface de la phosphatidylcholine que du Ca^{2+} (Ochmański *et Barabasz*, 2000).

5.3. Induction de réactions inflammatoires

L'incidence croissante des maladies inflammatoires dans les pays en développement a mis en évidence le rôle critique des polluants environnementaux en tant que facteurs causaux dans leur physiopathologie (Kozima *et al.*, 2020). L'exposition humaine à l'Al a été fortement liée aux cascades inflammatoires dans un large éventail de maladies (Gherardi *et al.*, 2001; Lukiw *et al.*, 2005). Il est rapporté que, l'exposition orale par nébulisation à court terme d'hydroxyde d'aluminium a induit le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons et un stress oxydatif chez les souris BALB/c adulte (De Chambrun *et al.*, 2014). L'injection intrapéritonéale d' AlCl_3 (100 mg/kg de poids corporel) pendant 60 jours a augmenté de manière significative les marqueurs inflammatoires tels que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), la molécule adaptatrice de liaison au calcium ionisé 1 (Iba-1), NF- κ B, la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), l'interleukine (IL)-1 β , IL-4, IL-6, le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α), l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ; et des marqueurs apoptotiques, notamment le cytochrome c (cyto c) cytosolique, la caspase-3, la caspase-8 et la caspase-9, ainsi qu'une diminution des expressions du cyto c mitochondrial, du phospho-Akt (pAkt) et du phospho-glycogène synthase kinase-3 β (pGSK-3 β) dans l'hippocampe et le cortex chez le rats mâles Albino Wistar (Justin-Thenmozhi *et al.*, 2018). La capacité de l'aluminium à provoquer une réponse inflammatoire dans le cerveau a été signalée à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'analyse de l'expression génétique des cellules exposées pendant 72 heures au maltolate d'aluminium, a conduit à une augmentation concentration-dépendante du TNF α et de la protéine inflammatoire de macrophage-1 alpha (MIP-1a) (Johnson *et Sharma*, 2003). (Martinez *et al.*, 2017) indiquent que de faibles concentrations d'Al dans les testicules (3,35 $\mu\text{g/g}$) sont suffisantes pour altérer la spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes en induisant un stress oxydatif accru dans les organes reproducteurs et une inflammation dans les testicules.

5.4. Altération des fonctions enzymatiques

Compte tenu des mécanismes d'action de l'Al décrits précédemment, on peut conclure à une influence substantielle sur la fonction et le métabolisme des protéines cellulaires. Ses effets sur les protéines sont variés, allant de l'altération de leur expression due à la liaison de l'Al à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et à l'acide ribonucléique (ARN), à l'inhibition directe de plusieurs enzymes comme l'hexokinase, les phosphatases, la phosphodiesterase et

la phosphoxydase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la NADP isocitrate déshydrogénase (Ochmański *et* Barabasz, 2000). Il a été rapporté que l'exposition à l'aluminium (AlCl_3) a entraîné une modification significative des enzymes intestinales ; L'activité de la gamma-glutamyltranspeptidase a également augmenté, tandis que la glutathion (GSH) synthase et la glutathion disulfure (GSSG)-réductase ont diminué (Orihuela *et al.*, 2005). Des changements significatifs dans les paramètres des testicules où l'on a constaté une diminution des activités de la SOD, de la CAT, de la glutathion-s-transférase (GST) et de la glutathion peroxydase (GPx) associée à une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase (XO) et des niveaux de MDA chez des rats traités à l'Al (50mg/kg/day) (Abdelazem, 2019).

5.5. Altération de la fonction membranaire

La membrane plasmique semble être la cible de la toxicité liée à l'Al, car ces cations trivalents interagissent facilement avec les composants membranaires et affectent ainsi les processus associés. L'Al peut former des liaisons électrostatiques avec des ligands donneurs d'oxygène ou interagir avec les lipides membranaires (Pandey *et* Jain, 2013). La production de EROs et la peroxydation lipidique des lipides membranaires ont des conséquences négatives profondes et progressives qui impactent sur la fluidité de la membrane, augmentent la perméabilité, et altèrent la fonction des récepteurs (Peixoto *et al.*, 2001; Meriga *et al.*, 2004). La neurotoxicité chronique induite par l'Al a été liée à la peroxydation lipidique des cellules cérébrales qui résulte probablement d'une altération du métabolisme des lipoprotéines (Belaïd-Nouira *et al.*, 2012). Il a été constaté que l' AlF_3 modifiait la forme des érythrocytes en induisant la formation d'échinocytes. Cet effet a été expliqué par la diffraction des rayons X qui a révélé que l' AlF_3 perturbait la structure du DMPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine), classe de lipides située dans la monocouche externe de la membrane érythrocytaire. L'étude a suggérée des changements dans la sécrétion apicale de Cl^- et une inactivation modérée de l'ATPase (Suwalsky *et al.*, 2004). L'étude de l'effet du rapport molaire cholestérol/phospholipides (CH/PL) sur l'accumulation d'aluminium (apport quotidien de 1,00 g d' AlCl_3 pendant 10 jours) et l'altération de la fluidité membranaire induite par ce métal dans les synaptosomes du cortex cérébral de rat, indique que l'intoxication alimentaire à l'Al peut être conditionnée par le cholestérol. Les faibles niveaux du rapport molaire CH/PL sont liés à la réduction de l'accumulation d'aluminium dans les cellules synaptiques (Silva *et al.*, 2002). D'autres études ont montré que l' AlCl_3 augmentait la pression artérielle systolique et moyenne des rats, augmentait la fragilité osmotique, diminuait le

pourcentage de protéines membranaires, inhibait les activités de la Na⁺/K⁺-ATPase, de la Mg²⁺-ATPase, de la Ca²⁺-ATPase, du CAT, de la SOD et du GSH-pX, et augmentait la teneur en MDA et perturbe la fonction de la membrane érythrocytaire (Zhang *et al.*, 2016).

5.6. Induction d'effets immunogènes

Malgré l'incertitude concernant le mécanisme d'action de l'immunopotence de l'Al. Cette dernière est connue depuis au moins 100 ans et constitue aujourd'hui encore la base de l'utilisation des sels d'Al comme adjuvants dans les vaccinations et les thérapies antiallergiques (Exley *et al.*, 2010). Les adjuvants à base d'Al sont couramment utilisés dans les vaccins prophylactiques pour renforcer l'immunogénicité des antigènes par l'induction de réponses anticorps de haut niveau. Trois formes principales d'adjuvants à base d'Al aux propriétés physiques et chimiques sensiblement différentes ont été décrites : le phosphate d'aluminium (AlPO₄), l'hydroxyde d'aluminium (AlOH) et le sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe (AAHS) (Jones *et al.*, 2005; Caulfield *et al.*, 2007). Le Comité consultatif mondial sur la sécurité des vaccins de l'OMS estime qu'il n'y a pas lieu, à l'heure actuelle, de modifier les recommandations relatives aux pratiques de vaccination. Néanmoins, des hypothèses ont été émises que l'hydroxyde d'aluminium, qui a été utilisé comme adjuvant dans de nombreux vaccins que les soldats ont reçus, est associé au syndrome de la guerre du Golfe (Bojanić *et al.*, 2020). La capacité de l'Al à favoriser l'inflammation est incontestable. Le mécanisme comprend la formation d'un dépôt, l'absorption efficace des particules d'antigène d'Al par les cellules présentatrices d'antigènes et la stimulation des cellules immunocompétentes de l'organisme par l'activation du système immunitaire et du complément, l'induction de l'éosinophilie et l'activation des macrophages (HogenEsch, 2013).

5.7. Induction d'effet mutagène, cancérigène et tératogène

L'Al est reconnu comme un agent mutagène depuis de nombreuses années. Cependant, les recherches spécifiques sur sa cancérigénicité et sa tératogénicité chez l'homme sont extrêmement rares (Banasik *et al.*, 2005). Des résultats d'études menés sur les antitranspirants à base d'Al et le cancer du sein, démontrent que ce métal sous forme de chlorure d'aluminium ou de chlorhydrate d'aluminium peut interférer avec la fonction des récepteurs d'œstrogènes des cellules cancéreuses du sein humain MCF7, à la fois en termes de liaison au ligand et en termes d'expression de gènes rapporteurs régulés par les œstrogènes. Cela ajoute l'aluminium à la liste croissante des métaux capables d'interférer avec l'action des œstrogènes appelés métallo-œstrogènes (Darbre, 2005). La présence d'Al dans le sein humain,

suite à l'exposition tout au long de la vie quotidienne, notamment par l'alimentation, l'application d'anti-transpirants, l'utilisation d'antiacides et la vaccination, peut également altérer le microenvironnement du sein en provoquant des perturbations du métabolisme du fer, des dommages oxydatifs aux composants cellulaires, des réponses inflammatoires et des altérations de la motilité des cellules (HogenEsch, 2013). L'exposition prénatale à l'aluminium au cours des deuxième et troisième trimestres est positivement associée à l'altération de l'ADN nucléaire et mitochondrial chez les nouveau-nés (Liu *et al.*, 2019). Les résultats d'une étude longitudinale révèlent que l'exposition précoce à l'Al peut être associée à une mauvaise motricité fine, selon une relation dose-réponse, chez des nourrissons (Ma *et al.*, 2021).

Chapitre III : Phytothérapie et plantes médicinales

1. Définitions et concepts de base

1.1. Phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : « *phuton* » et « *therapeia* » qui signifient respectivement « plante » et « traitement ». C'est la thérapie qui se base sur les vertus thérapeutiques des plantes et de leurs extraits pour le traitement et la prévention des maladies ou pour la promotion de la santé. Seules les plantes ayant fait preuve de leurs vertus médicinales ont un intérêt en phytothérapie. Les parties les plus concentrées en principes actifs seront choisies, donc il peut s'agir de la plante entière, des feuilles, de la tige, des rameaux, des sommités fleuries, de l'écorce, des racines, des fruits ou des fleurs, utilisées fraîches ou sèches. Des modes de préparations seront privilégiés en fonction de la partie de la plante concernée, de la nature du principe actif qu'il soit hydrophile ou lipophile et du type de patient qui va la recevoir. On ne traitera pas un jeune enfant avec une teinture mère à degré alcoolique élevé (Cazau-Beyret, 2013).

1.2. Aromathérapie

L'aromathérapie, du latin « *aroma* » pour « arôme » et du grec « *therapeia* » pour « soin, cure » ; consiste à utiliser des huiles végétales volatiles, y compris des huiles essentielles, pour le bien-être psychologique et physique. L'aromathérapie est un remède thérapeutique qui a aidé des millions de personnes au fil des ans. L'aromathérapie a une variété de propriétés utiles, qui comprennent des agents antibiotiques, antiseptiques, anti-inflammatoires, antifongiques, etc. L'aromathérapie est souvent utilisée en conjonction avec la massothérapie, l'acupuncture, l'exologie de la réflexion, l'herbologie et d'autres thérapies de guérison holistiques (Bharkatiya *et al.*, 2008).

1.3. Plante médicinale

La définition des plantes médicinales selon la Pharmacopée Européenne précise que les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou servir à la préparation de boissons hygiéniques (Jean 2009). Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais, dans la plupart des cas des espèces sauvages d'où la nécessité de l'identification précise des plantes employées (Aouadhi, 2010).

1.4. Notion de totum

En effet, chaque plante utilisée en phytothérapie renferme entre 200 et 250 familles de principes actifs, soit des dizaines voire des centaines de milliers de molécules dont certaines peuvent agir entre elles, soient par synergie soit par antagonisme. Ainsi, l'action résultante globale des plantes de phytothérapie est due à cet ensemble de substances actives, parfois appelé le « totum », qui sont présentes dans le végétal, et qui lui confère un profil pharmacologique différent de celui de chacune des substances prises individuellement (Bone *et al.*, 2012).

1.5. Drogue végétale ou substance végétale

Dans une plante, la partie utilisée à des fins thérapeutiques est également appelée drogue végétale. Il s'agit de la plante, ou parties de plantes, d'algues, de champignons, de lichens, principalement entiers, fragmentés ou coupés, utilisés en l'état, le plus souvent desséchés, mais parfois frais (Fourasté, 2005).

1.6. Médicament à base de plantes

Un médicament à base de plantes est un médicament dont la substance active est exclusivement une ou plusieurs substances végétales ou préparation à base de plantes ou une association de plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes (Lehmann, 2013).

2. Evolution des connaissances de l'homme sur l'utilisation des plantes

Depuis l'Antiquité, l'homme a toujours cherché de manière instinctive des remèdes à base de plantes médicinales pour soulager ses maux (Petrovska, 2012). Etant donné qu'à l'époque on ne disposait pas d'informations suffisantes, ni sur les raisons des maladies, ni sur quelle plante et comment elle pouvait être utilisée comme remède, tout était basé sur l'expérience. Avec le temps, les raisons de l'utilisation de plantes médicinales spécifiques pour le traitement de certaines maladies ont été découvertes; ainsi, l'usage des plantes médicinales a progressivement abandonné le cadre empirique pour se fonder sur des faits explicatifs. Jusqu'à l'avènement de l'iatrochimie au 16ème siècle, les plantes avaient été la source de traitement et de prophylaxie (Zahan, 2017). Il y a 60 000 ans, l'homme de Neandertal utilisait les plantes et les chamans ont joué un rôle important dans la collection, l'apprentissage à l'utilisation et la transmission de la connaissance des plantes durant l'évolution d'Homo Sapiens. Les plantes

étaient employées largement dans l'alimentation, la gestion de certaines maladies et aussi pour atteindre un monde plus spirituel (Mamedov *et* Craker, 2011). Le papyrus Ebers, écrit vers 1550 av.J.-C., représente une collection de 800 proscriptions faisant référence à 700 espèces végétales et médicaments utilisés pour la thérapie tels que la grenade, l'huile de ricin, l'aloès, le séné, l'ail, l'oignon, la figue, le saule, la coriandre, le genévrier...etc. (Ozturk *et* Hakeem, 2018). Les Grecs avec Hippocrate, Aristote, Théophraste, Galien, Dioscoride et les Romains ont enseigné l'art de traiter par les plantes en colligeant les connaissances avec plus de 500 plantes médicinales répertoriées (Pan *et al.*, 2014). Au Moyen Âge, les compétences de guérison, de culture de plantes médicinales et de préparation de médicaments ont été transférées dans les monastères. La thérapie était basée sur des plantes médicinales, que les médecins-moines cultivaient couramment dans les monastères tel que la sauge, l'anis, la menthe, la graine grecque, la sarriette, la tanaïsie,...etc. (Hajar, 2012). En 529, le pape Grégoire le Grand interdit l'enseignement en France de la médecine par les plantes et ce n'est qu'aux alentours du début du IXe siècle que le Moyen-Orient, l'Afrique du nord et l'Espagne avec l'université de Cordoue ont repris l'enseignement de ces connaissances, puis Avicenne (980-1037) distilla les premières huiles essentielles (Schlosser 2011; Létard *et al.*, 2015). Les Arabes ont introduit de nombreuses nouvelles plantes en pharmacothérapie, principalement d'Inde, pays avec lequel ils entretenaient des relations commerciales. Ils utilisaient l'aloès, la morelle mortelle, la jusquiame, le café, le gingembre, le strychnos, le safran, le curcuma, le poivre, la cannelle, le rhum, le séné, etc. (Saad *et al.*, 2005). Certains médicaments à action forte ont été remplacés par des médicaments à action légère, par exemple le *Sennae folium* était utilisé comme laxatif doux, comparé aux purgatifs *Heleborus odorus* et *Euphorbium* utilisés jusque présent (Srivastava, 2018). Au début du XIXe siècle, on isolait la morphine de l'opium, la strychnine de la noix vomique, la quinine de l'écorce de quinquina (Brook *et al.*, 2017). Cependant, l'essor de la chimie de synthèse à partir du XIXe siècle a conduit à une certaine éclipse de l'utilisation des médicaments à base de plantes. Néanmoins, l'efficacité décroissante des médicaments synthétiques et les contre-indications croissantes de leur utilisation rendent à nouveau l'utilisation de médicaments naturels d'actualité aussi bien dans les pays en voie de développement où les tradipraticiens jouent un rôle considérable, que dans les pays industrialisés où ils sont surtout employés en automédication (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

3. Les différents modes d'extraction des plantes

Le choix et la variation des méthodes d'extraction dépendent généralement d'un certain nombre de paramètres à savoir : la durée de la période d'extraction, le solvant utilisé et son pH, la température, la taille des particules du matériel végétal et le rapport solvant / échantillon. Le principe de base est de broyer la matière végétale (sèche ou humide) le plus finement possible, ce qui augmente la surface à extraire en augmentant ainsi le taux d'extraction. Des études antérieures ont rapporté qu'un rapport solvant / échantillon de 10: 1 (volume /masse) serait idéal (Das *et al.*, 2010). Les principales méthodes d'extraction des éléments actifs les plus fréquemment employés sont :

3.1.Extraction par homogénéisation

L'homogénéisation des tissus végétaux dans un solvant a été largement utilisée par les chercheurs. Les parties de plantes fraîches séchées ou humides sont broyées en fines particules, mises dans une certaine quantité de solvant et agitées vigoureusement pendant 5 à 10 min ou laissées pendant 24 h, après quoi l'extrait est filtré. Le filtrat peut ensuite être séché sous pression réduite et redissous dans le solvant pour déterminer la concentration. Certains chercheurs procèdent à une centrifugation du filtrat pour clarifier l'extrait (Das *et al.*, 2010).

3.2.Extraction par épuisement exhaustive en série

C'est une autre méthode d'extraction courante qui implique une extraction successive avec des solvants de polarité croissante d'un solvant non polaire (ex. l'hexane) à un solvant plus polaire (ex. le méthanol) pour garantir qu'une large plage de polarité du composé puisse être extraite (Das *et al.*, 2010).

3.3. Extraction au Soxhlet

L'extraction au Soxhlet n'est requise que lorsque le composé souhaité a une solubilité limitée dans un solvant et que l'impureté est insoluble dans ce solvant. Si le composé souhaité a une solubilité élevée dans un solvant, une simple filtration peut être utilisée pour séparer le composé de la substance insoluble. L'avantage de ce système est qu'au lieu de faire passer de nombreuses portions de solvant chaud à travers l'échantillon, un seul lot de solvant est recyclé. Cette méthode ne peut pas être utilisée pour les composés thermolabiles car un chauffage prolongé peut conduire à une dégradation des composés (Nikhal *et al.*, 2010).

3.4. Macération

En macération le matériel végétal entier, grossièrement broyé, ou en poudre est maintenu en contact avec le solvant dans un récipient hermétiquement fermé pendant une durée définie avec une agitation fréquente jusqu'à dissolution de la matière soluble. Cette méthode est la mieux adaptée pour une utilisation dans le cas des composés thermolabiles (Ncube *et al.*, 2008).

3.5. Décoction

Cette méthode est utilisée pour l'extraction à la chaleur des constituants solubles dans l'eau et thermorésistants stables en le faisant bouillir dans l'eau pendant 15 minutes, et en les filtrants après refroidissant. Le filtrat peut ensuite être séché sous pression réduite et redissous dans le solvant pour déterminer la concentration (Remington, 2006).

3.6. Infusion

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Après filtration le filtrat peut être séché sous pression réduite et redissous dans le solvant pour déterminer la concentration (Remington, 2006).

3.7. Digestion

Il s'agit d'une sorte de macération dans laquelle une chaleur douce est appliquée pendant le processus d'extraction par macération. Il est utilisé lorsque la température modérément élevée n'est pas répréhensible et que l'efficacité du solvant s'en trouve augmentée (Remington, 2006).

3.8. Percolation

Il s'agit de la procédure la plus fréquemment utilisée pour extraire les principes actifs dans la préparation de teintures et d'extraits fluides. Un percolateur (un vaisseau étroit en forme de cône ouvert aux deux extrémités) est généralement utilisé (figure 11). Les ingrédients solides sont humidifiés avec une quantité appropriée du solvant spécifié et laissés au repos pendant environ 4 h dans un récipient bien fermé, après quoi la masse est emballée et le dessus du percolateur est fermé. Des volumes supplémentaires de solvant sont ajoutés pour former une couche peu profonde au-dessus de la masse, et le mélange est laissé macérer dans

le percolateur fermé pendant 24 h. La sortie du percolateur est alors ouverte et le liquide qu'il contient peut s'égoutter lentement. Des volumes supplémentaires sont ajoutés au besoin, jusqu'à ce que le percolât mesure environ les trois quarts du volume requis du produit fini. Le marc est ensuite pressé et le liquide obtenu est ajouté au percolât. Des volumes suffisants sont ajoutés pour produire le volume requis et le liquide mélangé est clarifié par filtration ou par repos puis décantation (Pandey *et* Tripathi, 2014).

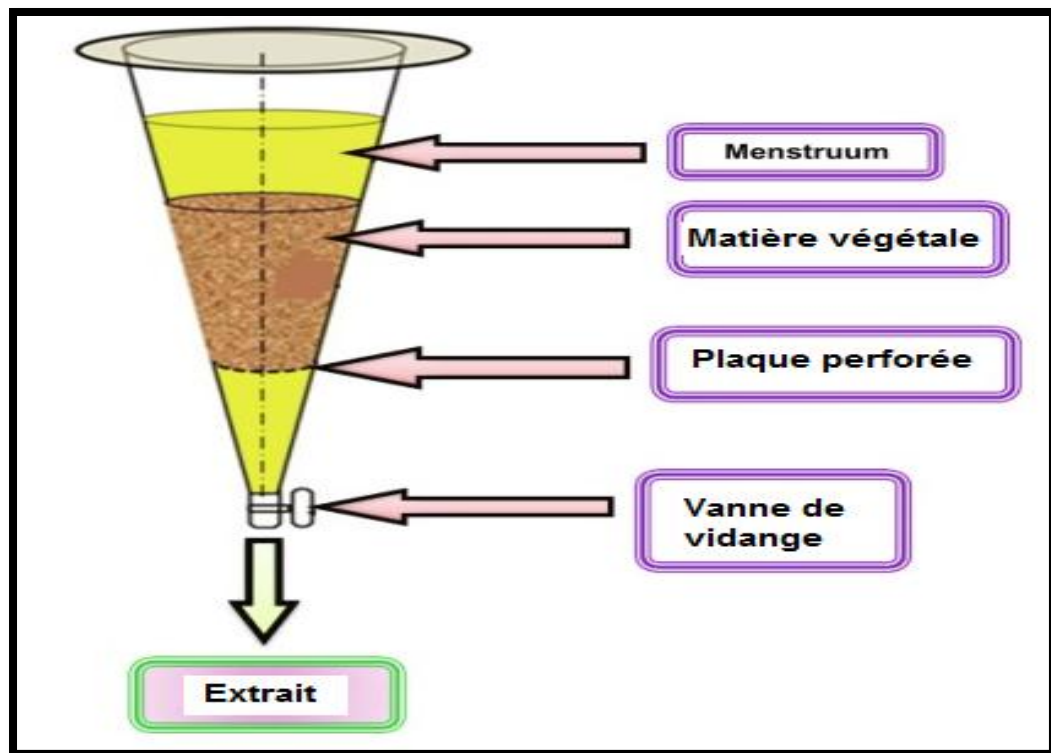


Figure 11. Schéma de l'extraction d'un extrait brut par percolation (Mukherjee, 2019).

3.9. Sonication

La procédure implique l'utilisation d'ultrasons avec des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz; cela augmente la perméabilité des parois cellulaires et produit une cavitation. Un inconvénient de la procédure est l'effet délétère occasionnel mais connu de l'énergie ultrasonore (plus de 20 kHz) sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation de radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules du composé actif (Pandey *et* Tripathi, 2014).

4. Choix du solvant d'extraction

Le succès de la détermination des composés biologiquement actifs à partir de matériel végétal dépend en grande partie du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction. Les propriétés d'un bon solvant dans les extractions végétales comprennent une faible toxicité, une facilité d'évaporation à basse température, la promotion d'une absorption physiologique rapide de l'extrait, une action conservatrice, une incapacité à provoquer une complexation ou une dégradation. Les facteurs influençant le choix du solvant sont la quantité de composés phytochimiques à extraire, la vitesse d'extraction, la diversité des différents composés extraits, la facilité de manipulation ultérieure des extraits, la toxicité et le risque potentiel pour la santé des agents d'extraction (Eloff, 1998). Puisque le produit final contiendra des traces de solvant résiduel, le solvant doit être non toxique et ne doit pas interférer avec le test biologique. Le choix dépendra également des composés ciblés à extraire (Ncube *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2010).

Les différents solvants privilégiés dans les procédures d'extraction des composés bioactifs des plantes sont indiqués ci-dessous et résumés dans le tableau 1:

4.1. Eau

L'eau est un solvant universel, utilisé pour extraire les composés bioactifs hydrophile. Bien que les guérisseurs traditionnels utilisent principalement de l'eau, des extraits de plantes provenant de solvants organiques se sont avérés donner une activité antimicrobienne plus cohérente que l'extrait aqueux. De plus, les flavonoïdes solubles dans l'eau (principalement des anthocyanes) n'ont aucune signification antimicrobienne et les composés phénoliques solubles dans l'eau ne sont importants que comme composés antioxydants (Das *et al.*, 2010).

4.2. Acétone

L'acétone dissout de nombreux composants hydrophiles et lipophiles, en plus d'être miscible à l'eau, est volatile et a une faible toxicité pour le dosage biologique utilisé, c'est un extractant très utile, en particulier pour les études antimicrobiennes où plus de composés phénoliques sont nécessaires pour être extraits. Une étude a rapporté que l'extraction des tanins et autres composés phénoliques était meilleure dans l'acétone aqueuse que dans le méthanol aqueux (Eloff, 1998; Das *et al.*, 2010). L'acétone et le méthanol se sont avérés extraire les saponines qui ont une bonne activité antimicrobienne (Ncube *et al.*, 2008).

4.3. Alcools

L'activité plus élevée des extraits éthanoliques par rapport à l'extrait aqueux peut être attribuée à la présence de quantités plus élevées de polyphénols par rapport aux extraits aqueux. Cela signifie qu'ils sont plus efficaces dans la dégradation des parois cellulaires et des graines qui ont un caractère non polaire et provoquent la libération de polyphénols des cellules. Une explication plus utile de la diminution de l'activité de l'extrait aqueux peut être attribuée à l'enzyme polyphénol oxydase, qui dégrade les polyphénols dans les extraits aqueux, alors que dans le méthanol et l'éthanol, ils sont inactifs. De plus, l'eau est un meilleur milieu pour l'apparition des micro-organismes par rapport à l'éthanol (Lapornik *et al.*, 2005). Les concentrations plus élevées de composés flavonoïdes plus bioactifs ont été détectées avec l'éthanol à 70% en raison de sa polarité plus élevée que l'éthanol pur. En ajoutant de l'eau à l'éthanol pur jusqu'à 30% pour préparer l'éthanol à 70%, ce qui augmentera sa polarité (Bimakr *et al.*, 2011). De plus, l'éthanol s'avère plus facile à pénétrer dans la membrane cellulaire pour extraire les ingrédients intracellulaires du matériel végétal (Wang, *et al.*, 2010). La quasi-totalité des composants identifiés à partir de plantes actives contre les microorganismes étant des composés organiques aromatiques ou saturés, ils sont le plus souvent obtenus par extraction initiale à l'éthanol ou au méthanol. Le méthanol est plus polaire que l'éthanol, mais en raison de sa nature cytotoxique, il ne convient pas de l'utiliser comme extractant dans certains types d'études car il peut conduire à des résultats incorrects (Cowan, 1999).

4.4. Chloroforme, Ether et Dichlorométhane

Les lactones terpénoïdes sont obtenues par extractions successives d'écorces séchées avec de l'hexane, du chloroforme et du méthanol avec une activité se concentrant dans la fraction chloroformique. On retrouve parfois des tanins et des terpénoïdes dans la phase aqueuse, mais ils sont le plus souvent obtenus par traitement avec des solvants moins polaires. L'éther est couramment utilisé de manière sélective pour l'extraction des coumarines et des acides gras. Le dichlorométhane est un autre solvant utilisé pour effectuer les procédures d'extraction. Il est spécialement utilisé pour l'extraction sélective de terpénoïdes uniquement (Cowan, 1999).

Tableau 1: Les différents solvants utilisés pour l'extraction des composés bioactifs (Cowan 1999 ; Lapornik *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2010 ; Bimakr *et al.*, 2011).

Eau	Ethanol	Méthanol	Chloroform	Ether	Acetone
Anthocyanes	Tanins	Polyphénols	Terpénoïdes	Alcaloïdes	Phénol
Tanins	Polyacétylènes	Anthocyanes	Flavonoïdes	Terpénoïdes	Flavonols
Terpénoïdes	Polyphénols	Terpénoïdes		Les acides	
Polypeptides	Flavonol	Saponines		gras	
Les lactones	Terpénoïdes	Tanins		Coumarines	
Amidons	Alcaloïdes	Xanthoxyllines			
Saponines	Stérols	Totarol			
		Flavones			
		Phénones			
		Lectines			
		Quassinoïdes			

5. Composition chimique des plantes

5.1. Les métabolites primaires et secondaires

La composition chimique des plantes est classée en deux catégories de molécules, en fonction de leur rôle dans le métabolisme des plantes. D'abord, en composés primaires (ou métabolites primaires) représentés par les macromolécules telles que les glucides, les acides aminés, protéines, acide nucléiques, et chlorophylle, associés aux fonctions vitales pour la cellule. En suite en constituants secondaires (ou métabolites secondaire) tels que les alcaloïdes, les terpènes, les lignanes, les stéroïdes, les curcumines, les saponines, les phénoliques, et les flavonoïdes. Ce sont des composés chimiques biologiquement actifs, naturellement présents dans les plantes. Les plantes les produisent pour se protéger des dangers environnementaux tels que la pollution, le stress, la sécheresse, l'exposition aux UV et les attaques des différents pathogènes (Saranya *et Divyabharathi*, 2019). Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter leur survie. La littérature indique que les composés phénoliques sont les plus abondants et les plus structurellement diversifiée parmi les composés phytochimiques (Saxena *et al.*, 2013). Il est bien connu que les plantes produisent ces composés chimiques pour se protéger, mais des recherches récentes démontrent que de nombreux composés phytochimiques peuvent également protéger l'homme contre de multiples maladies. Ils possèdent des propriétés biologiques comme antioxydants,

effets antimicrobiens, modulation des enzymes de désintoxication, stimulation du système immunitaire, diminution de l'agrégation plaquettaire, modulation du métabolisme hormonal et propriété anticancéreuse (Rao, 2003).

5.2.Principales classes de métabolites secondaires

5.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont omniprésents dans la plupart des tissus végétaux, y compris les parties comestibles comme les fruits, les graines, les feuilles, les tiges, les racines, etc. (Santos-Buelga *et al.*, 2019). Il y a plus de 8000 composés phénoliques, avec une grande variabilité structurelle; ils peuvent être classés en deux groupes principaux: les flavonoïdes et les non flavonoïdes (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants en fruits et légumes, ils représentent près des deux tiers des composés phénoliques; et, en tant que groupe, ils sont les plus bioactifs (Haminiuk *et al.*, 2012). Ils contiennent un squelette phénylbenzopyrane: deux cycles phényle (A et B) reliés par un cycle pyrane hétérocyclique (cycle C dans la Figure 12). Les flavonoïdes peuvent être divisés en six groupes ou familles, selon les différences de l'anneau pyrane. Dans chaque famille, les composés individuels diffèrent par leur schéma d'hydroxylation et de méthylation des cycles A et B (Feng *et al.*, 2017). La structure de base des flavonoïdes ainsi que celle de leurs principales familles sont indiqués dans la figure 12.

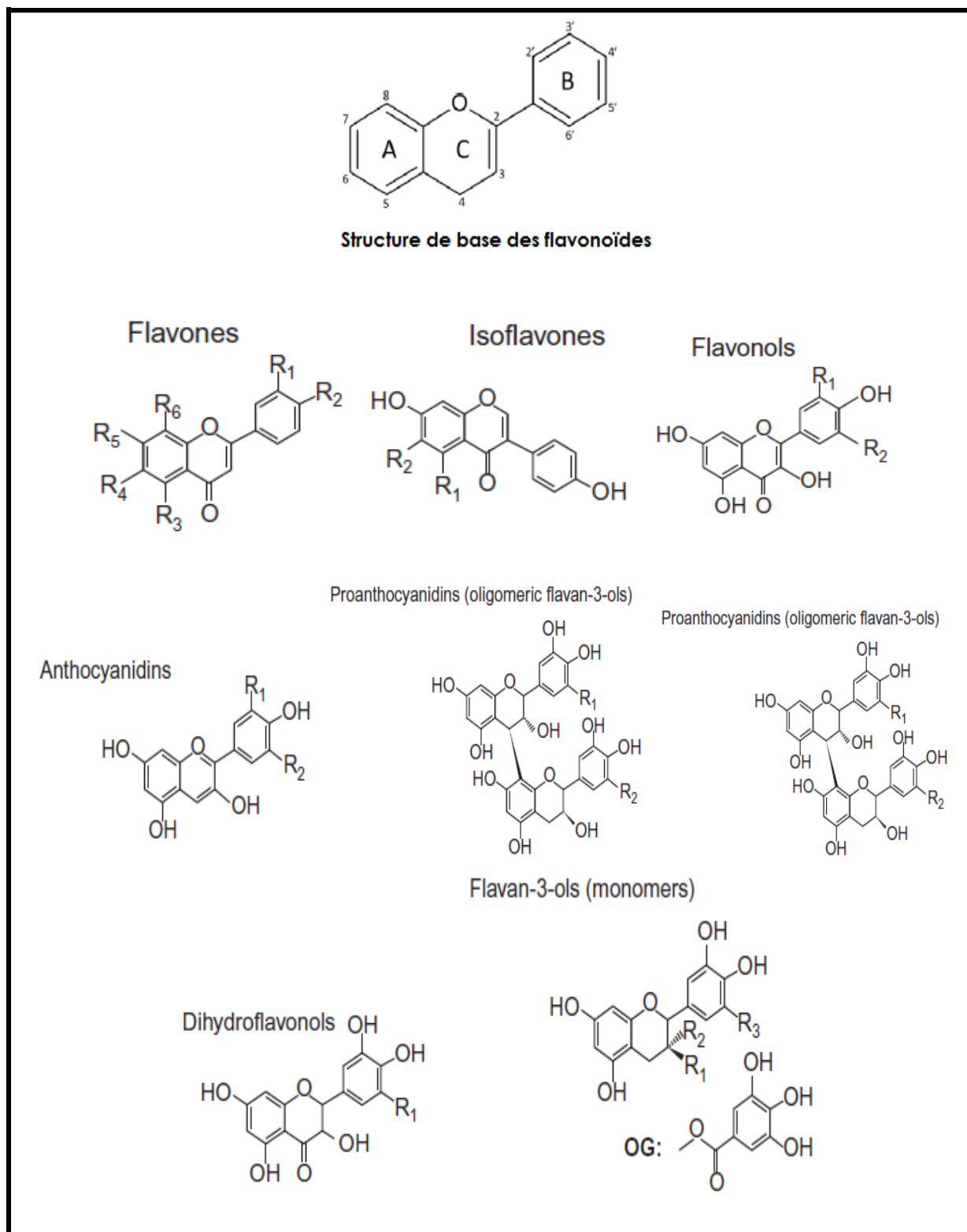


Figure 12. Structures de base des flavonoïdes et de leurs principales familles (Laura *et al.*, 2019).

Le groupe des non flavonoïdes comprend des composés phénoliques avec des structures chimiques très diverses, la plupart sont plus petits et plus simples que les flavonoïdes, mais il y a aussi certains composés avec des structures complexes et des poids

moléculaires élevés. Les groupes les plus importants de composés non flavonoïdes sont les acides phénoliques, qui contiennent un seul groupe phényle substitué par un groupe carboxylique et un ou plusieurs groupes OH. Les acides phénoliques peuvent être divisés en acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques et autres acides hydroxyphényliques (acétique, propanoïque et pentaénoïque), différant entre eux par la longueur de la chaîne contenant le groupe carboxylique (Figure 13) (Laura *et al.*, 2019).

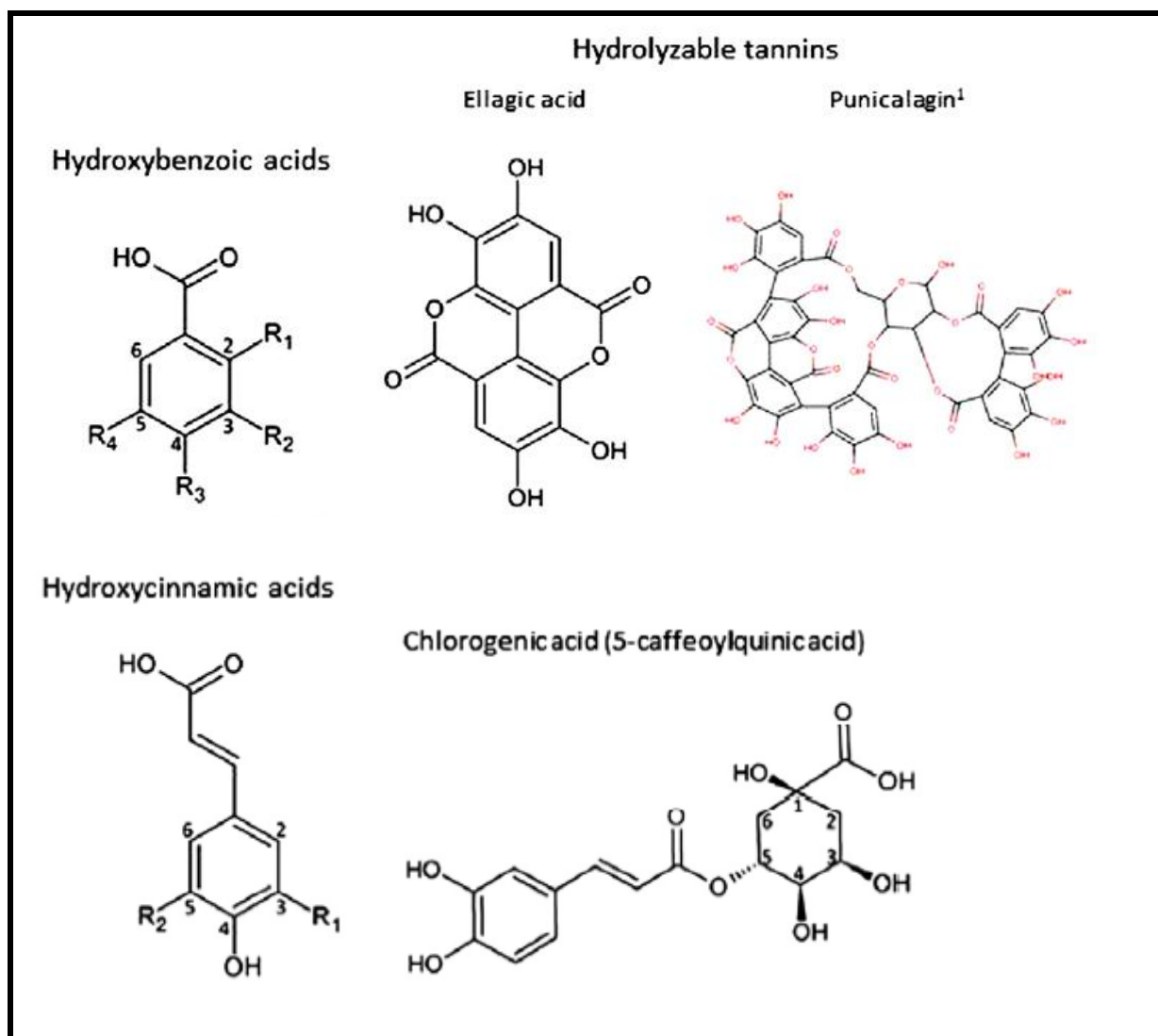


Figure 13. Structures des acides phénoliques (Laura *et al.*, 2019).

Les herbes et les épices sont riches en certains nombre de composés phénolique uniques avec des propriétés bioactives importantes (Opara *et* Chohan, 2014). Un grand nombre de ceux-ci sont des composés volatils, tels que l'eugénol (un hydroxyphénylpropène) le principe actif des clous de girofle, ou le carvacrol (terpène phénolique), un composant typique de l'origan. Curcumine (diferuloylméthane) et les curcuminoïdes sont des composés phénoliques trouvés uniquement dans les rhizomes de *Curcuma longa*, à partir de laquelle le

curcuma, ingrédient principal du curry, est obtenu. La curcumine est connu pour jouer un rôle important dans la prévention et le traitement de diverses maladies, du cancer aux maladies auto-immunes, neurologiques, cardiovasculaires et diabétiques (Kocaadam *et* Şanlıer, 2017). Les capsaïcinoïdes ne se trouvent que dans les fruits des plantes du genre *Capsicum*, ils contiennent un groupe vanillyle lié à une chaîne d'acide gras par une liaison amide et la capsaïcine est le principal représentant de ce groupe. Les capsaïcinoïdes ont de nombreuses actions biologiques mais ils sont principalement reconnus pour être l'ingrédient piquant des piments forts (figure 14) (Wahyuni *et al.*, 2013).

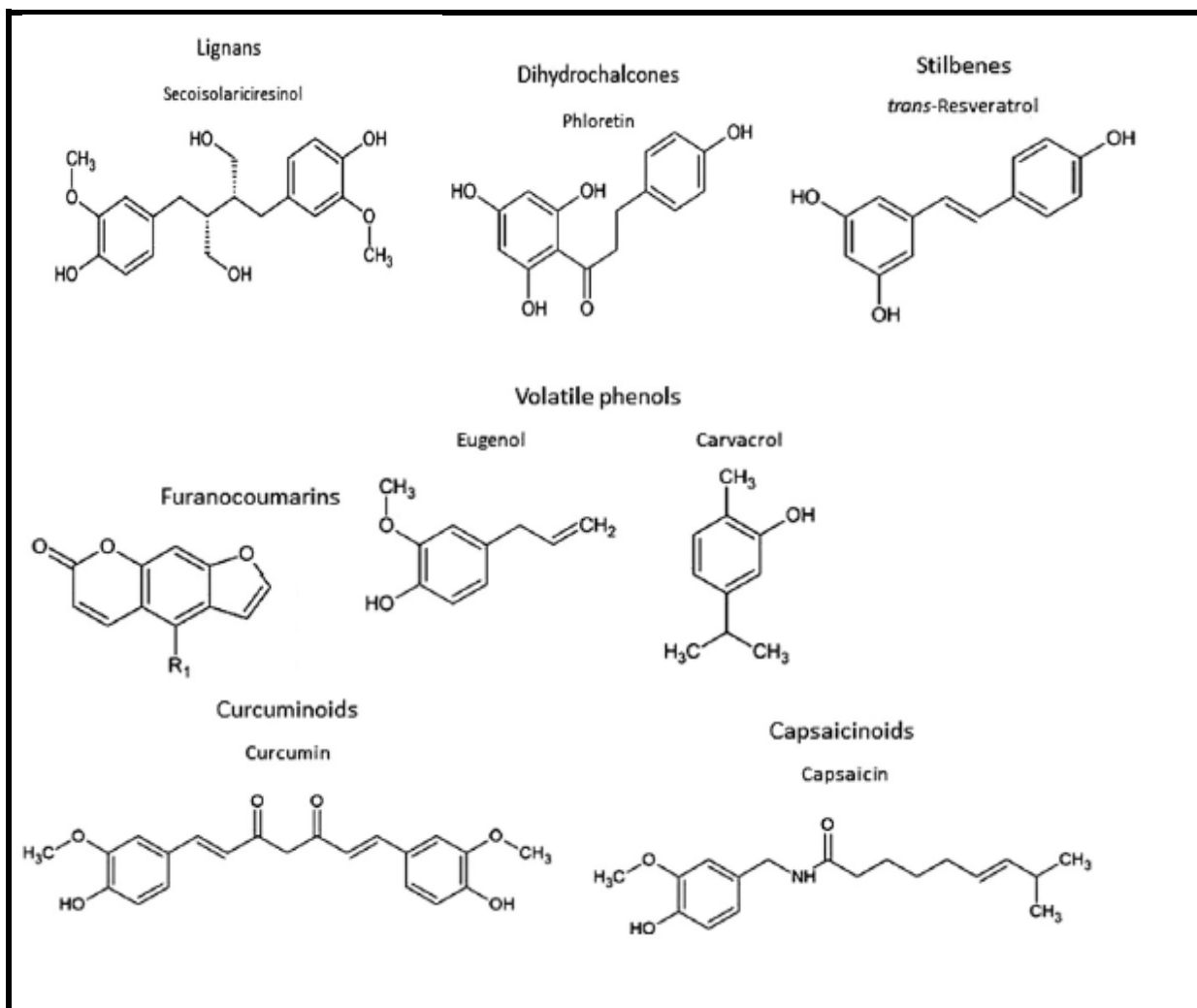


Figure 14. Autres composés phénoliques non flavonoïdes (Laura *et al.*, 2019).

5.2.2. Tanins

Le terme tanin est largement appliqué à de grandes biomolécules complexes de nature polyphénolique ayant suffisamment d'hydroxyles et d'autres groupes appropriés tels que les carboxyles pour former des complexes forts avec diverses macromolécules (figure 15). Ils se

trouvent couramment dans les gymnospermes et les angiospermes et sont classés dans la catégorie des tanins condensés et hydrolysables (Das *et al.*, 2020). Les tanins hydrolysables contiennent du glucose ou d'autres alcools polyhydriques estérifiés avec de l'acide gallique (gallotanins) ou de l'acide hexahydroxydiphénique (ellagitanins) (Versari *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2020). En fonction de l'estérification, les tanins hydrolysables sont subdivisés en gallotanins et ellagitanins. L'hydrolyse acide des tanins hydrolysables aide à obtenir de l'acide gallique, de l'acide ellagique ou d'autres espèces similaires (Khanbabaee *et Van Ree*, 2001). D'autre part, les tanins condensés sont composés de flavolanes ou de polymères de flavan-3-ols (catéchines) et / ou de flavan 3: 4-diols (leucoanthocyanidines) (Kemppainen *et al.*, 2014). Par rapport aux tanins hydrolysables, les tanins condensés ont une large gamme de poids moléculaire allant de 500 à plus de 20000 Da, et ont la capacité de réagir avec des aldéhydes pour générer des matériaux polymères (Hagerman *et Butler*, 1981; Huang *et al.*, 2011). Les tanins sont largement distribués dans de nombreuses espèces de plantes. Les espèces végétales qui contiennent une plus grande quantité de tanins condensés sont l'acacia, le quebracho, la mangrove et la pruche, tandis que les espèces de châtaignier et de myrobalan contiennent une plus grande quantité de tanins hydrolysables (Naumann *et al.*, 2013).

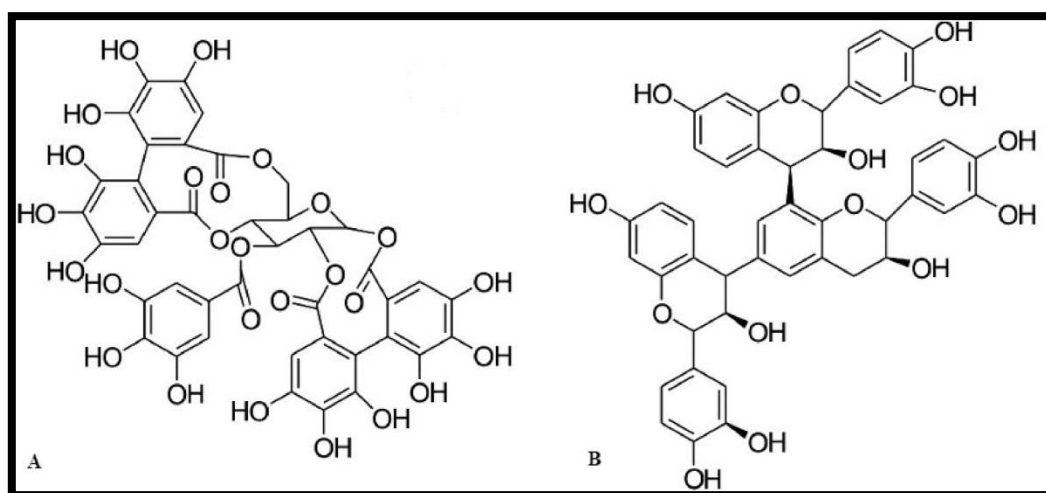


Figure 15. Structure des tanins (A) hydrolysables et (B) condensés (Raja *et al.*, 2014).

5.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques cyclique contenant de l'azote, et dont la distribution est limitée parmi les organismes vivants (Aniszewski, 2007). La plupart des alcaloïdes ont des propriétés basiques liées à un azote tertiaire hétérocyclique. Les exceptions notables sont la colchicine, la caféine et le paclitaxel (Aloko *et Bello*, 2021). La plupart des

alcaloïdes sont biosynthétiquement dérivés d'acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'ornithine et la lysine (Xu *et al.*, 2017). Les alcaloïdes représentent une grande variété de structures chimiques. 20000 alcaloïdes sont connus, la plupart étant isolés de plantes (Othman *et al.*, 2019). Mais les alcaloïdes ont aussi été trouvés dans des microorganismes, des organismes marins tels que des algues, des dinoflagellés, et les poissons-globe et les animaux terrestres tels que les insectes, les salamandres et les crapauds (Desgagné-Penix, 2020). Les alcaloïdes sont souvent classés en fonction de leur squelette moléculaire, par exemple les deux grands groupes sont les alcaloïdes indoliques et les alcaloïdes isoquinoléins (chacun plus de 4000 composés). D'autres groupes importants sont les alcaloïdes tropaniques (300 composés), les alcaloïdes stéroïdiens (450 composés) et les alcaloïdes pyridiniques et pyrrolizidiniques (respectivement 250 et 570 composés) (Dey *et al.*, 2020; Qing *et al.*, 2020). Une classification basée sur l'origine botanique des alcaloïdes est également utilisée, par exemple le Papaver (opium), alcaloïdes du quinquina, alcaloïdes de Rauwolfia, alcaloïdes de Catharanthus, alcaloïdes de Strychnos, alcaloïdes de l'ergot, alcaloïdes de cactus et l'alcaloïdes de Solanum (Böttger *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2019). Les structures de certains alcaloïdes sont illustrées dans la figure 16.

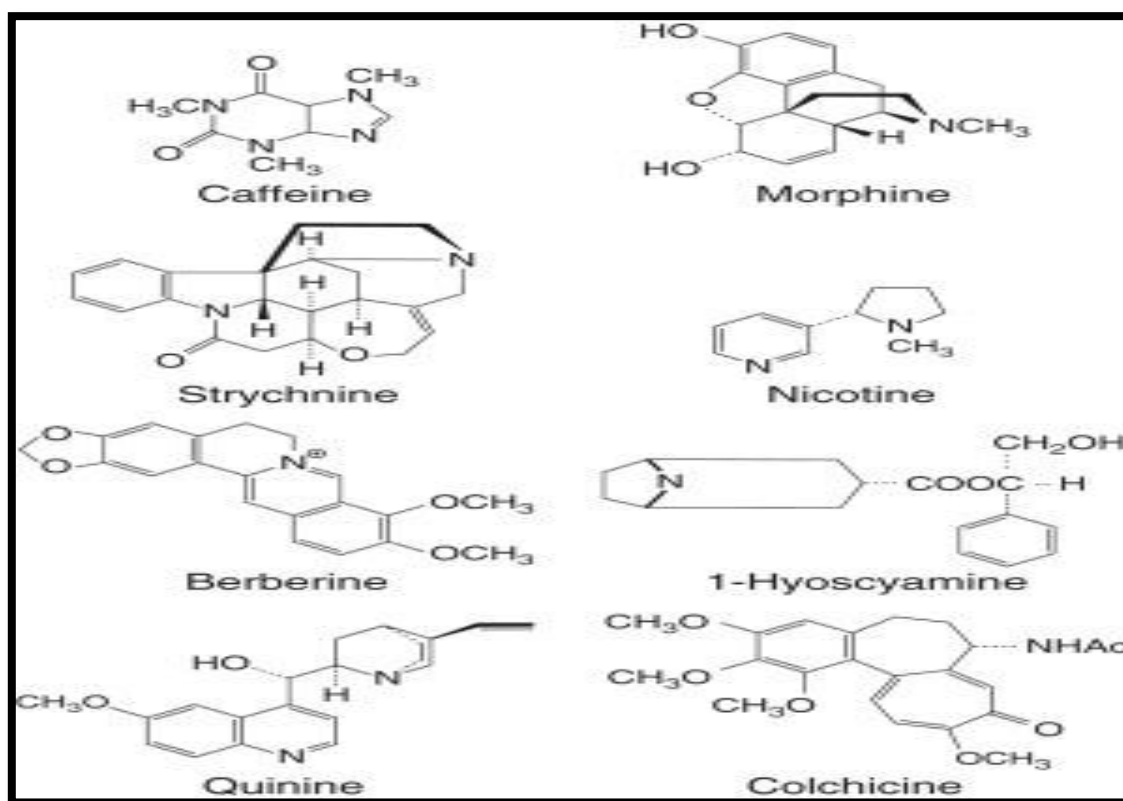


Figure 16. Structures de certains types d'alcaloïdes (Raja *et al.*, 2014).

5.2.4. Terpénoïdes

Les terpénoïdes, également connus sous le nom d'isoprénoïdes ou de terpènes, sont une grande classe de produits naturels que l'on trouve dans presque tous les organismes vivants (Oldfield *et al.*, 2012). Plus de 60 000 structures terpénoïdes ont été identifiées à partir de sources naturelles, ce qui en fait l'une des plus grandes classes de produits naturels connues (Köksal *et al.*, 2011; Berthelot *et al.*, 2012). Les terpénoïdes présentent un large éventail d'activités biologiques et ont généralement une structure cyclique. On suppose souvent que l'activité biologique de certains terpénoïdes est le résultat de leur lipophilie et de leur tendance à se répartir dans les membranes cellulaires, et soit interagir avec les protéines liées à la membrane, soit perturber l'intégrité de la membrane. Les terpénoïdes sont les principaux constituants des huiles essentielles produites par les plantes aromatiques et les résines d'arbres telles que la térébenthine. En raison de la longue utilisation historique des terpénoïdes en médecine et de l'ajustement évolutif de leurs interactions dans les systèmes naturels, il n'est pas surprenant que tant d'activités biologiques aient été signalées pour ce groupe de composés. De nombreuses plantes contenant des terpénoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires et analgésiques. La famille des astéracées contient de nombreuses espèces qui ont été traditionnellement utilisées pour traiter les conditions inflammatoires. Le facteur de transcription pro-inflammatoire, le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), est inhibé par les lactones sesquiterpéniques qui contribuent à expliquer leur activité anti-inflammatoire (Salminen *et al.*, 2008). De nombreuses huiles essentielles ont été évaluées pour leur activité anti-inflammatoire et analgésique dans une variété de modèles cellulaires et animaux (Teixeira *et al.*, 2013). Des essais cliniques réalisés avec des huiles essentielles ont démontré des effets positifs contre la dysménorrhée (douleurs menstruelles), les coliques infantiles, les douleurs articulaires traumatiques ou chirurgicales, les maux de tête, la névralgie post-herpétique et le syndrome du côlon irritable (Harris, 2010). Les structures de certains terpènes importants de chaque classe sont illustrées dans la figure 17.

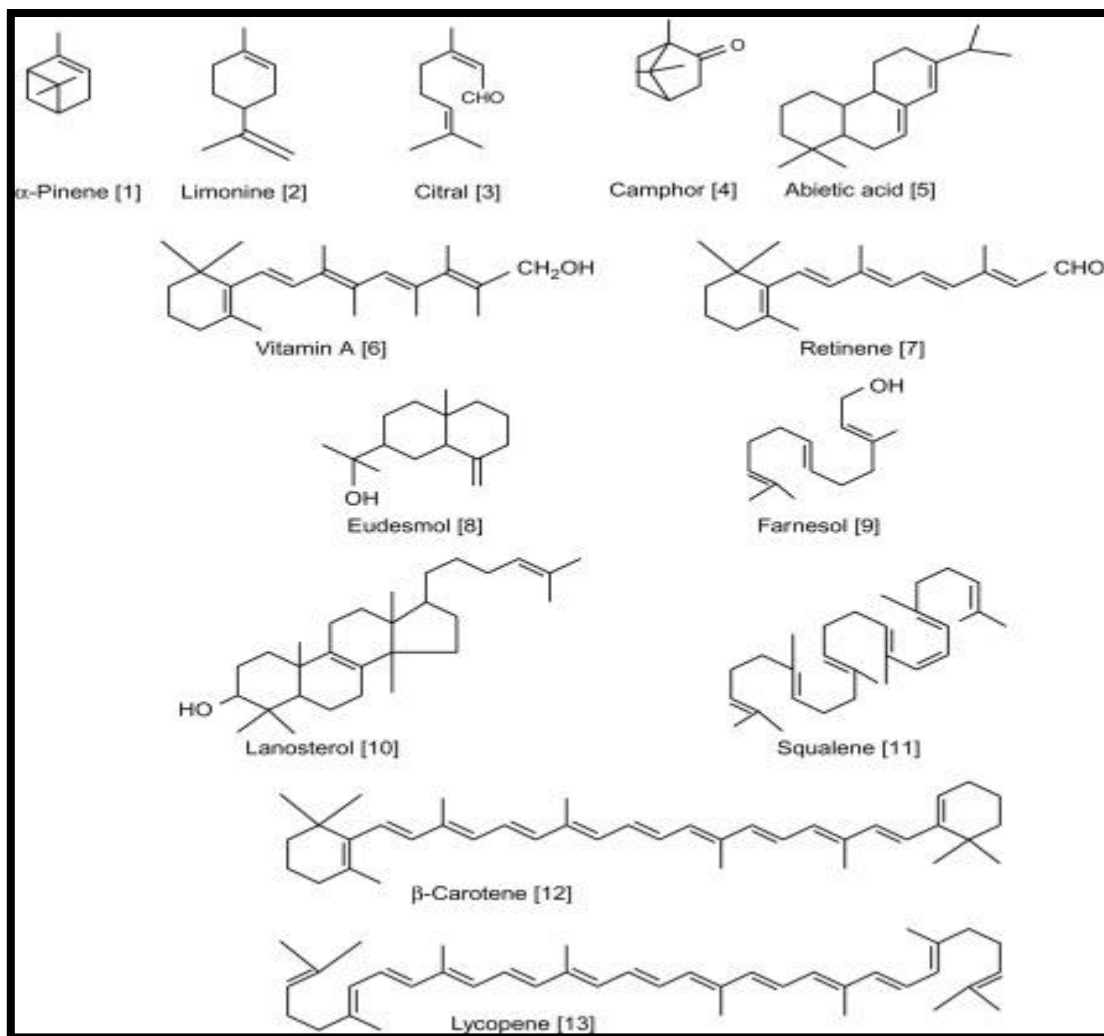


Figure 17. Les structures de certains terpènes importants de chaque classe (Saxena *et al.*, 2013).

6. Curcuma (*Curcuma longa* Linn.)

6.1. Généralités

Curcuma longa Linn, connue sous différentes dénomination (tableau 2), est une plante herbacée vivace membre de la famille des Zingiberaceae (gingembre). Elle est largement cultivée en Inde, en Malaisie, en Chine et dans d'autres pays à climat tropical à subtropical tel qu'en Amérique centrale et Latine, aux Antilles, en Australie et en Afrique. Elle pousse sur les alluvions, les sols bien drainés et en plein soleil. Elle peut atteindre une hauteur de trois à cinq pieds (1 à 2 mètre) et possède des feuilles oblongues et pointues, vert uniforme, faisant jusqu'à 50 cm de long et 7 à 25 cm de large, et des fleurs jaunes en forme d'entonnoir de 5 cm de long environ. Le rhizome principal ou primaire est ovoïde, oblong, piriforme (environ 3 cm de diamètre et 4 cm de long), les rhizomes latéraux ou secondaires sont courts, légèrement

coudés, souvent ramifiés. L'extérieur des rhizomes est de couleur jaunâtre à brun-jaune, avec des cicatrices profondes et des annulations (vestiges des cicatrices des feuilles), et la chair interne est jaune orangée (Figure 18). Ils sont généralement bouillis, nettoyés, séchés, et broyés ce qui donne une poudre jaune qui est la source de l'épice curcuma, l'ingrédient qui donne à la poudre de curry sa couleur jaune caractéristique. Le curcuma est largement utilisé dans les aliments pour renforcer leur saveur, et les conserver, et comme colorant des aliments et des textiles. Il est aussi largement utilisé à des fins médicinales dans les systèmes de médecine chinoise, et en Inde en médecine ayurvédique, l'Unani et le Siddha, comme remède traditionnel à diverse maladies telles que les troubles biliaires, l'anorexie, la toux, les plaies, le diabète, les troubles hépatiques, les rhumatismes et la sinusite (Hombourger, 2010; Kumar *et al.*, 2011).



Figure 18. Image représentant la partie aérienne (1) et sous-terrainne (2) de la plante '*Curcuma longa Linn*' (Loap, 2008).

Tableau 2. Les différentes dénominations de *Curcuma longa linn* (Loap, 2008).

Langue	Dénomination
Arabe	Kurkum / الكركم
Français	Curcuma, safran des Indes, souchet de Babylone, terre-mérite.
Anglais	Turmeric, Indian saffron

6.2. Composition chimique du rhizome de *Curcuma longa* L.

Les analyses phytochimiques menées sur *C. longa* L. révèlent la présence de plusieurs fractions à savoir : une fraction volatile, une autre non volatile et d'autres composants (tableau 3), et dont les concentrations peuvent varier en fonction des régions d'origine des plantes et du moment de la récolte par rapport au cycle végétal (Jayaprakasha *et al.*, 2005).

6.2.1. Les fractions volatiles (Les huiles essentielles)

La fraction volatile représente environ 6 à 7% de l'ensemble. Elle est obtenue par distillation. De couleur jaune, elle est composée d'huiles essentielles volatiles, dont les principaux composés chimiques sont essentiellement des monoterpènes et des sesquiterpènes dont les α - et β -turmérone et α -turmérone pour environ 60% de l'huile, le zingibérène pour 25%, ainsi que d'autres éléments présents en faibles concentrations (Atlantone, Cinéole, δ -phallandrène...etc. (Sandur *et al.*, 2007).

6.2.2. La fraction non volatile

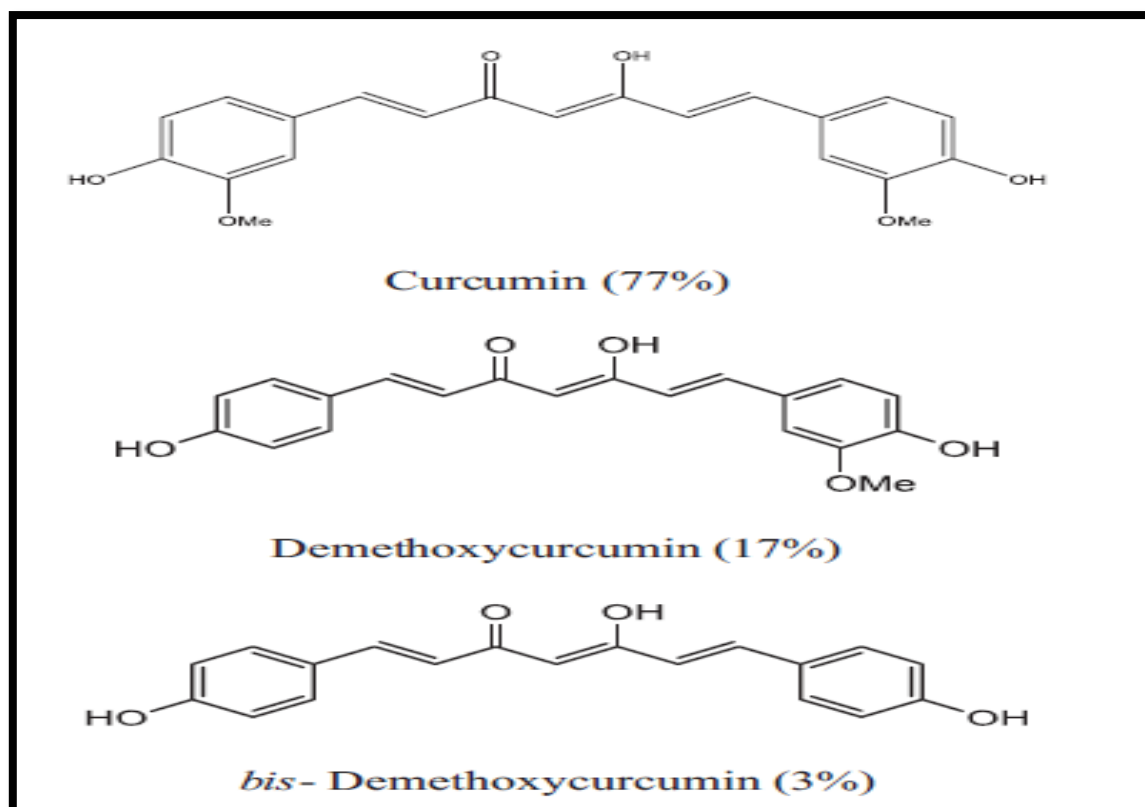
La fraction non volatile est constituée de principes pigmentaires, les curcuminoïdes (environ 5 à 8%) riches en molécules phénoliques dont 50 à 60% sont représentés par le mélange de curcumine (diféruoylméthane) à hauteur de 70-76%, de monodéméthoxycurcumine (16%) et de bisdéméthoxycurcumine (8%) (Kohli *et al.*, 2005). Les structures des différents curcuminoïdes sont présentés dans la figure 19.

6.2.3. Les autres composants

Le rhizome de curcuma est riche en amidon (45 à 55%) et autres glucides (presque 70% en tout). Il contient aussi des protéines, 6.3% dont la turmerine, peptide hydrosoluble (Sharma, Steward *et al.*, 2007), des lipides à hauteur de 5% environ et 3.5% de minéraux (Chattopadhyay *et al.*, 2004).

Tableau 3. Composition chimique du rhizome de *Curcuma longa* L. (Jayaprakasha *et al.*, 2005).

Famille de constituants	Molécules
De 4 à 14% d'une huile jaune orangé volatile (huile essentielle)	Cycles aromatiques
-monoterpènes	Alpha-phellandrènes (1%)
-sesquiterpènes	Zingibérène, atlantone (25%)
-Cétones sesquiterpènes	50-60% ar-turmérone (environ 60%), turmérone
Pigments phénoliques appelés curcuminoïdes	-diféruoylméthane ou curcumine : de 0.3 à 5.4% -bis-(4-hydroxy-cinnamoyl)-methane (bis-desméthoxycurcumine) -4-hydroxycinnamoyféruoylméthane (desméthoxycurcumine) -dihydrocurcumine (dérivé asymétrique)
Polysaccharides	Dont un arabino-galactane dénommé « uconane A »
Glucide	Amidon : 28% Glucide, 12% fructose, 1% arabinose
Divers	Résines, protéines, vitamines, et minéraux

**Figure 19.** Structure de la Curcumine et de ses principaux dérivés (Tung *et al.*, 2019).

7. Propriétés médicinales et pharmacologiques

7.1. Propriétés anti-inflammatoires

La médecine traditionnelle indienne (médecine ayurvédique) utilise le rhizome de *Curcuma longa* depuis l'antiquité, notamment pour ses propriétés anti-inflammatoires (Bernard *et al.*, 2005). L'administration orale de curcumine en cas d'inflammation s'est avérée aussi efficace que la cortisone ou la phénylbutazone (Cronin, 2003). Les propriétés anti-inflammatoires de *C. longa* peuvent être attribuées à sa capacité à inhiber à la fois la biosynthèse des prostaglandines inflammatoires de l'acide arachidonique et de la fonction des neutrophiles durant le processus inflammatoires (Akram *et al.*, 2010). Les curcuminoïdes inhibent également les cyclooxygénases (COX), lipoxygénases (LOX), les phospholipases, les leucotriènes, les prostaglandines, la thromboxane, l'oxyde nitrique élastase, hyaluronidase, collagénase, protéin-1 chemoattractante des monocytes, les protéines inductibles par l'interféron, TNF (tumor necrosis factor) et interleukine-12. Ils diminuent également la formation des prostaglandines et inhibent la biosynthèse des leucotriènes via la voie de la lipoxygénase (Bundy *et al.*, 2004). L'effet anti-inflammatoire de la curcumine s'exerce aussi par l'inhibition de NFκB (nuclear factor-kappa B), une protéine de la super-famille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire (Shishodia *et al.*, 2005).

7.2. Propriétés antioxydantes

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les activités antioxydantes de *C. longa L.* et ses molécules bioactives telle la curcumine. Il a été montré que les extraits hydrosolubles et liposolubles de curcuma ainsi que la curcumine présentent une forte activité antioxydante, comparable aux vitamines C et E (Hamidpour *et al.*, 2015). La curcumine agit contre les espèces réactives à l'oxygène (EROs) (Ruby *et al.*, 1995), et peut protéger l'hémoglobine de l'oxydation (Joe and Lokesh, 1994). In vitro, la curcumine peut réduire considérablement la vitesse de production des EROs telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et des radicaux nitrites (Mouzaoui, Banerjee *et al.*, 2020). D'autres études on a constaté que la curcumine réduisait les lésions testiculaires causées par l'exposition au phtalates de di-n-butyle, par une augmentation du glutathion (GSH), des taux de testostérone et l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la diminution de niveaux de malondialdéhyde (MDA). Et indiquent que ces propriétés peuvent être dues aux capacités antioxydantes intrinsèques de la curcumine (Ishihara *et al.*, 2000). L'incubation de cellules endothéliales de

l'aorte bovine avec la curcumine (dans une plage de concentration de 5-15 μM) a montré une induction d'expression de l'hème de l'oxygénase. L'hème oxygénase est une enzyme qui réagit au stress oxydatif, en produisant l'antioxydant biliverdine, et il améliore la résistance aux dommages oxydatifs cellulaires (Motterlini *et al.*, 2000).

7.3. Propriétés hépatoprotectrices

Le curcuma est connu pour avoir un effet hépatoprotecteur caractéristique similaire à la silibinine (le principal constituant actif de la silymarine, un mélange de flavonolignanes extraits du chardon-Marie, *Silybum marianum*) (Pradhan et Girish, 2013). Des études ont démontré les propriétés hépatoprotectrices du curcuma contre une variété de lésions hépatotoxiques, y compris celle causée par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) (Ibrahim *et al.*, 2020), ainsi que hépatotoxicité causée par une overdose au paracétamol (Pramono *et al.*, 2018). L'effet hépatoprotecteur du curcuma résulte principalement de ses propriétés antioxydantes, ainsi que sa capacité à diminuer la formation de cytokines pro-inflammatoires (Khan *et al.*, 2019). Le curcuma réduit l'infection par *Aspergillus parasiticus* et inhibé de 90% la production d'aflatoxines fongiques qui peuvent être à l'origine de l'hyperplasie biliaire (Verma *et al.*, 2008). Le curcuminate de sodium, un sel de curcumine, exerce également des propriétés cholérétiques en augmentant l'excrétion biliaire, cholestérol et la bilirubine, ainsi que l'augmentation de la solubilité de la bile, ce qui peut donc éventuellement prévenir et traiter la cholélithiase (Nasri *et al.*, 2014). La curcumine protège également les cellules contre les peroxydations lipidiques induites par le paracétamol. Cela peut être dû aux propriétés antioxydant des groupes phénoliques de la curcumine (Yousef *et al.*, 2010). Il a été démontré que la curcumine diminue l'aspartate sérique, l'activité de transaminase et de la phosphatase alcaline, et le taux des acides gras libres, du cholestérol et des phospholipides (Hewlings et Kalman, 2017). Dans une étude avec des cultures d'hépatocytes humains exposées à la Tacrine qui est connue pour son activité destructrice des lymphocytes T et son hépatotoxicité, la curcumine s'est avérée être près de dix fois plus efficace que le traitement régulier, à l'acide ascorbique (Bhargual *et al.*, 2010).

7.4. Propriétés anticarcinogènes

Des recherches ont montré que la curcumine joue un rôle important en tant qu'agent anti-cancérigène par l'inhibition des trois étapes de la carcinogenèse : initiation, promotion et progression. Lors de l'initiation et de la promotion, la curcumine module les facteurs de transcription contrôlant les phases I et II (Kunnumakkara *et al.*, 2008; Rahmani *et al.*,

2014). Dans des études *in vitro* et *in vivo*, il est avéré que le *Curcuma longa* et notamment la curcumine est également capables de supprimer l'activité de plusieurs mutagènes et cancérigènes courants dans une variété de types de cellules (López-Lázaro, 2008). L'activité antioxydante et le piégeage des radicaux libres du curcuma et de la curcumine sont à l'origine de leur pouvoir anticancérigène, ainsi qu'à leur capacité à augmenter indirectement le niveau de la glutathion, et aidant ainsi à la désintoxication hépatique des mutagènes et cancérigènes, et inhibant la formation de nitrosamine. La curcumine induit également l'apoptose des cellules cancéreuses et inhibe angiogénèse (Dorai *et al.*, 2001). D'autre part, la curcumine peut augmenter les effets de certains médicaments chimio-thérapeutiques. Chez des souris modèle de xénogreffe de cancer du sein humain, curcumine en association avec le paclitaxel (Taxol) inhibent de manière significative les métastases du cancer du sein au poumon à un degré supérieur à celui de la paclitaxel seul (Aggarwal *et al.*, 2005).

7.5. Propriétés antidiabétiques

Des études antérieures sur des animaux ont montré que le curcuma abaisse le glucose plasmatique. *Curcuma longa* peut donc être un ingrédient prometteur dans les aliments fonctionnels visant à prévenir le diabète de type 2 (Wickenberg *et al.*, 2010). Un certain nombre d'expériences menées démontrent les propriétés antidiabétiques des extraits de *C. longa* L. Une étude utilisant des extraits éthanolique et hexanique de *C. longa* contenant de l'ar-turmérone, de la curcumine, de la déméthoxycurcumine, et de la bisdéméthoxycurcumine ont permis une différenciation des adipocytes de manière dose-dépendante (Den Hartogh *et al.*, 2020). Il a été aussi constaté que l'extrait éthanolique de curcuma contenant à la fois des curcuminoïdes et des sesquiterpénoïdes possède une forte activité hypoglycémique (Nishiyama *et al.*, 2005). Wickenberg *et al.*, (2010) en étudiant les effets du curcuma sur le glucose plasmatique postprandial et l'insuline chez des sujets sains; ils ont constaté que l'ingestion de 6 g de *C. longa* a augmenté les taux d'insuline sérique postprandiale, mais n'a pas semblé affecter les taux de glucose plasmatique ou l'index glycémique chez les sujets sains. Les résultats indiquent que *C. longa* peut avoir un effet sur la sécrétion d'insuline. Il a été aussi constaté que le curcuma réduisant le taux du sucre dans le sang chez des rats rendus diabétiques par exposition à l'alloxane (Arun *et Nalini*, 2002). Dans une autre expérience, il a été montré qu'à très faible dose, la curcumine empêche la formation de cataracte induite par le galactose (Suryanarayana *et al.*, 2003).

7.6. Propriétés antimicrobiennes

Les extraits de *Curcuma longa* L. et ses huiles essentielles permettent l'inhibition de la croissance de diverses bactéries, parasites et champignons pathogènes. Une étude sur les poussins infectés par le parasite caecal *Eimera maxima* a démontré que les régimes supplémentés avec du curcuma entraînent une réduction des lésions intestinales causés par le parasite et regain de poids corporel (Kim *et al.*, 2013). Les propriétés antimicrobiennes des feuilles de *C. longa* testées par la méthode de diffusion de disque contre divers agents pathogènes, dont huit souches fongiques et cinq souches bactériennes montrent que l'huile essentielle possède la plus forte activité antimicrobienne contre *Fusarium miniformes* MAY 3629 suivi de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Parveen *et al.*, 2013). Une autre étude, dans laquelle des cobayes ont été infectés par soit des dermatophytes, des moisissures pathogènes ou des levures, ont constaté que l'huile de curcuma appliquée localement inhibe les dermatophytes et les champignons pathogènes. La disparition des lésions a été observée chez ces cobayes infectés après seulement sept jours d'application (Apisariyakul *et al.*, 1995). L'activité antifongique et antibactérienne d'un extrait éthanolique de curcuma a démontré une bonne activité antifongique contre *Trichophyton longifusus* et *Microsporium canis* et une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (Khattak *et al.*, 2005). L'extrait méthanolique de curcuma a également montré une activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* avec des valeurs de concentration minimale d'inhibition (CMI) de 128 et 256 µg / ml, respectivement (Kim *et al.*, 2003).

7.7. Propriétés antidépressives

L'administration d'un extrait aqueux de *Curcuma longa* par voie orale à des souris pendant 14 jours a pu induire une relation dose-dépendante de réduction d'immobilité dans le test de suspension de queue et le test de nage forcée chez la souris. Les effets des extraits à la dose de 560 mg / kg étaient plus puissants que ceux de l'antidépresseur de référence fluoxétine. Ces résultats ont démontré que *C. longa* avait des effets spécifiquement antidépresseurs in vivo. L'activité antidépressive peut être médiée en partie par l'inhibition de la MAO A (l'activité monoamine oxydant A) dans le cerveau de souris (Yu *et al.*, 2002). Une autre étude entreprise pour déterminer les effets comportementaux, neurochimiques et neuroendocriniens de l'extrait éthanolique de *Curcuma longa* en utilisant le test de la nage forcée (FST) chez des souris mâles souche ICR. L'extrait éthanolique s'est avéré réduire la durée d'immobilité chez les souris lorsqu'il est administré par voie orale pendant 21 jours. Ces résultats suggèrent que les propriétés antidépressives de l'extrait éthanolique de *C. longa* ont

été médiées par la régulation des systèmes neurochimiques et neuroendocriniens et qu'il peut être un agent utile contre la dépression (Xia *et al.*, 2007). L'effet d'une administration orale de curcumine sur le comportement d'un modèle de stress chronique de dépression chez le rat a été étudié. L'administration de curcumine a montré des propriétés similaires à celle de l'Imipramine. Ces résultats suggèrent que les propriétés antidépressives de la curcumine peut être lié aux propriétés modulatrices du dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Xu *et al.*, 2006).

Matériels et méthodes

« Ce chapitre détaille de manière exhaustive, l'approche que nous avons suivie lors de la réalisation de ce travail. La préparation de l'extrait de plante, sa caractérisation phytochimique, le traitement des animaux, le prélèvement des échantillons et les différents protocoles, sont tous décrits en détail afin de faciliter la bonne reproductivité de ce travail ».

1. Objectif du travail

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les éventuels effets prophylactiques d'un extrait aqueux de *Curcuma longa L.* (EAC) contre les effets reprotoxique du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) chez le rat mâle adultes, en évaluant son impact sur le système reproducteur masculin à savoir : les testicules, l'épididyme, la vésicule séminale et la prostate, en suivant une approche biochimique, cytologique, histologique et histochimique.

2. Matériels utilisés

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de rhizomes de Curcuma (*Curcuma longa L.*), un produit disponible tout au long de l'année dans le marché algérien suite à sa grande importance dans les traditions culinaires locales ainsi que son utilisation dans la médecine traditionnelle. Les racines sèches de *C. longa L.* ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique à usage domestique afin d'obtenir un broyat fin qui sera utilisé dans la préparation ultérieure de l'EAC.

2.2. Matériel animal

En raison de leur petite taille, leur maniabilité, leur disponibilité dans le marché, leur prix raisonnables et leur cycle reproducteur assez court et une grande portée (allant jusqu'à une dizaine de rats par portée) certains rongeurs et en particulier le rat, espèce *Rattus norvegicus*, constituent l'animal de choix le plus utilisé dans les expériences de toxicologie. A cet égard, des couples de rats de souche *Wistar*, obtenus de l'animalerie de l'université de Saida ont été utilisés pour la production d'un nombre suffisant de rats mâles nécessaire pour entamer notre étude expérimentale. L'élevage a été réalisé au niveau de l'animalerie du département de biologie, Faculté des sciences, à l'université Dr. Moulay Taher de Saida, dans des conditions d'hébergement adéquates (cycle lumière / obscurité de 12/12 heures, à $22 \pm 2^\circ C$, et ont eu accès *Ad libitum* à de l'eau et à une alimentation spéciale rongeurs SIM).

2.3. Matériels et appareillages de laboratoire

Le présent travail, réalisé au niveau du laboratoire de chimie organique au département de chimie, Faculté des sciences, à l'université Dr. Moulay Taher de Saida, nécessitait l'utilisation d'un ensemble de matériels et d'appareillages de laboratoire listés dans le tableau 4.

Tableau 4 : liste des principaux matériels et appareillages utilisés lors de la réalisation des expériences.

Noms	Références
Agitateur magnétique	LMR AG 200
Balance analytique	BEL LW1553
Broyeur	CLATRONIC KSW 3306
Centrifugeuse	eba 200 hettich
Etuve	memmert UNB 500
Evaporateur rotatif (Rotavapor)	Heidolph laborota 4000
HPLC-UV	Agilent Series 1100
Montage reflux avec chauffe-ballon	Labheat CB4500050
pH-mètre	hanna hi 2210
Spectrophotomètre	PRIMLIGHT, SECOMAM® / UV-Vis-NIR (JASCO V-770)
Congélateur armoire	LIEBHERR GP2033-21.

2.4. Produits chimiques

La réalisation de cette présente étude a nécessité l'utilisation d'un ensemble de produits chimique à savoir des sels minéraux, des solvants organiques, des solutions tampons et des réactifs, et dont les plus importants sont listés ci-dessous :

2-(3,4 Dihydroxyphényl)-3,4-dihydro-2H-chromène-3,5,7-triol (Catéchine ;CE), 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3,4,5-trihydroxybenzoïque (acide gallique ; GA), 3-méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde (Vanilline), 5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3,4-dihydroxyfuran-2-one (acide ascorbique), le chlorure d'aluminium d'aluminium (AlCl_3), molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), réactif phénolique de Folin-Ciocalteu réactif phénolique, acide chlorhydrique (HCl), chlorure de fer (FeCl_3), solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, carbonate de sodium (Na_2CO_3), nitrite de sodium (NaNO_2), et acide sulfurique (H_2SO_4), acide trichloracétique, acide thiobarbiturique, tris(hydroxyméthyl) aminométhane, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).

Tous les produits chimiques utilisés ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich ou de Merck.

3. Méthodes

La réalisation de la présente étude a été décomposée en deux parties. D'abord une partie dédiée à la préparation de l'extrait aqueux de la plante (les rhizomes de *curcuma longa L.*), sa caractérisation par dosages phytochimiques et d'analyse chromatographique (chromatographie liquide haute performance dite HPLC-UV, et chromatographie sur couche mince dite CCM), et l'optimisation *in vitro* de ses pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires. Ensuite, la deuxième partie a été consacrée à l'étude expérimentale qui comprend une évaluation de la qualité du sperme, un dosage sérique des hormones sexuelles, une estimation du degré du stress oxydatif tissulaire par le biais du dosage de certains marqueurs et enzymes relatifs au stress oxydatif, et au final une étude histologique et histochimique pour évaluer la structure et les niveaux d'atteintes des gonades mâles et des glandes annexes.

3.1.Préparation de l'extrait aqueux de *Curcuma longa L.*

Vingt-cinq gramme (25g) de broyat de rhizomes de *C. longa L.* est porté à ébullition, dans un ballon de 250 mL d'eau distillée (à 100 °C), au bain-marie dans un système de reflux, pendant 15 min, puis filtrés avec du papier filtre (Whatman N °1). Les filtrats sont combinés, centrifugés à 4000 tr/min pendant 20 min, les surnageants sont ensuite concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (heidolph laborota 4000), et le résidu obtenu est stocké au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation ultérieure (Serairi-Beji *et al.*, 2018) (figure 20). Cette procédure a été répétée chaque semaine tout au long de l'étude.

Le rendement (R) a été calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{masse du ballon avec extrait (g)} - \text{masse du ballon vide(g)}}{\text{masse de l'échantillon (g)}} \times 100$$



Figure 20. Procédures de préparation de l'EAC. A : broyat des *rhizomes sec* de *C. longa L.* ; B : montage d'un système à reflux (décoction); C : concentration à sec de l'extrait à l'aide d'un évaporateur rotatif (modèle Heidolph laborota 4000) ; D : aspect du résidu d'extraction après évaporation rotative.

3.2. Analyses spectrophotométriques et colorimétriques

3.2.1. Détermination de l'absorbance maximale (λ_{max})

Le balayage du spectre UV de l'extrait aqueux de *C. longa* a été effectué entre 400 et 800 nm de longueur d'onde afin de déterminer l'absorbance maximale (λ_{max}) enregistrée en utilisant un spectromètre UV-Vis-NIR (JASCO V-770).

3.2.2. Dosages des métabolites secondaires

3.2.2.1. Dosage de la teneur totale en polyphénols (TTP)

- *Principe*

Le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) ou réactif de Folin-Denis, également appelé méthode d'équivalence de l'acide gallique (GAE), est un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate utilisé pour le dosage colorimétrique *in vitro* des composés phénoliques et polyphénoliques (Singleton *et al.*, 1999). La méthode repose fortement sur la réduction du

mélange hétéropolyphosphotungstates-molybdates par le composé phénolique, ce qui entraîne la formation d'un chromogène de couleur bleue. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de FC uniquement dans des conditions basiques ajustées par une solution de carbonate de sodium. Ces derniers subissent une dissociation pour former un phénol ou un anion phénolate qui réduit le réactif. L'intensité de la couleur du chromogène bleu formé peut être mesurée par la lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 21) (Jadhav *et al.*, 2012).

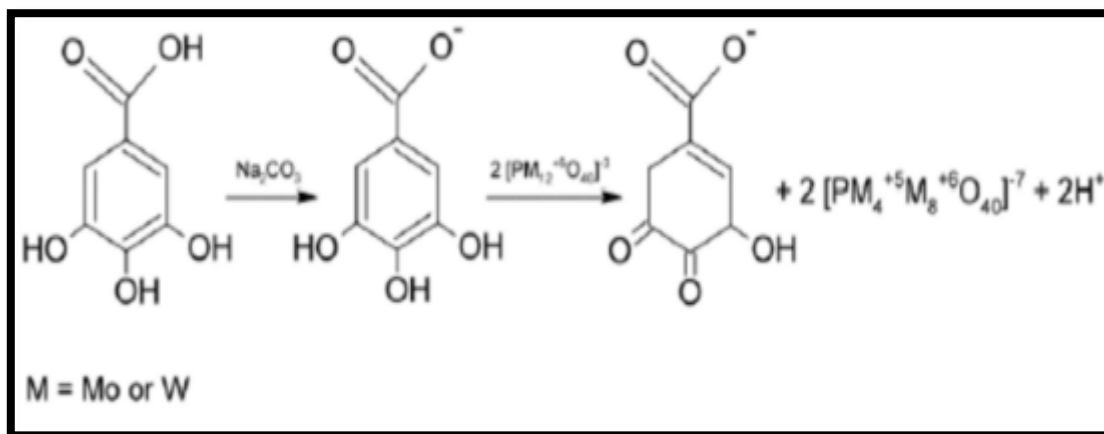


Figure 21. Réaction entre les composés phénoliques et les dérivés des acides phosphotungstique et phosphomolybdique en milieu alcalin, entraînant la formation d'une couleur bleue par la méthode de Folin-Ciocalteu (Munteanu et Apetrei, 2021).

- *Mode opératoire*

La TTP des extraits de curcuma a été estimée par spectrométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu adopté par Afroz *et al.*, (2014). Brièvement, une aliquote de la fraction d'échantillon diluée a été ajoutée à 0,5 mL d'eau distillée et à 0,125 mL de réactif de FC. Le mélange est ensuite agité et incubé pendant 6 min. avant d'ajouter 1,25 mL de Na₂CO₃ (7%). La solution est ensuite ajustée avec d'eau distillée jusqu'à un volume final de 3 mL. Après incubation dans l'obscurité (30 min), l'absorbance est lue à 765 nm par rapport à un blanc préparé.

- *Expression des résultats*

La TTP est exprimé en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE/g d.s.) en se référant à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-400 µg/mL ; R² = 0,97). Tous les échantillons ont été analysés en trois répétitions.

3.2.2.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT)

- Principe

La teneur en flavonoïdes totaux (TFT) a été estimée à l'aide d'un dosage colorimétrique utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl_3) (Chang *et al.*, 2002). Le principe de base de la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium est que l' AlCl_3 forme des complexes acides stables avec le groupement céto et l'un ou l'autre des groupes hydroxyle des flavonoïdes (Figure 22-A), tandis qu'il se lie aux curcuminoïdes par l'intermédiaire du groupe β -dicéton (figure 22-B) (Siddique *et al.*, 2010).

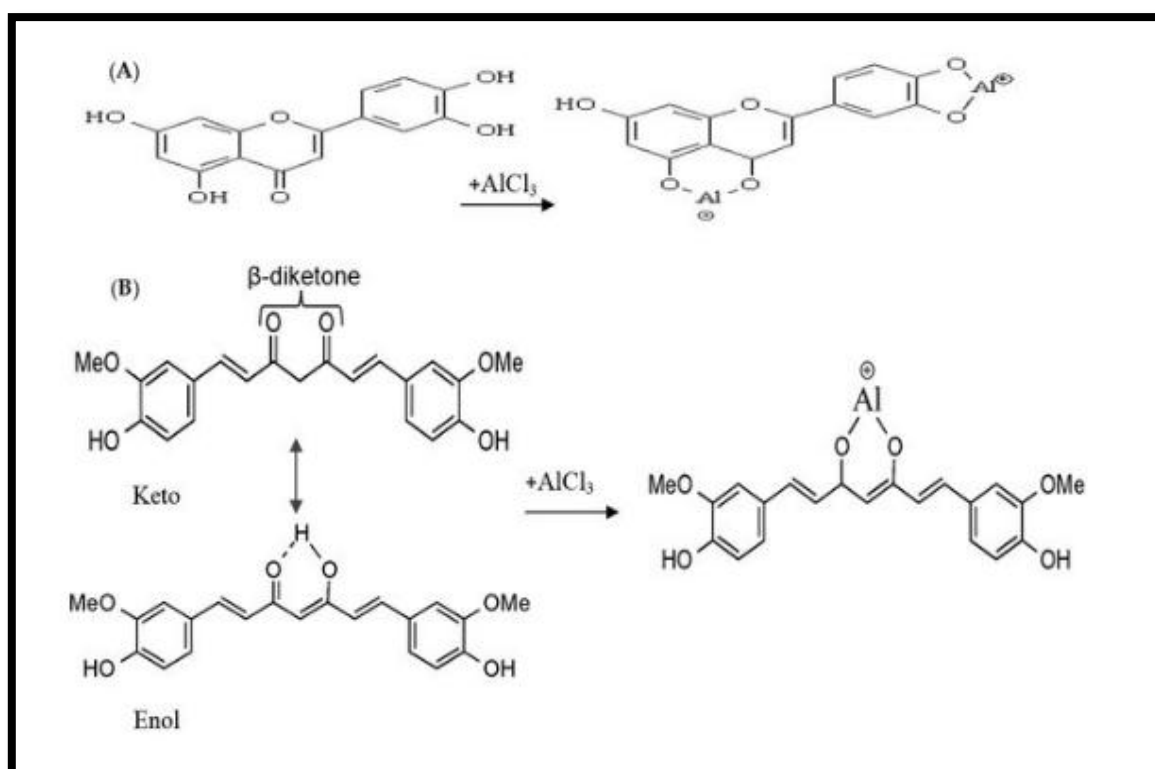


Figure 22. (A) Formation d'un complexe flavonoïde-Al; (B) formation d'un complexe de curcumine-Al (Sepahpour *et al.*, 2018).

- Mode opératoire

Tout d'abord, 100 μL de l'extrait (1 mg / mL) est mélangé avec 0,3 mL de nitrite de sodium à 5%. Après environ 5 min, 0,3 mL d' AlCl_3 à 10% sont ajoutés. Puis, après 6 min, 2 mL supplémentaires d'hydroxyde de sodium 1M (NaOH) sont ajoutés. La solution est ensuite ajustée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 2.5 mL. L'intensité de la couleur du complexe flavonoïde-aluminium a été mesurée à 510 nm.

- **Expression des résultats**

La TFT a été déterminée en équivalent à la catéchine (CE) grâce à une courbe d'étalonnage de la catéchine 0-500 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,99$). Les échantillons ont été analysés en trois répétitions.

3.2.2.3. Dosage de la teneur des tannins condensés (TTC)

- **Principe**

La réaction de la vanilline implique la réaction d'un aldéhyde aromatique, la vanilline, avec le cycle métabasubstitué des flavanols pour donner un adduit rouge. Bien que la réaction à la vanilline ait été largement utilisée pour estimer le tanin condensé (proanthocyanidine), la réaction n'est pas spécifique aux tanins condensés (figure 23) (Gessner *et* Steiner, 2020).

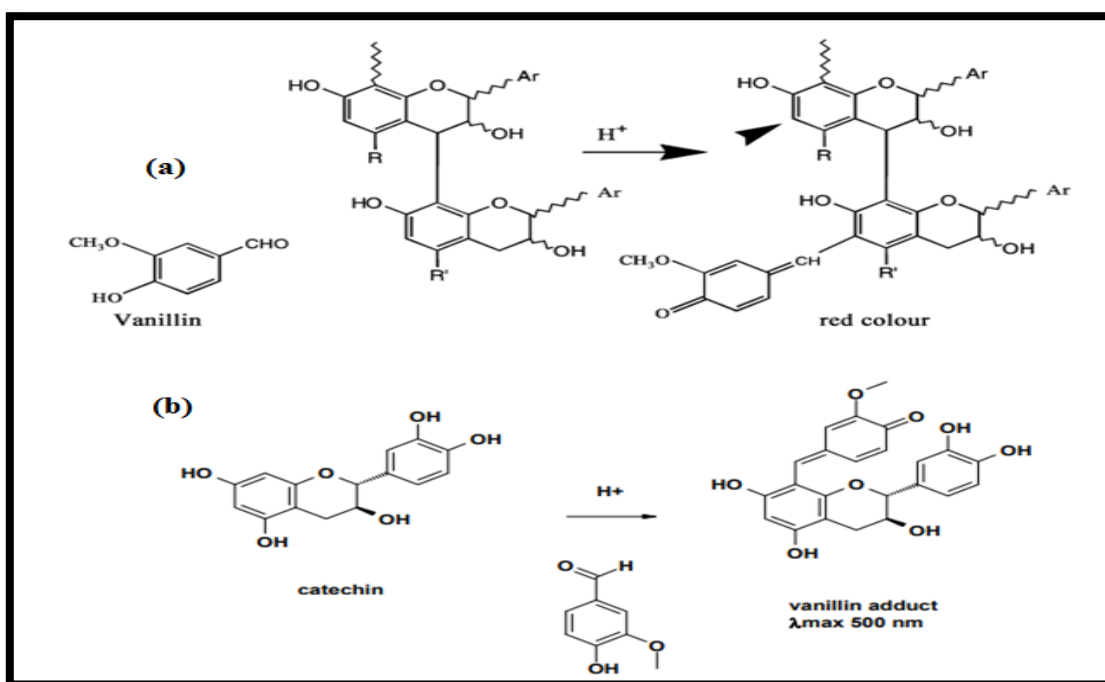


Figure 23. (a) Formation d'un complexe vanilline avec les tannins condensés. La flèche pointe vers un second site potentiellement réactif. (b) formation du complexe catechine-vanilline (Schofield *et al.*, 2001).

- **Mode opératoire**

En bref 200 μL d'échantillon dilué est ajouté à 3 mL de solution méthanolique de vanilline (4%) et 1,5 mL d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Après une période d'incubation de 15 minutes, l'absorption a été mesurée à 500 nm avec du méthanol comme blanc.

- *Expression des résultats*

La TTC a été exprimée en milligrammes d'équivalent de catéchine par gramme de poids sec (mg CE/g d.w.). L'intervalle de la courbe d'étalonnage de la catéchine a été établi entre 0 et 400 mg/mL. Les échantillons ont été analysés en trois exemplaires.

3.3. Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant un ou plusieurs composés est adsorbé sur une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée), puis est désorbé par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique). Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption-désorption.

3.3.1. Chromatographie sur couche mince

- *Principe*

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie en phase liquide. Pour effectuer la séparation, une petite quantité de la solution à analyser est déposée sur le bord d'une plaque CCM. La plaque est ensuite trempée dans un éluant contenu dans une cuve fermée. L'éluant migre par capillarité, il rencontre l'échantillon et l'entraîne.

Les différentes substances constituant l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec la phase stationnaire ou la phase mobile.

Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur du rapport frontal (Rf) puis comparées à celle de la littérature ou à celles des étalons.

Mode opératoire

Pour choisir la phase mobile la plus appropriée pour séparer efficacement les composés curcuminoïdes extraits de *C. longa L.* Différentes combinaisons de systèmes solvants ont été utilisées comme suit :

- Méthanol : Chloroforme (10 : 90) -----(A)
- Méthanol : Chloroforme (25 : 75) -----(B)
- Méthanol : Chloroforme (45 : 55) -----(C)
- Méthanol : Chloroforme (50 : 50) -----(D)
- Méthanol : Chloroforme (60 : 40) -----(E)
- Méthanol : Chloroforme (75 : 25) -----(F)
- Méthanol : Chloroforme (90 : 10) -----(G)

- Expression des résultats

Le système de solvant qui a fourni la meilleure séparation permet de calculer le Rf en utilisant la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon (h)}}{\text{distance parcourue par le front solvant (H)}}$$

3.3.2. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

- Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP), en anglais HPLC pour, high performance liquid chromatography ou plus rarement high pressure liquid chromatography, reste l'une des principales méthodes les plus performante de séparation des mélanges chimiques et de quantification des composants (Lindon *et al.*, 2003). Le principe de séparation de la CLHP est basé sur la distribution de l'analyte (échantillon) entre une phase mobile (éluant) et une phase stationnaire (matériau de garnissage de la colonne). Selon la structure chimique de l'analyte, les molécules sont retardées lors de leur passage sur la phase stationnaire. Les interactions intermoléculaires spécifiques entre les molécules d'un échantillon et le matériau de garnissage définissent leur temps "sur la colonne". Par conséquent, les différents constituants d'un échantillon sont élués à des moments différents. Ainsi, la séparation des composants de l'échantillon est réalisée. Une unité de détection (par exemple, un détecteur UV) reconnaît les analytes après leur sortie de la colonne. Les signaux sont convertis et enregistrés par un système de gestion des données (logiciel informatique), puis représentés dans un chromatogramme (Gumustas *et al.*, 2013).

- Mode opératoire

L'analyse des polyphénols contenu dans l'extrait aqueux de *C. longa L.* est effectuée selon la méthode de Vidal-Casanella *et al.*, (2020), en utilisant un chromatographe HPLC (Agilent Series 1100) (figure 24). Les empreintes polyphénoliques ont été enregistré à 280 nm, en utilisant une colonne Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, 100 4,6 mm D.I. avec 2,6 m la taille des particules). Les composants de la phase mobile étaient constitué d'une solution aqueuse d'acide formique à 0,1% (v / v) et méthanol (MeOH). Les composés ont été élués avec un gradient linéaire de 5% à 95% de MeOH en 20 min. La colonne a été nettoyée

pendant 2 minutes à 95% de B et conditionnée pendant 3 minutes à 5% de MeOH. Le volume d'injection était de 5 μ L et le débit était de 0,4 mL/min.



Figure 24. Système HPLC-UV (Agilent Series 1100) utilisé pour l'identification des composants phénoliques de l'EAC.

3.4. Evaluation du potentiel antioxydant

3.4.1. La capacité antioxydante totale (TAC)

- Principe

Le dosage de la capacité antioxydante totale (TAC) par la méthode du phosphomolybdène repose sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par l'échantillon à analyser et la formation ultérieure d'un complexe phosphate vert/Mo (V) à pH acide, détecte généralement des antioxydants tels que certains phénols, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol et les caroténoïdes (Prieto *et al.*, 1999).

- Mode opératoire

La capacité antioxydante totale a été évaluée selon la méthode décrite par Sánchez-Moreno *et al.*, (1998). Une aliquote (100 μ L) de la fraction d'extrait diluée est combinée avec 1 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0,3 N, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Du méthanol est utilisé à la place d'un échantillon pour le blanc. Les mélanges sont incubés dans un bain d'eau bouillante pendant 90 minutes puis refroidis à température ambiante. Leur absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc.

- *Expression des résultats*

La TAC a été exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE / g p.s.). Les dosages ont été effectués en triple.

3.4.2. L'activité de piégeage des radicaux DPPH

- *Principe*

Ce test est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante d'extraits bruts ou de composés purifiés de plantes. Le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une molécule stable soluble dans le méthanol, caractérisée par sa couleur violet foncé avec un maximum d'absorption à 515 nm. Les antioxydants (AH) ou d'autres espèces radicalaires sont capables de réagir avec ce radical stable en lui fournissant un électron ou un atome d'hydrogène, le réduisant ainsi en 2,2-diphényl-1-hydrazine (DPPH-H) ou en une hydrazine analogue substituée (DPPH-R) caractérisée par une couleur incolore ou jaune pâle qui peut être facilement suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 25) (Njoya, 2021).

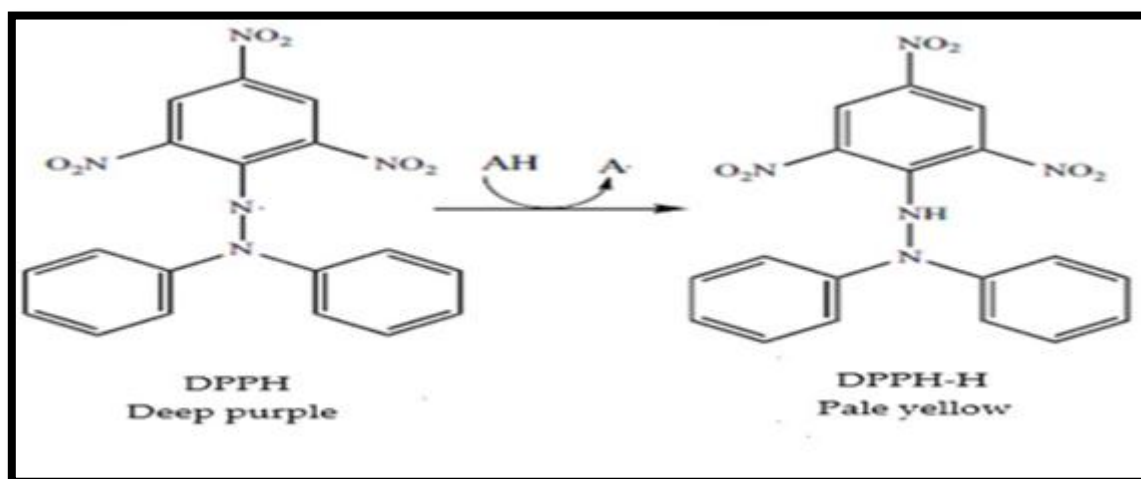


Figure 25. Mécanismes de piégeage du DPPH par un antioxydant (AH) (Munteanu *et* Apetrei 2021).

- *Mode opératoire*

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été réalisée selon la méthode décrite par Sánchez-Moreno *et al.*, (1998). Rapidement 50 μ L de chaque extrait à différentes concentrations (de 0,078 à 5 mg / mL) sont ajoutés à 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g / L). Dans le même temps, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μ L de méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH. Le mélange est agité

vigoureusement et laissé au repos à température ambiante pendant 30 minutes dans l'obscurité. L'absorbance de la solution résultante a ensuite été mesurée à 517 nm.

- **Expression des résultats**

L'activité de piégeage a été exprimée en $CI_{50\%}$ (mg / mL), la dose requise pour provoquer une inhibition de 50% de la DPPH. Une valeur $CI_{50\%}$ faible correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait. Le pourcentage d'inhibition des radicaux est calculé selon l'équation suivante:

$$I\% = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \times 100$$

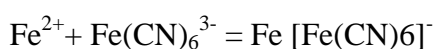
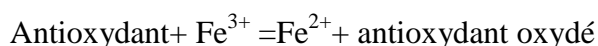
Dont :

A0: absorbance du contrôle (solution DPPH sans extrait).

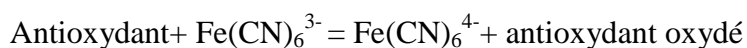
A: Absorbance en présence d'extrait.

3.4.3. Dosage du pouvoir antioxydant par réduction ferrique (FRAP)

Le test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP en anglais, Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) est une méthode basée sur la mesure de la réduction du complexe ion ferrique (Fe^{3+})-ligand en complexe ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu intense par des antioxydants dans un milieu acide. L'activité antioxydante est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 700 nm (Zhong *et* Shahidi 2015). Plus récemment, le ferricyanure de potassium a été le réactif ferrique le plus utilisé dans les tests FRAP. Dans ce dernier cas, le produit final est le bleu de Prusse, qui est quantifié par spectrophotométrie et indique le pouvoir réducteur des antioxydants testés. La production de bleu de Prusse peut se faire par deux voies différentes avec le même résultat. Les antioxydants peuvent soit réduire le Fe^{3+} de la solution en Fe^{2+} , qui se lie au ferricyanure pour donner le bleu de Prusse, soit réduire le ferricyanure en ferrocyanure, qui se lie au Fe^{3+} libre de la solution et forme le bleu de Prusse (Berker *et al.*, 2010). Le schéma simplifié de ces deux réactions est donné ci-dessous :



Ou,



- **Mode opératoire**

Le dosage du pouvoir réducteur ferrique de l'extrait aqueux de *C. longa* est déterminé selon la méthode décrite par Wu, Sun *et al.* (2014). Pour cela, un millilitre d'extrait à différentes concentrations (de 0,078 à 5 mg / mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le mélange est incubé dans un bain-marie à 50 ° C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Une aliquote de surnageant (2,5 mL) est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse à 0,1% de $FeCl_3$. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 700 nm contre un blanc préparé de manière similaire, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (PRIMLIGHT, SECOMAM®). Le témoin positif est représenté par une solution d'acide ascorbique (Vitamine C) et l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

- **Expression des résultats**

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé. Le pouvoir antioxydant de l'échantillon testé a été exprimé en EC_{50} (mg / mL), la concentration nécessaire pour une réduction de 50% du fer.

3.5.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

- **Principe**

L'évaluation in vitro du test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été utilisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de CAE. Une méthode modifiée de Nagavekar *et* Singhal (2018) a été utilisée pour déterminer la capacité des extraits à inhiber la dénaturation de l'albumine. L'aspirine, l'acide acétylsalicylique (ASA), qui est un médicament anti-inflammatoire connu, a été utilisée comme standard de référence.

- **Mode opératoire**

À 1 mL d'albumine d'œuf à 1 % ou d'albumine de sérum bovin (BSA), sont ajouté 1 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 6,8) et 0,2 mL d'extrait de plante ou de l'extrait standard (ASA). Un volume similaire de solvant seul a servi de contrôle. Le mélange réactionnel a été mélangé soigneusement, puis chauffé à 70 °C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été refroidis et l'absorbance a été mesurée à 660 nm sur un spectrophotomètre (spectrophotomètre UV-VIS).

- *Expression des résultats*

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines ont été déterminées par la formule suivante :

$$\text{inhibition (\%)} = \frac{Ac-At}{Ac} \times 100$$

Où Ac = absorbance du contrôle, et At = absorbance du test ou du médicament.

4. Répartition et traitement des animaux

L'expérimentation a été menée sur 24 mâles matures de souche *Wistar*, âgés de 3 mois et pesant $193,9 \pm 26,46$ g pendant 30 jours. Les animaux ont été logés dans une animalerie dans des cages appropriés avec un cycle lumière / obscurité de 12/12 heures, à 22 ± 2 ° C, et ont eu accès *Ad libitum* à de l'eau et a une alimentation spéciale rongeurs (15% de protéines) (figure 26). Les rats ont été répartis au hasard en 4 groupes (N=6). Les animaux du premier groupe (GI) ont reçu 1/25 DL₅₀ de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à une dose de 34 mg / kg de poids corporel (p.c.) en se référant à l'étude de Moselhy *et al.*, (2012). Les rats du deuxième groupe (GII) ont reçu par voie orale, une heure au préalable à l'administration de l'Al une dose de l'EAC (1/25 DL₅₀) à 200 mg / kg de p.c (Govind, 2011). Le troisième groupe (GIII) n'a reçu que de l'EAC à la même dose et par la même voie d'administration que le 2^{ème} groupe ; quant au quatrième groupe (IV) n'a reçu aucun traitement, mais recevait de l'eau et de la nourriture *Ad libitum*.



Figure 26. A : cage d'élevage des rats Wistar (A). B : alimentation spéciale rongeurs (SIM)©.

4.1. Technique d'administration des traitements

Les rats ont été acclimatés à la manipulation pour réduire au maximum l'état de stress en les manipulant le plus fréquemment possible avant le début de l'expérimentation. L'animal est pris par la base de la queue et maintenues en plaçant fermement la main sur le dos et la cage thoracique et en retenant la tête avec le pouce et l'index immédiatement derrière les mandibules pour immobiliser la tête et faciliter l'administration des traitements par voie orale (gavage). Le gavage est effectué à l'aide d'une sonde métallique à boule. La distance à laquelle la sonde doit être insérée est estimée en mesurant la distance entre le nez à la première côte. Le rat doit être étendu en ligne droite pour faciliter l'introduction de la sonde de gavage. Cette dernière est introduite dans l'espace entre les incisives gauches et les molaires et dirigée doucement vers la branche droite de la mandibule. Le rat avale généralement lorsque la sonde s'approche du pharynx, ce qui facilite l'entrée dans l'œsophage. Si l'animal se débat ou semble avoir des difficultés respiratoires, la sonde est retirée et la tentative est recommencée après un bref temps de repos. Une fois la position souhaitée atteinte, le liquide est injecté dans l'estomac et la sonde est doucement retirée. L'animal doit être surveillé après la procédure pour s'assurer qu'il n'y a pas d'effets indésirables. Le volume maximal recommandé pour l'administration est de 1% du poids corporel (Ökva *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2011) (figure 27).

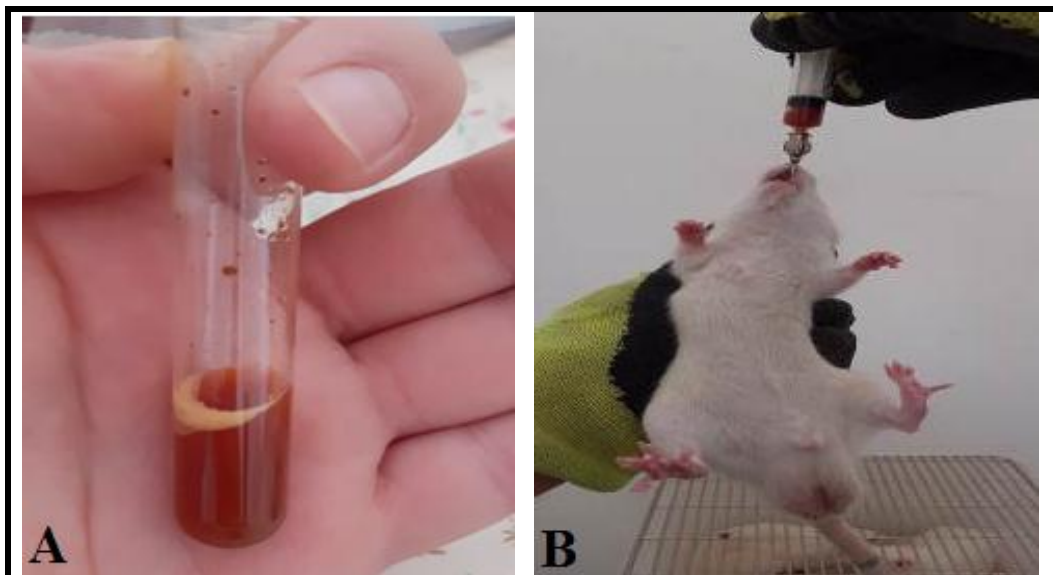


Figure 27. A : Aspect de la solution de l'EAC. B : Techniques de manutention et de gavage des rats ©.

4.2. Suivi des rats

Durant toute la période expérimentale les rats ont fait l'objet d'un suivi qui consiste à peser hebdomadairement les animaux de chaque lot afin de pouvoir calculer leur gain corporel moyen exprimé en g/semaine (gain corporel moyen = poids moyen de la semaine - poids moyen de la semaine précédente) (Qin *et al.*, 2013). Le suivi des rats permet aussi de pouvoir détecter tout changement morphologique (perte de poile, irruption cutanée, diarrhée,... etc.), ou comportementale (stress, anxiété,... etc.).

4.3. Nécropsie

Au terme du trentième jour de l'expérimentation, les rats sont sacrifiés après un jeûne de 12 heures par euthanasie en utilisant de l'éther d'éthylque ou du chloroforme dans un grand dessiccateur (Kim *et al.*, 2018). Après l'incision de l'abdomen, le sang est prélevé dans des tubes secs pour le dosage hormonal. Les testicules, les épидидymes, les vésicules séminales et les prostates ont été soigneusement prélevés, lavés avec une solution saline (0.9% NaCl), séchés et pesés afin de calculer l'index d'organe correspondant à l'aide de la formule suivante (Qin *et al.*, 2013) :

$$\text{Index d'organe(poids relatif)} = \frac{\text{Poids de l'organe(g)}}{\text{Poids corporel (g)}}$$

4.4. Collecte du sang et analyse hormonale

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine cave inférieure dans des tubes secs. Les échantillons de sang ont été centrifugés pour obtenir des sérums. Ces derniers sont séparés dans d'autres tubes à échantillons simples et conservés au réfrigérateur jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour les dosages hormonaux. Tous les tests ont été réalisés dans les 24 heures suivant le prélèvement d'échantillons. Les échantillons de sérum ont été dosés pour déterminer les taux de la FSH, la LH et la testostérone en utilisant des méthodes de dosage immunoenzymatique par le biais de kits commerciaux (VIDAS Assays, BIOMERIEUX) (Uboh *et al.*, 2007).

4.5. Evaluation des paramètres biochimiques

4.5.1. Préparation des homogénats des organes

Les homogénats des gonades et des glandes annexes (Testicules, épидидymes, vésicules séminales et prostates) ont été préparés selon la méthode décrite par Olayinka *et al.*, (2019)

en broyant 1 g de de chaque organe dans 5 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 à 4 ° C, puis centrifugés à 3000 trs / min pendant 10 min. Les surnageants sont prélevés et maintenus au congélateur (à -20 ° C) pour être utilisés dans les dosages biochimiques ultérieures à savoir : le dosage des protéines totales et des marqueurs du stress oxydatif tissulaire.

4.5.2. Dosage des protéines totales (méthode de Bradford)

- Principe

La teneur en protéines tissulaires des homogénats des différents organes étudiés a été dosée par une technique rapide et reproductible suivant la méthode de (Bradford, 1976) en utilisant le Bleu de Coomassie R250 comme colorant. Ce pigment forme un complexe avec les protéines ce qui modifie sa structure et déplace sa longueur d'onde d'absorbance maximale de 465nm à 595nm. C'est cette augmentation de l'absorption qui est mesurée par cette technique de dosage. La coloration est stable pendant 1 heure, et il y a peu ou pas d'interférence avec les cations et les sucres tel que le saccharose. Néanmoins, une légère coloration se développe en présence de tampons fortement alcalins. Les seuls composants donnant des interférences importantes de coloration sont les détergents en concentration élevée (sodium dodecyl-sulfate et le Triton X-100) et les détergents commerciaux pour la verrerie.

- Mode opératoire

Chaque dosage est réalisé dans une cuve de spectrophotomètre comme suit : 100 µl de solution contenant 1 à 10 µg de protéines + 5 mL de réactif au Bleu de Coomassie homogénéisée par renversement ou au Vortex. Après 5 minutes (stabilisation de la coloration), la lecture de la DO est effectuée à 595 nm (coloration stable 1 heure). Le tube 'blanc' est réalisé avec 100µl d'eau distillée pour la gamme étalon.

- Expression des résultats

La quantité de protéines de l'échantillon est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage établie avec le sérum albumine bovine (BSA) entre 0 et 10 µg/mL.

4.5.3. Evaluation du statu oxydatif

4.5.3.1. Dosage du maldondialdéhyde (MDA)

- Principe

Les peroxydes se décomposent en composés volatiles responsables de l'odeur de rance au cours de la phase finale de la peroxydation lipidique. Il y'a notamment formation d'aldéhydes dont l'aldéhyde malonique qui réagit avec l'acide Thio-barbiturique pour former

un complexe rose qui absorbe à 530 nm. Ce complexe rend compte de la quantité de malondialdéhyde (MDA) (Azad *et al.*, 2019).

- *Mode opératoire*

Le taux de MDA est mesuré en mélangeant 1 mL de chaque homogénat, dans une série de tubes à essais, avec 0.5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1ml d'acide Thio-barbiturique (TBA) 0.67%. Dans le tube témoin, l'échantillon est remplacé avec 1 mL de tampon Tris-HCl 50mM, KCL 150mM. Ensuite les tubes ont été fermés et chauffés pendant 10 minutes à 90°C au bain marie. Après refroidissement à l'eau de robinet, 2 ml de n-butanol sont additionnées, puis centrifugés à 3000 trs / min pendant 15min à température ambiante. Le surnageant est décanté et la DO est lue à 530 nm contre le blanc.

- *Expression des résultats*

La Concentration en MDA est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire de cette molécule et en appliquant La loi de Beer-Lambert, $DO = \epsilon \cdot C \cdot L$.

Là Où :

ϵ : est le coefficient d'atténuation molaire ou d'absorptivité propre à l'entité chimique (constante).

L : est la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré ;

C : est la concentration de l'entité chimique.

4.5.3.2. Dosage de la catalase (CAT)

- *Principe*

Le peroxyde d'hydrogéné (H_2O_2), un produit faiblement toxique pour les cellules, est normalement détruit par la catalase qui est une enzyme largement présente chez tous les organismes aérobies. La mesure de l'activité de cette enzyme est basée sur la capacité du H_2O_2 à se lier au dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) pour former un précipité bleu-vert d'acide perchlorique. Ce dernier, étant instable, va être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert absorbant à 570 nm. L'activité de la catalase, qui est proportionnelle à la densité optique, sera déterminée grâce à une courbe d'étalonnage (Hadwan, 2016).

- *Mode opératoire*

Le mélange réactionnel nécessaire à la préparation de la courbe d'étalonnage (Tableau 5) est constitué d'un réactif de dichromate/acide acétique (50 mL d'une solution dichromate de potassium à 5% additionnée à 150 mL d'acide acétique glacial) et du peroxyde d'hydrogène préparé à 50 mM. L'ajout du H_2O_2 à différentes concentration à la solution de dichromate/ acide acétique conduit à la formation d'un précipité bleu. Le chauffage des tubes

pendant 10 min à 100 °C suivi de leur refroidissement à température ambiante conduit au changement de couleur (couleur verte) indiquant la formation d'acétate chromique. L'eau distillée est ensuite ajoutée et l'absorbance est lue à 570 nm.

Dans les tubes tests le mélange réactionnel est constitué de 50 µL d'homogénat et 750 µL de solution tampon phosphatée (0,1 M, pH 7,5). Le chronomètre est ensuite déclenché après l'ajout de 200 µL de H₂O₂ (50 mM). La réaction est arrêtée après 1 min par ajout rapide de 2 mL de solution de dichromate/acide acétique. Dans les tube témoins l'homogénat est remplacé par 800µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). Les tubes sont ensuite chauffés à 100 °C pendant 10 minutes, et la densité optique est lue à 570 nm après refroidissement des tubes à l'eau de robinet.

- *Expression des résultats*

La quantité de H₂O₂ restante dans la solution après ajout de l'acide prechromique a été évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage. L'activité spécifique de la catalase est exprimée en mM de H₂O₂/min/mg de protéines

Tableau 5. Gamme d'étalonnage pour la détermination de la Catalase.

N° tubes	1	2	3	4	5
H ₂ O ₂ 50 mM (µL)	0	20	40	80	160
Solution de dichromate/ acide acétique (mL)	2	2	2	2	2
Eau distillée (µL)	1000	980	960	920	840

4.5.3.3. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

- *Principe*

La suproxyde dismutase (SOD) est une enzyme appartenant à la famille des enzymes antioxydant qui régulent les niveaux des espèces réactive à l'oxygène (EROs) en catalysant la conversion de l'anion radicalaire superoxyde (O₂[•]) en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Katerji *et al.*, 2019). L'activité enzymatique de la SOD peut être déterminée à l'aide de la méthode décrit par Misra *et* Fridovich, (1972). Le principe de cette méthode repose sur la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation de l'adrénaline en adrénochrome dans un milieu basique, qui peut être mesuré à une longueur d'onde d'absorption de $\lambda = 480$ nm.

- **Mode opératoire**

Afin de mesurer l'activité spécifique de la SOD (exprimée en unité SOD/mg de protéines), un mélange réactionnel est préparé en additionnant 134 μL d'homogénat à 1666 μL de tampon carbonate. Ensuite, pour déclencher la réaction, 200 μL d'adrénaline (0.3 mM) est ajoutée dans chaque tube. Après agitation rapide des tubes, la densité optique (DO) est déterminée à 20 s et à 80 s.

- **Expression des résultats**

L'activité spécifique de la super oxyde dismutase au niveau tissulaire est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{L'activité spécifique de la SOD} \left(\text{unité} \frac{\text{SOD}}{\text{mg Protéines}} \right) = \frac{\text{N}^\circ \text{ d'unité SOD/mL}}{\text{mg protéines} \times \text{facteur dilution}}$$

Sachant que :

Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50% de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome dans un intervalle de temps d'une minute.

Avec :

- $\Delta \text{Do} = \text{DO}_{20\text{s}} - \text{DO}_{80\text{s}}$.
- $\% \text{ d'inhibition} = 100 - (\Delta \text{Do} \times 100 / \Delta \text{DO blanc})$.
- X % d'inhibition correspond à N unités.

4.6. Etude de la qualité du sperme (Le spermogramme)

Le spermogramme est un examen essentiel à la recherche de la cause de l'infertilité au sein d'un couple. Les renseignements qu'il fournit se doivent d'être justes et représentatifs de l'échantillon obtenu. L'échantillon de sperme est soumis à différentes analyses ayant pour but de le quantifier et d'en évaluer la qualité des spermatozoïdes (Menkveld *et al.*, 2011).

4.6.1. Préparation des suspensions spermatique

Les suspensions spermatiques sont préparées selon la technique d'écrite par Wang, (2002). Un épидидyme de chaque rat est placé dans une boîte de Pétri, coupé avec des ciseaux et homogénéisé dans 1 mL de solution saline physiologique (0,9%) à 35-37 ° C et laissé macéré pendant 15 min pour permettre aux spermatozoïdes de se déplacer vers l'extérieur et former la suspension de sperme.

4.6.2. Comptage des spermatozoïdes

La numération des spermatozoïdes épидидymaires est une méthode largement utilisée, simple et sensible pour évaluer les effets des substances toxiques pour la reproduction masculine sur l'épididyme et / ou les testicules. Habituellement, l'épididyme est divisé en trois parties: la tête, le corps (corps) et la queue (figure 28). C'est la queue de l'épididyme qui est largement utilisée pour effectuer la numération des spermatozoïdes (Wang, 2002).

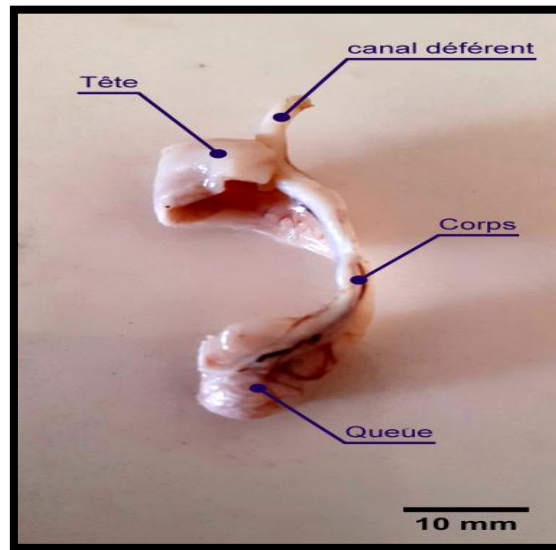


Figure 28. Observation macroscopique de l'épididyme de rat et ses trois parties anatomiques (Tête, corps et queue) ainsi qu'un petit fragment du canal déférent ©.

Une aliquote de 0,5 mL de suspension de sperme est additionnée à 1 ou 2 mL du liquide de dilution (bicarbonate de sodium 5 g, formol 1 mL et eau distillée 99 mL) afin d'immobiliser les spermatozoïdes. Une goutte de sperme dilué est déposée dans un hémocytomètre (Cellule Thoma). L'échantillon est laissé reposer dans un endroit humide pendant 10 min. Le nombre de spermatozoïdes dans les carrés appropriés de l'hémocytomètre a été compté au microscope optique à un grossissement de $\times 400$. Le nombre de spermatozoïdes par ml de suspension d'épididyme a été calculé selon Wang, (2002).

- 0.5 mL de suspension spermatique est additionnée à 1 ou 2 mL du liquide de dilution (liquide mobilisateur) préparé selon la méthode d'écrite par (Srinivasulu and Changamma 2017).
- 10 μ L de sperme dilué est déposée sur une cellule Thoma (figure 29). Afin, de permettre aux spermatozoïdes de se déposer dans les quadrillages de hémocytomètre.

Ce dernier est déposé, pendant 2 min, dans une boîte de Pétri propre contenant une portion de gaze humidifiée.

- Hémocytomètre est ensuite déposé sur la platine du microscope et les quadrillages (16 carrés primaires contenant chacun 25 carrés secondaires) sont observés au grossissement (G×10) (figure 29-A).
- Le nombre des spermatozoïdes est compté dans 5 carreaux primaires de la grille. Les spermatozoïdes situés à cheval sur les côtés du grand carré ne doivent être comptés que sur deux cotés (toujours les mêmes) pour éviter de les comptabiliser deux fois (figure 34-B).
- Chaque comptage est effectué en duplicata.

Le nombre total des spermatozoïdes par épидидyme est en utilisant la formule suivant :

$$\text{Sperme total} = \text{nombre moyen} \times \text{facteur de dilution}$$

Avec :

$$\text{Nombre moyen} = (\text{compte 1} + \text{compte 2}) / 2$$

Et :

$$\text{facteur de dilution} = \frac{\text{Vol. Eau phsio. boite pétri}}{\text{Vol transféré}} \times \frac{\text{Vol. total tube à essai}}{\text{Vol. carré sec.} \times \text{N}^\circ \text{ carrés}}$$

Le nombre de spermatozoïdes épидидymaires est exprimé par milligramme d'épididyme = (nombre moyen × facteur de dilution) / poids de la queue (mg)

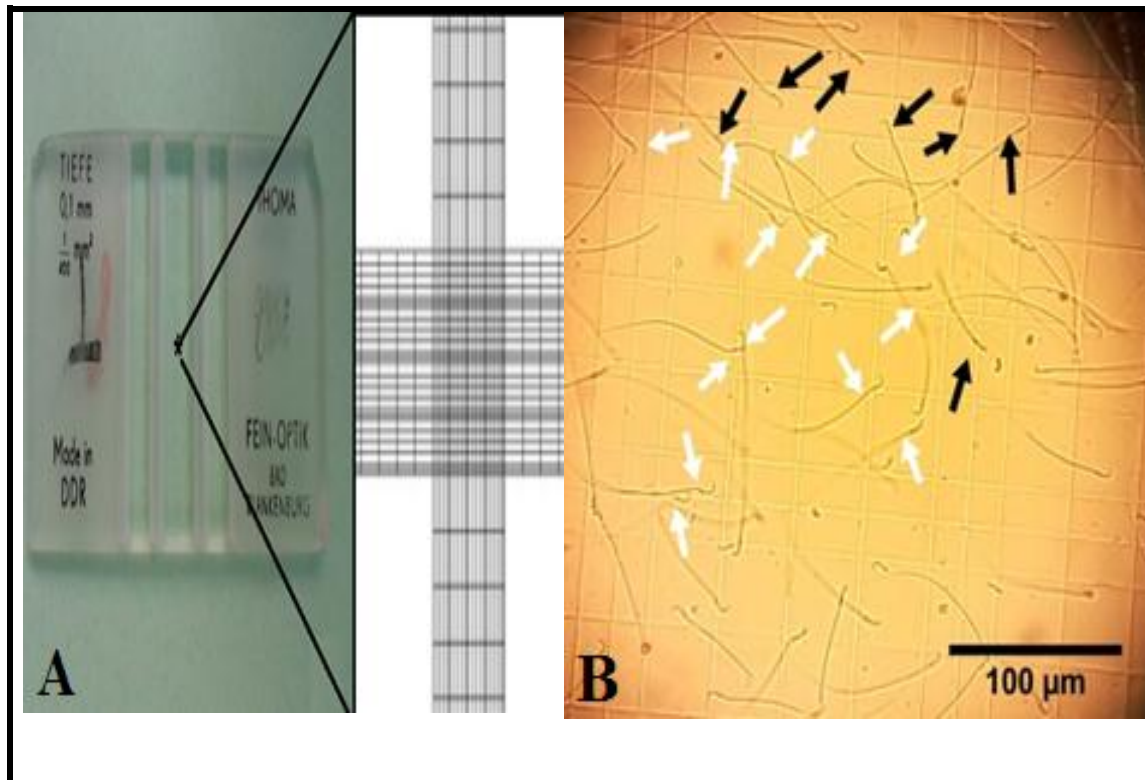


Figure 29. A : zone de comptage d'un hémacytomètre (cellule Thoma). B : carré secondaire d'une cellule Thoma où les flèches blanches indiquent les spermatozoïdes qui seront comptés et les flèches noirs indiquent les spermatozoïdes qui ne seront pas comptés (G×400) ©.

4.6.3. Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes

Le spermocytogramme est l'examen médical correspondant à l'analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes au microscope optique, permettant l'exploration de la fertilité masculine (Menkveld *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2017).

La morphologie des spermatozoïdes est évaluée après coloration d'un frottis et examen de celui-ci au microscope au grossissement ×40. Une goutte de suspension de sperme (10 μL) colorée est montée entre la lame et la lamelle. Différentes colorations peuvent être utilisées telle que : Hématoxyline et Éosine, Papanicolaou ou Diff-Quick (Srivastava *et al.*, 2017).

Un décompte d'au moins 200 spermatozoïdes est effectué avant d'établir une moyenne. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) à partir de la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'anomalie(\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ spz anormaux}}{\text{N}^\circ \text{ total de spz}} \times 100$$

Les anomalies sont classées par ordre d'importance comme suit: tête, pièce médiane et flagelles. Dès qu'une anomalie est identifiée, les spermatozoïdes sont directement classés dans les «anormaux» (Al-Ani *et al.*, 2009).

4.6.4. Détermination du pourcentage des spermatozoïdes vivants (test de vitalité)

Le test de la viabilité à la coloration d'éosine-nigrosine est une technique basée sur le principe de la perméabilité des cellules mortes à certains colorants comme l'éosine (membranes plasmiques lésées). Celle-ci nous permet d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants (Soleimanzadeh *et Saberivand*, 2013).

Une goutte de suspension de sperme est mélangée avec une goutte d'éosine à 1%. Après 30 s, un volume égal de nigrosine est ajouté à ce mélange (colorant dit négatif qui sert de contraste de fond). Des frottis minces sont ensuite préparés et observés au microscope optique à un grossissement de $G \times 100$. Les spermatozoïdes viables dont la membrane plasmique est imperméable aux colorants restent incolores tandis que les spermatozoïdes morts leurs membrane devient perméable et se colorent en rouge (figure 30).

Au moins 200 spermatozoïdes sont observés pour le calcul du pourcentage (%) de spermatozoïdes vivants en utilisant la formule suivante:

$$\text{Pourcentage spermatozoïdes vivants (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ spz vivant}}{\text{N}^\circ \text{ total de spz}} \times 100$$

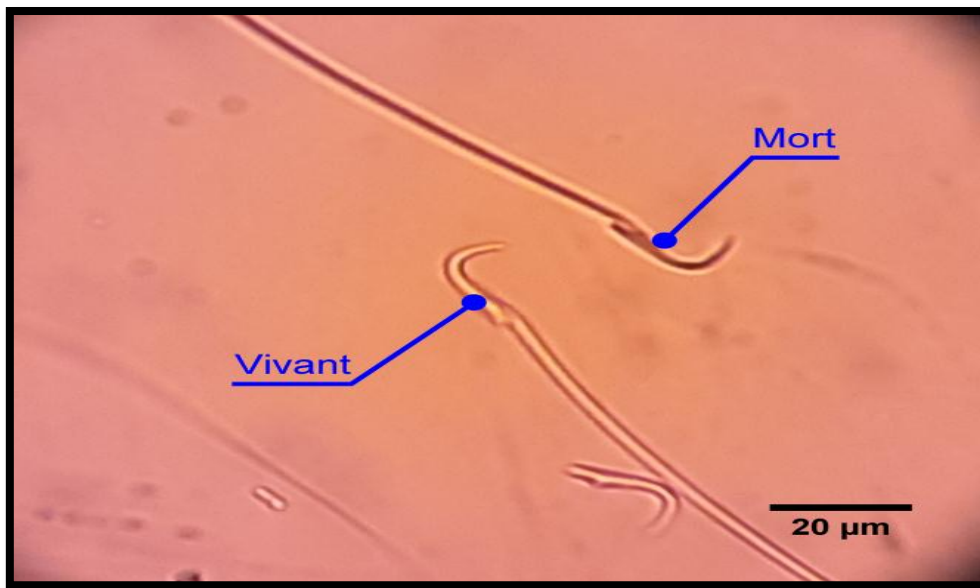


Figure 30. Observation microscopique d'un frottis spermatique après coloration à l'Eosine-Nigrosine montrant un spermatozoïde coloré en rose (mort) et un spermatozoïde incolore (vivant) (G×1000) ©.

4.6.5. Analyse de l'intégrité de l'ADN spermatique

Afin d'évaluer l'intégrité de l'ADN spermatique, des frottis de sperme ont été réalisés et soumis à une technique de coloration adaptée, à base de colorant de Bleu de Toluidine (BT), suivant le protocole décrit par Rui *et al.*, (2018).

Les frottis de sperme ont été préparés en utilisant 10 µL de suspension spermatique fixée dans 96% éthanol-acétone pendant 30 min à 4 ° C. Après séchage, les frottis sont hydrolysés dans 0,1 N HCL pendant 5 min à 4 ° C et lavés trois fois à l'eau distillée. Les frottis sont ensuite soumis à une coloration à base de BT (0,05%) pendant 20 min et lavés 2 fois dans de l'eau distillée. Ils sont ensuite évalués sous microscopie optique à un grossissement de 100 fois. Les spermatozoïdes avec un ADN intègre demeurent incolores, tandis que les spermatozoïdes ayant subis une fragmentation d'ADN (ADN endommagé) apparaissent colorés en bleu (figure 31).

Un décompte d'au moins 200 spermatozoïdes est effectué avant d'établir une moyenne. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) à partir de la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de spz à ADN fragmenté (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ spz Colorés}}{\text{N}^\circ \text{ total de spz}} \times 100$$

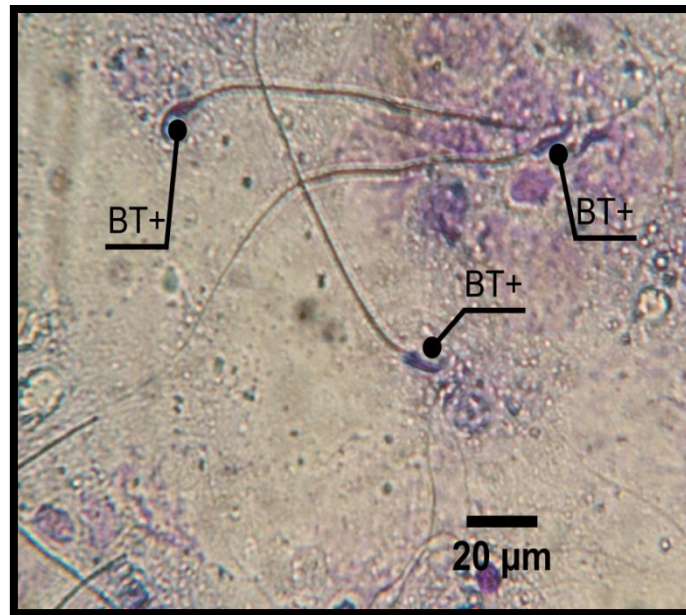


Figure 31. Observation microscopique d'un frottis spermatique montrant des spermatozoïdes au Bleu de Toluidine boraté (BT+) (G×1000).

4.7. Etude histologique (Histomorphologie)

Parmi toutes les méthodes utilisées pour évaluer la fertilité des animaux de laboratoire, l'histologie reste une étape incontournable. Elle vise à explorer la structure des tissus. Elle permet d'assurer le lien entre la structure des organes et leurs fonctions pour pouvoir détecter les différentes pathologies à différents niveaux (McLachlan *et al.*, 2007; Nandedkar *et al.*, 2015).

Une série d'étapes clés sont nécessaires pour obtenir des coupes histologiques parfaites, à savoir : la fixation, la déshydratation, la clarification, l'imprégnation, inclusion dans la paraffine et la coloration sont décrites ci-après :

4.7.1. La fixation

La fixation de l'échantillon est réalisée rapidement pour éviter la putréfaction ou l'autolyse du tissu. Cette étape permet de préserver les composants cellulaires ou tissulaires sous une forme presque proche du tissu vivant (Dettmeyer, 2018). Les organes doivent séjournés durant 24 à 48 heures dans un volume de fixateur de 20 à 50 fois supérieures au volume de l'échantillon (figure 32) (Dey, 2018). Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide Bouin (un mélange de formaldéhyde et d'acide picrique) (Musiał *et al.*, 2016).



Figure 32. Fixation des organes dans du formol dilué au 1/10 ©.

4.7.2. Techniques macroscopiques

Les tissus prélevés sont séchés et mesurés avant d'être coupés en minces morceaux transversalement ou longitudinalement et placés dans des cassettes d'enrobage. À chaque examen, la taille, le poids, la couleur, la forme, la consistance et la délimitation des échantillons histologiques sont décrits.

4.7.3. Inclusion de paraffine

La méthode d'inclusion à la paraffine est la plus fréquemment utilisée en histologie. La paraffine est un mélange d'hydrocarbures saturés et de cires. Elle n'est pas miscible à l'eau ce qui impose une étape de déshydratation. Le déshydratant le plus courant est l'alcool éthylique (Fischer et al., 2008 ; Fiette *et al.*, 2017). Du fait que la paraffine n'est pas miscible à l'alcool, elle pourrait être remplacée avant l'inclusion par un liquide intermédiaire miscible à l'alcool et à la paraffine. Le xylène est donc utilisé. La succession de toutes ces étapes sont indiquées dans l'Annexe A et elle est facilitée par un appareil automate (Figure 33).



Figure 33. Appareil d'inclusion de paraffine (modèle LEICA EG1160) ©.

4.7.4. Technique d'enrobage à la paraffine

Après l'étape de l'inclusion, les cassettes sont démontées et remplies de paraffine chaude dans un récipient en utilisant des moules métalliques. Ensuite, la paraffine est refroidie en les déposants dans une platine réfrigérée ce qui permet sa solidification (figure 34).



Figure 34. L'appareil d'enrobage, avec deux compartiments chauds (A, B), et un compartiment froid (c) (LEICA EG 1160) ©.

4.7.5. Coupes au microtome

Le microtome sert à obtenir des coupes d'une épaisseur de 3 à 5 μm . La coupe histologique est obtenue par le passage régulier de la pièce sur la lame du microtome (Coyle *et al.*, 2019). A chaque passage, il enlève une tranche d'épaisseur réglable. Il s'agit de réaliser des coupes isolées ou des coupes en série disposées sous la forme d'un ruban. Les rubans de paraffine sont étalés à la surface d'un bain marie chauffé à 45 C° pour éviter qu'ils se plient. Ensuite, les coupes sont récupérées sur une lame de verre recouverte d'une solution d'albumine qui renforce l'adhésion de l'échantillon sur la lame. Les coupes sont égouttées puis mises dans une étuve à 40 C° avant d'être colorés (figure 35).



Figure 35. Technique de découpage au microtome (LEICA RM 2235) ©.

4.7.6. Technique de coloration

La paraffine (hydrophobe) et les colorants (hydrophile) ont des solubilités différentes et des comportements chimiques opposés. La coloration des coupes comprend une étape de déparaffinage et de réhydratation (Thompson *et* Richter, 1960; Horobin, 2002). Ces étapes sont réalisées par une série de bains dans un appareil automate (Annexe B) (figure 36).



Figure 36. Automatique pour coloration à l'hématoxyline-éosine (LEICA EG 4040) ©.

4.7.7. Montage des lames

Il s'agit d'une étape post-coloration. Une goutte d'Eukitt (colle à base de résine) est déposée sur la section; une lamelle couvre-objet est appliquée afin que la résine recouvre toute la coupe. Lors de la manipulation, aucune bulle d'air ne doit être insérée entre les deux lames (figure 37). L'Eukitt polymérise en une vingtaine de minutes mais afin accélérer le processus la lame peut être placée sur une plaque chauffante à 40 ° C.



Figure 37. Séchage des coupes montées entre lames et lamelles ©.

4.7.8. Observation microscopique

L'observation microscopique est l'activité principale du pathologiste en utilisant un microscope. Selon l'objectif et la nature de l'étude, nous faisons recours soit à un microscope optique soit à un microscope électronique. Cette étape permet d'évaluer d'éventuelles lésions ou anomalies dans les tissus cibles (Daniel *et al.*, 2011).

4.8. Etudes histochimiques

4.8.1. Mise en évidence du phénomène d'apoptose

L'un des premiers signes de l'apoptose est la condensation de la chromatine. Le Bleu de Toluidine borate (BT) (BT 1%, tétraborate de sodium 1%) permet de mettre en évidence cette condensation (Chakroun *et al.*, 2003).

Le BT boraté est préparé à une concentration de 1% additionné de 1% de tétra-borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Cette solution coloré est ensuite diluée au 1/10^e dans de l'éthanol à 70%, puis déposée sur les coupes histologique placées sur une platine chauffante à 40° C durant 45 à 60 s. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, puis déshydratées en les passant successivement dans deux bains d'acétone et de toluène durant 2 min chacun, puis montées à l'Eukit.

Les cellules apoptotiques apparaissent avec des noyaux au couleur bleu denses. Alors que, les cellules normales (saines) montrent des noyaux clairs avec filaments de chromatine et des nucléoles bien visibles.

4.8.2. Mise en évidence des dépôts d'Aluminium

Le sel de triammonium de l'acide aurintricarboxylique, communément appelé Aluminon, est un colorant souvent utilisé pour détecter la présence de l'Al en formant un complexe rouge en combinaison avec Al^{3+} (Bahey *et al.*, 2014).

Selon la technique décrite par Ohtsuki *et al.*, (1989), les coupes de tissu ont été déparaffinées avec du xylène et hydratées dans de l'eau distillée puis les lames sont émergées dans une solution chaude d'Aluminon (80-85°C) pendant 7 min. Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée et contre-colorées avec une solution de vert rapide pendant 3 minutes. Les lames ont ensuite été rincées dans trois bains d'eau distillée et séchées à l'air avant d'être montées.

Après visualisation des lames les éventuels dépôts d'aluminium sont mis en évidence par une teinte rouge (révélatrice du complexe Al^{3+} -Aluminon) sur fond vert.

4.9. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (Erreur standard de la moyenne). Les résultats sont analysés par le logiciel SigmaPlot 11.0 version Windows. La comparaison de deux moyennes est effectuée par un test t de Student. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (ANOVA) par l'un des tests post-hoc suggérés par le logiciel (Student-Newman-Keuls, Bonferroni ou Tukey t-test). Lors des expressions des résultats des lettres sont utilisées pour indiquer l'existence ou pas de différence significative entre les différents groupes expérimentaux. Là où les groupes ne partageant pas une lettre commune (a-e) diffèrent significativement à $p < 0,05$.

Résultats et Interprétations

«Ce chapitre aborde les résultats de l'étude expérimentale que nous avons menée. Cette dernière comporte deux parties : une partie consacrée à la caractérisation de la plante par dosages phytochimiques et d'analyse chromatographique, et ceux de l'optimisation de ses pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires. Ensuite, la deuxième partie a été consacrée à l'étude expérimentale in vivo sur le rat Wistar qui comprend une évaluation de la qualité du sperme, le dosage sérique des hormones sexuelles, l'estimation du degré du stress oxydatif tissulaire par dosage de certains marqueurs et enzymes relatifs au stress oxydatif, et au final une étude histologique et histochimique pour évaluer la structure et le niveau d'atteinte des gonades mâles et des glandes annexes. Les deux parties ont fait l'objet deux articles scientifiques publiés dans des journaux internationaux indexés dans les bases de données «copernicus» et «scopus».

1. Rendement d'extraction, teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés

L'extraction de la partie souterraine (rhizomes) de *curcuma longa L.* par décoction en utilisant l'eau comme solvant nous a permis de calculer le rendement d'extraction exprimé en pourcentages du rapport entre le poids du résidu sec et le poids de la matière sèche initiale (7.80 ± 0.81 %). La teneur totale en polyphénols (TTP) a été mesurée en milligrammes d'acide gallique équivalent par gramme de résidu sec (mg GAE/g RS) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, tandis que la teneur en flavonoïdes totaux (TFT) et la teneur des tanins condensés (TTC) (Les anthocyanidines) ont été mesurés en milligrammes catéchine équivalent par gramme de résidu sec (mg CE/g RS) en se référant aux courbes d'étalonnages de la catéchine (Annexes C). Les concentrations en TTP, TFT et TTC de l'EAC se sont avérées être de $26,63 \pm 0,06$ mg GAE/g RS, $17,56 \pm 0,77$ mg CE/g RS, et $41,59 \pm 0,62$ mg GAE/g RS comme indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6. Rendement d'extraction et des teneurs de TTP, TFT et TTC de l'extrait aqueux de *C. longa L.*

<i>Paramètres</i>	<i>Rendement d'extraction (%)</i>	<i>Polyphenols (mg GAE/g RS)</i>	<i>Flavonoides (mg CE/g RS).</i>	<i>Tannins condensés (mg CE/g RS)</i>
EAC	7.80 ± 0.81	26.63 ± 0.06^a	17.56 ± 0.77^b	41.59 ± 0.62^c

EAC : Extrait aqueux de *C. longa L.* Les données sont exprimées en moyennes \pm ESM (n=3). La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide du test de Tukey. Les colonnes ne partageant pas une lettre commune (a-c) diffèrent significativement à $p < 0,05$ (test de Tukey).

2. Résultat de la détermination de la longueur d'onde maximale

Lambda max (λ max) est une grandeur caractéristique du composé analysé. Elle peut donc permettre d'identifier l'espèce chimique en solution. En effet, le spectre UV de l'extrait aqueux de *C. longa* a été tracé en termes de lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde, et l'extrait a montré une longueur d'onde caractéristique pour l'absorption maximale (λ max) à 470 nm (Figure 38), proche des résultats trouvés dans la littérature qui indiquent des spectres d'absorption maximale des curcuminoïdes allant de 425~493 nm (Tableau 7).

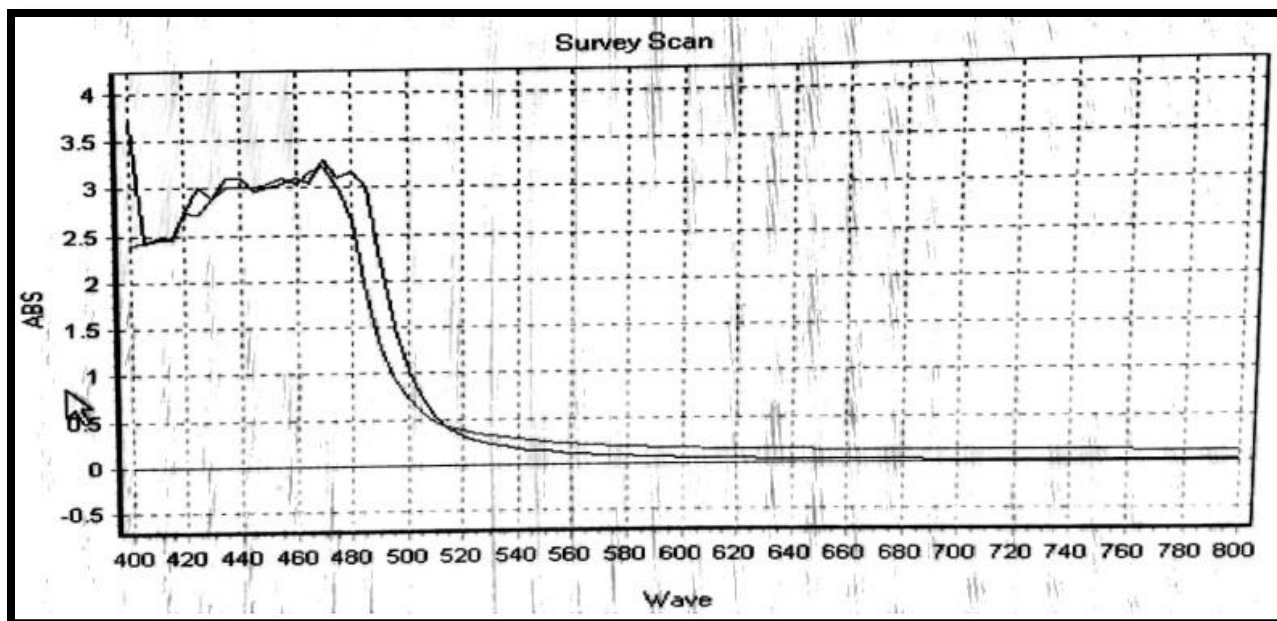


Figure 38. Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) de l'EAC.

Tableau 7. Résultat du balayage spectrophotométrique de l'EAC

Echantillons	Concentration	Absorbance	λ_{\max}	λ_{\max} (données de littérature)
EAC	1 mg/ml	3.222	470	425~493 (Khumsupan, Ramirez <i>et al.</i> , 2011; Sathishkumar, Hemalatha <i>et al.</i> , 2015)

3. Résultats de la séparation et de l'identification des curcuminoïdes par CCM

Différentes compositions de phases mobiles ont été testées dans la technique de CCM pour la séparation des curcuminoïdes de l'EAC. Comme le montre la figure 39, la meilleure séparation a été atteinte en utilisant le système de solvant méthanol : chloroforme (90 : 10) comme phase mobile. Les valeurs de R_f des curcuminoïdes étaient de 0.95, 0.71, et 0.55, pour la curcumine (C), déméthoxycurcumine (DMC), bisdéméthoxycurcumine (BDMC) respectivement. La meilleure résolution de la valeur R_f a montré que le méthanol peut être le solvant approprié pour la séparation des composés en chromatographie sur colonne. Les valeurs de R_f se sont avérées similaires aux valeurs rapportées dans la littérature (Tableau 8).

Tableau 8. Résultats de la séparation des curcuminoïdes par CCM.

Echantillons	Phase mobile	Ratio	Valeurs RF		
			C	DMC	BDMC
EAC	méthanol : chloroforme	90 : 10	0.95	0.71	0.55
Données de littérature (Sarwal <i>et al.</i> , 2017)	méthanol : chloroforme	98 : 2	0.90	0.75	0.69

EAC: Extrait aqueux *Curcuma longa* L. ; C : curcumine ; DMC : déméthoxycurcumine ; BDMC : bisdéméthoxycurcumine.

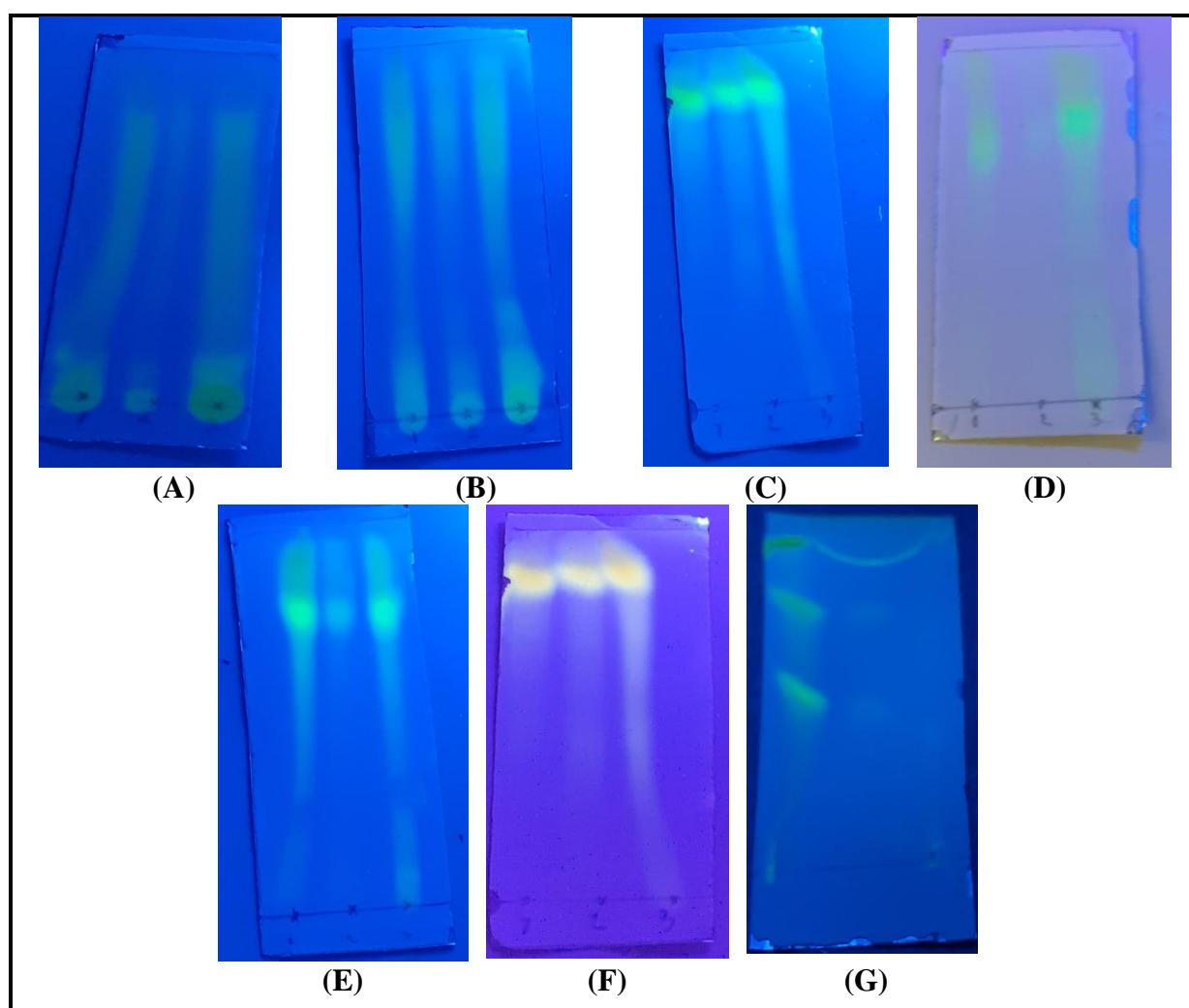


Figure 39. Choix de la phase mobile de la chromatographie en couche mince. A : MeOH:CHCl₃ (10 : 90) ; B : MeOH:CHCl₃ (25 : 75) ; C : MeOH:CHCl₃ (45 : 55) ; D : MeOH:CHCl₃ (50 : 50) ; E : MeOH:CHCl₃ (60 : 40) ; F : MeOH:CHCl₃ (75 : 25) ; G : MeOH:CHCl₃ (90 : 10). Détection: lampe UV 365 nm.

4. Profil chromatographique de l'EAC par HPLC

Comme on peut le voir sur la figure 40, le profil HPLC de l'extrait aqueux de *C. longa L.* obtenu par la méthode de décoction a permis d'obtenir un chromatogramme à neuf pics dont 3 composés ont été parfaitement identifiés, à savoir : la bisdéméthoxycurcumine, la déméthoxycurcumine et la curcumine avec des proportions de 5,12 %, 2,39 % et 4,92 % respectivement (tableau 9).

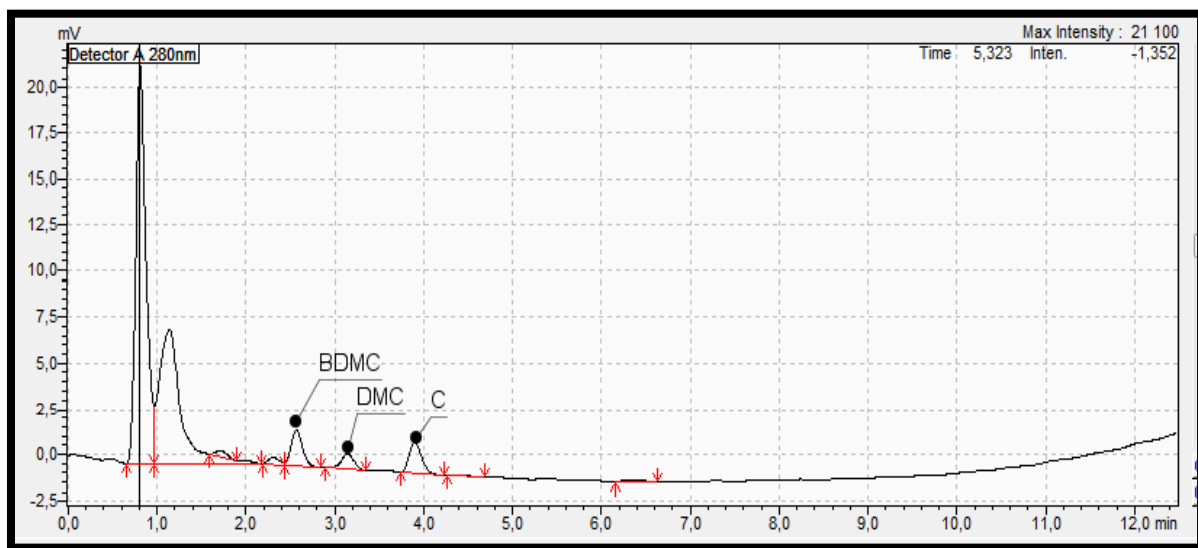


Figure 40. Chromatogramme de l'extrait aqueux de *Curcuma longa L.* Identification des pics. Pic N°5 : Bisdéméthoxycurcumine (BDMC), pic N°6 : Deméthoxycurcumine (DMC) ; pic N°7 : Curcumine (C).

Tableau 9. Résultats de la séparation par HPLC de l'extrait aqueux de *C. longa L.*

Numéro de pic	Composé identifié	Temps de rétention	
		(min)	Proportion (%)
1	Phase mobile	0,81	48,80
2	N.I.	1,14	36,33
3	N.I.	1,71	0,87
4	N.I.	2,31	0,93
5	Bisdemethoxycurcumin	2,57	5,12
6	Demethoxycurcumin	3,14	2,39
7	Curcumin	3,90	4,92
8	N.I.	4,41	0,32
9	N.I.	6,35	0,33

NI : non identifié.

5. Résultats de l'activité antioxydante *in vitro*

Dans cette étude, trois tests complémentaires ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de l'EAC: la capacité antioxydante totale, l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et l'évaluation du pouvoir réducteur du fer (figures 41, 42 et tableau 10). La capacité antioxydante totale du CAE a été exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique. L'étude a révélé que l'extrait de décoction de *C. longa L.* a enregistré $36,55 \pm 0,01$ mg GAE/g DS de capacité antioxydante totale. Le tableau 10 a montré que l'EAC est doté d'une capacité significative à piéger le radical DPPH ($IC_{50} = 0,77 \pm 0,04$ mg/mL) et à réduire le fer ($EC_{50} = 3,46 \pm 0,11$ mg/mL). Ces activités restent néanmoins nettement inférieures à celle de l'acide ascorbique.

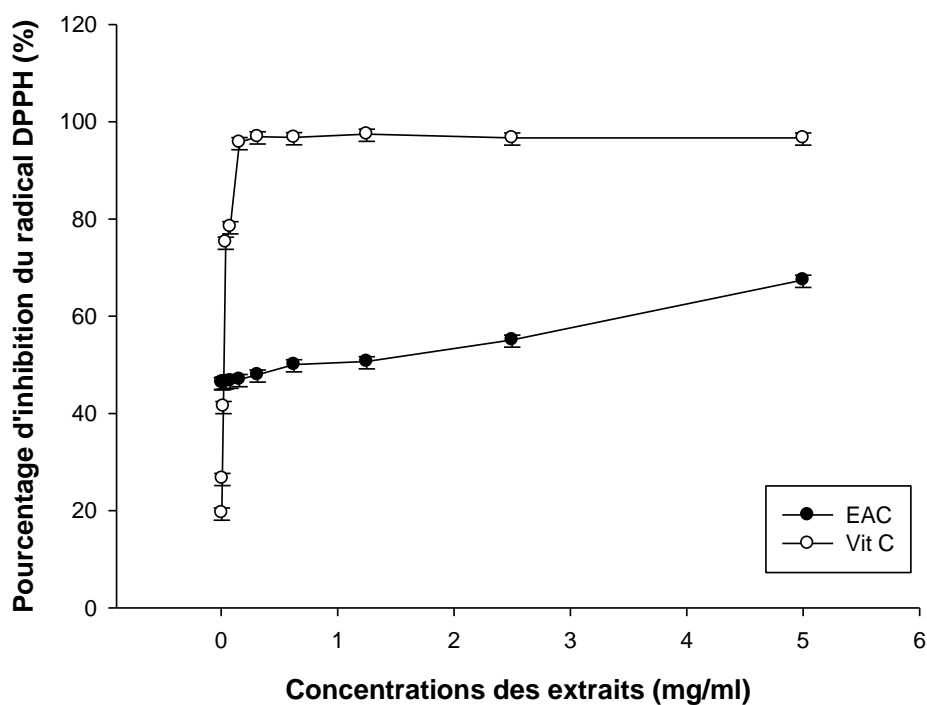


Figure 41. Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage des radicaux DPPH de l'EAC par rapport à l'acide ascorbique.

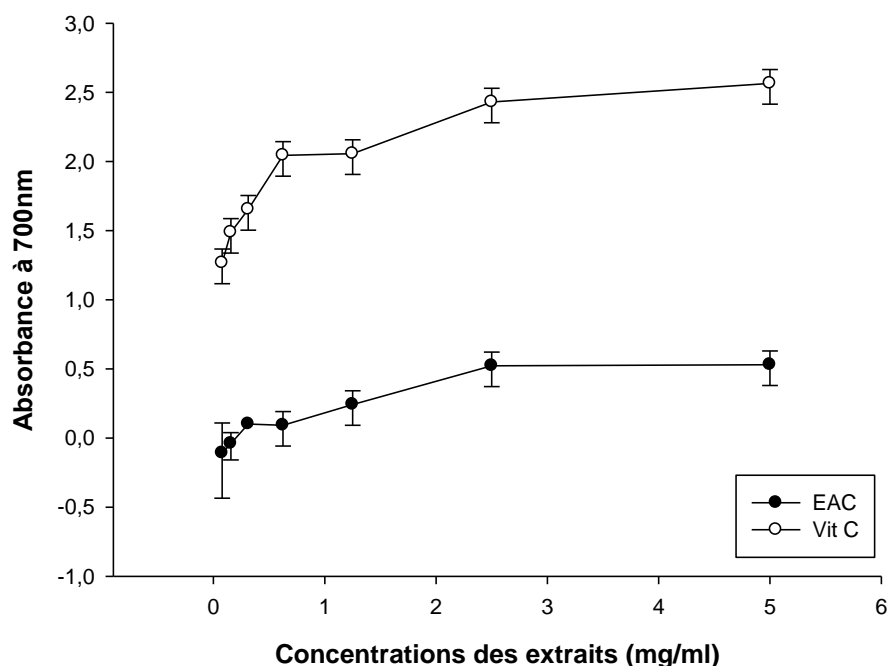


Figure 42. Evaluation du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de l'EAC par rapport à l'acide ascorbique.

Tableau 10. Activité antioxydante totale, activité de piégeage des radicaux DPPH et dosage du pouvoir réducteur du fer de l'EAC.

Extract	TAC (mg GAE/g d.w.)	IC50 DPPH (mg/mL)	EC50 FRAP (mg/mL)
CAE	36.55 ± 0.01	0.77 ± 0.04 ^a	3.46 ± 0.11 ^a
Acide ascorbique	-	0.019 ± 0.001 ^b	0.005 ± 0.003 ^b

EAC: Extrait aqueux *Curcuma longa* L. ; TAC : activité antioxydante totale ; IC50 : Concentration inhibitrice médiane; EC50 : La concentration efficace médiane ; Les données sont exprimées en moyennes ± ESM (n=3). La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide du test de Tukey. Les colonnes ne partageant pas une lettre commune (a-b) diffèrent significativement à $p < 0,05$ (test de Tukey).

6. Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro

La capacité de l'extrait végétal à prévenir la dénaturation des protéines a été étudiée dans le cadre d'identifier le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire. L'extrait aqueux de *C. longa* L. a réussi à prévenir la dénaturation de l'albumine causée par la chaleur. Toutefois, à 5000 µg/mL, l'extrait révèle une inhibition maximale de la dénaturation de la protéine d'œuf estimée à 78,88±0,53 % avec une $IC_{50\%}=240,30\pm 5,70$ µg/mL, et une inhibition maximale de la dénaturation de la protéine albumine de sérum bovin (BSA) estimée à 90,51±0,29% à la même concentration avec une $IC_{50\%}=4,97\pm 0,33$ µg/mL (Tableau 11), comparée à l'aspirine, ou l'acide acétylsalicylique (ASA), qui représente le médicament anti-inflammatoire de référence, et qui a montré une inhibition maximale de 88,8 ± 0,28 % et 95,37 ± 0,23 % à une

concentration de 1000 µg/ml avec des IC_{50%} estimés à 7.66±0,54 µg/ml et 162.51±8.23 µg/ml vis-à-vis de la protéine d'œuf et de la BSA respectivement (tableau 12).

Tableau 11. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'EAC.

<i>Parameters</i>	<i>Concentrations</i> (µg/ml)	<i>Inhibition de la</i> <i>dénaturation des</i> <i>protéines de l'œuf</i> (%)	<i>Inhibition de la</i> <i>dénaturation des</i> <i>protéines de la BSA</i> (%)
<i>Dilutions</i>			
1	5000	78.88 ± 0.53 ^a	90,51 ± 0.29 ^b
2	2500	70.12 ± 0.43 ^a	89,41 ± 0.05 ^b
3	1250	65.34 ± 0.85 ^a	89,00 ± 0.10 ^b
4	625	59.36 ± 0.27 ^a	79,50 ± 0.29 ^b
5	313	52.59 ± 0.49 ^a	73,87 ± 0.22 ^b
6	157	45.82 ± 0.22 ^a	71,48 ± 0.13 ^b

Les données sont exprimées en moyennes ± ESM (n=3). La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide du test de S-N-K. Les rangées ne partageant pas une lettre commune (a-c) diffèrent significativement à p < 0,05 (test de S-N-K).

Tableau 12. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'aspirine, ou l'acide acétylsalicylique (ASA).

<i>Parameters</i>	<i>Concentrations</i> (µg/ml)	<i>Inhibition de la</i> <i>dénaturation des</i> <i>protéines de l'œuf</i> (%)	<i>Inhibition de la</i> <i>dénaturation des</i> <i>protéines de la BSA</i> (%)
<i>Dilutions</i>			
1	1000	88.08 ± 0.28 ^a	95.37 ± 0.23 ^b
2	500	85.94 ± 0.99 ^a	84.46 ± 0.77 ^b
3	250	80.43 ± 0.55 ^a	60.33 ± 0.60 ^b
4	125	73.31 ± 0.57 ^a	45.01 ± 0.29 ^b
5	62.5	65.84 ± 0.01 ^a	27.49 ± 0.93 ^b

Les données sont exprimées en moyennes ± ESM (n=3). La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide du test de S-N-K. Les rangées ne partageant pas une lettre commune (a-c) diffèrent significativement à p < 0,05 (test de S-N-K).

7. Evaluation du développement pondéral

Les résultats de la figure 43 montrent des différences remarquables dans l'évolution des poids pondérales entre les différents groupes expérimentaux (Al, Al-EAC, EAC et T). Nous constatons que le poids des rats témoins s'accroît d'une manière exponentielle dès la première semaine et cela jusqu'à la fin de l'expérimentation allant de 189.5 ± 6.40 jusqu'à 275 ± 1.40 g. De la même manière, les animaux du groupe exposé seulement à l'EAC ont montré une croissance exponentielle à partir de la 2^{ème} semaine, précédée par une période de latence d'une semaine caractéristique d'une durée d'adaptation au traitement là où le poids a évolué de 222.33 ± 25.50 à 238.67 ± 1.40 g. Contrairement au groupe de rats exposé à l'Al qui ont montré une croissance exponentielle de leurs poids corporels du début de l'expérience jusqu'à la fin de la 3^{ème} semaine (de 202.3 ± 45.22 à 247.50 ± 30.47 g) suivie d'une chute libre durant la 4^{ème} semaine d'exposition à l'Al pour atteindre une moyenne de 226.33 ± 24.65 g. Ce qui confirme l'effet délétère de l'exposition subaiguë à l' $AlCl_3$ (34 mg/kg p.c) sur l'évolution pondérale de ces animaux. Ceci peut être expliqué par l'effet compétitif de ce métal avec les autres oligoéléments nécessaire à la croissance corporelle (calcium, phosphore, fer ...etc.) ce qui peut impacter négativement leurs absorptions intestinale ou leurs métabolismes, alors que les animaux traités simultanément avec l'Al et l'EAC ont montré une bonne évolution de leurs poids corporels avec une croissance exponentielle dès la première semaine et cela jusqu'à la fin de l'expérience allant de 191.00 ± 35.12 jusqu'à 238.20 ± 33.66 g. Ces résultats montrent l'efficacité de cet extrait et sa capacité à contrer les effets néfastes de ce métal sur le développement pondéral.

De plus, l'évaluation des gains de poids corporel montre une baisse significative du gain de poids corporel chez le groupe de rats exposé à l'Al ($p < 0.05$) comparativement aux autres groupes expérimentaux (Al-EAC, EAC et T) (figure 44). Tandis que, les animaux traités simultanément par l'Al et l'EAC présentent une nette amélioration du gain du poids corporel similaire à ceux des deux groupes non-exposés à l'Al (EAC et T).

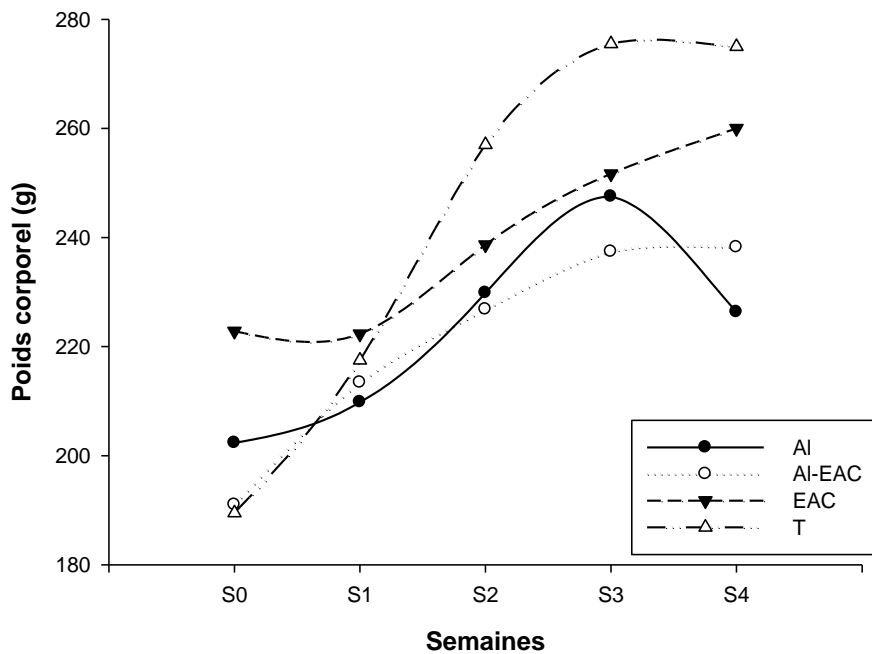


Figure 43. Effets des différents traitements sur l'évolution pondérale chez les rats des différents groupes expérimentaux.

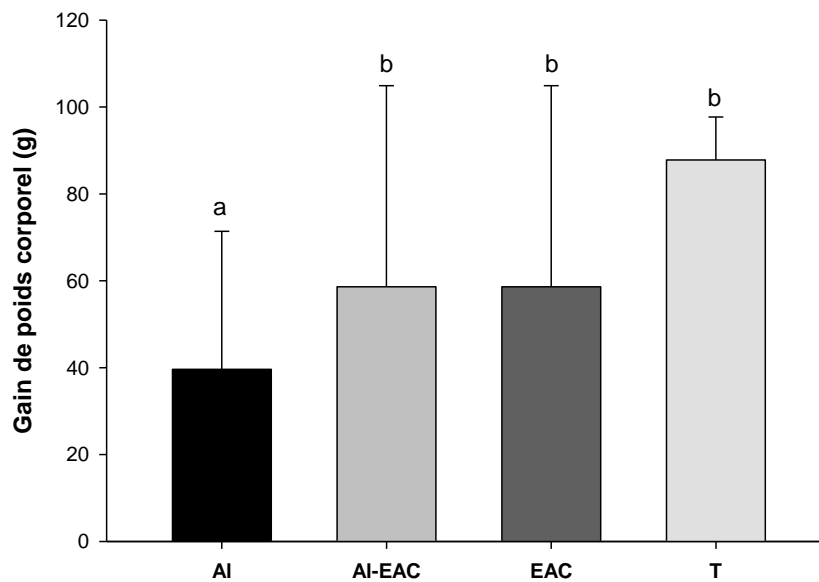


Figure 44. Evaluation du gain de poids corporel (g).

GI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); GII: groupe $AlCl_3 + CAE$; GIII: groupe traité par seulement avec EAC; GIV: groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les colonnes ne partageant pas une lettre commune (a - c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

8. Evaluation L'index des poids (poids relatif) et la tailles des testicules et des glandes annexes

Les résultats du tableau 13 exprimant les index des organes sexuels, calculés par le rapport entre le poids des organes et le poids corporel correspondant, indiquent que ces derniers n'ont pas été affectés par les différents traitements expérimentaux. Aucune différence significative des indexes de poids des organes sexuels entre les différents groupes expérimentaux n'a été enregistrée.

Par ailleurs, le calcul des surfaces des organes étudiés par le logiciel ImageJ (Fiji) (figure 45 et 46) a permis d'enregistrer les résultats de la figure 47, qui indique des différences significatives des tailles des organes entre les quatre groupes expérimentaux. Les données obtenues montrent une diminution significative ($p < 0.001$) de la taille des testicules du groupe Al ($0.54 \pm 0.01 \text{ cm}^2$) comparativement aux deux groupes non-exposés à l'Al (EAC et T) qui affichent des valeurs de 1.00 ± 0.01 et $1.20 \pm 0.01 \text{ cm}^2$ respectivement. Cependant, le traitement à base d'EAC a permis d'enregistrer une amélioration significative ($p < 0.001$) dans la taille des testicules ($0.68 \pm 0.02 \text{ cm}^2$) par rapport au groupe exposé à l'Al, mais qui reste significativement ($p < 0.001$) inférieure aux deux autres groupes non-exposés à l'Al (EAC et T). En outre, l'analyse des résultats des tailles des épидидymes permet de constater une diminution significative ($p < 0.001$) des tailles de cet organe chez les deux groupes d'animaux exposés à l'Al avec des valeurs de 0.98 ± 0.02 et $1.11 \pm 0.03 \text{ cm}^2$ respectivement, comparés aux groupes non-exposés à ce métal qui affichent des valeurs de 1.61 ± 0.03 et $1.92 \pm 0.01 \text{ cm}^2$ respectivement.

De même, les données collectées, lors de la prise des mesures des tailles des prostates chez les différents groupes expérimentaux, montrent que l'exposition subaiguë à l'Al induit une diminution significative ($p < 0.001$) de la taille des prostates (0.67 ± 0.01) comparée à celle des groupes non-intoxiqués (EAC et T) dont les tailles sont de 1.50 ± 0.01 et $1.21 \pm 0.01 \text{ cm}^2$ respectivement. Alors que, le traitement simultané à l'Al et à l'extrait de plante permet de constater une amélioration significative ($p < 0.001$) dans la taille des prostates ($1.04 \pm 0.01 \text{ cm}^2$) par rapport au Al, mais qui reste nettement inférieure aux deux autres groupes non-exposés au métal.

Enfin, les résultats des tailles des vésicules séminales montrent une diminution significative ($p < 0.001$) chez les deux groupes de rats exposés à l' AlCl_3 (Al et Al-EAC) avec des valeurs de 0.66 ± 0.01 et $0.67 \pm 0.01 \text{ cm}^2$ respectivement, comparativement aux groupes

non-exposés au métal (EAC et T), qui affichent des valeurs de 1.00 ± 0.01 et 1.81 ± 0.01 cm² respectivement.

Tableau 13. L'effet des différents traitements sur l'index des organes sexuels.

Groupes	Testicule	Epididyme	Vésicule séminale	Prostate
Al	0.58 ± 0.08^a	0.31 ± 0.03^a	0.41 ± 0.20^a	0.41 ± 0.05^a
Al-EAC	0.63 ± 0.09^a	0.40 ± 0.09^a	0.40 ± 0.02^a	0.44 ± 0.21^a
EAC	0.70 ± 0.02^a	0.38 ± 0.10^a	0.43 ± 0.13^a	0.53 ± 0.08^a
T	0.59 ± 0.03^a	0.35 ± 0.06^a	0.51 ± 0.08^a	0.53 ± 0.07^a

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium (AlCl₃); Al-EAC: groupe traité simultanément avec l'AlCl₃ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T: groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS (n = 6). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les colonnes ne partageant pas une lettre commune (a - c) diffèrent significativement (p < 0,05).

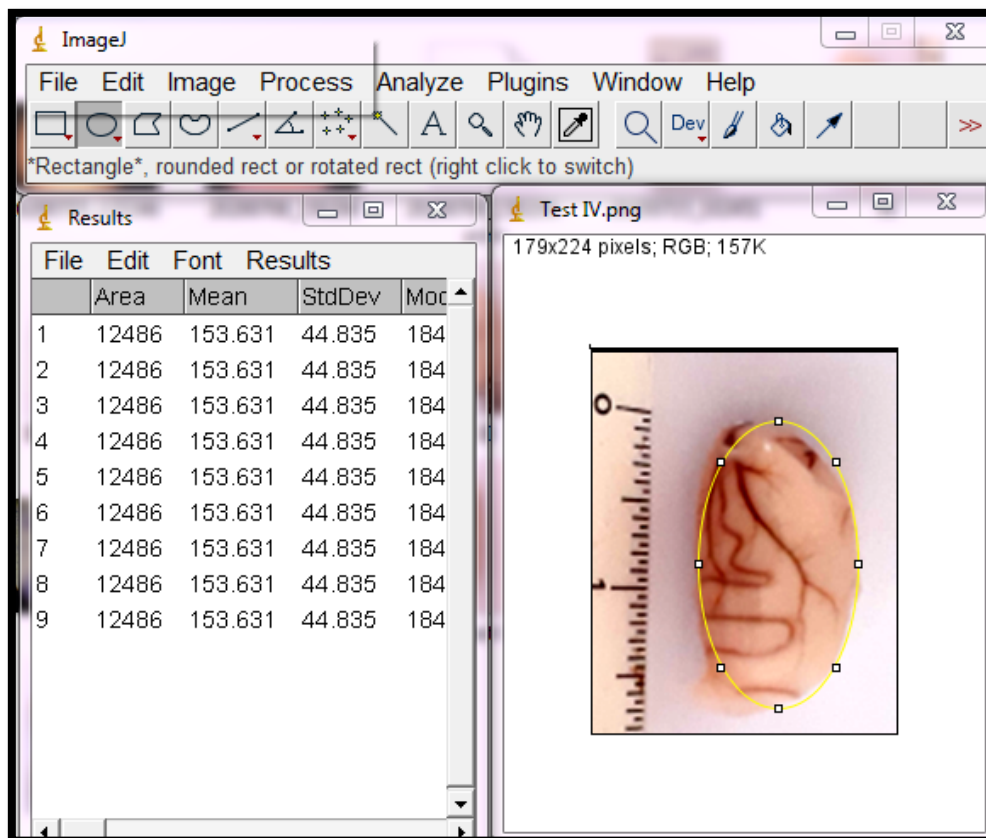


Figure 45. Le calcul des tailles effectué par le logiciel ImageJ (Fiji).

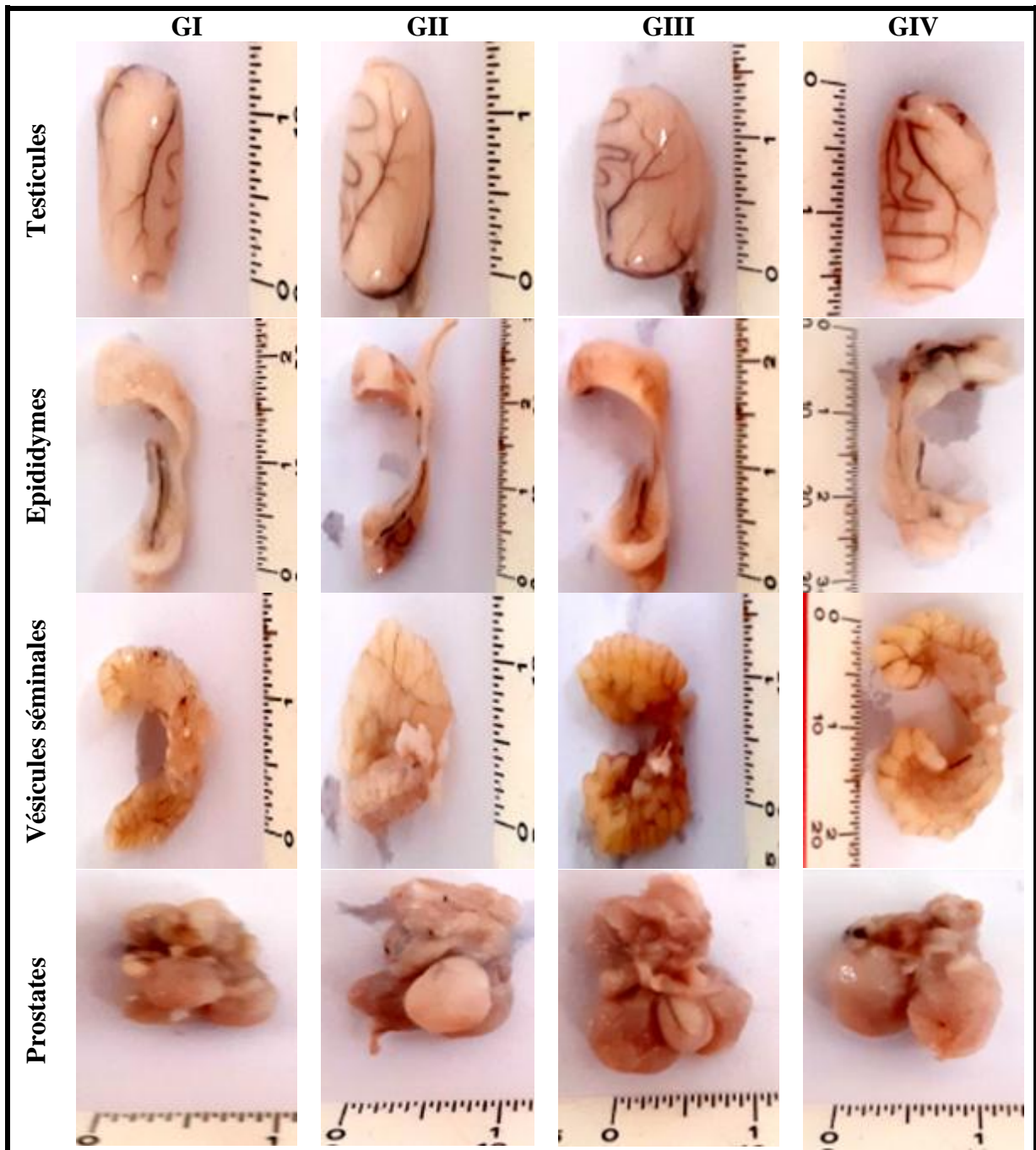


Figure 46 : photographies lors de la prise des mesures des organes étudiés.

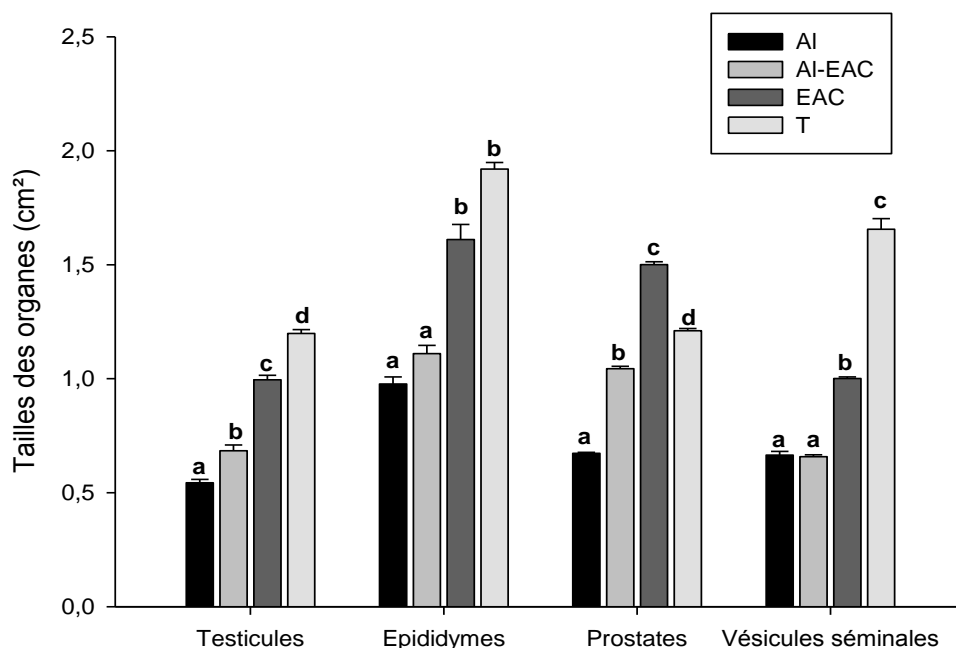


Figure 47. Evaluation des tailles des organes sexuels des différents groupes.

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffère significativement ($p < 0,05$).

9. Effets des différents traitements sur les paramètres spermatiques

Les résultats des paramètres spermatiques (nombre des spermatozoïdes, anomalies morphologiques, vitalité et taux de fragmentation d'ADN) du liquide séminal collecté à partir des épидидymes sont exprimés dans le tableau 14. Les données obtenues révèlent une diminution importante et hautement significative du nombre des spermatozoïdes du groupe de rats exposé à l'Al ($p < 0.001$), ainsi que le groupe d'animaux exposé à l'Al et traité à l'EAC comparativement aux deux autres groupes non exposés au métal (EAC et T). Tandis que, les résultats du pourcentage des anomalies spermatiques indiquent une élévation significative ($p < 0.05$) du nombre de spermatozoïdes anormaux chez les animaux intoxiqués comparés aux groupes de rats traité simultanément à l'EAC et aussi aux deux autres groupes non traités par l'Al (EAC et T). De la même manière, les résultats du taux vitalité spermatique montrent que le groupe exposé seulement à l'Al possède les valeurs les plus significativement basses ($p < 0.05$) comparativement aux autres groupes expérimentaux (Al-EAC, EAC et T). Quant à l'évaluation du degré de fragmentation de l'ADN spermatique elle indique des taux de fragmentation très élevés et hautement significatives ($p < 0.001$) chez le groupe de rats exposé

à l'Al comparativement aux différents autres groupes expérimentaux qui eux aussi révèlent des pourcentages de la fragmentation d'ADN spermatique significativement bas.

Par ailleurs, La classification des anomalies spermatiques (figures 48 et 49) par catégorie selon la partie du spermatozoïde affectée (tête, pièce intermédiaire ou flagelles) indique que l'exposition à l'Al induit une élévation remarquable et hautement significative ($p < 0.001$) des anomalies de la tête suivies par celle des flagelles et enfin ceux de la pièce intermédiaire par rapport aux autres groupes expérimentaux. Tandis que, le traitement à base d'EAC révèle des niveaux significativement bas des anomalies spermatiques chez les animaux simultanément exposés à l'Al.

Ces résultats indiquent que l'exposition subaiguë avec une dose de 34 mg/kg p.c d'Al affecte négativement la spermatogénèse et conduit à une oligospermie et tératospermie sévères avec une augmentation du pourcentage de mortalité spermatique et un taux élevé de fragmentation d'ADN. Alors que, le traitement à base d'extrait de curcuma à une dose de 400 mg/kg p.c permet de contrer les effets néfastes causés par l'exposition à ce métal.

Tableau 14. Evaluation des différents paramètres spermatiques.

<i>Groupes</i>	<i>Nombre des spermatozoïdes (10^6spz/ml)</i>	<i>Taux de spermatozoïdes anormaux (%)</i>	<i>Taux de spermatozoïdes vivants (%)</i>	<i>Fragmentation d'ADN (%)</i>
<i>Al</i>	04.58±0.65 ^a	26.11±17.84 ^a	61.53±23.60 ^a	69.05±4.36 ^a
<i>Al-EAC</i>	05.80±0.56 ^a	21.00±01.00 ^b	67.33±05.03 ^b	41.00±3.33 ^b
<i>EAC</i>	09.30±0.35 ^b	19.00±02.65 ^b	66.67±04.93 ^b	38.33±2.22 ^b
<i>T</i>	11.52±0.77 ^b	16.67±01.53 ^b	76.33±06.51 ^b	39.33±6.44 ^b

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC: groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T: groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne ± EMS (n = 6). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les colonnes ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffère significativement ($p < 0,05$).

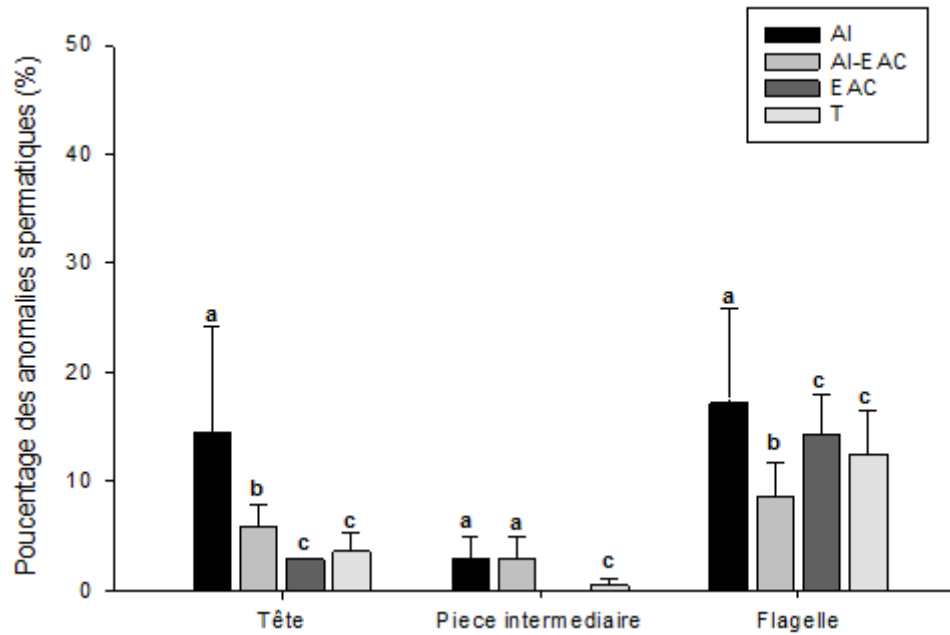


Figure 48. La classification des anomalies spermatisques par catégorie selon la partie du spermatozoïde affectée (tête, pièce intermédiaire et flagelles).

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

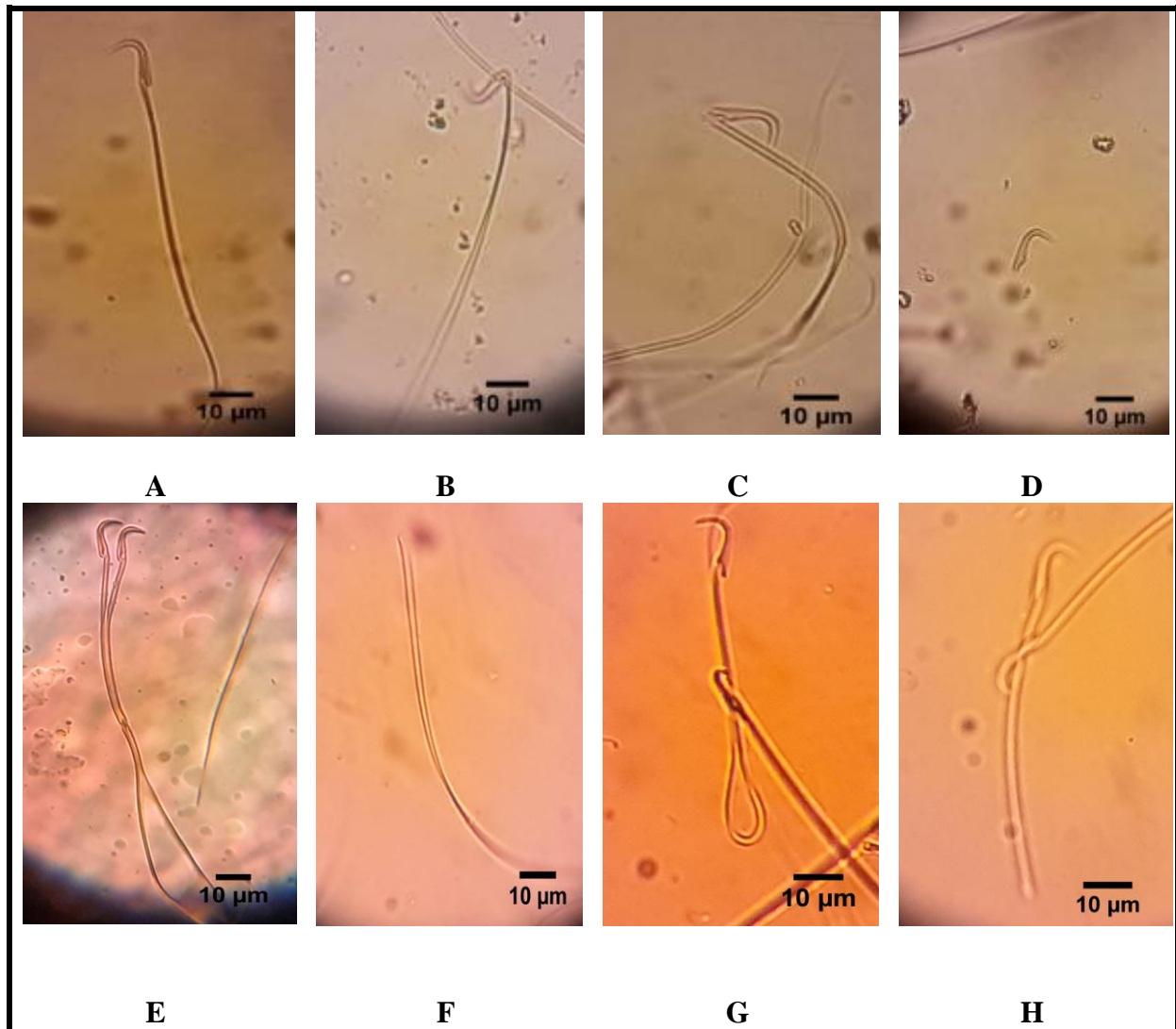


Figure 49. Observation microscopique de la morphologie des spermatozoïdes grossissement ($\times 40$). A: spermatozoïde normal ; B-C : anomalies de la pièce intermédiaire (angulée) ; D : spermatozoïde à flagelle amputé ; E : spermatozoïdes à flagelles collés ; F : spermatozoïde sans tête ; G : spermatozoïdes à flagelle angulé ; H : spermatozoïde court.

10. Dosage des hormones sexuelles (Testostérone, LH et FSH)

Les résultats des figures 50, 51 et 52 montrent une variation importante dans les taux des hormones sexuelles sériques (Testostérone, LH et FSH) entre les différents groupes expérimentaux. En effet, la figure 50 révèle d'une part une diminution très significative ($p < 0.01$) du taux sérique de testostérone chez le groupe de rats intoxiqué avec l'Al (0.31 ± 0.15 ng/ml) comparé au groupe témoin (1.24 ± 0.35 ng/ml) ainsi qu'au groupe traité simultanément à l'Al et à l'extrait aqueux de plante (1.17 ± 0.14 ng/ml), et d'autre part, permet de constater une élévation significative ($p < 0.001$) du taux de cette hormone chez les animaux ayant reçu seulement le traitement à base d'extrait de plante (3.16 ± 1.75 ng/ml). En outre, les résultats de

l'évaluation du taux de LH (figure 51) montrent une élévation significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique de cette hormone chez le groupe d'animaux intoxiqués avec l'Al (0.56 ± 0.27 UI/ml) comparé aux trois autres groupes qui révèlent des valeurs de 0.53 ± 0.02 , 0.33 ± 0.13 , et 0.26 ± 0.09 UI/ml pour le groupe Al-EAC, EAE et T respectivement.

En revanche, l'analyse sérique du taux de FSH (figure 52) montre un taux significativement élevé de cette hormone chez le groupe de rat traité seulement à l'extrait de curcuma (0.14 ± 0.02 UI/ml), alors que les autres groupes (Al, Al-EAC et EAC) présentent des taux de FSH similaires qui avoisinent la concentration de 0.1 UI/mL.

Ces résultats poussent à déduire que l'exposition à ce métal peut avoir un impact négatif sur les cellules de Leydig sécrétrices de la testostérone et qu'en contrepartie le traitement à base de plante a permis d'une part de contrer les effets néfastes de l'Al sur ces cellules et d'autre part de les exciter à produire d'avantage de testostérone ce qui explique le taux élevé de cette hormone chez le groupe EAC par rapport au groupe témoins. Nous suggérons également que la diminution du niveau de testostérone suite à l'impact de l'Al qui affecte les cellules de Leydig entraîne une augmentation du niveau de LH en réponse à l'interruption de la rétroaction négative de la testostérone.

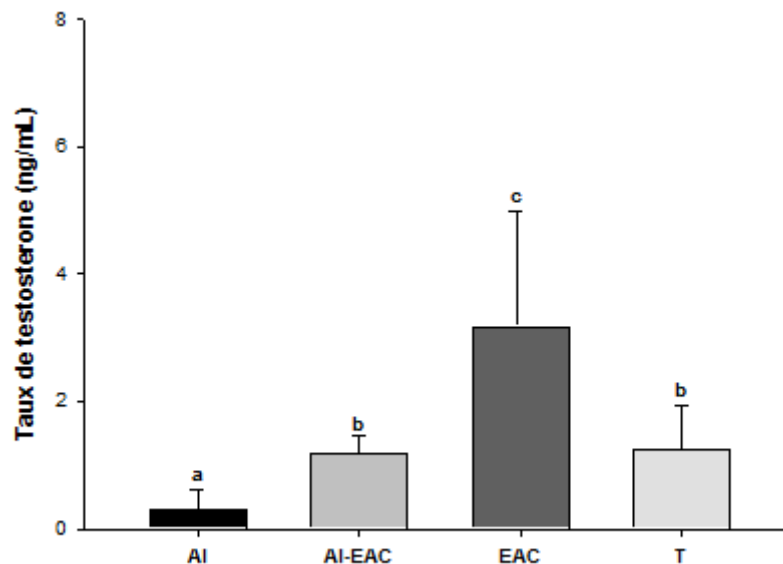


Figure 50. Evaluation du taux de testostérone sérique (ng/mL).

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a - c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

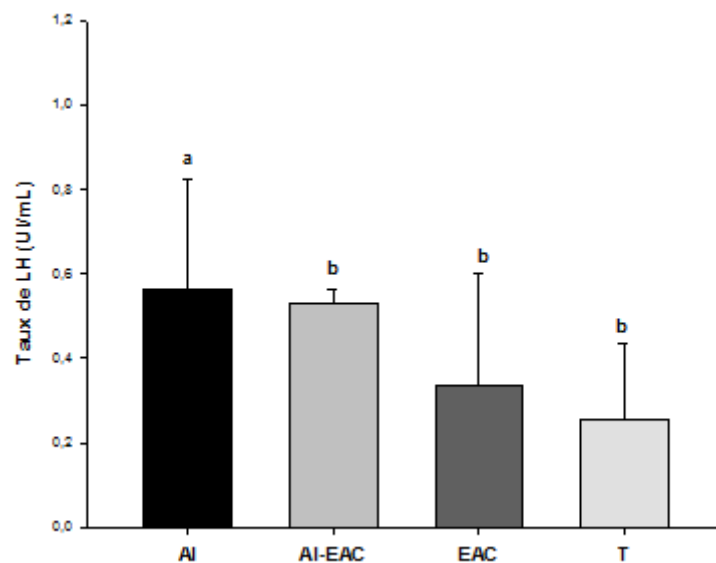


Figure 51. Evaluation du taux de LH (U/mL).

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

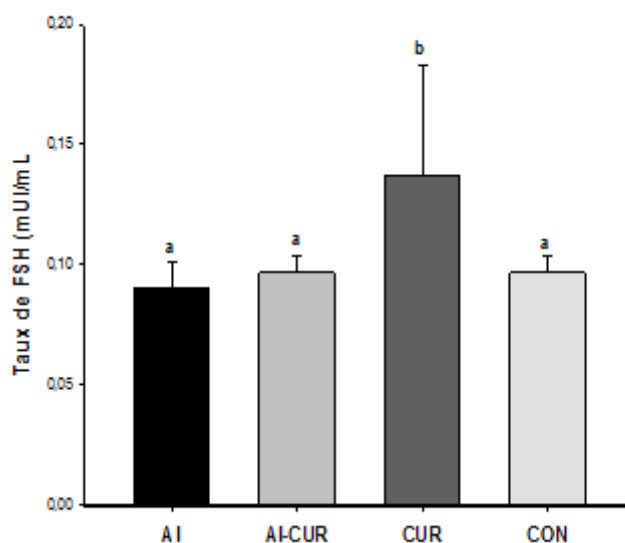


Figure 52. Evaluation du taux de FSH (mU/mL).

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

11. Evaluation des paramètres biochimiques et indicateurs du stress oxydatif

11.1. Estimation du taux des protéines tissulaires totales

Les résultats de l'évaluation du taux de protéines totales tissulaires dans les homogénats des quatre organes étudiés (Testicules, épидидymes, prostates et vésicule séminales) chez les différents groupes expérimentaux sont indiqués dans la figure 53. Les données collectées montrent une baisse significative ($p < 0.001$) détectée du taux des protéines au niveau testiculaire du groupe Al (5.69 ± 0.08 mg/ml) et le groupe Al-EAC (5.49 ± 0.12 mg/ml) comparé au groupe témoin (8.25 ± 0.04 mg/ml), alors que le groupe EAC présente une valeur significativement supérieure aux groupes Al et Al-EAC ($p < 0.01$) (6.15 ± 0.17 mg/ml) mais qui reste nettement inférieure par rapport au groupe témoin.

Tandis que, l'évaluation des taux de protéines épидидymaire montre une diminution hautement significative ($p < 0.001$) du taux des protéines du groupe Al (2.04 ± 0.37 mg/ml) comparé aux groupes EAC et T qui affichent des valeurs de 2.23 ± 0.08 et 2.28 ± 0.21 mg/ml respectivement, alors que le traitement simultané des animaux intoxiqué à l'Al avec l'extrait de *C. longa L.* montre une amélioration et une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du taux des protéines par rapport au groupe Al.

Par ailleurs, le dosage des protéines tissulaires prostatiques révèle un taux significativement ($p < 0.05$) bas chez le groupe exposé à l' $AlCl_3$ (1.37 ± 0.10 mg/ml) comparé au groupe témoin (2.93 ± 0.03 mg/ml). Contrairement, aux deux groupes d'animaux traités avec l'extrait aqueux de curcuma (Al-EAC et EAC) qui affichent des valeurs significativement ($p < 0.05$) supérieures au groupe intoxiqué par l'Al (1.80 ± 0.13 et 1.63 ± 0.11 mg/ml respectivement), mais qui reste nettement inférieures au groupe témoin.

Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée durant l'estimation du taux des protéines tissulaire des vésicules séminales entre les différents groupes expérimentaux.

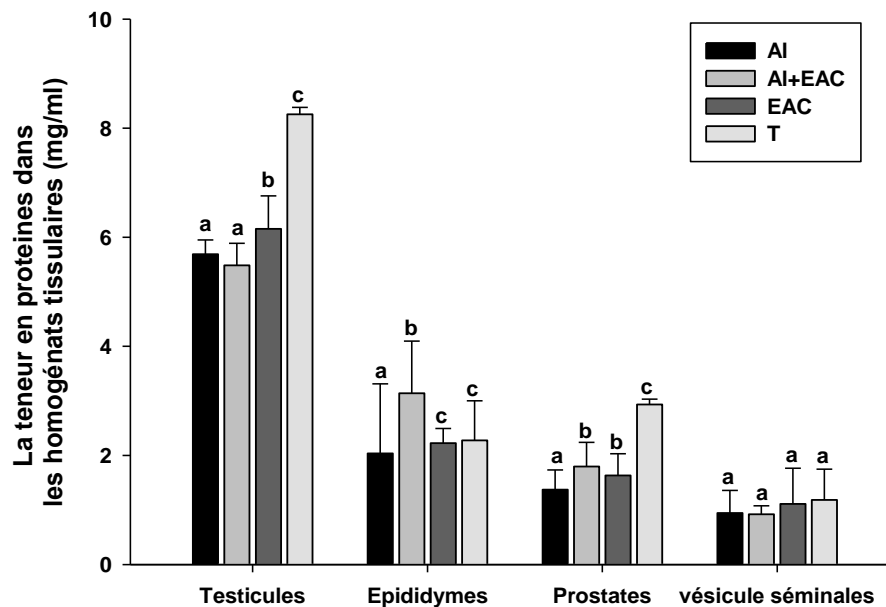


Figure 53. Evaluation du taux des protéines tissulaires totales des différents organes étudiés des quatre groupes expérimentaux.

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); *Al-EAC*: groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'*EAC*; *EAC*: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; *T*: groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffèrent significativement ($p < 0,05$).

11.2. Taux du malondialdéhyde (MDA)

La figure 54 présente les résultats de l'estimation de la peroxydation lipidique, au niveau tissulaire dans les homogénats des organes sexuels étudiés, par le biais d'un dosage spectrophotométrique du taux du malondialdéhyde (MDA). On remarque que le taux du MDA est significativement élevé dans les homogénats tissulaires des quatre organes sexuels chez le groupe de rats exposés à l'Al comparé aux autres groupes expérimentaux. En effet, c'est dans les épididymes que le taux de MDA le plus important est enregistré ($1.57 \pm 0.20 \mu M/g$ tissu), suivi par la vésicule séminale ($1.13 \pm 0.10 \mu M/g$ tissu), la prostate ($0.77 \pm 0.03 \mu M/g$ tissu), et les testicules ($0.16 \pm 0.009 \mu M/g$ tissu). Par ailleurs, les groupes de rats exposés à l'aluminium et traités par une solution de *Curcuma longa* (Al-EAC) ont permis d'enregistrer une baisse remarquable du taux du MDA par rapport au groupe exposé seulement à l'Al. En fait, c'est au niveau des prostates et des testicules que le traitement à base d'EAC a permis de diminuer significativement ($p < 0.001$) le taux de peroxydation lipidique (0.32 ± 0.03 et $0.11 \pm 0.009 \mu M/g$ tissu respectivement) jusqu'à atteindre des valeurs équivalentes à celle du

groupe témoin et du groupe EAC. Alors qu'au niveau des épидидymes et des vésicules séminales le traitement à base de plante a permis de baisser significativement ($p < 0.001$) le taux de MDA par rapport au groupe Al mais qui reste cependant significativement élevé par rapport au deux autres groupes (témoin et EAC). Toutefois, et d'après ces données il semble que l'exposition subaiguë à l' $AlCl_3$ à une concentration de 34 mg/kg p.c durant 30 jours est à l'origine d'un stress oxydatif induit suite à une peroxydation lipidique et une production accrue de MDA tissulaire. Tandis que, le traitement à base d'extrait aqueux de *C. longa* à une dose de 200 mg/kg p.c administré simultanément à des rats intoxiqués à l'Al a permis d'abaisser le degré de peroxydation lipidique et d'atténuer le stress oxydatif causé par ce métal en fournissant une foule de molécules anti-oxydantes.

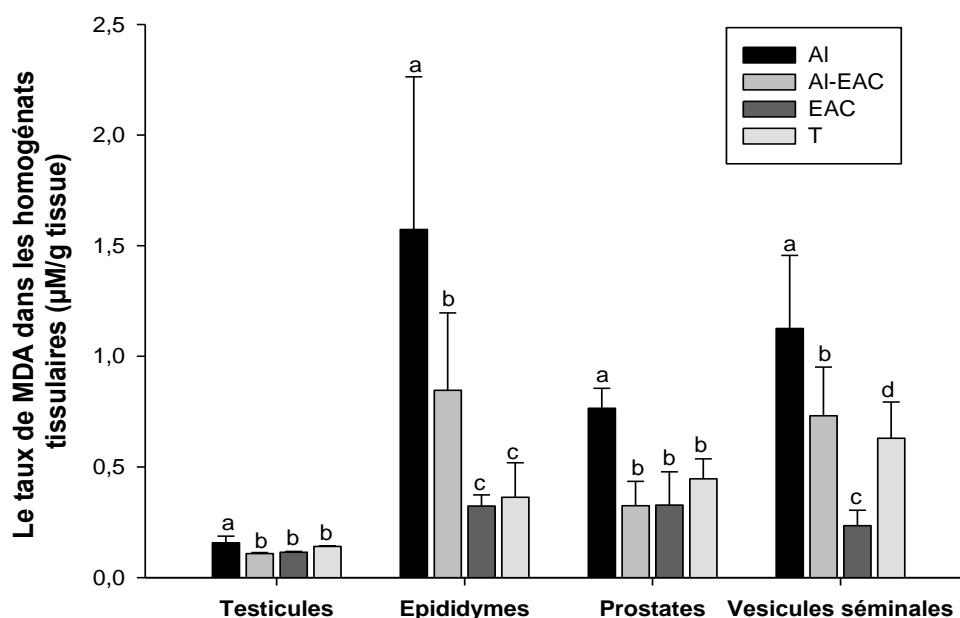


Figure 54. Evaluation du taux du malondialdéhyde tissulaires des différents organes étudiés des quatre groupes expérimentaux.

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); *Al-EAC* : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'*EAC*; *EAC*: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; *T* : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffère significativement ($p < 0,05$).

11.3. Evaluation de l'activité catalasique tissulaire

La catalase est une enzyme qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire. Elle appartient aux enzymes peroxysomales dont le rôle principal est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par le H_2O_2 . Le

suivi de l'activité tissulaire de la catalase, des différents organes étudiés, est présenté dans la figure 55. En effet, les résultats collectés indiquent que l'exposition à l'Al provoque une très forte activité catalasique aux niveaux des quatre organes étudiés. En effet, c'est dans les vésicules séminales que les taux de l'activité enzymatique les plus significativement ($p < 0.05$) importantes sont enregistrés (618.80 ± 2.65 mM H₂O₂/min/mg de protéines), suivie par les épидидymes (573.68 ± 7.94 mM H₂O₂/min/mg de protéines), les prostatites (112.56 ± 0.53 mM H₂O₂/min/mg de protéines), et les testicules (67.14 ± 3.15 mM H₂O₂/min/mg de protéines). Par ailleurs, l'administration du traitement à base d'une solution de *C. longa L* aux rats intoxiqués (Al-EAC) a permis d'enregistrer une baisse remarquable du taux de l'activité catalasique par rapport au groupe exposé seulement à l'Al. En fait, c'est au niveau des prostatites, des vésicules séminales et des épидидymes que le traitement à base d'EAC a permis de diminuer le plus significativement ($p < 0.05$) le taux de l'activité de cette enzyme (555.25 ± 6.68 , 89.79 ± 0.79 et 556.76 ± 9.09 H₂O₂/min/mg de protéines respectivement) contrairement au tissu testiculaire où aucun changement n'a été enregistré entre le groupe Al et le groupe Al-EAC.

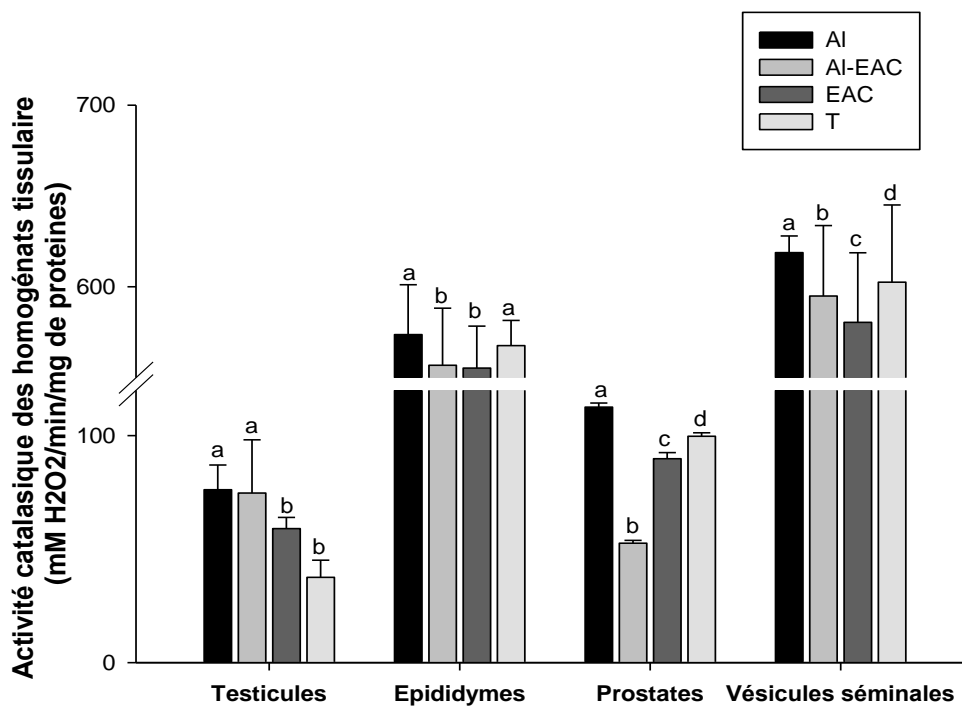


Figure 55. Evaluation de l'activité catalasique tissulaire des différents organes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium (AlCl₃); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l'AlCl₃ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin. Les données sont exprimées en moyenne \pm EMS ($n = 6$). Une comparaison entre les groupes a été faite en utilisant le test de S-N-K. Les barres ne partageant pas une lettre commune (a – c) diffère significativement ($p < 0,05$).

11.4. Evaluation de l'activité de la SOD tissulaire

Le suivi de l'activité tissulaire de la SOD des quatre organes sexuels étudiés chez les différents groupes expérimentaux a permis d'enregistrer les données de la figure 56. Les résultats collectés indiquent que l'exposition subaiguë à l' $AlCl_3$ provoque une très forte élévation de l'activité de la SOD aux niveaux des quatre organes étudiés. En fait, les taux de l'activité enzymatique les plus significativement élevés ($p < 0.001$) sont enregistrés aux niveaux des vésicules séminales (20.35 ± 0.35 U/mg de protéines), suivis par les prostates (13.85 ± 0.21 U/mg de protéines), les épидидymes (9.28 ± 0.17 U/mg de protéines), et ensuite les testicules (3.40 ± 0.22 U/mg de protéines). Par ailleurs, des diminutions remarquables de l'activité enzymatique de la SOD sont enregistrées suite à l'administration d'un traitement à base d'extrait aqueux de *C. longa L.* Toutefois, les résultats les plus hautement significatifs ($p < 0.001$) sont enregistrés aux niveaux des épидидymes et des prostates suivis par une diminution significative ($p < 0.05$) aux niveaux des vésicules séminales. Alors qu'aucune baisse significative n'a été constatée au niveau testiculaire. Ces résultats montrent que l'exposition pendant 30 jours à l'Al à une dose de 34mg/kg p.c a induit un stress oxydatif traduit pas une élévation de l'activité du superoxyde dismutase aux niveaux des tissus des organes sexuels étudiés et que le traitement à base d'EAC a permis de contrer ce stress en fournissant les antioxydants nécessaires.

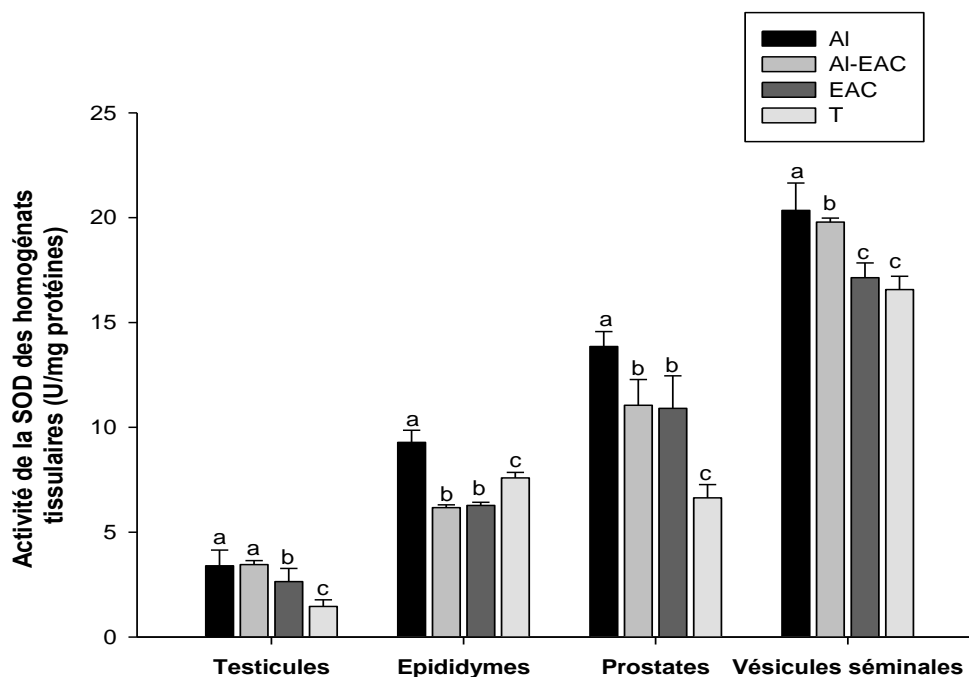


Figure 56. Evaluation de l'activité de la SOD tissulaire des différents organes étudiés chez les quatre groupes expérimentaux.

12. Etude histologique

Les organes sexuels et les organes accessoires de l'appareil reproducteur masculin comprennent, les testicules, les épидидymes, la prostate, les vésicules séminales, les glandes préputiales, les canaux déférents et le pénis. Ces tissus peuvent présenter des réponses pathologiques pléotrophiques directes ou indirectes (souvent hormonales). Une modification d'un tissu reproducteur s'accompagne souvent de modifications d'autres tissus reproducteurs. La majorité de ces tissus sont appariés, ce qui permet d'identifier les réponses unilatérales ou bilatérales.

L'exploration détaillée des différents tissus étudiés est représentée dans les sections suivantes:

9.1.Exploration du tissu testiculaire

L'évaluation histopathologique constitue l'un des points d'aboutissement les plus sensibles pour détecter les effets des substances toxiques sur le testicule, et elle est utilisée de manière routinière dans l'évaluation de la toxicité pour la reproduction masculine. Une section transversale contenant la zone du rete-testis fournit une bonne histologie des tubules séminifères ainsi que du rete-testis. Pour l'inclusion du rete testis dans la coupe histologique, l'orientation est donnée par la vascularisation (figure 57).

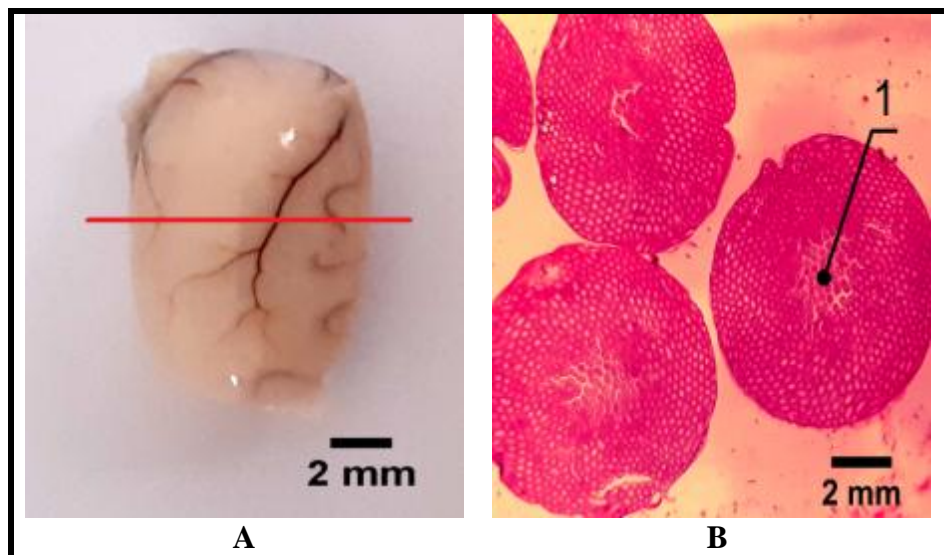


Figure 57. **A:** Observation macroscopique d'un testicule de rat et la position de la coupe transversale (trait rouge); **B :** Observation microscopique des coupes transversales d'un testicule et de ses tubes séminifères (**1**). Coloration H&E (G×40).

L'observation des lames histologiques réalisées au niveau des testicules du groupe témoin (T) et du groupe de rats traités seulement à l'extrait aqueux de *C. longa* (EAC) (figure 58) révèle un aspect normal, montrant des tubes séminifères serrés avec une lumière remplie de spermatozoïdes ainsi qu'une succession cellulaire représentant un épithélium stratifié composé des cellules des différents stades de la spermatogenèse, qui se déroule d'une façon centripète de la paroi des tubes (lame basale) vers sa lumière tubulaire et qui témoigne de l'évolution normale de la spermatogenèse et de la spermiogénèse. En effet, c'est au niveau de la lame basale que nous observons facilement les spermatogonies (cellules souches) reconnaissables par leur petite taille et leur petit noyaux de couleur sombre, suivies par les spermatocytes I et II de plus grandes tailles et dont les noyaux sont volumineux et parfois en phase de division. Les spermatides de plus petite taille sont situées vers l'intérieur des tubes. Ces derniers s'allongent et se différencient lors de la spermiogénèse pour se transformer en spermatozoïdes qui se détachent au cours de la spermiation et se libèrent dans la lumière du tube séminifère. L'ensemble de ces cellules germinales est maintenu par les cellules somatiques de soutien (cellules de Sertoli) dont les noyaux sont aperçus au voisinage des spermatogonies. L'espace interstitiel étroit du fait du rapprochement des tubes séminifères est richement vascularisé (présence de capillaire sanguins) et est composé de cellules interstitielles productrices d'androgènes (cellules de Leydig).

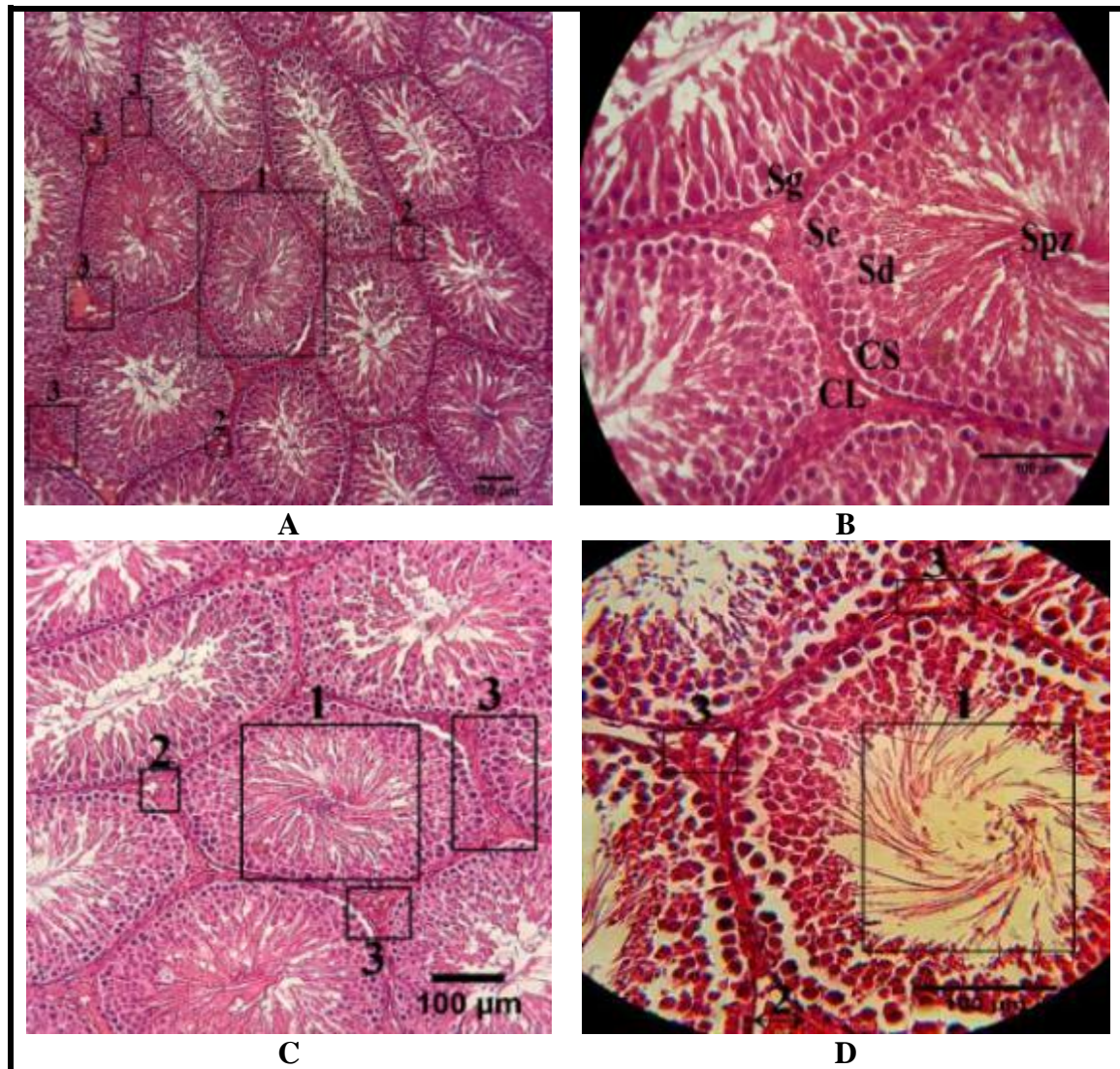


Figure 58. Observation microscopique de la structure histologique des testicules des groupes témoin et EAC. Coloration H&E. A et C (G×100) & B et D (G×400).

A & C : montrent une architecture normale des tubes séminifères remplis de spermatozoïde(1), avec un tissu interstitiel très vascularisé (2) et riche en cellules de Leydig (CL) (3); B & D : l'épithélium germinale montre une progression normale de la spermatogénèse depuis les spermatogonies (Sg) jusqu'aux spermatozoïdes (Spz) en passant par les spermatocytes (Sc) et les spermatides (Sd) l'ensemble est maintenu par les cellules de Sertoli (CS).

Par ailleurs, l'observation des coupes histologiques des testicules de rats exposés à l' AlCl_3 (figure 59) permet de constater de multiples perturbations à différents stades de la spermatogénèse. Parmi les anomalies signalées on note : une atrophie des tubes séminifères représentée par leur rétrécissement et un large espace interstitiel ; Présence de travées vides et de cellules exfoliées au sein des tubes séminifères témoignant de la dégénérescence de l'épithélium séminifère et de l'atteinte de l'intégrité des cellules de Sertoli ; Absence partielle et/ou totale des spermatozoïdes dans la lumière tubulaire avec une dégénérescence des cellules de Leydig entourant la membrane basale. Toutes ces anomalies prouvent l'effet

cytotoxique de ce métal sur les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig compte tenu de leur rôle important dans la spermatogénèse.

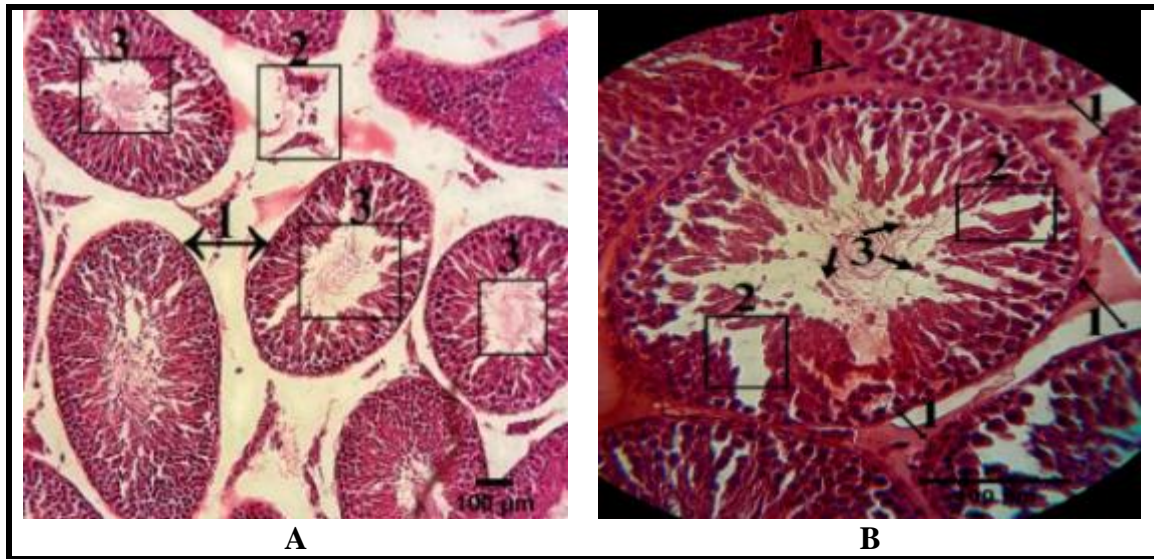


Figure 59. Observation microscopique de la structure histologique des testicules du groupe exposé à l'Al. Coloration H&E. A (G \times 100) & B (G \times 400).

A : montre que l'exposition à l'Al induit une atrophie des tubes séminifères et du tissu interstitiel représentés par un large espace interstitiel (1), dégénérescences des cellules de Leydig (2), et une réduction du nombre des spermatozoïdes. **B :** montre un rétrécissement des tubes séminifères (1), dégénérescence des cellules de Sertoli (2), et présence de cellules exfoliées avec peu de spermatozoïdes dans la lumière.

Cependant, l'analyse histologique des testicules des rats exposés à l'Al et traités avec l'extrait aqueux de *C. longa* (groupe EAC) (figure 60) révèle une importante atténuation de la majorité des anomalies précédemment signalées à savoir : des tubes séminifères de taille normale et des espaces interstitiels réduits richement peuplés par les cellules de Leydig avec des lumières de tubes séminifères remplis de spermatozoïdes qui indiquent un bon déroulement de la spermatogénèse.

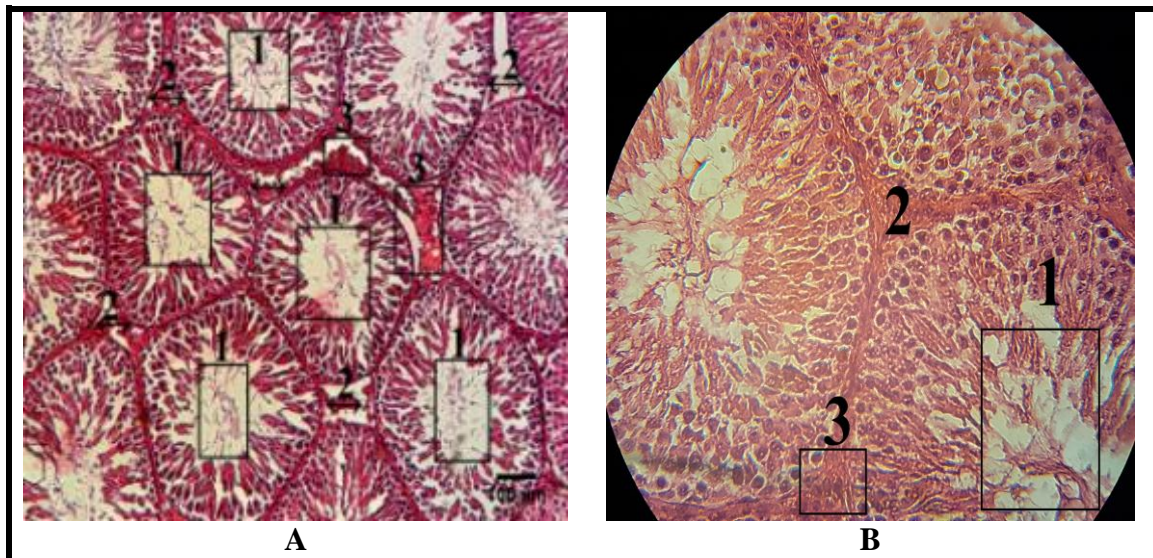


Figure 60. Observation microscopique de la structure histologique des testicules (G4). Coloration H&E. A (G \times 100) & B (G \times 400).

(A et B) montrent que le traitement par l'extrait aqueux de C. longa a permis d'atténuer la majorité des anomalies à savoir : des tubes séminifères de taille normale et moyennement peuplés en spermatozoïdes (1), des espaces interstitiels réduits (2) et riche en cellules de Leydig (3).

9.2.Exploration du tissu épидидymaire

Il est bien établi que les spermatozoïdes testiculaires sont immatures et acquièrent leur mobilité et leur capacité de fécondation pendant leur transit dans l'épididyme. Ce dernier est un organe en forme de canal qui relie le testicule au canal déférent et comprend trois régions anatomiques : la tête, le corps et la queue. La maturation des spermatozoïdes se produit pendant le transit épидидymaire par l'interaction des spermatozoïdes avec l'environnement luminal unique de chaque région épидидymaire. Il semble que l'épithélium du corps de l'organe soit parfois plus sensible que celui de la tête et de la queue. Par conséquent, le corps ne doit pas être exclu de l'examen. L'organe entier doit être fixé et incorporé dans de la paraffine (figure 61). Il convient de noter que certains toxiques affectent en particulier les canaux efférents, qui sont situés entre le testicule et la tête de l'épididyme. Il faut veiller à ce que ces structures ne soient pas détruites lors de la préparation.

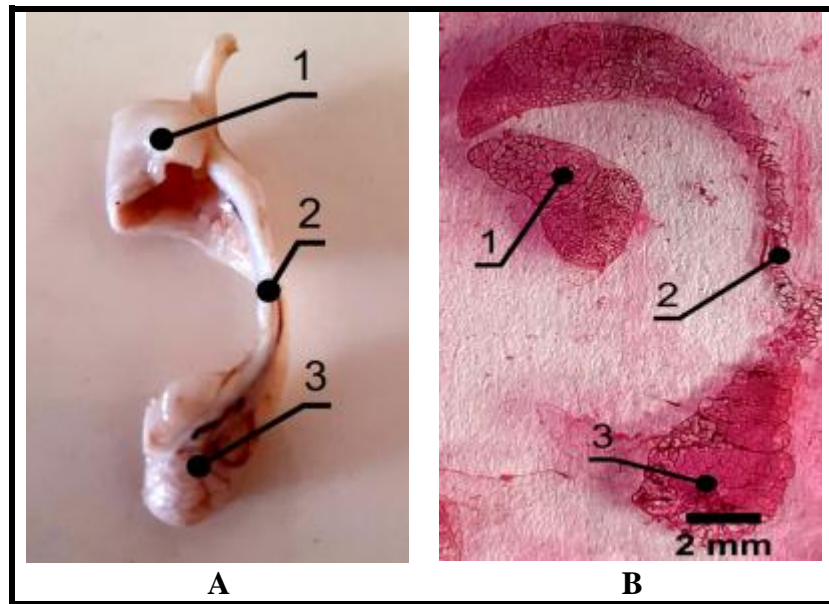


Figure 61. A: Observation macroscopique des 3 segments epididymaires; **1** : tête de l'épididyme, **2** : le corps de l'épididyme, et **3** : la queue de l'épididyme ; **B** : Observation microscopique de la coupe longitudinale de l'épididyme. Coloration H&E (G×40).

L'observation des sections histologiques au niveau du canal epididymaire (figure 62) montre une architecture normale chez les groupes non-exposés à l'Al (groupes T et EAC), présentant des sections tubulaires avec différents diamètres, d'abord moins larges au niveau du cône efférent et de la tête epididymaire et qui s'élargissent au niveau du corps et de la queue de l'épididyme, avec une lumière richement peuplée en spermatozoïdes. L'ensemble est entouré par un tissu conjonctif lâche vascularisé contenant des fibres musculaires lisses circulaires. En effet, les canaux efférents présentent un épithélium prismatic simple avec cellules ciliées sécrétrices présentant des microvillosités apicales (modification du plasma séminal et réabsorption) et des cellules basales de renouvellement avec une lumière remplie de spermatozoïdes, l'ensemble est entouré par un tissu conjonctif lâche vascularisé contenant des fibres musculaires lisses circulaires nécessaires pour favoriser la progression du plasma séminal (battements des cils et contraction des cellules musculaires lisses). Au niveau des trois régions de l'épididyme, l'épithélium est prismatic simple, haut au début du canal puis bas vers son extrémité et pourvu de stéréocils (sécrétion de substances nécessaires à la maturation des spermatozoïdes), l'ensemble est bordé par un tissu conjonctif lâche vascularisé composé de fibres musculaires lisses (transit des spermatozoïdes).

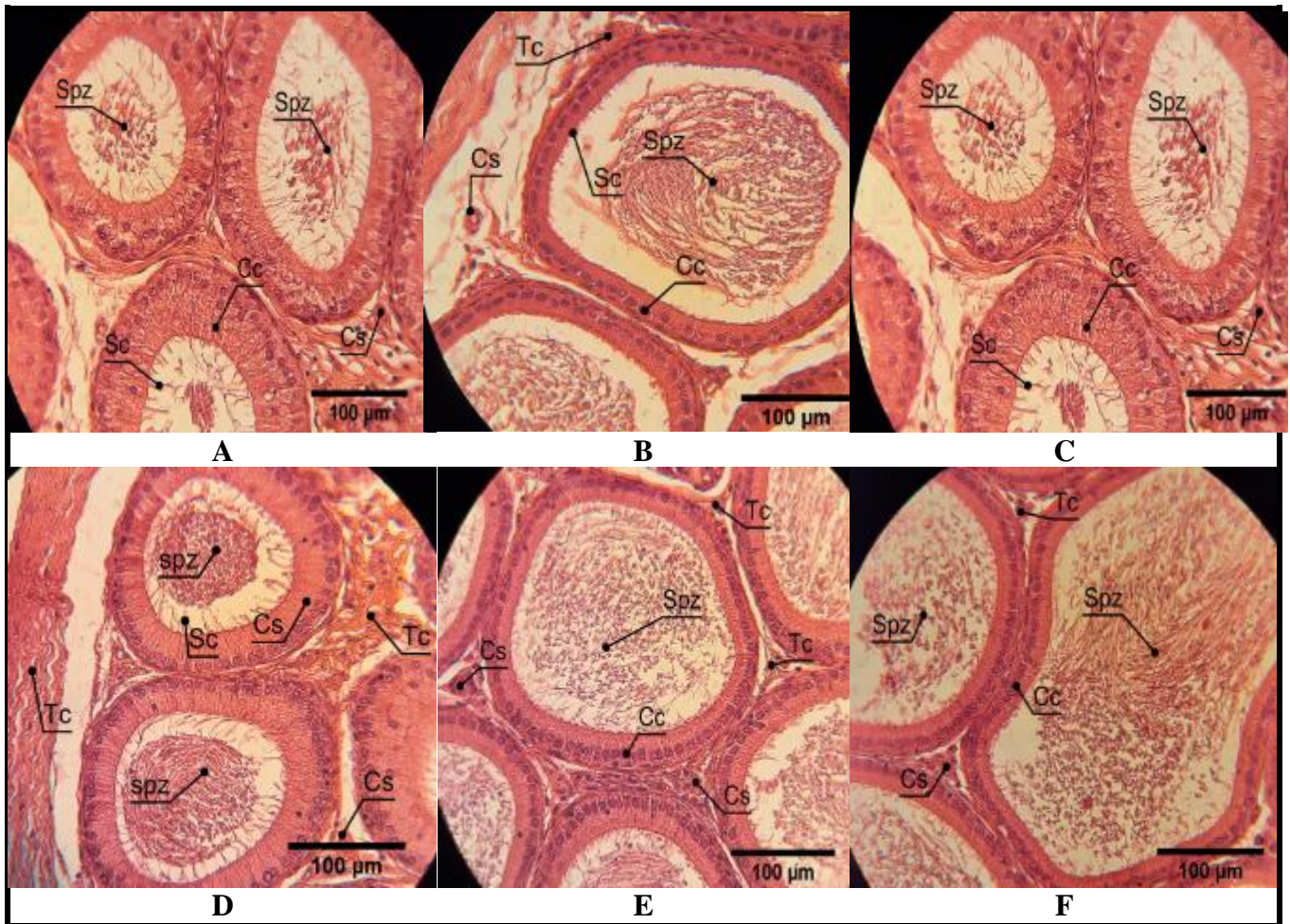


Figure 62. Observation microscopique de la structure histologique de l'épididyme des groupes témoin et EAC Coloration H&E (G×400).

(A, B, C) et (D, E, F) représentent les segments epididymaires (tête, corps et queue) du groupe témoin et du groupe EAC respectivement, composés de, tissu conjonctif (TC), cellules prismatiques hautes au début du canal puis basses vers son extrémité (Cc) et pourvues de stéréocils (Sc).

Par ailleurs, l'observation des coupes histologiques au niveau epididymaire chez les rats exposés à l' $AlCl_3$ permet de constater de multiples perturbations à savoir: Présence de cellules germinales testiculaires ou de débris cellulaires (souvent reconnaissables comme des spermatozoïdes ronds ou des spermatocytes) dans la lumière du canal epididymaire indiquant une perturbation de la spermatogénèse dans le testicule ; une atrophie de l'épididyme caractérisée par une diminution du diamètre des conduits et associée à une diminution du contenu luminal en spermatozoïdes, secondaire à une diminution de la spermatogénèse testiculaire ; Une inflammation en réponse à une lésion tissulaire et à la rupture de la barrière hémato-épididymaire, entraînant une infiltration des cellules immunitaires et formation d'une réaction granulomateuse entourant un noyau de spermatozoïdes (Granulome spermatique épидидymite). Cependant, le traitement à basse dose de *C. longa* L. a permis d'atténuer la majorité des anomalies précédemment citées et causées par l' Al à savoir : absence de débris dans la lumière, absence

du granulome spermatique, et une diminution de l'inflammation avec absence partielle ou totale des cellules immunitaires (figure 63).

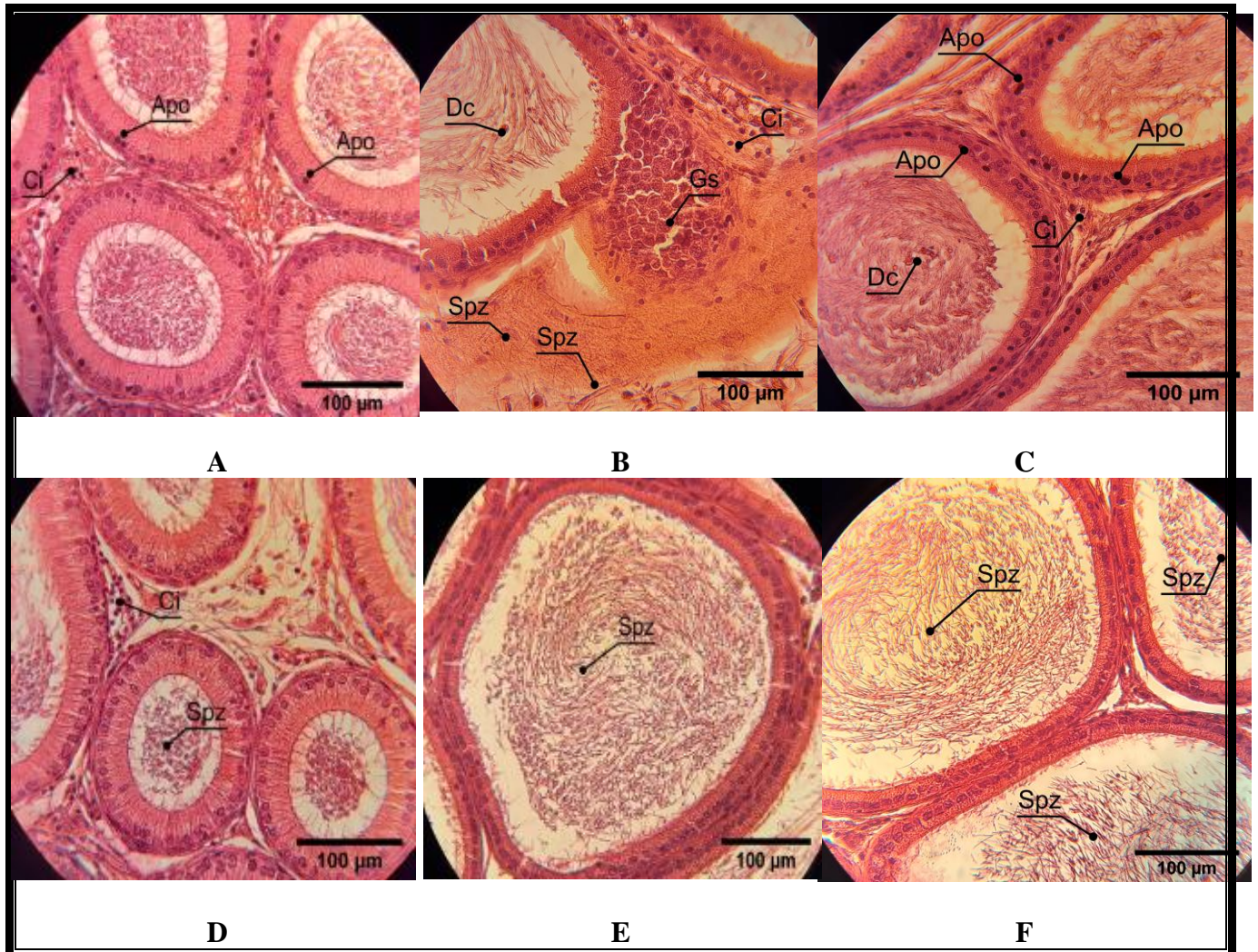


Figure 63. Observation microscopique de la structure histologique de canal epididyme. Coloration H&E (G×400).

(a, b, c) et (d, e, f) représentent les segments epididymaires (tête, corps et queue) du groupe Al et Al-EAC respectivement. L'exposition à l'Al est à l'origine de multiples anomalies à savoir : présence de cellule apoptotiques (Apo), de débris cellulaires (Dc) testiculaires (spermatocytes ou spermatides) dans la lumière, infiltration des cellules immunitaires (Ci) dans l'épithélium et formation de foyer inflammatoire induisant l'apparition de granulome spermatique (GS) suite à l'extravasation des spermatozoïdes (Spz) dans la matrice extracellulaire. Le traitement à base d'EAC a permis d'atténuer la majorité des anomalies à savoir : absence de débris dans la lumière, absence de granulome spermatique, et une diminution de l'inflammation avec absence partielle ou totale des cellules immunitaires.

9.3.Exploration du tissu prostatique

La prostate du rat est constituée de 4 lobes appariés : le ventral, dorsal, latéral et antérieur. Les glandes coagulantes, qui représentent les lobes antérieurs se distinguent facilement des autres lobes prostatiques du fait qu'elles sont attachées aux vésicules séminales et seront par conséquent étudiées séparément de la prostate (voir section vésicule séminale).

Le tissu acinaire prostatique est fondamentalement similaire dans les lobes dorsal, latéral et ventral, mais avec des différences tinctoriales reflétant les différents constituants biochimiques des sécrétions et les différents protocoles de coloration entre les laboratoires. Il y a également une variabilité dans la quantité de sécrétion à la fois dans et entre les lobes spécifiques. En outre, le revêtement unicellulaire des acini prostatiques varie en hauteur en fonction du degré d'activité sécrétoire. Le défi de l'évaluation de la prostate est l'identification fiable des lobes spécifiques. L'identification des lobes spécifiques dépend fortement de l'obtention d'une section qui montre clairement leur relation les uns avec les autres et la façon dont ils entourent l'urètre (figure 64). Par conséquent, une section longitudinale-horizontale à travers le complexe prostatique, comprenant les lobes dorsolatéral et ventral, l'urètre et, éventuellement, l'uretère et le canal déférent, représente une méthode privilégiée applicable au traitement et à l'examen histologiques de routine.

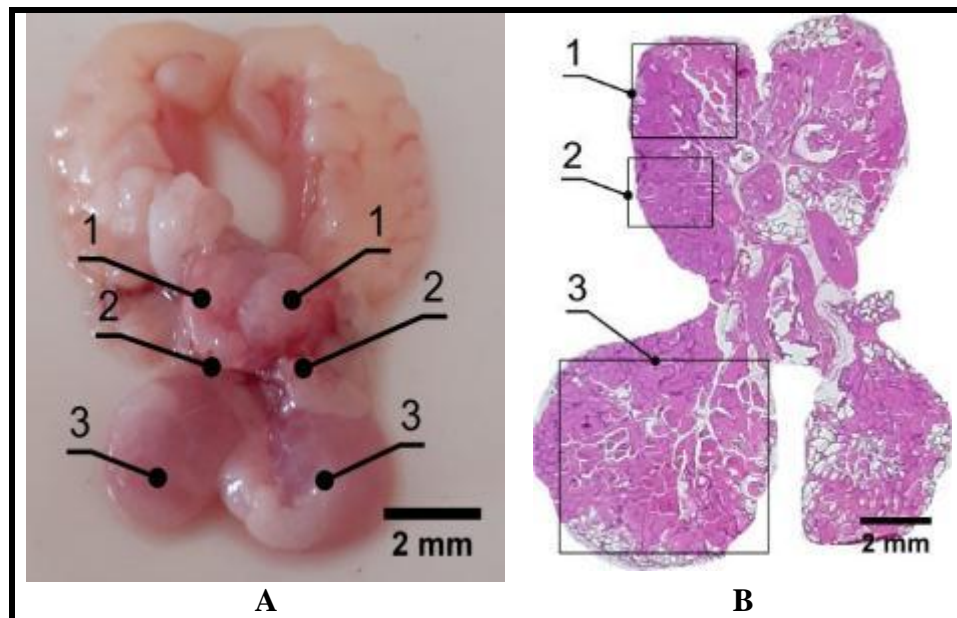


Figure 64. **A:** Observation macroscopique montrant les 3 paires de lobes prostatiques ; **1** : lobe dorsal, **2** : lobe latéral, et **3** : lobe ventral ; **B** : Observation microscopique de la coupe longitudinale de la prostate. Coloration H&E (G×40).

L'analyse histologique de la prostate montre une structure normale chez le groupe de rats témoins et du groupe exposé seulement à l'extrait de plante (groupe EAC) (figure 65), présentant des alvéoles (acini) glandulaires entourés d'un stroma abondant. L'épithélium glandulaire est fait d'une assise de cellules cubiques ou prismatiques reposant sur une lame

basale. Ces cellules sont relevées en festons ou replis occasionnels au niveau du lobe dorsal et plus fréquent au niveau du lobe latéral et ventral. On peut voir quelques cellules basales de remplacement. Les trois lobes prostatiques présentant des acini à importante activité sécrétrice. Le stroma abondant forme des cloisons autour des lobules ; il est constitué de fibres conjonctives et élastiques, de fibres musculaires lisses et contient des plexus veineux.

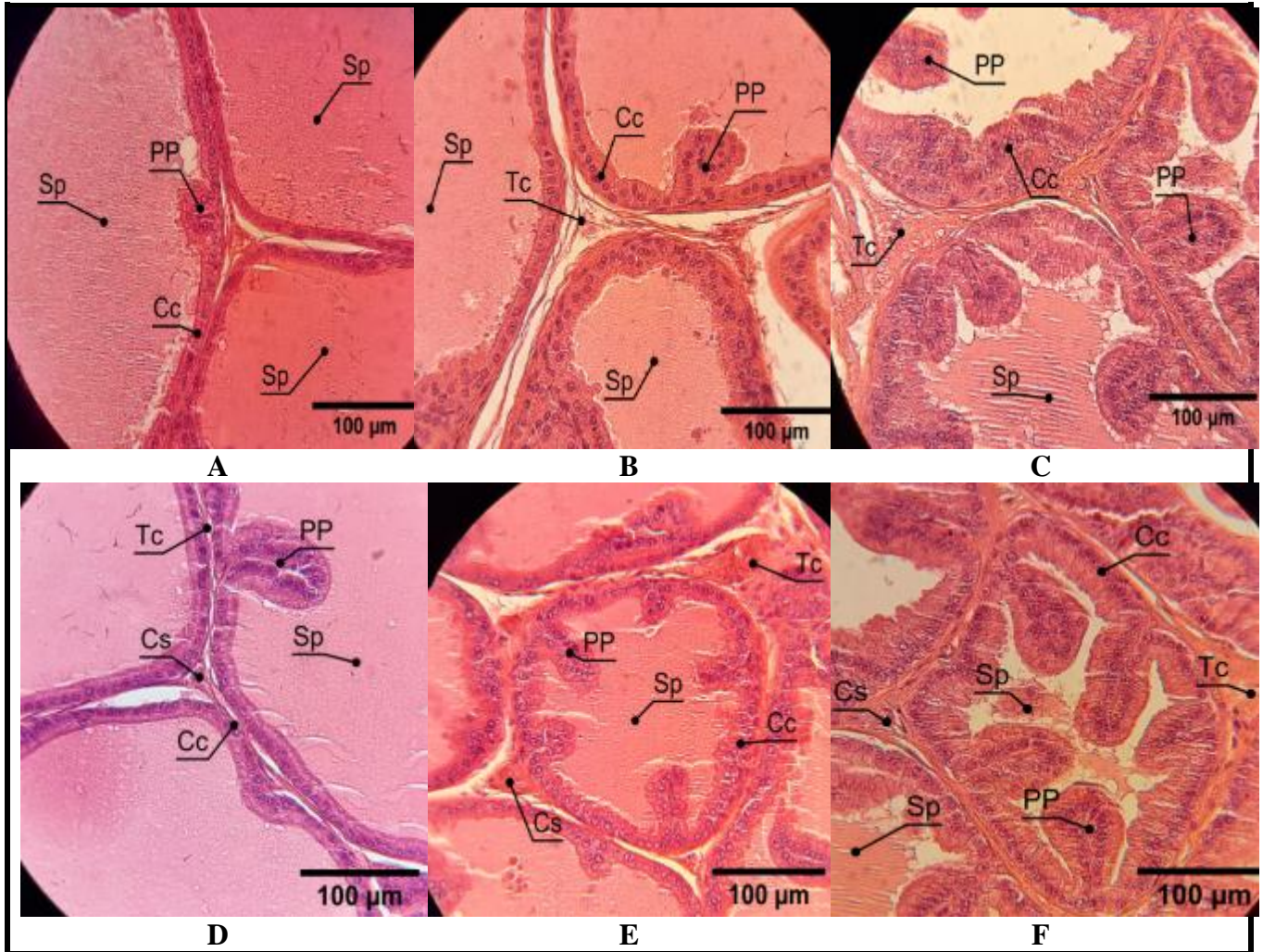


Figure 65. Observation microscopique de la structure histologique des lobes prostatiques. Coloration H&E. (G×400).

(A, B, C) et (D, E, F) représentent les observations du groupe témoin et du groupe EAC respectivement, présentant une apparence normale des trois lobes prostatiques (Dorsaux, latéraux, et ventraux) présentant des acini à importante activité sécrétrice (Sp). Le lobe dorsal présente une muqueuse épithéliale cuboïdale à cylindrique (Cc) ; Le lobe latéral normale à muqueuse épithéliale cuboïdale (Cc) et des plis papillaires occasionnels (PP) ; Le lobe ventral à épithélium cylindrique normale présentant de nombreux replis (PP).

Cependant, l'exposition à l' AlCl_3 à raison de 34 mg/kg p.c durant une période de 30 jours a induit de multiples perturbations à savoir : une atrophie (sténose glandulaire) caractérisée par une réduction de la taille des acini, une atténuation des cellules épithéliales de la

muqueuse, un faible matériel de sécrétion et une dégénérescence stromale accrue avec une inflammation (prostatite) caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires au niveau de la muqueuse et de la lumière alvéolaire. Tandis que, le traitement à base d'extrait aqueux de *C. longa L.* à une dose de 200 mg/kg p.c administré simultanément à des rats intoxiqués à l'Al a permis d'atténuer l'ensemble des anomalies en gardant une architecture presque normale du tissu prostatique avec une activité sécrétrice normale au niveau des acini des trois lobes, et en atténuant l'inflammation causées par l'exposition à l'Al (figure 66).

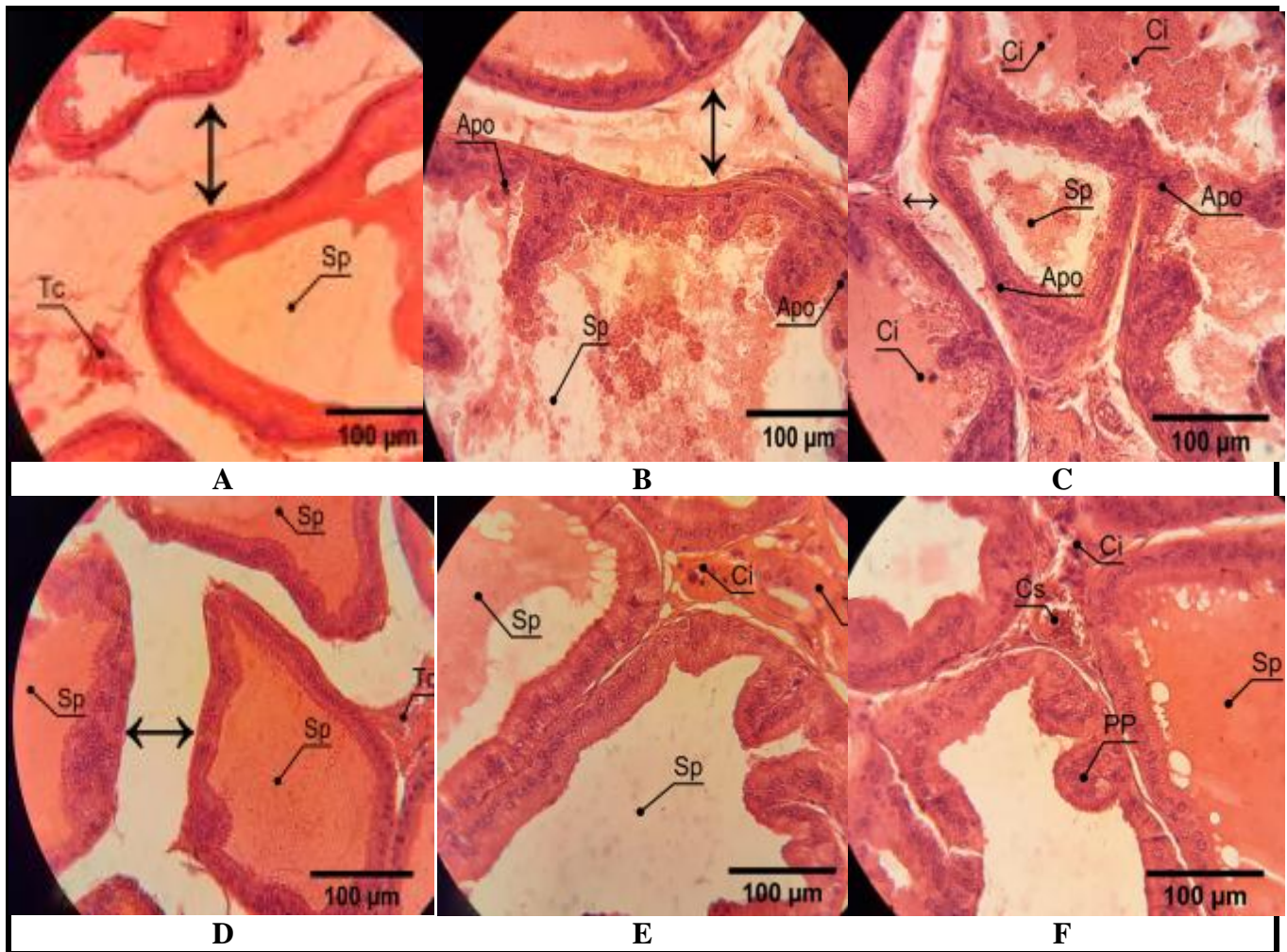


Figure 66. Observation microscopique de la structure histologique des lobes prostatiques Coloration H&E (G×400).

(A, B, C) et (D, E, F) représentent les observations du groupe Al et AL-EAC respectivement. L'exposition à l'Al est à l'origine de multiples anomalies à savoir : une atrophie prostatique (sténose glandulaire) caractérisée par une réduction de la taille des acini (flèche à double sens), une atténuation des cellules épithéliales de la muqueuse, un faible matériel de sécrétion et une dégénérescence stromale accrue. Infiltration des cellules immunitaires (tête de flèches) dans l'épithélium et la lumière alvéolaire. Le traitement à base de *C. longa* a permis d'atténuer l'inflammation (Ci) et de garder une activité sécrétrice normale au niveau des acini des trois lobes (Sp).

9.4.Exploration histologique de la glande coagulante et de la vésicule séminale

La glande de coagulation représente le lobe antérieur de la prostate. Une section transversale doit être réalisée à travers la partie la plus large de la vésicule séminale avec la glande de coagulation (figure 67).

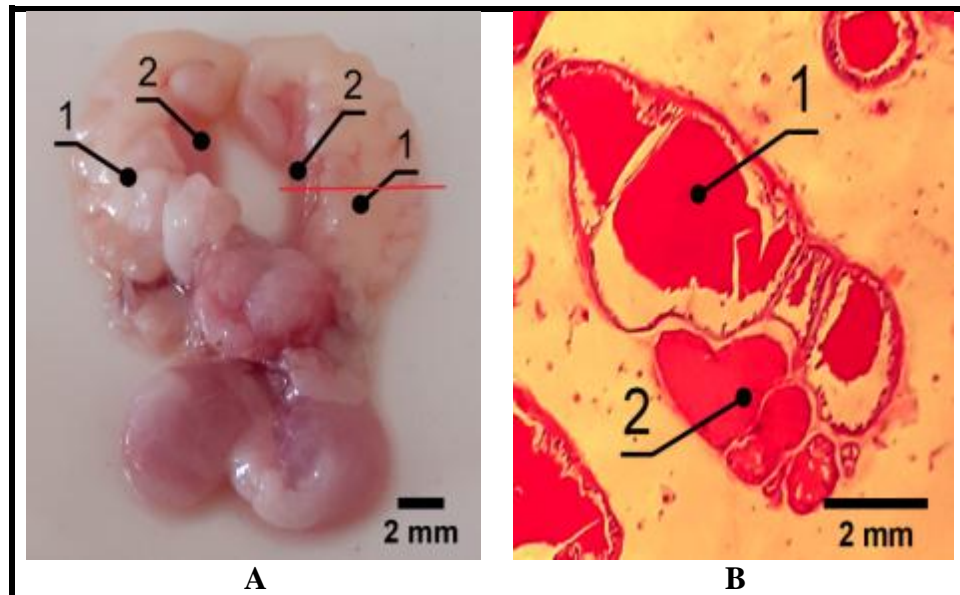


Figure 67. **A** : Observation macroscopique de la vésicule séminale (1) et de la glande coagulante (2) et de la position de la coupe transversale (trait rouge) ; **B** : Observation microscopique de la coupe longitudinale de la vésicule séminale et de la glande coagulante. Coloration H&E (G×40).

L'analyse histologique des glandes coagulantes et des vésicules séminales des animaux des groupes témoins montrent une structure histologique normale (figure 68). Les acini des glandes coagulantes sont serrés, entourés d'un stroma épais de muscle lisse et de tissu conjonctif et attachés aux vésicules séminales. Les acini sont typiquement repliés et contiennent une sécrétion modérément éosinophile. L'épithélium est généralement colonnaire pseudostratifié. Les noyaux des cellules épithéliales sont situés au centre ; les zones basales de pâleur cytoplasmique sont proéminentes. Tandis que, les vésicules séminales présentent d'épaisses cellules musculaires lisses et un stroma de tissu conjonctif entourant les acini qui sont repliés en périphérie et présentent une sécrétion fortement éosinophile dans une lumière distendue au centre. L'épithélium est colonnaire, et les noyaux des cellules épithéliales sont situés à la base avec des zones de pâleur cytoplasmique dans le cytoplasme apical.

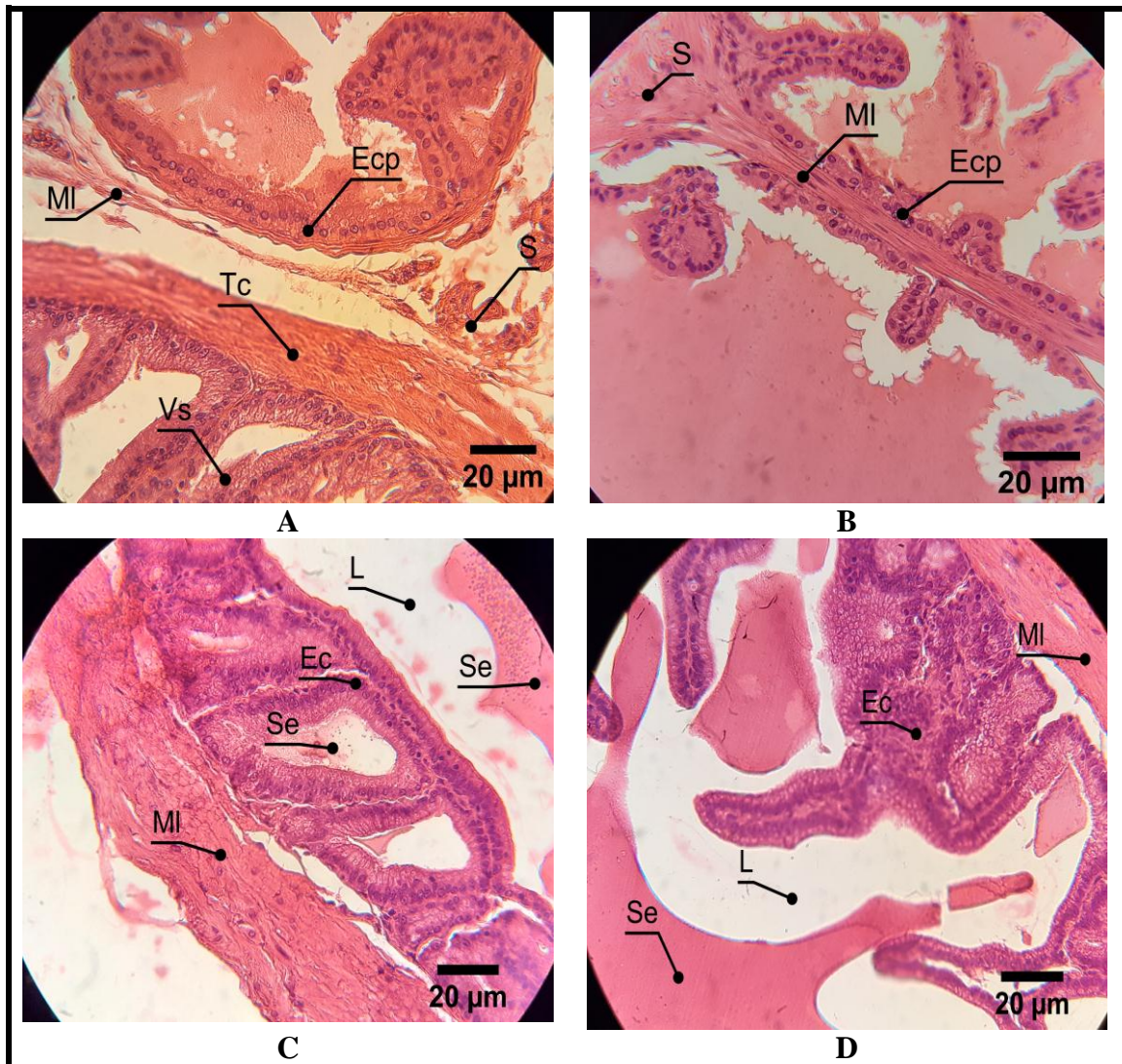


Figure 68. Observation microscopique de la structure histologique des glandes coagulantes et vésicules séminales. Coloration H&E (G×400).

(A) et (B) représentent les observations des GC du groupe témoin et EAC respectivement. Présentant une apparence normale avec des acini serrés repliés avec un épithélium colonnaire pseudostratifié (Ecp) entourés d'un stroma épais (S) de muscle lisse (MI) et de tissu conjonctif (Tc) attaché à la vésicule séminale (Vs). (C) et (D) représentent les observations des Vs du groupe témoin et EAC respectivement. Présentant d'épaisses cellules musculaires lisses (MI) et un stroma de tissu conjonctif entourant les acini qui sont repliés en périphérie et présentent une sécrétion fortement éosinophile (Se) dans une lumière distendue au centre (L). L'épithélium est colonnaire (Ec), et les noyaux des cellules épithéliales sont situés à la base avec des zones de pâleur cytoplasmique dans le cytoplasme apical.

Alors que, l'exposition subaiguë à l' AlCl_3 à raison 34 mg/kg p.c a permis à conduit à l'installation d'un état inflammatoire marqué par une augmentation de la prééminence stromale, caractérisée par un stroma étendu par un exsudat cellulaire mixte de fibroblastes et du collagène présentant des congestions des vaisseaux sanguins dans le foyer inflammatoire, une infiltration de cellules immunitaire au niveau de l'épithélium glandulaire, du stroma et des lumières dont les cellules infiltrantes les plus prédominantes sont les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes, et une métaplasie pavimenteuse qui accompagne

l'inflammation dans certaines régions. Tandis que, le traitement à base d'extrait aqueux de *C. longa L.* à une dose de 200 mg/kg p.c administré simultanément à des rats intoxiqués à l'Al a permis d'atténuer l'ensemble des anomalies en gardant une architecture presque normale des glandes coagulantes. Les vésicules séminales des rats traités avec l' $AlCl_3$ présentent une perte des plis complexes et une lumière bien dilatée, une métaplasie avec un 'épithélium glandulaire peu développé dont la hauteur des cellules cylindriques semble fortement réduite avec une forme cuboïdale ou squameuse (figure 69).

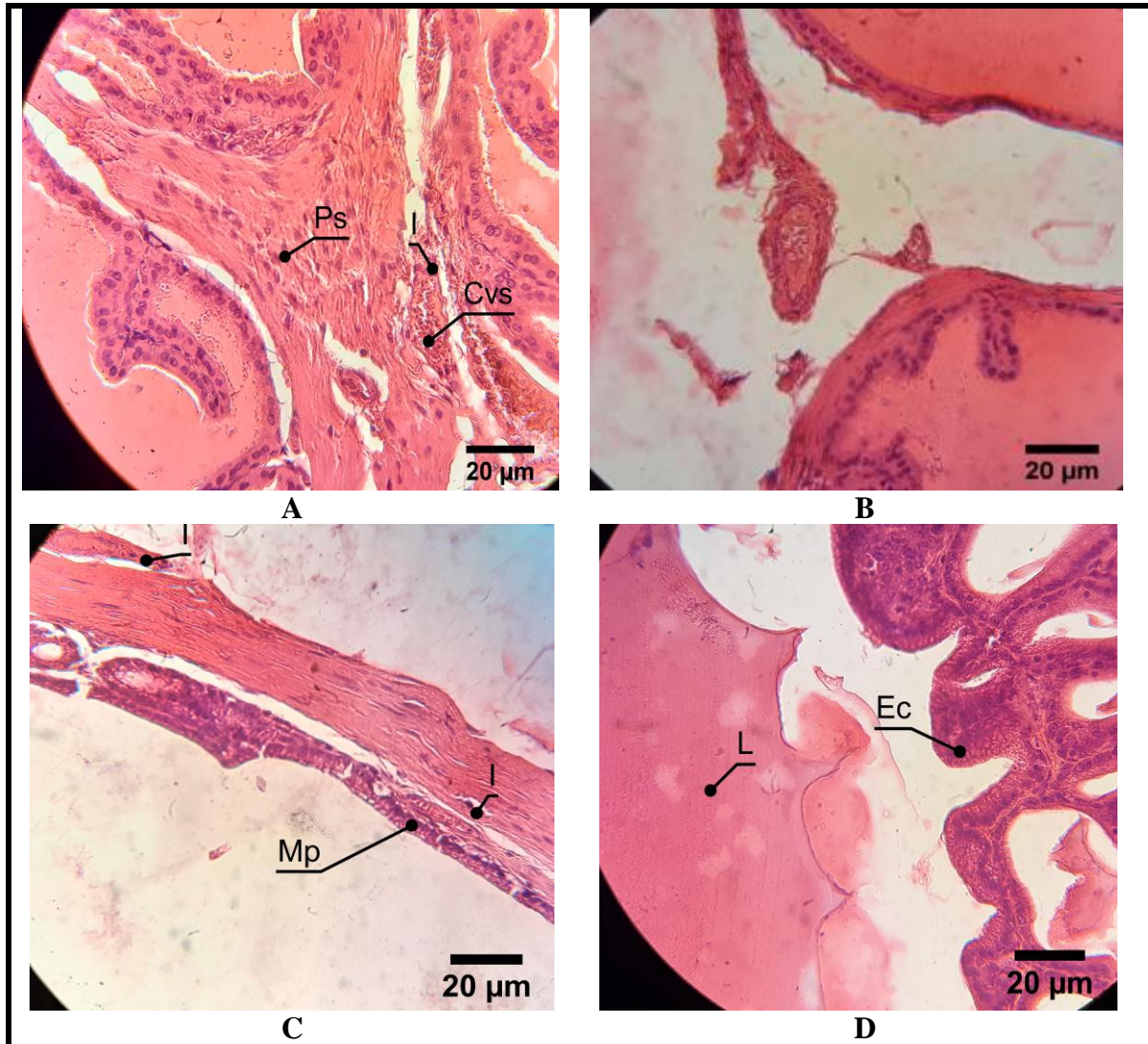


Figure 69. Observation microscopique de la structure histologique de la glande coagulante. Coloration H&E (G×400).

(A) et (B) représentent les observations des GC du groupe Al et AL-EAC respectivement. L'exposition à l'Al est à l'origine de multiples anomalies à savoir : une inflammation marquée par une proéminence stromale (Ps), une congestion des vaisseaux sanguins (Cvs), une infiltration (I) de neutrophiles et de macrophages et une métaplasie pavimenteuse (Mp). Le traitement à base de EAC a permis d'atténuer l'inflammation et de garder une architecture normale des glandes coagulantes. (C) et (D), représentent les observations des VS du groupe Al et AL-EAC respectivement. Les rats traités avec l' $AlCl_3$ présentent une perte des plis complexes et une lumière bien dilatée (L), avec un épithélium glandulaire peu développé dont la hauteur des cellules cylindriques semble fortement réduite avec une forme cuboïdale (Ec) ou squameuse.

10. Mise en évidence du phénomène d'apoptose au niveau tissulaire

L'un des premiers signes de l'apoptose est la condensation de la chromatine. Le bleu de toluidine boraté permet la mise en évidence histochimique de ce phénomène. Après coloration les cellules apoptotiques possèdent des noyaux denses de couleur bleu foncé. Au contraire, les cellules normales paraissent avec des noyaux ayant des chromatines et des nucléoles visibles. De plus, ce colorant permet aussi d'estimer le degré d'inflammation en colorant spécifiquement les cellules immunitaires infiltrantes est plus particulièrement les mastocytes.

10.1. Mise en évidence de l'apoptose au niveau testiculaire

L'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des testicules montrent chez les groupes de rats non exposés au métal (groupe T et EAC) une architecture normale du tissu testiculaire montrant une lumière remplie de spermatozoïdes révélant le bon déroulement de la spermatogénèse et une succession cellulaire représentant un épithélium stratifié composé des cellules germinales des différents stades qui paraissaient avec un aspect normal et un noyau clair indiquant une bonne activité chromatique et témoignant de la vitalité cellulaire (figure 70).

Alors qu'après l'exposition à l'Al, les coupes histologiques au niveau des testicules montrent des cellules apoptotiques avec des noyaux denses concentrés vers la lumière des tubes séminifères ce qui laisse à déduire que l'effet cytotoxique de l'Al s'exerce par un phénomène d'apoptose qui touche les derniers stades de la spermatogénèse à savoir les spermatides (figure 70-A) et les spermatozoïdes (figure 70-B). De plus, cette coloration a aussi permis d'estimer le degré d'inflammation en colorant spécifiquement les cellules immunitaires infiltrantes est plus particulièrement les mastocytes (figure 70-C). Cependant, Le traitement à base d'EAC a permis d'atténuer l'inflammation et de garder une architecture normale du tissu testiculaire présentant un aspect identique à celui des rats témoins (figure 70-D).

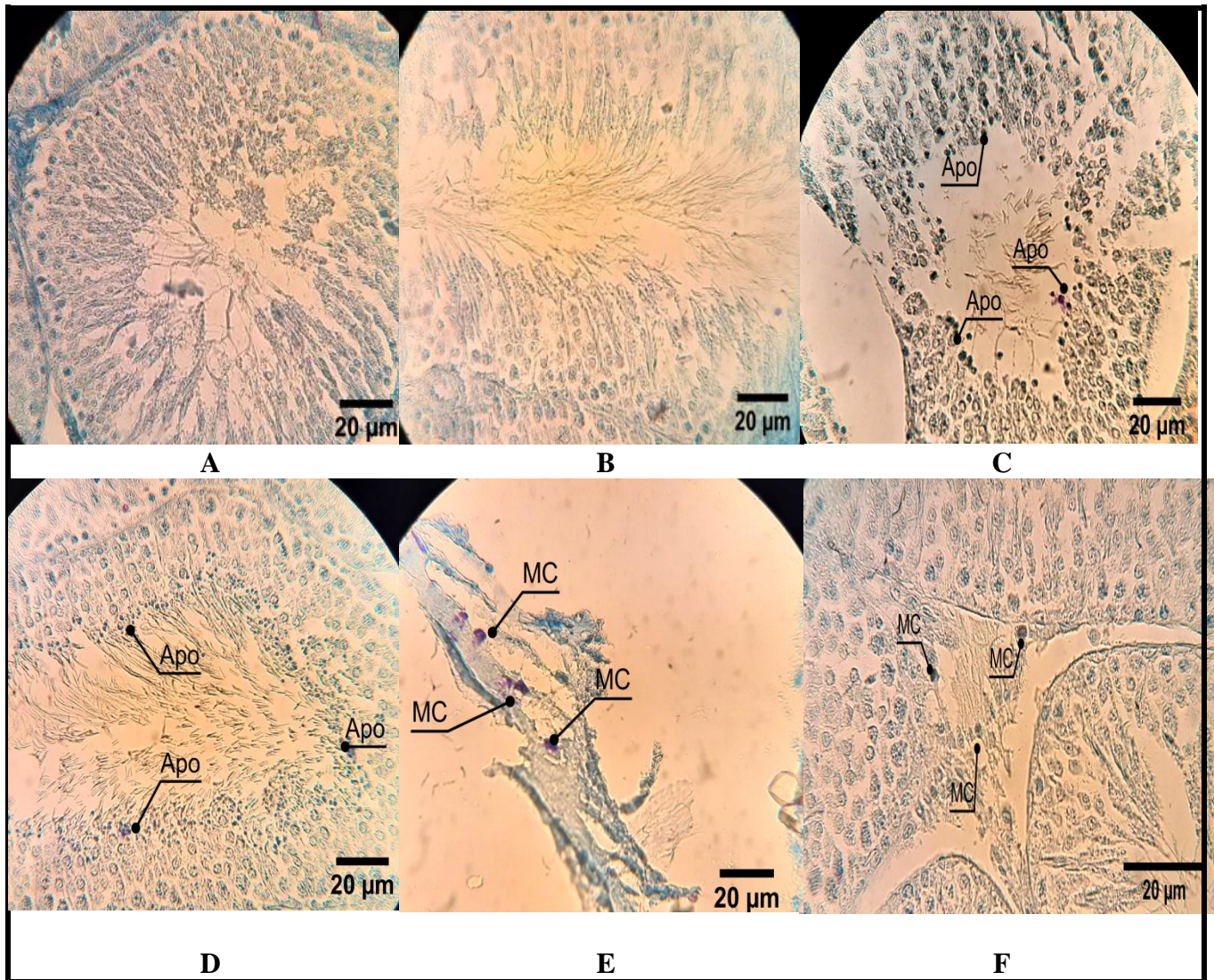


Figure 70. Observation microscopique des coupes histologiques testiculaires après coloration bleu de toluidine boraté (G× 400).

(A) et (B) représentent les observations du groupe T et EAC respectivement. Présentant une apparence normale cellules germinales des différents stades qui paraissent avec un aspect normal et un noyau clair indiquant une bonne activité chromatinique et témoignant de la vitalité des cellules. (C, D et E) représentent les observations du groupe AI qui montrent un phénomène d'apoptose qui touche les derniers stades de la spermatogénèse à savoir les spermatides et les spermatozoïdes ainsi qu'une infiltration des mastocytes. (F) représente l'observation du groupe AI-EAC montrant un aspect normal des cellules et une inflammation atténuée.

10.2. Mise en évidence de l'apoptose au niveau épидидymaire

L'exploration des coupes histologiques de l'épididyme colorées au bleu de toluidine, à fin d'estimer l'état des cellules et le degré d'inflammation par l'infiltration des cellules immunitaires, a permis de montrer chez le groupe de rats témoins et ceux traités seulement avec l'extrait de plante (groupe EAC) une architecture normale du tissu épидидymaire exempt de toutes cellules apoptotiques ou cellules immunitaires, avec des tubules remplis de spermatozoïdes traduisant le bon déroulement de la spermatogénèse en amont dans les

testicules (figure 71 A, B et C). Cependant, l'exposition à l' AlCl_3 à raison de 34 mg/kg p.c durant une période de 30 jours a induit le déclenchement d'un état apoptotique des cellules de l'épithélium épидидymaire traduit par une coloration positive au bleu de toluidine montrant des cellules à noyaux denses typique d'un état de condensation de la chromatine qui est en effet le premier signe de la mort cellulaire. La coloration au BT a aussi permis de visualiser des cellules immunitaires de type mastocyte dans le tissu interstitiel témoignant d'un état inflammatoire du tissu épидидymaire. En contrepartie, le traitement à base d'extrait aqueux de *C. longa* L. à une dose de 200 mg/kg p.c administré simultanément à des rats intoxiqués à l'Al a permis d'atténuer le niveau d'inflammation et l'état apoptotique des cellules de l'épididyme.

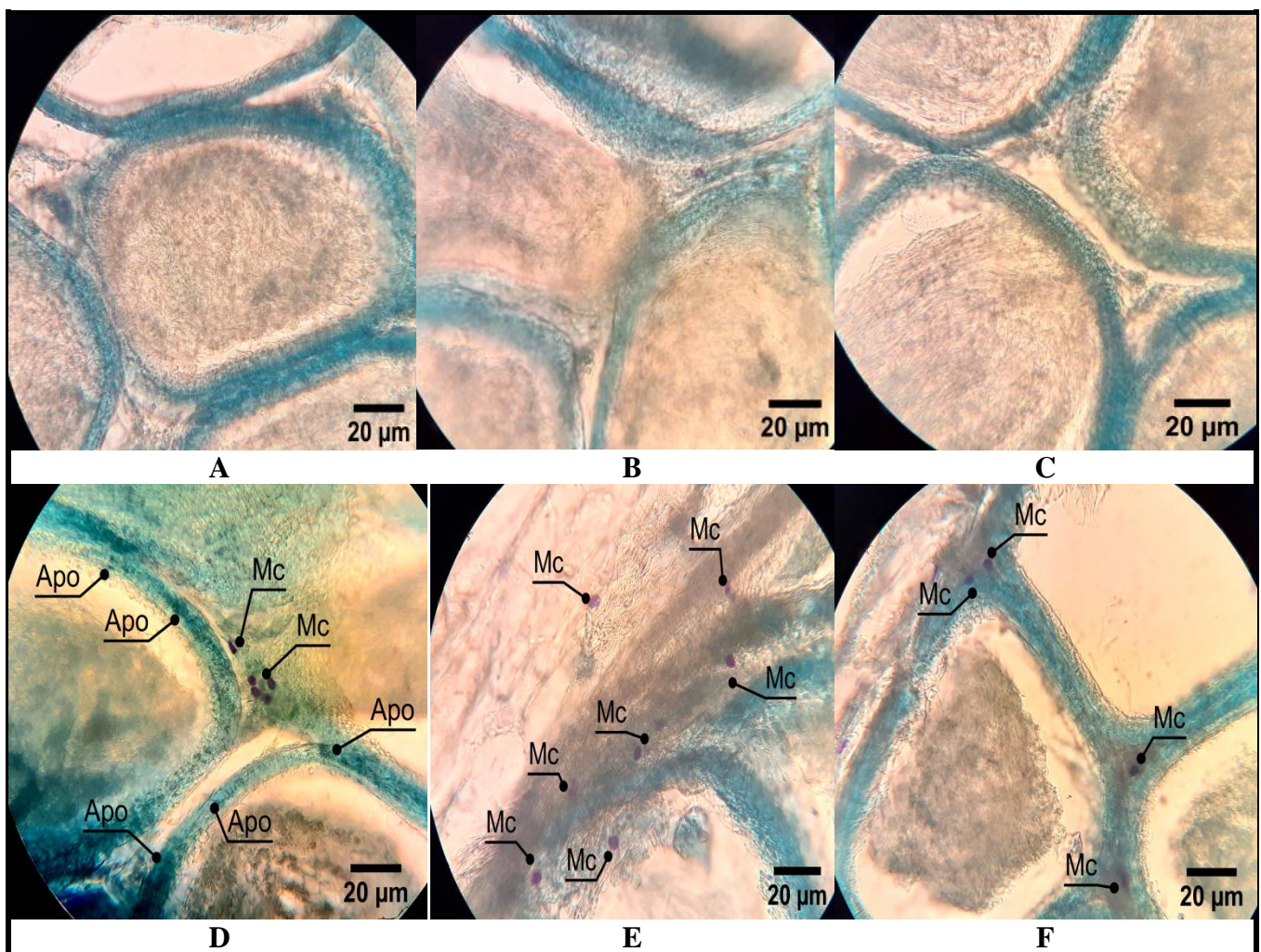


Figure 71. Observation microscopique des coupes histologiques de l'épididyme après coloration au bleu de toluidine boraté ($\text{G} \times 400$).

A et (B-C) représentent les observations du groupe T et EAC respectivement. Présentant une apparence normale du tissu épидидymaire exempt de toutes cellules apoptotiques ou cellules immunitaires. **(D-E)** représentent les observations du groupe Al qui montrent un phénomène d'apoptose et une infiltration des mastocytes. **(F)** représente l'observation du groupe Al-EAC montrant un aspect normal des cellules et une inflammation atténuée.

10.3. Mise en évidence de l'apoptose au niveau prostatique

Après traitement par Al, les coupes prostatiques montrent des cellules apoptotiques avec des noyaux denses dans la muqueuse épithéliale. En effet, la condensation de la chromatine est l'un des premiers signes de la mort cellulaire. L'effet cytotoxique de l'aluminium semble donc s'exercer par un phénomène d'apoptose. Par ailleurs, la coloration TB a également été utilisée pour visualiser l'infiltration des mastocytes dans les cellules stromales. L'exposition à l'aluminium a entraîné une augmentation du nombre de mastocytes par rapport au contrôle. D'autre part, le traitement simultané avec EAC montre une bonne amélioration en réduisant le nombre de cellules apoptoses et l'infiltration des mastocytes (figure 72).

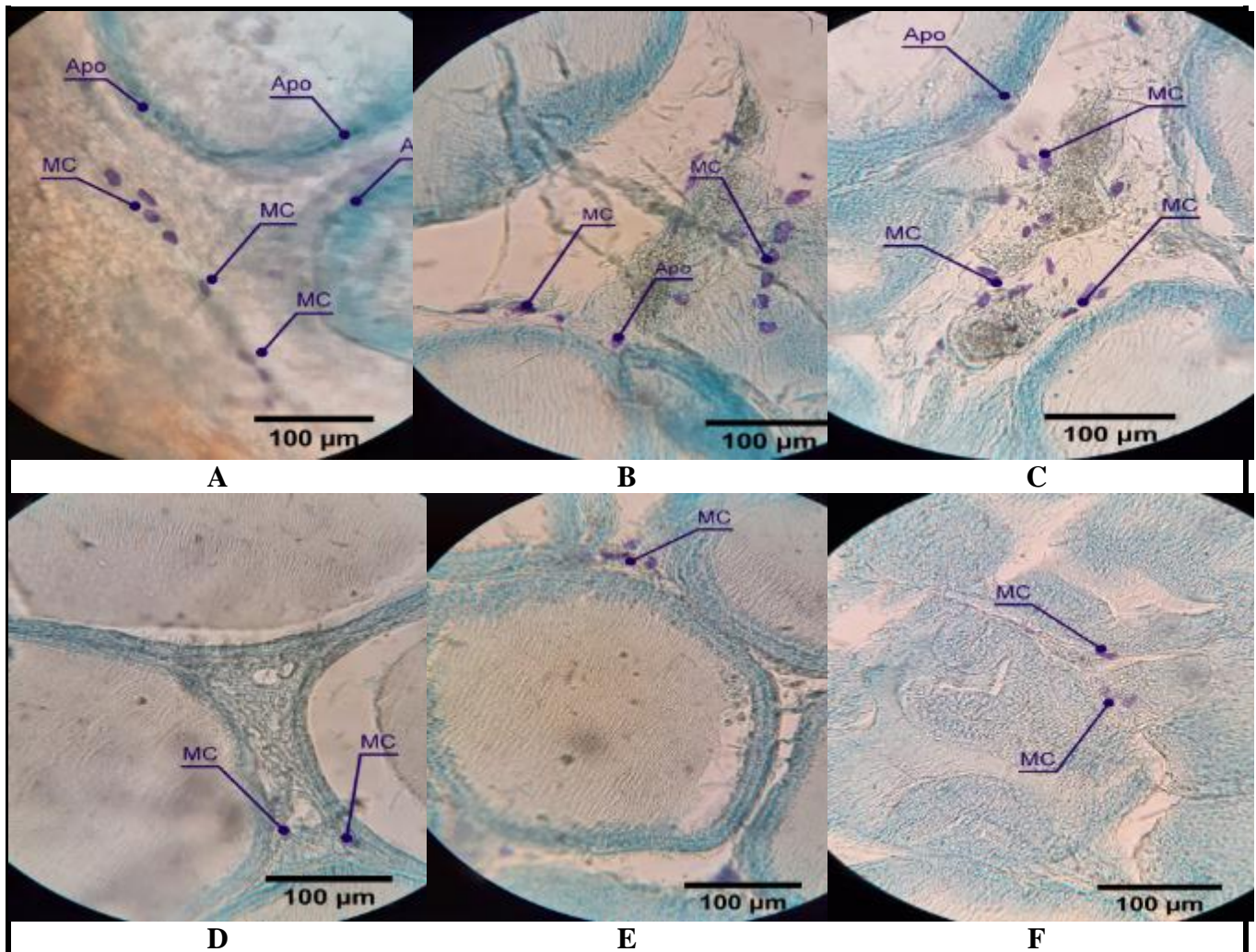


Figure 72. Observation microscopique des coupes histologiques de la prostate après coloration au bleu de toluidine boraté (G× 400).

(A, B et C) représentent les observations du groupe Al qui montrent un phénomène d'apoptose et une infiltration des mastocytes. (D, E et F) représente l'observation du groupe Al-EAC montrant un aspect normal des cellules et une inflammation atténuée.

11. Mise en évidence de l'aluminium par histochimie au niveau tissulaire

L'observation des coupes histologiques au niveau testiculaire (figure 73), colorées avec le sel de triammonium de l'acide aurintricarboxylique communément connu sous le nom de « Aluminon » qui est un composé organique de plusieurs acides salicyliques utilisé comme indicateur pour détecter la présence de l'ion aluminium en fournissant une teinte rouge à brune révélatrice de la formation d'un complexe Aluminon- Al^{3+} , révèlent la présence de dépôts rouges brunâtres (réaction positive) au niveau des testicules des animaux exposés à l'Al (groupes Al et Al-EAC) comparé au deux autres groupes de rats non exposés au à ce métal (groupes T et EAC).

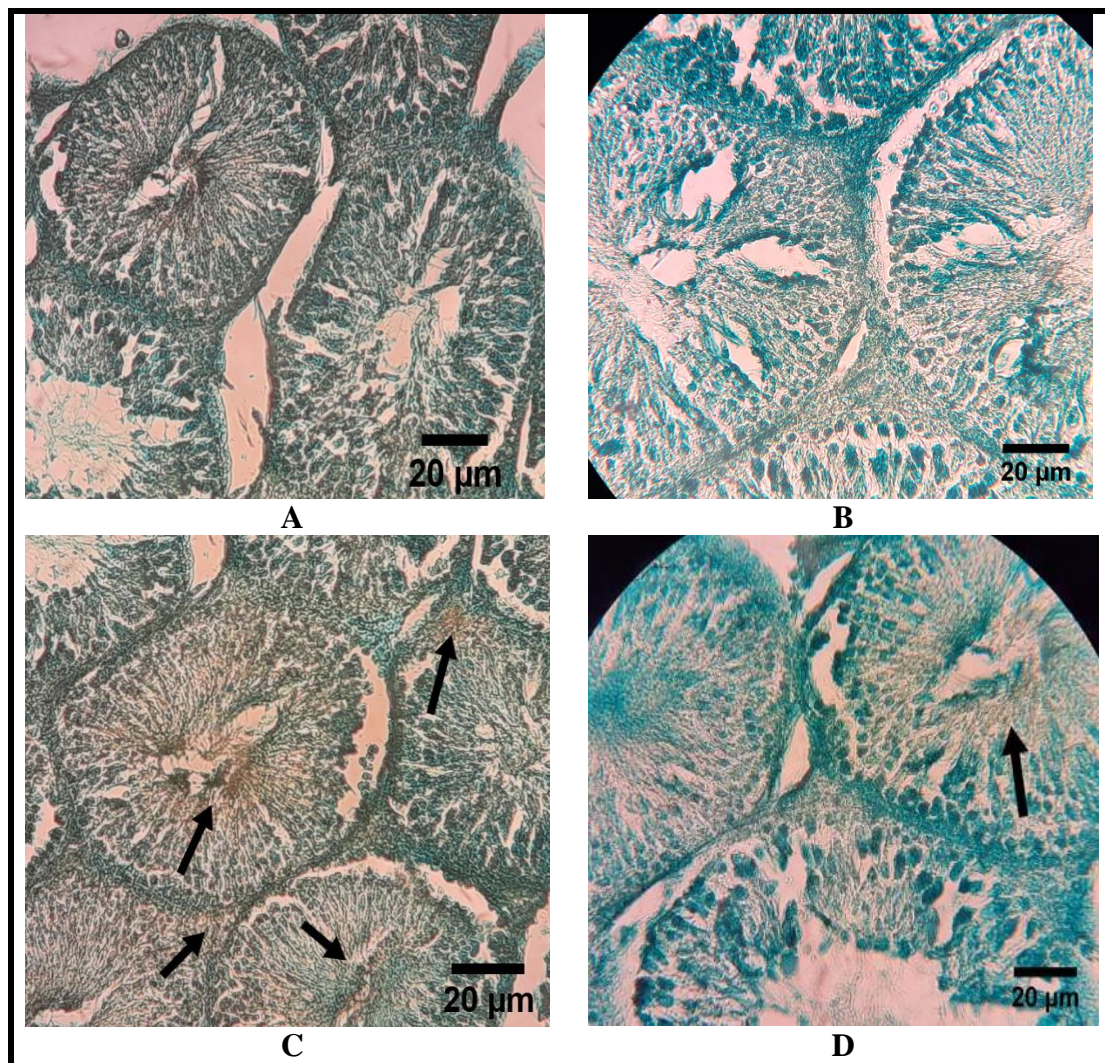


Figure 73. Observation microscopique des coupes histologiques de testicules après coloration à l'Aluminon (G× 400).

(A, B, C et D) représentent les observations du groupe T, EAC, Al et Al-EAC respectivement, montrant un dépôt rouge-brun (flèches) révélateur de la présence de Al^{3+} chez le groupe Al avec une intensité moindre chez le groupe Al-EAC et une absence de ce dépôt chez les autres groupes.

Tandis que la coloration à l'Aluminon au niveau des autres organes sexuels accessoires étudiés (épididymes, prostates, et vésicules séminales) a révélé une réaction positive à cet indicateur chez tous les groupes de rats expérimentaux (groupes Al, Al-EAC, EAC et T) suite à une possible interférence de cet indicateur avec d'autres éléments de traces métalliques tel que le Zn^{+2} qui est richement présent dans les sécrétions de ces organes (figure 82).

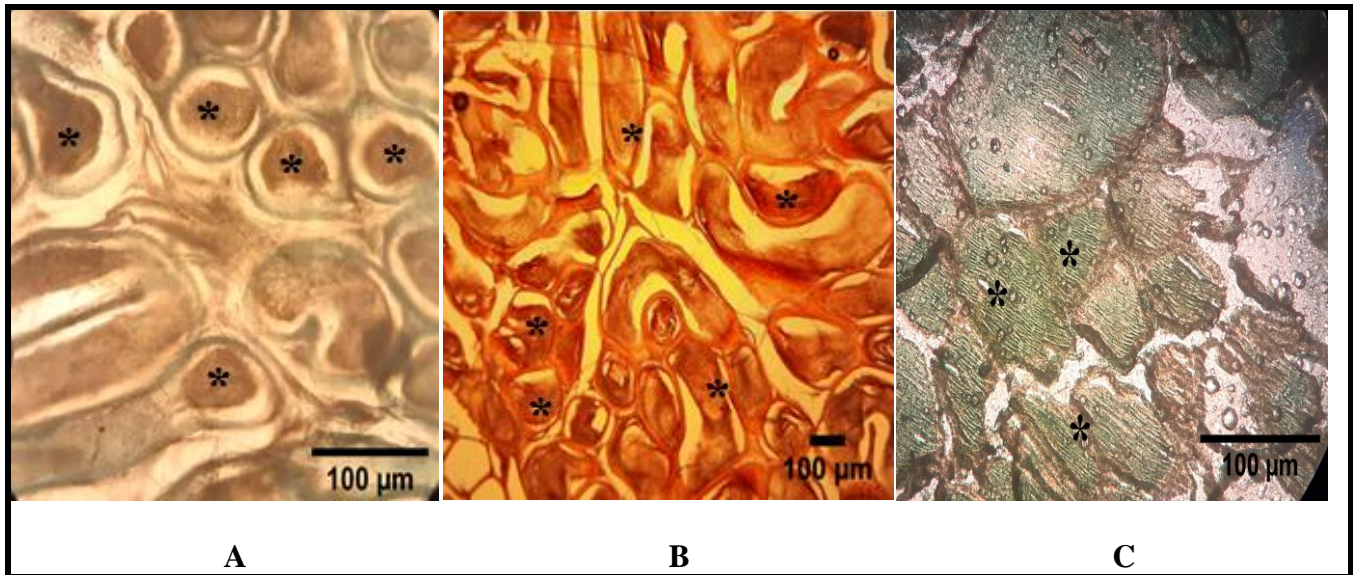


Figure 74. Observation microscopique des coupes histologiques des épididymes (A) ($G \times 400$), prostates (B) ($G \times 100$), et vésicules séminales (C) après coloration à l'Aluminon ($G \times 400$).

Une réaction positive (astérisque) à cet indicateur chez tous les groupes de rats expérimentaux (groupes Al, Al-EAC, EAC et T) suite à une possible interférence de cet indicateur avec d'autres éléments de traces métalliques tel que le Zn^{+2} qui est richement présent dans les sécrétions de ces organes.

12. Analyse statistique

L'ensemble des résultats numériques obtenus lors des deux parties de cette étude sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM (l'expérience reproduite 3 fois). Ces résultats sont analysés par le logiciel SigmaPlot 11.0 version Windows. La comparaison de deux moyennes est effectuée par un test t de Student. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (ANOVA) suivie par l'un des tests post-hoc suggérés par le logiciel (Student-Newman-Keuls, Bonferroni ou Tukey t-test). Ces tests sont utilisés pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance. Lors des expressions des résultats, des lettres sont utilisées pour indiquer l'existence ou pas de différence significative entre les différents groupes expérimentaux. Les groupes ne partageant pas une lettre commune (a-e) diffèrent significativement à $p < 0,05$.

12.1. Résultats de l'évaluation du potentiel antioxydant

Les résultats obtenus lors des analyses de l'évaluation du potentiel antioxydant de l'extrait de plante en utilisant le test de l'activité du piégeage des radicaux DPPH montrent, qu'après une comparaison de deux moyennes (EAC vs Vit-C) effectuée par un test t de Student, qu'il n'y a donc pas de différence statistiquement significative ($P = 0,076$). Alors que l'analyse des résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait EAC par réduction ferrique (FRAP) indique que la différence entre les valeurs moyennes des deux groupes (EAC vs Vit-C) est supérieure à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe donc une différence statistiquement significative entre les groupes ($P \leq 0,001$).

12.2. Résultats de l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire

Les résultats obtenus lors de l'analyse des données de l'étude de la capacité de l'extrait végétal à prévenir la dénaturation de l'albumine bovine indiquent, qu'après une comparaison de deux moyennes (EAC vs ASA) effectuée par un test t de Student, qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative ($P = 0,690$). Ceci témoigne du grand potentiel anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *C. longa L.*, identique à celui de l'aspirine, le médicament anti-inflammatoire le plus utilisé. Par contre, l'analyse des résultats de la capacité de l'EAC à prévenir la dénaturation de l'albumine d'œuf montrent l'existence d'une différence statistiquement significative entre la moyenne des deux groupes ($P \leq 0,001$).

12.3. l'évolution du poids pondéral, du gain corporel et de l'index de poids des organes sexuels

Les résultats de l'analyse statistique obtenus lors des analyses des données de l'évolution pondérale, du gain corporel et de l'index de poids des organes montrent que les différences entre les valeurs moyennes des groupes de traitement ne sont pas suffisamment importantes pour exclure la possibilité que la différence soit due à la variabilité de l'échantillonnage aléatoire ; Aucune différence statistiquement significative n'a été signalée pour l'évolution pondérale ($P = 0,425$), pour le gain de poids corporel ($P = 0,351$), ni pour l'index (poids relatif) des organes ($P = 0,974$).

12.4. Résultats de l'étude cytologique du sperme

Les résultats obtenus lors des analyses des résultats de la concentration (numération) spermatique montrent que les différences entre les valeurs médianes des groupes de traitement

sont supérieures à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe donc une différence statistiquement significative de $P \leq 0,001$ dans les résultats de concentration, la vitalité, et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes entre les différents groupes expérimentaux. Alors qu'aucune différence statistiquement significative ($P = 0,080$) n'a été signalée pour la morphologie des spermatozoïdes. Toutes les procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) sont présentées dans les tableaux suivants:

Tableau 15. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la concentration spermatique.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
T vs. AL	6,940	31,652	<0,001	Yes
T vs. AL-EAC	5,717	26,072	<0,001	Yes
T vs. EAC	2,217	10,110	<0,001	Yes
EAC vs. AL	4,723	21,542	<0,001	Yes
EAC vs. AL-EAC	3,500	15,963	<0,001	Yes
AL-EAC vs. AL	1,223	5,579	<0,001	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC: groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T: groupe témoin.

Tableau 16. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la vitalité spermatique.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
T vs. Al	65,333	27,206	<0,001	Yes
T vs. EAC	9,667	4,025	0,026	Yes
T vs. Al- EAC	9,000	3,748	0,016	Yes
Al- EAC vs. Al	56,333	23,459	<0,001	Yes
Al- EAC vs. EAC	0,667	0,278	0,846	No
EAC vs. Al	55,667	23,181	<0,001	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC: groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T: groupe témoin

Tableau 17. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats de la morphologie spermatique.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. EAC	30,713	14,442	<0,001	Yes
Al vs. T	29,713	13,972	<0,001	Yes
Al vs. AL- EAC	28,047	13,188	<0,001	Yes
AL- EAC vs. EAC	2,667	1,254	0,655	No
AL- EAC vs. T	1,667	0,784	0,586	Do Not Test
T vs. EAC	1,000	0,470	0,743	Do Not Test

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC: groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T: groupe témoin.

12.5. Résultats de l'étude du dosage hormonale

Les résultats obtenus lors des analyses hormonales du taux de FSH et de la testostérone indiquent que les différences entre les valeurs médianes des groupes de

traitement sont supérieures à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe une différence statistiquement significative de $P = 0,008$ et $P = 0,021$ pour l'analyse statistique des résultats de la FSH et de la testostérone respectivement. Alors qu'aucune différence significative ($P = 0,143$) n'est observée lors de l'analyse des résultats du taux de l'hormone LH. Pour isoler le ou les groupes qui diffèrent des autres, une procédure de comparaison multiple est utilisée. Toutes les procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) sont indiquées dans les tableaux ci-dessous:

Tableau 18. Comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) des résultats du dosage de la FSH.

Comparaison	Différence de rangs	q	P<0,05
EAC vs AI	76,000	4,388	Yes
EAC vs T	50,000	3,824	Yes
EAC vs AI- EAC	50,000	5,661	Yes
AI- EAC vs AI	26,000	1,988	No
AI-EAC vs T	0,000	0,000	Do Not Test
T vs AI	26,000	2,944	Do Not Test

Le résultat " Do Not Test " est obtenu pour une comparaison lorsqu'aucune différence significative n'est pas trouvée entre les deux sommes de rangs qui entourent cette comparaison.

Tableau 19. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du testostérone.

Comparaison	Différence de rangs	q	P<0,05
EAC vs AI	68,000	3,926	Yes
EAC vs T	12,000	0,918	No
EAC vs AI- EAC	8,000	0,906	Do Not Test
AI- EAC vs AI	60,000	4,588	Yes
AI- EAC vs T	4,000	0,453	Do Not Test
T vs AI	56,000	6,341	Yes

Le résultat " Do Not Test " est obtenu pour une comparaison lorsqu'aucune différence significative n'est pas trouvée entre les deux sommes de rangs qui entourent cette comparaison.

12.6. Résultats des dosages biochimiques

12.6.1. Résultats du dosage du malondialdéhyde tissulaire

Les résultats obtenus lors des analyses du dosage du MDA aux niveaux des différents tissus étudiés (testicule, épидидymes, prostate et vésicule séminale) indiquent que les différences entre les valeurs médianes des groupes de traitement sont supérieures à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe une différence statistiquement significative ($P \leq 0,001$). Pour isoler le ou les groupes qui diffèrent des autres, une procédure de comparaison multiple est utilisée. Toutes les procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) sont indiquées dans les tableaux ci-dessous:

Tableau 20. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA testiculaire

Comparaison	Différence de rangs	q	P<0,05
CUR vs AI	100,000	5,774	Yes
CUR vs T	64,000	4,894	Yes
CUR vs AI-CUR	20,000	2,265	No
AI-CUR vs AI	80,000	6,118	Yes
AI-CUR vs T	44,000	4,982	Yes
T vs AI	36,000	4,076	Yes

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

Tableau 21. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA épидидymaire.

Comparaison	Différence de rangs	q	P<0,05
AI vs CUR	94,000	5,427	Yes
AI vs T	86,000	6,577	Yes
AI vs AI-CUR	36,000	4,076	Yes
AI-CUR vs CUR	58,000	4,435	Yes
AI-CUR vs T	50,000	5,661	Yes
T vs CUR	8,000	0,906	No

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

Tableau 22. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA prostatique.

Comparaison	Différence de rangs	q	p	P<0,05
AI vs. AI-CUR	0,441	21,394	<0,001	Yes
AI vs. CUR	0,438	21,249	<0,001	Yes
AI vs. T	0,319	15,488	<0,001	Yes
T vs. AI-CUR	0,122	5,907	<0,001	Yes
T vs. CUR	0,119	5,761	0,001	Yes
CUR vs. AI-CUR	0,003	0,146	0,919	No

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

Tableau 23. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du MDA au niveau de la vésicule séminale.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
AI vs. CUR	0,891	22,457	<0,001	Yes
AI vs. T	0,496	12,497	<0,001	Yes
AI vs. AI-CUR	0,395	9,944	<0,001	Yes
AI-CUR vs. CUR	0,497	12,514	<0,001	Yes
AI-CUR vs. Con	0,101	2,553	0,086	No
T vs. CUR	0,395	9,961	<0,001	Yes

AI: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); AI-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

12.6.2. Résultats du dosage de la Catalase tissulaire

Les résultats obtenus lors des analyses du dosage de la CAT aux niveaux des différents tissus étudiés (testicule, épидидymes, prostate et vésicule séminale) montrent que les différences entre les valeurs médianes des groupes de traitement sont supérieures à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe une différence statistiquement significative de $P \leq 0,001$ pour les données issues de l'analyse de la CAT testiculaire et prostatique, et de $P = 0,027$ et $P = 0,004$ pour les résultats de la CAT épидидymaire et de la vésicule séminale respectivement. Pour isoler le ou les groupes qui diffèrent des autres, une procédure de comparaison multiple est effectuée. Toutes les procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) sont présentées dans les tableaux suivants:

Tableau 24. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage du CAT au niveau testiculaire

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs T	92,000	5,312		Yes
Al vs EAC	56,000	4,282		Yes
Al vs Al- EAC	4,000	0,453		No
Al- EAC vs T	88,000	6,730		Yes
Al- EAC vs EAC	52,000	5,888		Yes
EAC vs T	36,000	4,076		Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

Tableau 25. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau épидидymaire.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. EAC	18,425	4,056	0,043	Yes
Al vs. Al- EAC	16,912	3,723	0,041	Yes
Al vs. T	6,072	1,337	0,356	No
T vs. EAC	12,353	2,719	0,158	No
T vs. Al- EAC	10,840	2,386	0,107	Do Not Test
Al- EAC vs. EAC	1,513	0,333	0,816	Do Not Test

Le résultat " Do Not Test " est obtenu pour une comparaison lorsqu'aucune différence significative n'est trouvée entre les deux sommes de rangs qui entourent cette comparaison.

Tableau 26. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau de la prostate.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. Al- EAC	59,996	171,718	<0,001	Yes
Al vs. EAC	22,770	65,172	<0,001	Yes
Al vs. T	12,842	36,757	<0,001	Yes
T vs. Al- EAC	47,154	134,962	<0,001	Yes
T vs. EAC	9,928	28,416	<0,001	Yes
EAC vs. Al- EAC	37,226	106,546	<0,001	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin.

Tableau 27. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la CAT au niveau de la vésicule séminale.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. EAC	38,328	6,022	0,002	Yes
Al vs. Al- EAC	23,911	3,757	0,039	Yes
Al vs. T	16,258	2,554	0,086	No
T vs. EAC	22,070	3,468	0,059	No
T vs. Al- EAC	7,653	1,202	0,405	Do Not Test
Al- EAC vs. EAC	14,417	2,265	0,125	Do Not Test

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin

12.6.3. Résultats du dosage du superoxyde dismutase tissulaire

Les résultats obtenus lors des analyses du dosage de la SOD aux niveaux des différents tissus étudiés (testicule, épидидymes, prostate et vésicule séminale) montrent que les différences entre les valeurs médianes des groupes de traitement sont supérieures à ce que l'on pourrait attendre du hasard ; il existe une différence statistiquement significative de $P \leq 0,001$ pour les données issues de l'analyse de la SOD testiculaire, épидидymaire, prostatique et de la vésicule séminale. Toutes les procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Student-Newman-Keuls) sont présentées dans les tableaux suivants:

Tableau 28. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau testiculaire.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al- EAC vs. T	1,993	20,889	<0,001	Yes
Al- EAC vs. EAC	0,813	8,523	<0,001	Yes
Al- EAC vs. Al	0,0567	0,594	0,679	No
Al vs. T	1,937	20,296	<0,001	Yes
Al vs. EAC	0,757	7,930	<0,001	Yes
EAC vs. T	1,180	12,366	<0,001	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin

Tableau 29. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau epididymaire

Comparaison	Différence de rangs	q	P<0,05
Al vs Al- EAC	100,000	5,774	Yes
Al vs EAC	80,000	6,118	Yes
Al vs T	36,000	4,076	Yes
T vs Al- EAC	64,000	4,894	Yes
T vs EAC	44,000	4,982	Yes
EAC vs Al- EAC	20,000	2,265	No

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin

Tableau 30. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau prostatique.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. T	7,220	35,919	<0,001	Yes
Al vs. EAC	2,950	14,676	<0,001	Yes
Al vs. Al- EAC	2,800	13,930	<0,001	Yes
Al- EAC vs. T	4,420	21,989	<0,001	Yes
Al- EAC vs. EAC	0,150	0,746	0,604	No
EAC vs. T	4,270	21,243	<0,001	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin

Tableau 31. Comparaison multiple par paires (méthode de S-N-K) des résultats du dosage de la SOD au niveau de la vésicule séminale.

Comparaison	Différence de rangs	q	P	P<0,05
Al vs. T	3,777	25,499	<0,001	Yes
Al vs. EAC	3,211	21,678	<0,001	Yes
Al vs. Al- EAC	0,560	3,779	0,015	Yes
Al- EAC vs. T	3,217	21,720	<0,001	Yes
Al- EAC vs. EAC	2,651	17,899	<0,001	Yes
EAC vs. T	0,566	3,821	0,014	Yes

Al: groupe exposé au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$); Al-EAC : groupe traité simultanément avec l' $AlCl_3$ et l'EAC; EAC: groupe traité seulement avec l'extrait de curcuma; T : groupe témoin

Discussion

Les résultats de la présente étude ont révélé qu'une exposition subaiguë à 34 mg/kg p.c. de chlorure d'aluminium pendant 30 jours a entraîné de nombreux dysfonctionnements physiologiques et histologiques, à savoir une perte de gain corporel, une diminution de la qualité du sperme, des troubles hormonaux et des anomalies histologiques.

En effet, les métaux peuvent provoquer l'infertilité masculine en affectant la spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes. Des preuves solides confirment que l'infertilité masculine chez les humains exposés aux métaux est médiée par divers mécanismes telle que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jamalan *et al.*, 2016).

D'un autre côté, et en raison de leurs multiples propriétés thérapeutiques, telles que les activités antioxydantes et anti-inflammatoires, les composés phénoliques végétaux font l'objet d'une attention accrue ces dernières années.

Dans ce contexte, l'objectif de cette présente étude était d'une part, consacré à l'étude phytochimique d'un extrait aqueux de *curcuma longa L* (EAC), une plante connue pour ses multiples bienfaits sur la santé humaine, par des dosages biochimiques et d'analyse chromatographique, et aussi par l'optimisation de ses pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires. D'autre part, grâce à une deuxième partie consacrée à l'étude expérimentale *in vivo* réalisée sur le rat *Wistar* qui comprend une évaluation de la qualité du sperme, le dosage sérique des hormones sexuelles, l'estimation du degré du stress oxydatif tissulaire par dosage de certains marqueurs et enzymes relatifs au stress oxydatif, et une étude histologique et histochimique pour évaluer la structure des gonades mâles et des glandes sexuels annexes.

L'analyse de nos résultats montrent que les teneurs en composés phénoliques totaux ($26,63 \pm 0,06$ mg GAE/g DR), en flavonoïdes ($17,56 \pm 0,77$ mg CE/g DR) et en tanins condensés ($41,59 \pm 0,62$ mg CE/g DR) de l'extrait aqueux de *C. longa L* étaient plus élevés que ceux rapportés par Tanvir *et al.*, (2007) utilisant plusieurs variétés de curcuma récoltées au Bangladesh avec des valeurs de $16,07 \pm 0,30$ mg GAE/g DR, $9,66 \pm 0,042$ et $11,78 \pm 0,211$ mg CE/g DR, pour les phénoliques totaux, les flavonoïdes, et les tanins respectivement. Par contre, dans une autre étude, Akinola *et al.*, (2014) ont déterminé les contenus phénoliques et flavonoïdes des extraits de *C. longa* et *C. xanthorrhiza* en utilisant le méthanol comme solvant et ils ont trouvé que les deux extraits ont donné des valeurs très élevées par rapport aux nôtres de flavonoïdes ($741.36 \text{mg}/\text{NGN}/\text{g DW}$ et $220.53 \text{mg}/\text{NGN}/\text{g DW}$), d'acide phénolique ($42.71 \text{mg}/\text{GAE}/\text{g DW}$ et $22.03 \text{mg}/\text{GAE}/\text{g DW}$) et de polyphénols ($39.38 \text{mg}/\text{GAE}/\text{g DW}$ et $38.01 \text{mg}/\text{GAE}/\text{g DW}$) respectivement. En réalité, le contenu des

composés phénoliques et des flavonoïdes varie en fonction de l'organe végétal, de l'espèce étudiée et de la méthode d'extraction par solvant utilisée (Djebaili *et* Zellagui, 2013). Selon Dai *et* Mumper, (2010), le volume et le taux de polyphénols sont fortement affectés par la méthode d'extraction et par les solvants utilisés. Des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et leurs mélanges sont largement utilisés pour extraire les composés phénoliques des plantes en général. En outre, les méthodes à base d'eau comme solvant d'extraction sont particulièrement prometteuses car l'eau est un solvant bon marché, sûr et abondant et l'utilisation de solvants organiques toxiques (Flórez *et al.*, 2015).

Les trois principaux composés actifs (curcumine, déméthoxycurcumine et bisdéméthoxycurcumine) et les autres composés coexistants dans l'EAC ont été complètement séparés avec un temps de d'élution de 15 min dans les conditions optimales décrites dans la section matériels et méthodes, comme le montrent les pics du chromatogramme d'HPLC (voir section résultats page). À partir des surfaces de pics obtenues, la proportion de curcumine, de déméthoxycurcumine et de bisdéméthoxycurcumine s'est avérée être de 4,92, 5,12 et 2,39 %, respectivement. Ces composés curcuminoïdes ont été d'emblée détectées grâce à la détermination de l'absorption maximale (λ max) à 470 nm comparée aux résultats trouvés dans la littérature qui indiquent des spectres d'absorption maximale des curcuminoïdes allant de 425 à 493 nm (Khumsupan *et al.*, 2011 ; Sathishkumar *et al.*, 2015), et grâce à leur séparation par CCM en utilisant le système de solvant méthanol : chloroforme (90 : 10) comme phase mobile, et dont les valeurs de Rf étaient de 0.95, 0.71, et 0.55, pour la curcumine (C), déméthoxycurcumine (DMC), bisdéméthoxycurcumine (BDMC) respectivement, et qui s'avèrent similaires aux valeurs de RF rapportées dans la littérature (Sarwal *et al.*, 2017).

Les radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène sont fortement liés à la peroxydation des lipides, à la détérioration des aliments et à divers troubles métaboliques et maladies (Lobo *et al.*; Liu *et al.*, 2017). Les propriétés redox des composés phénoliques, qui peuvent jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres, l'extinction de l'oxygène singlet et triplet et la décomposition des peroxydes, sont principalement responsables de leur fonction antioxydante (Cantin *et al.*, 2009; Arora *et* Chandra 2011). Dans cette étude, l'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la capacité antioxydante totale (TAC), la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH et l'évaluation du pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP). Les résultats ont révélé que *C. longa L.* a enregistré $36,55 \pm 0,01$ mg GAE/g DS de TAC, a montré une capacité significative à inhiber le radical

DPPH (IC₅₀=5,58±0,14 mg/mL), et à réduire le fer (EC₅₀=3,46±0,11 mg/mL). Les résultats obtenus indiquent que l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH peut être attribuée à la teneur élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes ayant un pouvoir réducteur plus élevé (Denre, 2014). Widowati *et al.*, (2011) ont rapporté des données similaires avec des valeurs de IC₅₀ de 5,99 mg/mL du curcuma du Bengale occidental (en Inde) tandis que le curcuma d'Indonésie a montré des valeurs de CI₅₀ plus élevées (8,33 mg/mL) par rapport à la curcumine pure (7,85 mg/mL) utilisée dans la même étude. Le test FRAP mesure le potentiel antioxydant des échantillons par la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) (Zhong *et Shahidi* 2015). Ce test est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel et peut être appliqué aux plantes ainsi qu'aux plasmas et aux extraits inorganiques et aqueux (Li *et al.*, 2008). La présence d'agents réducteurs dans les extraits de plantes entraîne la réduction du complexe Fe³⁺/ferricyanure à la forme ferreuse Fe²⁺. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en suivant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002). En d'autres termes, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité nécessaire à la détermination "semi-quantitative" des concentrations de polyphénols, qui participent à la réaction d'oxydoréduction (Amarowicz *et al.*, 2004). Le bio-essai d'un complexe phosphate vert/Mo-1 a été utilisé pour déterminer le potentiel antioxydant total (Jan *et al.*, 2013). La curcumine peut diminuer les niveaux de MDA et augmenter la capacité antioxydante totale (Jakubczyk *et al.*, 2020). Les résultats d'une étude montrent que pour le TAC (capacité antioxydante totale) et le TOC (capacité oxydante totale) dans des échantillons de sang, l'alimentation supplémentée en curcumine (300 mg/kg/jour de curcumine dissoute dans de l'huile de maïs par gavage oral pendant 12 jours) montrait un niveau significativement (P <0,05) plus élevé par rapport au contrôle. Ces résultats confirment que la curcumine renforce le système de défense antioxydant (Konak *et Şener*, 2019).

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine étudie la capacité d'un agent anti-inflammatoire à empêcher la dénaturation thermique des protéines (Chandra *et al.*, 2012). La dénaturation des protéines, qui se produit à la suite d'une lésion tissulaire, produit des motifs moléculaires associés aux dommages, communément appelés DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) (Rubartelli *et Lotze*, 2007). Ces DAMP sont reconnus par les récepteurs scavenger (SR) et l'association des DAMPs avec les SRs conduit à l'activation de médiateurs inflammatoires telles que les cytokines et propage l'inflammation (Brown, 2007). Dans notre étude, l'extrait aqueux de *C. longa L.* a parfaitement réussi à prévenir la dénaturation de

l'albumine causée par la chaleur. Les résultats montrent qu'à la concentration de 5000 µg/mL, une inhibition maximale de la dénaturation de la protéine d'œuf de 78.88 ± 0.53 % avec une $IC_{50} = 240,30 \pm 5,70$ µg/mL, et une inhibition maximale de la dénaturation de la protéine BSA de 90.51 ± 0.29 avec une $IC_{50} = 4,97 \pm 0,33$ µg/mL ont été observées, comparativement à l'aspirine ou l'acide acétylsalicylique (ASA), le médicament anti-inflammatoire le plus populaire, qui a montré une inhibition maximale de 88.8 ± 0.28 % et 95.37 ± 0.23 % à une concentration de 1000 µg/mL avec des IC_{50} estimés à $7.66 \pm 0,54$ µg/ml et 162.51 ± 8.23 µg/ml, pour la protéine d'œuf et BSA respectivement. Ce qui prouve que l'effet de notre extrait a parfaitement dépassé celui de l'ASA concernant la protection de la dénaturation thermique de la protéine BSA avec une concentration inhibitrice médiane inférieure de 40 fois celle du médicament standard. Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Paw *et al.*, (2020) qui indiquent que l'huile essentielle de rhizome de *Curcuma caesia Roxb*, collectée dans le Nord-Est de l'Inde, a montré une activité anti-inflammatoire de $IC_{50} = 121,7 \pm 0,0013$ µg/mL vis-à-vis de la dénaturation de la protéine BSA. Tandis que, l'activité anti-inflammatoire des nanoparticules d'argent médiées par l'huile de *C. longa L.* a montré une activité maximale à 150 µg/mL et s'est avérée supérieure à celle du diclofénac sodique standard (Das *et al.*, 2019) mais, qui reste tout de même inférieur à nos résultats. Cependant, le mécanisme par lequel la curcumine produit ses propriétés anti-inflammatoires est encore mal connu. Le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR-) a été lié aux effets anti-inflammatoires (Landreth *et Heneka*, 2001). Une étude menée par Jacob *et al.*, (2008) souligne l'importance de la curcumine en tant qu'agent anti-inflammatoire et suggère que l'effet bénéfique de la curcumine est médié par l'activation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes- γ (PPAR- γ). La curcumine inhibe la cyclooxygénase 2 (COX-2), l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la lipoxygénase, qui sont des enzymes pro-inflammatoires. Les processus inflammatoires sont médiés par des enzymes essentielles telles que les iNOS, LOX et COX (Wal *et al.*, 2019).

La deuxième partie de l'étude, consacrée à l'expérimentation animale, a révélé que l'administration d' $AlCl_3$ à la dose de 34 mg/kg p.c. à des rats mâles pendant 4 semaines a conduit à une diminution du poids corporel et à l'apparition de nombreux troubles, notamment une déplétion hormonale, une induction de l'apoptose, une augmentation des cellules pro-inflammatoires (mastocytes) et une augmentation significative des marqueurs de stress oxydatif des tissus (MDA, CAT et SOD). Une diminution significative du poids corporel a été enregistrée dès la deuxième semaine d'exposition à l' $AlCl_3$. Mais, aucune diminution

significative n'a été montrée après le calcul de l'indice d'organe (poids relatif). Ces résultats sont en accord avec ceux de Balgoon, (2019), qui a montré que l'administration de 10 mg/kg d' AlCl_3 pendant 8 semaines a provoqué une réduction significative ($p < 0,001$) du gain de poids des rats ($7,67 \pm 2,87$ g) par rapport au contrôle ($92,00 \pm 18,61$ g). Une autre étude menée par Lahouel *et al.*, (2020) a montré qu'une dose intrapéritonéale hebdomadaire d'aluminium de 60 mg/kg pendant 6 à 12 semaines a montré des changements intenses dans le temps du poids du corps et du cerveau, ils ont suggéré que ces diminutions pourraient être attribuées à l'interaction de l'Al avec le statut hormonal et/ou la synthèse des protéines. Nos résultats sont en accord avec ceux de Wal *et al.*, (2019) qui ont montré une diminution significative du poids corporel des rats après une exposition pendant 45 jours à une dose non létale d' AlCl_3 . Cette perte de poids corporel peut être expliquée par les effets de ce métal toxique qui contribue à altérer divers aspects du métabolisme, par exemple en se substituant aux micronutriments essentiels et aux éléments de traces métalliques vitaux. Il est concevable que la carence en métal essentiel comme le zinc diminue l'adiposité chez les humains et les modèles de rongeurs (Padilla *et al.*, 2010). Les métaux lourds constituent un groupe hétérogène de substances hautement réactives, qui peuvent agir comme cofacteurs essentiels pour les processus physiologiques et/ou comme éléments toxiques, mais, le facteur d'unification dans la détermination de la toxicité des métaux est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (Valko *et al.*, 2005). Les métaux toxiques peuvent également altérer la fonction thyroïdienne chez certains individus et induire une perte de poids (Hyman, 2007)

De plus, les résultats de l'étude actuelle indiquent que l'administration d' AlCl_3 a significativement diminué les niveaux de testostérone sérique par rapport aux rats témoins. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Sun *et al.*, (2011) qui ont remarqué une diminution significative des niveaux de testostérone, d'hormone folliculo-stimulante (FSH) et d'hormone lutéinisante (LH) après 120 jours d'exposition à trois doses respectives (64,18, 128,36 et 256,72 mg/kg) d'Al et expliquent que ce métal interfère avec les expressions des récepteurs androgènes dans les testicules. Un autre travail de recherche effectué par Deaibil *et al.*, (2020) indique que l' AlCl_3 a provoqué une diminution significative de la FSH, de la LH et de la testostérone et a induit le développement d'une oligospermie et de tubules exfoliés dans le testicule. Les auteurs ont remarqué une diminution significative des hormones testostérone et LH après 60 jours d'administration d' AlCl_3 (20 mg /kg p.c), ils indiquent également que l'aluminium nuit à la stéroïdogénèse en augmentant la production d'oxyde nitrique qui

pourrait inhiber à son les niveaux de LH. Sachant que l'hormone testostérone est libérée des cellules de Leydig par la stimulation de la LH, sa réduction entraîne une baisse de la concentration de testostérone sérique (Al-Eisa *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'analyse du sperme a montré une diminution significative du nombre de spermatozoïdes, de leur viabilité et une augmentation du taux d'anomalies morphologique des spermatozoïdes chez les rats exposés à l'Al par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Abdul-Rasoul *et al.*, (2009), qui ont révélé qu'une administration quotidienne de chlorure d'aluminium à deux doses de 40 et 80 mg/kg p.c a induit une réduction significative de la concentration des spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes vivants, associée à une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes anormaux. Une autre recherche menée par Martinez *et al.*, (2017), a révélé que l'exposition à l'aluminium pendant 60 jours à des doses de niveaux alimentaires humains (1,5, 8,3 et 100 mg/kg p.c./jour) affecte la qualité du sperme chez les rats en diminuant le nombre de spermatozoïdes, leur motilité et leur morphologie, avec une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation dans les organes reproducteurs. Ils ont également constaté qu'une faible concentration d'Al (3,35 µg/g) dans les testicules est suffisante pour altérer la spermatogenèse. Miska-Schramm *et al.*, (2017), en utilisant le Campagnol roussâtre (*Myodes Glareolus*) comme modèle de rongeur, ont indiqué que l'AlCl₃, à une dose de 3 et 200 mg/L, altèrent les capacités de reproduction des adultes en diminuant la qualité et la quantité des spermatozoïdes et en provoquant un développement morphologiquement anormal des gonades. De même, Guo *et al.*, (2005) ont indiqué que l'exposition à l'aluminium entraîne une augmentation des produits d'oxyde nitrique (NO) qui étaient responsables de la toxicité reproductive induite par l'Al. Zhu *et al.*, (2014) ont suggéré que l'exposition subchronique à l'AlCl₃ perturbe l'équilibre des oligo-éléments et diminue la spermatogenèse et les activités enzymatiques testiculaires, ce qui a des effets néfastes sur la fonction testiculaire des rats mâles. Nous constatons également que l'AlCl₃ affecte l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes révélée par l'augmentation du pourcentage de fragmentation d'ADN.

Les métaux lourds peuvent provoquer l'infertilité masculine en affectant la spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes. Des preuves solides confirment que l'infertilité masculine chez les humains exposés aux métaux est médiée par divers mécanismes tels que la production ROS (Jamalan *et al.*, 2016). D'autre part, les résultats de l'étude actuelle indiquent que l'administration d'AlCl₃ a significativement diminué la testostérone sérique et a augmenté les niveaux de LH par rapport aux rats témoins. Ces résultats sont cohérents avec

ceux de Sun *et al.*, (2011), qui ont remarqué une diminution significative des niveaux de testostérone, d'FSH et de LH après 120 jours d'exposition à trois doses (64,18, 128,36 et 256,72 mg/kg) d'aluminium et expliquent que l'exposition à l'Al interfère avec les expressions des récepteurs androgènes dans les testicules. Un autre travail a indiqué que l' $AlCl_3$ a provoqué une diminution significative de la FSH, de la LH et de la testostérone, et a provoqué le développement d'une oligospermie et de tubules exfoliés dans le testicule (Al-Eisa *et Al-Nahari*, 2017). Sachant que, l'hormone testostérone est libérée des cellules de Leydig par la stimulation de la LH, sa réduction entraîne la baisse de la concentration de testostérone sérique. En outre, notre étude a montré que l'exposition à l'Al a provoqué une élévation des niveaux de MDA et de CAT par rapport au groupe témoin. Nos résultats confirment ceux d'Akayet *et al.*, (2016) qui ont conclu qu'une exposition sub-chronique à l'Al (75 mg/kg/jour pendant 30 jours) entraîne une diminution significative sur les enzymes antioxydantes telles que la SOD et la GPx, et une augmentation significative des niveaux de MDA par rapport au groupe témoin. Ce déséquilibre entre le système antioxydant et les oxydants conduit à un stress oxydatif qui a un effet destructeur sur le testicule. Les travaux d'Afolabi *et al.*, (2018) sur le phosphore d'aluminium, indiquent que l'administration orale d'Al (1,15mg/kg) pendant 30 jours a entraîné une augmentation significative des niveaux de MDA et de protéines oxydées dans les testicules avec une diminution des enzymes antioxydantes telles que SOD, CAT et GPx suivie d'une réduction significative des antioxydants non enzymatiques. Tandis que, l'observation des coupes histologiques du groupe exposé à l' $AlCl_3$ montre la dégénérescence des tubules séminifères et la raréfaction des spermatozoïdes dans la lumière séminifère, avec de grands espaces interstitiels et l'absence de cellules de Lydig autour des membranes basales. Ces résultats suivent ceux obtenus par Moselhy *et al.*, (2012) qui ont démontré après l'examen histopathologique de testicules de rats exposés à une dose quotidienne (34 mg/kg) de $AlCl_3$ pendant 60 jours, a révélé des changements dégénératifs dans les tubules séminifères avec des cellules spermatogènes nécrosées.

En outre, notre résultat a montré que l'Al a provoqué dans le tissu épидидymaire une désorganisation de l'épithélium, et une augmentation des cellules apoptotiques en raison du faible niveau de testostérone et d'un état inflammatoire révélé par l'infiltration leucocytaire. Ces résultats concordent avec ceux de Mesole *et al.*, (2020) qui ont montré que l'exposition à l' $AlCl_3$ entraînait une élévation significative ($p < 0,01$) des niveaux d'oxyde nitrique et de 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), augmentait l'activité de la caspase-3, du niveau de la protéine pro apoptotique Bax et réduisait les niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, et

réduisait significativement les niveaux de SOD et GPx ($p < 0,01$). Alors que, l'examen histopathologique des souris exposées à l' AlCl_3 (2 mg/kg b.w) pendant 3 mois a montré une dégénérescence des cellules de la spermatogènes dans les tubules séminifères des testicules avec la formation de cellules spermatides géantes à l'intérieur de la lumière avec une inflammation interstitielle (Manal *et al.*, 2017).

De plus, l'examen histopathologique a révélé de multiples anomalies, notamment une réduction de la taille des acini, une atténuation de la membrane de la muqueuse épithéliale, une altération de la sécrétion alvéolaire et une dégénérescence stromale. da Silva *et al.*, (2020) ont indiqué que chez les gerbilles mâles adultes, la toxicité de l'aluminium provoque des dommages histopathologiques et pro-oxydants au niveau de la prostate et des gonades. Une autre étude, axée sur la prostatite chronique et le syndrome de douleur pelvienne chronique a révélé après des analyses histopathologiques des lésions de la prostate chez les rats suite à de fortes concentrations d'hydroxyde d'aluminium avec également une expression plus élevée du facteur de nécrose ($\text{TNF-}\alpha$) et des IgG (Qi *et al.*, 2012). En outre, l'induction de l'apoptose par l'Al révélée dans notre étude confirme les résultats de plusieurs récentes recherches. Qin *et al.*, (2020), en utilisant des analyses cytométriques (utilisées pour évaluer les processus apoptotiques) et des analyses PCR quantitative en temps réel et ELISA (réalisées pour mesurer les niveaux d'expression de l'ARNm et des protéines caspases) indiquent que l'exposition à long terme à l'aluminium provoque l'apoptose des neurones de l'hippocampe, des dommages à la plasticité synaptique et des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. En outre, d'autres chercheurs ont constaté que les expositions prolongées à l'aluminium (1 mM) provoquaient la dégénérescence des astrocytes par induction du processus d'apoptose et entraînaient la mort des neurones (Suárez-Fernández *et al.*, 1999). Selon les constatations de Zhou *et al.*, (2021) l'Al pourrait s'accumuler dans les tissus du myocarde et causer des dommages aux cardiomyocytes. Il pourrait également causer des dommages dus au stress oxydatif dans ce tissu en augmentant les niveaux de MDA, ainsi que déclencher l'apoptose dans les cardiomyocytes en activant les protéines pro-apoptotiques caspase-3 et Bax et en diminuant la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Il est clair que l'induction de l'apoptose est fortement corrélée à l'induction du stress oxydatif. Nos résultats consolident l'hypothèse du stress oxydatif causé par l'aluminium, prouvée par de nombreuses recherches antérieures. Une augmentation significative du MDA testiculaire a été observée après 30 jours d'exposition orale au phosphore d'aluminium (PAI) (1,15 mg/kg) (Afolabi *et al.*, 2018). Halvaei *et al.*, (2017), affirment que l'induction du stress oxydatif est l'un des mécanismes les plus

importants de l'intoxication aiguë par le PAI. Aussi, l'induction de l'apoptose était accompagnée d'une infiltration de mastocytes (MCs). Les MCs sont des cellules inflammatoires qui contiennent, entre autres, des protéases, des facteurs angiogéniques et des cytokines. La survie, la croissance et la différenciation des cellules ainsi que l'expression de la cyclooxygénase-2 sont toutes induites par l'augmentation des cytokines (Wang *et al.*, 2004). Il a été également découvert par Huang *et al.*, (2008) que les mastocytes inhibaient l'apoptose des cellules tumorales en sécrétant des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF. Les MCs sont également considérées comme les principaux régulateurs des maladies inflammatoires, car elles jouent un rôle important dans la croissance de nombreuses tumeurs, y compris le cancer de la prostate (Taverna *et al.*, 2013).

D'autre part, le traitement concomitant avec le EAC à une dose de 200 mg/kg p.c a permis une amélioration du gain de poids corporel, une augmentation du niveau de testostérone, et une réduction des cellules apoptotiques, et de l'infiltration des mastocytes. Cependant, diverses études ont montré que *C. longa* avait un large éventail d'effets biologiques, notamment anti-inflammatoires, antioxydants et anticarcinogènes (Verma *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2019). Sood *et al.*, (2011) concluent que la curcumine est prometteuse en tant qu'agent pouvant potentiellement atténuer les effets toxiques induits par l'aluminium dans le cerveau en minimisant le stress oxydatif, comme le démontre l'hypoxie dans les observations histologiques et le dysfonctionnement mitochondrial. En plus de l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de *C. longa* prouvés, les recherches menées par Beneduci *et al.*, (2019), rapportent que la curcumine a un effet chélateur sur certains métaux comme le fer et l'aluminium, et il a été constaté que l'Al se lie à la fraction céto-énol de la curcumine, tandis que le Fer se lie à celle du gaiacol (2-méthoxyphénol). Dans un modèle de neurotoxicité induite par le chlorure d'aluminium chez la drosophile melanogaster, les régimes alimentaires supplémentés en curcumine ont montré un effet protecteur et peuvent être utilisés comme thérapie pour la toxicité induite par l'AlCl₃ (Oyetayo *et al.*, 2020). Une atténuation globale significative des marqueurs inflammatoires, ainsi qu'une diminution des médiateurs amyloïdogènes ont été observées chez des rats traités avec du resvératrol-curcumine (Zaky *et al.*, 2017).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que le traitement à base d'extrait aqueux de *Curcuma longa* en concomitance une heure au préalable de l'exposition à l'AlCl₃ a conduit à une amélioration significative de certains paramètres du sperme avec une augmentation significative de la testostérone sérique et une diminution du niveau de MDA. De plus,

l'analyse histologique a montré une régénération significative de la majorité des tubules séminifères et des cellules interstitielles, avec un bon développement de la spermatogenèse indiqué par les lumières des tubes séminifères remplies de spermatozoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Cheraghi *et al.*, (2017) qui ont conclu que la curcumine, le principal constituant de *Curcuma longa* a inversé de manière significative les effets néfastes de l'Al sur le testicule et la qualité du sperme et expliquent que la curcumine présente des effets protecteurs contre les dommages oxydatifs en diminuant les niveaux de radicaux libres, grâce à son activité de piégeage des radicaux libres, en particulier contre les radicaux oxygénés, qui inhibent l'oxydation des groupes sulfhydryles (SH). La curcumine inhibe également l'activité du facteur nucléaire kappa B (NF-kB), la cyclooxygénase-2 (COX-2) et l'expression de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK), tandis qu'elle module la libération de plusieurs cytokines et les activités enzymatiques testiculaires et l'expression de l'ARNm des 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénases (17 β -HSD). En outre, Belhan *et al.*, (2017) ont confirmé l'effet protecteur de la curcumine et ont indiqué que la curcumine à faible dose (10 mg/kg) a augmenté significativement la motilité et la concentration des spermatozoïdes, et a diminué le pourcentage de spermatozoïdes anormaux avec une suppression significative du profil lipidique et une augmentation des niveaux de testostérone. Également, pour évaluer l'effet protecteur de la curcumine sur la reprotoxicité induite par l'acétate de plomb (50 mg/kg p.c). Sudjarwo et Giftania, (2017) ont constaté que l'administration orale quotidienne de curcumine à trois doses différentes (100, 200 et 400 mg/kg) pendant 40 jours à des rats a amélioré de manière significative la structure histopathologique des testicules, a augmenté le nombre de spermatozoïdes, la motilité, la viabilité, et a également augmenté de manière significative la SOD, la GPx, et a diminué la MDA dans les testicules des rats traités à l'acétate de plomb. Ils ont conclu que la co-administration de curcumine à une dose de 400 mg/kg réduisait les effets de la toxicité testiculaire induite par l'acétate de plomb, probablement en inhibant le processus médié par les radicaux libres. En plus, de l'effet protecteur de *C. longa* sur la fonction de reproduction masculine, une récente étude a montré également que l'extrait éthanolique de *C. longa* (100 mg/kg p.c) a pu prévenir avec succès la toxicité reproductive induite par le bisphénol chez les rats femelles (Benalia *et al.*, 2017). D'autres chercheurs ont également démontré que le *Curcuma longa* possède des effets cytoprotecteurs sur l'histoarchitecture des testicules chez les rats diabétiques (Olanrewaju *et al.*, 2017). En étudiant les effets de différentes doses de curcumine 25, 50 et 100 mg/kg pendant 14 jours sur l'indice de poids des organes reproducteurs, l'histopathologie testiculaire et l'apoptose chez la souris, Taba *et al.*, (2019) ont indiqué que la supplémentation en

curcumine (2 semaines, 100 mg / kg) induit une amélioration des marqueurs biochimiques et des paramètres spermatiques ainsi qu'une réduction de l'apoptose dans le tissu testiculaire.

Conclusion & Perspectives

Ce travail de recherche avait pour but d'évaluer les effets de l'exposition subaiguë à l'aluminium sur les fonctions testiculaires endocrine et exocrine ainsi que sur les fonctions des autres organes sexuels (épididymes) et glandes annexes (prostates et vésicules séminales) du rat mâle Wistar, et de démontrer l'efficacité du traitement à base d'extraits aqueux de *Curcuma longa L.* sur les dommages causés par ce métal.

Les résultats obtenus ont mis en exergue les effets délétères de l'Al sur le système reproducteur mâle.

D'après ces résultats, l'exposition subaiguë à l'Al s'avère délétère sur la santé de l'Homme et de l'animale vu qu'il est impliqué dans le déséquilibre de la balance oxydative conduisant à un stress oxydatif accru mis en évidence par de fortes concentrations de produits de la peroxydation lipidique tel que le MDA, ainsi que par une augmentation significative des enzymes antioxydantes telle que la SOD et la CAT.

Cette peroxydation lipidique aurait pour corollaire les altérations de la membrane plasmique cellulaire y compris celles des spermatozoïdes. De même, l'examen des données spermiologiques a révélé une réduction de tous les paramètres spermatiques à savoir la concentration, la vitalité, et la morphologie, ainsi qu'une augmentation du taux de fragmentation d'ADN spermatique.

Par ailleurs, le dosage des hormones sexuelles (Testosterone, LH et FSH) a révélé un déséquilibre dans la production de ces hormones ce qui confirme également qu'en plus des effets reprotoxique directes de l'Al sur les gonades mâles, ce métal peut agir aussi sur l'axe hypothalamo-hypophysaire par un déséquilibre de sécrétion des gonadotrophines et de la testostérone.

De même, L'analyse histologique et histochimique confirment les résultats précédemment avancés. En effet, l'exposition subaiguë à l'Al affecte les cellules de Leydig, ce qui entraîne une diminution du taux de testostérone et une augmentation du taux de LH en réponse à l'interruption de la rétroaction négative de la testostérone. Le faible niveau de testostérone affecte la spermatogenèse et provoque l'apparition de multiples anomalies histologiques et d'un état apoptotique au niveau des épithéliums des différents organes étudiés (gonades et glandes annexes) étant donné que ces derniers sont des organes androgéniques dépendants. Un déclenchement d'une réaction inflammatoire fait suite en réponse à l'augmentation du taux d'apoptose dans les différents tissus étudiés marquée par une

infiltration importante des cellules immunitaires spécialisées tels que les mastocyte, neutrophile et lymphocytes.

Une coloration spécifique brune à l'Aluminon a aussi permis de localiser une forte accumulation de ce métal aux niveaux tissulaires.

Au regard de ce qui précède, l'hypofertilité des rats Wistar observée au cours de cette étude serait imputable à l'exposition à ce métal.

Par ailleurs, on a remarqué que ces différentes perturbations causées par ce métal ont été corrigées par la co-administration d'un extrait aqueux à base de *Curcuma longa L* à l' $AlCl_3$. Ce qui est traduit par son pouvoir régulateurs des différents métabolismes due à ses propriétés anti-inflammatoires, à son pouvoir antioxydant protecteur des membranes contre l'attaque radicalaire et à la diminution de la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines au niveau tissulaire.

En conclusion, ce travail a permis d'évaluer l'efficacité de *Curcuma longa L* sur le rétablissement des effets toxiques induits par l'Al aux niveaux des différents organes sexuels étudiés.

A la lumière de ces résultats obtenus forts intéressants : il serait envisageable d'entreprendre et de poursuivre un protocole expérimental plus approfondi portant sur différents volets.

- L'élargissement de la période du traitement par les extraits de *Curcuma longa* pour une plus grande efficacité dans les tissus qui nécessitent une période de récupération plus longue.
- Il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expérimentations portant sur la définition des rôles de chaque constituant de ces extraits à rétablir les dommages induits par ce métal.
- Tester de nouvelles approches thérapeutiques pour augmenter la biodisponibilité et éventuellement l'efficacité des composés curcuminoïdes par le biais d'encapsulation sous forme liposome ou grâce aux techniques de nanotechnologie, afin de permettre le passage de ses composés actifs à travers les barrières physiologiques telles que la barrière hémato-encéphalique ou hémato-testiculaire.

- Renforcer l'étude par de nouvelles approches de diagnostic telle que les techniques de biologie moléculaire et d'immunohistochimie afin de cibler aux niveaux cellulaires et moléculaires les régions atteintes par ce métal.

Références bibliographiques

A

- Abbasali, K., T. Zhila, et al. (2005). Developmental toxicity of Aluminum from high doses of AlCl₃ in mice. *J. Applied Res.*, 5: 575-579.
- Abdel-Moneim, A. M. (2013). "Effects of taurine against histomorphological and ultrastructural changes in the testes of mice exposed to aluminium chloride." *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **64**(3).
- Abdelazem, H. (2019). "Effect of *Moringa oleifera* on antioxidant enzymes and oxidative stress induced by aluminium exposure in male albino rat testes." *International Journal of Cancer and Biomedical Research* **4**(3): 34-41.
- Abdullah, A. M. (2014). "Aluminum pollution removal from water using a natural zeolite." *Journal of Pollution Effects & Control*: 1-4.
- Addabbo, F., M. Montagnani, et al. (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." *Hypertension* **53**(6): 885-892.
- Agarwal, D. R. and S. B. Gupta (2010). "An alarming hazard in the community using aluminium day to day life on the basis of toxic effects on the liver of abino rats by ingestion of aluminium." *National Journal of Community Medicine* **1**(2): 82-84.
- Aguilar, F., H. Autrup, et al. (2008). "Safety of aluminium from dietary intake scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC)." *EFSA J* **754**: 1-34.
- AI-Ashmawy, M. A. (2011). "Prevalence and public health significance of aluminum residues in milk and some dairy products." *Journal of food science* **76**(3): T73-T76.
- Altmann, P., J. Cunningham, et al. (1999). "Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident." *Bmj* **319**(7213): 807-811.
- Anandh, U., R. K. Ch, et al. (2020). "Acute interstitial nephritis in a patient with high aluminum blood levels: A case report." *Indian journal of nephrology* **30**(1): 39.
- Andersen, O. (2004). "Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents." *Mini reviews in medicinal chemistry* **4**(1): 11-21.
- Ashkenazi, D. (2019). How aluminum changed the world: A metallurgical revolution through technological and cultural perspectives. *Technological Forecasting and Social Change*, 143, 101-113
- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, et al. (2005). "Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- κ B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice." *Clinical Cancer Research* **11**(20): 7490-7498.
- Akram, M., A. A. Shahab-Uddin, et al. (2010). "Curcuma longa and curcumin: a review article." *Rom J Biol Plant Biol* **55**(2): 65-70.
- Aloko, S. and M. O. Bello (2021). *The Role of Alkaloids in the Management of Diabetes Mellitus. Structure and Health Effects of Natural Products on Diabetes Mellitus*, Springer: 267-278.

- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier.
- Aouadhi, S. (2010). "Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes." Mém. Mas. en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie.
- Apisariyakul, A., N. Vanittanakom, et al. (1995). "Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae)." *Journal of ethnopharmacology* 49(3): 163-169.
- Arun, N. and N. Nalini (2002). "Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats." *Plant foods for human nutrition* 57(1): 41-52.
- Abdul-Rasoul, E. M., N. H. Hassan, et al. (2009). "Effect of aluminium chloride on sexual efficiency in adult male rats." *JOURNAL OF EDUCATION AND SCIENCE* 22(4): 27-44.
- Afolabi, O. K., A. D. Wusu, et al. (2018). "Aluminium phosphide-induced testicular toxicity through oxidative stress in Wistar rats: Ameliorative role of hesperidin." *Toxicology Research and Application* 2: 2397847318812794.
- Akay, C., O. Erdem, et al. (2016). "Oxidative effects of aluminum on testes and erythrocytes in rats." *Trace Elements and Electrolytes* 33(4): 155.
- Akinola, A. A., S. Ahmad, et al. (2014). "Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes." *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 11(3): 7-13.
- Al-Eisa, R. and H. Al-Nahari (2017). "The attenuating effect of royal jelly on hormonal parameters in aluminum chloride (AlCl₃) intoxicated rats." *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences* 6(2).
- Amarowicz, R., R. Pegg, et al. (2004). "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies." *Food chemistry* 84(4): 551-562.
- Arora, D. S. and P. Chandra (2011). "Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*." *International Scholarly Research Notices* 2011.
- Afroz, R., E. Tanvir, et al. (2014). "Potential Antioxidant and Antibacterial Properties of a Popular Jujube Fruit: *Zizyphus mauritiana*." *Journal of Food Biochemistry* 38(6): 592-601.
- Al-Ani, I., I. Al-Khfaji, et al. (2009). "The effect of lead exposure of mice during pregnancy on the morphology of epididymal and testicular spermatozoa of their offspring." *IJUM Medical Journal Malaysia* 8(1).
- An, Y. H., P. L. Moreira, et al. (2003). *Principles of embedding and common protocols. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, Springer: 185-197.
- Azad, F., V. Nejati, et al. (2019). "Antioxidant and anti-apoptotic effects of royal jelly against nicotine-induced testicular injury in mice." *Environmental toxicology* 34(6): 708-718.

Afroz, R., E. Tanvir, et al. (2014). "Potential Antioxidant and Antibacterial Properties of a Popular Jujube Fruit: A pple Kul (*Z izephus mauritiana*)." *Journal of Food Biochemistry* **38**(6): 592-601.

B

Banasik, A., A. Lankoff, et al. (2005). "Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle." *Environmental Toxicology: An International Journal* **20**(4): 402-406.

Banks, W. A., M. L. Niehoff, et al. (2006). "Aluminum complexing enhances amyloid β protein penetration of blood–brain barrier." *Brain research* **1116**(1): 215-221.

Beardmore, J., G. Rugg, et al. (2007). "A systems biology approach to the blood–aluminium problem: The application and testing of a computational model." *Journal of inorganic biochemistry* **101**(9): 1187-1191.

Becaria, A., A. Campbell, et al. (2002). "Aluminum as a toxicant." *Toxicology and industrial health* **18**(7): 309-320.

Belaïd-Nouira, Y., H. Bakhta, et al. (2012). "Study of lipid profile and parieto-temporal lipid peroxidation in AlCl₃ mediated neurotoxicity. Modulatory effect of fenugreek seeds." *Lipids in health and disease* **11**(1): 1-8.

Berthon, G. (1996). "Chemical speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity." *Coordination chemistry reviews* **149**: 241-280.

Bojanić, N., J. Milenković, et al. (2020). "Pathophysiological mechanisms of aluminium toxicity." *Acta Medica Medianae* **59**(1): 100-109.

Borowska, S. and M. M. Brzóška (2015). "Metals in cosmetics: implications for human health." *Journal of applied toxicology* **35**(6): 551-572.

Brough, D. and H. Jouhara (2019). "International Journal of Thermofluids."

Brough, D. and H. Jouhara (2020). "The aluminium industry: A review on state-of-the-art technologies, environmental impacts and possibilities for waste heat recovery." *International Journal of Thermofluids* **1**: 100007.

Bernard, M., R. Couderc, et al. (2005). "Les aliments traditionnels: remèdes de bonne femme ou pharmacopée du xxie siècle l'exemple de la curcumine." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **40**(6): 325-333.

Berthelot, K., Y. Estevez, et al. (2012). "Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis." *Biochimie* **94**(8): 1621-1634.

Bharkatiya, M., R. K. Nema, et al. (2008). "Aromatherapy: short overview." *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)* **2**(1).

Bhragual, D. D., N. Kumar, et al. (2010). "Review on plants havin g hepatoprotective activity." *J Pharm Res* **3**(9): 2077-2082.

- Bimakr, M., R. A. Rahman, et al. (2011). "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves." *Food and bioproducts processing* 89(1): 67-72.
- Bone, K., M. Simon Mills, et al. (2012). *Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine*, Elsevier Health Sciences.
- Böttger, A., U. Vothknecht, et al. (2018). *Alkaloids. Lessons on Caffeine, Cannabis & Co*, Springer: 179-203.
- Brook, K., J. Bennett, et al. (2017). "The chemical history of morphine: an 8000-year journey, from resin to de-novo synthesis." *Journal of anesthesia history* 3(2): 50-55.
- Bundy, R., A. F. Walker, et al. (2004). "Turmeric extract may improve irritable bowel syndrome symptomology in otherwise healthy adults: a pilot study." *Journal of Alternative & Complementary Medicine* 10(6): 1015-1018.
- Bahey, N. G., G. M. Soliman, et al. (2014). "Influence of insulin and testosterone on diabetic rat ventral prostate: Histological, morphometric and immunohistochemical study." *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 2(3): 151-160.
- Berker, K. I., K. Güçlü, et al. (2010). "Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method." *Food Analytical Methods* 3(3): 154-168.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Balagoon, M. J. (2019). "Assessment of the protective effect of *Lepidium sativum* against aluminum-induced liver and kidney effects in albino rat." *BioMed Research International* 2019.
- Belhan, S., M. Özkaraca, et al. (2017). "Effectiveness of hesperidin on methotrexate-induced testicular toxicity in rats." *biological membranes* 4: 6.
- BENALIA, A., M. BENDAHMANE, et al. (2017). "The Protective Effect of *Curcuma longa* (L.) against Bisphenol A-Induced Reproductive Toxicity in Adult Female Albino Wistar Rats." *Journal of Biochemistry International*: 63-72.
- Beneduci, A., G. A. Corrente, et al. (2019). "Insight on the chelation of aluminum (III) and iron (III) by curcumin in aqueous solution." *Journal of Molecular Liquids* 296: 111805.
- Brown, G. (2007). "Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase." *Biochemical society transactions* 35(5): 1119-1121.

C

- Cabezuelo, A. S., E. B. González, et al. (1997). "Quantitative studies of aluminium binding species in human uremic serum by fast protein liquid chromatography coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry." *Analyst* 122(6): 573-577.

- Campbell, A. (2002). "The potential role of aluminium in Alzheimer's disease." *Nephrology Dialysis Transplantation* **17**(suppl_2): 17-20.
- Cao, Z., D. Liu, et al. (2016). "Aluminum Chloride Induces Osteoblasts Apoptosis via Disrupting Calcium Homeostasis and Activating Ca²⁺/CaMKII Signal Pathway." *Biological trace element research* **169**(2): 247-253.
- Caulfield, M. J., L. Shi, et al. (2007). "Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice." *Human Vaccines* **3**(4): 139-145.
- Chalansonnet, M., N. Carabin, et al. (2018). "Study of potential transfer of aluminum to the brain via the olfactory pathway." *Toxicology letters* **283**: 77-85.
- Chang, M.-Y., S.-F. Lin, et al. (2020). "Myelodysplastic syndrome: the other cause of anemia in end-stage renal disease patients undergoing dialysis." *Scientific reports* **10**(1): 1-9.
- Chappard, D., P. Bizot, et al. (2016). "Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al³⁺ deposition in the calcified matrix of bone." *Morphologie* **100**(329): 95-105.
- Chen, B., Y. Zeng, et al. (2010). "Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection." *Talanta* **81**(1-2): 180-186.
- Cheng, D., J. Tang, et al. (2018). "Effect of aluminum (Al) speciation on erythrocytic antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics." *Ecotoxicology and environmental safety* **157**: 201-206.
- Cheraghi, E. and K. Roshanaei (2019). "The protective effect of curcumin against aluminum-induced oxidative stress and hepatotoxicity in male rats." *Pharmaceutical and Biomedical Research* **5**(1): 11-18.
- Codling, E. E., R. L. Chaney, et al. (2002). "Biomass yield and phosphorus availability to wheat grown on high phosphorus soils amended with phosphate inactivating residues. I. Drinking water treatment residue." *Communications in soil science and plant analysis* **33**(7-8): 1039-1060.
- Corain, B., G. Bombi, et al. (1996). "Aluminium toxicity and metal speciation: established data and open questions." *Coordination chemistry reviews* **149**: 11-22.
- Cutler, H. G. and S. J. Cutler (1999). "Agrochemicals and pharmaceuticals: the connection." *Biologically active natural products: Agrochemicals*. CRC Press, Boca Raton, Fla: 1-14.
- Cazau-Beyret, N. (2013). *Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie*, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Chattopadhyay, I., K. Biswas, et al. (2004). "Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications." *Current science*: 44-53.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* **12**(4): 564-582.

- Cronin, J. R. (2003). "Curcumin: Old spice is a new medicine." *Alternative & complementary therapies* 9(1): 34-38.
- Cantin, C. M., M. A. Moreno, et al. (2009). "Evaluation of the antioxidant capacity, phenolic compounds, and vitamin C content of different peach and nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] breeding progenies." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11): 4586-4592.
- Chandra, S., P. Chatterjee, et al. (2012). "Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(1): S178-S180.
- Cheraghi, E., A. Golkar, et al. (2017). "Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in Wistar rats: ameliorative effects of curcumin." *International journal of fertility & sterility* 11(3): 166.
- Choi, Y., I. Ban, et al. (2019). "Puffing as a novel process to enhance the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Curcuma longa* L.(turmeric)." *Antioxidants* 8(11): 506.
- Chung, Y.-C., C.-T. Chang, et al. (2002). "Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8): 2454-2458.
- Chang, C.-C., M.-H. Yang, et al. (2002). "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods." *Journal of food and drug analysis* 10(3).
- Chakroun, H., N. Hfaiedh, et al. (2003). "Nickel et fertilité chez le rat." *Rev. Eur. Sexol* 12: 28-34.
- Chang, C.-C., M.-H. Yang, et al. (2002). "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods." *Journal of food and drug analysis* 10(3).
- Coyle, D., A. M. O'Donnell, et al. (2019). "The Extent of the Transition Zone in Hirschsprung Disease." *Journal of Pediatric Surgery* 54(11): 2318-2324.

D

- D'Souza, S. P., K. Vijayalaxmi, et al. (2014). "Assessment of genotoxicity of aluminium acetate in bone marrow, male germ cells and fetal liver cells of Swiss albino mice." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 766: 16-22.
- Darbre, P. D. (2005). "Aluminium, antiperspirants and breast cancer." *Journal of inorganic biochemistry* 99(9): 1912-1919.
- Darbre, P. D. (2016). "Aluminium and the human breast." *Morphologie* 100(329): 65-74.
- Darbre, P. D., F. Mannello, et al. (2013). "Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology." *Journal of inorganic biochemistry* 128: 257-261.

- De Chambrun, G. P., M. Body-Malapel, et al. (2014). "Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice." *Mucosal immunology* **7**(3): 589-601.
- Díaz-Corte, C., J. L. Fernández-Martín, et al. (2001). "Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis." *Nephrology Dialysis Transplantation* **16**(4): 742-745.
- Divine, K. K., J. L. Lewis, et al. (1999). "Quantitative particle-induced X-ray emission imaging of rat olfactory epithelium applied to the permeability of rat epithelium to inhaled aluminum." *Chemical research in toxicology* **12**(7): 575-581.
- Długaszek, M., M. A. Fiejka, et al. (2000). "Effects of various aluminium compounds given orally to mice on Al tissue distribution and tissue concentrations of essential elements." *Pharmacology & toxicology* **86**(3): 135-139.
- Domingo, J. L. (2011). Aluminum. *Reproductive and Developmental Toxicology*, Elsevier: 407-413.
- Donoghue, A. M., N. Frisch, et al. (2011). "Occupational asthma in the aluminum smelters of Australia and New Zealand: 1991–2006." *American journal of industrial medicine* **54**(3): 224-231.
- Dórea, J. G. and R. C. Marques (2010). "Infants' exposure to aluminum from vaccines and breast milk during the first 6 months." *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* **20**(7): 598-601.
- Das, A. K., M. N. Islam, et al. (2020). "Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities." *South African Journal of Botany* **135**: 58-70.
- Das, K., R. Tiwari, et al. (2010). "Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends." *Journal of medicinal plants research* **4**(2): 104-111.
- Den Hartogh, D. J., A. Gabriel, et al. (2020). "Antidiabetic properties of curcumin I: Evidence from in vitro studies." *Nutrients* **12**(1): 118.
- Desgagné-Penix, I. (2020). "Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review." *Phytochemistry Reviews*: 1-23.
- Dey, P., A. Kundu, et al. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Recent Advances in Natural Products Analysis*, Elsevier: 505-567.
- Dorai, T., Y. C. Cao, et al. (2001). "Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo." *The Prostate* **47**(4): 293-303.
- da Silva Lima, D., L. da Silva Gomes, et al. (2020). "Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils." *Experimental and Molecular Pathology* **116**: 104486.
- Dai, J. and R. J. Mumper (2010). "Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties." *Molecules* **15**(10): 7313-7352.

- Das, A., A. Roy, et al. (2019). "Anti-inflammatory activity of turmeric oil mediated silver nanoparticles." *Research Journal of Pharmacy and Technology* **12**(7): 3507-3510.
- Denre, M. (2014). "The determination of vitamin C, total phenol and antioxidant activity of some commonly cooking spices crops used in West Bengal." *International Journal of plant physiology and biochemistry* **6**(6): 66-70.
- Djebaili, H. and A. Zellagui (2013). "L'Effet des facteurs d'environnement sur la variation de quelque métabolites secondaires chez deux espèces médicinales."
- Daniel, C., M. G. Rojo, et al. (2011). "Standardizing the use of whole slide images in digital pathology." *Computerized Medical Imaging and Graphics* **35**(7-8): 496-505.
- Dettmeyer, R. B. (2018). *Histothanatology: Autolysis, Putrefaction, and Mummification. Forensic Histopathology*, Springer: 503-518.
- Dey, P. (2018). *Fixation of Histology Samples: Principles, Methods and Types of Fixatives. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*, Springer: 3-17.
-

E

- El-Demerdash, F. M. (2004). "Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**(1): 113-121.
- El-Gendy, A. M. (2011). "Amelioration of aluminium-intake oxidative stress by some antioxidants in male albino rats." *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* **45**(1): 536-546.
- EL-HAINA, F. Z., BENDAHMANE, M., FIZAZI, A., ZERROUKI, R., & KANDOUCI, A. B. (2015). Effet des facteurs médicaux et environnementaux sur la morphologie des spermatozoïdes chez les hommes infertiles à l'ouest algérien.
- Eltahawy, N., O. Sarhan, et al. (2016). "Effects of combined exposure to aluminum chloride and γ -radiation on histological and ultrastructure of intestinal Paneth cells." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **9**(4): 400-408.
- Exley, C. (2004). "The pro-oxidant activity of aluminum." *Free Radical Biology and Medicine* **36**(3): 380-387.
- Exley, C. (2009). *Aluminium and medicine*, Nova Biomedical Books: New York: 45-68.
- Exley, C. (2013). "Human exposure to aluminium." *Environmental Science: Processes & Impacts* **15**(10): 1807-1816.
- Exley, C., J. Beardmore, et al. (2007). "Computational approach to the blood-aluminum problem?" *International Journal of Quantum Chemistry* **107**(2): 275-278.
- Exley, C., E. Burgess, et al. (1996). "Aluminum toxicokinetics." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **48**(6): 569-584.

- Exley, C. and E. R. House (2011). "Aluminium in the human brain." *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* **142**(4): 357-363.
- Exley, C., P. Siesjö, et al. (2010). "The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?" *Trends in immunology* **31**(3): 103-109.
- Eloff, J. (1998). "Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?" *Journal of ethnopharmacology* **60**(1): 1-8.
-

F

- Filippini, T., S. Tancredi, et al. (2019). "Aluminum and tin: Food contamination and dietary intake in an Italian population." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **52**: 293-301.
- Flarend, R., T. Bin, et al. (2001). "A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26." *Food and chemical toxicology* **39**(2): 163-168.
- Flarend, R. E., S. L. Hem, et al. (1997). "In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26Al." *Vaccine* **15**(12-13): 1314-1318.
- Fleming, A. M. and C. J. Burrows (2020). "On the irrelevancy of hydroxyl radical to DNA damage from oxidative stress and implications for epigenetics." *Chemical Society Reviews* **49**(18): 6524-6528.
- Flora, S., M. Mittal, et al. (2008). "Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy." *Indian journal of medical research* **128**(4): 501.
- Fulgenzi, A., D. Vietti, et al. (2014). "Aluminium involvement in neurotoxicity." *BioMed Research International* **2014**.
- Feng, W., Z. Hao, et al. (2017). "Isolation and structure identification of flavonoids." *Flavonoids, from biosynthesis to human health/Ed. by Justino GC Intech Open*: 17-43.
- FOURASTÉ, I. "Règlement des produits à base de plantes." *Substances naturelles en Polynésie française: IRD éditions* 2005 150.
- Fiette, L., M. Slaoui, et al. (2017). *Procedures of Necropsy and Tissue Sampling. Drug Safety Evaluation*, Springer: 71-100.
- Fischer, A. H., K. A. Jacobson, et al. (2008). "Paraffin embedding tissue samples for sectioning." *CSH protocols* **2008**: pdb. prot4989.
- FIZAZI, A., BENDAHMANE, M., & SAHRAOUI, T. (2020). Sperm Profile of Infertile Men in the Western Region of Algeria: About 320 Cases. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 51-56.
- Flórez, N., E. Conde, et al. (2015). "Microwave assisted water extraction of plant compounds." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**(4): 590-607.
-

G

- García-Medina, S., A. C. Razo-Estrada, et al. (2010). "Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*)." *Fish physiology and biochemistry* **36**(4): 875-882.
- Genuis, S. J., D. Birkholz, et al. (2011). "Blood, urine, and sweat (BUS) study: monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements." *Archives of environmental contamination and toxicology* **61**(2): 344-357.
- Gherardi, R., M. Coquet, et al. (2001). "Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle." *Brain* **124**(9): 1821-1831.
- Gherardi, R. K. and F.-J. Authier (2003). "Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition." *Immunology and Allergy Clinics* **23**(4): 699-712.
- Girerd, C., T. Lihoreau, et al. (2018). "In vivo inspection of the olfactory epithelium: feasibility of robotized optical biopsy." *Annals of biomedical engineering* **46**(11): 1951-1961.
- González-Weller, D., A. n. J. Gutiérrez, et al. (2010). "Dietary intake of aluminum in a Spanish population (Canary Islands)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(19): 10452-10457.
- Greger, J. L., J. E. Sutherland, et al. (1997). "Aluminum exposure and metabolism." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **34**(5): 439-474.
- Guillard, O., B. Fauconneau, et al. (2012). "Aluminium overload after 5 years in skin biopsy following post-vaccination with subcutaneous pseudolymphoma." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **26**(4): 291-293.
- Guo, C.-H., C.-J. Huang, et al. (2001). "Serum and testicular testosterone and nitric oxide products in aluminum-treated mice." *Environmental toxicology and pharmacology* **10**(1-2): 53-60.
- Guo, C.-H., C.-Y. Lin, et al. (2005). "Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice." *Environmental toxicology and pharmacology* **19**(1): 33-40.
- Govind, P. (2011). "Active principles and median lethal dose of *Curcuma longa* Linn." *Internafional Research Journal of Pharmacy*, 2 (5): 239 **41**.
- Gessner, M. O. and D. Steiner (2020). *Acid Butanol Assay to Determine Bulk Concentrations of Condensed Tannins. Methods to Study Litter Decomposition*, Springer: 169-177.
- Govind, P. (2011). "Active principles and median lethal dose of *Curcuma longa* Linn." *Internafional Research Journal of Pharmacy*, 2 (5): 239 **41**.
- Gumustas, M., S. Kurbanoglu, et al. (2013). "UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters." *Chromatographia* **76**(21): 1365-1427.

Guo, C.-H., C.-Y. Lin, et al. (2005). "Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice." *Environmental toxicology and pharmacology* **19**(1): 33-40.

H

Hala, A., Z. Khattab, et al. (2010). "Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats." *J Am Sci* **6**(12): 352-361.

Hall, A. R., H. Le, et al. (2018). "Aluminum exposure from parenteral nutrition: Early Bile Canaliculus changes of the hepatocyte." *Nutrients* **10**(6): 723.

Harris, W. R. (1996). "Binding and transport of aluminum by serum proteins." *Coordination chemistry reviews* **149**: 347-365.

Harris, W. R., G. Berthon, et al. (1996). "Speciation of aluminum in biological systems." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **48**(6): 543-568.

Harris, W. R., G. Berthon, et al. (1996). "Speciation of aluminum in biological systems." **48**(6): 543-568.

HogenEsch, H. (2013). "Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants." *Frontiers in immunology* **3**: 406.

Hosseini, S. F., M. Forouzes, et al. (2020). "The molecular mechanism of aluminum phosphide poisoning in cardiovascular disease: Pathophysiology and diagnostic approach." *Cardiovascular Toxicology* **20**(5): 454-461.

Houben, G. J., S. Kaufhold, et al. (2019). "Investigation of the source of acidification in an aquifer in Northern Germany." *Environmental Earth Sciences* **78**(3): 73.

House, E., A. Polwart, et al. (2013). "The aluminium content of breast tissue taken from women with breast cancer." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **27**(4): 257-266.

Hagerman, A. E. and L. G. Butler (1981). "The specificity of proanthocyanidin-protein interactions." *Journal of Biological chemistry* **256**(9): 4494-4497.

Hajar, R. (2012). "The air of history (part II) medicine in the middle ages." *Heart views: the official journal of the Gulf Heart Association* **13**(4): 158.

Hamidpour, R., S. Hamidpour, et al. (2015). "Turmeric (*Curcuma longa*): from a variety of traditional medicinal applications to its novel roles as active antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-diabetes." *Int J Pharmacol Phytochem Ethnomed* **1**: 37-45.

Haminiuk, C. W., G. M. Maciel, et al. (2012). "Phenolic compounds in fruits—an overview." *International Journal of Food Science & Technology* **47**(10): 2023-2044.

Harris, B. (2010). "11 Phytotherapeutic Uses of Essential Oils." *ESSENTIAL*: 315.

- Hewlings, S. J. and D. S. Kalman (2017). "Curcumin: a review of its effects on human health." *Foods* 6(10): 92.
- Hombourger, C. (2010). *Le Curcuma, de l'épice au médicament*, UHP-Université Henri Poincaré.
- Huang, X., J. Liang, et al. (2011). "Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production." *Animal Feed Science and Technology* 166: 373-376.
- Halvaei, Z., H. Tehrani, et al. (2017). "Vitamin E as a novel therapy in the treatment of acute aluminum phosphide poisoning." *Turkish journal of medical sciences* 47(3): 795-800.
- Huang, B., Z. Lei, et al. (2008). "SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 112(4): 1269-1279.
- Hyman, M. (2007). "Systems biology, toxins, obesity, and functional medicine." *Altern Ther Health Med* 13(2): S134-S139.
- Hadwan, M. H. (2016). "New method for assessment of serum catalase activity." *Indian Journal of Science and Technology* 9(4): 1-5.
- Horobin, R. (2002). "Biological staining: mechanisms and theory." *Biotechnic & histochemistry* 77(1): 3-13.

I

- Igbokwe, I. O., E. Igwenagu, et al. (2019). "Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects." *Interdisciplinary toxicology* 12(2): 45.
- Igwenagu, E., I. O. Igbokwe, et al. (2020). "Fasting hyperglycaemia, glucose intolerance and pancreatic islet necrosis in albino rats associated with subchronic oral aluminium chloride exposure." *Comparative Clinical Pathology* 29(1): 75-81.
- Inan-Eroglu, E. and A. Ayaz (2018). "Is aluminum exposure a risk factor for neurological disorders?" *Journal of research in medical sciences: The official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 23.
- Ingerman, L., D. G. Jones, et al. (2008). "Toxicological profile for aluminum."
- Israeli, E. (2012). "Gulf War syndrome as a part of the autoimmune (autoinflammatory) syndrome induced by adjuvant (ASIA)." *Lupus* 21(2): 190-194.
- Ibrahim, J., A. Y. Kabiru, et al. (2020). "Antioxidant and hepatoprotective potentials of curcuminoid isolates from turmeric (*Curcuma longa*) rhizome on CCl₄-induced hepatic damage in Wistar rats." *Journal of Taibah University for Science* 14(1): 908-915.
- Ishihara, M., M. Itoh, et al. (2000). "Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat." *International journal of andrology* 23(2): 85-94.

J

- Jeffery, E. H., K. Abreo, et al. (1996). "Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **48**(6): 649-666.
- Johnson, V. J. and R. P. Sharma (2003). "Aluminum disrupts the pro-inflammatory cytokine/neurotrophin balance in primary brain rotation-mediated aggregate cultures: possible role in neurodegeneration." *Neurotoxicology* **24**(2): 261-268.
- Jomova, K. and M. Valko (2011). "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease." *Toxicology* **283**(2-3): 65-87.
- Jones, L. S., L. J. Peek, et al. (2005). "Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens." *Journal of Biological Chemistry* **280**(14): 13406-13414.
- Justin-Thenmozhi, A., M. D. Bharathi, et al. (2018). "Attenuation of aluminum chloride-induced neuroinflammation and caspase activation through the AKT/GSK-3 β pathway by hesperidin in wistar rats." *Neurotoxicity Research* **34**(3): 463-476.
- Jamshidi-Kia, F., Z. Lorigooini, et al. (2018). "Medicinal plants: Past history and future perspective." *Journal of HerbMed Pharmacology* **7**(1).
- Jayaprakasha, G., L. J. M. Rao, et al. (2005). "Chemistry and biological activities of *C. longa*." *Trends in Food Science & Technology* **16**(12): 533-548.
- Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.), Lavoisier.
- Joe, B. and B. Lokesh (1994). "Role of capsaicin, curcumin and dietary n—3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1224**(2): 255-263.
- Jacob, A., R. Wu, et al. (2008). "Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- γ activation." *PPAR Research* **2007**.
- Jakubczyk, K., A. Drużga, et al. (2020). "Antioxidant Potential of Curcumin—A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials." *Antioxidants* **9**(11): 1092.
- Jamalan, M., M. A. Ghaffari, et al. (2016). "Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function." *International Journal of Fertility & Sterility* **10**(2): 215.
- Jan, S., M. R. Khan, et al. (2013). "Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothecha buxifolia* fruit." *Osong Public Health and Research Perspectives* **4**(5): 246-254.
- Jadhav, A., J. Kareparamban, et al. (2012). "Spectrophotometric estimation of ferulic acid from *Ferula asafoetida* by Folin-ciocalteu's reagent." *Der Pharmacia Sinica* **3**(6): 680-684.

K

- Karaś, K., A. Ziola-Frankowska, et al. (2020). "Chemical Speciation of Aluminum in Wine by LC–ICP–MS." *Molecules* **25**(5): 1069.
- Klein, G. L. (2019). "Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect?" *Osteoporosis and sarcopenia* **5**(1): 2-5.
- Klein, G. L., R. M. Goldblum, et al. (1993). "Increased biliary transferrin excretion following parenteral aluminum administration to rats." *Pharmacology & toxicology* **72**(6): 373-376.
- Klein, J., M. Mold, et al. (2014). "Aluminum content of human semen: Implications for semen quality." *Reproductive Toxicology* **50**: 43-48.
- Kongerud, J. and V. Søyseth (2014). "Respiratory disorders in aluminum smelter workers." *Journal of occupational and environmental medicine* **56**(5 Suppl): S60.
- Koo, Y. J., E. C. Pack, et al. (2020). "Determination of toxic metal release from metallic kitchen utensils and their health risks." *Food and chemical toxicology* **145**: 111651.
- Kozima, E. T., A. B. F. d. Souza, et al. (2020). "Aluminum hydroxide nebulization-induced redox imbalance and acute lung inflammation in mice." *Experimental lung research* **46**(3-4): 64-74.
- Kragh, H. (2019). "Controversial Elements: Priority Disputes and the Discovery of Chemical Elements." *Substantia*: 79-90.
- Krewski, D., R. A. Yokel, et al. (2007). "Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **10**(S1): 1-269.
- Krupińska, I. (2020). "Aluminium drinking water treatment residuals and their toxic impact on human health." *Molecules* **25**(3): 641.
- Kemppainen, K., M. Siika-aho, et al. (2014). "Spruce bark as an industrial source of condensed tannins and non-cellulosic sugars." *Industrial crops and products* **52**: 158-168.
- Khan, H., H. Ullah, et al. (2019). "Mechanistic insights of hepatoprotective effects of curcumin: therapeutic updates and future prospects." *Food and chemical toxicology* **124**: 182-191.
- Khanbabaee, K. and T. Van Ree (2001). "Tannins: classification and definition." *Natural product reports* **18**(6): 641-649.
- Khattak, S., H. U. Shah, et al. (2005). "Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*." *Fitoterapia* **76**(2): 254-257.
- Kim, D. K., H. S. Lillehoj, et al. (2013). "Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens." *Poultry Science* **92**(10): 2635-2643.

- Kim, M.-K., G.-J. Choi, et al. (2003). "Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6): 1578-1581.
- Kocaadam, B. and N. Şanlier (2017). "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health." *Critical reviews in food science and nutrition* 57(13): 2889-2895.
- Kohli, K., J. Ali, et al. (2005). "Curcumin: a natural antiinflammatory agent." *Indian Journal of Pharmacology* 37(3): 141.
- Köksal, M., H. Hu, et al. (2011). "Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase." *Nature chemical biology* 7(7): 431-433.
- Kumar, A., J. Dora, et al. (2011). "A review on spice of life *Curcuma longa* (turmeric)." *Int. J. Appl. Biol. Pharmaceut. Tech* 2: 371-379.
- Kunnumakkara, A. B., P. Anand, et al. (2008). "Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins." *Cancer letters* 269(2): 199-225.
- Katerji, M., M. Filippova, et al. (2019). "Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**.
- Kim, E.-J., M. Jang, et al. (2018). "An improved dehydroepiandrosterone-induced rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS): Post-pubertal improve PCOS's features." *Frontiers in Endocrinology* **9**: 735.
- KONAK, Ş. and E. H. ŞENER (2019). "Antioxidant effects of curcumin on the blood tissue in rats." *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute* **7**(1): 8-14.

L

- Le Roux, M. (2015). "From science to industry: the sites of aluminium in France from the nineteenth to the twentieth century." *Ambix* **62**(2): 114-137.
- Lerner, A. (2007). "Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1107**(1): 329-345.
- Levine, S., A. Saltzman, et al. (1992). "Parenteral aluminum compounds produce a local toxic myopathy in rats: importance of the anion." *Toxicologic pathology* **20**(3-1): 405-415.
- Levine, S. N., G. B. Sonnier, et al. (1990). "Effects of diabetes mellitus and aluminum toxicity on myocardial calcium transport." *Toxicology* **65**(1-2): 137-148.
- Li, T., R. Hu, et al. (2018). "Fine particulate matter (PM_{2.5}): The culprit for chronic lung diseases in China." *Chronic diseases and translational medicine* **4**(3): 176-186.
- Liu, B., L. Song, et al. (2019). "Prenatal aluminum exposure is associated with increased newborn mitochondrial DNA copy number." *Environmental Pollution* **252**: 330-335.

- LMAROUDIA, O. and E. Mehdi (2018). Les cosmétiques et les dérivés d'aluminium: Enquête auprès d'une grande surface commerciale à Kenitra.
- Lukiw, W. J., M. E. Percy, et al. (2005). "Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture." *Journal of inorganic biochemistry* **99**(9): 1895-1898.
- Lahouel, Z., O. Kharoubi, et al. (2020). "Effect of Aluminium and Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* on rat Brain: Impact on Neurobehavioral and Histological study." *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **10**(4): 179-187.
- Landreth, G. E. and M. T. Heneka (2001). "Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* **22**(6): 937-944.
- Li, H.-B., C.-C. Wong, et al. (2008). "Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants." *LWT-Food Science and Technology* **41**(3): 385-390.
- Liu, Z., T. Zhou, et al. (2017). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**.
- Lobo, V., A. Patil, et al. (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." *Pharmacognosy reviews* **4**(8): 118.
- Lapornik, B., M. Prošek, et al. (2005). "Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time." *Journal of food engineering* **71**(2): 214-222.
- Laura, A., J. O. Moreno-Escamilla, et al. (2019). Phenolic compounds. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables, Elsevier: 253-271.
- Lehmann, H. (2013). Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles, Université de Strasbourg.
- Létard, J.-C., J.-M. Canard, et al. (2015). "Phytothérapie–Principes généraux." *Hegel*(1): 29-35.
- Loap, S. (2008). "Curcuma (partie I)." *Phytothérapie* **6**(1): 22-28.
- López-Lázaro, M. (2008). "Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent." *Molecular nutrition & food research* **52**(S1): S103-S127.
- Lindon, J. C., N. J. Bailey, et al. (2003). "Biomedical applications of directly-coupled chromatography-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS)." *Handbook of analytical separations* **4**: 293-329.

- Ma, R., K. Yang, et al. (2021). "Early-life exposure to aluminum and fine motor performance in infants: a longitudinal study." *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* **31**(2): 248-256.
- Mahdi, A. A., S. Tripathi, et al. (2010). "Aluminium mediated oxidative stress: possible relationship to cognitive impairment of Alzheimer's type." *Annals of Neurosciences* **13**(1): 18-24.
- Malaki, M. (2013). "Acute encephalopathy following the use of aluminum hydroxide in a boy affected with chronic kidney disease." *Journal of pediatric neurosciences* **8**(1): 81.
- Mandal, R. and S. Kaur (2020). "Health concerns on provisional tolerable weekly intake of aluminium in children and adults from vegetables in Mandi-Gobindgarh (India)." *Environmental geochemistry and health: 1-20.*
- Martin, K. (2007). "The chemistry of silica and its potential health benefits." *The Journal of nutrition, health & aging* **11**(2): 94.
- Martinez, C. S., A. G. Escobar, et al. (2017). "Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats." *Reproductive Toxicology* **73**: 128-141.
- Martini, M.-C. (2020). *Déodorants et antitranspirants. Annales de dermatologie et de venereologie*, Elsevier.
- Maya, S., T. Prakash, et al. (2016). "Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **83**: 746-754.
- Means, R. T. (2019). *Anemias of Chronic Disorders and Nonhemolytic Normochromic, Normocytic Anemias. Handbook of Hematologic Pathology*, CRC Press: 325-339.
- Meriga, B., B. K. Reddy, et al. (2004). "Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*)." *Journal of plant physiology* **161**(1): 63-68.
- Mestaghanimi, H., S. El Amrani, et al. (2002). "Effects of aluminium chloride on some essential elements in pregnant rats and their offspring." *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* **22**(4): 227-234.
- Mishra, B. and S. Gostu (2017). "Materials sustainability for environment: Red-mud treatment." *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **11**(3): 483-496.
- Mold, M., D. Umar, et al. (2018). "Aluminium in brain tissue in autism." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **46**: 76-82.
- Monteiro-Riviere, N. A., S. J. Oldenburg, et al. (2010). "Interactions of aluminum nanoparticles with human epidermal keratinocytes." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* **30**(3): 276-285.
- Moore Jr, P., T. Daniel, et al. (2000). "Reducing phosphorus runoff and inhibiting ammonia loss from poultry manure with aluminum sulfate." *Journal of Environmental Quality* **29**(1): 37-49.

- Moos, T. and E. H. Morgan (2000). "Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems." *Cellular and molecular neurobiology* **20**(1): 77-95.
- Moumen, R., N. Ait-Oukhatar, et al. (2001). "Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **15**(2-3): 89-93.
- Mouro, V. G., T. P. Menezes, et al. (2018). "How bad is aluminum exposure to reproductive parameters in rats?" *Biological trace element research* **183**(2): 314-324.
- Mujika, J. I., F. Ruipérez, et al. (2011). "Pro-oxidant activity of aluminum: stabilization of the aluminum superoxide radical ion." *The Journal of Physical Chemistry A* **115**(24): 6717-6723.
- Mundy, W. R. and T. J. Shafer (2001). Aluminum-induced alteration of phosphoinositide and calcium signaling. *Aluminium and Alzheimer's Disease*, Elsevier: 345-360.
- Murakami, K. and M. Yoshino (2004). "Aluminum decreases the glutathione regeneration by the inhibition of NADP-isocitrate dehydrogenase in mitochondria." *Journal of cellular biochemistry* **93**(6): 1267-1271.
- Muselin, F., E. Dumitrescu, et al. (2015). "Protective effect of melatonin on aluminum accumulation in some organs of rats." *J Fac Vet Med Istanbul Univ* **41**: 26-30.
- Mamedov, N. and L. Craker (2011). Man and medicinal plants: a short review. *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS2010 and History of Mayan Ethnopharmacology IMAPS2011* 964.
- Martínez-Valverde, I., M. J. Periago, et al. (2000). "Nutritional importance of phenolic compounds in the diet." *Archivos latinoamericanos de nutrición* **50**(1): 5-18.
- Motterlini, R., R. Foresti, et al. (2000). "Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress." *Free Radical Biology and Medicine* **28**(8): 1303-1312.
- Mouzaoui, S., S. Banerjee, et al. (2020). "Low-dose curcumin reduced TNBS-associated mucin depleted foci in mice by scavenging superoxide anion and lipid peroxides, rebalancing matrix NO synthase and aconitase activities, and recoupling mitochondria." *Inflammopharmacology*: 1-17.
- Mukherjee, P. (2019). "Extraction and Other Downstream Procedures for Evaluation of Herbal Drugs." *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs: Evaluating Natural Products and Traditional Medicine*. Elsevier: New Delhi: 195-227.
- McLachlan, R. I., E. Rajpert-De Meyts, et al. (2007). "Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review." *Human Reproduction* **22**(1): 2-16.
- Menkveld, R., C. A. Holleboom, et al. (2011). "Measurement and significance of sperm morphology." *Asian journal of andrology* **13**(1): 59.
- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." *Journal of Biological chemistry* **247**(10): 3170-3175.

- Moselhy, W., N. Helmy, et al. (2012). "Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminium chloride in albino male rats." *Reproduction in domestic animals* **47**(2): 335-343.
- Munteanu, I. G. and C. Apetrei (2021). "Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review." *International journal of molecular sciences* **22**(7): 3380.
- Musiał, A., R. W. Gryglewski, et al. (2016). "Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries." *Folia medica Cracoviensia*.
- Manal, M. S., F. A. Marwa, et al. (2017). "The protective role of DMSA and vitamin E & selenium on aluminum induced neuro and reproductive toxicity in male rats." *Animal Health Research Journal* **5**(1): 52-70.
- Martinez, C. S., A. G. Escobar, et al. (2017). "Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats." *Reproductive Toxicology* **73**: 128-141.
- Mesole, S. B., O. O. Alfred, et al. (2020). "Apoptotic inducement of neuronal cells by aluminium chloride and the neuroprotective effect of eugenol in wistar rats." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**.
- Miska-Schramm, A., J. Kapusta, et al. (2017). "The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*)." *Biological trace element research* **177**(1): 97-106.
- Moselhy, W., N. Helmy, et al. (2012). "Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminium chloride in albino male rats." *Reproduction in domestic animals* **47**(2): 335-343.

N

- Newton, D. and R. Talbot (2012). "Long-term retention of injected aluminium-26." *Human & experimental toxicology* **31**(12): 1195-1198.
- Nie, J. (2018). *Exposure to aluminum in daily life and Alzheimer's disease. Neurotoxicity of Aluminum*, Springer: 99-111.
- Niu, Q. (2018). *Neurotoxicity of aluminum*, Springer.
- Novaes, R. D., V. G. Mouro, et al. (2018). "Aluminum: A potentially toxic metal with dose-dependent effects on cardiac bioaccumulation, mineral distribution, DNA oxidation and microstructural remodeling." *Environmental Pollution* **242**: 814-826.
- Nasri, H., N. Sahinfard, et al. (2014). "Turmeric: A spice with multifunctional medicinal properties." *Journal of HerbMed Pharmacology* **3**.
- Naumann, H., J. Muir, et al. (2013). "Condensed tannins in the ruminant environment: a perspective on biological activity." *Journal of Agricultural Sciences* **1**(1): 8-20.

- Ncube, N., A. Afolayan, et al. (2008). "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends." *African journal of biotechnology* 7(12).
- Nikhal, S., P. Dambe, et al. (2010). "Hydroalcoholic extraction of *Mangifera indica* (leaves) by Soxhletion." *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(1): 30-32.
- Nishiyama, T., T. Mae, et al. (2005). "Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 959-963.
- Nandedkar, S. S., E. Patidar, et al. (2015). "Histomorphological patterns of endometrium in Infertility." *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 65(5): 328-334.
- Njoya, E. M. (2021). *Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer*. Cancer, Elsevier: 349-357.
-

O

- Ochmański, W. and W. Barabasz (2000). "Aluminum--occurrence and toxicity for organisms." *Przegląd lekarski* 57(11): 665-668.
- Oludare, F. V. (2017). "Effects of weathering and erosion on the geochemistry of rocks and soils." *Int. J. Sci. Res. Sci. Technol.* 3(6): 74-80.
- Orihuela, D., V. Meichtry, et al. (2005). "Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism." *Journal of inorganic biochemistry* 99(9): 1871-1878.
- Orr, S. E. and C. C. Bridges (2017). "Chronic kidney disease and exposure to nephrotoxic metals." *International journal of molecular sciences* 18(5): 1039.
- Oyeyipo, I., Y. Raji, et al. (2010). "Effects of oral administration of nicotine on organ weight, serum testosterone level and testicular histology in adult male rats." *Nigerian Journal of Physiological Sciences* 25(1): 81-86.
- Olanrewaju, A., J. Owolabi, et al. (2017). "Testicular cytoprotective activities of *Curcuma longa* in STZ-induced diabetic adult male wistar rats." *Anatomy Journal of Africa* 6(1): 905-913.
- Oyetayo, B. O., A. O. Abolaji, et al. (2020). "Ameliorative role of diets fortified with curcumin in a *Drosophila Melanogaster* model of aluminum chloride-induced neurotoxicity." *Journal of Functional Foods* 71: 104035.
- Oldfield, E. and F. Y. Lin (2012). "Terpene biosynthesis: modularity rules." *Angewandte Chemie International Edition* 51(5): 1124-1137.
- Opara, E. I. and M. Chohan (2014). "Culinary herbs and spices: their bioactive properties, the contribution of polyphenols and the challenges in deducing their true health benefits." *International journal of molecular sciences* 15(10): 19183-19202.

- Othman, L., A. Sleiman, et al. (2019). "Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants." *Frontiers in microbiology* 10: 911.
- Ozturk, M. and K. R. Hakeem (2018). *Plant and Human Health, Volume 1: Ethnobotany and Physiology*, Springer.
- Ohtsuki, Y., T. Yamaguchi, et al. (1989). "Stain Technology: A Simplified Aluminum Stain in Paraffin Sections of Bone from Hemodialysis Patients." *Stain technology* 64(2): 55-59.
- Õkva, K., E. Tamoseviciute, et al. (2006). "Refinements for intragastric gavage in rats." *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences* 33(4): 243-252.
- Olayinka, E. T., A. Ore, et al. (2019). "The role of flavonoid antioxidant, morin in improving procarbazine-induced oxidative stress on testicular function in rat." *Porto Biomedical Journal* 4(1).
- Õkva, K., E. Tamoseviciute, et al. (2006). "Refinements for intragastric gavage in rats." *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences* 33(4): 243-252.
-

P

- Pandey, G. and G. C. Jain (2013). "A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity." *International journal of toxicology and applied pharmacology* 3(3): 48-57.
- Pavelić, K. and M. Hadžija (2003). *Medical applications of zeolites. Handbook of zeolite science and technology*, CRC Press: 1465-1503.
- Peixoto, P., J. Cambraia, et al. (2001). "Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars." *Journal of Plant Nutrition* 24(7): 1061-1070.
- Pennington, J. A. and S. A. Schoen (1995). "Estimates of dietary exposure to aluminium." *Food Additives & Contaminants* 12(1): 119-128.
- Pérez, G., D. Vittori, et al. (2002). "Aluminum toxicity in erythropoiesis. Related mechanisms." *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 36(1): 41-50.
- Pi, X., L. Jin, et al. (2019). "Association between concentrations of barium and aluminum in placental tissues and risk for orofacial clefts." *Science of The Total Environment* 652: 406-412.
- Pineau, A., B. Fauconneau, et al. (2014). "If exposure to aluminium in antiperspirants presents health risks, its content should be reduced." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28(2): 147-150.
- Pineau, A., O. Guillard, et al. (2012). "In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell." *Journal of inorganic biochemistry* 110: 21-26.

- Powell, J., R. Jugdaohsingh, et al. (1999). "The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract." *Proceedings of the Nutrition Society* **58**(1): 147-153.
- Priest, N., R. Talbot, et al. (1998). "Uptake by man of aluminium in a public water supply." *Human & experimental toxicology* **17**(6): 296-301.
- Padilla, M. A., M. Elobeid, et al. (2010). "An examination of the association of selected toxic metals with total and central obesity indices: NHANES 99-02." *International journal of environmental research and public health* **7**(9): 3332-3347.
- Paw, M., R. Gogoi, et al. (2020). "Study of anti-oxidant, anti-inflammatory, genotoxicity, and antimicrobial activities and analysis of different constituents found in rhizome essential oil of *Curcuma caesia* Roxb., collected from north east India." *Current pharmaceutical biotechnology* **21**(5): 403-413.
- Pan, S.-Y., G. Litscher, et al. (2014). "Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014.
- Pandey, A. and S. Tripathi (2014). "Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug." *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* **2**(5).
- Parveen, Z., S. Nawaz, et al. (2013). "Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Curcuma longa* L. Kasur variety." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **75**(1): 117.
- Petrovska, B. B. (2012). "Historical review of medicinal plants' usage." *Pharmacognosy reviews* **6**(11): 1.
- Pradhan, S. and C. Girish (2013). "Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine." *Indian journal of medical research* **137**(2).
- Pramono, S., F. H. Arifah, et al. (2018). "Hepatoprotective Activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Paracetamol-induced Liver Damage in Rats and Correlation with Their Chemical Compounds." *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)* **42**(4).
- Prieto, P., M. Pineda, et al. (1999). "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E." *Analytical biochemistry* **269**(2): 337-341.

Q

- Qi, X., L. Han, et al. (2012). "Prostate extract with aluminum hydroxide injection as a novel animal model for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome." *Urology* **80**(6): 1389. e1389-1389. e1315.
- Qin, X., L. Li, et al. (2020). "Effects of chronic aluminum lactate exposure on neuronal apoptosis and hippocampal synaptic plasticity in rats." *Biological trace element research* **197**(2): 571-579.

Qin, D., Z. Wen, et al. (2013). "Effect of cichorium glandulosum extracts on CCl₄-induced hepatic fibrosis." *Iranian Red Crescent Medical Journal* **15**(12).

Qing, Z., Y. Xu, et al. (2020). "Investigation of fragmentation behaviours of isoquinoline alkaloids by mass spectrometry combined with computational chemistry." *Scientific reports* **10**(1): 1-13.

R

Ranau, R., J. Oehlschläger, et al. (2001). "Aluminium levels of fish fillets baked and grilled in aluminium foil." *Food chemistry* **73**(1): 1-6.

Reto, M., M. E. Figueira, et al. (2007). "Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal." *Plant foods for human nutrition* **62**(4): 139.

Riihimäki, V. and A. Aitio (2012). "Occupational exposure to aluminum and its biomonitoring in perspective." *Critical reviews in toxicology* **42**(10): 827-853.

Rochman, M., L. Mangel, et al. (2021). "Aluminum Content of Human Milk and Antiperspirant Use." *Breastfeeding Medicine*.

Rondeau, V., H. Jacqmin-Gadda, et al. (2009). "Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort." *American journal of epidemiology* **169**(4): 489-496.

Rout, G., S. Samantaray, et al. (2001). "Aluminium toxicity in plants: a review." *Agronomie* **21**(1): 3-21.

Rubartelli, A. and M. T. Lotze (2007). "Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox." *Trends in immunology* **28**(10): 429-436.

Rahmani, A. H., M. A. Al Zohairy, et al. (2014). "Curcumin: a potential candidate in prevention of cancer via modulation of molecular pathways." *BioMed Research International* 2014.

Raja, P. B., A. A. Rahim, et al. (2014). "Green synthesis of silver nanoparticles using tannins." *Materials Science-Poland* **32**(3): 408-413.

Rao, B. N. (2003). "Bioactive phytochemicals in Indian foods and their potential in health promotion and disease prevention." *Asia Pacific Journal of clinical nutrition* **12**(1).

Remington, J. P. (2006). *Remington: The science and practice of pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins.

Ruby, A. J., G. Kuttan, et al. (1995). "Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids." *Cancer letters* **94**(1): 79-83.

Rui, B., D. Angrimani, et al. (2018). "A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species." *Reproduction in domestic animals* **53**(1): 171-175.

S

- Saiyed, S. M. and R. A. Yokel (2005). "Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives." *Food additives and contaminants* **22**(3): 234-244.
- Sanders, L. H. and J. T. Greenamyre (2013). "Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model." *Free Radical Biology and Medicine* **62**: 111-120.
- Sanderson, P., J. M. Delgado-Saborit, et al. (2014). "A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles." *Atmospheric Environment* **94**: 353-365.
- Santiago, T., O. Rebelo, et al. (2015). "Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence?" *Rheumatology international* **35**(1): 189-192.
- Schäfer, U. and M. Seifert (2006). "Oral intake of aluminum from foodstuffs, food additives, food packaging, cookware and pharmaceutical preparations with respect to dietary regulations." *Trace Elements & Electrolytes* **23**(3).
- Seidowsky, A., E. Dupuis, et al. (2018). "Intoxication aluminique en hémodialyse chronique. Un diagnostic rarement évoqué de nos jours. Illustration par un cas clinique et revue de la littérature." *Néphrologie & Thérapeutique* **14**(1): 35-41.
- Shaaban, L. H., H. H. Zayet, et al. (2016). "Respiratory hazards: clinical and functional assessment in aluminum industry workers." *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* **65**(2): 537-543.
- Shahraki, M., S. ZAHEDIASL, et al. (2004). "The effect of aluminum injection in lateral ventricle on sex hormones in male rat."
- Sharma, P. and R. Dubey (2007). "Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum." *Plant cell reports* **26**(11): 2027-2038.
- Sharma, P. and K. P. Mishra (2006). "Aluminum-induced maternal and developmental toxicity and oxidative stress in rat brain: response to combined administration of Tiron and glutathione." *Reproductive Toxicology* **21**(3): 313-321.
- Shirley, D. and C. Lote (2005). "Renal handling of aluminium." *Nephron Physiology* **101**(4): p99-p103.
- Silva, V. I. S., J. M. Cordeiro, et al. (2002). "Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol." *Neuroscience research* **44**(2): 181-193.
- Soni, M. G., S. M. White, et al. (2001). "Safety evaluation of dietary aluminum." *Regulatory toxicology and pharmacology* **33**(1): 66-79.

- Stahl, T., S. Falk, et al. (2018). "Evaluation of human exposure to aluminum from food and food contact materials." *European Food Research and Technology* **244**(12): 2077-2084.
- Sun, H., C. Hu, et al. (2011). "Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats." *Biological trace element research* **144**(1): 1050-1058.
- Sun, X., H. Sun, et al. (2018). "Aluminum chloride causes the dysfunction of testes through inhibiting the ATPase enzyme activities and gonadotropin receptor expression in rats." *Biological trace element research* **183**(2): 296-304.
- Suwalsky, M., B. Norris, et al. (2004). "Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes." *Food and chemical toxicology* **42**(6): 925-933.
- Sood, P. K., U. Nahar, et al. (2011). "Curcumin attenuates aluminum-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat brain." *Neurotoxicity research* **20**(4): 351-361.
- Suárez-Fernández, M. B., A. B. Soldado, et al. (1999). "Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death." *Brain research* **835**(2): 125-136.
- Sudjarwo, S. A. and K. Giftania Wardani Sudjarwo (2017). "Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats." *Research in Pharmaceutical Sciences* **12**(5): 381.
- Sun, H., C. Hu, et al. (2011). "Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats." *Biological trace element research* **144**(1): 1050-1058.
- Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, et al. (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**(2): 270-276.
- Schofield, P., D. Mbugua, et al. (2001). "Analysis of condensed tannins: a review." *Animal Feed Science and Technology* **91**(1-2): 21-40.
- Sepahpour, S., J. Selamat, et al. (2018). "Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems." *Molecules* **23**(2): 402.
- Serairi-Beji, R., W. Aidi Wannes, et al. (2018). "Antioxidant and hepatoprotective effects of *Asparagus albus* leaves in carbon tetrachloride-induced liver injury rats." *Journal of Food Biochemistry* **42**(1): e12433.
- Siddique, N. A., M. Mujeeb, et al. (2010). "Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of *Aegle marmelos*." *African Journal of plant science* **4**(1): 001-005.

- Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1999). "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent." *Methods in enzymology* **299**: 152-178.
- Soleimanzadeh, A. and A. Saberivand (2013). Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. *Veterinary Research Forum, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*
- Srinivasulu, K. and C. Changamma (2017). "A study on the effect of *Ocimum sanctum* (Linn.) Leaf extract and ursolic acid on spermatogenesis in male rats." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **79**(1): 158-163.
- Srivastava, N., M. Pande, et al. (2017). *Evaluating Sperm Cell Morphology. Protocols in Semen Biology (Comparing Assays), Springer: 89-107.*
- Saad, B., H. Azaizeh, et al. (2005). "Tradition and perspectives of Arab herbal medicine: a review." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2**(4): 475-479.
- Salminen, A., M. Lehtonen, et al. (2008). "Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential." *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(19): 2979-2999.
- Sandur, S. K., M. K. Pandey, et al. (2007). "Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism." *Carcinogenesis* **28**(8): 1765-1773.
- Santos-Buelga, C., A. M. González-Paramás, et al. (2019). "Plant phenolics as functional food ingredients." *Advances in food and nutrition research* **90**: 183-257.
- Saranya, K. and U. Divyabharathi (2019). "Phytochemical and histochemical screening of *Dodonaea viscosa* leaves." *Pramana Res. J.* **9**: 53-59.
- Saxena, M., J. Saxena, et al. (2013). "Phytochemistry of medicinal plants." *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* **1**(6).
- Schlosser, Š. (2011). *Distillation—from Bronze Age till today. 38th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia May.*
- Sharma, R. A., W. P. Steward, et al. (2007). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin." *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease: 453-470.*
- Shishodia, S., H. M. Amin, et al. (2005). "Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma." *Biochemical pharmacology* **70**(5): 700-713.
- Srivastava, A. K. (2018). *Significance of medicinal plants in human life. Synthesis of Medicinal Agents from Plants, Elsevier: 1-24.*
- Suryanarayana, P., K. Krishnaswamy, et al. (2003). "Effect of curcumin on galactose-induced cataractogenesis in rats." *Mol Vis* **9**(9): 223-230.

- Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, et al. (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**(2): 270-276.
- Serairi-Beji, R., W. Aidi Wannes, et al. (2018). "Antioxidant and hepatoprotective effects of *Asparagus albus* leaves in carbon tetrachloride-induced liver injury rats." *Journal of Food Biochemistry* **42**(1): e12433.
-

T

- Theodore, M. K. and L. Theodore Water Chemistry. *Introduction to Environmental Management*, CRC Press: 143-149.
- Trif, A., F. Muselin, et al. (2007). "The consequences of chronic exposure to aluminium on some morphological biomarkers of reproductive function (body, genital organs, sexual accessory glands weight, seminiferous tubules diameter) in male rats." *Lucrări științifice medicină veterinară* **40**: 652-658.
- Tsialtas, I., V. A. Gorgogietas, et al. (2020). "Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling." *Neurotoxicology* **77**: 114-126.
- Turner, T. T. and J. J. Lysiak (2008). "Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction." *Journal of andrology* **29**(5): 488-498.
- Taverna, G., et al., Mast cells as a potential prognostic marker in prostate cancer. *Disease markers*, 2013. 35.
- Tambe, V. D. and R. S. Bhambar (2014). "Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. wood extracts." *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* **2**(4): 41-47.
- Turner, P. V., T. Brabb, et al. (2011). "Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **50**(5): 600-613.
- Taba, M. Y., S. Mohammadi, et al. (2019). "Effects of different doses of curcumin on testicular histopathology, apoptosis, and reproductive organs weight index in mice D-galactose-induced aging model." *Comparative Clinical Pathology* **28**(4): 997-1002.
- Tanvir, E., M. Hossen, et al. (2017). "Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh." *Journal of Food Quality* **2017**.
- Thompson, J. H. and W. R. Richter (1960). "Hematoxylin-eosin staining adapted to automatic tissue processing." *Stain technology* **35**(3): 145-148.
- Turner, P. V., T. Brabb, et al. (2011). "Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **50**(5): 600-613.
- Teixeira, B., A. Marques, et al. (2013). "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils." *Industrial crops and products* **43**: 587-595.

Tung, B. T., D. T. Nham, et al. (2019). "Curcuma longa, the polyphenolic curcumin compound and pharmacological effects on liver." *Dietary Interventions in Liver Disease*: 125-134.

U

Uboh, F., M. Akpanabiatu, et al. (2007). "Effect of inhalation exposure to gasoline on sex hormones profile in Wistar albino rats." *ACTA ENDOCRINOLOGICA- BUCHAREST*- 3(1): 23.

V

Verma, S., S. Ahmad, et al. (2007). "Acute pancreatitis: A lesser-known complication of aluminum phosphide poisoning." *Human & experimental toxicology* 26(12): 979-981.

Vignal, C., P. Desreumaux, et al. (2016). "Gut: An underestimated target organ for Aluminum." *Morphologie* 100(329): 75-84.

Vota, D. M., R. L. Crisp, et al. (2012). "Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin." *Journal of cellular biochemistry* 113(5): 1581-1589.

Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." *Current medicinal chemistry* 12(10): 1161-1208.

Verma, R. K., P. Kumari, et al. (2018). "Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review." *Int. J. Chem. Stud* 6(4): 1354-1357.

Vidal-Casanella, O., N. Nuñez, et al. (2020). "Characterization of turmeric and curry samples by liquid chromatography with spectroscopic detection based on polyphenolic and curcuminoid contents." *Separations* 7(2): 23.

VSPN_A_E, I. "Method HPLC."

Verma, C., E. Ebenso, et al. (2019). "Alkaloids as green and environmental benign corrosion inhibitors: An overview." *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition* 8(3): 512-528.

Verma, R. J., B. S. Chakraborty, et al. (2008). "Curcumin ameliorates aflatoxin-induced changes in SDH and ATPase activities in liver and kidney of mice." *Acta Pol. Pharm* 65: 415-419.

Versari, A., W. Du Toit, et al. (2013). "Oenological tannins: A review." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19(1): 1-10.

W

- Wang, B., J. Zhao, et al. (2014). "Disturbance of intracellular calcium homeostasis and CaMKII/CREB signaling is associated with learning and memory impairments induced by chronic aluminum exposure." *Neurotoxicity research* **26**(1): 52-63.
- WATER, S. (1998). "Effects of human activities on the interaction of ground water and surface water."
- Wei, X., H. Wei, et al. (2018). "Effect of aluminum exposure on glucose metabolism and its mechanism in rats." *Biological trace element research* **186**(2): 450-456.
- Weisser, K., T. Göen, et al. (2019). "Aluminium toxicokinetics after intramuscular, subcutaneous, and intravenous injection of Al citrate solution in rats." *Archives of toxicology* **93**(1): 37-47.
- Wenwen, X., Y. Jing, et al. (2019). "The effect of magnesium deficiency on neurological disorders: a narrative review article." *Iranian journal of public health* **48**(3): 379.
- Witte, F. (2010). "The history of biodegradable magnesium implants: a review." *Acta biomaterialia* **6**(5): 1680-1692.
- Wu, M., R. E. Gordon, et al. (2010). "Case report: Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nanotubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples." *Environmental health perspectives* **118**(4): 499-504.
- Wal, P., N. Saraswat, et al. (2019). "A detailed insight of the anti-inflammatory effects of curcumin with the assessment of parameters, sources of ROS and associated mechanisms." *Open Medicine Journal* **6**(1).
- Wang, W., A. Bergh, et al. (2004). "Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium." *The Prostate* **61**(1): 60-72.
- Widowati, W., C. T. Sardjono, et al. (2011). Free radicals scavenging activities of spices and curcumin. Proceedings of the Second International Syposium on Temulawak and the 40th Meeting of National Working Group on Indonesian Medicinal Plant.
- Wahl, O. (2016). Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore, Universität Würzburg.
- Wang, Y. (2002). "Epididymal sperm count." *Current protocols in toxicology* **14**(1): 16.16. 11-16.16. 15.
- Wu, D., M. Z. Sun, et al. (2014). "Antioxidant properties of Lactobacillus and its protecting effects to oxidative stress Caco-2 cells." *J Anim Plant Sci* **24**(6): 1766-1771.
- Wahyuni, Y., A.-R. Ballester, et al. (2013). "Secondary metabolites of Capsicum species and their importance in the human diet." *Journal of natural products* **76**(4): 783-793.
- Wang, G.-X., Z. Zhou, et al. (2010). "In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*." *Veterinary Parasitology* **171**(3-4): 305-313.

- Wickenberg, J., S. L. Ingemansson, et al. (2010). "Effects of *Curcuma longa* (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects." *Nutrition journal* 9(1): 1-5.
- Wu, D., M. Z. Sun, et al. (2014). "Antioxidant properties of *Lactobacillus* and its protecting effects to oxidative stress Caco-2 cells." *J Anim Plant Sci* 24(6): 1766-1771.
-

X

- Xu, F., Y. Liu, et al. (2017). "Aluminum chloride caused liver dysfunction and mitochondrial energy metabolism disorder in rat." *Journal of inorganic biochemistry* 174: 55-62.
- Xia, X., G. Cheng, et al. (2007). "Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test." *Journal of ethnopharmacology* 110(2): 356-363.
- Xu, D., M. Luo, et al. (2017). "Cytochalasan and tyrosine-derived alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Westerdykella dispersa* and their bioactivities." *Scientific reports* 7(1): 1-9.
- Xu, Y., B. Ku, et al. (2006). "Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB." *Brain research* 1122(1): 56-64.
-

Y

- Yan-fei, L., L. Jian-yu, et al. (2015). "Effects of Sub-chronic Aluminum Exposure on Renal Structure in Rats." *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 22(2): 47-51.
- Yanagishita, T., Y. Tamada, et al. (2012). "Histological localization of aluminum in topical aluminum chloride treatment for palmar hyperhidrosis." *Journal of dermatological science* 67(1): 69-71.
- Yang, F. and I. Y. Massey (2019). "Exposure routes and health effects of heavy metals on children." *Biometals* 32(4): 563-573.
- Yang, M., L. Jiang, et al. (2014). "Dietary exposure to aluminium and health risk assessment in the residents of Shenzhen, China." *PloS one* 9(3): e89715.
- Yokel, R. A. (2002). "Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese." *Environmental health perspectives* 110(suppl 5): 699-704.
- Yokel, R. A. (2012). "Aluminum in food—the nature and contribution of food additives." *Food Additive, Intech*: 203-228.
- Yokel, R. A. and P. J. McNamara (2001). "Aluminium toxicokinetics: an updated minireview." *Pharmacology & Toxicology: MiniReview* 88(4): 159-167.
-

- Yousef, M. I., K. I. Kamel, et al. (2007). "An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants." *Toxicology* **239**(3): 213-223.
- Yousef, M. I., S. A. Omar, et al. (2010). "Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat." *Food and chemical toxicology* **48**(11): 3246-3261.
- Yu, Z., L. Kong, et al. (2002). "Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice." *Journal of ethnopharmacology* **83**(1-2): 161-165.

Z

- Zhang, Q., Z. Cao, et al. (2016). "Aluminum trichloride induces hypertension and disturbs the function of erythrocyte membrane in male rats." *Biological trace element research* **171**(1): 116-123.
- Zhang, Q., Y. Ding, et al. (2018). "Exposure to alumina nanoparticles in female mice during pregnancy induces neurodevelopmental toxicity in the offspring." *Frontiers in pharmacology* **9**: 253.
- Zhou, Y., W. R. Harris, et al. (2008). "The influence of citrate, maltolate and fluoride on the gastrointestinal absorption of aluminum at a drinking water-relevant concentration: A ²⁶Al and ¹⁴C study." *Journal of inorganic biochemistry* **102**(4): 798-808.
- Zhu, C. Q., J. H. Zhang, et al. (2018). "Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast Al contents in rice." *Frontiers in plant science* **9**: 294.
- Zhu, Y., Y. Li, et al. (2014). "Immunotoxicity of aluminum." *Chemosphere* **104**: 1-6.
- Zaky, A., A. Bassiouny, et al. (2017). "A combination of resveratrol and curcumin is effective against aluminum chloride-induced neuroinflammation in rats." *Journal of Alzheimer's Disease* **60**(s1): S221-S235.
- Zhong, Y. and F. Shahidi (2015). *Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Handbook of antioxidants for food preservation, Elsevier: 287-333.*
- Zhou, L., M. He, et al. (2021). "Molecular Mechanism of Aluminum-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in Rat Cardiomyocytes." *Biological trace element research*: 1-10.
- Zhu, Y., H. Sun, et al. (2014). "Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats." *Life sciences* **102**(1): 36-40.
- Zahan, N. (2017). *Antioxidant and Antimicrobial Investigations of Methanol Extract of Garcinia cowa Stem, East West University.*
- Zhong, Y. and F. Shahidi (2015). *Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. Handbook of antioxidants for food preservation, Elsevier: 287-333.*

Annexes

Annexe A

Les étapes de déshydratation et d'inclusion, ainsi que la série de bains utilisés pour la coloration à l'hématoxyline-éosine sont illustrées dans le tableau annexe 1 et annexe 2 respectivement.

Tableau annexe 1. Les étapes de déshydratation et d'inclusion (Fischer *et al.*, 2008).

Étapes	Produits chimiques	Durée (h: min)
1 ^{er} bain	Formol	1:30
2 ^{eme} bain	Ethanol 75%	1:30
3 ^{eme} bain	Ethanol 95%	1:30
4 ^{eme} bain	Ethanol 100%	2
5 ^{eme} bain	Acetone I	1:30
6 ^{eme} bain	Acetone II	1:30
7 ^{eme} bain	Xylene I	1
8 ^{eme} bain	Xylene II	1
9 ^{eme} bain	Xylene III	1
10 ^{eme} bain	Paraffine I	1
11 ^{eme} bain	Paraffine II	1:30
12 ^{eme} bain	Paraffine III	1:30

Tableau annexe 2. Série de bains utilisés pour la coloration à l'hématoxyline-éosine (Thompson *et* Richter 1960).

Etapes	Produits chimiques	Duration
Déparaffinage	Toluene I (or xylene)	10min
	Toluene II (or xylene)	10min
Réhydrations	100% ethanol	30 sec
	95% ethanol	30 sec
	Ethanol 75%	30 sec
Rinçage	Eau	5 min
Coloration	Hematoxylin Harris	1 min
	Eau	1 min
	HCl	1 min
	Lithium Bicarbonate	1min
	Eau	1min
	Ethanol 95%	30 sec
	eosine	1 min
Déshydrations	Ethanol 100%	30 sec
Clarification	Toluene (or xylene)	10min

Annexe B

La teneur totale en polyphénols (TTP) a été mesurée en milligrammes d'acide gallique équivalent par gramme de résidu sec (mg GAE/g RS) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure annexe 1), tandis que la teneur en flavonoïdes totaux (TFT) et la teneur des tannins condensés (TTC) (Les anthocyanidines) ont été mesurés en milligrammes catéchine équivalent par gramme de résidu sec (mg CE/g RS) en se référant aux courbes d'étalonnages de la catéchine (figures annexes 2 et 3 respectivement).

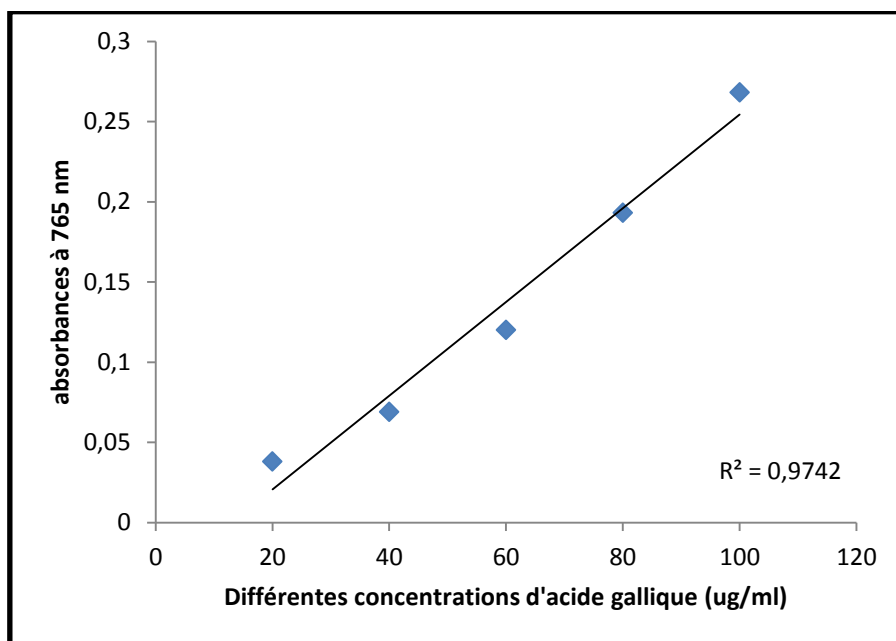


Figure annexe 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

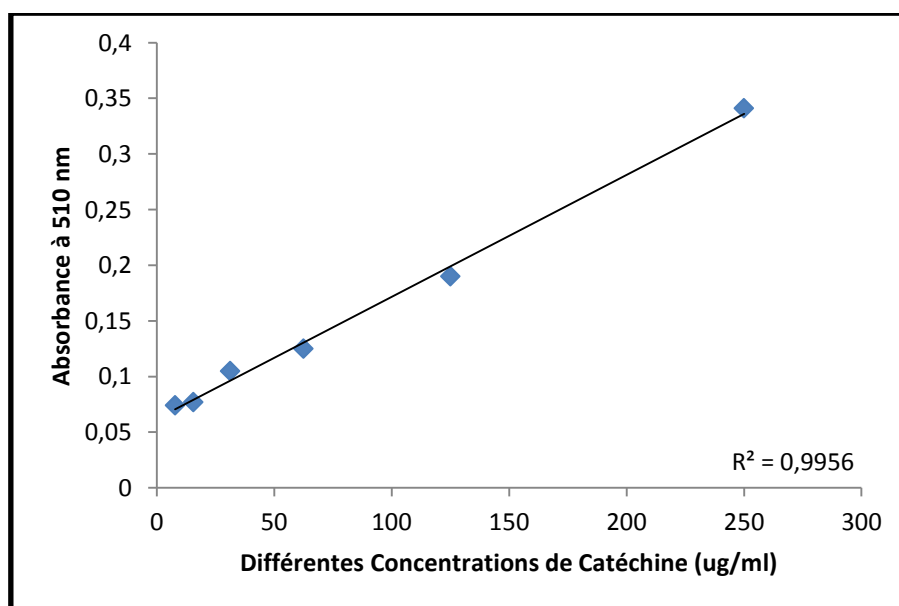


Figure annexe 2. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

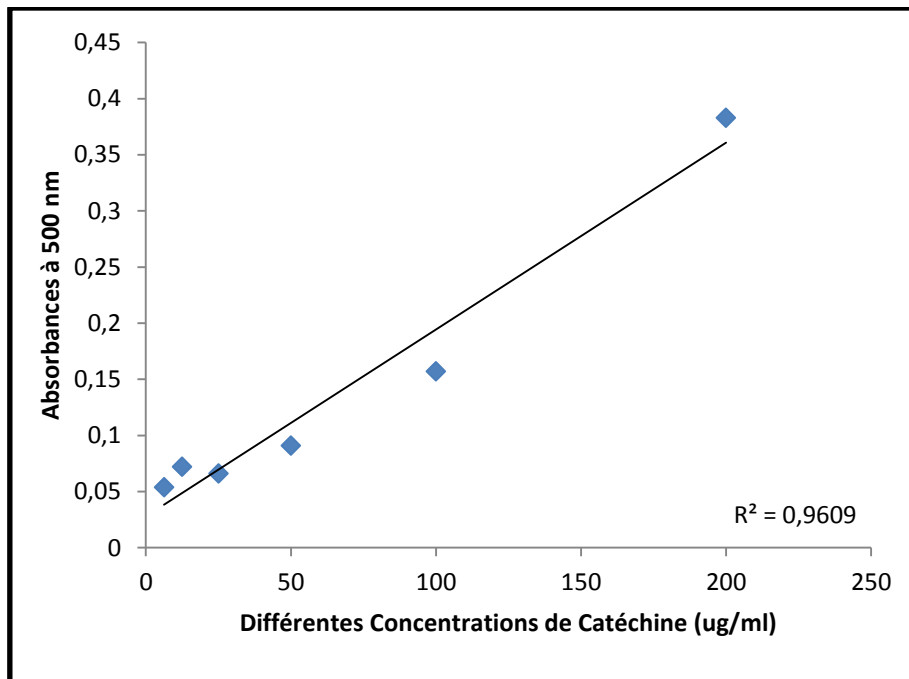


Figure annexe 3. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins condensés (Les anthocyanidines).

GLOSSAIRE

Anosmique : atteint d'anosmie (perte de l'odorat).

Asthénospermie : anomalie du sperme affectant la mobilité des spermatozoïdes.

Azoospermie : anomalie du sperme caractérisée par l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

Cryptorchidie : trouble de la migration du testicule (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum).

Gonadotrophine : toutes les hormones qui stimulent les gonades, ou glandes sexuelles, pour effectuer leurs fonctionnements reproducteurs ou endocriniens.

Gynécomastie : augmentation du volume de la glande mammaire.

Hyperprolactinémie : sécrétion excessive de prolactine

Hypogonadisme hypogonadotrope (HH) : chez l'homme est défini par une synthèse insuffisante des hormones sexuelles (d'origine testiculaire) due à la diminution de la sécrétion des gonadotrophines LH et FSH (hormones hypophysaires)

Hypogonadotropisme : défini par un déficit en testostérone avec des symptômes associés et/ou une diminution de la production de spermatozoïdes.

Microdélétions : définies comme un groupe de syndromes caractérisés par une petite délétion (<5Mb) d'un segment chromosomique couvrant plusieurs gènes délétères, pouvant chacun contribuer indépendamment au phénotype

Oligospermie : anomalie spermatique se caractérisant par une quantité anormalement faible de spermatozoïdes.

Orchi-épididymite : inflammation du testicule et de l'**épididyme**, le plus souvent d'origine infectieuse.

Sarcoïdose : maladie caractérisée par des amas pathologiques de cellules inflammatoires (granulomes) dans de nombreux organes du corps humain

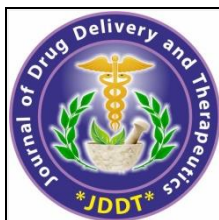
Syndrome de Barry-Perkins-Young : également connu sous le nom d'azoospermie sinopulmonaire, est une affection rare qui englobe une combinaison de syndromes tels que la bronchectasie, la rhinosinusite et une fertilité masculine réduite.

Syndrome de Klinefelter (SK) : anomalie génétique qui n'affecte que les hommes. Il se caractérise par la présence d'un chromosome X surnuméraire lié à une erreur de division au cours de la méiose maternelle ou paternelle.

Syndrome de Kallmann de Morsier (SKM) : maladie génétique du développement embryonnaire caractérisée par l'association d'un hypogonadisme hypogonadotrophique par déficit en gonadolibérine (GnRH) et d'une anosmie (perte de l'odorat).

Tératospermie : anomalie spermatique se caractérisant par des spermatozoïdes présentant des défauts morphologies.

Publications scientifiques

Available online on 15.09.2020 at <http://jddtonline.info>

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

© 2011-18, publisher and licensee JDDT, This is an Open Access article which permits unrestricted non-commercial use, provided the original work is properly cited



Open Access

Research Article

Effect of *Curcuma longa* Aqueous Extract on Male Fertility in Aluminum Exposed Wistar Rats

Farouk BOUDOU^{1,2,*}, Malika BENDAHMANE-SALMI^{1,2}, Mokhtar BENABDERRAHMANE¹, Amal BELAKREDAR¹, Abdelkrim BENALIA², Benali BEGHADLI², AND Bader dine Abdelkrim KANDOUCCI²

1. Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, DjillaliLiabes University of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria

2. Research Laboratory of Environment and Health (RLEH), Faculty of Medicine, Sidi-Bel-Abbes, Algeria

ABSTRACT

To assess the effects of *Curcuma longa* aqueous extract (CE) on fertility in male rats exposed to Aluminum chloride (AlCl₃), Twenty four male rats, 3 months old, divided into 4 groups (n=6) were used. Animal from the first group received, by the oral route, water-containing AlCl₃ at the dose of 34 mg/kg body weight (BW). Rats from the second group received both AlCl₃ at the same dose in combination with oral treatment of CE at a dose of 200 mg/kg BW. The third group received only an oral administration of CE with the same dose. Rats from the fourth group, without any treatment, served as control. After 4 weeks of experimentation, AlCl₃ exposure showed a significant decrease in sperm concentration (4.58±0.65 × 10⁶ cells /ml), and percentage of viability (61.53±23.63 %), and an increase of morphological abnormalities (26.11±17.84 %). A significant decrease in serum testosterone levels (0.31±0.26 ng/ml) and an increase of testicular malondialdehyde (MDA) level (0.16±0.015 μM/g) were also observed. Histological examination of the testes showed degeneration of the seminiferous tubules, germ line cells, and interstitial cells. However, CE treatment concomitant to AlCl₃ showed that the rate of morphological abnormalities (19±2.65 %) is significantly decreased compared to AlCl₃ group, with a significant increase in serum testosterone (1.17±0.24 ng/ml) and a significant decrease in MDA (0.11±0.003 μM/g) level. Microscopic examination revealed a significant regeneration of seminiferous tubules and interstitial cells. This study demonstrated an ameliorative effect of *Curcuma longa* aqueous extract in testicular tissue and sperm quality.

Keywords: *Curcuma longa*, Aluminum, fertility, testosterone, malondialdehyde (MDA), sperm.

Article Info: Received 09 July 2020; Review Completed 12 August 2020; Accepted 19 August 2020; Available online 15 September 2020



Cite this article as:

Boudou F, Bendahmane-Salmi M, Benabderrahmane M, Belakredar A, Benalia A, Beghdadli B, Kandouci BDA, Effect of *Curcuma longa* Aqueous Extract on Male Fertility in Aluminum Exposed Wistar Rats, Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2020; 10(5):11-17 <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4275>

*Address for Correspondence:

Farouk BOUDOU, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, DjillaliLiabes University of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria

INTRODUCTION

Aluminum (Al) is an abundant element in the earth's crust and is widely dispersed throughout the environment. Nowadays, aluminum salts are included in cosmetics, food processing, and storage and also used in various non-prescription drugs¹. It has for a long time been considered on an indifferent element from a toxicological point of view. However, it is unclear whether the normal environmental levels of Al. Aluminum is known as a neurotoxin that can cause certain diseases such as Alzheimer's disease, dialysis dementia, Parkinsonism, and amyotrophic lateral sclerosis². In addition to its neurotoxicity, Al affects other body structures like the skeletal system³, brain tissue, bone, blood cells, liver and kidney^{3, 4}. The sources of Al are especially corn, yellow cheese, salt, herbs, spices, tea, cosmetics, aluminum ware, and containers. Also, Al is widely used in antacid drugs, as well as in food additives and toothpaste¹. Environmental pollution with the different aluminum-

containing compounds, especially those in industrial wastewater, exposes people to higher than normal levels of Al⁵. Aluminum ingestion in excessive amount leads to accumulation in target organs and has been associated with damage of testicular tissues of both humans and animals, with alteration in the histology of testis^{6, 7} deterioration of spermatogenesis and sperm quality; enhancement of free radicals and alterations in antioxidant enzymes^{8, 9, 10} interruptions in sex hormone secretion^{11, 12} and biochemical changes in the testis and other accessory reproductive organs^{13, 14} are some of the aspects suggested that Al exposure harms the reproduction male function. Furthermore, the use of medicinal plants is a great contribution to treat primary medical problems. A variety of plants are claimed to have fertility regulating properties¹⁵. One of these plants is *Curcuma longa*. It's belonging to the Zingiberaceae family and has been widely used as a medicine, condiment, and cosmetics worldwide and valued

as a functional food because of its health-promoting potentials. The rhizome of *C. longa*, a traditional medicine used for centuries in the Indian subcontinent, has been scientifically validated for its antioxidant, antimicrobial, antiarthritic, anticancer, carminative, stomachic, tonic, analgesic, hemostatic and anti-inflammatory activities¹⁶. The beneficial properties of *C. longa* have been associated with antioxidant activity^{17, 18}. And most of the studies performed on *C. longa* focused on curcuminoid components which comprised curcumin, dimethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin¹⁹. The most important feature of curcumin is that it has no side effects despite being a therapeutic agent with multiple beneficial functions. It acts as a scavenger of free radicals²⁰. Curcumin is considered to be an effective antioxidant against oxidative tissue damage. It can significantly inhibit the generation of reactive oxygen species (ROS) both *in vitro* and *in vivo*²¹. Based on the bibliographic database, our research work tends to assess the beneficial effects of *Curcuma longa* aqueous extract on Aluminum chloride-induced damages in the testis of adult male rats.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Curcuma longa* aqueous extract (CE)

25 g of the powder is boiled in 250 mL (100 °C) water bath reflux system for 15 min and then filtered with N°1 Whatman Millipore filter paper. The filtrate is combined, centrifuged at 4000 rpm for 20 min, the supernatant is concentrated to dryness using a rotary evaporator and the residue is stored at 4 °C until use. This procedure was repeated weekly throughout the study²².

Animals and experimental design

Experiments were carried out on 24 albino mature males, aged 3 months and weighing 193.9 ± 26.46 g. The animals were housed in a room with a 12/12-hour light/ dark cycle, at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and had access to *ad libitum* to water and special rodent pellet diet (15% proteins). Rats were randomly allocated into 4 groups, with 6 rats in each group. The 4 groups were: AlCl₃ group, received 1/25 LD₅₀ of Aluminum chloride at a dose of 34mg/kg BW²³; Al+CE group receiving orally both AlCl₃ at the same dose and 1/25 LD₅₀ of CE at a dose of 200 mg/kg BW²⁴; the third group received only CE at the same dose and route as the previous group; and control group (CONT) without any treatment. All the experiments lasted for 30 days.

Biological samples collection

At the end of the experiment, the animals were sacrificed in the morning after fasting for 12 hours and anesthetizing with diethyl ether in a large desiccator²⁵. After incision of the abdomen, blood is collected from the inferior cava vena for the determination of testosterone level by using immunoassay commercial kits (VIDAS Assays, BIOMERIEUX). The testicles are carefully removed, separated from their epididymis, and rinsed with cold saline solution. The right ones were used for histological study according to standard techniques, after fixation in fixative solution (formalin 1/10), paraffin embedding, and staining with hematoxylin-eosin¹⁵. While the left ones are used to prepare tissue homogenate, by grinding 1 g of testis in 5 mL of 0.01M phosphate buffer

pH 7.4 at 4°C, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was kept frozen (-20 °C) to be used for the ulterior determination of malondialdehyde (MDA) level as described by Azad et al., (2019)²⁶. The epididymis of each rat was placed in a petri dish, cut with scissors, and homogenized in 1 mL of physiological saline solution (0.9%) at 35-37 °C for 15 min to form the sperm suspension. Semen characteristics, including sperm count, percent viability, and sperm morphology, were evaluated according to Wang, (2002)²⁷.

Statistical Analysis

Results were represented as mean \pm SD. The data were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni t-test using SigmaPlot version 11.0. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Table 1 shows that all semen parameters of the AlCl₃ exposed group were significantly affected compared to the other experimental groups. A significant decreased in sperm count, percent viability, and an increase in sperm abnormal morphology were showed in the AlCl₃ group compared to control. However, a significant improvement was observed in the sperm morphology of the animals belonging to the AlCl₃+CE group comparatively to the group of rats exposed to only AlCl₃. But, no significant changes were observed in sperm count and percentage of viability between these two groups. For the Hormonal assay, the results showed that the administration of AlCl₃ significantly decreased serum testosterone levels (0.31 ± 0.26 ng/ml) as compared with the other experimental groups. *Curcuma longa* treatment showed a very significant increase in serum testosterone of the CE group (3.16 ± 3.05 ng/ml) and an important improvement in this hormone level in the Al+CE group (1.17 ± 0.24 ng/ml) (Figure 1). Figure 2 showed that AlCl₃-administration for 30 days significantly increased the MDA level (0.16 ± 0.015 $\mu\text{M/g}$) as compared to the controls (0.14 ± 0.002 $\mu\text{M/g}$). On the contrary, AlCl₃ concomitant with *Curcuma longa* treatment led to a significant reduction in MDA level (0.11 ± 0.003 $\mu\text{M/g}$). Histological study in the testicles reveals a normal architecture in control and CE groups (Figures 3 and 6) showing seminiferous tubules richly populated with a healthy appearance. All stages of the spermatogenic lines cells such as spermatogonia, spermatocyte, spermatids, and spermatozoa, even Sertoli cells could be identified in the seminiferous tubules. Lumen could easily be delineated in almost all the tubules and the majority of them were filled by mature spermatozoa. While the observation of histological sections of the AlCl₃exposed group (Figure 4) shows that all these stages are affected. Among the disturbances reported: degeneration of the seminiferous tubules, a total absence of sperm and/or a low sperm count, with large interstitial spaces and lack of Lydig cells around basement membranes. However, *Curcuma longa* administration to rats concomitantly exposed to AlCl₃ (Figure 5), shows a significant regeneration of the majority of seminiferous tubules structure and interstitial cells, with a good development of the spermatogenesis indicated by sperm-filled lumens of seminiferous tubes.

Table 1: Semen parameters of the different experimental groups

Parameters	Groups			
	AlCl ₃	AlCl ₃ +CE	CE	CONT
Sperm count (10 ⁶ /ml)	4.58±0.65 ^a	5.80±0.56 ^a	9.30±0.35 ^b	11.52±0.77 ^b
Morphology (abnormal %)	26.11±17.84 ^a	19±2.65 ^b	21±1.00 ^b	16.67±1.53 ^b
Viability (%)	61.53±23.60 ^a	67.33±5.03 ^a	66.67±4.93 ^b	76.33±6.51 ^c

AlCl₃: Aluminum chloride exposed group; AlCl₃+CE: Al and *Curcuma longa* aqueous extract exposed group; CE: Only *C. longa* aqueous extract-treated group; CONT: a control group with no treatment. Data are expressed as means ± SD (n=6). A comparison between groups was made using the Bonferroni t-test. Column not sharing a common letter (a-c) differ significantly at p < 0.05 (Bonferroni t-test).

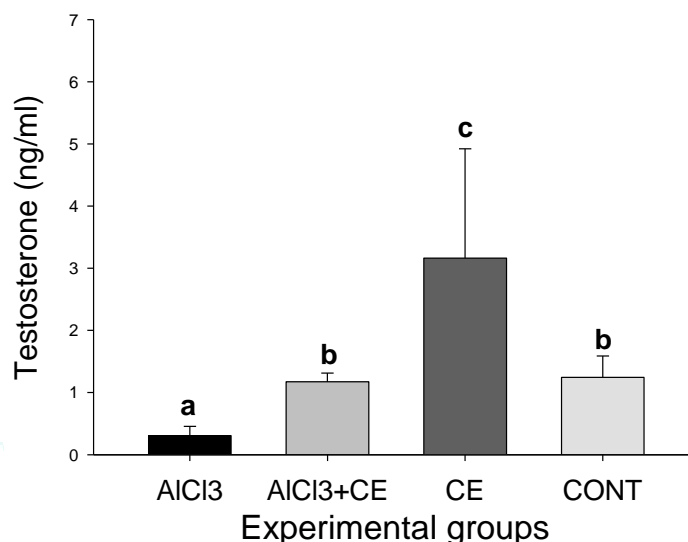


Figure 1: Evaluation of Testosterone level in different experimental groups. AlCl₃: Aluminum chloride exposed group; AlCl₃+CE: Al and *Curcuma longa* aqueous extract exposed group; CE: Only *C. longa* aqueous extract-treated group; CONT: a control group with no treatment. Data are expressed as means ± SD (n=6). A comparison between groups was made using the Bonferroni t-test. Column not sharing a common letter (a-c) differ significantly at p < 0.05 (Bonferroni t-test).

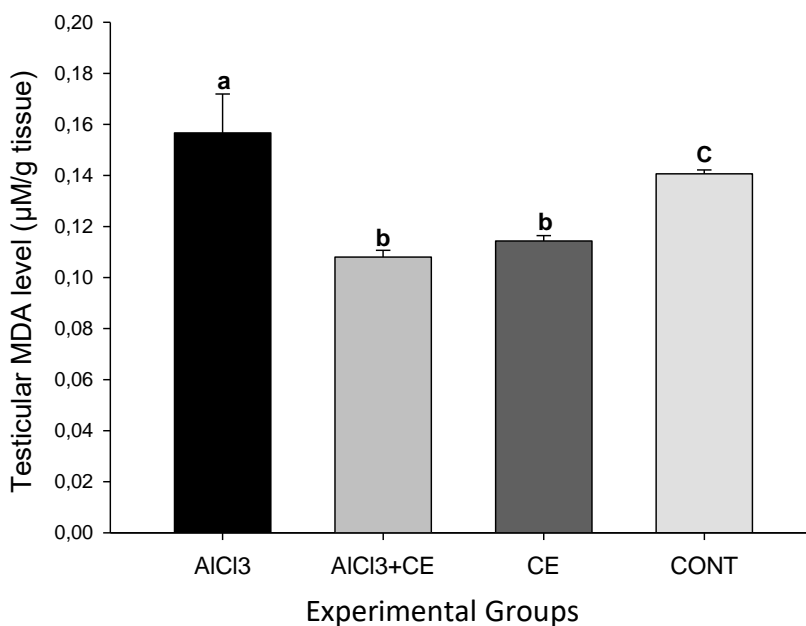


Figure 2: Evaluation of Testicular Manoldyaldehyde (MDA) levels in different experimental groups. AlCl₃: Aluminum chloride exposed group; AlCl₃+CE: Al and *Curcuma longa* aqueous extract exposed group; CE: Only *C. longa* aqueous extract-treated group; CONT: a control group with no treatment. Data are expressed as means ± SD (n=6). A comparison between groups was made using the Bonferroni t-test. Column not sharing a common letter (a-c) differ significantly at p < 0.05 (Bonferroni t-test).

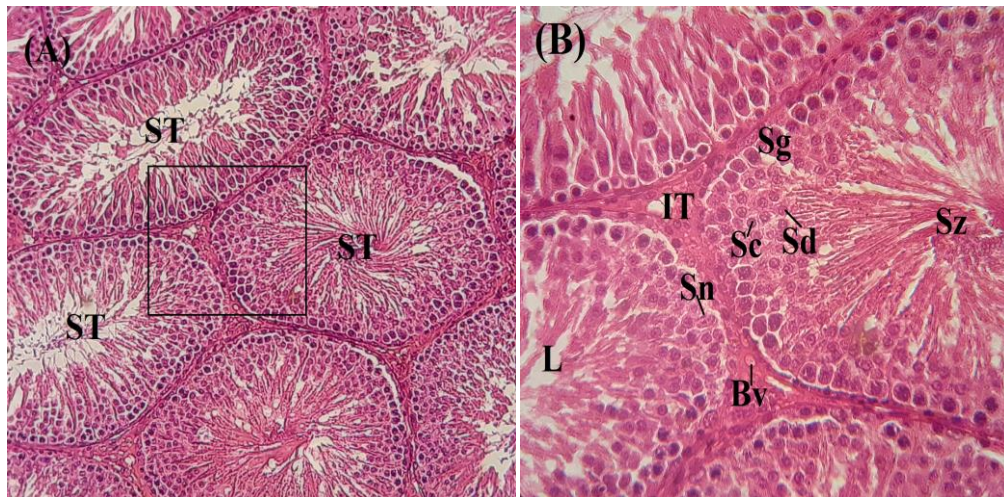


Figure 3: (A)-(B) Microscopic observation of Haematoxylin and eosin stained sections of the control rat testis. (A): Normal architecture and seminiferous tubules filled with sperm (ST) $\times 10$. (B): Higher magnification ($\times 40$) of the inbox of (A) showing the normal progression of spermatogenesis from spermatogonia (Sg) to spermatozoa (Sz) via spermatocytes (Sc) and spermatids (Sd). Interstitial tissue (IT) formed by Leydig cells and blood vessels (Bv). The Sertoli cell nucleus (Sn) and the lumen of the seminiferous tube (L).

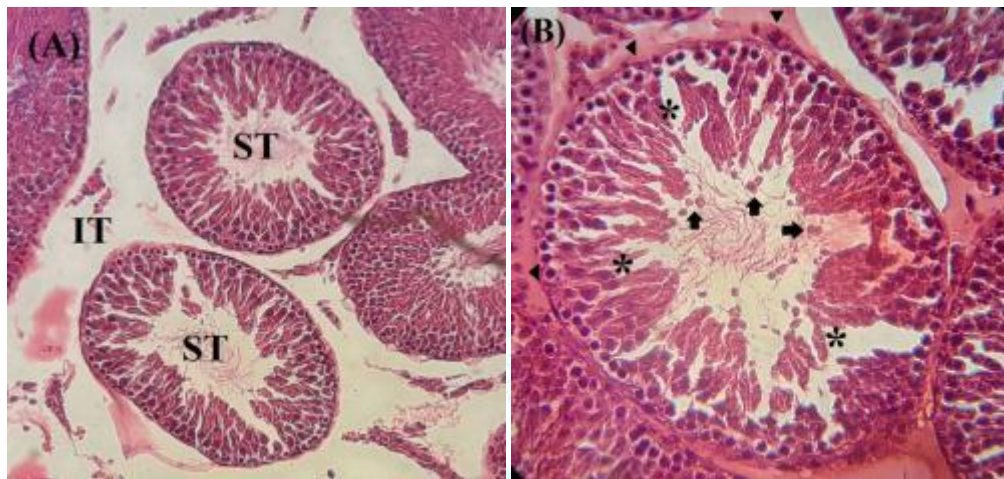


Figure 4: (A)-(B) Microscopic observation of Haematoxylin and eosin stained sections of AlCl_3 -exposed rat testis. (A): Showing a lack of Leydig cells with a large interstitial space (IT) and seminiferous tubules with sperm depletion (ST) ($\times 10$). (B): Showing disorganization of germinal epithelium (asterisks), lack of Leydig cells, and degeneration of interstitial tissue (arrowheads) with some exfoliated cells in the lumen (arrows) ($\times 40$).

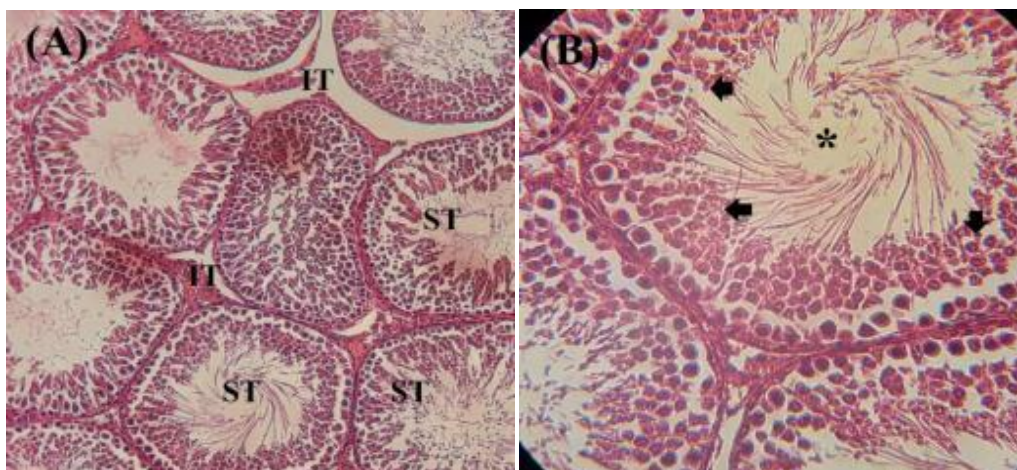


Figure 5: (A)-(B) Microscopic observation of Haematoxylin and eosin stained sections of both Aluminum and *Curcuma longa* treated rat testis (AlCl_3 -CE). (A): showing regeneration of the majority of seminiferous tubules (ST) and interstitial cells and reduction of interstitial space (IT) ($\times 10$). (B): showing a good development of the spermatogenesis (arrows) and lumens of seminiferous tubes filled with sperm (asterisk) ($\times 40$).

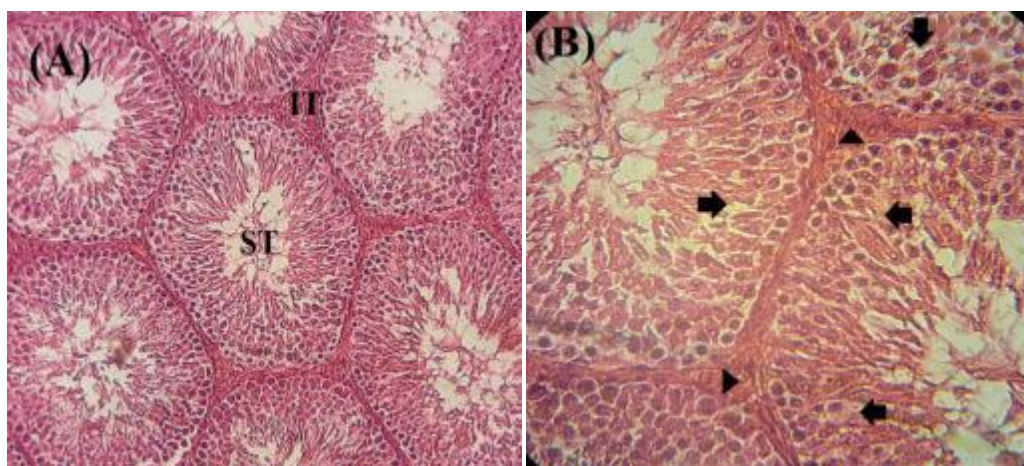


Figure 6: (A)-(B) Microscopic observation of Haematoxylin and eosin stained sections of only *Curcuma longa* treated rat testis (CE). (A): Showing a normal architecture approaching the normal state as in controls, with seminiferous tubules (ST) populated with spermatozoa, and interstitial tissue rich with Leydig cells with reduced interstitial space. (B): thick and well-structured germinal epithelium (arrows) and interstitial tissue rich with Leydig cells with reduced interstitial space (arrowheads) ($\times 40$).

DISCUSSION

The current study revealed that the administration of $AlCl_3$ at the dose of 34 mg/kg BW to male rats during 4 weeks led to many reproductive system disorders including a decrease in sperm quality, hormonal disturbances, and induction of tissue oxidative stress. A significant decrease in sperm count, percent viability, and an increase in sperm abnormal morphology were observed. These results are in accordance with those obtained by Abdul-Rasoul, *et al.*, (2009)²⁸ who revealed that a daily administration of Aluminum chloride with two doses 40 and 80 mg/kg body weight induced a significant reduction in sperm concentration and percentage of live sperm, associated with a significant increase in the percentage of abnormal sperm. Another research conducted by Martinez *et al.*, (2017)²⁹ found that exposure to aluminum for 60 days at human dietary levels (1.5, 8.3 and 100 mg/kg BW/day) affects the sperm quality in rats by decreasing sperm count, sperm motility, and sperm morphology, with an increase in oxidative stress and inflammation in reproductive organs. They found also that a low concentration of Al (3.35 μ g/g) in testes is sufficient to impair spermatogenesis. Moreover, Miska-Schramm *et al.*, (2017)³⁰ by using the Bank Vole (*Myodesglareolus*) as a rodent model indicate that $AlCl_3$, at a dose of 3 and 200 mg/l, impairs adult reproductive abilities by decreasing the quality and quantity of sperm cells and by causing morphologically abnormal development of the gonads. Also, Guo *et al.*, (2005)¹² indicated that aluminum exposure leads to an increase in nitric oxide (NO) products which were responsible for Al-induced reproductive toxicity. Zhu *et al.*, (2005)³¹ suggested that sub-chronic $AlCl_3$ disorders the balance of trace element and decreases the spermatogenesis and testicular enzyme activities which have adverse effects on the testicular function in male rats. On the other hand, the results of the current study indicated that the administration of $AlCl_3$ significantly decreased serum testosterone levels compared to control rats. These findings are consistent with those of Sun *et al.* (2011)³², who noticed a significant decrease in the levels of testosterone, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) after 120 days of exposition to three doses (64.18, 128.36 and 256.72 mg/kg) of aluminum and explain that Al-exposure interferes with androgen receptor expressions in testes. Another work indicated that $AlCl_3$ caused a significant decrease of FSH, LH, and testosterone, and caused the development of

oligospermia and exfoliated tubules in the testis³³. Hadyet *et al.*, (2020) noticed a significant decrease in testosterone and LH hormones after 60 days of $AlCl_3$ (20 mg $AlCl_3$ /kg b.w.) administration. They indicate that aluminum harms the steroidogenesis by increasing the production of nitric oxide which might inhibit LH levels. Knowing that, testosterone hormone is released from the Leydig cells by stimulation of LH, its reduction results in the decline of serum testosterone concentration. Moreover, our study showed that Al exposure caused an elevation in the MDA level compared to the other experimental groups. Our finding is confirmed by those of Akayet *et al.*, (2016)³⁴ who concluded that subchronic exposure to Al (75 mg/kg/day during 30 days) lead to a significant decrease on antioxidant enzymes such as SOD and GPx, and a significant increase in MDA levels compared to control group. This imbalance between the antioxidant system and oxidants leads to oxidative stress which has a destructive effect on the testis. The work of Afolabi *et al.*, (2018)³⁵ on Aluminum phosphide, indicated that oral administration of Al (1.15mg/kg) during 30 days resulted in a significant increase in testicular MDA and oxidized protein levels with a decrease in antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx followed by a significant reduction in non-enzymatic antioxidants. While, the observation of histological sections of the $AlCl_3$ exposed group shows the degeneration of the seminiferous tubules and depletion of sperm in the seminiferous lumen, with large interstitial spaces and lack of cells Leydig around basement membranes. These results are following those obtained by Moselhy *et al.*, (2012)²³ who demonstrated after histopathological examination of rats testis exposed to a daily dose (34 mg/kg) of $AlCl_3$ during 60 days, revealed degenerative changes in seminiferous tubules with necrosed spermatogenic cells. On the other hand, our result showed that the treatment with *Curcuma longa* aqueous extract at a dose of 200 mg/kg body weight concomitant with $AlCl_3$ exposure, led to significant improvement of some semen parameters with a significant elevation of serum testosterone and a decrease in MDA level. Furthermore, Histologic analysis showed a significant regeneration of the majority of seminiferous tubules and interstitial cells, with a good development of the spermatogenesis indicated by lumens of seminiferous tubes filled with sperm. These findings are in agreement with those of Cheraghi *et al.*, (2017)³⁶ who concluded that curcumin, the major constituent of *Curcuma longa*, significantly reversed the

adverse effects of Al on testis and sperm quality. and explained that curcumin exhibits protective effects against oxidative damage by decreasing the levels of free radicals, through its free radical scavenging activity, particularly against oxygen radicals, which inhibit sulfhydryl (SH)-group oxidation. It inhibits nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity, cyclooxygenase-2 (COX-2), and mitogen-activated protein kinase (MAPK) expression, while it modulates the release of several cytokines and testicular enzyme activities, mRNA expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSD). Besides, Belhan *et al.*, (2017) finding confirmed the protective effect of curcumin and indicated that low dose curcumin (10 mg/kg) significantly increased sperm motility and concentration, and decreased abnormal sperm percentage with a significant suppressing of the lipid profile and an increase in testosterone levels. Furthermore, to assess the protective effect of curcumin on lead acetate-induced (50 mg/kg BW) reproductivity, Sudjarwo *et al.*, (2017)³⁷ found that daily oral administration of curcumin at three doses (100, 200 and 400mg/kg) during 40 days to rats significantly improved the histopathological structure of testis, increased the sperm count, motility, viability, and also significantly increased the SOD, GPx, and decreased MDA in the testis of lead acetate-treated rats. They concluded that co-administration of curcumin at a dose of 400 mg/kg reduced the effects of lead acetate-induced testicular toxicity, possibly by inhibiting the free radical mediated process. In addition to the protective effect of *C. longa* on male reproductive function, a study also shows that the ethanolic extract of *C. longa* (100 mg/kg BW) successfully prevents female albino Wistar rats against bisphenol A-inducing reproductive toxicity³⁸. Another study indicates also that *Curcuma longa* does not only possess a non-toxic effect but has cytoprotective effects on the histoarchitecture of the testes in diabetic rats³⁹. By studying the effects of different doses of curcumin 25, 50, and 100 mg/kg during 14 days on reproductive organ weight index, testicular histopathology and apoptosis in a mouse aging model. Taba *et al.*, (2019)⁴⁰ indicated that Curcumin supplementation (2 weeks, 100 mg / kg) induced improvement in biochemical markers and sperm parameters as well as reduction of apoptosis in testicular tissue.

CONCLUSION

The current study demonstrated that *Curcuma longa* aqueous extract had a remarkable protective effect against AlCl₃ reproductive toxicity and its mechanism is related, at least in part, to its high free radical scavenging and antioxidant activity. Further works are necessary to isolate bioactive compounds and elucidate the mechanism involved in the reprotective activity of this plant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Mestaghanimi, H., et al., *Effects of aluminium chloride on some essential elements in pregnant rats and their offspring*. Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, 2002; 22(4):227-234.
- Abbasali, K., T. Zhila, and N. Farshad, *Developmental toxicity of Aluminum from high doses of AlCl₃ in mice*. J. Applied Res., 2005; 5:575-579.
- Mestaghanmi, H., S. El-Amrani, and R. Saile, *Effects of aluminium chloride administration during gestation in rat*. Stal, 2002; 27:73-81.
- Mahieu, S., et al., *Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration*. Journal of inorganic biochemistry, 2005; 99(9):1858-1864.
- Klöppel, H., A. Fliedner, and W. Kördel, *Behaviour and ecotoxicology of aluminium in soil and water-Review of the scientific literature*. Chemosphere, 1997; 35(1-2):353-363.
- Buraimoh, A.A., et al., *Histological study of the effects of aluminium chloride exposure on the testis of wistar rats*. American International Journal of Contemporary Research, 2012; 2(5):114-122.
- Kutlubay, R., et al., *Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium*. International Journal of Toxicology, 2007; 26(4):297-306.
- Yousef, M.I., A.M. El-Morsy, and M.S. Hassan, *Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid*. Toxicology, 2005; 215(1-2):97-107.
- Yousef, M.I., et al., *An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants*. Toxicology, 2007; 239(3):213-223.
- Yousef, M.I. and A.F. Salama, *Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats*. Food and chemical toxicology, 2009; 47(6):1168-1175.
- Shahraki, M., S. ZAHEDIASL, and A. Sarkaki, *The effect of aluminum injection in lateral ventricle on sex hormones in male rat*. 2004.
- Guo, C.-H., et al., *Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice*. Environmental toxicology and pharmacology, 2005; 19(1):33-40.
- Chinoy, N., R. Momin, and D. Jhala, *Fluoride and aluminium induced toxicity in mice epididymis and its mitigation by vitamin C*. Fluoride, 2005; 38(2):115-121.
- Chinoy, N., H. Sorathia, and D. Jhala, *Fluoride+ aluminium induced toxicity in mice testis with giant cells and its reversal by vitamin C*. Fluoride, 2005; 38(2):109-114.
- Boudou, F., et al., *Ameliorative effects of Syzygium aromaticum essential oil on fertility in male rats exposed to manganese*. Advances in sexual medicine, 2013. 2013.
- Bagad, A.S., et al., *Comparative evaluation of anti-inflammatory activity of curcuminoids, turmerones, and aqueous extract of Curcuma longa*. Advances in pharmacological sciences, 2013. 2013.
- Ramirez-Tortosa, M., et al., *Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999; 147(2):371-378.
- Patil, M., et al., *Extraction, isolation and evaluation of anti-inflammatory activity of Curcuminoids from Curcuma longa*. International Journal of Chemical Sciences and Applications, 2011; 2(3):172-174.
- Devasagayam, T.P., J.P. Kamat, and N. Sreejayan, *Antioxidant action of curcumin*. Micronutrients and health: molecular biological mechanisms, 2001; 42-59.
- Slemmer, J.E., et al., *Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging*. Current medicinal chemistry, 2008; 15(4):404-414.
- Joe, B. and B. Lokesh, *Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1994; 1224(2):255-263.
- Serairi-Beji, R., et al., *Antioxidant and hepatoprotective effects of Asparagus albus leaves in carbon tetrachloride-induced liver injury rats*. Journal of Food Biochemistry, 2018; 42(1):e12433.
- Moselhy, W., et al., *Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminium chloride in albino male rats*. Reproduction in domestic animals, 2012; 47(2):335-343.
- Govind, P., *Active principles and median lethal dose of Curcuma longa Linn*. Internafional Research Journal of Pharmacy, 2011; 2(5):239.
- Kim, E.-J., et al., *An improved dehydroepiandrosterone-induced rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS): Post-pubertal improve PCOS's features*. Frontiers in Endocrinology, 2018; 9:735.
- Azad, F., et al., *Antioxidant and anti-apoptotic effects of royal jelly against nicotine-induced testicular injury in mice*. Environmental toxicology, 2019; 34(6):708-718.
- Wang, Y., *Epididymal sperm count*. Current protocols in toxicology, 2002; 14(1):16.6.1-16.6.5.
- Abdul-Rasoul, E.M., N.H. Hassan, and K.H. Al-Mallah, *Effect of aluminium chloride on sexual efficiency in adult male rats*. JOURNAL OF EDUCATION AND SCIENCE, 2009; 22(4):27-44.

29. Martinez, C.S., et al., *Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats*. Reproductive Toxicology, 2017; 73:128-141.
30. Miska-Schramm, A., J. Kapusta, and M. Kruczek, *The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (Myodes glareolus)*. Biological trace element research, 2017; 177(1):97-106.
31. Zhu, Y., et al., *Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats*. Life sciences, 2014; 102(1):36-40.
32. Sun, H., et al., *Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats*. Biological trace element research, 2011; 144(1-3):1050-1058.
33. Al-Eisa, R. and H. Al-Nahari, *The attenuating effect of royal jelly on hormonal parameters in aluminum chloride (AlCl₃) intoxicated rats*. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences, 2017; 6(2).
34. Akay, C., et al., *Oxidative effects of aluminum on testes and erythrocytes in rats*. Trace Elements and Electrolytes, 2016; 33(4):155.
35. Afolabi, O.K., et al., *Aluminium phosphide-induced testicular toxicity through oxidative stress in Wistar rats: Ameliorative role of hesperidin*. Toxicology Research and Application, 2018; 2:2397847318812794.
36. Cheraghi, E., et al., *Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in Wistar rats: ameliorative effects of curcumin*. International journal of fertility & sterility, 2017; 11(3):166.
37. Sudjarwo, S.A. and K. Giftania Wardani Sudjarwo, *Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats*. Research in Pharmaceutical Sciences, 2017; 12(5):381.
38. BENALIA, A., et al., *The Protective Effect of Curcuma longa (L.) against Bisphenol A-Induced Reproductive Toxicity in Adult Female Albino Wistar Rats*. Journal of Biochemistry International, 2017; 63-72.
39. Olanrewaju, A., et al., *Testicular cytoprotective activities of Curcuma longa in STZ-induced diabetic adult male wistar rats*. Anatomy Journal of Africa, 2017; 6(1):905-913.
40. Taba, M.Y., et al., *Effects of different doses of curcumin on testicular histopathology, apoptosis, and reproductive organs weight index in mice d-galactose-induced aging model*. Comparative Clinical Pathology, 2019; 28(4):997-1002.



THE IMPACT OF ALUMINUM CHLORIDE SUB-ACUTE EXPOSURE ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS

*Boudou F,^{1,2} Bendahmane-Salmi M,^{1,2} Benabderrahmane M¹,
Benalia A,^{1,2} Beghdadli B.²

¹Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, DjillaliLiabes University of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria.

²Research Laboratory of Environment and Health (RLEH), Faculty of Medicine, Sidi-Bel-Abbes, Algeria.

*Author for Correspondence: farouk.boudou@univ-sba.dz

ABSTRACT

In order to elucidate the Aluminum chloride (AlCl₃) male reproductive toxicity mechanisms, twelve mature male rats were divided into 2 groups (n=6). The first group received orally AlCl₃ (34 mg/kg body weight) while rats from the second group, without any treatment, served as control. After 30 days of experimentation, AlCl₃ exposure showed a significant decrease in body weight. Semen analysis showed a significant decrease in sperm count ($4.58 \pm 0.65 \times 10^6$ cells/mL), sperm viability (61.53 ± 23.63 %), and a significant increase in morphological abnormalities (26.11 ± 17.84 %), with a predominance of head (14.54 ± 8.38 %) and flagellum defects (14.22 ± 20.60 %). Sperm DNA integrity analysis revealed a high percentage of fragmented DNA (69.05 ± 4.36 %). Hormones analysis showed a significant decreased in serum testosterone (0.31 ± 0.26 ng/ml) and an increase in luteinizing hormone (LH) (0.56 ± 0.47 mUI/mL) levels, whereas, no significant changes were observed in follicle stimulating hormone (FSH) level. A significant elevation in testicular malondialdehyde (0.16 ± 0.015 μM/g) and catalase activity levels (69 ± 14.29 mM H₂O₂/min/mg) were also observed. Degeneration of testicular epithelial and interstitial tissues was observed, with an increase in apoptotic cells, and an inflammatory state revealed by leukocytic infiltration in epididymal tissue. We suggest that sub-acute exposure to AlCl₃ affects the Leydig cells which results in the decrease in testosterone level and an increase in LH Level as a response to the interruption of testosterone negative feedback. Low testosterone level affects the spermatogenesis and causes the appearance of an inflammatory reaction in response to the increase rate of apoptosis in the epididymal epithelial tissue.

Keywords: Aluminum, Testis, Epididymis, Sperm, Hormones.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the earth's crust and is omnipresent in our environment, including our food (Klein 2019). It is readily available for human ingestion through the use of food additives, gastric antacid drugs, buffered aspirin, astringents, nasal sprays, and antiperspirants; from drinking water; from automobile exhaust and tobacco smoke; and from using aluminum foil, aluminum cookware, cans, ceramics, and fireworks (Baby et al. 2010). It has for a long time been considered on an indifferent element from a toxicological point of view (Yousef 2004). However, in the 70s the nephrological community was alerted for the first time to the occurrence of an epidemic human pathology induced by acute aluminum poisoning in patients undergoing hemodialysis (Seidowsky et al. 2018). Then the neurotoxicity

of aluminum was clearly stated. Aluminum is known as a neurotoxin that can cause certain diseases such as Alzheimer's disease, dialysis dementia, Parkinsonism, and amyotrophic lateral sclerosis (Kawahara et al. 2011). Al accumulation in tissues and organs results in their dysfunction and toxicity (Pandey et al. 2013). Studies carried out to determine the mechanisms of Al-induced neurodegeneration and its relationship to Alzheimer's disease indicate that Al toxicity is mediated through reactive oxygen species (ROS) production. ROS induce instability of the cell membrane (Kim et al. 2006), destruction of DNA structures (Takabe et al. 2001), and DNA damages (Kawanishi et al. 2001). They also induce toxicity in humans and other living organisms by interfering with the activity of vital enzymes (Machida et al. 2010). Although the knowledge of Al toxicity has markedly improved in recent years; however, information concerning the mechanism of male

reproductive toxicity *in vitro* of this element is still very limited. Cheraghi et al. (2017) reported that it can be concluded that Al causes reproductive dysfunction by creating oxidative damage. Al cytotoxicity may be mediated by free radicals derived from this element and its capability to induce apoptosis through a wide variety of mechanisms including production of ROS, LPO, cell membrane damage, diminished activity of alkaline phosphatase and cAMP reduction in various tissues (Pandey et al. 2013; Savory et al. 2003). Chronic AlCl₃ exposure caused deterioration in sperm motility and viability, enhancement of free radicals and alterations in enzymes activities. Aluminum was shown to exert a pro-oxidant activity and promotes biological oxidation both *in vitro* and *in vivo* (Exley 2004). Therefore, the aim of the current study is to elucidate the Aluminum chloride sub-acute exposure mechanisms of male reproductive toxicity *in vivo* by a biochemical, serological, cytological and histological approaches.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Experiments were carried out on twelve Wistar mature males, aged of 3 months and weighing 191.63 ± 38.03 g. The animals were housed in room with a 12/12-hour light/ dark cycle, at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and had access to *ad libitum* to water and special rodent pellet diet (15% proteins). Rats were randomly allocated into 2 groups, with 6 rats in each group. The first group received, by oral route, water-containing AlCl₃ at the dose of 34 mg/kg body weight (b.w.) according to Moselhy et al. (2012), and control group without any treatment. All the experiment lasted for 30 days during which animal weight was measured every week.

Specimens and Analytical methods

At the end of the experiment, animals were euthanized using diethyl ether in a large desiccator (Kim et al. 2018). Testis and epididymis were carefully removed, separated from their fat tissues, rinsed with saline solution, and weighed in order to calculate the corresponding index (organ weight/body weight ratio) according to Qin et al. (2013). Blood was collected from the inferior cava vena for the

determination of testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH) levels by mean of immunoassay commercial kits (VIDAS Assays, BIOMERIEUX). Semen samples were collected by maceration of the epididymis in physiological saline solution (0.9%) at 35-37 °C for 15 min to form the sperm suspension. Semen characteristics, including sperm count and percent viability were evaluated according to Wang (2002) and Soleimanzadeh et al. (2013) respectively. The sperm abnormalities were classified in order of importance as follows: head, middle piece and flagella. As soon as an anomaly is identified, the spermatozoa are directly classified in the “abnormal” (Al-Ani et al. 2009). Evaluation of testicular oxidative stress markers: malondialdehyde (MDA) and catalase activity (CAT) were measured in testicular homogenate as described by Azad et al. (2019). Testicular and epididymal histological study was performed according to standard techniques, after fixation in fixative solution (formalin 1/10), paraffin embedding, and staining with hematoxylin-eosin (Ghosh et al. 2019).

Statistical analysis

The mean \pm SD values were calculated for each group to determine the significance of intergroup difference. Each parameter was analyzed separately using one way analysis of variance (ANOVA). To find the difference between the groups Bonferroni t-test was used. *P* values <0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Effect of Aluminum on body weight and organ index

Table 1 showed that before embarking on the experiment, the two groups had no significant difference in body weight ($p>0.05$). From the second week, administration of AlCl₃ caused a significant decrease ($p<0.001$) in body weight of rats as compared to the controls. However, no significant changes were observed in both testis and epididymis index between the two groups.

Table 1. Effect of AlCl₃ exposure on body weight and testicular index

Groups	Body weight (g)					Testis index	Epididymis index
	W ₀	W ₁	W ₂	W ₃	W ₄		
AlCl ₃	202.3±45.22	209.8±27.91	229.8±32.60	247.5±30.40	226.33±24.65	0.58±0.06	0.31±0.03
CONTROL	189.5±6.40	217.5±3.50	257±1.43	275.5±9.21	275±1.40	0.59±0.08	0.40±0.09

AlCl₃ exposed group; C: a control group with no treatment; W: week. Data are expressed as means ± SD (n=6). The comparison of means between groups was performed by the Bonferroni t-test of Student after analysis of variance (ANOVA): **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Effect of Aluminum on semen parameters

Exposure to AlCl₃ significantly affected all sperm parameters studied compared to control group. Table 2 showed a significant decrease (*p* < 0.001) in sperm count (4.58±0.65

×10⁶/ml) and sperm viability (61.53±23.60 %), with a significant increase (*p* < 0.001) in DNA fragmented spermatozoids (69.05±4.36 %), and abnormal sperm rate (26.11±17.84 %).

Table 2. Effect of AlCl₃ on semen parameters

Groups	Sperm count (10 ⁶ /ml)	Parameters		
		Morphology (abnormal %)	Viability (%)	DNA fragmentation (%)
AlCl ₃	4.58±0.65 ***	26.11±17.84 **	61.53±23.60 ***	69.05±4.36 ***
CONTROL	11.52±0.77	16.67±1.53	76.33±6.51	39.33±6.44

AlCl₃ exposed group; C: a control group with no treatment. Data are expressed as means ± SD (n=6). The comparison of means between groups was performed by the Bonferroni t-test of Student after analysis of variance (ANOVA): **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

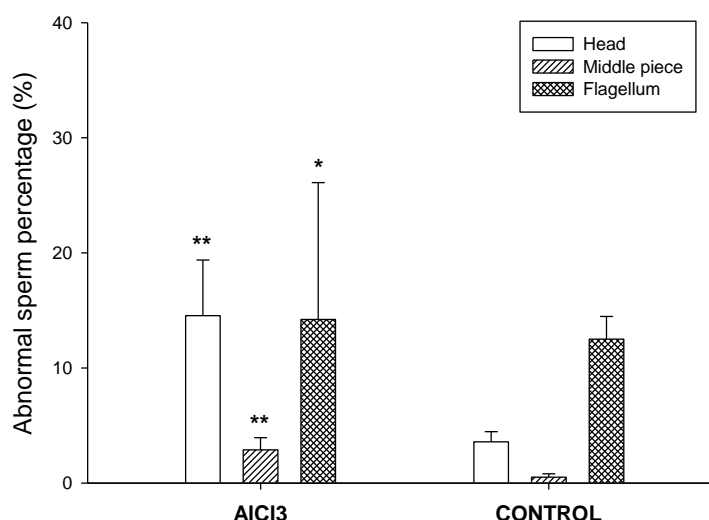


Figure 1. Evaluation of abnormal sperm percentage depending on the type of anomalies.

Data are expressed as means ± SD (n=6). The comparison of means between groups was performed by the Bonferroni t-test of Student after analysis of variance (ANOVA): **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Effect of AlCl₃ on hormones levels

Results of the current study showed that administration of AlCl₃ significantly decreased

($p < 0.05$) serum testosterone and luteinizing hormone levels as compared to the corresponding control values; whereas, no significant changes were observed in the follicle stimulating hormone (FSH) level (Figure 2).

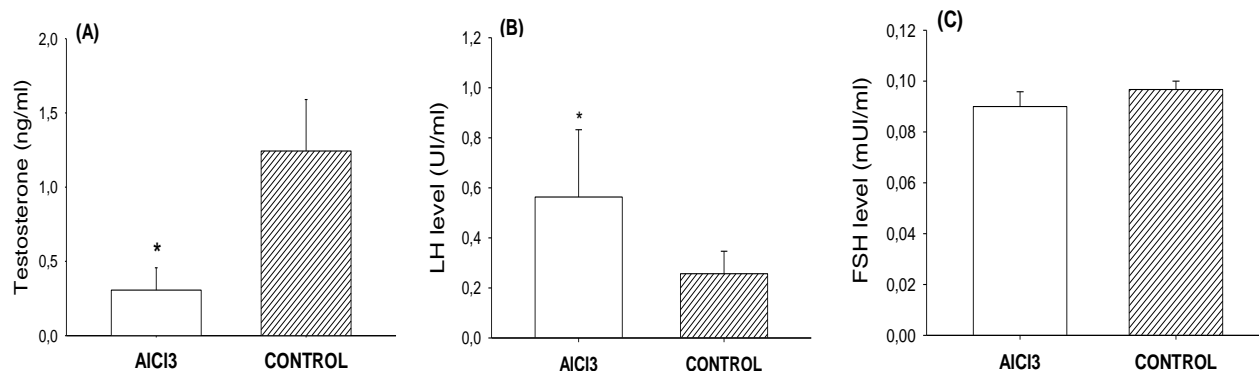


Figure 2. Evaluation of hormones levels in different experimental groups.

A: Serum testosterone level; B: serum luteinizing hormone (LH) level; C: follicle stimulating hormone (FSH) level. Data are expressed as means \pm SD (n=6). The comparison of means between groups was performed by the Bonferroni t-test of Student after analysis of variance (ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Evaluation of testicular oxidative stress markers

In this study, two complementary tests were used to assess the ability of AlCl₃ sub-acute exposure to induce testicular oxidative stress:

determination of Malondialdehyde (MDA) and Catalase activity (CAT). Figure 3 showed a significant increase ($p < 0.05$) in MDA level and CAT activity in Al exposed group compared to the controls.

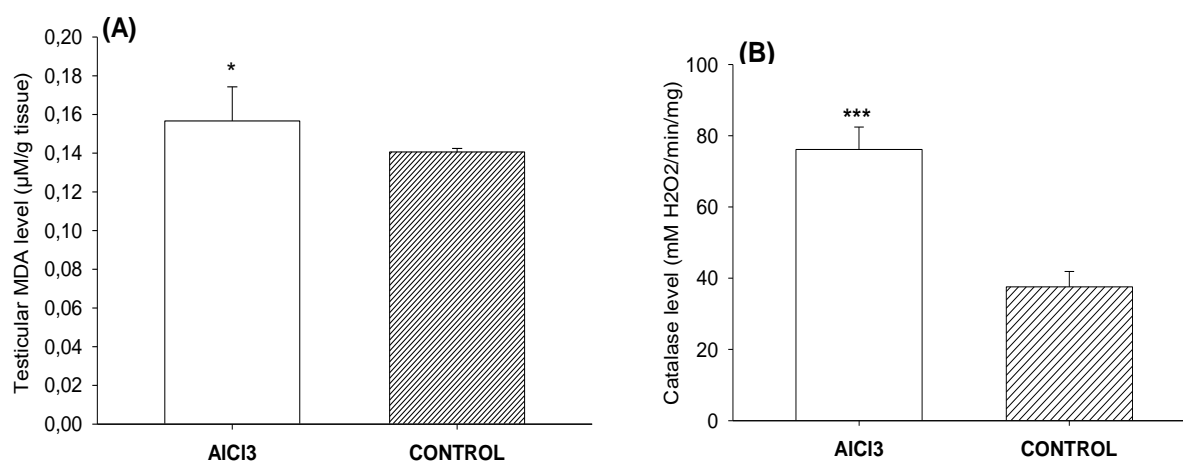


Figure 3. Evaluation of Testicular oxidative stress markers.

A: Testicular Malondialdehyde (MDA) level. B: Testicular Catalase activity level. Data are expressed as means \pm SD (n=6). The comparison of means between groups was performed by the Bonferroni t-test of Student after analysis of variance (ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Histopathological Study

Histological study reveals a normal architecture in the testicles structure of the control group (Figures 4-A) showing seminiferous tubules richly populated with a healthy appearance. All stages of the spermatogenic cell lines such as spermatogonia, spermatocyte, spermatids, and spermatozoa, even Sertoli cells could be identified in the seminiferous tubules. Lumen could easily be delineated in almost all the tubules and the majority of them were filled by mature spermatozoa. While the observation of histological sections of the $AlCl_3$ -exposed group (Figure 4-B) shows that all these stages are affected. Among the disturbances reported: degeneration of the seminiferous tubules with

disorganization of germinal epithelium, low sperm count and the presence of some exfoliated cells in the lumen, degeneration of interstitial tissue with large interstitial spaces and lack of Leydig cells around basement membranes. In epididymal tissue, the microscopic examination showed a normal architecture in the control group (Figure 5-A) with a pseudostratified ciliated columnar epithelium surrounded by connective tissue and smooth muscles and a lumen filled with spermatozoa. However $AlCl_3$ -exposed rats showed an epididymal tissue with a disorganized epithelium, an elevation of apoptotic cells due to the low level of testosterone and a proliferation of lymphocytes which indicates an inflammatory state (Figure 5-B).

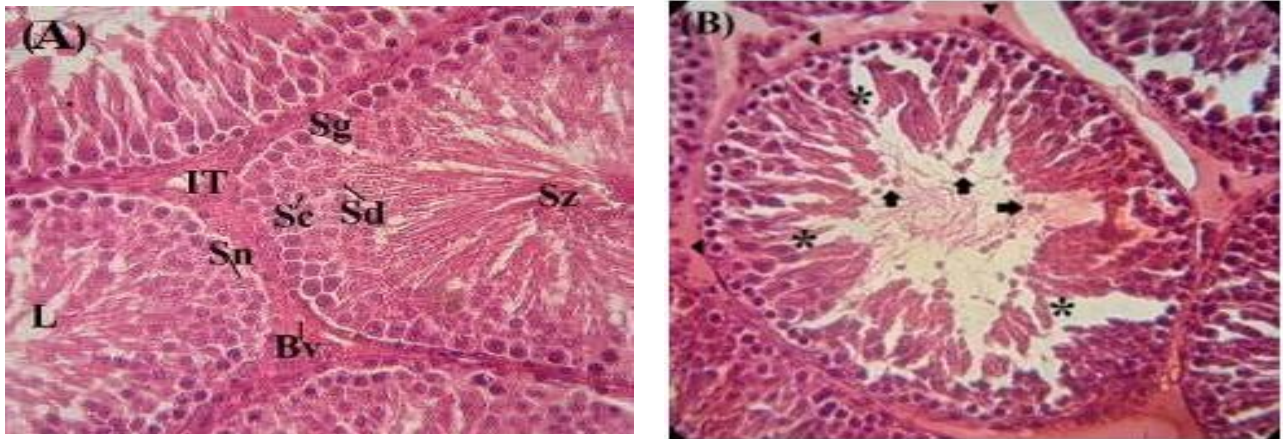


Figure 4. Microscopic observation of Haematoxylin stained testicular sections.

A: Control rats sections showing normal progression of spermatogenesis from spermatogonia (Sg) to spermatozoa (Sz) via spermatocytes (Sc) and spermatids (Sd). Interstitial tissue (IT) formed by Leydig cells and blood vessels (Bv). The Sertoli cell nucleus (Sn) and the lumen of the seminiferous tube (L) filled of spermatozoa. **B:** $AlCl_3$ -exposed rat testis Showing disorganization of germinal epithelium (asterisks), lack of Leydig cells, and degeneration of interstitial tissue (arrowheads) with some exfoliated cells in the lumen (arrows) ($\times 40$).

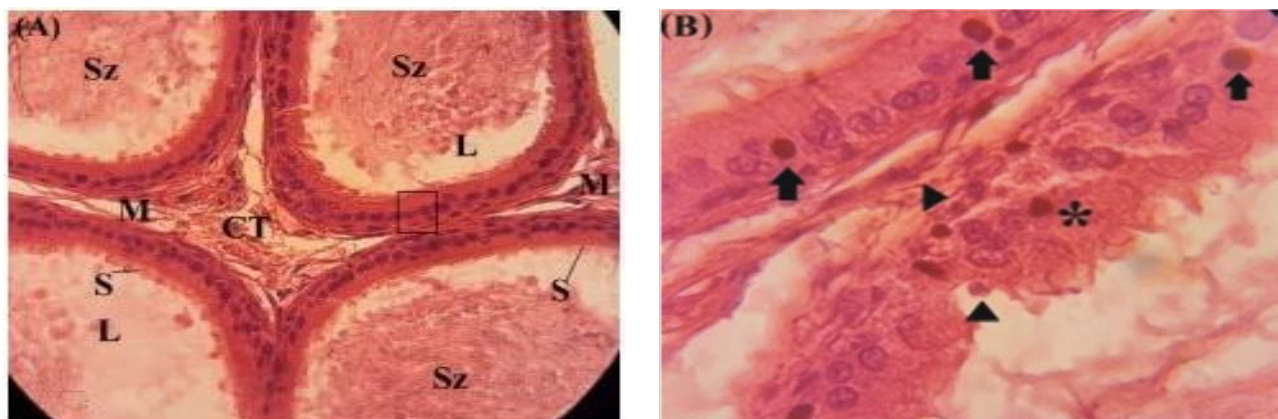


Figure 5. Microscopic observation of Haematoxylin stained epididymal sections. **A:** Control rats sections showing epididymal tubes formed by a pseudostratified ciliated columnar epithelium (black box) surrounded by connective tissue (CT) and smooth muscles (M). The stereocilia (S) clearly visible and a lumen (L) filled with sperm (Sz) ($\times 40$). **B:** $AlCl_3$ -exposed rat epididymal tissue showing disorganized epithelium (asterisk), apoptotic cells (arrowheads), and a leukocytic infiltration (arrows) ($\times 100$).

DISCUSSION

Results of the current study revealed that sub-acute exposure to 34 mg/kg b.w. of aluminum chloride during 30 days led to many physiological and histological dysfunctions, namely a body gain loss, decrease of sperm quality, hormonal disorders and histological abnormalities. A significant decrease in body weight was recorded from the second week of exposition to AlCl₃. But no significant decrease was shown in organ index. These results are in agreement with those of Balgoon (2019) who showed that administration of 10 mg/kg AlCl₃ during 8 weeks caused a significant ($p < 0.001$) reduction in rats weight gain (7.67 ± 2.87 g) compared to the control (92.00 ± 18.61 g). Another study conducted by Lahouel et al. (2020), showed that a weekly aluminum intraperitoneal dose of 60mg/kg during 6 to 12 weeks showed intense changes over time in body and brain weight, they suggested that this decreases could be attributed to the interaction of Al with the hormonal status and /or protein synthesis. Moreover, semen analysis showed a significant decreased in sperm count, viability, and an increase in sperm abnormal morphology percent in rats exposed to Al compared to controls. These results are in accordance with those obtained by Abdul-Rasoul et al. (2009) who revealed that a daily administration of Aluminum chloride with two doses 40 and 80 mg/kg body weight induced a significant reduction in sperm concentration and percentage of live sperm, associated with a significant increase in the percentage of abnormal sperm. Another research conducted by Martinez et al. (2017) found that exposure to aluminum for 60 days at human dietary levels (1.5, 8.3 and 100 mg/kg b.w/day) affects the sperm quality in rats by decreasing sperm count, sperm motility, and sperm morphology, with an increase in oxidative stress and inflammation in reproductive organs. They found also that a low concentration of Al ($3.35 \mu\text{g/g}$) in testes is sufficient to impair spermatogenesis. Miska-Schramm et al. (2017) by using the Bank Vole (*Myodesglareolus*) as a rodent model indicated that AlCl₃, at a dose of 3 and 200 mg/L, impairs adult reproductive abilities by decreasing the quality and quantity of sperm cells and by causing morphologically abnormal development of the gonads. Also, Guo et al. (2005) indicated that aluminum exposure leads to an increase in nitric oxide (NO) products which were responsible for Al-induced reproductive toxicity. Zhu et al. (2014) suggested that sub-chronic AlCl₃ disorders the balance of trace element and decreases the spermatogenesis and testicular enzyme activities which have adverse effects on the testicular function in male rats. We also find that AlCl₃ affected sperm DNA integrity revealed by increasing the percentage of sperm fragmented DNA. A number of reports discuss DNA fragmentation in sperm cells exposed to PbCl₄ *in-vitro* Gomes et al. (2015). Metals can cause male infertility through affection of spermatogenesis and sperm quality. Strong evidences confirm that male infertility in metal-exposed humans is mediated via various mechanisms such as production of reactive oxygen species (ROS) Jamalan et al. (2016). On the other hand, the results of the current study indicated that the administration of AlCl₃ significantly decreased serum testosterone and increased LH levels compared to control rats. These findings are consistent with those of Sun et al. (2011), who noticed a significant decrease in the levels of testosterone, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) after 120 days of exposition to three doses (64.18, 128.36 and 256.72 mg/kg) of aluminum and explain that Al-exposure interferes with androgen receptor expressions in testes. Another work indicated that AlCl₃ caused a significant decrease of FSH, LH, and testosterone, and caused the development of oligospermia and exfoliated tubules in the testis (Al-Eisa et al. 2017). Knowing that, testosterone hormone is released from the Leydig cells by stimulation of LH, its reduction results in the decline of serum testosterone concentration. Furthermore, our study showed that Al exposure caused an elevation in the MDA and CAT levels as compared to control group. Our finding confirmed those of Akayet al. (2016) who concluded that sub-chronic exposure to Al (75 mg/kg/ day during 30 days) lead to a significant decrease on antioxidant enzymes such as SOD and GPx, and a significant increase in MDA levels compared to control group. This imbalance between the antioxidant system and oxidants leads to an oxidative stress which has a

destructive effect on the testis. The work of Afolabi et al. (2018) on Aluminum-phosphide, indicated that oral administration of Al (1.15mg/kg) during 30 days resulted in a significant increase in testicular MDA and oxidized protein levels with a decrease in antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx followed by a significant reduction in non-enzymatic antioxidants. While, the observation of histological sections of the AlCl₃ exposed group shows the degeneration of the seminiferous tubules and depletion of sperm in the seminiferous lumen, with large interstitial spaces and lack of cells Lydig around the basement of membranes. These results are following those obtained by Moselhy et al. (2012) who demonstrated after histopathological examination of rats testis exposed to a daily dose (34 mg/kg) of AlCl₃ during 60 days, revealed degenerative changes in seminiferous tubules with necrosed spermatogenic cells. Besides, our result showed that Al caused in epididymal tissue a disorganization of epithelium, and elevation of apoptotic cells due to the low level of testosterone and an inflammatory state revealed by the leukocytic infiltration. These results agree with those of Mesole et al. (2020) who showed that exposure to AlCl₃ resulted in a significant (p < 0.01) elevation in the levels of nitric oxide and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), enhanced the activity of caspase-3, increased the level of pro apoptotic protein Bax and reduced the levels of anti-apoptotic protein Bcl-2, and significantly (p < 0.01) reduced the levels of SOD and GPx. While, The histopathological examination of mice exposed to AlCl₃ (2 mg/kg b.w) during 3 months showed degeneration of spermatogenic cell in the somniferous tubules of testes with formation of spermatid giant cells inside the lumen with interstitial inflammation (Manal et al. 2017).

CONCLUSION

The present study demonstrated that sub-acute exposure to AlCl₃ affects the testicular Leydig cells which results in the decrease in testosterone level and an increase in LH Level as a response to the interruption of the negative feedback of this hormone. Low testosterone level affects also the spermatogenesis and causes

the appearance of an inflammatory reaction in response to the increase rate of apoptosis in the epididymal epithelial tissue.

Conflicts of Interest

Authors have declared that they have no competing interest.

REFERENCES

- Abdul-Rasoul EM, Hassan NH, Al-Mallah KH. (2009). Effect of aluminium chloride on sexual efficiency in adult male rats. 22 (4):27-44.
- Afolab OK, Wusu AD, Ugbaja R, Fatoki JO. (2018). Aluminium phosphide-induced testicular toxicity through oxidative stress in Wistar rats: Ameliorative role of hesperidin. Toxicology Research and Application. 2: 1-11. 2397847318812794.
- Akay C, Erdem O, Aydin A, Eken A, Sayal A. (2016). Oxidative effects of aluminum on testes and erythrocytes in rats. Trace Elements and Electrolytes. 33 (4):155-161.
- Al-Ani IM, Al-Khfaji IN, Fakhrildin MB, Mangalo HH, Al-Obaidi SR. (2009). The effect of lead exposure of mice during pregnancy on the morphology of epididymal and testicular spermatozoa of their offspring. IIUM Medical Journal Malaysia. 8 (1):11-16.
- Al-Eisa RA, Al-Nahari HA. (2017). The attenuating effect of royal jelly on hormonal parameters in aluminum chloride (AlCl₃) intoxicated rats." International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. 6(2):70-85.
- Azad F, Nejati V, Shalizar-Jalali A, Najafi G, Rahmani F. (2019). Antioxidant and anti-apoptotic effects of royal jelly against nicotine-induced testicular injury in mice. Environmental toxicology. 34 (6):708-718.
- Baby J, Raj JS, Biby ET, Sankarganesh P, Jeevitha MV, Ajisha SU, Rajan SS. (2010). Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 4(4): 939-952.
- Balagoon MJ. (2019). Assessment of the protective effect of Lepidium sativum against aluminum-induced liver and kidney effects in albino rat. BioMed Research International. 2019:1-9.
- Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K, Alani B. (2017). Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in Wistar rats: ameliorative effects of curcumin. International journal of fertility &

- sterility. 11 (3):166-175.
- Exley C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology and Medicine*. 36 (3):380-387.
- Ghosh D, Mondal S, Ramakrishna K. (2019). Acute and sub-acute (30-day) toxicity studies of *Aegialitis rotundifolia* Roxb., leaves extract in Wistar rats: safety assessment of a rare mangrove traditionally utilized as pain antidote. *Clinical Phytoscience*. 5 (1):5-13.
- Gomes M, Gonçalves A, Rocha E, Sá R, Alves A, Silva J, Barros A, Pereira ML, Sousa M. (2015). Effect of in vitro exposure to lead chloride on semen quality and sperm DNA fragmentation. *Zygote*. 23 (3):384-393.
- Guo CH, Lin CY, Yeh MS, Hsu GSW. (2005). Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice. *Environmental toxicology and pharmacology*. 19 (1):33-40.
- Kim JG, Chandrasekaran K, Morgan W. (2006). Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis*. 21 (6):361-367.
- Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. (2016). Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International journal of fertility & sterility*. 10 (2):215-223.
- Kawahara M, Kato-Negishi M. (2011). Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International journal of Alzheimer's disease*. 2011:1-17.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 488 (1):65-76.
- Kim EJ, Jang M, Choi JH, Park KS, Cho IH. (2018). An improved dehydroepiandrosterone-induced rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS): Post-pubertal improve PCOS's features. *Frontiers in Endocrinology*. 9:735-741.
- Klein GL. (2019). Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? Osteoporosis and sarcopenia. 5 (1):2-5.
- Lahouel Z, Kharoubi O, Boussadia A, Bekkouche Z, Aoues A. (2020). Effect of Aluminium and Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* on rat Brain: Impact on Neurobehavioral and Histological study. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 10 (4):179-187.
- Machida K, McNamara G, Cheng KTH, Huang J, Wang CH, Comai L, Lai MM. (2010). Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *The Journal of Immunology*. 185 (11):6985-6998.
- Manal MS, Marwa FA, Doaa SM. (2017). The protective role of DMSA and vitamin E & selenium on aluminum induced neuro and reproductive toxicity in male rats. *Animal Health Research Journal*. 5 (1):52-70.
- Martinez CS, Escobar AG, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Exley C, Marta M, Wiggers GA. (2017). Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. *Reproductive Toxicology*. 73:128-141.
- Mesole SB, Alfred OO, Yusuf UA, Lukubi L, Ndhlovu D. (2020). Apoptotic Inducement of Neuronal Cells by Aluminium Chloride and the Neuroprotective Effect of Eugenol in Wistar Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020:1-7.
- Moselhy WA, Helmy NA, Abdel-Halim BR, Nabil TM, Abdel-Hamid MI. (2012). Role of ginger against the reproductive toxicity of aluminium chloride in albino male rats. *Reproduction in domestic animals*. 47 (2):335-343.
- Pandey G, Jain GC. (2013). A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity. *International journal of toxicology and applied pharmacology*. 3 (3):48-57.
- Qin D, Wen Z, Nie Y, Yao G. (2013). Effect of cichorium glandulosum extracts on CCl4-induced hepatic fibrosis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 15 (12):1-8.
- Savory J, Herman MM, Ghribi O. (2003). Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *Journal of inorganic biochemistry*. 97 (1):151-154.
- Seidowsky A, Dupuis E, Druke T, Dard S, Massy ZA, Canaud B. (2018). Intoxication aluminique en hémodialyse chronique. Un diagnostic rarement évoqué de nos jours. Illustration par un cas clinique et revue de la littérature. *Néphrologie & Thérapeutique*. 14 (1):35-41.
- Soleimanzadeh A, Saberivand A. (2013). Effect of curcumin on rat sperm morphology after the

- freeze-thawing process. In Veterinary Research Forum. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Vol. 4, No. 3, p. 185-189.
- Sun H, Hu C, Jia L, Zhu Y, Zhao H, Shao B, Li Y. (2011). Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats. *Biological trace element research*. 144 (1-3):1050-1058.
- Takabe W, Niki E, Uchida K, Yamada S, Satoh K, Noguchi N. (2001). Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis*. 22 (6):935-941.
- Wang Y. (2002). Epididymal sperm count. *Current protocols in toxicology*. 14 (1):16.6. 1-16.6. 5.
- Yousef MI. (2004). Aluminium-induced changes in hemato- biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199 (1):47-57.
- Zhu YZ, Sun H, Fu Y, Wang J, Song M, Li M, Miao LG. (2014). Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life sciences*. 102 (1):36-40.