

N° d'ordre :

Université de Saida– Dr. Moulay Tahar
Faculté des Sciences de la Nature & la Vie

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat 3ème Cycle

Spécialité : Biochimie et Toxicologie expérimentale

Filière : Sciences de la Nature et la Vie

Par :

ZERARKI Nour El Imane

Thème :

Activités préventives de *Zingiber officinale* contre la toxicité des sels du chrome au niveau de l'appareil reproducteur du rat Wistar. Etudes analytique, biochimique et histologique



Thèse soutenue le 23/ 04/ 2025 devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	SLIMANI Miloud	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	BERROUKCHE Abdelkrim	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	KHAROUBI Omar	Prof	Université d'Oran 1 – Ahmed Ben-Bella	Examineur
05	DEMMOUCHE Abbassia	Prof	Université de Sidi-Bel-Abbès – Djillali Liabes	Examineur
06	ADLI Houari Djalal Eddine	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

Résumé en arabe

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Revue bibliographique 3

Chapitre 1 : Chromes et dérivés chromiques 4

1. Introduction 4

2. Propriétés physicochimiques 4

3. Toxicité du chrome..... 7

Chapitre 2 : *Zingiber officinale* (Gingembre) 11

1. Origine..... 11

2. Botanique 11

3. Composition chimique 13

4. Pharmacologie 16

5. Evaluation clinique..... 17

6. Relation gingembre – fertilité masculine 18

Chapitre 3 : Points de vue de la littérature sur les relations « chrome-pathologies prostatiques » et « gingembre-pathologies prostatiques »..... 20

1. Trioxyde de chrome (nature, exposition et toxicité) 20

2. Toxicité sur l'appareil reproducteur male 21

3. Cr (VI) et pathologies prostatiques 21

4. Gingembre (composés actifs et propriétés biologiques) 22

5. Effets du gingembre sur l'appareil reproducteur male 23

6. Effets protecteurs du gingembre contre la toxicité du chrome..... 23

7. Interactions chrome-gingembre dans le contexte des pathologies prostatiques..... 24

Matériels et méthodes 25

1. Objectifs 26

2. Matériel végétal..... 26

3. Etude phyto-chimique 27

4. Matériel animal	29
5. Détermination sérique des paramètres biochimiques	38
6. Etude histologique	40
7. Analyses statistiques	41
Résultats	42
1. Rendement d'extraction	42
2. Étude phytochimique	46
3. Etude in vivo	46
Discussion	58
Conclusion	67
Perspectives	70
Références bibliographiques	71
Annexes	79
Publication & Participations aux manifestations scientifiques	84

Dédicaces

A mes parents

Mes plus profonds remerciements pour votre soutien sans faille et permanent, vos encouragements dans les moments difficiles, votre totale confiance en moi et pour les valeurs que vous m'avez inculquées.

Je vous dédie tout particulièrement cette thèse, en gage de mon amour et de ma reconnaissance.

A toute ma famille

Merci pour votre réconfort et votre gentillesse.

Avec toute mon affection.

A mes amis

Merci pour ces bons moments passés ensemble.

Avec toute mon affection

Remerciements

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur Le Professeur **SLIMANI Miloud** qui a accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux.*

*Je remercie vivement Monsieur Le Professeur **BERROUKCHE Abdelkrim**, directeur de cette thèse, de son accueil chaleureux au sein de son équipe et pour sa passion qu'il a su me faire partager. Il m'a donné les moyens de réaliser ce passionnant travail et a éveillé mon engouement pour ce domaine de recherche. Il m'a accordé sa confiance pendant toutes ces années et m'a fait profiter de son expérience, c'est donc naturellement que je lui témoigne toute ma reconnaissance et ma gratitude.*

*J'adresse mes respectueux remerciements à Madame La Professeur **DEMMOUCHE Abassia**, Monsieur Le Professeur **KHAROUBI Omar** et Monsieur Le Professeur **ADLI Djallal Eddine Houari** qui m'ont fait l'honneur d'être membres du jury et d'accepter pour examiner ce travail.*

Résumé

Introduction : Le chrome hexavalent (CrVI), notamment sous forme de trioxyde de chrome (CrO₃), est un métal lourd toxique impliqué dans diverses atteintes de l'appareil reproducteur mâle, y compris la prostate. Le gingembre (*Zingiber officinale*), riche en composés antioxydants, pourrait offrir une protection contre ces effets nocifs. Cette étude a pour objectif d'évaluer les effets protecteurs de l'extrait de rhizome de gingembre (RGE) sur les tissus de la prostate et des testicules chez les rats exposés au CrO₃.

Matériel et Méthodes : L'étude expérimentale d'une durée de 90 jours a été réalisée sur 20 rats Wistar mâles adultes répartis en quatre groupes. Le premier groupe « témoin » a reçu quotidiennement une solution saline physiologique, le second groupe a reçu (10 mg/kg/j) de CrO₃, le troisième groupe a reçu (600 mg/kg/j) de l'extrait hydroalcoolique du *Zingiber officinal*, et le quatrième groupe a reçu quotidiennement une combinaison entre CrO₃ (10 mg/kg) et l'extrait hydroalcoolique du gingembre (600 mg/kg). Tous les traitements ont été administrés par voie orale (gavage). L'extrait hydroalcoolique (éthanol) du *Zingiber officinal* a été préparé par macération. Les paramètres biochimiques, hormonaux, histologiques et le PSA ont été évalués.

Résultats : CrO₃ a induit une baisse significative du poids corporel, une altération de la spermatogenèse avec une diminution du glutathion réduit, une élévation du PSA, une perturbation hormonale de la testostérone et des altérations histologiques testiculaires et prostatiques. L'extrait hydro-alcoolique du *Zingiber officinale* a exercé une action antioxydante efficace contre la toxicité du CrO₃ sur l'appareil reproducteur, comme en témoigne la restauration des niveaux de GSH, la régulation des taux de testostérone, la réduction des taux de PSA et l'amélioration des paramètres histologiques.

Discussion : Les effets du CrO₃ sont liés à un stress oxydatif intense. Le gingembre, par ses composés antioxydants, a montré une capacité partielle à contrecarrer les effets du chrome, en améliorant les paramètres reproducteurs et prostatiques.

Conclusion : Le gingembre exerce un effet protecteur contre la toxicité du CrVI. Il pourrait représenter un agent thérapeutique naturel d'intérêt face à la pollution métallique affectant la fertilité masculine.

Mots-clés : Chrome hexavalent, Gingembre, Prostate, Stress oxydatif, Antioxydants, Toxicité testiculaire.

Abstract

Introduction: Hexavalent chromium (CrVI), especially as chromium trioxide (CrO₃), is a toxic heavy metal known to damage the male reproductive system, including the prostate. Ginger (*Zingiber officinale*), rich in antioxidant compounds, may offer protection against such. This study aims to evaluate the protective effects of ginger rhizome extract (RGE) on prostate and testicular tissues in rats exposed to CrO₃.

Materials and Methods: The 90-day experimental study was conducted on twenty adult male Wistar rats divided into four groups. The first group (control), received a physiological saline solution daily, the second group received 10 mg/kg/day of CrO₃, the third group received 600 mg/kg/day of a hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale*, and the fourth group received a daily combination of 10 mg/kg of CrO₃ and 600 mg/kg of the hydroalcoholic extract of ginger. All treatments were administered orally (gavage). The hydroalcoholic (ethanol) extract of ginger was prepared by maceration. Biochemical, hormonal, histological parameters, and PSA levels were assessed.

Results: CrO₃ induced a significant decrease in body weight, impaired spermatogenesis with reduced glutathione, elevated PSA, hormonal disruption of testosterone, and histological alterations in the testicles and prostate. The hydro-alcoholic extract of *Zingiber officinale* exerted an effective antioxidant action against the toxicity of CrO₃ on the reproductive system, as evidenced by the restoration of GSH levels, the regulation of testosterone levels, the reduction of PSA levels, and the improvement of histological parameters.

Discussion: CrO₃-induced toxicity is mainly due to oxidative stress. Ginger's antioxidant compounds partially counteracted these effects, improving reproductive and prostatic markers.

Conclusion: Ginger demonstrated a protective role against CrVI toxicity and may serve as a natural therapeutic agent in preventing heavy metal-induced male infertility.

Keywords: Hexavalent chromium, Ginger, Prostate, Oxidative stress, Antioxidants, Testicular toxicity.

المخلص

المقدمة: يُعد الكروم سداسي التكافؤ (CrVI) ، وخاصة في شكل ثلاثي أكسيد الكروم (CrO₃) ، من المعادن الثقيلة السامة التي تؤثر سلبيًا على الجهاز التناسلي الذكري، بما في ذلك البروستاتا. قد يوفر الزنجبيل (*Zingiber officinale*) ، الغني بالمركبات المضادة للأكسدة، حماية ضد هذه السمية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثيرات الوقائية لمستخلص جذور الزنجبيل (RGE) على أنسجة البروستاتا والخصيتين في الفئران المعرضة لـ CrO₃.

المواد والطرق: أجريت الدراسة التجريبية لمدة 90 يومًا على 20 فأرًا بالغًا من ذكور سلالة الويستر، وُزَعوا على أربعة مجموعات: المجموعة الأولى (ضابطة) تلقت يوميًا محلولًا ملحيًا فسيولوجيًا ، المجموعة الثانية تلقت 10 ملغم/كغم/يوم من CrO₃، المجموعة الثالثة عولجت بمستخلص كحولي مائي لنبات الزنجبيل 600 ملغم/كغم/يوم ، وتلقت المجموعة الرابعة مزيجًا يوميًا من 10 ملغم/كغم من CrO₃ و600 ملغم/كغم من المستخلص الكحولي المائي للزنجبيل. أُعطيت جميع العلاجات عن طريق الفم. تم تحضير مستخلص الزنجبيل الكحولي-المائي (الإيثانول) بطريقة النقع. تم تقييم المؤشرات البيوكيميائية، الهرمونية، النسيجية، ومستويات (PSA).

النتائج: سبب CrO₃ انخفاض ملحوظ في وزن الجسم، اضطراب في تكوين الحيوانات المنوية مع انخفاض مستوى الجلوتاثيون، ارتفاعًا في PSA ، انخفاضًا في التستوستيرون، وتلفًا نسيجيًا في الخصيتين والبروستاتا. خفف مستخلص الزنجبيل من هذه التأثيرات، وأعاد التوازن لبعض المؤشرات. وقد أظهر المستخلص الكحولي المائي لنبات الزنجبيل فعالية مضادة للأكسدة ضد سمية مركب CrO₃ على الجهاز التناسلي، يتضح ذلك من خلال استعادة مستويات الجلوتاثيون، تنظيم مستويات التستوستيرون، خفض مستويات PSA وتحسين المؤشرات النسيجية.

المناقشة: تعود سمية CrO₃ إلى الإجهاد التأكسدي. أظهر الزنجبيل قدرة جزئية على مكافحة هذه السمية من خلال مركباته المضادة للأكسدة، ما أدى إلى تحسن في وظائف الجهاز التناسلي والبروستاتي.

الاستنتاج: يساهم الزنجبيل في الوقاية من السمية الناجمة عن الكروم سداسي التكافؤ، وقد يكون علاجًا طبيعيًا واعدًا ضد التلوث المعدني المؤثر على الخصوبة الذكورية.

الكلمات المفتاحية: الكروم سداسي التكافؤ، الزنجبيل، البروستاتا، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، سمية الخصيتين.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATSDR: Agency for Toxicological Substances and Diseases Registry

CAT : catalase

CCM : Chromatographie sur couche mince

CPG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DHT : dihydrotestosterone

DL : dose létale

DTNB : Acide 6,6'-dinitro-3,3'-dithiodibenzoïque

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

ECHA : European Chemicals Agency

EDTA : Acide éthylène Diamine Tétra-Acétique

ELFA : Enzyme Linked Fluorescent Assay

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FC : Folin-Ciocalteu

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

EPA : Environmental Protection Agency

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène

GAE : gallic acid equivalence

GSH : glutathion réduit

HBP : Hypertrophie Bénigne de la Prostate

HPG : hypothalamo-hypophyso-gonadique

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IARC: International Agency of Research of Cancer

IPCS : International Program Chemical Safety

IRTP : Indice relative du poids des testicules

LRBPVBP : Laboratoire de Recherche de Bio-toxicologie et Pharmacognosie, Valorisation
Biologique des Plantes

LDL : Low Density of Lipoproteins

LH : hormone lutéinisante

MDA : malondialdéhyde

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

NTP: National Pipe Tapered thread

OEHHA: Office of Environmental Health Hazard Assessment

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCFM : poids corporel final moyen

PMT : poids moyen des testicules

PSA : prostate specific antigen

RGE : root ginger extract (extrait hydro-alcoolique des rhizomes)

SOD : Superoxyde Dismutase

TFT : teneur en flavonoïdes totaux

TTP : teneur totale en polyphénols

WHO: World Health Organization

Liste des figures

Figure 1. Plante « *Zingiber officinale* ou gingembre » et ses différentes végétales

Figure 2. Grains d'amidon du rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*)

Figure 3. Coupe transversale du rhizome de gingembre

Figure 4. Principe de dosage sérique ou PSA par méthode immuno-enzymatique type Elisa "sandwich".

Figure 5. Principe de la technique ELFA du dosage immuno-enzymatique du PSA.

Figure 6. Courbe d'étalonnage concernant les polyphénols totaux

Figure 7. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Figure 8. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations

Figure 9. Effet de l'exposition au CrO₃ et du traitement au gingembre sur les niveaux sériques de glutathion réduit (GSH) chez les rats"

Figure 10. Effet de l'exposition au CrO₃ et du traitement au gingembre sur les niveaux sériques de la catalase chez les rats

Figure 11. Taux sériques du PSA chez les animaux témoins, expérimentaux et ceux traités avec le CrO₃ et l'extrait du rhizome de gingembre

Figure 12. Niveaux sériques de testostérone chez les animaux témoins, expérimentaux et ceux traités avec le CrO₃ et l'extrait du rhizome de gingembre

Figure 13. Examens microscopiques de la glande prostatique (grossissement ×10).

Figure 14. Examens microscopiques du tissu testiculaire (grossissement ×10)

Liste des tableaux

Tableau 1. VTR retenues par l’Ineris pour le chrome hexavalent

Tableau 2. Composition chimique des extraits de rhizomes de gingembre

Tableau 3. Composition chimique de l’huile essentielle de gingembre

Tableau 4. Analyse phytochimique et activité antioxydante de l’extrait de *Zingiber officinale*.

Tableau 5. Teneurs totaux des polyphénols (mg EAG / g) de l’extrait du gingembre et des absorbances (ou densités optiques) à 765 nm pour tracer la courbe d’étalonnage.

Tableau 6. Teneurs totales des flavonoïdes (mg CE/g) de l’extrait du gingembre et des absorbances (ou densités optiques) à 765 nm pour tracer la courbe d’étalonnage.

Tableau 7. Valeurs des concentrations de l’extrait du gingembre (mg/ml) et pourcentages d’inhibition des radicaux DPPH pour tracer la courbe d’étalonnage.

Tableau 8. Variations des poids corporels des rats normaux, exposés eu chrome et à l’extrait des rhizomes de gingembre.

Tableau 9. Variations des poids des testicules chez les rats normaux, exposés eu chrome et à l’extrait des rhizomes de gingembre.

Tableau 10. Dosages sériques du PSA et testostérone chez les groupes de rat

Introduction generale

Les pathologies prostatiques, en particulier l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), la prostatite chronique et le cancer de la prostate, représentent un problème de santé publique majeur dans le monde. Ces affections touchent principalement les hommes âgés de plus de 50 ans, avec une prévalence croissante avec l'âge. Parmi ces pathologies, le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquents chez l'homme, représentant la deuxième cause de mortalité par cancer dans cette population (**Rawla, 2019**).

Les causes exactes de ces affections sont multifactorielles, impliquant des facteurs génétiques, hormonaux, nutritionnels, et environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux, l'exposition aux métaux lourds est de plus en plus incriminée dans la genèse ou la progression des maladies prostatiques. Le chrome hexavalent (CrVI), notamment sous forme de trioxyde de chrome (CrO_3), est un composé industriel couramment utilisé, dont la toxicité est bien documentée. Il est classé comme cancérigène certain pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (**IARC, 2012**).

Le CrVI traverse facilement les membranes cellulaires via les transporteurs d'anions tels que ceux du sulfate. Une fois à l'intérieur de la cellule, il est réduit successivement en CrV, CrIV et CrIII, générant au passage une importante quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce stress oxydatif provoque des dommages à l'ADN, aux lipides membranaires et aux protéines, favorisant des processus d'inflammation, d'apoptose, voire de transformation néoplasique (**Kumar et al., 2021**).

La toxicité du CrVI sur l'appareil reproducteur mâle a été rapportée dans plusieurs études expérimentales. Chez le rat, l'administration de CrVI entraîne une réduction du poids testiculaire, une altération de la spermatogenèse, une baisse du taux de testostérone, et des lésions histopathologiques marquées au niveau des testicules et de la prostate (**Elbetieha et al., 2001 ; Junaid et al., 2019**). Ces effets sont en grande partie dus à l'activation du stress oxydatif et de réponses inflammatoires au niveau des tissus reproducteurs.

Face à ces effets délétères, l'exploration de composés naturels à potentiel antioxydant s'est intensifiée. Le gingembre (*Zingiber officinale*), plante médicinale largement utilisée, possède des propriétés pharmacologiques reconnues, notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et anticancéreuses. Ses principaux constituants bioactifs, dont les gingérols, shogaols et zingerone, agissent en neutralisant les radicaux libres et en modulant les voies cellulaires impliquées dans l'inflammation et l'apoptose (**Ali et al., 2008 ; Mashhadi et al., 2013**).

Plusieurs travaux ont démontré les effets protecteurs du gingembre contre les dommages induits par des substances toxiques sur l'appareil reproducteur mâle. Il améliore la qualité du sperme, stimule la stéroïdogénèse, et protège les tissus testiculaires et prostatiques contre les altérations histologiques et biochimiques (**Khaki et al., 2009 ; Ajiboye et al., 2010**). Ces propriétés font du gingembre un candidat prometteur dans la prévention ou l'atténuation des effets néfastes du CrVI sur la prostate.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente thèse, qui vise à étudier l'effet du trioxyde de chrome sur l'appareil reproducteur mâle, en particulier la prostate, et à évaluer le rôle protecteur d'un extrait hydroalcoolique de gingembre. Le travail repose sur un protocole expérimental *in vivo* utilisant un modèle murin, et intègre des analyses biochimiques, hormonales, histologiques et statistiques. Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les interactions entre polluants métalliques et pathologies prostatiques, et d'évaluer l'intérêt thérapeutique du gingembre comme agent protecteur naturel.

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Chromes et dérivés chromiques

1-Introduction

Le chrome et ses sels dérivés jouent un rôle essentiel dans divers domaines scientifiques, industriels, et biologiques en raison de leurs propriétés physicochimiques uniques. Métal de transition polyvalent, le chrome existe principalement sous les formes trivalente (Cr^{3+}) et hexavalente (Cr^{6+}), qui diffèrent considérablement en termes de comportement chimique, de biodisponibilité et de toxicité (Saha et al., 2011). Ces formes sont omniprésentes dans divers contextes naturels et anthropiques, où elles exercent une influence sur les écosystèmes et la santé humaine.

Dans l'industrie, les composés du chrome sont utilisés dans des applications telles que le tannage des cuirs, les pigments, les alliages métalliques, et les traitements anticorrosion (Kotás & Stasicka, 2000). En agriculture, certains sels de chrome sont employés comme additifs dans l'alimentation animale, bien que leur efficacité et leur innocuité restent sujets à débat (Anderson, 1997). Par ailleurs, dans le domaine biologique, le chrome trivalent est reconnu comme un oligoélément essentiel pour le métabolisme des glucides et des lipides, tandis que le chrome hexavalent est hautement toxique et classé parmi les cancérigènes de classe I par l'IARC (Goyer et Clarkson, 2001).

Les préoccupations liées à la toxicité du chrome, particulièrement sous sa forme hexavalente, s'intensifient en raison de ses effets délétères sur les systèmes biologiques. Ces effets incluent des dommages oxydatifs, des perturbations métaboliques et un potentiel génotoxique avéré (Bagchi et al., 2002). L'impact du chrome sur la fertilité masculine est également préoccupant. Des études expérimentales et épidémiologiques suggèrent que le chrome, par sa capacité à générer un stress oxydatif et à altérer les fonctions cellulaires, pourrait compromettre la spermatogenèse et réduire la qualité des spermatozoïdes (Sengupta, 2013 ; Piao et al., 2003).

Ce chapitre s'attache à examiner les propriétés physicochimiques du chrome et de ses sels dérivés, leurs applications industrielles, agricoles et biologiques, ainsi que les mécanismes sous-jacents à leur toxicité. Une attention particulière est accordée à leurs effets sur la fertilité masculine, un sujet d'intérêt croissant dans la recherche biomédicale contemporaine.

2-Propriétés physico-chimiques

Le chrome est un métal dur, blanc grisâtre. Il résiste à la corrosion et au ternissement. Il est souvent en substitution du fer (rayons ioniques très proches $\text{Fe(III)} = 0,067 \text{ nm}$, $\text{Cr(III)} =$

0,061 nm, Cr(VI) = 0,044 nm). Sa masse molaire est de 52 g/mole, de masse volumique 7,14 g/cm³, son point de fusion est de 1840 °C et son point d'ébullition est de 2642 °C. Il appartient au groupe 6 (ou VI-b) de la série des éléments de transition.

Le chrome peut exister sous plusieurs formes chimiques avec des degrés d'oxydation s'étendant de Cr (0) de forme métallique jusqu'à Cr(VI) de forme anionique, mais seules deux formes sont stables dans les valeurs de pH et de potentiel redox trouvées dans l'environnement: le chrome trivalent Cr(III) et le chrome hexavalent Cr(VI) (**Fandorf, 1995**). Ces deux formes du Cr ont une toxicité et des propriétés chimiques différentes.

2-1-Chrome trivalent, Cr(III)

Le chrome trivalent est la forme la plus stable mais ayant des propriétés chimiques plus complexes que le chrome hexavalent. Le Cr(III) a peu d'affinité pour l'oxygène, c'est pour cette raison qu'il a tendance à former un nombre de complexes avec des ligands organiques ou non. Parmi les ligands suivants : OH⁻, SO₄⁻², CO₃⁻², NO₃⁻, seul OH⁻ se complexe de façon significative avec le Cr(III) aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Le Cr(III) présent sous forme cationique est stable en conditions réductrices.

Dans les conditions physico-chimiques des sols, le Cr trivalent est présent sous plusieurs formes: Cr³⁺, Cr(OH)²⁺, Cr(OH)²⁺, Cr(OH)₃ et Cr(OH)⁴⁻.

Les formes ioniques donnent une coloration verte aux solutions. La forme solide Cr(OH)₃ la plus fréquemment rencontrée aux pH naturels présente une solubilité très faible. Certains composés, notamment des composés organiques, peuvent former des complexes avec le chrome trivalent, prévenant ainsi sa précipitation à de faibles valeurs de pH, diminuant de ce fait la mobilité du Cr(III).

2-2-Chrome hexavalent, Cr(VI)

Le chrome hexavalent est un puissant oxydant. On le retrouve sous des formes d'oxyanions (Cr₂O₇²⁻, HCrO₄⁻ et CrO₄²⁻) qui sont très solubles dans l'eau et donnent une couleur rouge-orangé à la solution aqueuse.

Le comportement du Cr(VI) est similaire à celui de l'orthophosphate (**Bartlett et Kimble, 1976**). Il peut se complexer avec des ligands inorganiques tels que les chlorures, les sulfates et les phosphates (CrO₃Cl⁻, CrO₃SO₄²⁻, CrO₃H₂PO₄⁻, CrO₃HPO₄²⁻).

A la différence du Cr(III), les complexes du chrome sous la forme hexavalente (VI) sont faiblement absorbés sur les surfaces inorganiques et constituent ainsi la forme la plus mobile du chrome.

Dans les conditions généralement rencontrées dans les eaux polluées au chrome, l'ion chromate est prédominant. C'est pour cette raison que la chimie de l'environnement se limite souvent à l'étude de l'ion chromate plutôt que l'ion dichromate.

La spéciation du chrome (VI) et (III) dépend de plusieurs paramètres comme le pH, leur concentration et la disponibilité en ligand. Dans les milieux naturels, le chrome hexavalent est principalement sous la forme de CrO_4^{2-} (chromate) est fortement retenu par les phases minérales chargées positivement au sein des sols, comme l'oxyde de Fe. Le Cr ainsi adsorbé est facilement déplacé par des anions comme les phosphates et les sulfates (**Ball et Norstrom, 1998; Becquer et al., 2003**).

Les phosphates et chromates peuvent être adsorbés de manière similaire. Le bichromate peut être bien fixé comme H_2PO_4^- ou rester soluble comme HCO_3^- , Cl^- ou NO_3^- .

Les mécanismes de fixation du Cr(VI) sont moins bien connus que pour PO_4^{3-} . L'augmentation de pH diminue l'adsorption du Cr(VI) car il y a moins de charges de surface positives et la vitesse de réduction en Cr(III) est plus faible (**James et Bartlett, 1983**).

Pour des pH basiques, le Cr(VI) est très peu retenu (**Amacher et al., 1988**). **Kpombrekou et Tabatabai (1994)** ont montré que les acides organiques à faible poids moléculaire peuvent accroître la concentration du phosphore dans le sol par des mécanismes de complexation et d'échange. Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse de pH du milieu (**Hinsinger, 2001**).

Les solides du Cr(VI) sont solubles à l'intérieur des conditions existant dans les sols. L'adsorption du Cr(VI) par les argiles, les sols et les matériaux naturels des aquifères va de faible à modérée dans les conditions typiques de pH de la nappe phréatique, par exemple pH 6,8.

À un pH $>8,5$, le Cr(VI) est totalement mobile et peut facilement être lessivé du sol vers la nappe phréatique. Le Cr(VI) peut être stabilisé dans le profil du sol par la réduction en Cr(III) relativement immobile ou par l'adsorption aux minéraux solides.

Toutefois, le Cr(VI) qui n'est pas adsorbé ou réduit en Cr(III) demeure fortement mobile dans le profil du sol. Dans les sols naturels, le Cr(III) se trouve souvent en insertion dans des minéraux. Il peut par exemple se trouver dans le site octaédrique des argiles et autres phyllosilicates. Dans les sols volcaniques, il a été montré que le Cr(III) se trouvait dans les olivines sous forme de Chromite (**Doelsch et al., 2006**). Ce minéral, peu altéré, résiste à la formation des sols (altération de la roche mère).

3-Toxicité du chrome

3-3-1-Absorption et devenir dans l'organisme

Les composés solubles du chrome VI sont bien absorbés par le tractus respiratoire (de 50 à 85% des particules inhalables, par rapport à 5-30% pour le Cr III) (**ATSDR, 2012 ; Costa & Klein, 2006**). Pour les doses habituellement rencontrées dans la nourriture, son absorption par voie orale est faible (2 à 9%) car le chrome est réduit dans l'estomac en chrome III peu soluble (**WHO, 2013 ; Zhitkovich, 2011**). La pénétration par voie cutanée est limitée (1- 4% de la dose appliquée), sauf lors d'expositions massives entraînant des brûlures (**Stern, 2010 ; De Flora, 2000**). La majorité du chrome VI absorbé est rapidement réduit dans l'organisme, puis largement distribué et éliminé sous forme de composés du Cr (III) dans l'urine et les fèces (**Baruthio, 1992 ; IARC, 2012**).

3-2-Toxicologie aigüe

3-2-1-Etudes chez l'homme

L'ingestion d'une quantité importante de chromates ou de dichromates provoque une action corrosive importante qui se traduit par des troubles digestifs (gastro- entérite hémorragique, vomissements, diarrhée). Ensuite apparaissent une insuffisance hépatocellulaire avec cytolyse et une insuffisance rénale par atteinte des cellules épithéliales des tubules proximaux. Lors d'ingestion de dichromate de potassium, une atteinte cardiaque peut également survenir (**Sainte-Marie et al., 2004 ; Barceloux, 1999**). L'inhalation d'aérosols de dérivés du chrome VI provoque une forte irritation et inflammation du tractus respiratoire associée à des douleurs nasale et thoracique, une toux, une dyspnée et une cyanose (**ATSDR, 2012**).

L'application cutanée peut être à l'origine de nécroses ; les lésions locales liées au contact cutané favorisent la pénétration des chromates et peuvent provoquer des manifestations générales (digestives et rénales) (**WHO, 2013**).

Des cas de décès à la suite d'une exposition aux dérivés du chrome VI ont été rapportés.

Les projections oculaires de chromates solubles entraînent des irritations sévères de l'œil : conjonctivite et atteintes cornéennes (inflammation, érosion, ulcération). Ces effets sont liés au pH bas des produits (**Baruthio, 1992**).

3-2-2-Études chez l'animal

C'est le caractère corrosif du trioxyde de chrome qui est responsable de sa toxicité. Son inhalation, ingestion et absorption provoquent de graves lésions des tissus exposés, des saignements et ulcérations, cyanose et détresse respiratoire conduisant à la mort pour plusieurs espèces de rongeurs (**ATSDR, 2012 ; NTP, 2007**).

Les expositions par la voie orale induisent des effets plus importants que par inhalation et que par la voie cutanée (**Glaser et al., 1986**).

3-3-Toxicologie chronique

3-3-1-Effets systémiques

Etudes chez l'homme

La peau et les muqueuses sont les organes les plus atteints. Les chromates et dichromates provoquent des ulcérations cutanées persistantes qui surviennent spontanément ou après excoriation. Des dermatoses allergiques des mains et des avant-bras sont fréquemment rencontrées. D'après l'OMS (**IPCS, 2013**), des études sur l'Homme montrent que des concentrations en chrome VI comprises entre 0,03 à 0,12 µg/cm² provoquent des réactions cutanées pour 10 % de personnes déjà sensibilisées ou des dermatites.

Dans la population générale mondiale, la prévalence de cette sensibilisation a été estimée à 0,7 % (**Paustenbach, Sheehan, Parell, Wisser, & Finley, 1992**).

L'action corrosive sur les muqueuses nasales se manifeste au maximum par la perforation de la cloison nasale. Au niveau pulmonaire, on peut observer des asthmes allergiques et des atteintes chroniques obstructives (**Langård, 1990**).

Etudes chez l'animal

Les composés hydrosolubles du chrome VI sont très toxiques lors de l'inhalation et de l'ingestion. Les principaux organes cibles sont le rein, le foie, la rate et les poumons selon la voie d'administration (**Standeven & Wetterhahn, 1991**).

Les effets par voie cutanée sont également importants et peuvent être augmentés lorsque la peau est déjà lésée.

Chez le rat, l'inhalation de dichromate de sodium stimule le système immunitaire. Une autre étude pratiquée chez le rat lors de l'ingestion de chromate de potassium montre une sensibilisation des animaux. Enfin, chez le cobaye et la souris l'exposition au chrome VI induit des dermatites de contact (**Adachi et al., 1986 ; Burrows et al., 1981**).

3-4-Effets cancérigènes

Les mécanismes d'action du Cr(VI) ne sont pas totalement connus. Cependant, les principaux mécanismes d'action semblent être l'induction de dommages à l'ADN, la production d'un stress oxydatif et l'aneuploïdie⁴⁸ (**IARC 2012**).

L'Union Européenne a classé les dérivés hexavalents, trioxyde de chrome, chromates, dichromate de nickel et chromate de zinc comme cancérigènes de catégorie 1A49, et les autres composés hexavalents (sauf le chromate de baryum) en catégorie 1B50 (**ECHA, 2017**).

Le CIRC-IARC a classé les composés du chrome VI dans le groupe 1 comme « agent cancérigène pour l'homme » (IARC, 2012).

L'US-EPA les a classés comme cancérigènes pour l'homme (groupe A51) et ce, par inhalation Uniquement (US EPA, 1998).

Ces classifications s'appuient sur de nombreuses études épidémiologiques chez les salariés de la production des chromates et de pigments à base de chrome et ceux utilisant du chrome VI pour le travail des métaux, ainsi que sur de nombreuses études chez l'animal (IARC, 2012 ; ATSDR, 2012).

Il est à noter que les composés du chrome III ne sont pas classés comme cancérigènes que ce soit par l'Union Européenne, par le CIRC-IARC ou par l'US-EPA (ATSDR, 2012).

3-5-Effets sur la reproduction et le développement

Des études sur les souris et les rats ont montré une baisse de la fertilité et des troubles du développement après ingestion de chrome VI (Kanojia, Jhanwar, & Seth, 2005 ; Zhang & Li, 1987). Chez l'homme, plusieurs études épidémiologiques ont trouvé un lien entre des effets sur la qualité du sperme chez des soudeurs et leur exposition au chrome VI (Alexandersson & Attewell, 1980).

Les études les plus robustes ou avec les concentrations d'exposition les plus élevées ont montré une augmentation des effets néfastes chez les travailleurs exposés au chrome VI (OEHHA, 2009).

L'Union Européenne a classé les principaux composés du chrome VI reprotoxiques de catégorie 1A ou 1B (dichromates de sodium, potassium et ammonium, chromate de sodium et potassium) ou 2 (trioxyde de chrome) (ECHA, 2017).

3-6-Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) sélectionnées par l'Ineris pour le chrome VI ont fait l'office d'un document spécifique publié en 2017 intitulé « Choix de valeur toxicologique de référence. Chrome et composés Tri- et hexavalents » (INERIS, 2017).

La veille sur les VTR est disponible depuis le Portail Substances Chimiques (INERIS, 2017). Les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) actuellement retenues par l'Ineris pour le chrome hexavalent sont présentées dans le **tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1 : VTR retenues par l’Ineris pour le chrome hexavalent (INERIS, 2017).

Type d'effet	Voie d'exposition	Facteur d'incertitude	Valeur de référence	Source, Année de révision	Date de choix
Effets à seuil	Inhalation (sub-chronique) aérosol	100	$5.10^{-3} \mu\text{g Cr.m}^{-3}$	ATSDR, 2012	INERIS, 2017
Effets à seuil	Inhalation (sub-chronique) particules	30	$0,3 \mu\text{g Cr. m}^{-3}$	ATSDR, 2012	INERIS, 2017
Effets à seuil	Inhalation (chronique) aérosol	90	$8.10^{-3} \mu\text{g Cr. m}^{-3}$	US EPA, 1998a	INERIS, 2017
Effets à seuil	Inhalation (chronique) particules	300	$3.10^{-2} \mu\text{g Cr. m}^{-3}$	OMS CICAD, 2013	INERIS, 2017
Effets à seuil	Orale (sub-chronique)	100	$5.10^{-3} \text{mg Cr.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	ATSDR, 2012	INERIS, 2017
Effets à seuil	Orale (chronique)	100	$9.10^{-4} \text{mg Cr.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	ATSDR, 2012	INERIS, 2017
Effets sans seuil	Inhalation (chronique)	-	$4.10^{-2} (\mu\text{g Cr.m}^{-3})^{-1}$	OMS CICAD, 2013	INERIS, 2017
Effets sans seuil	Orale (chronique)	-	$0,5 (\text{mg Cr.kg}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$	OEHHA, 2011	INERIS, 2017

Chapitre 2 : *Zingiber officinale* (Gingembre)

1-Origine

Cette épice est inconnue à l'état sauvage et son origine est incertaine : Chine ? Inde ? (Ravindran and Babu, 2005). De nombreux cultivars sont produits en Inde, en Malaisie, en Chine mais aussi au Sierra Leone, au Nigeria, en Australie.

La racine brute est simplement séchée à l'air (non pelée). Le nom est dérivé du sanskrit *shringavera*, qui signifie « en forme du bois de cerf ». De là sont apparus les noms grec *ziggiberis* et latin *zingiber*, puis « gingibre » en français, et finalement « gingembre » (Weiss et Abrahams, 2020).

2-Botanique

Herbe vivace par un rhizome sympodial le gingembre possède des feuilles engainantes et des fleurs zygomorphes groupées en épis denses. Le périanthe, 2-cyclique et 3-mère, entoure un androcée réduit à une seule étamine fertile et à un « labelle » et un gynécée à 3 carpelles, eusyncarpe.

Partie active

Le gingembre est constitué par le rhizome séché, entier ou coupé, de *Z. officinale*, débarrassé du liège, soit complètement, soit seulement sur les faces plates et larges. Entier ou coupé, le gingembre contient au minimum 15 ml / kg d'huile essentielle (Ghasemzadeh et al., 2016).

Plante

Le gingembre possède des caractères botaniques très proches de ceux du curcuma : grande plante herbacée (1,5 m) vivace par son rhizome horizontal, à longues feuilles au limbe lancéolé et au pétiole engainant et stipulé, inflorescence en épi dense avec des bractées latérales se recouvrant, fleurs à corolle jaune en tube à la base, à staminode pétaloïde formant un labelle pourpre (figure 1).

L'espèce, uniquement cultivée, serait originaire de l'Inde ; sa production mondiale avoisine un million de tonnes (Ravindran and Babu, 2005 ; Shukla and Singh, 2007). De nombreuses variétés de gingembre sont cultivées en Inde (420000 tonnes), en Chine (285000 tonnes), au Népal (159000 tonnes), au Bangladesh (57000 tonnes), dans tout le sud-est asiatique (Indonésie [177000 tonnes], Philippines [28000 tonnes], etc.) et en Afrique tropicale (Nigeria [138000 tonnes]) (FAO, 2021 ; Zeng et al., 2013).

L'aspect des gingembres commerciaux varie selon l'origine et le mode de préparation : gingembre gris (*coated*) à surface ridée, gingembre blanc (*uncoated, scraped*) à surface lisse, gingembre préparé (*preserved*) (Ravindran et al., 2016).



Figure 1: la plante «*Zingiber officinale* ou gingembre» et ses différentes végétales (Bruneton, 2009; Kumar and Bhatnagar, 2014 ; Chevallier, 2016).

Rhizome

Le rhizome, comprimé latéralement (5-10 cm × 1,5-3-4 cm × 1-1,5 cm) est courtement ramifié sur sa face supérieure. Il peut avoir une surface externe brun clair et striée (rhizome mondé) ou brun plus ou moins foncé et partiellement revêtu de liège parcouru de rides transversales et longitudinales bien visibles (rhizome non mondé). La cassure est fibreuse et granuleuse, l'odeur aromatique, la saveur chaude et piquante (Efferth and Greten, 2019).

Examinée au microscope dans du glycérol à 50 %, la poudre de rhizome présente de nombreux grains d'amidon aplatis, ovales (50 × 25 µm) ou irréguliers à petit hile punctiforme situé à l'extrémité la plus étroite (figure 2) (Trease and Evans, 2009 ; Kokate et al., 2010).



Figure 2 : Grains d'amidon du rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*) (Trease and Evans,2009 ; Kokate et al., 2010).

De grandes fibres à paroi souvent dentée et des cellules à oléorésines sont visibles quand la poudre est examinée dans l'hydrate de chloral (figure 3) (Kokate et al., 2010).

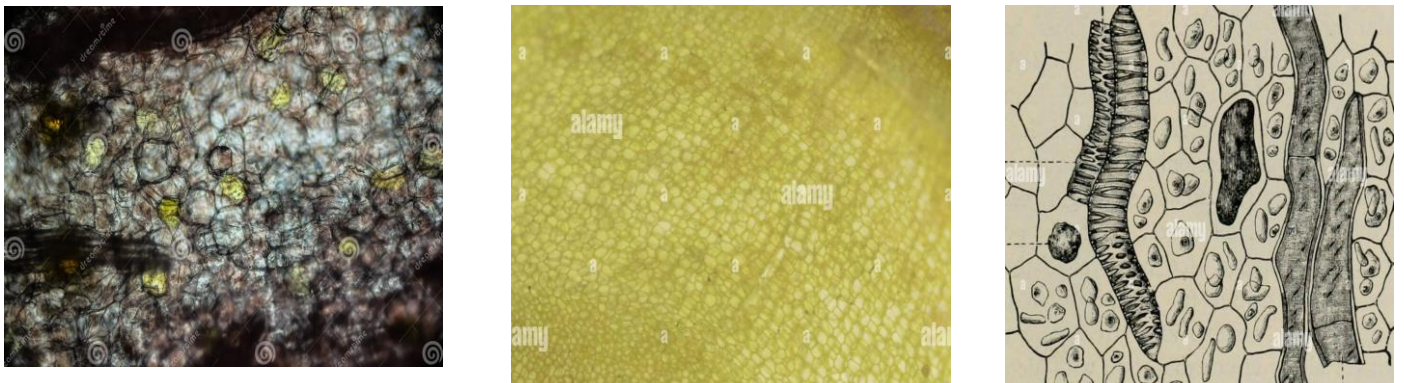


Figure 3 : Coupe transversale du rhizome de gingembre (Okwu and Nnamdi, 2008 ; Naik and Jhala, 2016).

3-Composition chimique

Le rhizome, très riche en amidon (60 %), renferme des protéines, des lipides (10 %), de 10 à 40 ml/kg d'huile essentielle et une résine (Mao et al., 2021). La composition de l'huile essentielle varie beaucoup selon l'origine géographique, les éléments principaux – des carbures sesquiterpéniques représentant 30 à 70 % de l'huile essentielle – semblent être constants : zingibérène, curcumène, β -sesquiphellandrène, α -farnésène, β -bisabolène, accompagnés d'aldéhyde (citral) et d'alcools monoterpéniques dont une partie existe dans le rhizome frais sous forme d'hétérosides (Masuda et al., 2008).

Les constituants responsables de la saveur très marquée du gingembre sont des 1-(3'-méthoxy-4'-hydroxy-phényl) -5-hydroxy-alcan-3-ones (Stoilova et al., 2007). Ces composés ont une chaîne latérale de longueur variable de 7 à 16 carbones.

Les gingérols sont accompagnés de cétones correspondantes, de gingerdiols ((3-désoxy-3,5-dihydroxygingérols), de déoxygingérols (paradol) et d'esters et, dans le rhizome sec, de produits de déshydratation : les shogoals (ou 5-désoxy-4,5-déhydrogingérols) (Baliga et al., 2011). On note aussi, mais uniquement dans certaines variétés, la présence de diterpènes labdaniques (galonolactone et dérivé dialdéhyde) ou celle de diarylheptanoïdes (curcuminoïdes linéaires et cycliques) (Zancan et al., 2002).

Le gingembre (*Zingiber officinale*) est une plante médicinale et aromatique dont les rhizomes sont utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques et culinaires. La composition chimique des extraits hydroalcoolique, aqueux et alcoolique, ainsi que de l'huile essentielle de gingembre, varie en fonction des méthodes d'extraction et des conditions d'analyse. La composition chimique dépend du solvant utilisé pour l'extraction.

Selon une étude publiée dans le *Journal of the Cameroon Academy of Sciences* en 2022, l'extrait aqueux, préparé à partir de 100 g de poudre de rhizomes, renferme les composés suivants : polyphénols totaux (840 mg), flavonoïdes (2,98 g), tanins (1,51 g), protéines (5,09 g), lipides (3,72 g), glucides (38,35 g), vitamine C (9,33 mg), caroténoïdes (29 mg), cendres (3,85 g), minéraux [Ca (0,88 g), P (1,74 g), Fe (0,008 g), Zn (0,038 g), Cu (0,001 g), Cr (0,0007 g), Mn (0,0009 g)] (Fotsing et al., 2022).

La même étude a révélé la composition chimique d'un extrait hydroalcoolique (30 % éthanol), préparé à partir de 100 g de la poudre de rhizomes du gingembre, comme suit : polyphénols totaux (1,12 g), flavonoïdes (0,12 g), tanins (0,06 g), protéines (5,08 g), lipides (3,72 g), glucides (38,35 g), vitamine C (9,33 mg), caroténoïdes (29 mg), cendres (3,85 g), minéraux [Ca (0,88 g), P (1,74 g), Fe (0,008 g), Zn (0,038 g), Cu (0,001 g), Cr (0,0007 g), Mn (0,0009 g)] (Fotsing et al., 2022).

Selon une étude publiée dans la revue *Frontiers in Pharmacology* en 2022, l'huile essentielle de gingembre est riche en composés volatils, principalement des sesquiterpènes. La composition varie selon les méthodes d'extraction et les conditions d'analyse. Principaux composés identifiés sont comme suit : zingibérène (19,71 %), β -cédrene (12,85 %), farnésène (12,17 %), α -curcumène (10,18 %), β -élémyène (3,54 %), borneol (2,73 %) (Zhang et al., 2022).

Diverses méthodes d'analyse et de séparation des composés bioactifs sont utilisées pour analyser la composition chimique des extraits et de l'huile essentielle de gingembre (**Joubert, E., et al., 2016**), à savoir :

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) : Cette méthode permet d'identifier et de quantifier les composés volatils présents dans l'huile essentielle. Elle est couramment utilisée pour les analyses des huiles essentielles.

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) : Utilisée pour analyser les extraits non volatils, notamment les polyphénols, flavonoïdes et autres composés bioactifs.

Chromatographie sur couche mince (CCM) : Une technique simple pour séparer et identifier les composés présents dans les extraits.

Les compositions chimiques des extraits de rhizomes de gingembre (*Zingiber officinale*) et celles des huiles essentielles extraites de cette même plante, par différentes méthodes chromatographiques, sont résumées dans les **tableaux 2 et 3** (**Kant et al., 2012; Tao Y., et al., 2014**) :

Tableau 2 : Composition chimique des extraits de rhizomes de gingembre (**Kant et al., 2012; Tao Y., et al., 2014**)

Composé	Extrait aqueux (%)	Extrait hydroalcoolique (%)	Extrait alcoolique (%)	Méthode d'analyse
Zingibérène	0.5	1.5	1.2	CPG-SM (GC-MS)
β -Cédrene	1.0	1.2	0.8	CPG-SM (GC-MS)
Farnésène	0.8	1.0	0.9	CPG-SM (GC-MS)
Curcumène	0.6	1.3	1.1	CPG-SM (GC-MS)
Gingérol	8.5	10.1	9.4	HPLC, GC-MS
Shogaol	4.2	5.5	3.9	HPLC, GC-MS
Gingérol-6	4.5	6.0	4.8	HPLC, GC-MS
Protéines	5.0	5.1	5.0	HPLC
Lipides	3.5	3.7	3.6	HPLC

CPG-SM (GC-MS) : chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

HPLC : chromatographie liquide de haute performance

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile essentielle de gingembre (**Kant et al., 2012; Tao Y., et al., 2014**)

Composé	Pourcentage (%)	Méthode d'analyse
Zingibérène	19.71	CPG-SM (GC-MS)
β -Cédrene	12.85	CPG-SM (GC-MS)
α -Curcumène	10.18	CPG-SM (GC-MS)
Farnésène	12.17	CPG-SM (GC-MS)
β -Élémène	3.54	CPG-SM (GC-MS)
Borneol	2.73	CPG-SM (GC-MS)
Citral (Neral & Géranial)	3.40	CPG-SM (GC-MS)
Zingerone	2.10	CPG-SM (GC-MS)

4-Pharmacologie

Chez la souris et par voie orale, l'extrait acétonique du rhizome (à la dose de 75 mg/kg), renfermant les composés bioactifs shogaol et gingérols stimulent la motilité gastrointestinale (**Ali et al., 2008; Ghayur et al., 2008**). Leur action est comparable à celle du métoprolamide (à la dose de 10 mg/kg) (**Ghayur et al., 2008**). Cet extrait et le gingérol stimulent la sécrétion biliaire par voie intrapéritonéale chez le rat (**El-Sharakly et al., 2009**).

Expérimentalement, l'oléorésine est hypocholestérolémiant chez les rongeurs et le gingérol est hépato protecteur contre la toxicité du tétrachlorure de carbone sur des hépatocytes de rat (**El-Sharakly et al., 2009**). Un extrait éthanolique freine l'augmentation des taux sériques de cholestérol et de triglycérides induits, chez le lapin, par un régime riche en lipides (**Ali et al., 2008**). Chez des souris mutantes, déficientes en apolipoprotéines, la consommation d'un extrait de gingembre inhibe l'oxydation de LDL et le développement de plaques athérosclérotiques (**Fuhrman et al., 2000**). Un extrait sec réduit la production de suc gastrique et protège la muqueuse contre des agents ulcérogènes tels que l'indométhacine (**Shukla & Singh, 2007**).

Une activité anti-inflammatoire (œdème) a été rapportée par des extraits de rhizomes de gingembre administrés par voie orale chez le rat (**Heimes et al., 2009**). Cet effet pourrait être du à l'inhibition des cyclo-oxygénases et des lipoxygénases observée in vitro avec un extrait aqueux (**Nurtjahja-Tjendraputra et al., 2003**). Les extraits de gingembre, piègeurs de radicaux libres, sont antioxydants, inhibiteurs de la peroxydation lipidique in vitro (**Chen & Huang, 1998**).

Pour certaines études, l'action antiémétique de l'extrait de gingembre pourrait être consécutive à des effets directs sur le système digestif. Chez la souris, la stimulation de la motilité gastrointestinale par l'extrait acétonique (75 mg/kg), par le shogol (2,5 mg/kg) ou par les gingérols est comparable à celle du métaclopramide (10 mg /kg) (**Ali et al., 2008; Ghayur et al., 2008**).

D'autres études ont cependant relevé l'absence d'effets, chez l'homme sain, de la poudre de gingembre sur la vitesse de la vidange gastrique (**Ali et al., 2008**). Le shogol et le gingérol pourraient intervenir dans l'activité antinauséuse en supprimant les contractions gastriques et en stimulant la motilité gastro-intestinale et le péristaltisme (**Ali et al., 2008; Chen & Huang, 1998**).

5-Evaluation clinique

Chez l'humain, plus de 30 études et essais visant à évaluer les propriétés antiémétiques du gingembre ont été publiées : études aux laboratoires, évaluation de l'effet sur le mal de mer, sur les nausées et les vomissements de la grossesse, sur les nausées post-opératoires et sur celles induites par chimiothérapies (**Gigon, 2012**). Le gingembre a également été partiellement évalué dans le traitement de l'arthrose (**Black et al., 2010**).

Une étude conduite selon un protocole rigoureux contre placebo, montre l'utilité de la poudre de rhizome dans la prévention du mal des transports. La prise de 940 mg de poudre avant l'épreuve (chaise rotative) se montre plus efficace qu'une médication classique (dimenhydrinate, 100 mg) pour prévenir les symptômes gastro-intestinaux et des nausées (**Terry et al., 2011**).

De nombreux essais cliniques, à double insu avec placebo, ont démontré l'efficacité et la sécurité du gingembre et la sécurité du gingembre pour diminuer les nausées et vomissements de la femme enceinte au début de la grossesse (**Lakhan and Ford, 2015**).

Tous les essais cliniques effectués dans ce domaine concluent que le gingembre se révèle aussi efficace, voire plus efficace que le traitement de référence (vitamine B6) sans effets secondaires et complications (**Sharma and Srivastava, 2018**).

Une étude clinique menée auprès de 247 sujets, a montré qu'un extrait de gingembre administré par voie orale pendant 6 semaines permettrait de réduire de façon significative les symptômes de l'arthrose du genou (**Altman and Marcussen, 2001**).

6-Relation gingembre-fertilité masculine

L'infertilité est l'un des principaux problèmes de santé de la vie, et environ 30 % des infertilités sont dues à un facteur masculin (Agarwal et al., 2015 ; Kumar & Singh, 2015). Plusieurs conditions peuvent interférer avec la spermatogenèse et réduire la qualité et la production de sperme. D'autres facteurs tels que les traitements médicamenteux, la chimiothérapie, les toxines, la pollution de l'air, la toxicité des métaux lourds et l'apport insuffisant en vitamines ont des effets nocifs sur la spermatogenèse et la production normale de sperme (Gonzalez-Marín, Gosálvez, & Roy, 2012). Plusieurs études ont rapporté que les antioxydants et les vitamines A, B, C et E dans l'alimentation peuvent protéger l'ADN du sperme des radicaux libres et augmenter la stabilité de la barrière hémato-testiculaire (Showell et al., 2014 ; Tremellen, 2008).

De nos jours, le rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*, famille : Zingiberaceae), est utilisé dans le monde entier comme épice. L'activité antioxydante (Ali et al., 2008) et androgénique (Khaki et al., 2009) de *Z. officinale* a été rapportée dans des modèles animaux. Tous les principaux ingrédients actifs de *Z. officinale*, tels que la zingérone, le gingerdiol, le zingibrène, les gingérols et les shogaols, ont une activité antioxydante (Masuda et al., 2004). En outre, d'autres études ont montré que l'huile essentielle de gingembre a un effet préventif envers les altérations du matériel génétique (ADN) induits par H₂O₂ et pourrait agir comme un piègeur de radicaux oxygénés et pourrait être utilisée comme antioxydant (Habib et al., 2008). Les antioxydants protègent l'ADN et d'autres molécules importantes de l'oxydation et des dommages, et peuvent améliorer la qualité du sperme et par conséquent augmenter le taux de fertilité chez les hommes (Showell et al., 2011 ; Agarwal et al., 2014). Par conséquent, le rôle des facteurs nutritionnels et biochimiques dans la reproduction et le traitement de l'infertilité est très important.

Etudes animales

Plusieurs études ont exploré la relation entre l'extrait de rhizome de gingembre (*Zingiber officinale*) et la fertilité chez les animaux. Les résultats indiquent que le gingembre peut influencer divers aspects de la fertilité en fonction des doses administrées, des extraits utilisés (aqueux, hydroalcooliques, etc.), et des paramètres étudiés (spermatogenèse, taux hormonaux etc.).

Kamtchouing et al. (2002) ont montré que l'administration orale d'un extrait aqueux de gingembre améliore la qualité et la motilité des spermatozoïdes chez les rats mâles. Cela a été

attribué à son potentiel antioxydant, qui protège les cellules germinales, spermatides et spermatozoïdes contre le stress oxydatif.

Khaki et al. (2009) ont observé une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes et de la viabilité spermatique après administration d'un extrait de gingembre. Ils ont attribué cet effet aux propriétés antioxydantes et à la stimulation de la production de testostérone.

Saad and Abou-Zeid (2011) ont suggéré que le gingembre stimule la production de testostérone chez les rats mâles. L'extrait semble agir sur les cellules de Leydig, responsables de la synthèse de cette hormone.

Amin et Hamza (2006) ont constaté que l'extrait de gingembre protège les testicules contre les effets toxiques de certains médicaments et toxines, notamment en réduisant les dommages oxydatifs.

Etudes cliniques

Ghoochani et al. (2021) ont mené une étude randomisée en évaluant l'effet du gingembre sur la qualité du sperme chez des hommes stériles. Les résultats ont montré une augmentation significative du volume de sperme, de la motilité des spermatozoïdes et de leur concentration après 12 semaines d'une consommation d'une alimentation supplémentée en gingembre.

Kamal et al. (2019) ont révélé que la supplémentation en gingembre peut réduire le stress oxydatif et améliorer les niveaux de testostérone chez les hommes stériles. Les propriétés antioxydantes du gingembre ont été mises en évidence pour expliquer ces effets.

Mohammad-ghasemi et al. (2020) ont rapporté que l'administration d'extraits de gingembre améliore les marqueurs antioxydants dans le plasma séminal tout en augmentant la motilité et le nombre de spermatozoïdes.

Le gingembre contient des composés bioactifs (ou métabolites secondaires) comme les gingérols et les shogaols, connus pour leur capacité à neutraliser les radicaux libres qui peuvent endommager les cellules germinales et le sperme. L'extrait de gingembre peut stimuler la production de testostérone, ce qui est bénéfique pour la spermatogenèse. Certaines études ont indiqué que le gingembre peut réduire l'impact négatif des polluants environnementaux (métaux lourds et pesticides) et des toxines sur la fertilité masculine. Les études cliniques ont montré des limites parce qu'elles étaient réalisées sur des échantillons restreints et souvent durent quelques mois, ce qui limite la compréhension des effets à long terme.

Chapitre 3 : Points de vue de la littérature sur les relations « chrome (VI)-pathologies prostatiques » et « gingembre-pathologies prostatiques »

Introduction

Les pathologies prostatiques, telles que l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), la prostatite et le cancer de la prostate, représentent un enjeu majeur de santé publique mondiale, particulièrement chez les hommes de plus de 50 ans. Ces affections peuvent altérer considérablement la qualité de vie, voire compromettre le pronostic vital, notamment dans le cas du cancer prostatique. Si l'âge, les facteurs hormonaux et la génétique sont bien établis comme facteurs de risque, un intérêt croissant est accordé à l'impact des agents environnementaux et nutritionnels dans l'initiation et la progression de ces maladies.

Le chrome hexavalent (CrVI), présent sous forme de trioxyde de chrome (CrO_3), est un polluant industriel reconnu pour sa toxicité systémique et ses effets génotoxiques. Plusieurs études ont démontré sa capacité à induire un stress oxydatif, des altérations de l'ADN et une perturbation du système endocrinien, y compris au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

Face à ces agressions chimiques, certaines plantes médicinales à potentiel antioxydant, telles que le gingembre (*Zingiber officinale*), suscitent un intérêt croissant pour leurs effets cytoprotecteurs. Le gingembre est largement utilisé dans la médecine traditionnelle et possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, et anticancéreuses, notamment sur les organes de la reproduction.

Ce chapitre vise à explorer les interactions entre le trioxyde de chrome (CrVI) et le gingembre dans le contexte des pathologies prostatiques, en mettant l'accent sur les mécanismes moléculaires sous-jacents et les données expérimentales disponibles.

1-Trioxyde de chrome (CrVI) : nature, exposition, toxicité

Le chrome (Cr) est un élément métallique naturel qui existe principalement sous deux formes d'oxydation : le chrome trivalent (CrIII) et le chrome hexavalent (CrVI). Le CrIII est un oligoélément essentiel à faible dose, impliqué dans le métabolisme du glucose et des lipides. À l'inverse, le CrVI, présent dans le trioxyde de chrome (CrO_3), est une forme hautement oxydante et toxique, classée comme cancérigène certain pour l'homme (groupe 1 du CIRC) (IARC, 2012).

Le CrVI est largement utilisé dans diverses industries (traitement de surface, galvanoplastie, fabrication de pigments, cuir, textile). Il peut contaminer l'environnement et être absorbé par

voie respiratoire, cutanée ou digestive. Une fois dans l'organisme, il est rapidement internalisé dans les cellules via les transporteurs des anions (comme les transporteurs du sulfate) en raison de sa similarité structurale avec l'ion sulfate (SO_4^{2-}).

Au niveau cellulaire, le CrVI est réduit en CrV, CrIV puis CrIII, générant au passage une importante production de radicaux libres (O_2^- , $\text{OH}\cdot$, H_2O_2), responsables de dommages oxydatifs à l'ADN, aux lipides membranaires et aux protéines (**Kumar et al., 2021**). Ce stress oxydatif joue un rôle central dans la toxicité cellulaire et la carcinogenèse induite par le CrVI.

2-CrVI et toxicité sur l'appareil reproducteur mâle

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence les effets délétères du CrVI sur l'appareil reproducteur mâle. Chez le rat, l'exposition au CrVI a été associée à une réduction du poids des testicules, une altération de la spermatogenèse, une diminution du taux de testostérone, et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les tissus reproducteurs (**Elbetieha et al., 2001 ; Junaid et al., 2019**).

Les mécanismes de cette toxicité incluent :

- L'induction du stress oxydatif, avec peroxydation lipidique et dommages à l'ADN spermatique.
- L'activation des voies pro-apoptotiques (augmentation de Bax, caspase-3 ; diminution de Bcl-2).
- L'altération de la barrière hémato-testiculaire.
- La perturbation de la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig.

Ces effets peuvent entraîner une infertilité masculine, une baisse de la libido, et une vulnérabilité accrue aux pathologies prostatiques.

3-CrVI et pathologies prostatiques (inflammation, dysfonction et cancer)

Bien que les effets du CrVI aient été largement étudiés au niveau des testicules et de la spermatogenèse, des données récentes indiquent également une implication dans les pathologies de la prostate. En raison de sa capacité à induire un stress oxydatif chronique, des lésions de l'ADN et une inflammation, le CrVI pourrait jouer un rôle dans la genèse ou l'aggravation de diverses affections prostatiques.

• Inflammation prostatique (prostatite)

Le CrVI est capable d'induire une réponse inflammatoire par activation des voies NF- κ B et MAPK, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, TNF- α et IL-1 β . Dans des modèles animaux, une exposition chronique au CrVI a été associée à une

infiltration de cellules immunitaires dans les tissus prostatiques et à une hypertrophie des glandes prostatiques secondaires (Junaid et al., 2019).

• **Hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)**

Bien que peu de données spécifiques relient directement le CrVI à l'HBP, certains effets indirects ont été suggérés. Le stress oxydatif chronique et l'inflammation induite par le CrVI peuvent favoriser la prolifération des cellules stromales et épithéliales prostatiques, mécanisme central dans l'hypertrophie. De plus, le CrVI peut perturber l'équilibre hormonal (testostérone/DHT/oestrogènes), favorisant ainsi un environnement propice à l'HBP (Kumar et al., 2021).

• **Carcinogénèse prostatique**

Le potentiel cancérigène du CrVI est bien établi dans les poumons et d'autres organes. Concernant la prostate, des études ont montré que le CrVI pouvait induire :

- Une instabilité génomique par génération de cassures de l'ADN double-brin.
- La méthylation aberrante de l'ADN, altérant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs.
- Une augmentation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose.

Ainsi, une exposition prolongée au CrVI pourrait contribuer à l'initiation ou à la progression du cancer de la prostate, bien que des études épidémiologiques humaines soient encore rares.

4-Gingembre (*Zingiber officinale*) : composés actifs et propriétés biologiques

Le gingembre est une plante herbacée tropicale largement utilisée en médecine traditionnelle asiatique, africaine et moyen-orientale. Son rhizome contient une riche variété de composés bioactifs, principalement des phénols et des terpènes, qui lui confèrent de nombreuses propriétés thérapeutiques.

• **Composés bioactifs majeurs :**

- Gingerols (notamment le 6-gingérol)
- Shogaols
- Paradols
- Zingerone
- Huiles essentielles (zingibérène, bisabolène, farnésène)

Ces molécules sont reconnues pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, immunomodulatrices et antitumorales (Ali et al., 2008 ; Mashhadi et al., 2013).

● **Propriétés pharmacologiques pertinentes :**

- **Antioxydant** : neutralisation des radicaux libres (DPPH, superoxyde, hydroxyle), augmentation des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx).
- **Anti-inflammatoire** : inhibition des voies COX-2, NF-κB, réduction des cytokines pro-inflammatoires.
- **Cytoprotecteur** : stabilisation des membranes cellulaires, protection de l'ADN.
- **Anticancéreux** : inhibition de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, modulation des gènes de cycle cellulaire (p53, Bcl-2, Bax).

Ces propriétés font du gingembre un candidat intéressant pour la prévention ou l'atténuation des effets toxiques du CrVI, notamment au niveau de la prostate.

5-Effets du gingembre sur l'appareil reproducteur mâle

L'utilisation du gingembre dans le traitement de la fertilité masculine est ancienne, soutenue aujourd'hui par de nombreuses recherches scientifiques. Les effets bénéfiques du gingembre sur l'appareil reproducteur mâle s'expliquent principalement par ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et hormonales.

● **Amélioration de la spermatogenèse**

Des études expérimentales ont montré que l'administration de gingembre chez des rats mâles améliore la qualité et la quantité des spermatozoïdes. Il augmente le nombre, la motilité et la **viabilité** des spermatozoïdes, tout en réduisant les anomalies morphologiques [Khaki et al., 2009].

● **Stimulation hormonale**

Le gingembre favorise la production de testostérone en stimulant l'activité des cellules de Leydig. Il augmente les niveaux plasmatiques de LH (hormone lutéinisante), ce qui stimule indirectement la stéroïdogénèse testiculaire (**Morakinyo et al., 2008**).

● **Protection contre les agents toxiques**

Plusieurs recherches ont démontré que le gingembre peut contrer les effets délétères de toxiques environnementaux ou médicamenteux (cadmium, cyclophosphamide, plomb) sur les testicules, en réduisant le stress oxydatif et en améliorant les paramètres reproducteurs.

6-Effets protecteurs du gingembre contre la toxicité du CrVI

Le gingembre s'est révélé être un agent chimioprotecteur efficace contre divers polluants environnementaux, y compris les métaux lourds comme le chrome hexavalent. Ses effets protecteurs sont attribués à plusieurs mécanismes :

- **Réduction du stress oxydatif**

Les composés antioxydants du gingembre (gingérols, shogaols) capturent les radicaux libres générés par le CrVI. Le gingembre restaure également l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, catalase, glutathion peroxydase) diminuées par l'exposition au chrome (Ajiroye et al., 2010).

- **Stabilisation membranaire et protection de l'ADN**

Le gingembre limite la peroxydation lipidique (diminution du MDA) et protège l'intégrité de l'ADN en réduisant les cassures induites par le CrVI. Il prévient ainsi les altérations génétiques pouvant mener à la transformation cellulaire maligne (El-Haroun et al., 2020).

- **Préservation des fonctions hormonales et prostatiques**

Dans des études expérimentales, le gingembre a empêché la baisse de testostérone et réduit l'inflammation prostatique induite par des agents toxiques, incluant le CrVI. Il préserve la structure histologique de la prostate et améliore la vascularisation et la fonction glandulaire (Sharma et al., 2016).

7-Interactions CrVI – Gingembre dans le contexte des pathologies prostatiques

L'interaction entre le CrVI et le gingembre se manifeste par une **opposition directe** entre un toxique pro-oxydant et une plante antioxydante aux effets régulateurs sur l'homéostasie cellulaire.

- **CrVI : facteur de risque prostatique**

Le CrVI agit comme un **agent perturbateur cellulaire**, favorisant le microenvironnement inflammatoire, la prolifération anormale et la cancérogenèse prostatique. Il constitue un facteur aggravant potentiel pour des sujets exposés, notamment en milieu industriel.

- **Gingembre : agent préventif et thérapeutique**

Le gingembre, en inhibant les effets délétères du CrVI, peut jouer un rôle chimiopréventif dans les pathologies prostatiques. Il atténue l'inflammation chronique, régule les signaux de prolifération cellulaire, protège l'ADN et restaure les fonctions hormonales, réduisant ainsi le risque de développement d'une hypertrophie ou d'une tumeur prostatique.

Matériel & méthodes

1. Objectif du travail

L'objectif de notre projet est d'évaluer les possibles effets préventifs d'un extrait hydro-alcoolique (éthanol) de *Zingiber officinale* (ou gingembre) contre les effets toxiques du trioxyde de chrome (CrO₃) envers le fonctionnement de l'appareil reproducteur male (tissus prostatique et testiculaire) chez le rat Wistar adulte. Ce travail englobe essentiellement des études phytochimique, biochimique, hormonale et histologique.

2. Matériel végétal

2.1. Origine et Identification de l'espèce

Zingiber officinale, communément appelé gingembre, est originaire de l'Asie du Sud-Est. Cette espèce est disponible dans le marché local algérien. Ses racines (ou rhizomes) sont utilisées en phytothérapie, en médecine traditionnelle et en cuisine.

L'espèce végétale « *Zingiber officinal* », faisant l'objet de cette étude, a été réceptionnée au sein du Laboratoire de Recherche de Bio-toxicologie et Pharmacognosie, Valorisation Biologique des Plantes (LRBPVBP), affilié à la Faculté des Sciences de la Nature et la vie, Université Dr. Moulay-Tahar de Saida, Algérie. La plante médicinale, *Zingiber officinale*, a été identifiée par des enseignants botanistes spécialistes tout en ayant recours à des outils simples et didactiques pour son identification à savoir des ouvrages de littérature botanique et de biologie végétale (Encyclopédie des plantes médicinales),

2.2. Préparation des échantillons

Les rhizomes de *Zingiber officinale* ont été collectés auprès des herboristes opérant au niveau des marchés locaux de la ville de Saida, Algérie. Les échantillons ont été préparés afin de préserver leur qualité.

Les échantillons ont été soigneusement nettoyés pour éliminer les impuretés, puis séchés et broyés afin d'obtenir une poudre homogène, qui sera utilisée pour les analyses ultérieures. Chaque lot de matériel végétal a été conservé dans des conditions contrôlées de température et d'humidité pour prévenir toute altération des composés actifs.

2.3. Conservation des Échantillons

Les rhizomes broyés ont été conservés dans des conditions optimales pour éviter leur dégradation. La conservation adéquate est essentielle pour préserver les propriétés bioactives du matériel végétal et garantir la fiabilité des résultats expérimentaux.

3. Etude phyto-chimique

3.1. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) du *Zingiber officinale*

Le rhizome de *Zingiber officinale* a été acheté au marché aux épices de la ville de Saida, et a été présenté au Laboratoire de Recherche de Bio-toxicologie et Pharmacognosie, Valorisation Biologique des Plantes (LRBPVBP), affilié à la Faculté des Sciences de la Nature et la vie, Université Dr. Moulay-Tahar de Saida pour une identification, déjà décrit dans les paragraphes suscités. La plante a ensuite été lavée, rincée à l'eau distillée et divisée en morceaux plus petits. Les morceaux ont été séchés à température ambiante. Les morceaux séchés ont été broyés dans un moulin électrique et la matière première broyée (20 g) a été filtrée pour obtenir une poudre fine. Cette même poudre a été utilisée dans la préparation de l'extrait (100 ml d'éthanol à 70 %). L'extrait brut a été préparé selon la méthode de macération. La poudre séchée a été trempée pendant 48 h dans de l'éthanol à 70 %. Après 48 heures, le mélange a été séché à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis filtré à nouveau à l'aide de papier filtre Whatman (Edo, 2022). Le résidu obtenu a été stocké au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation ultérieure (Serairi-Beji et al., 2018). Cette procédure a été répétée chaque semaine tout au long de l'étude.

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

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

3.2. Dosages des métabolites secondaires

3.2.1. 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 phospho-molybdate et de phospho-tungstate 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 hétéro-poly-phospho-tungstates-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 (Jadhav et al., 2012).

- Mode opératoire

La TTP des extraits de l'extrait hydro-alcoolique des rhizomes de Zingiber officinale (ou gingembre) a été estimée par spectrométrie selon la méthode du Folin-Ciocalteu adopté par **Afroz et al., (2014)**. Brièvement, une aliquote de la fraction d'échantillon diluée (0,125ml) 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. 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 (AlCl₃) (**Chang et al., 2002**). Le principe de base de la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium est que l'AlCl₃ forme des complexes acides stables avec le groupement céto et l'un ou l'autre des groupes hydroxyle des flavonoïdes, tandis qu'il se lie aux flavonoïdes par l'intermédiaire du groupe β-dicéton (**Siddique et al., 2010**).

-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'AlCl₃ à 10% sont ajoutés. Puis, après 6 min, 0,2 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 µg/mL (R² = 0,99). Les échantillons ont été analysés en trois répétitions.

3.3. Activité de piégeage des radicaux DPPH (Activité anti-oxydante)

- Principe

Ce test est largement utilisé pour déterminer l'activité anti-oxydante 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 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 (Njoya, 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 µL 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 µL 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 :

$$I (\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

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

A: Absorbance en présence d'extrait.

4. Matériel animal

4.1. Préparation des animaux

L'expérimentation a été menée sur 20 mâles adultes de souche *Wistar*, âgés de 2 mois et pesant en moyenne 280.88 ± 7.56 g. La période d'expérimentation était de 90 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 à une alimentation spéciale rongeurs (15 % de protéines).

Les rats ont été répartis en 4 groupes (cinq rats / groupe). Les animaux témoins normaux (1^{er} groupe) ont reçu une alimentation standard et une solution physiologique saline (0,9 % NaCl).

Le deuxième groupe de rats (témoins expérimentaux) a été traité en recevant par gavage une solution de trioxyde de chrome (CrO_3) à la dose de 10 mg/kg/ jour (soit 1/10 de DL_{50}) ($\text{DL}_{50} = 52\text{-}113$ mg/L chez le rat par voie orale) (Cross et al., 1997). Le troisième groupe d'animaux a reçu par voie orale une solution de l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) du rhizome de *Zingiber officinale* à la dose de 600 mg / kg / jour (soit 1/100 of DL_{50}) ($\text{DL}_{50} = 3800$ mg/L chez le rat par voie orale) (Hamman et al., 2022). L'extrait a été dissout dans l'huile de maïs lors du gavage afin d'éviter l'irritation des voies digestives de l'animal. Le quatrième groupe d'animaux a reçu dans l'ordre l'extrait hydro-alcoolique de *Zingiber officinale* et la solution du trioxyde de chrome dans les mêmes conditions expérimentale.

4.2. Suivi des rats

Durant la période expérimentale, les rats ont fait l'objet de mesure de leur poids corporel à l'intervalle d'une semaine entre deux mesures successives. Cette étape a servi à déterminer leur gain corporel moyen exprimé en g /semaine selon l'équation (Qin et al., 2013) :

$$\text{Gain corporel moyen} = \text{Poids moyen final} - \text{Poids moyen initial}$$

4.3. Prélèvement et collecte du sang

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 des marqueurs biochimiques à savoir ; les marqueurs du stress oxydatif, marqueurs tumoral et hormonal. 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 des marqueurs du stress oxydatif (les activités du glutathion et de la catalase) et ainsi du marqueur tumoral (antigène spécifique de la prostate ou PSA) et l'hormone sexuelle male « testostérone » en utilisant des méthodes de dosage immuno-enzymatique basées sur des kits commerciaux (VIDAS Assays, BIOMERIEUX) (Uboh et al., 2007).

5. Détermination sérique des paramètres biochimiques

5.1. Préparation des homogénats des organes

Les homogénats des tissus prostatique et testiculaire ont été préparés selon la méthode d'écrite par Olayinka et al., (2019) en broyant 1 g 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 ont été prélevés et maintenus au congélateur (à -20 ° C) pour être utilisés dans les dosages biochimiques des marqueurs du stress oxydatif tissulaire.

5.2. Dosage des paramètres du stress oxydatif

5.2.1. Glutathion réduit (GSH)

Principe

Le dosage du glutathion (GSH) a été réalisé selon la méthode de **Weckbecker & Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide DTNB (réactif d'Ellman) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

Mode opératoire

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide SSA 0,25 %.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0,02 M d'EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc

5.2.2. Dosage de la catalase

- *Principe*

Le peroxyde d'hydrogène (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 concentrations 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 tubes 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.

5.3. Dosage sérique des marqueurs tumoraux et hormonaux

5.3.1. Dosage sérique de l'antigène spécifique de la prostate (PSA)

5.3.1.1. Principe du dosage immuno-enzymatique type ELISA

Les dosages immuno-enzymatiques sont basés sur la combinaison d'un traceur enzymatique et d'une immuno-réaction. La mesure de la fluorescence, émise lors de la réaction enzymatique, permettra alors de quantifier la réaction spécifique (Détermination de la concentration sérique du PSA). Deux types d'anticorps ont été préparés contre deux sites antigéniques. Le premier anticorps anti-PSA ou anticorps liant (il n'est pas marqué) est adsorbé sur une phase solide. Le deuxième anticorps anti-PSA de même nature, conjugué à l'enzyme, est utilisé comme traceur enzymatique qui agira sur un substrat en donnant naissance à une réaction fluorescente. L'antigène à doser est alors pris en sandwich entre ces deux types d'anticorps d'où l'appellation de "methode sandwich" (**figure 4**).

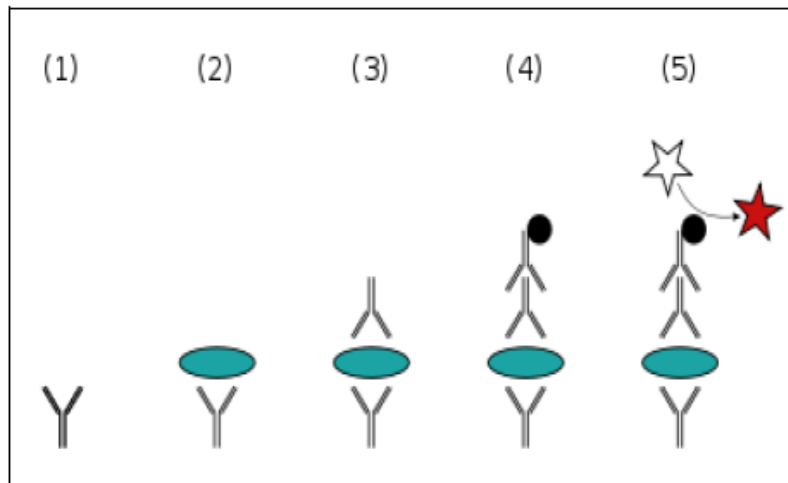


Figure 4. Principe de dosage sérique ou PSA par méthode immuno-enzymatique type Elisa "sandwich".

Un ELISA en sandwich.

- (1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ;
- (2) l'échantillon est ajouté, et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture ;
- (3) l'anticorps de détection est ajouté, et se lie à l'antigène ;
- (4) L'anticorps secondaire lié à l'enzyme est ajouté, et se lie à l'anticorps de détection ;
- (5) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme

Prélèvements sanguins

Les rats ont été sacrifiés et les prélèvements du sang destinés au dosage du taux de PSA, ont été effectués dans le laboratoire de recherche de bio-toxicologie et pharmacognosie, valorisation biologique des plantes, département de biologie, faculté des sciences de la nature et la vie, université de Saida.

Environ 5 ml de sang ont été prélevés dans des tubes secs de type Vortex, sans anticoagulant, par ponction au niveau de la veine cave inférieure de l'appareil circulatoire de l'animal.

Les échantillons de sang prélevés sont immédiatement acheminés vers le laboratoire d'analyse où serait effectué le dosage sérique du PSA.

Après centrifugation du sang prélevé, le sérum est recueilli dans des tubes convenablement étiquetés, avec numéro d'identification. La centrifugation se fait à une vitesse plus de 3000 tours par minute et pendant un temps de 10 minutes.

Les sérums sont ensuite conservés (ou congelés) à une température (- 18° C) jusqu'au moment du dosage.

Préparation des échantillons (Sérum et PSA)

Le sang prélevé est laissé coaguler pendant 30 min à 2-3 heures, à une température ambiante (ou à froid) de façon à laisser se former un caillot. Le sang sera par la suite centrifugé pendant 10 min à 3200 tours / min. Il se forme un caillot sanguin – sérum.

Le sérum sera prélevé à l'aide d'une pipette en faisant bien attention de ne pas aspirer les globules rouges. Les échantillons (Sérums et PSA) peuvent contenir des impuretés, ils devront être centrifugés avant toute analyse, sinon ils peuvent interférer avec le test d'immunodosage.

Le dosage peut être influencé par les paramètres :

- une hémolyse (Surcharge de l'échantillon en hémoglobines : 0 à 300 $\mu\text{mol /l}$)
- une lipémie (Surcharge de l'échantillon en lipides : 0 à 10 mg/ml d'équivalents triglycérides)
- une bilirubinémie (Surcharge de l'échantillon en bilirubine : 0 à 500 $\mu\text{mol /l}$)

Conservation et stabilité des échantillons

Les échantillons du sérum, renfermant le PSA, doivent être stockés à une température de 2 – 8 ° C pendant 24 heures au maximum. Au-delà de 24 heures, il faut les congeler à une température de – 20 °C. Un volume de 50 % de glycérol a été ajouté au sérum afin d'assurer une bonne conservation.

Réactifs et dispositif nécessaires au dosage (Annexe)

- Coffret TPSA-VIDAS
- Cartouche (ou test) TPSA
- Cône
- Contrôle TPSA
- Calibrateur
- Carte MLE
- Instrument (Automate mini VIDAS)

5.3.1.2. Etapes de la technique de dosage de PSA

La technique TPSA VIDAS utilise la technologie Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) pour réaliser des dosages immunoenzymologiques (Sandwich, compétition indirecte, compétition et en immunocapture). La révélation se fait en fluorescence.

Principe

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique sandwich en deux étapes à une détection finale en fluorescence (ELFA). Les deux anticorps anti-PSA utilisés sont monoclonaux et de même nature, issus de la même espèce (souris). Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche. Toutes les étapes du

test sont réalisées automatiquement par l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspiration / refoulement du milieu réactionnel. L'échantillon (sérum humain, PSA) est aspiré et refoulé plusieurs fois à l'intérieure du cône (Les anticorps monoclonaux primaires anti-PSA de souris). Cette opération permet à l'anticorps fixé sur le cône de capturer le PSA présent dans l'échantillon. Les composants non liés sont éliminés par lavage. L'anticorps monoclonal secondaire anti-PSA, de même espèce, conjugué à de la phosphatase alcaline est alors incubé dans le cône où il se fixe à l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Plusieurs étapes de lavage éliminent ensuite le conjugué non fixé (**figure 5**).

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate ou 4-Mop) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à une longueur d'onde 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'antigène spécifique de la prostate (PSA) présent dans l'échantillon. A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'appareil en se référant à une courbe de calibration mémorisée.

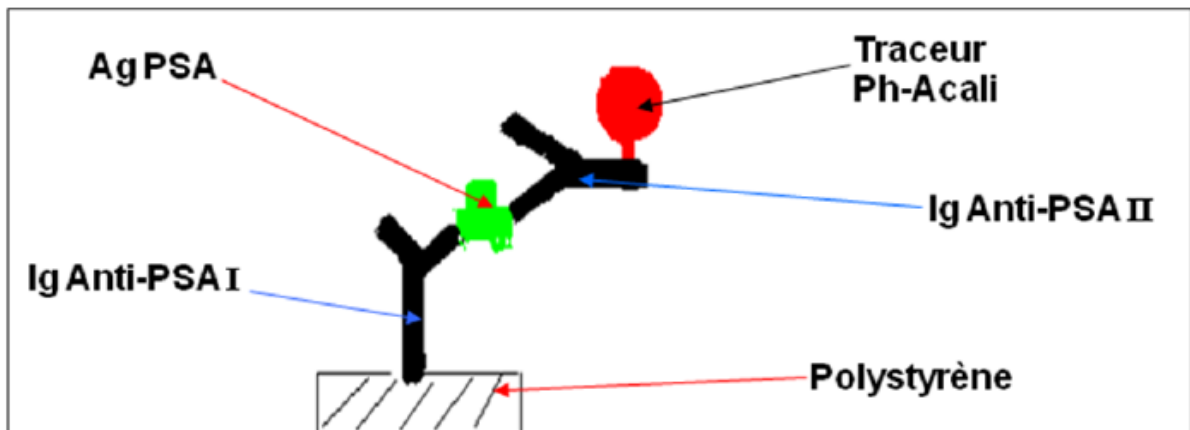


Figure 5. Principe de la technique ELFA du dosage immuno-enzymatique du PSA.

AgPSA : marqueur tumoral à doser

IgAnti-PSA I : anticorps anti PSA primaire

IgAnti-PSA II : anticorps anti PSA secondaire marqué

Traceur Ph-Acali : enzyme phosphatase alcaline servant de traceur

Polystyrène : support servan

Etapes du dosage

1ère étape : Coating

Le puits n°1 de la cartouche est rempli avec 200 µl de l'échantillon (sérum humain) contenant le PSA.

2e étape : Entrée du cône et de la cartouche dans le fluorimètre

Le cône, renfermant les anticorps monoclonaux primaires anti-PSA de souris, et la cartouche sont placés dans le fluorimètre (automate) aux emplacements indiqués à l'écran (**Annexe**).

3e étape : Anticorps Primaires anti-PSA

L'échantillon (sérum, PSA) est aspiré et refoulé plusieurs fois à l'intérieur du cône. Après une succession de cycles d'aspirations / refoulements du milieu réactionnel, l'anticorps monoclonal primaire anti-PSA de souris, adsorbé à la paroi du cône, réagit avec l'antigène spécifique de la prostate (PSA) présent dans l'échantillon, formant ainsi un complexe Ag-Ac. Les composants antigènes (PSA) non liés sont éliminés par un tampon de lavage. Ce dernier est constitué par plusieurs solutions à savoir :

- Solution Tris (0,05 mol/l et pH=7,4)
- Solution de NaCl (0,4mol/l)
- Solution Tween (0,05 %)
- Solution d'Azote de sodium (0,9g/l)

4e étape : Anticorps secondaires anti-PSA

Le conjugué, formé de l'anticorps monoclonal secondaire anti-PSA de souris et de l'enzyme phosphatase alcaline, présent dans le puit n°5 de la cartouche, est refoulé et aspiré plusieurs fois à l'intérieur du cône, puis incubé avec le PSA. Puis il est procédé à une série de lavage avec les tampons afin d'éliminer les conjugués non fixés ou qui n'ont pas réagi avec le PSA.

5e étape : Révélation de la phosphatase alcaline

Le substrat 4-Méthyl-ombelliféryl phosphate (0,6 mmol/l) présent dans le puit n°10 de la cartouche et qui servira aussi de cuvette de lecture, est aspiré et refoulé dans le cône plusieurs fois. L'enzyme du conjugué, la phosphatase alcaline, catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit 4-méthyl-ombelliférone.

6e étape : Lecture des résultats

La fluorescence émise à partir de la réaction d'hydrolyse du substrat (4-Méthyl-ombelliféryl phosphate) est mesurée à une longueur d'onde 450 nm par fluorimétrie (ou spectrophotométrie). La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration du PSA présent dans l'échantillon (puits n°1). A la fin du test, les résultats sont

calculés automatiquement par l'automate VIDAS par rapport à une courbe de calibration mémorisée dans cet appareil, puis imprimés.

Mesure des concentrations sériques du PSA par mini VIDAS

Dès le test terminé, les résultats sont analysés automatiquement par le système informatique. L'instrument effectue deux mesures de fluorescence dans la cuvette de lecture (puits n°10 de la cartouche TPSA) pour chaque test. La première lecture prend en compte le bruit de fond dû à la cuvette avant mise en contact du substrat avec le cône (renfermant les anticorps monoclonaux primaires anti-PSA de souris).

La seconde lecture est effectuée après incubation du substrat dans le cône. Le calcul de la RFV (Valeur de fluorescence relative) est le résultat de la différence des deux mesures.

Les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée et sont exprimés en ng/ml (**Annexe**).

5.3.2. Dosage sérique de la testostérone

Principe

Cette technique de dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (ELFA).

Le cône (SPR[®]) à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement dans l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspirations / refoulement du milieu réactionnel.

L'échantillon et le réactif de prétraitement sont mis en présence pour libérer la testostérone de ses protéines de liaison.

L'échantillon pré-traité est prélevé puis transféré dans le puits contenant un anticorps anti-testostérone marqué la phosphatase alcaline (conjugué). Il s'effectue une compétition entre l'antigène présent dans l'échantillon et l'antigène testostérone fixé sur le cône vis-à-vis des sites de l'anticorps spécifique anti-testostérone conjugué.

Des étapes de lavage éliminent les composés non fixés.

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-méthyl-ombélliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyl-embelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon.

A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée, puis imprimés.

Réactifs et dispositifs nécessaires au dosage (Annexe)

- Réactifs du coffret (30 test) / Description
- 30 cartouches TEST2
- 30 cônes TES2
- contrôle TES2
- Calibrateur TES2 (lyophilisé)
- Conservation du coffret VIDAS® Testostérone II à 2-8 °C

6. Etude histologique

6.2. Etude macroscopique

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce prélevée. Les tissus prostatique et testiculaire étaient examinés, mesurés, pesés, palpés puis disséqués. L'examen macroscopique des échantillons prélevés donnent des indications sur l'aspect et l'architecture morphologiques des organes :

- La taille et la localisation des anomalies.
- Il permet de sélectionner les territoires à prélever pour l'étude microscopique (Zones lésées).
- Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires.

6.3. Etude microscopique

Cette partie expérimentale a eu lieu au niveau du laboratoire de cytopathologie de l'établissement hospitalier publique d'Ain-Temouchent, Algérie. La technique de base comporte plusieurs étapes : Fixation, déshydratation, inclusion en paraffine, réalisation des coupes et colorations, observation au microscope optique (**Annexe**).

6.3.1. Fixation

Elle est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate après l'obtention de prélèvement. Toute fixation défectueuse rend l'étude histologique difficile voire impossible (désdifférenciation ou autolyse du tissu).

-Avant la fixation

Le tissu doit être coupée en tranches pour faciliter la pénétration rapide et homogène du fixateur (Alcool ; formol).

-Durée de la fixation

Elle dépend de la taille du prélèvement

-Nature du fixateur

Le fixateur le plus habituellement utilisé est l'alcool formol à 10 %.

6.3.2. Déshydratation

Elle a lieu dans une série de bains d'éthanol C₂H₅OH à degrés différents (6 bains), puis les prélèvements tissulaires passeront dans des solvants organiques (acétone, xylène) afin d'éliminer l'alcool restant. La durée de la déshydratation est de 16 heures (**Annexe**).

6.3.3. Imprégnation et inclusion à la paraffine

On utilise la paraffine comme milieu d'inclusion et d'enrobage. La paraffine, de point de vue chimique, est un mélange d'hydrocarbures saturés et d'un faible pourcentage de cires. L'inclusion est une véritable imprégnation du tissu à l'échelle cellulaire et non seulement un simple enrobage. Les prélèvements tissulaires, ayant achevé leur fixation dans le formol et leur déshydratation dans une série de bains d'alcools, seront déposés directement dans des cassettes en plastiques. Puis la paraffine est coulée sur le prélèvement tissulaire en prenant soin d'orienter convenablement le prélèvement. La paraffine 112 imprègne le tissu, et serait laissée refroidir. Une fois la paraffine refroidie, les cassettes marquées et les blocs sont prêts à la coupe (**Annexe**).

6.3.4. Réalisation des coupes

L'appareil utilisé est le microtome à paraffine (Marque : Leica 1510). Il comporte :

- Un support de rasoir.
- Un porte objet où sera inséré le bloc.
- Un système d'avance mécanique permettant le déplacement de l'objet en direction du rasoir.
- Un bouton gradué de 0 à 3 μ réglant l'épaisseur de la coupe.

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce au microtome (épaisseur de la coupe est réglée à 5μ). Les coupes sont étalées sur des lames en utilisant de la chaleur qui permettra leurs dilutions, puis sont collées par une eau albumineuse chauffée sur les mêmes lames.

6.3.5. Coloration

Avant de procéder à la phase de coloration des coupes, on doit réaliser plusieurs étapes de déparaffinage (**Annexe**).

- la 1ere étape consiste à un déparaffinage des lames ou des coupes sur une plaque chauffante.
- la 2eme étape de déparaffinage consiste à faire passer ces coupes dans une solution de xylène.

- la 3eme étape est la dissolution de la paraffine par hydratation qui consiste à éliminer le milieu d'inclusion et la réhydratation des tissus dans 03 bains d'alcools (absolu à 100°, 95°, 75°) de 5 min chacun.

- Rinçage à l'eau pour éliminer l'alcool.

La coloration usuelle associe :

- un colorant basique nucléaire (Hématoxyline).

- un colorant acide cytoplasmique (Eosine, érythrosine ou phloxine).

La phase de coloration des coupes déparaffinées à l'hématoxyline éosine nécessite le passage de ces coupes dans plusieurs bains d'alcool et de solvants organiques (voir annexe 10).

6.3.6. Montage des coupes

- La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée.

- Il est nécessaire d'interposer entre la lame et la lamelle un milieu de montage.

- Le milieu de montage utilisé est un liquide d'inclusion rapide.

- Une goutte de cette résine est déposée sur la lamelle puis appliquée.

- Après montage des coupes, les lames seront déposées dans une étuve pour un séchage d'une heure.

- Les lames seront enfin prêtes à l'observation microscopique et peuvent être conservées indéfiniment.

- Les coupes, colorées à l'hématoxyline éosine, sont examinées aux grossissements $\times 40$, $\times 100$ et $\times 400$.

7. 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 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

1-Rendement d'extraction

Un rendement d'extraction de 31,5 % est considéré comme acceptable pour un extrait hydroalcoolique obtenu par macération, qui est une méthode classique et simple. Un rendement de 31,5 % est souvent suffisant pour mener des études *in vivo*. Ce rendement reflète une bonne capacité d'extraction des métabolites secondaires solubles dans un mélange hydroalcoolique. Des rendements typiques pour les extraits de plantes médicinales varient entre 10 % et 40 %, selon la plante, le solvant, et la méthode d'extraction (Do et al., 2014).

L'éthanol est largement utilisé dans les extraits hydroalcooliques car il est non toxique et compatible avec les études *in vivo*. Il permet une extraction optimale des composés polaires et semi-polaires comme les gingérols et shogaols. Comparé à d'autres solvants organiques (Acétone ou méthanol) offrent parfois un meilleur rendement, mais ils sont moins compatibles pour des études *in vivo*.

Le rendement de 31,5 % est prometteur, car il indique une bonne extraction des métabolites bioactifs avec une méthode comme la macération. Les rhizomes de *Zingiber officinale* sont riches en composés phénoliques et flavonoïdes qui sont souvent solubles dans un solvant hydroalcoolique. La macération hydroalcoolique favorise la libération de composés polaires et semi-polaires, expliquant un rendement relativement élevé (Khoddami, et al., 2013 ; Ali et al., 2008 ; Chemat et al. 2012)

2-Etude phytochimique (Etude *in vitro*)

Les analyses phytochimiques permettent d'identifier des classes de composés bioactifs dans l'extrait. Voici les tests généralement effectués et leurs interprétations possibles :

L'extrait éthanolique de *Zingiber officinale* a été utilisé pour déterminer la teneur totale en polyphénols (TTP), la teneur totale en flavonoïdes (TTF) et l'activité antioxydante des radicaux DPPH.

La TTP a été quantifiée en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de poids sec (mg EAG /g), tandis que la TTF a été exprimée en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme de poids sec (mg CE/g).

Les niveaux de TTP et de TTF dans l'extrait alcoolique de *Zingiber officinale* étaient significatifs, mesurant $194,82 \pm 8,57$ mg GAE/g et $117,20 \pm 48,61$ mg CE/g respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydante a montré une efficacité potentielle remarquable exprimée par une faible valeur calculée de CI_{50} de $0,57 \pm 0,14$ mg/ml, soulignant sa capacité de piéger et à réduire les radicaux DPPH de 50 % (tableau 4).

Tableau 4 : Analyse phytochimique et activité antioxydante de l'extrait de *Zingiber officinale*.

Paramètres	Teneur totale en polyphénols (TTP) (mg EAG /g)	Teneur totale en flavonoïdes (TTF) (mg CE / g)	Activité de piégeage des radicaux DPPH (mg / ml)
<i>Zingiber officinal</i> extract	194,82 ± 8,57	117,20 ± 48, 61	0,57 ± 0,14

2-1-Teneur totale en polyphénols (TTP)

La teneur totale en polyphénols de l'extrait hydro-alcoolique des rhizomes de *Zingiber officinale* est estimée à 194,82 ± 8,57 mg GAE/g (**tableau 4**). La courbe d'étalonnage représentant l'absorbance (densité optique) en fonction des concentrations de polyphénols totaux (en mg EAG/g) est basée sur une relation linéaire $y = ax + b$ (**figure 6**). Cette courbe a été générée après plusieurs mesures d'absorbances (A%) pour différentes concentrations de TTP (EAG/g) (**tableau 5**).

La valeur expérimentale de 194,82 mg EAG/g correspondrait à une absorbance théorique d'environ 0.974 sur cette courbe.

Tableau 5 : Teneurs totaux des polyphénols (mg EAG / g) de l'extrait du gingembre et des absorbances (ou densités optiques) à 765 nm pour tracer la courbe d'étalonnage.

TTP (mg EAG /g)	0,00	33,33	66,67	100,00	133,33	166,67	200,00	233,33	267,67	300,00
Absorbance ($\lambda = 765$ nm)	0,00	0,17	0,33	0,50	0,67	0,83	1,00	1,17	1,33	1,50

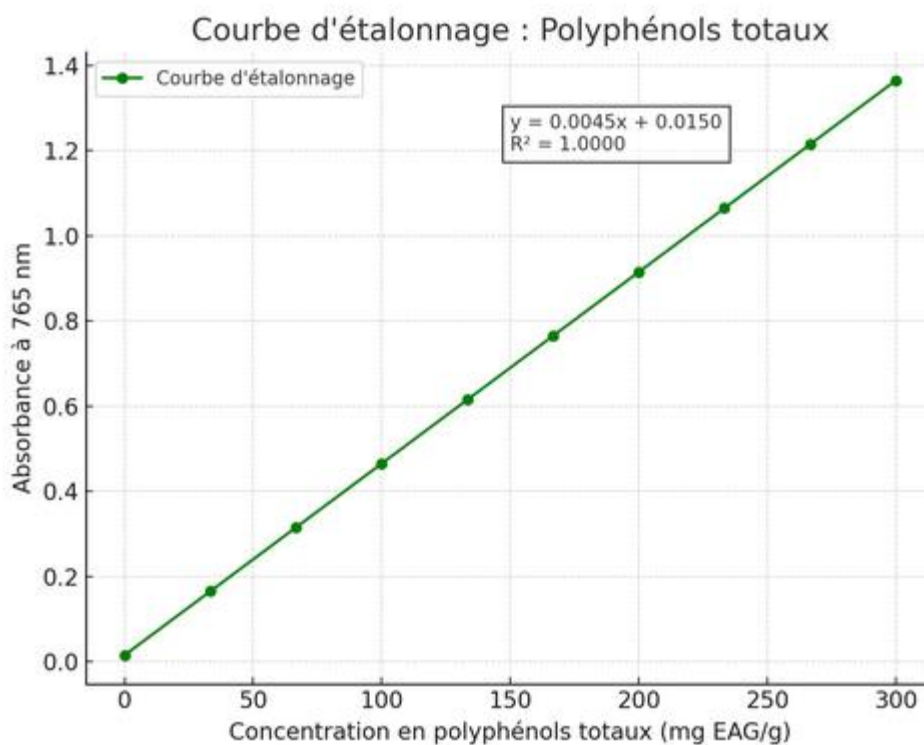


Figure 6 : Courbe d'étalonnage concernant les polyphénols totaux

Les données sont basées sur une relation linéaire $y=0.0045x+0.0150$ avec un coefficient de corrélation $R^2=1.00$.

Ces composés sont largement reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, dues à leur capacité à neutraliser les radicaux libres via le don d'électrons ou d'hydrogènes. Une teneur élevée en polyphénols, comme celle observée dans cette étude, est indicative du potentiel bioactif significatif de l'extrait, en particulier dans la prévention des dommages oxydatifs impliqués dans diverses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et le cancer.

2-2-Teneur totale en flavonoïdes (TTF)

La teneur totale en flavonoïdes est mesurée à $117,20 \pm 48,61$ mg CE/g, reflétant la présence importante de cette classe de métabolites secondaires (**tableau 6 et figure 7**). Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques bien connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Leur rôle consiste principalement à piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à réguler les enzymes impliquées dans les processus inflammatoires. Dans le contexte de cette étude, une teneur élevée en flavonoïdes contribue de manière significative au potentiel antioxydant global de l'extrait.

Tableau 6 : Teneurs totales des flavonoïdes (mg CE/g) de l'extrait du gingembre et des absorbances (ou densités optiques) à 765 nm pour tracer la courbe d'étalonnage.

TTF (mg CE/g)	0,00	33,33	66,67	100,00	133,33	166,67	200,00	233,33	267,67	300,00
Absorbance ($\lambda = 765$ nm)	0,02	0,19	0,35	0,52	0,69	0,85	1,02	1,19	1,35	1,52

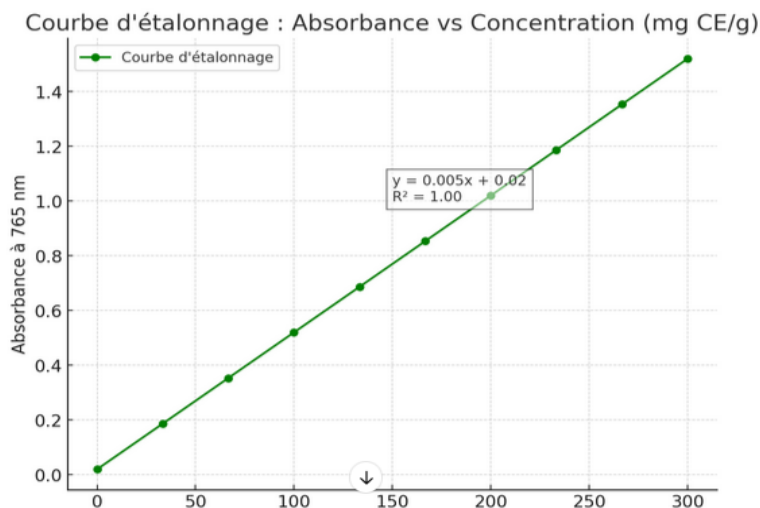


Figure 7 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Les données sont basées sur une relation linéaire $y=0.005x+0.02$ avec un coefficient de corrélation $R^2=1.00$.

2-3.-Activité antioxydante (CI₅₀)

L'activité antioxydante évaluée par le test de piégeage des radicaux DPPH montre une valeur de CI₅₀ = 0,57 ± 0,14 mg/ml. CI₅₀ a été déterminée graphiquement à partir des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration (mg/ml) (**tableau 7**).

Cette valeur représente la concentration d'extrait nécessaire pour réduire de 50 % les radicaux libres DPPH, un indicateur direct de l'efficacité antioxydante. Une valeur de CI₅₀ faible indique une activité antioxydante élevée (**figure 8**).

Comparativement à des standards antioxydants comme le BHT ou l'acide ascorbique, qui ont des CI₅₀ généralement plus faibles (de l'ordre de 0,02-0,05 mg/ml), l'extrait de gingembre montre une efficacité modérée mais compétitive. Cela s'explique par la contribution synergique des polyphénols et des flavonoïdes, ainsi que d'autres composés bioactifs présents dans l'extrait hydro-alcoolique, tels que les gingérols et shogaols, reconnus pour leur fort pouvoir antioxydant.

Tableau 7 : Valeurs des concentrations de l'extrait du gingembre (mg/ml) et pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH pour tracer la courbe d'étalonnage.

Concentration (mg/ml)	0,1	0,11	0,13	0,14	0,16	0,17	0,18	0,20	0,21	0,23
Inhibition (%)	0,90	1,04	1,19	1,37	1,58	1,81	2,08	2,39	2,74	3,15

Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations

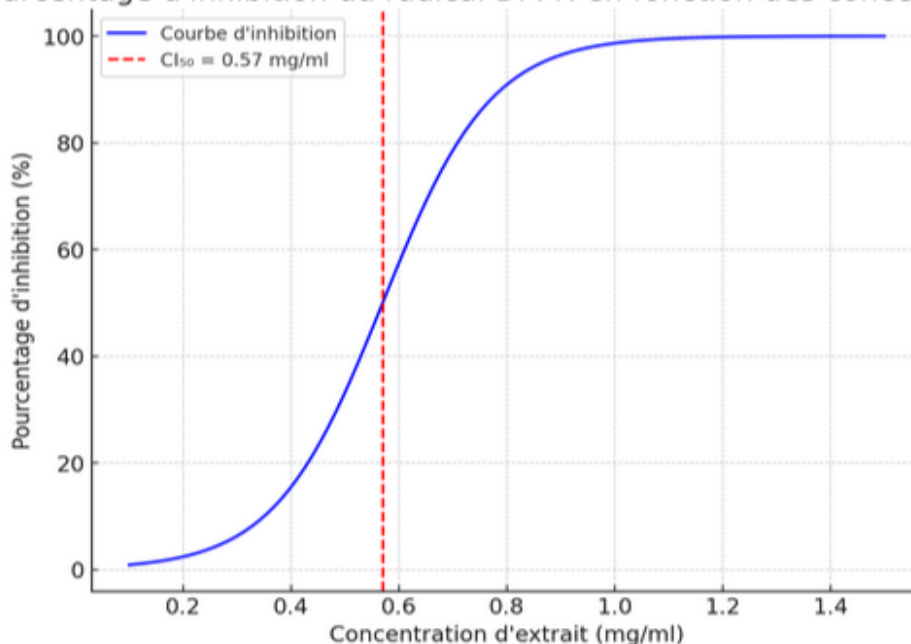


Figure 8 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations

3-Etude *in vivo*

3-1-Paramètre pondéral

3-1-1-Gain de poids corporel

Dans le groupe 1, les rats témoins normaux ont montré une augmentation significative du poids corporel final ($369,00 \pm 07,33$ g), suggérant une croissance normale avec une prise de poids moyenne de $81,33 \pm 06,89$ g (**tableau 8**).

Dans le groupe 2 (CrO_3), les rats témoins expérimentaux (ou intoxiqués par le trioxyde de chrome) ont montré une croissance ralentie avec un gain de poids corporel faible ($11,67 \pm 03,78$ g), indiquant une toxicité liée à l'exposition au CrO_3 , qui entrave la prise de poids (**tableau 8**).

Dans le groupe 3, les rats traités uniquement avec l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) du *Zingiber officinal* ont affiché une augmentation modérée du poids corporel final ($52,00 \pm 24,00$ g). Cela montre que l'extrait de gingembre pourrait avoir un effet bénéfique sur la croissance (**tableau 8**).

Dans le groupe 4, les rats traités préalablement avec l'extrait de *Zingiber officinal* (ou gingembre) puis exposés par voie orale au trioxyde chrome (CrO_3) ont développé un gain de poids intermédiaire ($45,33 \pm 09,11$ g). Cela suggère que l'extrait de gingembre pourrait atténuer en partie les effets toxiques du chrome sur la croissance (**tableau 8**).

Tableau 8 : Variations des poids corporels des rats normaux, exposés au chrome et à l'extrait des rhizomes de gingembre.

Groupes de rats	Poids corporel initial (g) \pm DS	Poids corporel final (g) \pm DS	Gain de poids (g) \pm DS
Groupe 1	278.75 \pm 11.25	369.00 \pm 07.33	81.33 \pm 06.89 ^a
Groupe 2	288.00 \pm 22.00	299.67 \pm 22.89	11.67 \pm 03.78 ^b
Groupe 3	272.75 \pm 14.75	333.67 \pm 16.22	52.00 \pm 24.00 ^c
Groupe 4	284.00 \pm 09.33	329.33 \pm 00.44	45.33/09.11 ^c \pm 0.0032

DS : déviation standard (ou écart-type)

Groupe 1 (témoins) : Rats non exposés ni traités (groupe témoin).

Groupe 2 (Exposé au chrome) : Rats exposés au trioxyde de chrome (CrO_3).

Groupe 3 (Extrait de gingembre uniquement) : Rats uniquement traités avec l'extrait de gingembre.

Groupe 4 (Gingembre + chrome) : Rats traités avec l'extrait de gingembre et exposés au chrome.

(a) : est significativement différent des autres groupes.

(b) : montre une réduction significative par rapport aux témoins.

(c) : montrent des gains intermédiaires, soulignant l'effet protecteur potentiel de l'extrait de gingembre.

3-1-2-Indice relatif du poids des testicules (IRPT)

Ce paramètre est déterminé selon la formule suivante :

$\text{IRPT (\%)} = \text{PCFM (g)} / \text{PMT (g)}$

IRTP : Indice relative du poids des testicules

PCFM : poids corporel final moyen

PMT : poids moyen des testicules

Les valeurs sont globalement similaires entre les groupes, mais le groupe 4 (traité préalablement avec l'extrait de gingembre puis exposé au trioxyde de chrome) a montré une préservation, ou une restauration, plus ou moins normale du poids des testicules relativement aux poids corporels moyens des rats (**tableau 9**).

L'indice relatif est le plus élevé dans le groupe (1), reflétant un état normal des testicules. Le groupe (2) exposé au chrome a montré une diminution de cet indice, confirmant un effet toxique du chrome sur les testicules. Le traitement du groupe (3) avec seulement l'extrait de gingembre a permis un meilleur maintien de l'indice relatif, indiquant des effets préventifs. Par contre, le groupe (4) traité avec la combinaison (extrait de gingembre et trioxyde de chrome) a révélé une réduction significative, bien qu'il y ait une légère atténuation des dommages par rapport au groupe 2 (**tableau 9**).

Tableau 9 : Variations des poids des testicules chez les rats normaux, exposés au chrome et à l'extrait des rhizomes de gingembre.

Groupes	PCFM (g)	PMT (g)	IRPT (%)
Groupe 1	369,00 ± 7,33	0,0034 ± 0,0001	0,00092
Groupe 2	299,67 ± 22,89	0,0026 ± 0,0004	0,00087
Groupe 3	333,67 ± 16,22	0,0027 ± 0,0002	0,00081
Groupe 4	329,33 ± 4,44	0,0004 ± 0,0001	0,00012

PCFM : poids corporel final moyen

PMT : poids moyen des testicules

IRPT : indice relatif du poids des testicules

Groupe 1 (témoins) : Rats non exposés ni traités (groupe témoin).

Groupe 2 (Exposé au chrome) : Rats exposés au trioxyde de chrome (CrO_3).

Groupe 3 (Extrait de gingembre uniquement) : Rats uniquement traités avec l'extrait de gingembre.

Groupe 4 (Gingembre + chrome) : Rats traités avec l'extrait de gingembre et exposés au chrome.

3-2- Paramètres du Stress oxydatif

Le groupe 1 (témoin) et ses niveaux de glutathion réduit (GSH) servent de base de comparaison pour évaluer les effets des autres traitements. Le niveau de GSH est élevé (~35 $\mu\text{mol/mg}$), ce qui reflète un état normal sans stress oxydatif significatif, sans influence extérieure. Ce niveau sert de référence. Les groupes 2, 3, et 4 ont reçu des traitements et ont été exposés à des conditions spécifiques (trioxyde de chrome CrO_3 responsable du stress oxydatif et administration d'extrait de gingembre pour traitement contre la toxicité du chrome). L'impact de ces interventions a été évalué en fonction de leur écart par rapport au groupe 1(témoin). Chez les animaux témoins (Groupe 1), le niveau sérique de GSH était élevé (~35 $\mu\text{mol/mg}$), ce qui reflète un état normal sans stress oxydatif significatif (**figure 9**).

Par contre le groupe 2 dont les animaux étaient exposés au CrO_3 (administration par voie orale), il a été constaté une réduction marquée du GSH (environ $20 \mu\text{mol}/\text{mg}$) indiquant ainsi une augmentation du stress oxydatif provoqué par le trioxyde de chrome (**figure 9**). Les dérivés chromiques, notamment le chrome hexavalent (Cr^{6+}), sont connus pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont des radicaux libres responsable du stress oxydatif. Cette diminution est un marqueur clair de la toxicité oxydative du CrO_3 . Par ailleurs, les animaux du groupe 3, traités uniquement par l'extrait végétal du *Zingiber officinal* toujours par voie orale, ont montré un niveau de GSH significativement élevé ($\sim 40 \mu\text{mol}/\text{mg}$) (**figure 9**), ce qui suggère un effet antioxydant direct du gingembre. Le gingembre est riche en composés bioactifs (comme les gingérols et les shogaols), qui stimulent les mécanismes de défense antioxydante, augmentant ainsi les niveaux de GSH. Finalement, les rats du groupe 4 (traités préalablement avec l'extrait de gingembre puis exposés au CrO_3), ont révélé des niveaux de GSH ($\sim 30 \mu\text{mol}/\text{mg}$) qui étaient plus élevés que dans le groupe 2 (CrO_3), mais inférieurs aux groupe 1 (témoin) et groupe 3 (extrait du gingembre) (**figure 9**). Cela indique que le traitement au gingembre offre a exercé un effet préventif contre le stress oxydatif induit par CrO_3 . Le gingembre semble empêcher la diminution du niveau de GSH en neutralisant une partie des ERO générées par CrO_3 .

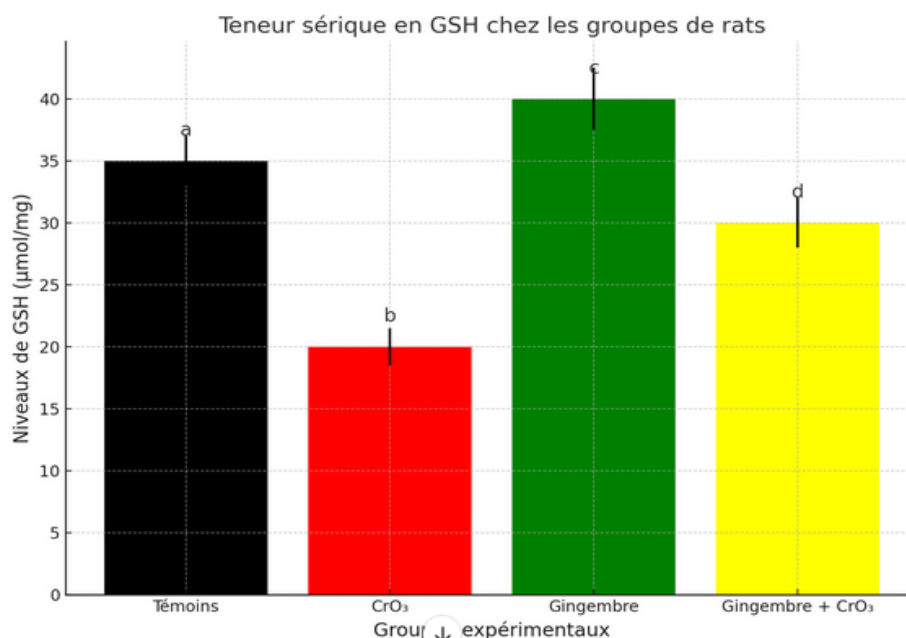


Figure 9: Effet de l'exposition au CrO_3 et du traitement au gingembre sur les niveaux sériques de glutathion réduit (GSH) chez les rats"

Groupe 1 (témoin) : Aucun traitement, condition normale.

Groupe 2 (CrO_3) : Exposition au trioxyde de chrome, un agent pro-oxydant.

Groupe 3 (gingembre) : Administration de l'extrait de gingembre uniquement.

Groupe 4 (gingembre + CrO_3) : Traitement au gingembre suivi de l'exposition au CrO_3 .

Chez le Groupe 1 (témoin), le niveau d'activité catalase était élevé (~25 mM H₂O₂/min/mg), indiquant une capacité antioxydante normale. La catalase, enzyme clé de la défense contre le stress oxydatif, est maintenue à un niveau optimal chez les rats témoins. Par contre, les rats du groupe 2 (exposé au CrO₃), il a été observé une diminution significative de l'activité catalase (~10 mM H₂O₂/min/mg) (**figure 10**). Cette réduction est probablement due à un stress oxydatif généré par le CrO₃, qui produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO peuvent inactiver la catalase, altérant la capacité des cellules à éliminer le H₂O₂. Le groupe 3 (traité au gingembre) a dévoilé un niveau sérique de catalase élevé (~27 mM H₂O₂/min/mg), similaire au groupe 1 (témoin) (**figure 10**). Cela confirme les propriétés antioxydantes du gingembre, qui soutient ou stimule l'activité enzymatique en neutralisant les radicaux libres et en protégeant les cellules du stress oxydatif. Par ailleurs, le groupe 4 (gingembre + CrO₃) a affiché une diminution modérée de l'activité catalase (~15 mM H₂O₂/min/mg), mais elle est plus élevée que dans le groupe 2 (CrO₃) (**figure 10**). Cela suggère que le gingembre offre une protection partielle contre l'inactivation de la catalase par CrO₃. Bien que la catalase soit réduite, la présence du gingembre a probablement limité les dommages oxydatifs induits par le CrO₃.

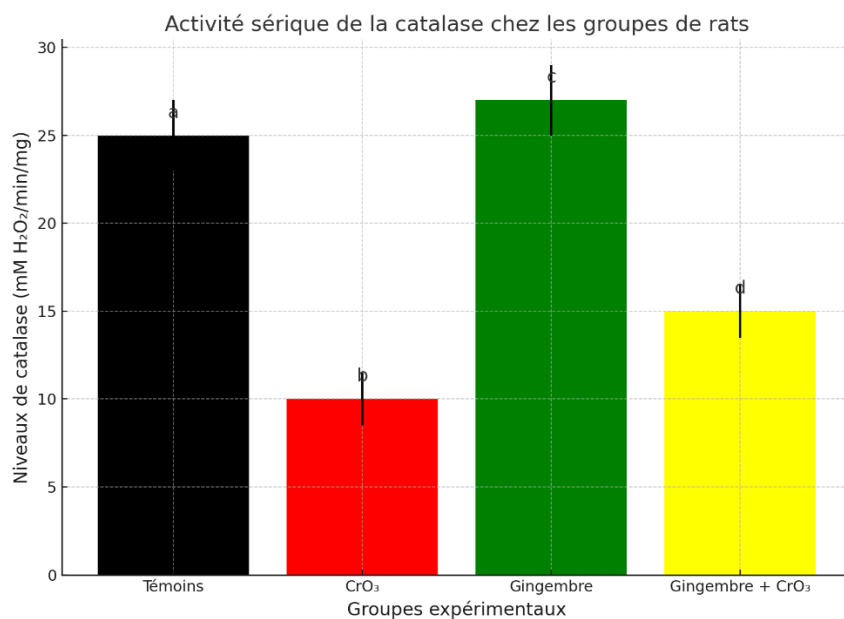


Figure 10 : Effet de l'exposition au CrO₃ et du traitement au gingembre sur les niveaux sériques de la catalase chez les rats

Groupe 1 (témoin) : Aucun traitement, condition normale.

Groupe 2 (CrO₃) : Exposition au trioxyde de chrome, un agent pro-oxydant.

Groupe 3 (gingembre) : Administration de l'extrait de gingembre uniquement.

Groupe 4 (gingembre + CrO₃) : Traitement au gingembre suivi de l'exposition au CrO₃.

3-3- Dosages sériques des Marqueurs biochimiques

L'évaluation des biomarqueurs tels que l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et la testostérone est essentielle pour comprendre les effets toxiques des substances environnementales et l'efficacité des agents protecteurs. Le trioxyde de chrome (CrO_3), un composé toxique bien connu, est capable d'induire des perturbations hormonales et des dommages aux tissus prostatiques par le stress oxydatif. Dans cette étude, l'extrait de gingembre a été utilisé pour évaluer ses propriétés préventives contre les effets délétères du CrO_3 . Les résultats obtenus fournissent des indications sur l'impact du CrO_3 et le potentiel de l'extrait de gingembre à atténuer ces effets en modulant les niveaux de PSA et de testostérone (**tableau 10**).

Tableau 10 : Dosages sériques du PSA et testostérone chez les groupes de rats

Groupes de rats	PSA (ng / mL) Moyenne \pm EMS	Testostérone (ng / mL) Moyenne \pm EMS	<i>p</i> -valeur
Groupe 1 (témoins)	$< 0.068 \pm 0.002$	0.43 ± 0.03	
Groupe 2 (CrO_3)	0.93 ± 0.001	$0.98^* \pm 0.04$	
Groupe 3 (RGE)	$< 0.068 \pm 0.002$	$0.29^* \pm 0.01$	< 0.01
Groupe 4 (RGE + CrO_3)	$< 0.068 \pm 0.002$	$0.41^* \pm 0.02$	

PSA: prostate specific antigen,

RGE : extrait de rhizome du gingembre

ESM : erreur standard de la moyenne

**Testostérone : significativement différent entre les groupes 2, 3 et 4 d'animaux ($p < 0,01$)*

CrO_3 : trioxyde de chrome

3-3-1- Marqueur tumoral (Antigène spécifique de la prostate ou PSA)

Dans le groupe 1 (témoins), groupe 3 (extrait de gingembre) et groupe 4 (extrait de gingembre + CrO_3) ; les dosages sériques ont révélé des concentrations de PSA inférieures à 0,068 ng/mL. Cela indique l'absence de dysfonctionnement prostatique, ou du moins aucun effet notable sur l'antigène spécifique de la prostate. Cela suggère que ni le stress oxydatif induit par le trioxyde de chrome (CrO_3) chez les rats traités avec l'extrait de gingembre, ni l'administration de gingembre seul, n'ont entraîné de modifications des taux du PSA. Par contre dans le Groupe 2 (CrO_3), les concentrations de PSA étaient significativement élevées ($0,93 \pm 0,001$ ng/mL), indiquant une perturbation du fonctionnement de la glande prostatique. Cela pourrait être attribué à la toxicité oxydative induite par le CrO_3 (**figure 11**).

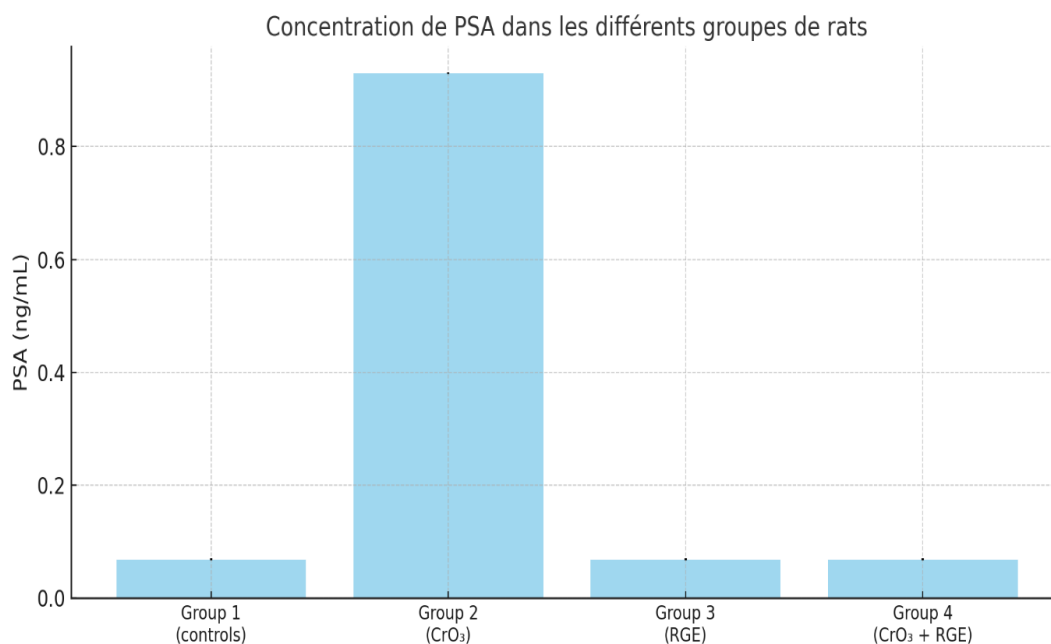


Figure 11 : Taux sériques du PSA chez les animaux témoins, expérimentaux et ceux traités avec le CrO₃ et l'extrait du rhizome de gingembre

Groupe 1 (control) : Témoins

Groupe 2 (CrO₃) : exposés au trioxyde de chrome (c'est le chrome hexavalent Cr⁶⁺)

Groupe 3 (RGE) : extrait des rhizomes de gingembre (ERG)

Groupe 4 : traité préalablement au RGE puis exposé au CrO₃

3-3-2- Marqueur hormonal (Testostérone)

Dans le Groupe 1 (témoins), la concentration de testostérone était modérée ($0,43 \pm 0,03$ ng/mL), reflétant un état physiologique normal sans aucune perturbation induite par l'environnement externe. Dans le groupe 2 (CrO₃), la concentration sérique de la testostérone était significativement élevée ($0,98 \pm 0,04$ ng/mL, $p < 0,01$). Cela pourrait indiquer une réponse adaptative ou une stimulation endocrine due à un stress oxydatif provoqué par le CrO₃. Toutefois, cette augmentation peut également être un facteur pathologique contribuant aux déséquilibres hormonaux. Dans le groupe 3 (extrait de gingembre), les concentrations sériques de testostérone sont plus bas ($0,29 \pm 0,01$ ng/mL). Cela suggère un potentiel effet régulateur et stabilisateur de l'extrait de gingembre (RGE) sur la production de testostérone, ce qui pourrait être bénéfique en cas de déséquilibres hormonaux ou pathologies liées à l'excès d'hormones.

Dans le groupe 4 (extrait de gingembre + CrO₃), le taux de testostérone était ramené à des niveaux proches de la normale ($0,41 \pm 0,02$ ng/mL). Cela reflète le même effet régulateur de l'extrait de gingembre (RGE) contre la toxicité induite par le CrO₃ (**figure 12**).

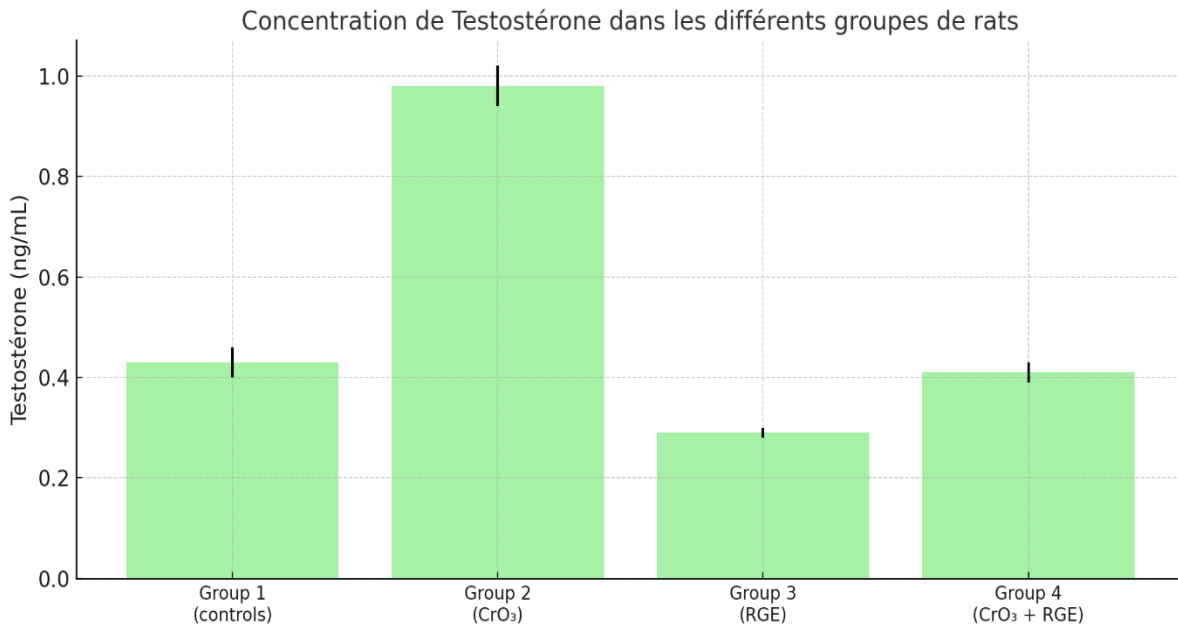


Figure 12 : Niveaux sériques de testostérone chez les animaux témoins, expérimentaux et ceux traités avec le CrO₃ et l'extrait du rhizome de gingembre

Groupe 1 (control) : Témoins

Groupe 2 (CrO₃) : exposés au trioxyde de chrome (c'est le chrome hexavalent Cr⁶⁺)

Groupe 3 (RGE) : extrait des rhizomes de gingembre (ERG)

Groupe 4 : traité préalablement au RGE puis exposé au CrO₃

3-4- Histologie

L'interprétation des examens microscopiques des coupes histologiques des tissus prostatique et testiculaire prélevés chez différents groupes d'animaux (témoins, exposés au trioxyde de chrome, traités avec l'extrait de *Zingiber officinale*, traités avec l'extrait et exposés au toxique) consiste à analyser les modifications morphologiques, structurelles et éventuellement fonctionnelles des tissus en réponse aux traitements administrés.

3-4-1-Tissu prostatique

Les coupes histologiques de la prostate peuvent être analysées en se concentrant sur les aspects suivants :

Chez les rats témoins (Groupe 1), le tissu prostatique présentait une structure normale et bien différenciée avec des glandes prostatiques organisées et bien définies. Les cellules sont organisées avec des canaux glandulaires espacés régulièrement. Les tissus sont uniformes sans signes de dégénérescence ou d'inflammation (**figure 13**).

Chez les rats intoxiqués avec le trioxyde de chrome ou CrO₃ (groupe 2), le métal lourd a induit des changements dégénératifs dans la prostate. Cette toxicité au chrome hexavalent (Cr⁶⁺) a induit une désorganisation cellulaire et des dégénérescences tissulaires appuyées par

des modifications des structures glandulaires associées à la dilatation ou l'atrophie des canaux. La présence de cellules anormales, de fibrose ou d'infiltrats inflammatoires sont des signes de dommages dus à l'exposition au toxique (**figure 13**). Des proliférations cellulaires, hyperplasie, nécrose ou fibrose dans le stroma sont apparemment présentes.

Chez les animaux traités uniquement avec l'extrait de *Zingiber officinale* (groupe 3), il a été observé une régénération ou une normalisation des structures glandulaires, avec une diminution de l'inflammation (**figure 13**). L'extrait de gingembre, reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, pourrait offrir une protection contre les dommages cellulaires et réduire les signes d'inflammation.

Concernant les animaux traités avec l'extrait de *Zingiber officinale* et exposés au trioxyde de chrome (Groupe 4), il a été révélé présence de signes de protection contre les dommages induits par le trioxyde de chrome comme la réduction de la nécrose, l'amélioration de la structure des glandes, et une organisation normale des cellules prostatiques par rapport au groupe 2 (**figure 13**). Il a été constaté des signes de régénération ou de récupération des tissus par rapport au groupe 2, avec des canaux prostatiques mieux organisés, moins de cellules inflammatoires et moins de dégénérescence par rapport au groupe exposé au toxique seul (groupe 2).

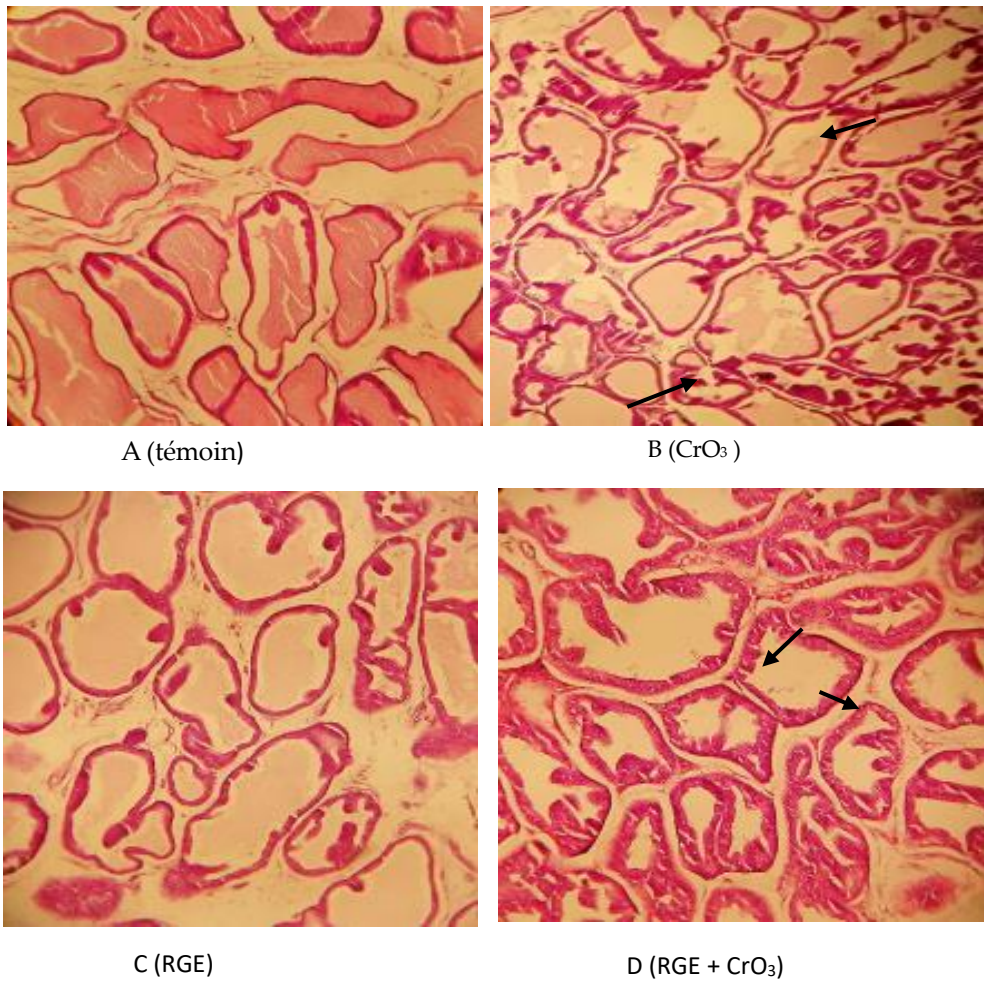


Figure 13: Examens microscopiques de la glande prostatique (grossissement $\times 10$).

RGE : extrait de rhizomes de gingembre

CrO₃ : trioxyde de chrome (chrome hexavalent)

B (CrO₃): Absence de tissu fibreux-stromal entre les acini (flèches) et la petite couche de cellules épithéliales et la lame basale non apparentes suite au traitement au CrO₃ (flèches).

D (RGE + CrO₃): Couche de cellules épithéliales épaisse et restauration de la prolifération des tissus entre les glandes prostatiques suite au traitement RGE (flèches) (H&E; $\times 10$).

3-4-2-Tissu testiculaire

Le tissu testiculaire a aussi fait l'objet d'une étude histologique pour évaluer la toxicité du trioxyde de chrome et une éventuelle prévention par le traitement avec un extrait végétal (rhizome du *Zingiber officinal* ou gingembre).

Chez les animaux témoins normaux (groupe 1), il a été observé une organisation normale des tissus testiculaires, y compris les tubules séminifères bien formés avec une architecture tubulaire bien définie, des cellules de Sertoli, des cellules germinales à différents stades de développement, et des cellules de Leydig dans l'interstitium (**figure 14**).

Les rats exposés au trioxyde de chrome (groupe 2) affichaient des tissus testiculaires présentant une altération de la spermatogenèse, des dommages des cellules de Sertoli, des spermatocytes anormaux ou une réduction du nombre de cellules germinales, et une probable dégénérescence des cellules de Leydig et des signes d'inflammation. Présence d'espaces vacuolaires dans les tubules, indiquant des lésions structurelles, absence de prolifération du tissu conjonctif entre les tubules séminifères (**figure 14**).

Le traitement des rats uniquement avec l'extrait de *Zingiber officinal* (groupe 3) a montré des effets protecteurs ou préventifs. Les structures testiculaires apparaissaient proches de la normale. Les tubules séminifères sont bien organisés. Dans les testicules, l'extrait pourrait protéger les cellules germinales et les cellules de Leydig des effets toxiques du trioxyde de chrome en normalisant la structure des tubules séminifères et en réduisant la dégénérescence cellulaire (**figure 14**).

Les animaux traités avec l'extrait de *Zingiber officinale* et exposé au trioxyde de chrome (Groupe 4) ont révélé des effets de remédiation, avec une préservation de la spermatogenèse, une réduction des dommages cellulaires, et des tubules séminifères plus réguliers et moins endommagés par rapport au groupe 2 (**figure 14**). Les coupes ont montré une amélioration significative de l'organisation des tubules séminifères par rapport au groupe 2. Bien que des anomalies mineures persistent (**figure 14**), la majorité des tubules montrent une récupération des spermatides et de la spermatogenèse. La présence de tissu conjonctif et de cellules germinales en prolifération a été préservée.

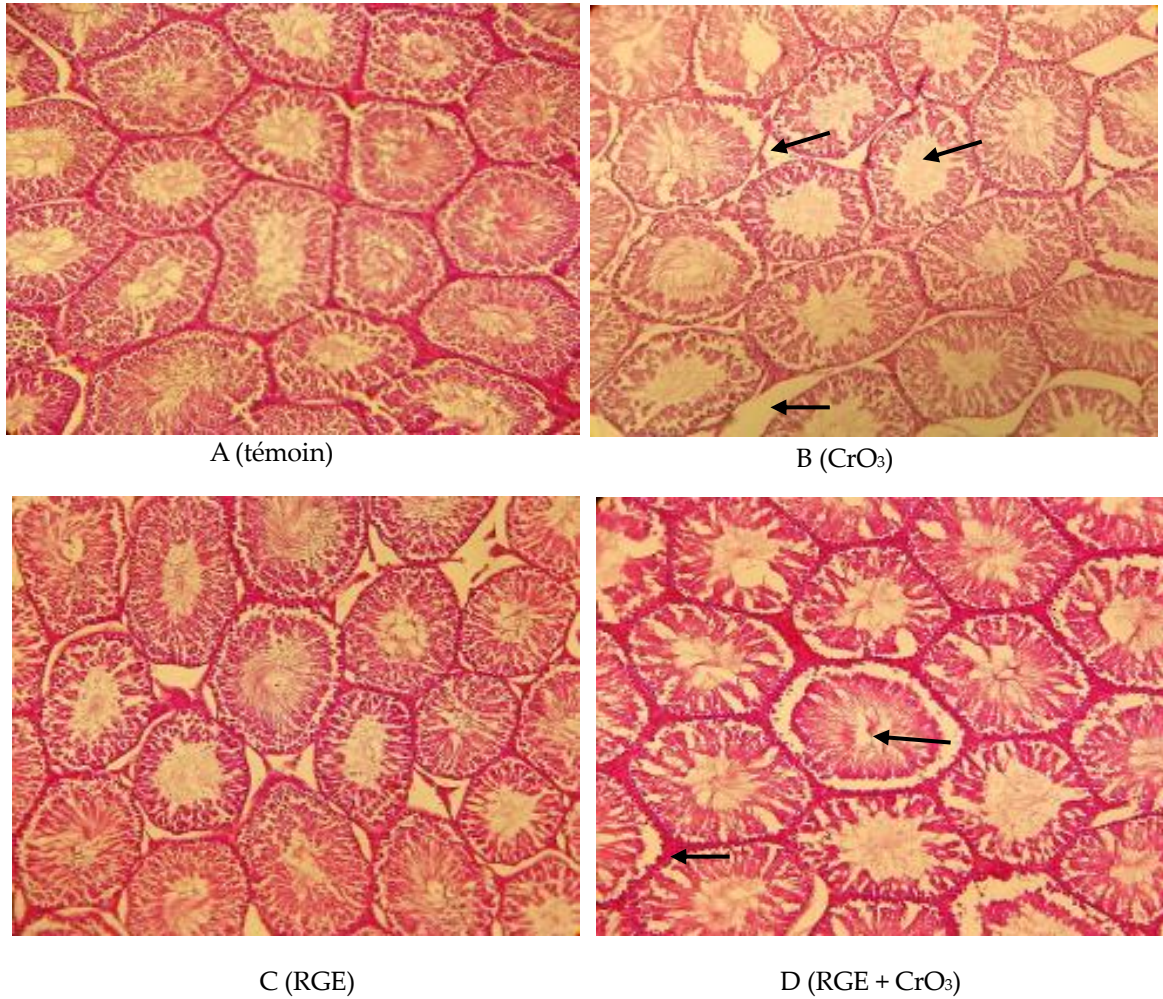


Figure 14 : Examens microscopiques du tissu testiculaire (grossissement $\times 10$)

B (CrO_3): Perte de spermatides dans les tubes séminifères (flèches) et absence de prolifération de tissu conjonctif entre les tubes séminifères suite au traitement au CrO_3 (flèches)

D (RGE + CrO_3): Absence d'anomalies et restauration de la prolifération des tissus entre les tubes séminifères suite au traitement RGE (flèches) (H&E; $\times 10$).

Discussion

D'une manière générale, les résultats présentés dans cette thèse ont mis en évidence les effets préventifs de l'extrait hydro-alcoolique de la poudre des rhizomes de *Zingiber officinale* (ou gingembre) contre la toxicité du chrome hexavalent (Cr^{6+}), sous forme d'un sel chromique à savoir le trioxyde de chrome (CrO_3), au niveau de l'appareil reproducteur male du rat, plus précisément au niveau des tissus prostatique et testiculaire.

Le trioxyde de chrome est bien connu pour son impact toxicologique, notamment en induisant un stress oxydatif et en perturbant les fonctions cellulaires normales. Des recherches antérieures ont établi que l'exposition aux composés de chrome hexavalent peut altérer la spermatogénèse, réduire les niveaux de testostérone et induire des lésions des tissus testiculaires en raison de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Nandi et al., 2014 ; Zhao et al., 2020**). Dans cette étude, l'amélioration observée des paramètres de reproduction avec la supplémentation en extrait de gingembre souligne ses puissantes propriétés antioxydantes. Le gingembre est riche en composés bioactifs tels que les gingérols, les shogaols et les paradols, qui ont démontré de fortes capacités de piégeage des radicaux libres dans des études antérieures (**Ali et al., 2008 ; Ghasemzadeh et al., 2016**). Ces composés atténuent probablement les dommages oxydatifs en neutralisant les ROS, préservant ainsi l'intégrité du tissu testiculaire et améliorant la qualité du sperme. L'augmentation des niveaux de testostérone dans les groupes traités au gingembre pourrait être attribuée à la modulation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) et à la protection des cellules de Leydig contre les dommages oxydatifs.

Des études antérieures ont montré que l'extrait de gingembre peut améliorer l'activité des enzymes antioxydantes et réduire la peroxydation lipidique dans les tissus testiculaires, contribuant ainsi à améliorer les résultats de la reproduction (**Kamtchouing et al., 2002 ; Ghayur & Gilani, 2005**). De plus, les résultats histopathologiques des testicules des rats exposés au CrO_3 ont révélé des dommages importants, qui ont été atténués par l'extrait de gingembre. Cela concorde avec la littérature existante démontrant les effets protecteurs des antioxydants d'origine végétale contre la toxicité reproductive induite par les métaux lourds (**Mansour et al., 2015 ; Khalaf et al., 2021**).

Tout en discutant chaque partie des résultats à part et les comparant aux littératures phytothérapeutique et toxicologique, cela nous permettra de dire que les résultats obtenus dans ce projet montrent des données prometteuses sur les propriétés phytochimiques et antioxydantes de l'extrait hydro-alcoolique des rhizomes (RGE) de *Zingiber officinale* (ou gingembre).

1-Rendement d'extraction d'une solution hydroalcoolique de poudre de rhizome de *Zingiber officinale*

Un rendement d'extraction de 31,5 % pour un extrait hydroalcoolique de gingembre obtenu par macération est considéré comme satisfaisant. Des études ont rapporté des rendements d'extraction pour le gingembre variant entre 8,15 % et 13,43 %, selon les méthodes et solvants utilisés (**Brevet FR2892933A1, 2007**). Le rendement, obtenu dans cette étude, est supérieur à ceux observés dans ces travaux. Pour des plantes médicinales comme *Artemisia herba alba*, des rendements d'extraction par macération ont été rapportés entre 10 % et 20 % (**Benabdallah, 2022**). Un rendement d'extraction élevé suggère une extraction efficace des métabolites secondaires.

2-Composés bioactifs de l'extrait du gingembre contrôlant le stress oxydatif

Les teneurs significatifs de polyphénols et flavonoïdes (TTP et TTF) dans l'extrait hydroalcoolique des rhizomes de gingembre indiquent une riche composition en métabolites secondaires, bien connus pour leurs propriétés antioxydantes. Les polyphénols agissent comme des agents réducteurs et des chélateurs de métaux, tandis que les flavonoïdes sont capables de neutraliser les radicaux libres en raison de leur structure poly-hydroxylée (**Ravindran and Babu, 2005 ; Shahidi and Ambigaipalan, 2015**).

Les concentrations (ou TTP et TTF), qui étaient respectivement de $194,82 \pm 8,57$ mg GAE/g (polyphénols) et $117,20 \pm 48,61$ mg CE/g (flavonoïdes), suggèrent que l'extrait de gingembre (RGE) est une source significative de composés bioactifs. Ces molécules jouent un rôle clé dans les activités antioxydantes grâce à leurs capacités à neutraliser les radicaux libres et à protéger contre le stress oxydatif (**Suleria et al., 2012 ; Singh, and Singh, 2021**).

3-Activité antioxydante

Une faible valeur de CI_{50} indique une excellente capacité antioxydante, ce qui suggère que l'extrait contient des composés capables de réduire les radicaux libres de manière efficace. Cette activité pourrait être liée à la présence de polyphénols et flavonoïdes identifiés dans l'extrait, corroborant les résultats des dosages des métabolites secondaires et des activités antioxydantes (**Brand-Williams et al., 1995 ; Ghasemzadeh and Rahmat, 2010**).

Avec une CI_{50} de $0,57 \pm 0,14$ mg/ml, l'extrait révèle une efficacité antioxydante supérieure par rapport à de nombreux extraits végétaux. Cette capacité peut être attribuée aux propriétés redox des polyphénols et flavonoïdes présents (**Prior and Schaich, 2005 ; Ghasemzadeh, et al., 2016**).

Les résultats obtenus suggèrent que les propriétés antioxydantes du *Zingiber officinale* pourraient le positionner comme un candidat prometteur pour le développement de

compléments alimentaires ou d'agents thérapeutiques destinés à la gestion des maladies chroniques liées au stress oxydatif, telles que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, diabète et autres pathologies (Scalbert et al., 2005 ; Prasad and Tyagi, 2015).

4-Paramètre pondéral (poids corporel des animaux)

Concernant les résultats des effets de l'extrait hydro-alcoolique (éthanol) du rhizome de *Zingiber officinale* sur le poids corporel des rats dans différentes conditions expérimentales, on peut avancer certaines suggestions comme le gain de poids corporel observé ($81,33 \pm 06,89$ g) dans le groupe 1 (témoin) qui reflète bien une croissance normale, indiquant un métabolisme fonctionnel sans perturbation physiologique. Ces résultats servent de base pour évaluer les effets de la toxicité et des traitements administrés dans les autres groupes (Morton and Griffiths, 1985).

La diminution significative du gain de poids corporel ($11,67 \pm 03,78$ g) dans le groupe 2 (exposé au CrO_3 ou chrome hexavalent Cr^{6+}) met en évidence l'effet toxique du chrome sur le métabolisme et la croissance. Des études suggèrent que le chrome hexavalent peut provoquer un stress oxydatif, altérer la fonction hépatique et perturber l'équilibre énergétique, ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la croissance (Stohs and Bagchi, 1995 ; Shanker and Mishra, 2010).

Les rats traités uniquement avec l'extrait hydro-alcoolique de gingembre (groupe 3) ont montré un gain de poids modéré (52,00 g), ce qui suggère un effet préventif ou protecteur du gingembre dans le maintien de la croissance et du métabolisme. *Zingiber officinale* est riche en composés bioactifs, tels que les gingérols et les shogaols, qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, améliorant potentiellement l'état nutritionnel et métabolique (Ghasemzadeh et al., 2010 ; Mashhadi et al., 2013).

Le résultat du gain de poids corporel ($45,33 \pm 09,11$ g) dans le groupe 4 (extrait de gingembre + CrO_3) suggère que le gingembre atténue partiellement la toxicité du trioxyde de chrome. Les propriétés antioxydantes et protectrices des composés phénoliques du gingembre pourraient réduire le stress oxydatif induit par le chrome, limitant ainsi les dommages aux tissus (Prasad and Tyagi, 2015 ; Alam et al., 2020).

Les résultats montrent que *Zingiber officinale* peut moduler les effets toxiques du CrO_3 , bien que la protection ne soit pas complète. Cette étude met en avant le potentiel du gingembre en tant qu'agent thérapeutique contre les toxines environnementales. Pour une application pratique, des études supplémentaires sur les mécanismes d'action moléculaires et la biodisponibilité des composés bioactifs sont nécessaires (Jomova and Valko, 2011).

5-Effets du trioxyde chromique et du gingembre sur le poids des testicules

L'indice relatif du poids des testicules (IRPT) est un indicateur crucial pour évaluer l'impact toxique de substances chimiques sur le système reproducteur mâle. Les résultats obtenus mettent en évidence l'effet toxique du trioxyde de chrome (CrO_3) et le rôle protecteur de l'extrait de gingembre.

Dans le groupe 1 (témoin), IRPT est élevé et reflète un état physiologique normal des testicules, sans exposition à des agents toxiques. Ces données servent de référence pour comparer les effets des traitements.

Pour le Groupe 2 (exposé au chrome), la diminution de l'IRPT confirme l'effet toxique du chrome sur les testicules. Cet effet peut être attribué à la capacité du CrO_3 à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui induisent un stress oxydatif, des dommages cellulaires, et une altération des fonctions des cellules de Leydig responsables de la production de testostérone (Nandi et al., 2014 ; Zhao et al., 2020). La diminution du poids des testicules peut également être liée à une perturbation de la spermatogenèse et à une apoptose accrue dans le tissu testiculaire.

Concernant le Groupe 3 (traitement avec l'extrait de gingembre ou RGE), l'IRPT se rapprochait de celui des témoins ce qui montre que l'extrait de gingembre possède des propriétés préventives. Ces effets sont probablement dus à la richesse du gingembre en antioxydants naturels, tels que les gingerols et les shogaols, qui neutralisent les ROS et réduisent les dommages oxydatifs (Ali et al., 2008). Ce résultat met en lumière la capacité du gingembre à renforcer les défenses antioxydantes endogènes et à protéger les cellules testiculaires.

Par ailleurs, le Groupe 4 (extrait de gingembre + chrome) a révélé un IRPT inférieur à celui du groupe témoin, et une atténuation notable des effets toxiques du CrO_3 est observée par rapport au groupe 2 (CrO_3). Cela suggère que l'extrait de gingembre peut limiter les dommages induits par le CrO_3 , bien qu'il ne puisse pas totalement les prévenir. Ces effets protecteurs sont probablement liés à l'inhibition de la peroxydation lipidique et à la modulation des activités enzymatiques antioxydantes (Kamtchouing et al., 2002 ; Mansour et al., 2015).

Ces résultats montrent que l'extrait de gingembre exerce une action préventive et protectrice contre la toxicité du CrO_3 sur l'appareil reproducteur mâle. Cependant, bien que l'atténuation des effets soit significative, elle n'est pas complète, ce qui suggère que des études supplémentaires sont nécessaires pour explorer les mécanismes moléculaires et les doses optimales du gingembre.

6-Effets de la toxicité du CrO₃ et ceux du gingembre sur les paramètres du stress oxydatif (glutathion réduit et catalase)

6-1-Gluthation réduit GSH

La teneur sérique élevée du glutathion réduit ou GSH (~35 µmol/mg) chez le groupe 1 (témoins) reflète une condition physiologique normale sans stress oxydatif, ce qui correspond à un fonctionnement optimal des systèmes antioxydants.

La diminution drastique du GSH (~20 µmol/mg), chez les animaux intoxiqués du groupe 2 (CrO₃), met en évidence un stress oxydatif sévère dû à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le CrO₃, comme le confirme la littérature (**Chandra & Pandey, 2020**). Cette réduction est souvent associée à la déplétion des défenses antioxydantes sous l'effet de radicaux libres induits par des métaux lourds.

La teneur sérique élevée de GSH (~40 µmol/mg), chez le groupe 3 (traité avec l'extrait hydroalcoolique des rhizomes de *Zingiber officinal*), est cohérent avec les propriétés antioxydantes du gingembre. Les composés phénoliques tels que les gingérols et shogaols augmentent la biosynthèse de GSH (**Ali et al., 2008**).

La teneur sérique modérée de GSH (~30 µmol/mg), chez le groupe 4 (gingembre + CrO₃), montre un effet préventif partiel du gingembre contre les dommages oxydatifs. Cette observation s'accorde avec des études ayant démontré que des extraits de plantes riches en antioxydants réduisent l'impact toxique des métaux lourds (**Kumar et al., 2017**).

6-2-Catalase

L'activité élevée de la catalase (~25 mM H₂O₂/min/mg), chez le groupe 1 (témoins) reflète, une fonction antioxydante normale et efficace, ce qui est typique chez des organismes non soumis à un stress oxydatif.

Par contre, la baisse significative de l'activité catalase (~10 mM H₂O₂/min/mg), chez les rats intoxiqués avec CrO₃ (groupe 2), suggère que les ERO générées par le CrO₃ inactivent l'enzyme, un phénomène fréquemment rapporté dans des modèles de toxicité du chrome (**Zhang et al., 2015**). Les ERO peuvent oxyder les groupes hème de la catalase, entraînant une diminution de son efficacité.

L'activité élevée de la catalase (~27 mM H₂O₂/min/mg), chez le groupe 3 (extrait de gingembre), est conforme aux effets préventifs du gingembre observés dans d'autres études, où les extraits de *Zingiber officinale* augmentent la capacité antioxydante enzymatique (**Jafarzadeh et al., 2010**).

Par ailleurs, la préservation partielle de l'activité catalase (~15 mM H₂O₂/min/mg), chez le groupe 4 (gingembre + CrO₃), souligne que le gingembre atténue la toxicité du CrO₃. Cela

peut être attribué à ses propriétés de piégeage des radicaux libres, qui réduisent l'inactivation enzymatique (**Rahmani et al., 2014**).

Les études suggèrent que le chrome hexavalent (Cr^{6+}) provoque un stress oxydatif intense via la génération de radicaux libres, entraînant une diminution des défenses antioxydantes comme le GSH et la catalase (**Zhitkovich, 2011**). Ces études rejoignent la nôtre concernant la diminution des teneurs sériques de GSH et de l'activité catalase dans le groupe 2 (CrO_3).

Les composés actifs du gingembre (6-gingérol, , 6-shogaol) agissent comme des antioxydants puissants, protégeant les enzymes antioxydantes et augmentant les concentrations de GSH dans des modèles animaux exposés à des agents toxiques (**Ali et al., 2008 ; Habib et al., 2010**). Ces données corroborent les résultats de cette étude montrant ainsi une augmentation du GSH et le maintien de l'activité catalase dans le groupe 3 (extrait de gingembre).

Des études antérieures ont démontré que le gingembre réduit la toxicité de métaux lourds comme le cadmium et le plomb en diminuant les ERO et en préservant les niveaux d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Kumar et al., 2017**).

7-Effets de la toxicité du CrO_3 sur les paramètres tumoraux, hormonaux et tissulaires

En explorant les bases de données via les sites Web de Science Direct et Springer ou dans la littérature en général, on a noté un manque d'études expérimentales spécifiques sur la relation entre la toxicité du trioxyde de chrome CrO_3 et le dysfonctionnement du système reproducteur masculin. Plusieurs raisons peuvent être avancées. Il est possible que les chercheurs n'aient tout simplement pas encore exploré cette question spécifique. La recherche scientifique est vaste et les chercheurs se concentrent souvent sur des domaines où l'intérêt ou l'inquiétude du public est accru. Les études sur les effets du trioxyde de chrome sur la fonction reproductrice masculine sont une tâche complexe qui nécessite souvent des études à long terme, des études épidémiologiques ou des essais cliniques spécifiques. Ces études peuvent être coûteuses et nécessitent une planification minutieuse. Il est possible que les études antérieures n'aient pas trouvé de lien significatif entre le chrome et l'infertilité, ce qui pourrait réduire l'intérêt des chercheurs à poursuivre cette voie de recherche. Les recherches sur le chrome peuvent souvent se concentrer sur d'autres aspects tels que son rôle dans le métabolisme des glucides (picolinate de chrome par exemple), son effet sur la santé cardiovasculaire ou son potentiel cancérigène, détournant ainsi l'attention de la fertilité. Le chrome est également un polluant potentiellement dangereux pour l'environnement.

Par conséquent, la recherche peut se concentrer sur ses effets toxiques généraux plutôt que sur ses effets spécifiques sur la fertilité humaine. Toutes ces raisons ont incité ce projet à avoir des objectifs précis qui ont voulu faire l'exception et ainsi initier des travaux de recherche et se

concentrer beaucoup plus sur cet axe qui est l'éventuelle association de la toxicité du trioxyde de chrome avec un dysfonctionnement de la reproduction masculine ou d'une autre manière chercher à explorer les effets d'une plante médicinale "*Zingiber officinale*" sur la toxicité du chrome (CrO_3) sur les organes reproducteurs mâles, à savoir la prostate et les testicules.

Sans exagération et avec modestie, cette présente étude pourrait être considérée parmi les premières études qui ont abordé la question du lien entre la toxicité du chrome et la fertilité masculine chez l'animal. Quelle que soit la nature des résultats obtenus, elle reste la première étape dans l'exploration de cette thématique. Cette étude ne s'est pas limitée uniquement à cette problématique, au contraire elle a tenté d'expérimenter un remède naturel tout en utilisant une plante médicinale « *Zingiber officinale* » pour prévenir et traiter les effets nocifs résultant de la toxicité du chrome dans un modèle animal. Cette étude a également suggéré une variation des concentrations sériques de marqueurs biologiques, à savoir le PSA et la testostérone, chez les animaux exposés uniquement au trioxyde de chrome (CrO_3) et également chez les animaux qui avaient été préalablement traités avec l'extrait hydroalcoolique de la poudre de rhizomes de *Zingiber officinale* puis exposés au trioxyde de chrome (ou chrome hexavalent Cr^{6+}). Cette étude a révélé une légère élévation du PSA et une augmentation significative de la testostérone chez les rats (groupe 2) auxquels on avait ingéré du CrO_3 . De plus, l'effet inverse s'est produit lorsque les rats ont été préalablement traités avec l'extrait de gingembre puis soumis à une exposition au CrO_3 (groupe 4) dans les mêmes conditions expérimentales. Les concentrations sériques de ces deux marqueurs n'ont pas augmenté (groupe 4).

La toxicité du trioxyde de chrome s'exprime beaucoup plus par inhalation (voie pulmonaire) que par ingestion (voie orale) et cela pourrait s'expliquer par sa caractéristique chimique (**Paustenbach et al., 2019 ; Gatto et al., 2010**). Des formes solubles de chrome, comme le chrome hexavalent (Cr^{6+}), peuvent être créées dans certains environnements biologiques en raison de processus de réduction ou d'autres interactions chimiques. Même le chrome hexavalent (Cr^{6+}) est plus soluble et potentiellement plus toxique et cancérigène (**Alavanja et al., 2003**). Des études, sous forme d'enquêtes, ont suggéré que l'exposition au chrome et à ses dérivés constitue des facteurs de risque associés au cancer de la prostate, très répandu chez les agriculteurs (**Koutros et al., 2013**). Risques professionnels associés au travail du bois, en particulier ceux liés à l'utilisation de produits de préservation du bois ont été révélés par d'autres enquêtes (**Van Maele-Fabry et al., 2006**). Ces produits, aux propriétés fongicides et insecticides, peuvent être des préparations de divers sels, contenant des composés d'arsenic (arséniates, oxydes), des composés de chrome (dichromates alcalins), des composés de bore

(borate, acide borique, complexe boracique), des composés de fluor (fluorure, fluorosilicate, fluoroborate), des composés de cuivre (sulfate, oxyde de cuivre). Une méta-analyse a également suggéré des associations significatives avec d'autres facteurs de risque professionnels tels que l'exposition au chrome (**Morrison et al., 1993**). Les expositions au chrome et le travail posté sont répandus chez les agriculteurs (**Parent and Siemiatycki, 2001**). Dans cette étude, l'extrait de rhizobium ginger a suggéré un effet curatif (ou chélateur) sur les particules toxiques de CrO₃ (dans les organes reproducteurs mâles).

La consommation de gingembre permet de prévenir contre l'action des radicaux libres et des maladies neurodégénératives et le cancer de la prostate (**Morrison et al., 1993 ; Keller-Byrne et al., 1997 ; Parent and Siemiatycki, 2001 ; Mills and Yang, 2003 ; Settini et al., 2003**). Les rhizomes de gingembre contiennent divers composants chimiques (paradiol, gingérol, shogaol et zingéron) lui permettant d'avoir de nombreuses propriétés médicinales : traitement des nausées, vomissements, maux de tête, stimulation du système immunitaire, effets hypoglycémisants, effets antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériens, antiviraux, hépato-protecteurs et effets sur la reproduction (**Krim et al., 2014**). Des études ont montré que le gingembre peut être consommé en toute sécurité chez l'homme et l'animal, sans effets secondaires nocifs et sans augmentation de la mortalité. D'après les études, le gingembre réduit les lésions testiculaires et les troubles hormonaux (testostérone) induits par l'exposition à des perturbateurs endocriniens tels que les dérivés du chrome (pesticides) (**Beristain-Bauza et al., 2019 ; Asynt, 2020**). Des taux de testostérone plus élevés chez les animaux exposés au CrO₃ sont cohérents avec les rapports liant l'exposition aux métaux lourds à la perturbation endocrinienne. Les résultats histologiques obtenus dans les tissus prostatiques et testiculaires mettent en évidence les effets protecteurs du gingembre contre les dommages induits par le CrO₃, ce qui étaye son application thérapeutique potentielle. Notre étude suggère que *Zingiber officinal* peut atténuer les dommages prostatiques et testiculaires induits par le CrO₃, soulignant son potentiel en tant qu'agent protecteur dans les environnements environnementaux et professionnels. D'autres études pourraient explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets protecteurs du gingembre et ses applications thérapeutiques potentielles pour atténuer la toxicité des métaux lourds.

Conclusion & Perspectives

La présente étude s'est intéressée aux effets toxiques du chrome hexavalent (CrVI), plus précisément sous forme de trioxyde de chrome (CrO₃), sur l'appareil reproducteur mâle du rat, et à l'évaluation du rôle protecteur potentiel d'un extrait hydroalcoolique des rhizomes de *Zingiber officinale* (gingembre). Ce travail s'inscrit dans un contexte de préoccupations croissantes liées à la toxicité environnementale des métaux lourds et à leurs impacts sur la santé reproductive et prostatique, ainsi qu'à la recherche de solutions naturelles, sûres et efficaces pour limiter ces effets délétères.

Les résultats expérimentaux obtenus ont confirmé la toxicité marquée du CrO₃ sur l'appareil reproducteur, illustrée par une baisse significative du poids corporel, une altération de la spermatogenèse, une diminution du glutathion réduit (GSH), une perturbation hormonale (testostérone), une augmentation du PSA, ainsi que des lésions histologiques nettes au niveau des tissus testiculaires et prostatiques. Ces effets sont en accord avec la littérature scientifique, qui attribue ces dysfonctionnements à un stress oxydatif intense, à une inflammation chronique et à des atteintes cellulaires graves causées par les espèces réactives de l'oxygène générées par le CrVI.

Face à ces effets néfastes, le traitement préventif au gingembre a permis de démontrer des effets protecteurs significatifs. L'extrait hydroalcoolique de *Zingiber officinale* a exercé une action antioxydante efficace, comme en témoigne la restauration des niveaux de GSH, la régulation des taux de testostérone, la réduction des taux de PSA et l'amélioration des paramètres histologiques. L'intégrité des tissus testiculaires et prostatiques a été partiellement restaurée, la spermatogenèse maintenue dans des conditions proches de la normale, et les signes d'inflammation fortement atténués. Ces effets bénéfiques sont attribués à la richesse du gingembre en composés bioactifs tels que les gingérols, shogaols, paradols et zingerone, bien connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cytoprotectrices.

Le protocole expérimental in vivo mis en œuvre dans cette étude a permis d'objectiver, à travers des paramètres biochimiques, hormonaux et histopathologiques, l'intérêt thérapeutique potentiel du gingembre dans le contexte d'une exposition au chrome hexavalent. L'extrait de gingembre a non seulement limité les effets du stress oxydatif, mais a aussi favorisé la préservation de la fonction testiculaire et prostatique. Toutefois, bien que l'effet protecteur du gingembre soit clairement mis en évidence, il reste partiel. La toxicité du CrO₃ n'a pas été totalement neutralisée, ce qui souligne l'intérêt d'approfondir les recherches, notamment sur les mécanismes moléculaires précis impliqués, la synergie possible avec d'autres agents naturels, ainsi que sur les doses optimales et les voies d'administration les plus efficaces.

En conclusion, ce travail contribue à renforcer la compréhension des effets du chrome hexavalent sur la fertilité et la santé prostatique, et ouvre des perspectives intéressantes quant à l'usage de produits naturels comme le gingembre dans un cadre préventif ou thérapeutique. Il souligne également la nécessité de renforcer la réglementation de l'exposition professionnelle et environnementale aux composés du chrome, et d'encourager le recours à des alternatives naturelles aux effets secondaires réduits. Enfin, cette étude ouvre la voie à des investigations cliniques futures, en vue d'une éventuelle transposition des résultats expérimentaux vers une application chez l'homme dans un contexte de médecine complémentaire et intégrative.

Références bibliographiques

- 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.
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M. R. (2015).** A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 37.
- Ajiboye TO, et al. (2010).** Protective effects of *Zingiber officinale* on cadmium-induced testicular damage in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 48(10): 2682–2686.
- Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O., & Nemmar, A. (2008).** Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale*): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 409–420.
- Asynt. (2020).** La chimie du gingembre. *Asynt*.
- Altman RD, Marcussen KC (2001).** Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 44(11), 2531-2538.
- Amin A., Hamza A. A. (2006).** Effects of *Roselle* and *Ginger* on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 8(5), 607–612.
- Anderson, R. A. (1997).** Chromium as an essential nutrient for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26(1), S35-S41.
- ATSDR (2012).** *Toxicological Profile for Chromium*. U.S. Department of Health and Human Services.
- ATSDR (2012).** *Toxicological Profile for Chromium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services.
- Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., Preuss, H. G. (2002).** Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180(1), 5-22.
- Baliga, M. S., Haniadka, R., Pereira, M. M., D'Souza, J. J., Pallaty, P. L., Bhat, H. P., Popuri, S. (2011).** Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and Its Phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 499–523.
- Barceloux, D. G. (1999).** *Chromium*. *Clinical Toxicology*, 37(2), 173-194.
- Baruthio, F. (1992).** Toxic effects of chromium and its compounds. *Biological Trace Element Research*, 32, 145-153.
- Benabdallah H (2022).** Etude du pouvoir antioxydant d'Artemisia herba-alba, *Université Frères Mentouri Constantine*.
- Beristain-Bauza SC, Hernández-Cruz BC, Lobato-Calleros C (2019).** Étude de la composition chimique et des effets biologiques du gingembre. *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Constantine*.
- Black C D, Herring M P, Hurley D J, O'Connor P J (2010).** Ginger (*Zingiber officinale*) reduces muscle pain caused by eccentric exercise. *The Journal of Pain*, 11(9), 894-903.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.
- Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4e édition, Lavoisier.
- Burrows, D. et al. (1981).** Contact dermatitis from chromium and chromates. *Contact Dermatitis*, 7(5), 270-275.
- 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).
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Cravotto, G. (2012).** Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chen, C. Y., Huang, Y. L. (1998).** "Gingerol and shogaol: Active components of ginger exhibiting antioxidative and anti-inflammatory properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2886-2892.

- Chevallier A. (2016).** *Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley Publishing.
- Chen C. C., Huang Y. L. (1998).** Antioxidant activity of *Zingiber officinale* extracts toward nitric oxide radicals. *Food Chemistry*, 63(3), 295–301.
- Costa M, Klein CB (2006).** Toxicity and Carcinogenicity of Chromium Compounds in Humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(2), 155–163.
- Cross HJ et al. (1997).** Criteria document for hexavalent chromium. Institute of Occupational Health, UK, International Chromium Development Association, Paris.
- De Flora S (2000).** Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(4), 533–541.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302.
- ECHA (2017).** *European Chemicals Agency - CLP Regulation*
- Elbetieha, A., Al-Hamood, M. H., & Al-Thnaibat, O. (2001).** Chronic toxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds on fertility of male and female mice. *Reproductive Toxicology*, 15(6), 505–511.
- ECHA (2017).** *European Chemicals Agency - CLP Regulation*.
- Edo G I. (2022)** Antibacterial, phytochemical and GC-MS analysis of *Thevetia peruviana* extracts: An approach in drug formulation. *Natural Resources for Human Health*, 2(4), 418–426.
- El-Haroun H, et al. (2020).** Ginger extract attenuates chromium-induced oxidative damage in reproductive organs of male rats. *Andrologia*, 52(2): e13509
- El-Sharaky, A. S., Newairy, A. A., Kamel, M. A., Eweda, S. M. (2009).** "Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in albino rats." *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 158-164.
- Extrait végétal** obtenu par un procédé d'extraction à l'aide de solvants polaires, Brevet FR2892933A1, 2007.
- FAO. (2021).** "Ginger production statistics by country." Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAOSTAT)
- Fotsing S, Ngogang M P; Bérenger N ; Simo LJ, Ngogang J (2022)** Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et activités antioxydantes des rhizomes de *Zingiber officinale* récoltés dans cinq sites de culture du Cameroun. *Journal of the cameroon academy of sciences*, (18) 2.
- Fuhrman, B., Rosenblat, M., Hayek, T., Coleman, R., Aviram, M. (2000).** "Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice." *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1124-1131.
- Gatto NM, Cockburn M, Bronstein J, Manthripragada AD, Ritz B (2010).** *Well water consumption and Parkinson's disease in rural California. Environmental Health Perspectives*, 118(12), 1912-1918.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Rahmat, A. (2016).** "Phytochemical constituents, antioxidant activity, and mineral composition of *Zingiber officinale* var. *rubrum*." *The Scientific World Journal*, 2016.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A. (2010).** Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15(6), 4324-4333.

- Ghayur, M. N., Gilani, A. H., Janssen, L. J. (2008).** "Ginger attenuates cholinergic contraction and Ca^{++} signaling of gut and airway smooth muscle via blockade of cell entry." *International Immunopharmacology*, 8(13-14), 2116-2124.
- Ghoochani N., Karimi J., Shoorei H., Dehghani F., Jalali M., Azizi M., Malekzadeh J. (2021).** The effect of ginger supplementation on semen parameters and antioxidant status in infertile men: A randomized double-blind controlled trial. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(1), 29–40.
- Gigon F (2012).** Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie* 10, 87–91
- Glaser, U. et al. (1986).** Toxicological aspects of soluble and insoluble chromium compounds. *Archives of Toxicology*, 58(3), 163-167.
- Gonzalez-Marín C., Gosálvez J., Roy R. (2012).** Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14026–14052.
- Goyer, R. A., Clarkson, T. W. (2001).** Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (6th ed., pp. 811-867). McGraw-Hill.
- Hadwan, M. H. (2016).** New method for assessment of serum catalase activity. *Indian Journal of Science and Technology* 9(4): 1-5.
- Hamman LL, Garba SH, Jacks TW, Zirahei JZ, Dibal NI, Oche Attah MO (2022).** Acute Toxicity and Effect of Prolonged Oral administration of *Zingiber officinale* ethanol extract on Liver and Kidney Histology in Rats. *AJBAR*, 1(3) : 17-23.
- Hanker, G., Mishra, S. (2010).** Chromium toxicity and its health hazards. *International Journal of Advanced Research*, 1(2), 9-12.
- Hasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2016).** Ginger as a source of phenolic compounds and the application of high-performance liquid chromatography for their evaluation. *BioMed Research International*, 2016, 1-10.
- Heimes K., Feistel B., Verspohl E. J. (2009).** Impact of the 5-HT₃ receptor channel system for the antiemetic activity of ginger. *European Journal of Pharmacology*, 615(1-3), 165–168.
- IARC (2012).** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100C: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts.* International Agency for Research on Cancer.
- IARC Monographs (2012).** Chromium (VI) compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 100C.
- INERIS (2017).** *Choix de valeur toxicologique de référence. Chrome et composés Tri- et hexavalents.*
- IPCS (2013).** *International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 61: Chromium.*
- 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.
- Joubert, E., et al. (2016).** "Phytochemical composition and biological activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oil." *Journal of Essential Oil Research*, 28(2), 105-112.
- Joy, P. P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, B. P. (1998).** "Medicinal plants." Kerala Agricultural University.
- Jomova, K., Valko, M. (2011).** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
- Junaid, M., Murad, H. A., & Ghafoor, K. (2019).** Evaluation of chromium-induced reproductive toxicity and ameliorative effects of vitamin C and E in male rats. *Toxicology Reports*, 6, 252–259.
- Kant, S., et al. (2012)** "Chemical composition of ginger (*Zingiber officinale*) and its antioxidant and antimicrobial activities." *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 473-478.

- Kamtchouing P., Mbongue Fandio G. Y., Dimo T., Jatsa H. B. (2002).** Evaluation of androgenic activity of *Zingiber officinale* and *Pentadiplandra brazzeana* in male rats. *Asian Journal of Andrology*, 4(4), 299–301.
- Kanojia, A., Jhanwar, A., & Seth, P. K. (2005).** Chromium-induced teratogenicity in rats. *Toxicology Letters*, 159(2), 180-187.
- Keller-Byrne JE, Khuder SA, Schaub EA (1997).** Meta-analyses of prostate cancer and farming. *American Journal of Industrial Medicine*, 31(5), 580-586.
- Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, A. A., Khamenehi, H. J., & Hamadeh, M. (2009).** Evaluation of androgenic activity of ginger in male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 7(1), 7–12.
- Khaki A, et al. (2009).** Effects of ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat. *Iran J Reprod Med*, 7(1): 7–12.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kokate, C. K., Purohit, A. P., Gokhale, S. B. (2010).** *Pharmacognosy*. 47th ed. Nirali Prakashan.
- Kotaś, J., Stasicka, Z. (2000).** Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107(3), 263-283.
- Koutros S, Beane Freeman LE, Lubin JH, Heltshe SL, Andreotti G, Barry KH, Hou L, DellaValle CT, Hoppin JA, Sandler DP, Blair A, Alavanja MCR (2013).** Risk of total and aggressive prostate cancer and pesticide use in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 177(1), 59-74.
- Krim M, Messaoudi I, Saïd L, Kessabi F, El Heni J (2014).** Effet protecteur du gingembre contre la toxicité testiculaire induite par le chrome chez le rat. *Université Badji Mokhtar-Annaba*.
- Kumar, S., Bhatnagar, S. (2014).** "Botanical illustrations of medicinal plants." *Journal of Plant Studies*, 3(2), 45-52.
- Kumar N., Singh A. K. (2015).** Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191–196.
- Kumar, A., Singh, A., Sharma, P (2017).** Antioxidant and protective effects of *Zingiber officinale* against heavy metal-induced toxicity. *Journal of Environmental Biology*, 38(6), 1393-1400.
- Kumar, S., Sharma, A., & Rawat, I. (2021).** Toxicity of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 40(2), 75–85.
- Lakhan SE, Ford CT (2015).** Ginger is an effective non-pharmacological treatment for pregnancy-induced nausea and vomiting. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(1), 1-7.
- Langård, S. (1990).** One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports. *American Journal of Industrial Medicine*, 17(2), 189-215.
- Mansour, S. A., Mossa, A. T. H., Heikal, T. M. (2015).** Biochemical and histopathological effects of exposure to essential oils of garlic and ginger in male rats. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(2), 123–134.
- Mao, Q., Xu, X., Cao, S., Gan, R. Y. (2021).** Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 10(3), 455.
- Mashhadi NS, et al. (2013).** Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: Review of current evidence. *Int J Prev Med*, 4(Suppl 1): S36–S42.
- Masuda Y., Kikuzaki H., Hisamoto M., Nakatani N. (2004).** Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors*, 21(1-4), 293–296.

- Masuda, T., Kikuzaki, H., Hisamoto, M. (2008).** Chemical Constituents of Ginger and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3964–3969.
- Mohammad-Ghasemi F., Moshfeghifar M., Najafi S., Kargar Jahromi H., Asadi-Samani M. (2020).** Effect of ginger (*Zingiber officinale*) supplementation on seminal antioxidant markers and semen parameters: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research*, 34(9), 2217–2225.
- Morakinyo AO, et al. (2008).** Effects of *Zingiber officinale* on reproductive functions in male rats. *Afr J Biomed Res*, 11: 329–334.
- Morrison H, Savitz D, Semenciw R, Hulka B, Mao Y, & Morison D (1993).** Farming and prostate cancer mortality. *American Journal of Epidemiology*, 137(3), 270-280.
- Morton, D. B., Griffiths, P. H. (1985).** Guidelines on the recognition of pain, distress, and discomfort in experimental animals and hypothesis for assessment. *Veterinary Record*, 116(16), 431-436.
- Naik, M. I., Jhala, R. C. (2016).** "Histological studies of *Zingiber officinale* rhizomes." *International Journal of Plant Sciences*, 11(2), 229-234.
- Nandi, S., Dey, S., Maiti, S. (2014).** Testicular toxicity of hexavalent chromium: Ultrastructural and biochemical studies. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(3), 182–189.
- Njoya, E. M. (2021).** Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer*, Elsevier: 349-357.
- Nurtjahja-Tjendraputra, E., Ammit, A. J., Roufogalis, B. D., Tran, V. H., Duke, C. C. (2003).** "Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger." *Thrombosis Research*, 111(4-5), 259-265.
- OEHHA (2009).** Office of Environmental Health Hazard Assessment. *Public Health Goal for Hexavalent Chromium in Drinking Water*.
- Okwu, D. E., Nnamdi, F. U. (2008).** "Evaluation of the chemical composition of ginger rhizome and its microscopical features." *Research Journal of Biological Sciences*, 3(4), 383-385.
- 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).
- Paustenbach, D. J., Sheehan, P. J., Parell, B., Wisser, T., & Finley, B. L. (1992).** Review of occupational and environmental exposures to hexavalent chromium. *Critical Reviews in Toxicology*, 22(2), 89-157.
- Paustenbach DJ, Sheehan PJ, Finley BL (1992).** Use of pharmacokinetics in risk assessment: Drinking water and health. *Environmental Health Perspectives*, 98, 139-147.
- Piao, F., Yokoyama, K., Ma, N., Yamauchi, T. (2003).** Subacute toxic effects of trivalent and hexavalent chromium on testicular functions and oxidative stress-related parameters in male rats. *Reproductive Toxicology*, 17(2), 219-227.
- Prasad, S., Tyagi, A. K. (2015).** Ginger and its constituents: Role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 1-11.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Qin, D., Z. Wen, et al. (2013).** "Effect of cichorium glandulosum extracts on CCl4-induced hepatic fibrosis." *Iranian Red Crescent Medical Journal* 15(12).

- Saha, R., Nandi, R., Saha, B. (2011).** Sources and toxicity of hexavalent chromium. *Journal of Coordination Chemistry*, 64(10), 1782-1806.
- Saad A. A., Abou-Zeid S. F. (2011).** Effect of ginger extract consumption on levels of testosterone and some biochemical parameters in male albino rats. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 45, 551–562.
- Sainte-Marie, G. et al. (2004).** *Toxicologie industrielle*. Masson, Paris.
- 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.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. (2005).** Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 215S–217S.
- Sengupta, P. (2013).** Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 353-368.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015).** Phenolics and polyphenolics in foods, beverages, and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Sharma S, et al. (2016).** Chemopreventive efficacy of ginger in colon carcinogenesis of rats via antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative mechanisms. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(3): 1275–1282.
- Sharma, M., & Srivastava, D. (2018).** Phytochemistry and medicinal attributes of *Zingiber officinale*. In *Zingiber officinale* (pp. 1-13). Springer, Singapore.
- Showell M. G., Brown J., Yazdani A., Stankiewicz M. T., Hart R. J. (2011).** Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1.
- Showell M. G., Mackenzie-Proctor R., Jordan V., Hart R. J. (2014).** Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 12.
- Shukla, Y., Singh, M. (2007).** "Cancer preventive properties of ginger: A brief review." *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 683–690.
- 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.
- Singh, A., & Singh, R. K. (2021).** Phytochemistry, therapeutic uses, and pharmacological activities of *Zingiber officinale*: A review. *Current Traditional Medicine*, 7(3), 204-216.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 299: 152-178.
- Standeven, A. M., & Wetterhahn, K. E. (1991).** Cellular uptake and metabolism of chromium: Relationship to chromium-induced toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 4(5), 616-622.
- Stern AH (2010).** Essentiality and Toxicity in Chromium Compounds: Does Cr(III) Have a Biological Role? *Environmental Research*, 111(8), 1185–1193.
- Stohs, S. J., Bagchi, D. (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321-336.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S. (2007).** Antioxidant Activity of a Ginger Extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102(3), 764–770.
- Suleria, H. A. R., Sadiq Butt, M., Anjum, F. M., Saeed, F. (2012).** Antioxidant potential of polyphenols and their applications in food systems: An overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 587-605.

- Tao Y., et al. (2014)** "Analysis of essential oil from ginger (*Zingiber officinale*) and its antibacterial activity." *International Journal of Food Science & Technology*, 49(6), 1493-1500.
- Terry R, Posadzki P, Watson LK, Ernst E (2011).** The use of ginger (*Zingiber officinale*) for the treatment of pain: a systematic review of clinical trials. *Pain Medicine*, 12(12), 1808-1818.
- Trease, G. E., Evans, W. C. (2009).** *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16th ed. Elsevier Health Sciences.
- Tremellen K. (2008).** Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3), 243–258.
- Uboh, F., M. Akpanabiatu, et al. (2007).** "Effect of inhalation exposure to gasoline on sex hormones profile in Wistar albino rats." *ACTA ENDOCRINOLOGICABUCHAREST-3(1)* : 23.
- US EPA (1998).** *Toxicological Review of Hexavalent Chromium*.
- Van Maele-Fabry G, Libotte V, Willems J, Lison D (2006).** Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes & Control*, 17(4), 353-373.
- Weckbecker G, Cory JG (1988).** Ribonucleotide Reductase Activity and Growth of Glutathione-Depleted Mouse Leukemia L1210 Cells In Vitro. *Cancer Lett* 40(3): 267-264
- Weiss E A, Abrahams S (2020).** *Spices: Historical, Traditional, and Modern Uses*. Springer.
- WHO (2013).** World Health Organization. Chromium in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- WHO (2013).** Chromium in Drinking-Water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization.
- Zancan, K. C., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. (2002).** Extraction of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Oleoresin with CO₂ and Co-solvents: A Study of the Antioxidant Action of the Extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 24(1), 57–76.
- Zeng, S., et al. (2013).** "Genetic diversity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in China assessed by ISSR and SRAP markers." *Genetica*, 141(3), 145-153.
- Zhang S , Zhang L , Yu M , Luo D, Chen S, Liu W, Zhang Y, Zhang L, Zhao T (2022)** Essential oils of *Zingiber officinale*: Chemical composition, in vivo alleviation effects on TPA induced ear swelling in mice and in vitro bioactivities. *Front Nutr*, 24;9:1043175.
- Zhang, Y., Wang, L., Wu, T. (2015).** Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 11228-11243.
- Zhang, J., & Li, X. (1987).** Chromium pollution of soil and water in Jinzhou. *Journal of Chinese Preventive Medicine*, 21(5), 262-264.
- Zhao, H., Zhu, J., Chen, X., Cai, X. (2020).** Hexavalent chromium-induced oxidative stress and apoptosis in male reproductive system via the Akt-dependent pathway. *Environmental Pollution*, 256, 113427.
- Zhitkovich A (2011).** Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), 1617–1629.

ANNEXES

Appareillage mini VIDAS



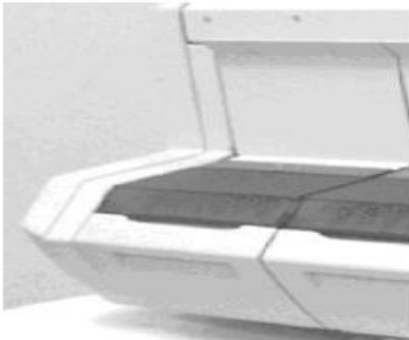
Composants du mini VIDAS



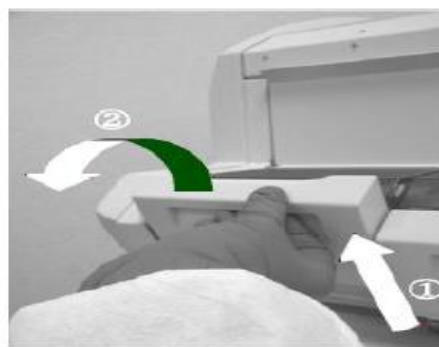
(1) le plateau cartouche des réactifs



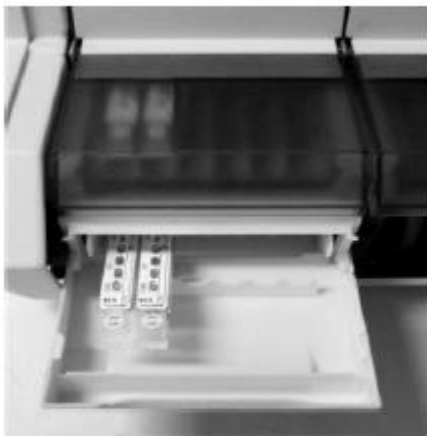
(2) Bloc cônes



(3) Porte cartouches fermée



(4) Ouverture du porte cartouche

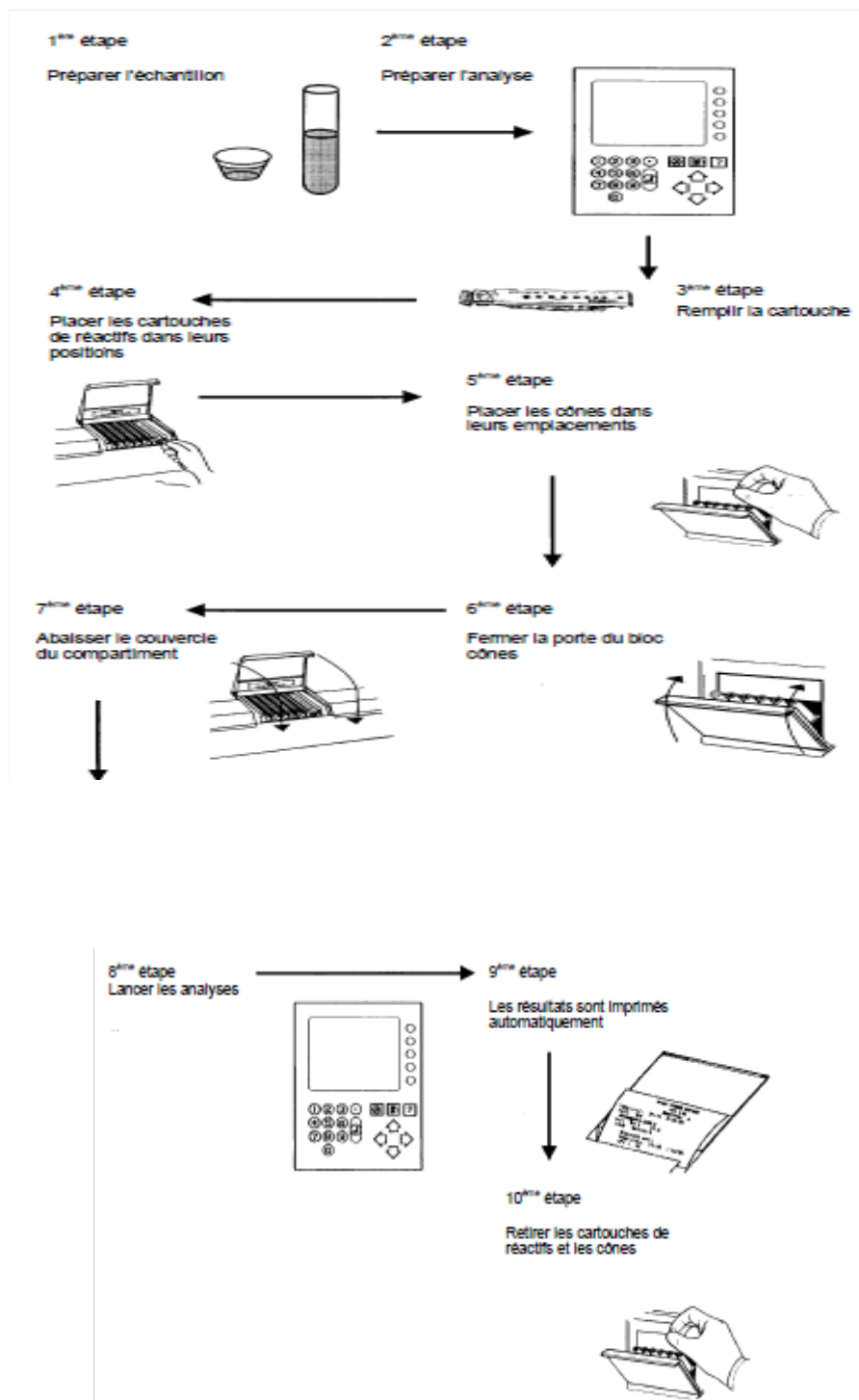


(5) Cartouches placées dans le porte -
cartouche



(6) Cartouches placées dans le porte -
cartouche avec leur barquette

Concept de travail



Etude microscopique

1-Etapes de déshydratation

Les prélèvements prostatiques préalablement fixés seront déshydratés dans une série de bains d'alcool éthylique et de solvants organiques.

Bains	Fixateurs, solvants organiques	Durée
1 ^{er} bain	formol	1 heure
2 ^e bain	alcool 75 %	2 heures
3 ^e bain	alcool 95 %	2 heures
4 ^e bain	alcool 95 %	1 heure
5 ^e bain	alcool absolu 100 %	1 heure
6 ^e bain	acétone	1 heure
7 ^e bain	acétone	1 heure
8 ^e bain	xylène	1 heure
9 ^e bain	xylène	1 heure
10 ^e bain	xylène	1 heure
11 ^e bain	paraffine	2 heures
12 ^e bain	paraffine	2 heures

2-Etapes de la coloration

La phase de coloration des coupes déparaffinées à l'hématoxyline éosine nécessite le passage de ces coupes dans plusieurs bains d'alcool et de solvants organiques.

N° de bain	Nature du bain	Durée
1	toluène ou xylène	2 min.
2	alcool 100 °	2 min.
3	alcool 95 °	2 min.
4	alcool 75 °	2 min.
5	eau	10 sec.
6	hématoxyline	5 sec.
7	eau	10 sec
8	Acide chlorhydrique HCL	8 sec.
9	Carbonate de lithium $\text{Li}_2 (\text{CO}_3)_2$	10 sec.
10	eau	10 sec.
11	alcool 95 °	1 min.
12	éosine	10 sec.
13	alcool absolu 100 °	2 min
14	alcool	2 min
15	xylène ou toluène	2 min

Attestations de participations aux manifestations scientifiques

	ATTESTAION DE PARTICIPATION	
2^{ème} SEMINAIRE NATIONAL UNIVERS, TERRE, NATURE & VIE		
Tlemcen le 19 Avril 2025		
Le président du séminaire atteste que :		
<p>Berroukhe Abdelkrim Laboratoire de Recherche en Sources Hydriques & Environnement, Département de l'Agronomie et Sciences Alimentaires, Faculté des Sciences de la Nature et la Vie, Université Dr. Moulay-Tahar de Saida, Algérie.</p> <p>Hafsa Dellaoui Pharmaceutical Sciences Research Center CRSP, Constantine, Algeria.</p> <p>Nour El Imen Zerarki Laboratory of Bio Toxicology, Pharmacognosy and biological valorization of plants, Biology Department, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Saida, Algeria.</p>		
ont participé au 2 ^{ème} séminaire national univers, terre, nature & vie organisé par la Startup Pedagogic and Scientific Conferences and Publications Tlemcen en collaboration avec la Maison des Universitaires pour l'édition, l'imprimerie et la diffusion Tlemcen qui s'est tenu le 19 Avril 2025 à Tlemcen par une communication orale intitulée :		
Preventive effects of a soybean seed extract on benign prostatic hypertrophy induced by testosterone and a high-calorie diet in rats		
 Le président du séminaire	 Le président du comité scientifique	



Association Française de Chimie Bioinorganique
France



Amboise, 22/05/2025

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

On behalf of the FrenchBIC 2025 organization, we hereby certify that

Dr Abdelkrim Berroukche

has attended the FrenchBIC 2025 conference, from May 19th to May 22nd 2025,
in Amboise, France where he has presented the work of

Nour El Imane Zerarki

entitled "Preventive effects of Zingiber Officinal on Chromium trioxide toxicity in
the reproductive tract of male rat"

On behalf of the organizing committee,

Dr. Célia Bonnet, CNRS research director



Association Française de Chimie Bioinorganique
France



Amboise, 22/05/2025

CERTIFICATE OF ATTENDENCE

On behalf of the FrenchBIC 2025 organization, we hereby certify that

Dr Abdelkrim Berroukche

has attended the FrenchBIC 2025 conference, from May 19th to May 22nd 2025,
in Amboise, France where he has presented the work of

Nour El Imane Zerarki

entitled “Preventive effect of ginger (Zingiber Officinal) against hexavalent
chromium [Cr(VI)]-induced oxidative stress in rat”

On behalf of the organizing committee,

Dr. Célia Bonnet, CNRS research director



Article

Preventive Effects of *Zingiber officinal* on Chromium Trioxide Toxicity in the Reproductive Tract of Male Rat

Nour El Imen Zerarki ¹ and Abdelkrim Berroukche ^{2,*}

¹ Laboratory of Bio Toxicology, Pharmacognosy and biological valorization of plants, Biology Department, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Saida Moulay-Tahar, Algeria.

² Laboratory of Water Sources and Environment, Department of Agronomy and Food Nutrition, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Saida Moulay-Tahar, Algeria.

*Corresponding author: abdelkrim.berroukche@univ-saida.dz

Abstract: Exposure to chromium trioxide (CrO_3) is known to induce oxidative stress and damage to various tissues, including reproductive organs. *Zingiber officinale* has been reported to possess potent antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to investigate the protective effects of rhizobium ginger extract (RGE) on the prostate and testicular tissues of rats exposed to CrO_3 . Male rats were divided into four groups: GR1 (control), GR2 (CrO_3 at 10 mg/kg), GR3 (RGE-treated at 600 mg/kg) and GR4 (RGE + CrO_3). Biochemical analyses were conducted to measure serum concentrations of prostate specific antigen (PSA) and testosterone. Histological examinations of prostate and testicular tissues were also performed. The CrO_3 -exposed rats (GR2) exhibited significant increases in PSA and testosterone levels respectively 0.93 and 0.98 ng/mL. Whereas RGE-treated rats (GR4) showed decreased serum-PSA (< 0.068 ng/mL) and testosterone (0.41 ng/mL). Histological study revealed tissue damage and inflammatory cell infiltration in the prostate and testicular tissues of CrO_3 -exposed rats (GR2). In contrast, rats treated with RGE (GR4) showed an improved tissue architecture and reduced inflammation compared to the CrO_3 -exposed group. The findings suggest that RGE mitigates CrO_3 -induced oxidative stress and tissue damage in the prostate and testicular tissues. This study highlights *Zingiber officinale* being a natural therapeutic agent against reproductive toxicity induced by heavy metals.

Keywords: chromium trioxide; oxidative stress; *Zingiber officinale*; protective effects; prostate and testicular tissues.

1. Introduction

Heavy metals, particularly in their oxidative forms, are increasingly recognized for their toxicity and deleterious effects on various biological systems, including the reproductive system [1,2]. Among these compounds, chromium trioxide (CrO_3) stands out for its high toxicity and its ability to generate reactive oxygen species (ROS), oxidative disruption, and cellular damage in many tissues, including the male reproductive system [1,3,4]. As a hexavalent chromium (Cr^{6+}) compound,

CrO₃ is widely used in various industries, such as electroplating, pigment manufacturing, and alloy production, resulting in potential exposure to workers and risk of environmental contamination [4,5]. The adverse effects of CrO₃ are well documented, with acute and chronic toxicity observed in lung, liver, and kidney tissues, as well as significant genotoxicity [4,6]. However, its impact on male reproductive health deserves special attention due to the possibility of hormonal disruption, germ cell damage, and reduced fertility. Recent research has highlighted the central role of oxidative stress in the reproductive toxicity of hexavalent chromium (Cr⁶⁺) [7]. This stress results from an imbalance between ROS production and the endogenous antioxidant capacity of tissues, leading to oxidative damage to lipids, proteins, and DNA [8,9]. This damage affects spermatogenesis, hormone production, and cellular integrity of the testes [1, 7, 8, 10]. Approaches to reduce the adverse effects of CrO₃ on reproduction have thus attracted increasing interest, particularly through the use of natural antioxidants capable of neutralizing ROS and strengthening endogenous antioxidant defenses. *Zingiber officinale*, commonly known as ginger, is a medicinal plant widely used for its antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties [11-14]. Composed of gingerols, shogaols, and zingerone, this plant has demonstrated protective effects against oxidative stress in many models of heavy metal-induced toxicity [15,16]. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that *Zingiber officinale* extract can reduce oxidative stress levels, prevent cellular damage, and support male reproductive function by promoting spermatogenesis and protecting testicular cells from toxic disruption [1, 7, 8, 17]. Therefore, *Zingiber officinale* may represent a promising preventive strategy against CrO₃-induced toxicity in the reproductive tract. This study aims to explore the preventive effects of *Zingiber officinale* extract on chromium trioxide-induced reproductive damage in male rats. By combining histopathological, biochemical, and hormonal analyses, we hope to demonstrate that *Zingiber officinale* can alleviate CrO₃ toxicity and protect reproductive function. The results of this research could pave the way for new therapeutic interventions using natural antioxidants to minimize the risks associated with exposure to heavy metals, thus contributing to a better understanding of protection strategies against environmental toxicants.

2. Materials and Methods

Preparation of rhizobium ginger extract (RGE)

Zingiber officinale rhizome was purchased at the spice market of Saida town, Algeria, and was presented to the Department of Agriculture and Food Science, Faculty of Natural Science and Life, University of Saida for recognition. The plant was then washed, disinfected, rinsed with distilled water, and divided into smaller pieces. The pieces were dried at room temperature. The dried pieces were ground in an electrical mill and the ground raw material (20 g) was put through a weave filter with a 60 mm opening to produce a fine powder. The obtained fine powder was then utilized in the preparation of the extract (100 mL of 70 % ethanol). The crude extract was made according to the maceration method; the dried powder was soaked for 48 h in 70 % ethanol. The mixture was dried in the vacuum using a rotary vacuum evaporator after 48 h and was then filtered again using Whatman filter paper [18].

Extraction yield

The extract was weighted and its percentage yield was calculated. The yield of the extract is defined as the ratio between the mass of the dry extract obtained after maceration (B) and the mass of the plant material used (A). It is given by the following formula:

Yield = (A/B) × 100 (B: weight of raw material, A: weight of plant extracts)

In vivo study

Animal material

Breeding of rats was carried out at the Department of Agriculture and Food Science, Faculty of Natural Science and Life, University of Saida. The maintenance of the animals was carried out in a lighted room 12 hours a day, it is a photoperiod of 12 hours / 24 hours whose temperature was kept constant (22-25 °C). The rats were housed and separated in four plastic cages. They had free access to water and food. Animals were treated following the principles and guidelines set out in the Care and Use of Experimental Animals Manual. Article 58 of law 88-08 of 1988 includes a general prohibition of committing 'bad treatments' towards animals. Article 58 also states that the same prohibition applies to animals used in biological, medical, and scientific experiments, which experiments are required to be 'limited to cases of strict necessity [19].

Experimental design

A population of about twenty male rats, 8 weeks old with a weight varying between 110-230 gr, were divided into 4 groups. Each group contained 5 rats. The experimental period was 90 days. The animals were divided as follows (Figure 1):

- Group 1: normal control rats received a standard diet and physiological saline (0.9 % NaCl).
- Group 2: experimental controls received orally trioxide chromium CrO₃ at the dose 10 mg/kg/ day (~ 1/10 of LD₅₀) (LD₅₀ = 52-113 mg/L in rat by oral route) [20].
- Group 3: rats received orally 600 mg/kg / day (~ 1/100 of LD₅₀) (LD₅₀ = 3800 mg/L) [21]. RGE was dissolved in corn oil to avoid irritation to the digestive tract.
- Group 4: rats received trioxide chromium CrO₃ and RGE.

Biochemical tests

Blood samples were taken from rats every 10 days for a month. Blood was collected from the eye areas of the animals. The amounts of blood were collected in heparinized tubes intended for the biochemical assays. Serum assays of prostate-specific antigen (PSA) and testosterone were performed respectively by enzymatic methods and immunological techniques such as ELISA (antigen-antibody reaction). PSA and testosterone were measured using the mini-VIDAS analyzer (Bio-Merieux, France). The method used was the technique enzyme-linked fluorescent assay (ELFA): this is a test immuno-enzymatic Elisa of "sandwich" type in phase heterogeneous where the biological markers are caught between two monoclonal antibodies. Reading the dosage results was made in two stages with a final detection by fluorimetry. Results of serum PSA and testosterone concentrations are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean), with a value of p<0.05 considered statistically significant. Statistical evaluation was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. All statistical analyses were conducted with the statistical software SIGMAPLOT (Version 11.0).

Histology

At the end of the experimental period, the animals were anesthetized and then sacrificed. Prostatic and testicular tissues were removed for histological study. Samples were preserved in 10 % formalin solution until use. Histological sections were performed in the Anatomopathology Department of the hospital center of the city of Saida, Algeria. The technique used includes the following steps; the samples were fixed in 10 % formaldehyde, dehydration of the samples in successive baths of ethanol, inclusion of the samples were in paraffin, after cooling the paraffin blocks to -20 °C, cuts were made of 4 μm thickness using a Microm HM 340 E manual microtome (Thermo scientific, Illkirch), and finally the staining of the sections using the Hematoxylin-Eosin technique [22].

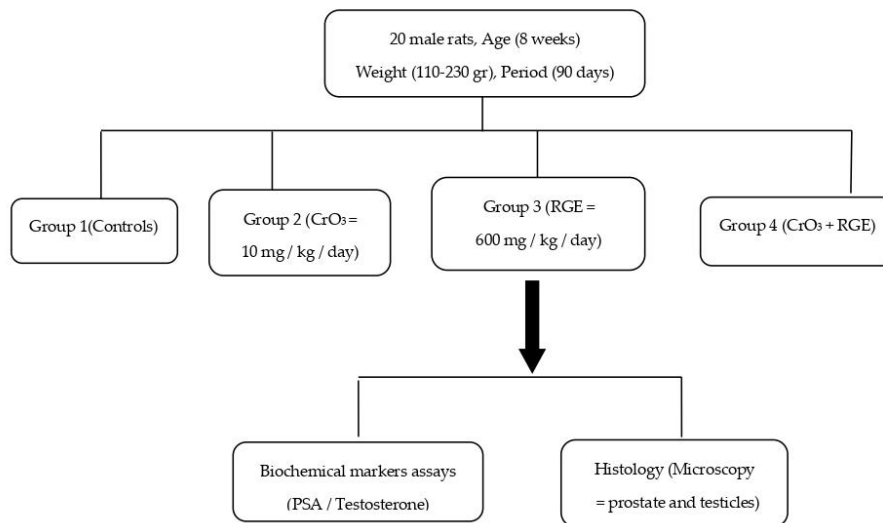


Figure 1. Experimental design
(RGE effects on the prostate and testicular tissues of rats exposed to CrO₃)

3. Results and Discussion

The percentage yield of the ethanol of *Zingiber officinale* was 31.5 %. The yield was a dark yellow mass of 31.5 g for ethanol extract. This result was following previous studies [11].

Serum-assay of the biomarker prostate specific antigen (PSA) did not show a considerable elevation in its serum concentration when comparing different groups of animals, namely, group 1 (normal controls), group 2 (CrO₃), group 3 (RGE), and group 4 (CrO₃ + RGE) (p>0.05). The values of serum PSA concentrations in groups 1, 3, and 4 were lower than 0.068 ng/mL, however, it was found that the PSA concentration in group 2 (CrO₃) reached a value of 0.93 ng/mL (Table 1).

Plasma concentrations of the male sex hormone “testosterone” in the different groups were measured at the end of the experiment. The values of plasma concentrations of the biological marker (testosterone) were different. The serum level of testosterone was significantly high in group 2 (CrO₃) and it was of the order of 0.98 ng/mL (p<0.01), however, the blood concentrations of testosterone were

variable. Among the other groups 1, 3, and 4 and they were respectively; group 1 (0.43 ng/mL), group 3 (0.29 ng/mL), and group 4 (0.41 ng/mL) (Table 1).

Table 1. Serum-assay of PSA and testosterone in groups of rats.

Groups of rats	PSA (ng/mL) mean ± SEM	Testosterone (ng/mL) mean ± SEM	p-value
Group 1 (controls)	< 0.068±0.002	0.43±0.03	
Group 2 (CrO ₃)	0.93±0.001	0.98*±0.04	< 0.01
Group 3 (RGE)	< 0.068±0.002	0.29*±0.01	
Group 4 (CrO ₃ + RGE)	< 0.068±0.002	0.41*±0.02	

PSA: prostate specific antigen, RGE: rhizobium ginger extract; SEM: standard error of the mean; *Testosterone: significantly different between groups 2, 3, and 4 of animals (p<0.01); CrO₃: trioxide chromium

The histology of control rats (group 1) showed normal prostate cells with a well-differentiated glandular structure (Figure 2-A). However, in group 2 (rats exposed to CrO₃), alterations and abnormal tissue architecture expressed by irregular neoplastic glands were noted (Figure 2-B). In these same animals (group 2), the presence of solid cellular areas confluent in mass presenting or necrosis. Whereas, in rats of groups 3 and 4 (treated with RGE), the stroma of the prostate parenchyma is regular and differentiated, little invaded by abnormal cells (Figure 2-C and D).

Microscopic examination of the testicular tissue of control rats (group 1) showed that the interstitial tissue and the seminal tubes, with their stages of spermatogenesis, are intact (Figure 3-A). The accumulation of chromium oxide CrO₃ in the testes of rats (group 2) leads to damage to the seminiferous tubules and interstitial tissue. These tissue disruptions were associated with loss of germ cells, necrosis, crowding of blood vessels, edema, cellular infiltration, and absence of Leydig cells (Figure 3-B). Whereas, in rats treated with RGE (group 3), a normal histological appearance of the testes was revealed and no cellular abnormality was detectable (Figure 3-C). In group 4 (CrO₃ + RGE), the testicular tissue did not show cellular transformation or cytonuclear abnormalities that could be induced by chromium oxide. The stages of spermatogenesis were present and visible. Spermatids and Sertoli cells displayed intact cell membranes and prominent nuclei with dense chromatin, preserved Lyedig cells (Figure 3-D).

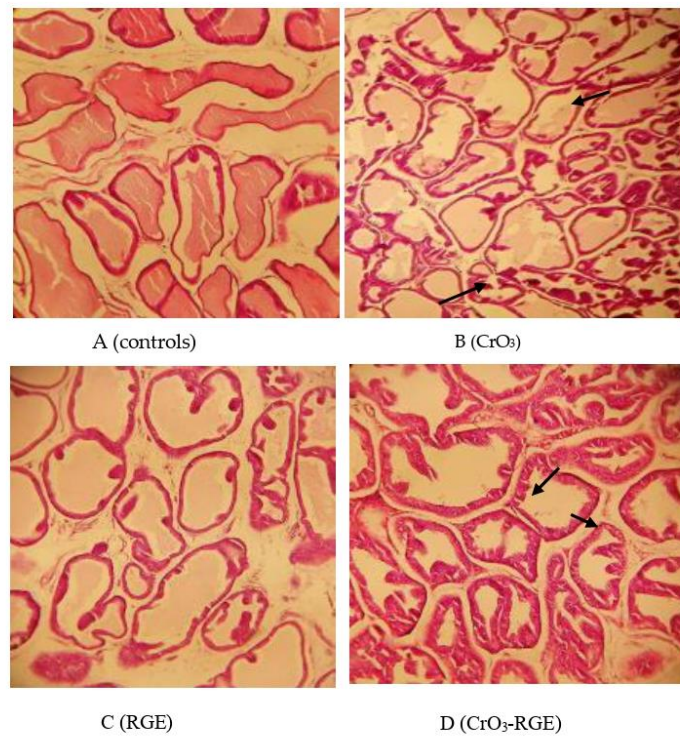


Figure 2. Microscopic examinations of the prostate glands were observed at magnifications $\times 10$. B (CrO₃): Lack of fiber-stroma tissue between acini (Arrows) and small epithelial cell layer and basal lamina not apparent as a result of CrO₃-treatment (Arrows); D (CrO₃+ RGE): Thick epithelial cell layer and recovery of the proliferation of tissue between prostate glands as a result of RGE-treatment (Arrows) (H&E; 10 \times).

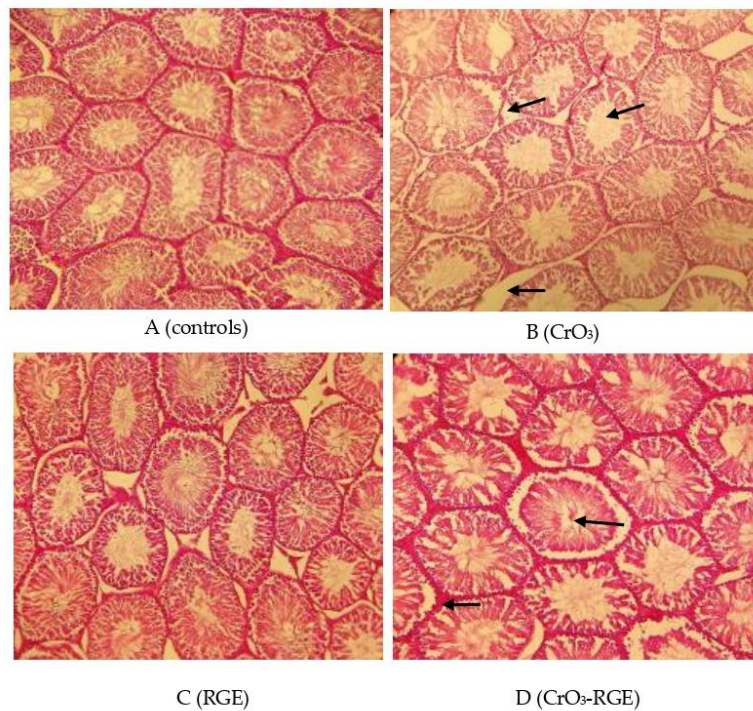


Figure 3. Microscopic examinations of the testicular tissue were observed at magnifications $\times 10$.

B (CrO₃): Loss of spermatids in the seminiferous tubules (Arrows) and No proliferation of connective tissue between seminiferous tubules as a result of CrO₃-treatment (Arrows); D (CrO₃ + RGE): Absence of anomalies and recovery of the proliferation of tissue between seminiferous tubules as a result of RGE-treatment (Arrows) (H&E; 10 \times).

By exploring the databases through the Science Direct and Springer websites or in the literature in general, it was noted a glaring lack of specific experimental studies about the relationship between the chromium trioxide toxicity CrO₃ and male reproductive system dysfunction. Several reasons can be put forward. It's possible that researchers simply haven't explored this specific question yet. Scientific research is broad, and researchers often focus on areas where there is increased interest or public concern.

Studies of the chromium trioxide effects on male reproductive function is a complex task that often requires long-term studies, epidemiological studies, or specific clinical trials. These studies can be expensive and require careful planning. It is possible that previous studies have not found a significant link between chromium and infertility, which could reduce researchers' interest in pursuing this line of research. Research on chromium can often focus on other aspects such as its role in carbohydrate metabolism (chromium picolinate for example), its effect on cardiovascular health, or its carcinogenic potential, thus shifting the focus away from fertility.

Chromium is also a potentially dangerous pollutant in the environment. Therefore, research can focus on its general toxic effects rather than specific effects on human fertility.

All these reasons prompted the authors of this article to make the exception and thus initiate their research work and focus much more on this axis which is the possible association of chromium trioxide toxicity with a male reproduction dysfunction or in another way seek to investigate the effects of a medicinal plant "*Zingiber officinale*" on the chromium toxicity (CrO_3) on the male reproductive organs, namely the prostate and the testicles.

Without exaggeration, this present study is possibly among the first studies that addressed the question of the link between chromium toxicity and male fertility in animals. Whatever the nature of the results obtained, it remains the first step in exploring this theme. This study was not limited only to this problem, on the contrary, it tried to experiment with a natural remedy while using a medicinal plant "*Zingiber officinale*" to prevent and treat the harmful effects resulting from chromium toxicity in an animal model. This study also suggested a variation in the serum concentrations of biological markers, namely PSA and testosterone, in animals exposed only to chromium trioxide (CrO_3) and also in animals that were previously exposed to CrO_3 and then treated with alcoholic extract of ginger rhizobium. This same study revealed a slight elevation in PSA and a significant increase in testosterone in rats (group 2) to which they ingested CrO_3 . Furthermore, the opposite effect occurred when rats were treated with the alcoholic extract of rhizobium ginger (RGE) after exposure to CrO_3 (group 4) in the same experimental conditions. Serum concentrations of these two markers did not increase (group 4) although the yield of the preparation of the RGE was not sufficient enough to lead to such results.

The toxicity of chromium trioxide is expressed much more by inhalation (pulmonary route) than by ingestion (oral route) and this could be explained by its chemical characteristic [23-25]. Soluble forms of chromium, such as hexavalent chromium (Cr^{6+}), can be created in certain biological environments due to reduction processes or other chemical interactions. Even hexavalent chromium (Cr^{6+}) is more soluble and potentially more toxic and carcinogenic [26]. Studies, in the form of surveys, have suggested that exposure to chromium and its derivatives constitute risk factors associated with prostate cancer, very widespread among farmers [27]. Occupational risks associated with woodworking, particularly those related to the use of wood preservatives [28]. These products, with fungicidal and insecticidal properties, can be preparations of various salts, containing arsenic compounds (arsenates, oxides), chromium compounds (alkaline dichromates), boron compounds (borate, boric acid, boracic complex), fluorine compounds (fluoride, fluoro-silicate, fluoro-borate), copper compounds (sulfate, copper oxide). The meta-analysis also found significant associations with other occupational risk factors such as exposure to chromium [29]. Chromium exposure and shift work are widespread among farmers [30].

In this study, rhizobium ginger extract (RGE), obtained with a yield of 31.5%, suggested a remedial (or chelating) effect towards the toxic particles of CrO_3 (in the male reproductive organs (prostate and testicles)).

Consumption of ginger helps fight the action of free radicals and prevent neurodegenerative diseases and prostate cancer [31,32]. Ginger rhizomes contain various chemical components (paradiol, gingerol, shogaol, and zingerone) allowing it to have numerous medicinal properties: treatment of nausea, vomiting, headaches, stimulation of the immune system, hypoglycemic effects, effects antioxidants, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, hepatoprotective and effects on the reproduction [33].