

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



UNIVERSITE  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biologie et Physiologie Animale

**Option :** Biologie et Physiologie de la Reproduction

## THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle LMD

**Présentée par :**

**Mlle : BENTAIBA Karima**

## THEME

**Effet d'une exposition aux métaux lourds sur la fonction  
de reproduction mâle chez le rat Wistar et l'impact d'un  
traitement avec *Withania frutescens***

Soutenu le : / /

Devant le jury :

<b>Président :</b> BENAKRICHE Ben Mehel	Pr.	Université de Mostaganem
<b>Examineur :</b> KAHLOULA Khaled	Pr.	Université de Saida
<b>Examinatrice :</b> MISSOUN Fatiha	Pr.	Université de Mostaganem
<b>Directrice de thèse :</b> BELHOCINE Mansouria	Pr.	Université de Mostaganem
<b>Co-directrice de thèse :</b> CHOUGRANI Fadela	Pr.	Université de Mostaganem
<b>Invité :</b> DAHOU Abdelkader El Amine	MCA.	Université de Mostaganem

**Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA)**

*Année universitaire : 2023/2024*

باسم الله الرحمان الرحيم

*Merci Allah de m'avoir donné la chance d'étudier et  
de suivre le chemin de la science.*

*Merci de m'avoir donné la patience d'aller jusqu'au  
bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le  
ciel et de dire.*

*"Ya Karim ya Rahim"*

## *Remerciements*

Mes sincères remerciements à notre Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (**UMAB**) qui m'a donnée la chance de réaliser ce projet de recherche doctorale et de m'avoir formée toutes ces années.

En premier lieu, mes sincères remerciements et ma profonde gratitude s'adressent à mon honorable et respectable directrice de thèse : **Pr. BELHOCINE Mansouria** sans oublier ma co-directrice de thèse : **Pr. CHOUGRANI Fadela** qui m'a fait l'honneur de m'encadrer et de suivre mon travail jusqu'au bout. Qu'elle soit remerciée pour ses encouragements, ses conseils judicieux, et également pour la confiance et la liberté de travail et de décision qu'elle m'a accordée tout au long de mon travail.

Mes sincères remerciements à notre directeur de laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA), **Dr. DAHOU Abdelkader El Amine**, qui m'a accueillie au sein de ce laboratoire et mis à ma disposition le matériel et les produits nécessaires à la réalisation et la réussite de cette recherche scientifique.

Mes remerciements vont également à **Pr. BENAKRICHE Ben Mehel** pour avoir accepté de présider le jury.

Nous sommes très honorées par la présence du **Pr. KAHLOULA Khaled** de l'Université Dr Moulay Tahar de Saida dans notre jury comme examinateur. Je vous adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté aimablement et sans hésitation notre invitation.

Mes remerciements vont aussi à la Professeure **MISSOUN Fatiha** du département de Biologie de la FSNV-UMAB pour avoir accepté de s'associer à notre jury pour contribuer à son enrichissement et l'amélioration de la qualité de ma thèse.

C'est avec un très grand plaisir que je présente mes sincères remerciements au **Pr. BOUOUDINA Mohamed**, Professeur au département de mathématiques et sciences, Université Prince Sultan, Riyadh, Arabie Saoudite. Un grand merci pour votre enrichissement de notre article et votre orientation. Vous avez été un exemple pour moi par votre modestie et votre rigueur au travail.

On ne saurait terminer sans remercier **Mme HAMED Djahira**. Tu étais, et tu es, toujours comme la mère attentionnée qui m'a embrassée et m'encouragée. Je ne saurai jamais oublier les jours qui nous ont réunis.

*Merci infiniment.*

## *Dédicace*

*On peut braver les difficultés pour atteindre un  
objectif précis.*

*Papa, Mama, votre présence m'a fait oublier  
toutes les difficultés.*

*Soyez juste avec moi et je n'ai besoin de rien  
d'autre.*

*Dieu vous bénisse pour moi*

*Karima*

## ملخص

يعتبر الكادميوم والرصاص من الملوثات البيئية الناتجة عن الصناعة والتي تم التأكد من اثارها الضارة على خصوبة الذكور. يمثل طب الاعشاب حاليا الحل البديل للطب الحديث المكلف والمرتبط بآثار جانبية سلبية.

تهدف هذه الدراسة الى البحث عن التأثير العلاجي ل *Withania frutescens* على تدهور وظيفة التكاثر عند الذكور في جرذان الويستر التي تعرضت الي التسمم بالرصاص والكادميوم لمدة 3 أشهر. تتناول الدراسة أيضًا التحليل الكيميائي النباتي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات لهذا النبات. أعطى المستخلص الهيدروإيثانولي لجذور *W. frutescens* مردود قدره 15.79% وكمية من متعددات الفينول والفلافونويدات والعفص بقيمة  $3.82 \pm 63.23$  ملغ مكافئ حمض الغاليك / غ من المستخلص، و  $0.12 \pm 1.56$  ملغ مكافئ الكرسيتين/ غ من المستخلص، و  $0.23 \pm 2.57$  ملغ مكافئ الكاتشين/ غ من المستخلص، على التوالي. من خلال استخدام GC-MS و GC-MS/MS كشف التحليل الكيميائي النباتي عن وجود 10 مكونات و36 مكونًا على التوالي والتي لها أنشطة بيولوجية مختلفة. اظهر المستخلص فعالية كبيرة مضادة للجذور الحرة ( $IC_{50} = 1.21 \pm 5.16$  ميكروجرام / مل) وقدرة إرجاعيه للحديد معتدلة ( $IC_{50} = 6.01 \pm 163.19$  ميكروجرام / مل). كما وجد ان له تأثيرا قويا مضادا للالتهابات ويتضح ذلك من خلال تثبيط انحلال الدم ( $IC_{50} = 1.06 \pm 12.71$  ميكروجرام/مل) وتثبيط تفكك البروتين ( $IC_{50} = 1.23 \pm 6.8$  ميكروجرام/مل). أظهرت الجرذان المعرضة للرصاص (1 غ/لتر) والكادميوم (10 مغ/لتر) في مياه الشرب تغيرات نسيجية في الخصيتين والبربخ، بما في ذلك تدهور النسيج الطلائي الجنسي، تشكل فجوات في خلايا Sertoli، انخفاض عدد خلايا Leydig، انخفاض كثافة الحيوانات المنوية، موت الخلايا المبرمج، وظهور خلايا عملاقة متعددة النوى. علاوة على ذلك، لوحظت تشوهات في الحيوانات المنوية والمعايير المورفولوجية، فضلاً عن انخفاض مستويات هرمون التستوستيرون في الدم. ومع ذلك، فإن إعطاء المستخلص بجرعة 200 مغ/كغ أدى إلى استعادة وتسوية تركيز هرمون التستوستيرون في الدم وكثافة الحيوانات المنوية والآفات النسيجية والمعايير المورفولوجية. تجدر الإشارة إلى أنه بجرعة 400 مغ/كغ، كان للمستخلص تأثير مثبت على بعض العوامل. تؤكد هذه النتائج على الإمكانيات المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات لـ *W. frutescens* نظرًا لوفرة المركبات النشطة بيولوجيًا، والتي، عند تناولها بجرعات منخفضة، يمكن أن يكون لها تأثير مفيد كبير على تكوين الحيوانات المنوية وتكوين الستيرويد. لذلك، قد يوصى بهذا النبات لعلاج اضطرابات خصوبة الذكور التي تسببها المعادن الثقيلة. علاوة على ذلك، يمكن استخدام المستخلص في التطبيقات الصيدلانية والطبية.

**الكلمات المفتاحية:** الرصاص، الكادميوم، *Withania frutescens*، الخصية، البربخ، الحيوانات المنوية، التستوستيرون، نشاط مضادات الأكسدة، نشاط مضادات الالتهاب.

## Résumé

Le cadmium et le plomb sont des contaminants environnementaux résultants de l'industrie dont les conséquences néfastes sur la fertilité masculine sont avérées. Actuellement, la phytothérapie constitue une alternative à la médecine conventionnelle coûteuse et associée à des effets indésirables variés.

L'objectif de cette étude est de prospecter les effets thérapeutiques de *Withania frutescens* sur les détériorations de la fonction masculin du rat Wistar intoxiqué aux plomb et cadmium pendant 3 mois. L'étude phytochimique et l'évaluation des activités antioxydante et antiinflammatoire *in vitro* de la plante ont été aussi abordées. L'extrait hydro-éthanolique des racines de *W. frutescens* a donné un rendement d'extraction de 15,79% et des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés de  $63,23 \pm 3,82$  mg EAG/g d'extrait,  $1,56 \pm 0,12$  mg EQ/g d'extrait, et  $2,57 \pm 0,23$  mg EC/g d'extrait respectivement. L'analyse phytochimique a identifié 10 composants par GC-MS et 36 composants par GC-MS/MS doués de diverses activités biologiques. L'extrait exprime une activité antiradicalaire importante ( $IC_{50} = 25.16 \pm 1.21$  µg/ml) et un pouvoir réducteur du fer modéré ( $IC_{50} = 163.19 \pm 6.01$  µg/ml). Un effet anti-inflammatoire puissant a été déterminé par l'inhibition de l'hémolyse ( $IC_{50} = 12,71 \pm 1,06$  µg/mL) et par l'inhibition de la dénaturation des protéines ( $IC_{50} = 6,8 \pm 1,23$  µg/mL). Des altérations histologiques testiculaires et épидидymaires (dégénérescence de l'épithélium germinal, vacuolisation des cellules de Sertoli, réduction de la taille et du nombre des cellules de Leydig, diminution de la densité spermatique, apoptose et apparition de cellules géantes multinucléées), des anomalies des paramètres spermatiques et morphométriques et une chute significative du taux de testostérone sérique, ont été notées chez les rats intoxiqués au Pb (1g/L) et au Cd (10mg/L) dans l'eau de boisson. Tous ces paramètres altérés ont été rétablis et normalisés par cet extrait à la dose de 200mg/kg. En revanche, à la dose de 400mg/kg l'extrait a eu un impact inhibiteur sur ces paramètres. Ces résultats révèlent les potentiels antioxydant et antiinflammatoire de *W. frutescens* dus à sa richesse en composés bioactifs, qui auraient eu à faible dose un impact bénéfique efficacement sur la spermatogenèse et la stéroïdogenèse. Cette plante pourrait être recommandée contre les troubles de la fertilité masculine engendrés par les métaux lourds. De plus, cet extrait peut être potentiellement utilisé dans des applications pharmaceutiques et médicinales.

**Mots clés :** Plomb, Cadmium, *Withania frutescens*, Testicule, Epididyme, Spermatogenèse, Testostérone, Activité antioxydante, Activité antiinflammatoire.

## Abstract

Cadmium and lead are environmental contaminants resulting from industry whose harmful consequences on male fertility are proven. Currently, phytotherapy constitutes an alternative to conventional medicine, which is expensive and associated with various adverse effects.

The objective of this study is to explore the therapeutic effects of *Withania frutescens*, on the deterioration of masculine function in Wistar rats poisoned with lead and cadmium for 3 months. The phytochemical study and the evaluation of the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant were also addressed. The *W. frutescens* hydro-ethanolic roots extract gave an extraction yield of 15.79% and contents of polyphenols, flavonoids and condensed tannins of  $63.23 \pm 3.82$  mg EAG/g of extract,  $1.56 \pm 0.12$  mg EQ/g of extract, and  $2.57 \pm 0.23$  mg EC/g of extract, respectively. Phytochemical analysis identified 10 components by GC-MS and 36 components by GC-MS/MS endowed with various biological activities. The extract expresses significant anti-radical activity ( $25.16 \pm 1.21$   $\mu\text{g/ml}$ ) and moderate iron reducing power ( $163.19 \pm 6.01$   $\mu\text{g/ml}$ ). A high anti-inflammatory capacity was determined by hemolysis inhibition ( $\text{IC}_{50} = 12.71 \pm 1.06$   $\mu\text{g/mL}$ ) and protein denaturation inhibition ( $\text{IC}_{50} = 6.8 \pm 1.23$   $\mu\text{g/mL}$ ). Testis and epididymis histological alterations (degeneration of the germinal epithelium, vacuolization of Sertoli cells, Leydig cells number reduction, sperm density decrease, apoptosis and multinucleated giant cells appearance), abnormalities in sperm and morphometrically parameters, and a reduction in serum testosterone levels, were noted in intoxicated rats with Pb (1g/L) and Cd (10mg/L) in drinking water. All these disorders have been repaired and normalized by the extract at dose of 200mg/kg. However, at dose of 400 mg/kg the extract had an inhibitory impact on these parameters. These results reveal the antioxidant and anti-inflammatory potential of *W. frutescens* due to its richness in bioactive compounds, which at low doses would have had an effective beneficial impact on spermatogenesis and steroidogenesis. This plant could be recommended against male fertility disorders caused by heavy metals. Additionally, this extract can be potentially used in pharmaceutical and medicinal applications.

**Keywords:** Lead, Cadmium, *Withania frutescens*, Testis, Epididymis, Spermatogenesis, Testosterone, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity.

## Tables des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

**Introduction** .....1

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre I: Fonction de reproduction masculine

1	Anatomophysiologie de l'appareil reproducteur mâle	4
1.1	Les testicules	4
1.1.1	Tube séminifère et fonction exocrine	5
1.1.1.1	Cellules de Sertoli	5
1.1.1.2	Cellules germinales	5
1.1.1.3	Spermatogenèse	6
1.1.2	Tissu interstitiel et fonction endocrine	7
1.1.2.1	Cellules myoïdes péritubulaires	7
1.1.2.2	Cellules de Leydig	7
1.1.2.3	Stéroïdogenèse	8
1.2	Voies génitales	9
1.2.1	Canaux efférents	9
1.2.2	Epididyme	10
1.2.3	Canaux déférents	11
1.3	Glandes annexes	12
1.3.1	Vésicule séminale	12
1.3.2	Glande de Cowper	12

1.3.3	Prostate .....	12
2	Régulation de la fonction de reproduction.....	13
3	Troubles de la fonction de reproduction masculine .....	15
3.1	Infertilité masculine.....	15
3.2	Causes de l'infertilité masculine .....	15

## **Chapitre II : Métaux lourds et infertilité masculine**

1	Généralité.....	17
2	Propriétés physico-chimiques des métaux lourds .....	17
3	Sources d'exposition aux métaux lourds.....	19
4	Métabolisme des métaux lourds.....	20
4.1	Absorption .....	20
4.2	Distribution .....	21
4.3	Métabolisme et excrétion.....	22
5	Métaux lourds et stress oxydatif .....	22

## **Chapitre III : Plantes médicinales et métabolites secondaires**

1	Sources de molécules naturelles bioactives .....	24
2	Métabolites secondaires .....	24
2.1	Terpènes.....	25
2.2	Alcaloïdes .....	25
2.3	Composés phénoliques .....	26
3	Monographie de la <i>Withania frutescens</i> comme source de molécules bioactives.....	26
3.1	Systématique de <i>Withania frutescens</i> .....	26
3.2	Distribution botanique .....	27
3.3	Répartition géographique.....	27
3.4	Composés chimiques .....	27
3.5	Intérêt et utilisations .....	28

## **Matériels et méthodes**

1	Matériels .....	29
1.1	Matériel végétal.....	29
1.2	Matériel animal .....	29
2	Méthodologie .....	30
2.1	Séchage et préparation du matériel végétal .....	30
2.2	Préparation de l'extrait brut .....	30
2.3	Calcul du rendement d'extraction .....	31
2.4	Étude phytochimique.....	31
2.4.1	Dosage des composés phénoliques .....	31
2.4.1.1	Dosage des polyphénols totaux .....	32
2.4.1.2	Dosage des flavonoïdes.....	33
2.4.1.3	Dosage des tanins condensés.....	33
2.4.2	Analyse phytochimique de <i>Withania frutescens</i> par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	34
2.4.3	Analyse phytochimique de <i>Withania frutescens</i> par GC-MS/MS .....	34
2.5	Évaluation des activités biologiques .....	35
2.5.1	Détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	35
2.5.1.1	Test de DPPH .....	35
2.5.1.2	Test de FRAP .....	36
2.5.2	Détermination de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	37
2.5.2.1	Test d'inhibition de l'hémolyse.....	37
2.5.2.2	Test d'inhibition de la dénaturation des protéines.....	38
2.6	Traitement des animaux.....	39
2.6.1	Répartition des animaux .....	39
2.6.2	Prélèvement du sang et sacrifice des rats .....	40
2.6.3	Évolution du poids corporel et du poids relatif des organes.....	41
2.7	Dosage hormonal.....	41
2.8	Evaluation de la concentration en spermatozoïdes .....	41

2.9	Étude histologique.....	42
2.9.1	Fixation.....	42
2.9.2	Déshydratation, éclaircissement et imprégnation en paraffine .....	43
2.9.3	Inclusion en paraffine .....	43
2.9.4	Coupe et étalement .....	44
2.9.5	Coloration et montage des lames .....	45
2.9.6	Observation des lames au microscope.....	46
2.10	Étude histo-morphométrique des paramètres testiculaires .....	46
2.11	Étude statistique .....	47
2.12.	Note éthique.....	47

### **Résultats et discussion**

1	Rendement d'extraction.....	48
2	Teneur en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tanins).....	49
3	Identification phytochimique des phyto-constituants de l'extrait éthanolique de racines de <i>W. frutescens</i> par GC-MS. ....	52
4	Identification phytochimique des phyto-constituants de l'extrait éthanolique des racines de <i>W. frutescens</i> par GC-MS/MS .....	54
5	Evaluation des activités biologiques .....	57
6	Evolution du poids corporel et du poids relatif des organes.....	60
7	Dosage hormonal.....	64
8	Détermination des paramètres spermatiques .....	69
9	Résultats histopathologiques.....	72
9.1.	Histologie du testicule.....	72
9.2.	Résultats morphométriques des paramètres testiculaires .....	80
9.3.	Histologie de l'épididyme.....	82

### **Conclusion et perspectives**

Références Bibliographiques

Annexes

Travaux scientifiques

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Propriétés physico-chimiques du plomb et du cadmium.	18
<b>Tableau 02</b> : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés dans l'extrait hydro-éthanolique de racines de <i>W. frutescens</i>	49
<b>Tableau 03</b> : Composants phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique de racines de <i>W. frutescens</i> par GC-MS.	53
<b>Tableau 04</b> : Composants phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique de racines de <i>W. frutescens</i> par GC-MS/MS.	55
<b>Tableau 05</b> : Activités antioxydante et anti-inflammatoire in vitro de l'extrait éthanolique de racines de <i>W. frutescens</i>	57
<b>Tableau 06</b> : Poids finaux, corporel, absolu des organes et relatif des organes.	62
<b>Tableau 07</b> : Indice de différenciation tubulaire (TDI) et indice de spermiogénèse (SPI) dans les différents groupes.	81

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Organisation structurale du testicule	4
<b>Figure 02</b> : Illustration schématique de la spermatogenèse.	7
<b>Figure 03</b> : Voies de biosynthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig	9
<b>Figure 04</b> : Les différentes régions de l'épididyme.	10
<b>Figure 05</b> : Régulation de la fonction de reproduction chez le mâle	14
<b>Figure 06</b> : Carte mondiale contenant les pourcentages de cas d'infertilité par région dus au facteur masculin	15
<b>Figure 07</b> : Causes de l'infertilité masculine	16
<b>Figure 08</b> : Mécanismes d'intoxication chez l'homme suite à une exposition aux métaux lourds.	20
<b>Figure 09</b> : La forme biologique de la plante <i>Withania frutescens</i>	27
<b>Figure 10</b> : Carte géographique de la zone de collecte de <i>Withania frutescens</i> .	29
<b>Figure 11</b> : Echantillonnage et séchage de <i>Withania. Frutescens</i> .	30
<b>Figure 12</b> : Filtration sous vide et évaporation du solvant d'extraction de l'extrait éthanolique de <i>Withania frutescens</i> .	31
<b>Figure 13</b> : Gavage des rats avec l'extrait de racines de <i>Withania. Frutescens</i> .	40
<b>Figure 14</b> : Prélèvement du sang et des organes reproducteurs.	41
<b>Figure 15</b> : Prélèvement du sperme.	42
<b>Figure 16</b> : Fixation histologiques des échantillons dans le formol à 10%.	43
<b>Figure 17</b> : Inclusion des échantillons dans la paraffine.	44
<b>Figure 18</b> : Coupe des blocs de paraffine à l'aide d'un microtome.	44
<b>Figure 19</b> : Détermination des indices de spermatogenèse (TDI) et de spermiogenèse (SPI).	46
<b>Figure 20</b> : Evolution du poids corporel des animaux.	61
<b>Figure 21</b> : Taux de testostérone sérique dans les différents groupes.	64
<b>Figure 22</b> : Nombre de spermatozoïdes dans les différents groupes.	70
<b>Figure 23</b> : Coupes histologiques des testicules chez le groupe témoin, le groupe traité avec le Pb et le groupe traité avec le Cd.	73
<b>Figure 24</b> : Coupes histologiques des testicules chez le groupe traité avec le Plomb.	74

- Figure 25 :** Coupes histologiques des testicules chez le groupe traité avec le Pb + 200 mg/kg de *W. frutescens*, le groupe traité avec le Cd + 200 mg/kg de *W. frutescens* et le groupe traité avec 200 mg/kg de *W. frutescens* seul. 77
- Figure 26 :** Coupes histologiques des testicules chez le groupe traité avec le Pb + 400 mg/kg de *W. frutescens*, le groupe traité avec le Cd + 400 mg/kg de *W. frutescens* et le groupe traité avec 400 mg/kg de *W. frutescens* seul. 79
- Figure 27 :** Coupes histologiques de l'épididyme distal chez le groupe témoin, les groupes traités avec le Pb et le Cd, les groupes co-traités avec les Pb/Cd + *W. frutescens* et les groupes traités avec *W. frutescens* seul (200mg et 400mg). 83

## Liste d'abréviation

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase

**ABP:** Androgen Binding Protein.

**ABTS:** 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic *acid*)

**AP :** Acides Phénoliques

**ATP :** Adénosine Triphosphate

**BHT :** Butylhydroxytoluène

**BHT :** Barrière Hémato-Testiculaire

**BSA :** Bovine Serum Albumin

**CCl<sub>4</sub> :** Tétrachlorure de carbone

**Cd :** Cadmium

**Cd-Cl<sub>2</sub> :** Chlorure de cadmium

**COX-2:** Cyclooxygénase 2

**CYP17A1:** Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1

**DDMP:** 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl, 4H-Pyran-4-one

**DMT1 :** Divalent Metal Transporter 1

**DPPH :** 2,2-diphényl 1-pyrrilhydrazyle

**EAG :** Equivalent d'Acide Gallique

**EAT :** Equivalent d'Acide Tannique

**EC :** Equivalent de Catéchine

**EC<sub>50</sub> :** Concentration Efficace Médiane

**EQ :** Equivalent de Quercétine

**ER :** Equivalent de Rutine

**ERO :** Espèces Réactives d'Oxygène

**ERWF** : l'extrait de racines de *Withania frutescens*

**ET**: Endothélines

**FRAP**: Ferric reducing antioxidant power

**FSH**: Follicle Stimulating Hormone

**FT**: Flavonoïdes Totaux.

**GC-MS/MS**: Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

**GC-MS**: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

**GPX**: Glutathion Peroxydase

**GSH**: Glutathion

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**HB**: Hémoglobine

**HPLC**: High Performance Liquid Chromatography

**IC<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice Médiane

**IL10** : Interleukine 10

**IL-1 $\beta$**  : Interleukine 1 $\beta$

**IL-6** : Interleukine 6

**iNOS** : Inducible Nitric Oxide Synthase

**IP** : Injection Intrapéritonéale

**LDH**: Lactate Déshydrogénase

**LH**: Luteinizing Hormone

**MDA**: Malondialdehyde

**MDH**: Malate dehydrogenase

**MT** : Métallothionéine

**NF $\kappa$ B** : Nuclear Factor-kappa B

**NIST** : Institut National des Standards et Technologies

**NO** : Nitric Oxide

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ONAB** : Office National des Aliments du Bétail

**Pb**: Plomb

**Pb-Ac**: Plomb acetate

**p-IKK $\beta$** : Phosphor- Inhibitory Kappa B kinase  $\beta$ .

**PT** : Polyphénols Totaux.

**REL** : Réticulum Endoplasmique Lisse

**RWA** : Racines de *Withania aristata*

**SNC** : Système Nerveux Central

**SOD**: *Superoxide Dismutase*

**SPI**: Spermiogenesis Index

**SPZ**: Spermatozoïdes

**StAR**: Steroidogenesis Acute Regulatory protein.

**TC**: Tanins Condensés.

**TDI**: Tubule Differentiation Index

**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor

**TS** : Tubes Séminifères

# ***Introduction***

## *Introduction*

Les changements apportés par l'homme à l'environnement perturbent les écosystèmes en modifiant le niveau d'exposition de l'homme à divers polluants qui peuvent présenter un risque important pour leur santé. Parmi ces polluants, l'exposition aux métaux figure en tête de liste en raison du développement rapide des industries modernes. Les effets néfastes de ces derniers sur la santé reproductive masculine ont beaucoup attiré l'attention depuis quelques décennies, on s'inquiète de plus en plus de la possible détérioration de la fertilité masculine (**Rahman et al., 2022; Sengupta et al., 2017**). Certains métaux sont connus pour être bénéfiques aux fonctions de reproduction chez l'homme, car ils interviennent dans plusieurs processus de reproduction, tandis que l'exposition environnementale ou professionnelle à d'autres métaux est reconnue pour perturber la fertilité masculine (**Sengupta, 2013**). De nombreuses études ont été menées de manière approfondie concernant l'augmentation de l'infertilité masculine qui pourrait résulter de l'exposition directe ou indirecte aux métaux lourds (**Ajarem et al., 2021; Chabchoub et al., 2021; Crocetto et al., 2023; Elgawish et Abdelrazek, 2014**). Du point de vue scientifique, les métaux lourds sont définis comme des éléments inorganiques de nature non biodégradable dont la densité est supérieure à  $5\text{g/cm}^3$  (**Kim et al., 2019**). Leur persistance à long terme dans l'environnement entraîne une contamination à différents niveaux notamment l'air, le sol, les aliments et l'eau.

Le plomb et le cadmium sont les deux métaux toxiques les plus abondants dans l'environnement (**Patra et al., 2011**) et sont aussi des perturbateurs endocriniens (**Plunk et Richards, 2020**). L'utilisation du plomb (Pb) dans les pesticides, les batteries, les pigments, les céramiques, les conduits d'eau, les alliages, les gaines de câbles et les additifs pour l'essence a entraîné la pénétration de grandes quantités de ce métal dans l'environnement et qui s'est retrouvé par la suite dans les aliments, l'eau et l'air (**Daku et al., 2016; Kadhum, 2019; Peana et al., 2023; Ramah et al., 2015**). En outre, l'exposition au cadmium (Cd) se produit principalement par le tabagisme et la consommation d'aliments contaminés notamment les poisson, les végétaux riches en fibres comme les grains, les céréales et les légumes à feuilles (**Godt et al., 2006**).

Le principal effet toxique de ces métaux est l'induction du stress oxydatif via la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Ilieva et Sainova, 2022; Manouchehri et al., 2022**). Ces espèces perturbent la structure et la fonction du système reproducteur masculin en altérant la barrière hémato-testiculaire et diminuant le développement des cellules germinales, des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli, et entraînent à la fin une infertilité (**Cheng et Mruk, 2012; Garu et al., 2011; Ghafouri-Fard et al., 2021; Man et al., 2023**).

## *Introduction*

Au cours des dernières décennies, les antioxydants de synthèse sont devenus moins efficaces contre certaines pathologies, c'est pourquoi de nombreux chercheurs ont encouragé le criblage des plantes médicinales pour la recherche des antioxydants bioactifs à haute valeur et le développement de médicaments puissants d'origine naturelle afin de réduire la toxicité de ces polluants (**Boroujeni et al., 2022; Moure et al., 2001; Liu et al., 2023**).

*Withania frutescens* (*W. frutescens* L. Pauquy) est une plante sauvage à petites feuilles coriaces appartenant à la famille des Solanacées, qui est largement distribuée dans la région méditerranéenne (**Raman et Chand, 2019**). Auparavant, elle était utilisée dans la médecine traditionnelle contre l'empoisonnement, l'ulcération gastrique et le traitement de la dysenterie (**Bellakhdar, 1997**). Aujourd'hui, il a été démontré que cette plante présente un profil des activités biologiques intéressant, notamment des activités antibactérienne, antifongique, antioxydante, antidiabétique et antiplasmodique (**EL Bouzidi et al., 2017; EL Moussaoui et al., 2022; Mechchate et al., 2021**). En outre, les extraits de ses feuilles ont une action protectrice et curative contre l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) (**Montilla et al., 1990**) et une activité cytotoxique contre HepG2 (carcinome hépatocellulaire) et HT29 (adénocarcinome du côlon) grâce à ses composants withanolides (**EL Bouzidi et al., 2013**).

Aucune étude n'a été accomplie sur les vertus thérapeutiques de cette plante sur le système reproducteur masculin et les troubles de la fertilité. Ce travail a donc été entrepris pour la première fois dans le but d'évaluer les effets bénéfiques de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* sur les détériorations testiculaires et hormonales induites par le plomb et le cadmium.

C'est pourquoi une partie de notre travail « Effets d'une exposition aux métaux lourds sur la fonction de reproduction mâle chez le rat Wistar et impact d'un traitement avec la *Withania frutescens* » vise à évaluer les effets toxiques de ces deux métaux lourds administrés par voie orale, sur la fonction de reproduction masculine chez les rats Wistar adulte à travers les paramètres sérologiques, spermatiques, histologiques et morphométriques.

En plus, une partie importante et complémentaire de notre travail a été basée sur cette hypothèse, la médecine alternative, en utilisant des antioxydants d'origine naturelle pour détoxifier les dommages occasionnés par ces métaux lourds. Pour cela, on a choisi la *Withania frutescens* comme une source d'antioxydants naturels pour tester leurs effets thérapeutiques possibles contre les altérations induites par le Pb et le Cd sur le système reproducteur masculin chez le rat Wistar.

La présente étude englobe trois parties :

## ***Introduction***

- \* Une étude phytochimique qualitative et quantitative qui a consisté à dresser un screening phytochimique de l'extrait éthanolique de racines de *Withania frutescens*, qui nous a indiqué les différents phyto-constituants connus comme étant biologiquement actifs, suivi de dosages colorimétriques (spectrophotométrique) de ces composés bioactifs avec des méthodes classiques, la GC-MS et GC-MS/MS (identification des composants volatils).
- \* Une étude *in vitro* des activités biologiques de cet extrait, l'activité antioxydante avec les tests DPPH et FRAP, l'activité anti-inflammatoire avec le test d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges et le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA).
- \* Une étude *in vivo* sur le rat Wistar intoxiqués avec le plomb et le cadmium et traités avec l'extrait éthanolique de racines de *Withania frutescens*. Ont été analysés, l'histopathologie testiculaire et épидидymaire, la spermatogenèse, les cellules de Leydig et la testostéronémie plasmatique, les paramètres spermatiques, les variations pondérales corporelles et testiculaires et la morphométrie (indices de différenciation tubulaire (TDI) et de spermiogénèse (SPI)).

# *Synthèse Bibliographique*

---

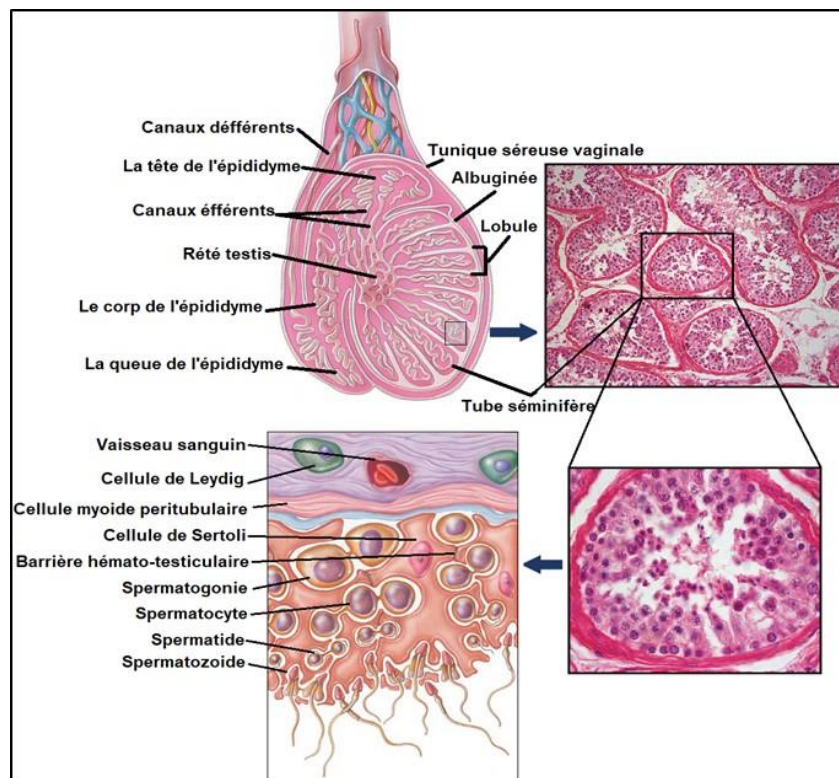
## Chapitre I : Fonction de reproduction masculine

### 1 Anatomophysiologie de l'appareil reproducteur mâle

Le système reproducteur mâle est l'ensemble des organes qui jouent un rôle dans le processus de reproduction. Le système reproducteur masculin est subdivisé en trois parties : les gonades (testicules) qui sont le site de production des gamètes mâle, les voies génitales qui transportent ces gamètes et interviennent dans leur maturation et les glandes annexes.

#### 1.1 Testicules

Les testicules sont des organes pairs logés chacun dans une cavité cutané scrotale (**Steger et Weidner, 2011**) et recouverts de deux tuniques : la séreuse vaginale externe et l'albuginée (**Fig. 01**). Dans le parenchyme testiculaire, les projections de l'albuginée forment des cloisons qui divisent les testicules en lobules renfermant 1 à 4 tubes séminifères contournés (**Carlson, 2019; Knoblauch et al., 2018**). Ces tubes s'assemblent en un tube droit qui converge vers le rete-testis (**Mollineau et al., 2018**).



**Figure 01** : Organisation structurale du testicule (**Tortora et Derrickson, 2014**).

### **1.1.1 Tube séminifère et fonction exocrine**

Les tubes séminifères (TS) sont composés de deux type de cellules : les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

#### **1.1.1.1 Cellules de Sertoli**

La cellule de Sertoli s'étend de la lame basale des TS vers la lumière de ces tubules. L'organisation et la polarité de ces cellules se traduit par des jonctions Sertoli-Sertoli et Sertoli-cellules germinales à différents stades de différenciation, ainsi que les jonctions Sertoli-matrice extracellulaire au niveau de la paroi des tubules séminifères. Les jonctions réunissant les cellules de Sertoli adjacentes sont des jonctions serrées (étanches ou tight junctions) et forment la barrière hémato-testiculaire (BHT). Cette dernière divise les tubes séminifères en deux compartiments, le compartiment basal comprend les cellules germinales diploïdes, spermatogonies et spermatocytes I avant la méiose (stade pré-leptotène) et le compartiment apical (adluminal) qui contient les spermatocytes I en division méiotique, et toutes les cellules haploïdes (spermatocyte stade leptotène, spermatocytes II, spermatides et spermatozoïdes). A l'extérieur de la BHT, dans la zone basale, les nutriments et les hormones ont un libre accès alors que dans la zone adluminale du tube séminifère, la BHT est perméable sélectivement et exerce un contrôle rigoureux au passage de tous les éléments y compris les xénobiotiques. De plus, la BHT constitue une barrière immunologique en raison de la présence des cellules haploïdes qui présentent des caractéristiques antigéniques et doivent être séparées de l'organisme (**Cheng et Mruk, 2012; Mruk et Cheng, 2015**). Les cellules de Sertoli ont plusieurs rôles cruciaux dans la fonction testiculaire tel que : support physique et apport des nutriments et des facteurs de croissance pour les cellules germinales ; libération des spermatides vers la lumière tubulaire lors de la spermiation ; sécrétion du liquide tubulaire, qui constitue un microenvironnement unique favorable à la spermatogenèse ; phagocytose du cytoplasme des spermatides (le corps résiduel) ; et phagocytose de cellules germinales apoptotiques (**Jeégou et Rolland, 2018**). De plus, en raison de la présence de récepteurs de FSH, des androgènes, des œstrogènes et des hormones thyroïdiennes, les cellules de Sertoli participent à la régulation hormonale de la spermatogenèse (**Hess, 2005; Luaces et al., 2023**).

#### **1.1.1.2 Cellules germinales**

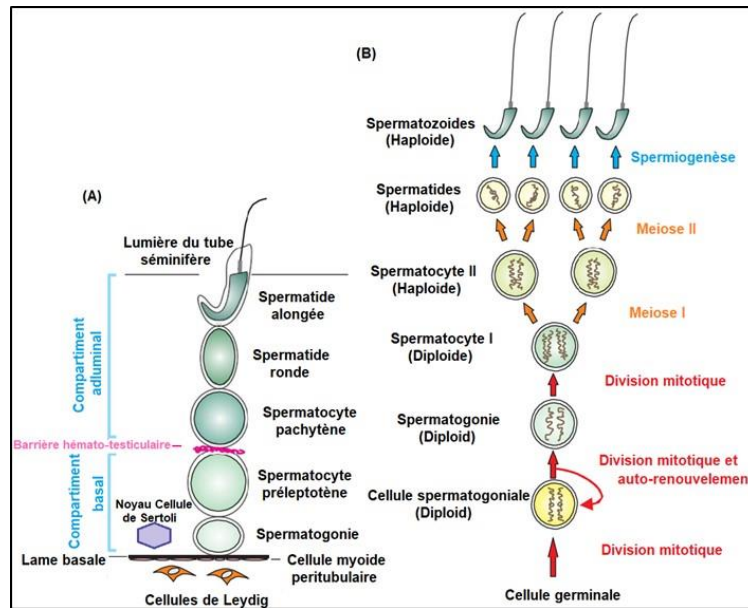
Entre les cellules de Sertoli, on trouve les cellules germinales à différent stade de développement qui sont organisées selon leurs stades de différenciation, du pole basal au pôle

apical des tubes séminifères, on distingue : Les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes (Auger, 2018; Nayernia *et al.*, 2004).

### 1.1.1.3 Spermatogenèse

La spermatogenèse (Fig.02), est un processus hautement organisé qui se produit dans l'épithélium séminifère et est orchestré par les cellules de Sertoli (Griswold, 2015; Kopera *et al.*, 2010). C'est un processus physiologique complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose qui à partir des spermatogonies, cellules germinales souches diploïdes, aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes (Creasy et Chapin, 2018; Lara *et al.*, 2018). Basé principalement sur des critères morphologiques et fonctionnels, ce processus a été classiquement divisé en trois phases bien caractérisées :

- **Phase prolifératif** : Cette étape est responsable du maintien du stock et réserve des spermatogonies souches afin d'assurer la production continue de spermatozoïdes chez les mammifères. La spermatogonie souche ou spermatogonie Ad (dark) subit une division mitotique et engendre deux cellules filles : une nouvelle spermatogonie de type Ad et une spermatogonie de type Ap (pale). La spermatogonie Ad reste près de la lame basale pour conserver la lignée germinale, alors que la spermatogonie Ap s'engage dans la différenciation germinale et donne une spermatogonie B. Cette dernière se transforme sans mitose en un spermatocyte I (Waqas, 2021).
- **Phase méiotique** : Chaque spermatocyte I subit une méiose I pour former deux cellules haploïdes, les spermatocyte II qui entrent rapidement en méiose II pour donner quatre spermatides rondes (Waqas, 2021).
- **Phase de différenciation (spermiogénèse)** : C'est un long processus au cours duquel les spermatides rondes et haploïdes subissent des changements morphologiques et fonctionnels frappants pour se transformer en spermatozoïdes. Au cours de cette phase, on peut observer: la formation de nouveaux organites, y compris le chromatide, corps composé d'ARN ; le compactage de la chromatine nucléaire et remplacement des histones en protamines ; la formation de l'acrosome par l'appareil de Golgi ; la formation du flagelle; le développement des spécialisations ectoplasmiques et des complexes tubulobulbaires à l'interface entre les cellules de Sertoli ; l'allongement des spermatides rondes en spermatides allongés; l'élimination du cytoplasme par les spermatides (corps résiduel); et la libération des spermatozoïdes de l'épithélium séminifère (spermiation) (O'Donnell et Stanton, 2018).



**Figure 02 :** Illustration schématique de la spermatogénèse. (A) Schéma d'un tube séminifère avec les différentes cellules germinales. (B) schéma illustrant les différentes étapes de la spermatogénèse (Cheng et Mruk, 2017).

### 1.1.2 Tissu interstitiel et fonction endocrine

L'espace interstitiel ou compartiment intertubulaire entre les TS est constitué essentiellement de tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les fibroblastes, on y trouve aussi les leucocytes, les mastocytes, les macrophages, les cellules myoïdes périvitubulaires et les cellules de Leydig (Heinrich et DeFalco, 2020).

#### 1.1.2.1 Cellules myoïdes périvitubulaires

Ce sont des cellules musculaires lisses qui entourent les TS. Elles possèdent la capacité de se contracter pour transporter les spermatozoïdes immobiles. Les cellules myoïdes périvitubulaires expriment les récepteurs des facteurs de croissance qui se lient aux endothélines (ET), à la vasopressine et au facteur de croissance bêta dérivé des plaquettes (PDGFb), conduisant à la contractilité du TS (Thompson *et al.*, 2018).

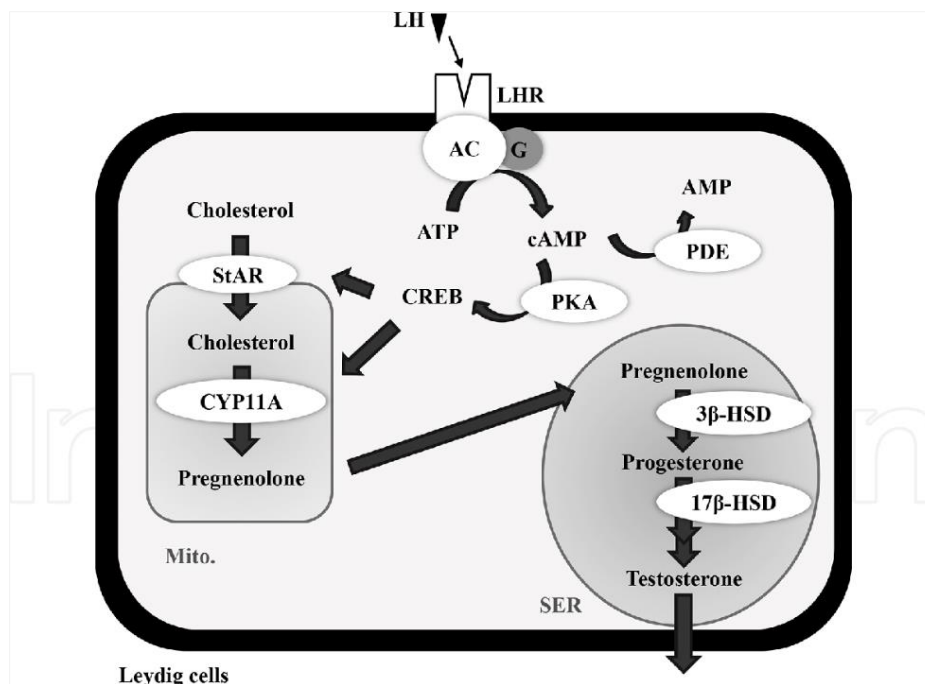
#### 1.1.2.2 Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont des cellules caractérisées par un noyau rond, un réseau abondant de réticulum endoplasmique lisse, des mitochondries avec des crêtes tubulo-vésiculaires, un appareil de Golgi de taille petite à moyenne, de nombreuses grosses gouttelettes lipidiques et une surface cellulaire en forme de doigts protubérants ; les cellules sont souvent

disposées en grappes dans l'interstitium (**Huhtaniemi et Teerds, 2018**). Leur rôle est la production des stéroïdes sexuels, en particulier la testostérone pour la régulation paracrine de la spermatogenèse au sein du testicule, et pour les divers effets endocriniens systémiques, androgènes et anabolisants, en dehors du testicule. En outre, les cellules de Leydig fœtale produisent une hormone nommée Insuline like 3 (INSL3), qui joue un rôle important dans la régulation de la descente testiculaire au cours de la vie fœtale (**Chen et al., 2009; Wen et al., 2016**).

### **1.1.2.3 Stéroïdogénèse**

La stéroïdogénèse est l'ensemble des processus de biosynthèse par lesquels le cholestérol est converti en hormones stéroïdes biologiquement actives. Ces processus peuvent être d'origine surrénalienne, ovarienne, testiculaire, placentaire et autres (**Miller et Auchus, 2011**). La stéroïdogénèse testiculaire (**Fig. 03**) se fait principalement par les cellules de Leydig (plus de 95%) sous la stimulation de LH (**Flück et Pandey, 2017**). La StAR (Steroidogenesis Acute Regulatory protein), protéine activatrice de la stéroïdogénèse, transporte le cholestérol de la membrane mitochondriale externe à la membrane mitochondriale interne après stimulation par la LH (**Shi et al., 2007; Adamczewska et al., 2022**). Ce transfert intra-mitochondrial du cholestérol est l'étape limitante de la stéroïdogénèse. Au niveau de la membrane mitochondriale interne, le cholestérol (C27) est clivé en prégnénolone (C21) sous l'action du cytochrome P450<sub>scc</sub> (side-chain clivage) ou CYP11A1. La prégnénolone est ensuite transportée vers le réticulum endoplasmique lisse (REL), où elle est ensuite convertie en une variété de stéroïdes (C19). En progestérone par la 3b-HSD puis en 17a-hydroxyprogestérone et androstènedione par le CYP17a. L'androstènedione est convertie ensuite en testostérone par le 17b-HSD. Cet androgène passe rapidement, grâce à sa liposolubilité, dans le tissu interstitiel afin de stimuler, en conjonction avec la FSH, la prolifération et la maturation des cellules de la lignée germinale dans les tubes séminifères. La testostérone est enfin convertie en estradiol par l'aromatase dans les cellules de Sertoli (**Bremer et Miller, 2014; Adamczewska et al., 2022**).



**Figure 03 :** Voies de biosynthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig (**Ho et al., 2017**)

## 1.2 Voies génitales

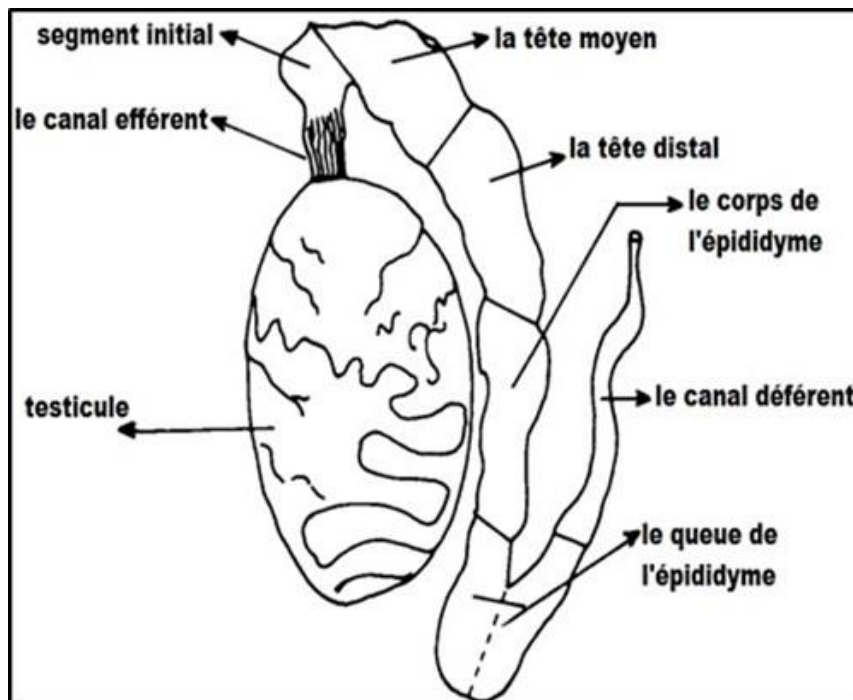
Les voies génitales, nommées aussi voies spermatiques, transportent le sperme du testicule vers l'extérieur du corps, ce sont : les canaux efférents, l'épididyme et les canaux déférents.

### 1.2.1 Canaux efférents

Les canaux efférents sont des tubules fins, parallèles reliant le rete-testis à l'épididyme (**Hess, 2002**). Chez les mammifères, les canaux efférents présentent une forme d'entonnoir, issus du rete-testis, les canalicules fusionnent pour former un seul canal commun qui pénètre dans la tête de l'épididyme (**Hess, 2018**). L'épithélium formant les canaux efférents est composé de cellules ciliées (80%) et non ciliées, certaines espèces présentent également des cellules basales et des lymphocytes ou macrophages intraépithéliaux (**Hess, 2003, 2015**), et repose sur une membrane basale entourée d'une fine couche de cellules musculaires lisses. La fonction principale des canaux efférents est la réabsorption du liquide luminal, qui rend les spermatozoïdes 28 fois plus concentrés (**Clulow et al., 1998; Hess, 2018**). La réabsorption de liquide implique plusieurs processus, y compris le transport de soluté, la perméabilité passive à l'eau, l'endocytose et la sécrétion (**Hansen et al., 1999**).

### 1.2.2 Epididyme

L'épididyme, localisé entre les canaux efférents et le canal déférent, est l'organe clé de la maturation (modification membranaire et acquisition de mobilité) et le stockage des spermatozoïdes (Denison *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2005). Ses cellules épithéliales créent un microenvironnement dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, leur capacité de fécondation des ovocytes et sont stockés dans un mode quiescent (Carlson, 2019). En générale, l'épididyme est constitué d'un seul tube très enroulé divisé en trois régions anatomiquement et physiologiquement différentes (Fig. 04) : la tête, le corps et la queue (Turner, 2008) et est entouré par des cellules musculaires lisses douées de contractions péristaltiques régulières contrôlées par des fibres nerveuses sympathiques (Cornwall, 2018).



**Figure 04** : Les différentes régions de l'épididyme (Srivastav *et al.*, 2004).

L'épithélium subit une transition graduelle passant de la forme proximale cylindrique, haute, pseudostratifiée, à la forme distale plus basse, pseudostratifiée (Sullivan et Miesusset, 2016). Ce dernier est constitué de plusieurs types cellulaires telles que :

- **Cellules principales** : elles synthétisent un nombre important de protéines qui sont soit secrétées dans la lumière épидидymaire ou reste dans la cellule, elles jouent aussi un rôle d'endocytose des protéines luminales. Entre ces cellules se trouvent des jonctions

serrées qui forment la barrière hémato-épididymaire (**Cornwall, 2009; Hermo et Robaire, 2002; Robaire et Hinton, 2015**).

- **Cellules basales** : elles expriment l'apolipoprotéine E et l'alcool déshydrogénase, ce qui lui confère un rôle dans la régulation d'électrolytes et le transport d'eau par les cellules principales (**Hamilton, 1975; Leung et al., 2004**).
- **Cellules apicales** : elles sont retrouvées principalement dans le segment initial et intermédiaire de l'épididyme. Elles jouent un rôle majeur dans l'endocytose des substances luminales, elles contiennent aussi plusieurs enzymes protéolytiques (**Avellar et Hinton, 2019; Hermo et Robaire, 2002**).
- **Cellules étroites** : chez le rat et la souris ces cellules apparaissent seulement dans l'épithélium du segment initial et intermédiaire. Elles sont impliquées dans le processus de transport intracellulaire entre la lumière et les cellules épithéliales, dans la dégradation des protéines et des glucides par leurs lysosomes et dans la protection des spermatozoïdes contre les changements nocifs de l'environnement luminal (**Avellar et Hinton, 2019; Hermo et Robaire, 2002**).
- **Cellules Claires** : elles sont présentes dans le corps et la région caudale de l'épididyme de plusieurs espèces incluant l'homme (**Cooper, 2007**). Elles jouent un rôle majeur dans l'endocytose plus importante que les cellules adjacentes particulièrement dans l'épididyme caudal (**Cornwall, 2018**). Ces cellules retirent les gouttelettes cytoplasmiques détachées des spermatozoïdes lorsqu'ils traversent le canal. L'acidification du fluide luminal est médiée par les cellules claires et les cellules étroites, car les protéines clés de ce processus sont localisée dans ces cellules (**Hermo et Robaire, 2002**).
- **Cellules en Halo** : Ce sont de petites cellules avec un cytoplasme étroit clair, elles sont présentes tout au long de l'épithélium épididymaire. Ces cellules sont généralement situées à la base de l'épithélium. Les cellules en Halo ont été décrites soit comme lymphocytes ou monocytes (**Hamilton, 1975**).

### 1.2.3 Canaux déférents

Les canaux déférents font suite à l'épididyme. Ces canaux sont moins enroulés avec un diamètre plus élevée que l'épididyme. Leur épithélium pseudostratifié cylindrique est entouré par trois couche de cellules musculaires lisses, et repose sur un tissu conjonctif lâche. Fonctionnellement, les canaux déférents produisent un liquide qui facilite le transport du sperme par les contractions péristaltiques des couches musculaires, et peuvent stocker le sperme

pendant plusieurs mois et réabsorbent le sperme mort ou non éjaculés (**Flannigan et Goldstein, 2018**).

### **1.3 Glandes annexes**

#### **1.3.1 Vésicule séminale**

Les vésicules séminales, organes paires, sont des glandes tubulaires enroulés et courbés avec de nombreuses projections latérales situées en arrière de la prostate et de la vessie, au-dessus de l'uretère distal et en arrière du rectum. Leur épithélium est cylindrique mince, avec des cellules qui ont plusieurs mitochondries et un réticulum endoplasmique rugueux bien développé important pour la synthèse et la sécrétion des protéines. On observe aussi des cellules basales qui ont une forme d'étoile avec un cytoplasme compact avec peu d'organites (**Bromfield et al., 2018**). Leur rôle principal est de produire le liquide séminal en réponse à la testostérone. Ce liquide a pour but de soutenir et maintenir la viabilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes pendant leurs transports à travers l'appareil reproducteur masculin lors de l'éjaculation et l'appareil reproducteur féminin pour faciliter la fécondation de l'ovule. Le liquide des vésicules séminales, épais, visqueux et alcalin, est riche en substrats énergétiques, minéraux et ions, divers protéines et acides aminés, enzymes, hormones, vitamines, agents tampons et antioxydants expressément dans le but de maintenir la capacité fonctionnelle du sperme (**Schjenken et al., 2018**).

#### **1.3.2 Glande de Cowper**

Aussi nommée glandes bulbo-urétrales, une paire est située dans le diaphragme urogénital, et la deuxième paire est située dans le tissu bulbo-spongieux. Cet organe est constitué de lobules bien délimités contenant des glandes tubulo-alvéolaires compactes avec un canal excréteur central tapissé d'épithélium pseudostratifié enveloppé de muscle (**Prins et Lindgren, 2015**). Cette glande contribue à la lubrification urétrale et la coagulation du sperme (**Whitney, 2018**). En outre, elles sont impliquées dans la défense immunitaire de l'appareil génito-urinaire et sécrètent de nombreuses glycoprotéines, y compris l'antigène spécifique de la prostate (PSA) (**Chen, 2023; Prins et Lindgren, 2015**).

#### **1.3.3 Prostate**

La prostate est un organe glandulaire sécréteur situé à la base de la vessie. L'épithélium de la prostate a trois types de cellules différenciées : les cellules luminales sécrétoires, les cellules

basales et de rares cellules neuroendocrines. On trouve aussi des cellules souches, qui résident au contact de la lame basale et donnent par division les autres cellules différenciées. Le stroma de la prostate comprend les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (**Sasaki et al., 2018**). Les cellules luminales sécrétoires produisent le liquide prostatique, légèrement acide (pH 6.5), qui contient plusieurs substances (acide citrique pour la production d'ATP par les spermatozoïdes, PSA, pepsinogène, lysozyme, amylase, hyaluronidase, la phosphatase acide, et la plasmine séminale qui est un antibiotique). Les sécrétions de la prostate pénètrent dans l'urètre prostatique à travers de nombreux conduits prostatiques (**Gauntner et Prins, 2018**).

## **2 Régulation de la fonction de la reproduction**

La fonction de reproduction mâle est soumise au contrôle neuroendocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (**Fig. 05**), et les interactions cellules de Sertoli-cellules de Leydig. D'une part, l'hormone folliculostimulante (FSH) qui stimule les cellules de Sertoli pour sécréter une protéine de transport fixant les androgènes : ABP (**Kretser, 2018**) et les cellules de Leydig secrètent la testostérone, qui va agir sur les cellules de Sertoli pour le déclenchement et l'entretien de la spermatogenèse et inhibe l'apoptose des cellules germinales (**Huhtaniemi, 2018; Oduwale et al., 2021**). D'autre part, la fonction épидидymaire est régulée par les androgènes, les œstrogènes, ainsi que par plusieurs d'autres hormones tels que : le Peptide Natriurétique Auriculaire (ANP), l'activine, la follistatine, la sous unité  $\beta$  de l'inhibine, l'ocytocine (OT) et la prolactine (PRL) (**Carlson, 2019; Joseph et al., 2011; Lara et al., 2018**).

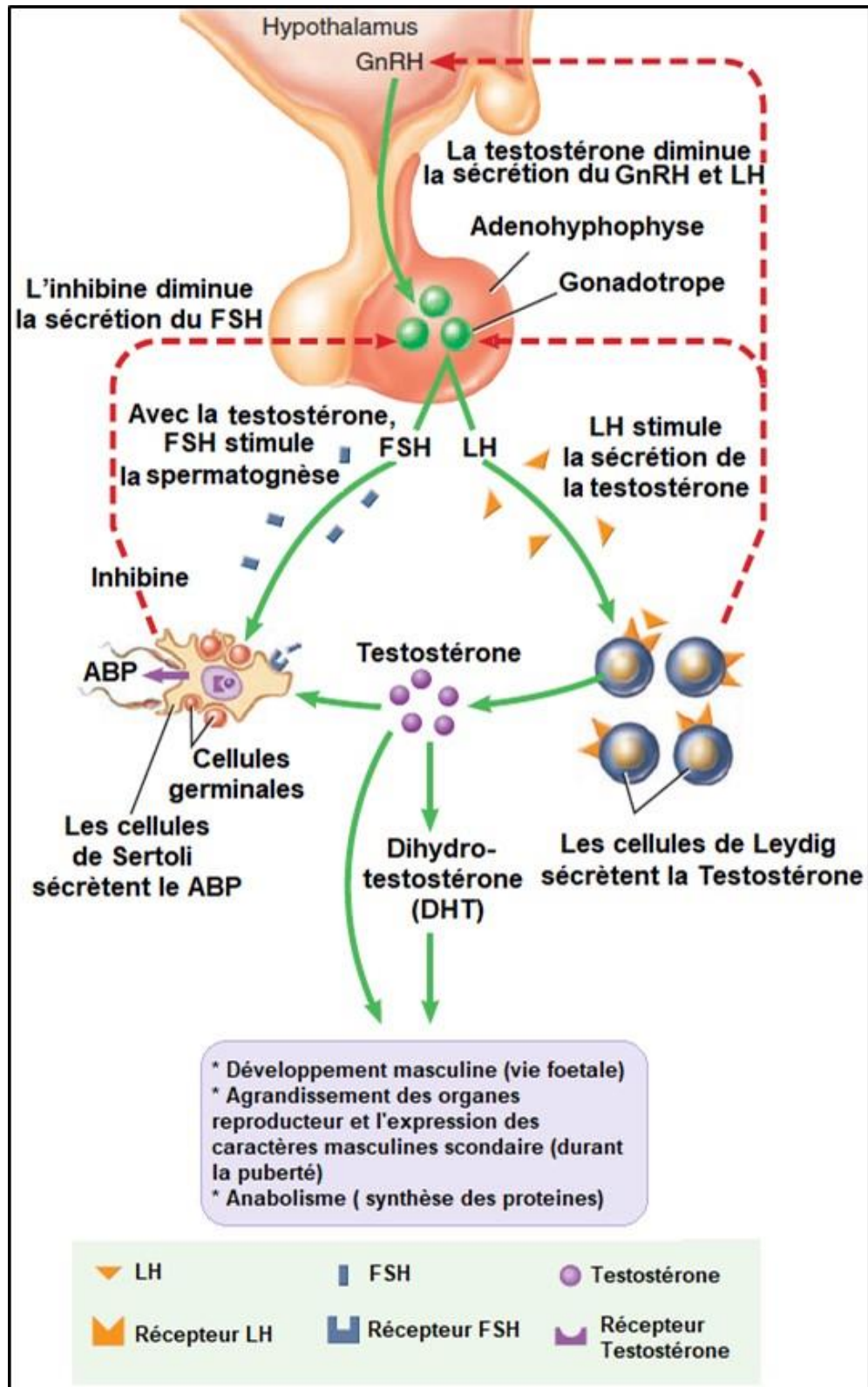


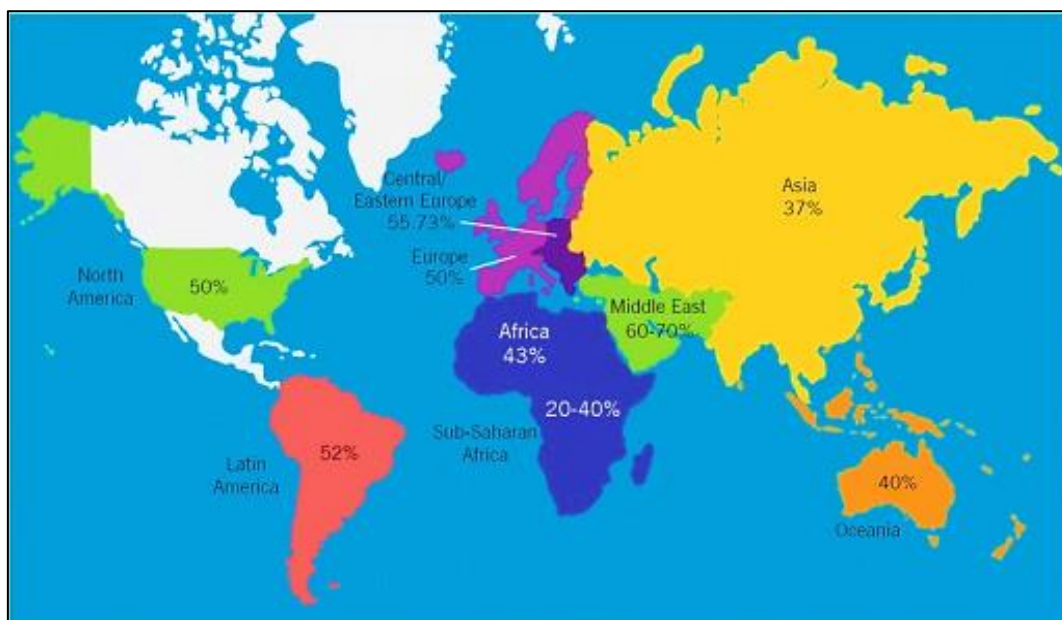
Figure 05 : Régulation de la fonction de reproduction mâle (Tortora et Derrickson, 2011).

### 3 Troubles de la fonction de reproduction mâle

#### 3.1 Infertilité masculine

L'infertilité est l'un des problèmes cliniques majeurs de santé humaine qui affecte la vie socioculturelle de nombreux individus. L'OMS définit l'infertilité comme la difficulté pour un couple d'avoir un enfant après 12 mois ou plus de rapports sexuels non protégés et réguliers (**Harrison et al., 2021**). Il a été estimé que l'infertilité touche 8 à 12 % de couples dans le monde, le facteur masculin étant une cause primaire ou contributive dans environ 40 à 50 % des couples (**Kumar et Singh, 2015**).

Les taux de cas d'infertilité dans le monde dus à l'implication du facteur masculin sont représentés dans **la figure 06**.



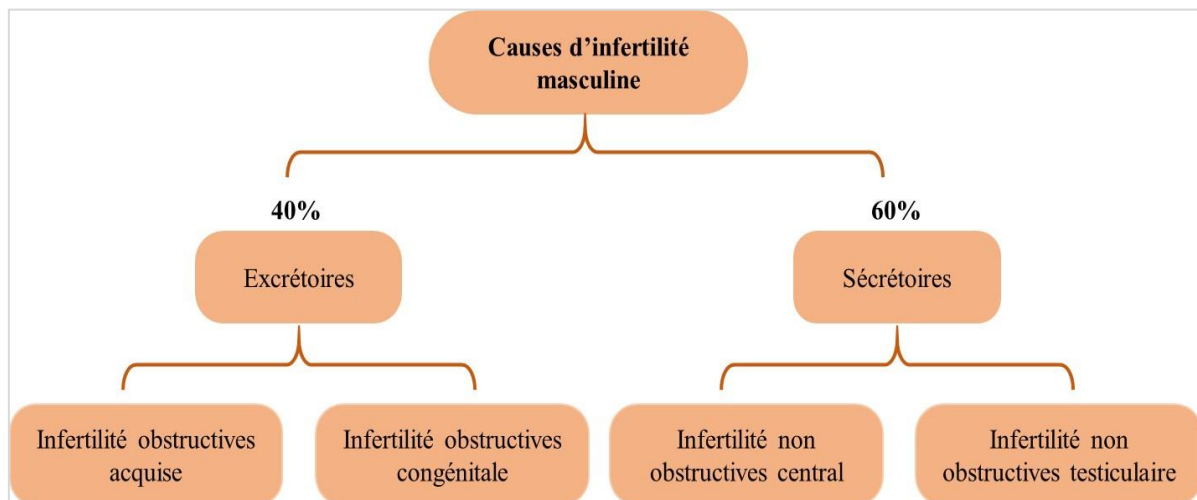
**Figure 06** : Carte mondiale illustrant les pourcentages de cas d'infertilité par région dus au facteur masculin (**Agarwal et al., 2015**).

#### 3.2 Causes de l'infertilité masculine

Les facteurs responsables de l'infertilité masculine peuvent être séparés en deux catégories ; excrétoires et sécrétoires (**Fig. 07**).

Les causes excrétoires représentent 40% des individus infertiles chez lesquels la synthèse des spermatozoïdes est conservée mais des blocages peuvent se produire dans les conduits qui transportent le liquide séminal due à une anomalie congénitale (absence des canaux déférents et/ou vésicules séminales), ou anomalie acquise (trouble de l'éjaculation, tumeurs testiculaires ou des infections des voies génitales). Tandis que, les causes sécrétoires, qui représentent 60%

des cas, correspondent à un déficit dans la production des spermatozoïdes au niveau des testicules. Cette détérioration peut être centrale ou testiculaire. L'altération centrale constitue 1 à 5% des infertiles où les troubles hormonaux (FSH et LH) entraînent un hypogonadisme et une hypo-testostéronémie. Alors que 52% des cas représentent une atteinte fonctionnelle du testicule liée à une anomalie génétique (par exemple : mutation au niveau du récepteur de FSH... etc), acquise (par exemple : varicocèle, cryptorchidie, traitements médicaux comme la chimiothérapie, le dysfonctionnement des spermatozoïdes et diminution de leur qualité à cause de la consommation des stéroïdes anabolisants ...etc) et idiopathique dans laquelle 65 à 75% des cas reste inconnue et pose l'hypothèse de l'effet du mode de vie et l'environnement, en particulier la contamination par des substances toxiques et l'exposition à des perturbateurs endocriniens (Agarwal *et al.*, 2021; Kumar et Singh, 2015; Leaver, 2016; Plunk et Richards, 2020).



**Figure 07 :** Causes de l'infertilité masculine (Agarwal *et al.*, 2021; Kumar et Singh, 2015; Leaver, 2016).

## Chapitre II : Métaux lourds et infertilité masculine

### 1. Généralité

Le terme "métaux lourds" est généralement utilisé dans la littérature environnementale pour désigner les métaux et les métalloïdes associés à la pollution environnementale, à la toxicité et aux effets néfastes sur les organismes vivants, y compris les humains (**Abd Elnabi et al., 2023**) Principalement en terme de densité, de masse atomique relative et de numéro atomique, ce terme a été défini comme des éléments métalliques naturels dont le numéro atomique ( $Z$ ) est supérieur à 20 et dont la densité est supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ , selon cette définition, on trouve 51 éléments appelés "métaux lourds" (**Ali et Khan, 2018; Kim et al., 2019**). Au cours des dernières décennies, la contamination de l'environnement par les métaux lourds a fortement augmenté en raison du développement rapide des industries modernes. A cause de leurs propriétés non biodégradables et leur accumulation dans l'environnement, une contamination à différents niveaux, notamment l'air, le sol, les aliments et l'eau, a été signalée (**Kim et al., 2019**). De nombreux chercheurs ont signalé l'effet nocif sur la fonction de reproduction, dont le plomb (**Carocci et al., 2016**) et le cadmium (**Nna et al., 2017**). Les effets toxiques de ces éléments sur la fonction de reproduction masculine ont suscité une grande attention par plusieurs chercheurs. Bien que plus de 20 métaux (plomb, cadmium, chrome, arsenic, calcium, etc.) provoquent des altérations au niveau des paramètres spermatiques, ainsi que des perturbations biochimiques et endocriniennes, tandis que le zinc, le sélénium et le magnésium sont bénéfiques pour les fonctions reproductives masculines (**Sengupta, 2013; Hu et al., 2023**). Le plomb et le cadmium, qui ne présentent aucun effet bénéfique pour l'organisme, sont considérés comme des facteurs de risque qui perturbent les fonctions endocriniennes et influencent les niveaux d'hormones responsables de la biosynthèse des spermatozoïdes. Ces défauts sont principalement induits par le stress oxydatif (**Manouchehri et al., 2022**).

### 2. Propriétés physico-chimiques des métaux lourds

Les différentes propriétés physique et chimique du plomb et du cadmium sont présentées dans le **tableau 01**.

**Tableau 01** : Propriétés physico-chimiques du plomb et du cadmium (Kabata-Pendias et Szteke, 2015; Sarkar *et al.*, 2013).

Propriétés	Caractères	Plomb	Cadmium	
Physiques	Couleur	Blanc-gris	Blanc argenté	
	Poids atomique	207.2 g/mol	112.4 g/mol	
	Masse volumique	11.3 g/cm <sup>3</sup>	8.7 g/cm <sup>3</sup>	
	Numéro atomique	32	48	
	Solubilité	4 (204, 206, 207,208)	8 (106, 108, 110, 111 112, 113, 114, 116)	
	T° de fusion	327.46°C	321°C	
	T° d'ébullition	1749°C	767°C	
	Conductibilité électrique	4.81.10 <sup>6</sup> S.m <sup>-1</sup>	13,6.10 <sup>-6</sup> S.m <sup>-1</sup>	
	Conductibilité thermique	35.3 W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>	103 W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>	
	Etat présenteielle	-Formes métallique, inorganique et organique. -Rarement présent à l'état élémentaire, mais plutôt à l'état d'oxydation (Pb <sup>2+</sup> ) dans divers minerais.	-Présent principalement dans les minerais de zinc, de cuivre ou de plomb. -On ne le trouve pas à l'état libre.	
Chimiques		Le plomb tétraéthyle (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> Pb.		
		Le dioxyde de plomb β-PbO <sub>2</sub> .	L'oxyde de cadmium CdO.	
	Principaux composés		Le minium Pb <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	L'hydroxyde de cadmium Cd(OH) <sub>2</sub> .
			L'oxyde de plomb PbO.	
			Le sulfate de plomb PbSO <sub>4</sub> .	Le chlorure de cadmium CdCl <sub>2</sub> .
			Le chlorure de plomb PbCl <sub>2</sub> .	
	Le nitrate de plomb Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .	Le sulfure de cadmium CdS		
	Le carbonate de plomb PbCO <sub>3</sub> .			

---

Le sulfure de plomb PbS.

Le chromate de plomb

PbCrO<sub>4</sub>

---

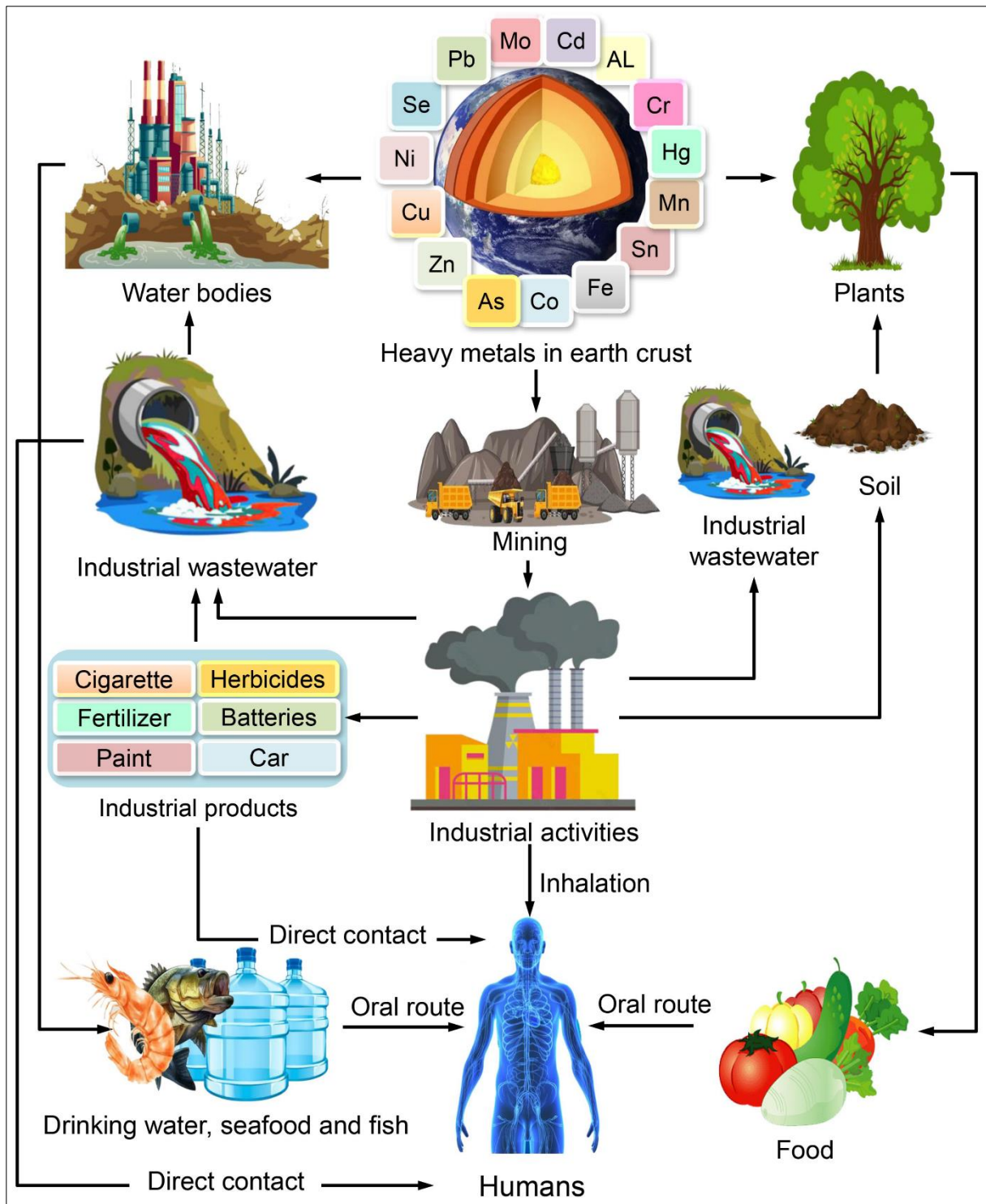
### 3. Sources d'exposition aux métaux lourds

Les métaux lourds ont été largement retrouvés dans divers milieux environnementaux (notamment le sol, l'eau, l'air et les aliments) dans le monde entier. Ils peuvent pénétrer dans le corps humain par inhalation de poussières, ingestion, contact cutané de sol et d'eau contaminés et consommation de légumes cultivés dans des champs contaminés (**Qu et al., 2012**).

Parmi les importantes sources industrielles et agricoles, on retrouve le Pb dans les produits manufacturés tels que les biocides (pesticides, herbicides), les batteries au Pb, les pigments et peintures, les céramiques, les conduits d'eau, les alliages, les gaines de câbles et les additifs pour l'essence (trafic routier) (**Daku et al., 2016; Ramah et al., 2015**). Le Pb est distribué dans toutes les parties de l'environnement sous trois formes principales : le Pb métallique, les sels de Pb (Pb inorganique), et le Pb organique contenant du carbone (**Assi et al., 2016**). La valeur biologique de référence du Pb sanguin est 85 µg/L chez les hommes et 60 µg/L chez les femmes tandis que le Pb urinaire est < 1,4 µg/L (< 1,1 µg/g de créatinine) (**Anses, 2022**). L'organisation mondiale de la santé indique que la concentration du plomb dans l'eau potable ne doit pas dépasser la norme de 10µg/L (**COTRUVU, 2017**).

Les aliments et le tabagisme (1-2 µg de Cd par cigarette) constituent les deux principales sources d'exposition au cadmium pour la population générale. Dans l'industrie, l'exposition est principalement due à l'inhalation de fumées et de poussières de Cd (**Bernard et Lauwerys, 1986; Zhang et Reynolds, 2019**). La valeur biologique de référence de Cd sanguin est 0.7 à 1 µg/L chez les non-fumeurs et 2 à 3 µg/L chez les fumeurs tandis que le Cd urinaire est 1,9 µg/g de créatinine (1,2 µg/L) pour les non-fumeurs et 3 µg/g de créatinine (1,7 µg/L) pour les fumeurs (**INRS, 2022**).

On peut aussi citer l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts comme des sources naturelles d'exposition à ces deux métaux (**Carocci et al., 2016; Godt et al., 2006; Sarkar et al., 2013; Sengupta, 2013**). Les figures 08 et 08' résument toutes les sources de contamination au Pb et au Cd et les mécanismes d'intoxication aux métaux lourds chez l'homme.



**Figures 08 :** Mécanismes d’intoxication chez l’homme suite à une exposition aux métaux lourds (Abd Elnabi *et al.*, 2023)

#### **4. Métabolisme des métaux lourds**

##### **4.1. Absorption**

L'absorption du Pb et du Cd par voie respiratoire et digestive dépend de l'espèce chimique, la taille des particules et leur solubilité ainsi que d'autres facteurs physiologiques notamment l'âge, le sexe, la teneur en protéines, en composés de zinc et de cuivre, en calcium et en fer dans l'alimentation (**Kabata-Pendias et Szteke, 2015; Sahmoun et al., 2005; Wani et al., 2015**).

L'absorption du Pb par voie d'ingestion représente 99% de leur absorption totale, tandis que l'inhalation ne contribue que de 1% (**Pizzol et al., 2010**). Leur absorption intestinale augmente lorsque les apports alimentaires en fer, calcium, phosphore ou zinc sont faibles. Il a été estimé qu'une personne pesant 70 kg aura une moyenne de 120 mg de Pb, avec 0,2 mg/L dans le sang, 5-50 mg/kg dans les os et 0,2-3 mg dans les tissus (**Kumar et al., 2020**). Le Pb inhalé se dépose dans les parties supérieure et inférieure des voies respiratoires. Les particules de Pb ayant un diamètre inférieur à 1 µm pénètrent dans la partie inférieure et sont absorbées par celles-ci. Tandis que les particules dont le diamètre est supérieur à 2,5 µm se déposent dans les voies supérieures (nasopharynx et région trachéo-bronchique), qui sont par la suite drainées par le mucus vers le carrefour aéro-digestif (où elles peuvent être absorbées) (**Boskabady et al., 2018**). Il y a peu d'absorption transcutanée de Pb lorsque des composés inorganiques de plomb, Pb de peinture, sont appliqués sur la peau. En revanche, le plomb organique (tétraéthyle), qui se trouve dans l'essence, peut être absorbé par la peau (**Papanikolaou et al., 2005**). Les formes organiques sont plus toxiques et facilement absorbées par le tractus gastro-intestinal (**Mudgal et al., 2010**).

L'absorption gastro-intestinale de Cd représente 5%, tandis que 90% du Cd inhalé est absorbé par voie pulmonaire (**Järup, 2002**). L'absorption intestinale du Cd, principalement sous forme de chlorure de cadmium (CdCl<sub>2</sub>) en raison de leur forte solubilité dans l'eau, se fait avec la participation des systèmes de transport des ions de zinc, cuivre, fer et calcium. Un faible apport de ces éléments favorise leur accumulation dans le duodénum. L'acidité du tube digestif favorise le transport du Cd par le co-transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Il peut également être absorbé par simple diffusion, par un système de protéines de transport membranaire (hZTL1 et ZNT1) responsables du transport des ions zinc et calcium, ou par combinaison avec les groupes thiol de la cystéine-SH et du glutathion (GSH) sous forme de Cd-cystéine, Cd-GSH (**Ryu et al., 2004; Sarkar et al., 2013; Zalups et Ahmad, 2003**). L'oxyde de cadmium (CdO) est la principale forme de Cd

associée à l'exposition par inhalation. En fait, jusqu'à 60 % de la dose de Cd inhalée est transloquée dans le tractus gastro-intestinal (**Zalups et Ahmad, 2003**). Deux mécanismes facilitent l'absorption du Cd par la peau : la liaison d'un ion cadmium libre à des radicaux sulfhydryles de cystéine dans les kératines épidermiques, ou une induction et une complexation avec la métallothionéine (MT) (**Godt et al., 2006**).

#### **4.2. Distribution**

Principalement, les ions métalliques du Pb remplacent les ions calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en affectant la protéine kinase C, d'autres ions divalents tels que  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  et des cations unitaires dont  $\text{Na}^+$  ont aussi été remplacés par ces derniers pour finalement perturber le métabolisme biologique des cellules. Le Cd peut remplacer le zinc présent dans les protéines métal-soufre, provoquant des troubles du métabolisme du zinc qui l'empêchent de jouer son rôle de piègeur de radicaux libres dans les cellules (**Zhushan et Shuhua, 2019**).

Près de 99% du Pb absorbé est liée à l'hémoglobine (HB) des érythrocytes, avec environ 1% dans le sérum et le plasma en formant des complexes avec une variété de ligands protéiques et non protéiques (albumine sérique, les acides aminés et les acides carboxyliques, ou  $\text{Pb}^{2+}$  libre) (**Kumar et al., 2020**). Le Pb absorbé dans l'intestin est ensuite transporté vers les tissus mous, par exemple dans le foie, les reins et les tissus osseux, où il s'accumule au fil du temps. La distribution du Pb dans les organes (cerveau, poumons, rate, cortex rénal, aorte, dents et os) dépend beaucoup de la concentration de Pb dans le plasma plutôt que dans le sang total (**Kabata-Pendias et Szteke, 2015**). La cinétique du transfert du Pb du sang aux tissus mous est faible et prend environ 4 à 6 semaines (**Papanikolaou et al., 2005**).

Le Cd absorbé est transporté dans tout l'organisme, généralement lié à une protéine de faible poids moléculaire contenant un groupe sulfhydryle (SH) appelé la métallothionéine (MT) en formant des complexes Cd-MT (**Bernhoft, 2013**). Les organes qui stockent le Cd sont le foie, les reins, les testicules, la rate, le cœur, les poumons, le thymus, les glandes salivaires, l'épididyme et la prostate, le pancréas et le système nerveux central ; cependant, environ 50 % du Cd présent dans l'organisme est stocké dans le foie et les reins en raison de leur forte concentration en MT (**Sarkar et al., 2013**).

#### **4.3. Métabolisme et excrétion**

Le Pb inorganique n'est pas métabolisé ; cependant, les composés alkyles du Pb sont oxydés par le système P450 hépatique. En général, l'excrétion du Pb est faible, la voie la plus importante étant celle des voies urinaires. Il peut également être excrété avec la bile par le

tractus gastro-intestinal. Bien que des quantités infimes de plomb soient excrétées par la sueur, les cheveux, les ongles, le lait maternel et le liquide séminal. La demi-vie du Pb dans le sang est estimée à 35 jours, 40 jours dans les tissus mous et jusqu'à 30 ans dans les os et les dents (**Kabata-Pendias et Szteke, 2015; Papanikolaou et al., 2005**).

Le cadmium est excrété principalement dans l'urine avec une demi-vie biologique exceptionnellement longue dans l'organisme humain (10-30 ans). De petites quantités de Cd généralement conjuguées au glutathion, à la cystéine ou à la métallothionéine sont excrétées dans les fèces à l'intermédiaire de la sécrétion biliaire (**Zalups et Ahmad, 2003**). L'excrétion quotidienne du cadmium par l'organisme (principalement par les reins) ne dépasse pas 0,01% de la quantité de cet élément consommée dans l'organisme (**Sarkar et al., 2013**).

### **5. Métaux lourds et stress oxydatif**

Le métabolisme normal de l'oxygène dans les cellules induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Un déséquilibre entre la production et la neutralisation de ces espèces par les antioxydants est défini comme « stress oxydant » (**Migdal et Serres, 2011**). Le terme "espèces réactives de l'oxygène" comprend la forme réduite de l'oxygène et les produits de leur réaction avec d'autres molécules. Elles se caractérisent par la présence d'électrons non appariés dans leur enveloppe externe, ce qui les rend très réactifs et de courte durée de vie de quelques millisecondes. Parmi tous les ERO, l'anion superoxyde ( $*O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux hydroxyles ( $*OH$ ) sont les exemples les plus connus (**Chang, 2016**). Une étude rapporté par **Melila et al. (2012)** montre que la bioaccumulation de Pb et Cd dans l'organisme humain induit un stress oxydatif en diminuant le potentiel total antioxydant du plasma sanguin (FRAP) et en provoquant la peroxydation lipidique (MDH). Le stress induit par le Pb entraîne divers troubles neurologiques (la maladie d'Alzheimer, Parkinson et schizophrénie), hématologiques (inhibition de la synthèse de l'hème), infertilité, et néphropathies (**Carocci et al., 2016**).

La génération des ERO induite par le Cd conduit à plusieurs altérations et dysfonctionnements physiologiques dont l'inflammations pulmonaire, dommages tubulaires rénales, altération neurodégénérative, infertilité et ostéoporose (**Hosseini-Khannazer et al., 2020**).

### **Chapitre III : Plantes médicinales et métabolites secondaires**

#### **1. Sources de molécules naturelles bioactives**

Dans le monde entier, il existe de nombreuses plantes, dont certaines sont médicinales. Les plantes médicinales sont considérées comme des sources d'agents médicinaux naturelles depuis des milliers d'années. En fait, plusieurs composés phytochimiques bioactifs issus de plantes ont été découverts comme des médicaments puissants dont beaucoup sont basés sur leur utilisation en médecine traditionnelle. En général, ces substances ont été identifiées comme antioxydants naturels bénéfiques pour la santé (**Lahlou, 2013**).

L'utilisation des plantes pour les études pharmacologiques basée soit par leur utilisation traditionnelle soit par la connaissance de molécules chimiques de leurs familles. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, sont des composants intermédiaires résultant du métabolisme cellulaire dispersés dans des compartiments particuliers de la plante (**Salim et al., 2008**).

#### **2. Métabolites secondaires**

Inversement aux métabolites primaires, dont les glucides, les lipides et les acides aminés, qui sont impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction des plantes, les métabolites secondaires se caractérisent par leur grande diversité chimique et sa fonctionnalité différente. Depuis les années 1850, des recherches approfondies ont été effectuées sur ces composants dans le but d'identifier, isoler et examiner leurs effets biologiques. Chez les plantes, ces métabolites sont utilisés pour la défense contre les prédateurs (champignons, virus, herbivores ...), et aussi pour la résistance et l'adaptation aux facteurs du stress (variation climatique...). Chez l'homme et/ou l'animal, ces molécules exercent des pouvoirs pharmacologiques ou toxicologiques dont antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique, anticancéreuses ...etc (**Croteau et al., 2000**).

La classification des métabolites secondaires basée sur leur composition chimique (contenant de l'azote ou non), leur structure chimique (ayant des cycles, contenant un sucre), leur voie de biosynthèse (acide shikimique pour les phénols, les tannins, alcaloïdes aromatiques ; l'acétate-malonate pour les phénols et les alcaloïdes et l'acide mévalonique pour les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes) ou leur solubilité. Ils sont divisés en trois grandes catégories, à savoir les terpènes, les alcaloïdes, et les composés phénoliques. Pour chacun d'eux, on trouve des sous-classes dont la structure est complexe (**Anand et al., 2019**).

## 2.1. Terpènes

Les terpénoïdes, généralement provenant des huiles essentielles, constituent la classe de phytoconstituants volatiles la plus variée sur les plans fonctionnels et structurels avec plus de 23 000 structures connues. Le nom de terpénoïde vient du fait que les premiers membres de cette classe ont été isolés de la térébenthine ("terpentine" en allemand). Tous les terpénoïdes sont dérivés de la fusion répétée d'unités ramifiées à cinq atomes de carbone basées sur le squelette de l'isopentane (unités isoprènes). Au cours de leur synthèse, à partir de l'acétate via la voie de l'acide mévalonique, ces monomères sont souvent joints de façon "tête à queue", mais les fusions tête à tête sont également courantes, et certains terpénoïdes sont formés par des fusions tête à milieu. Les terpénoïdes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprène (hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tétraterpènes, et polyterpènes). Beaucoup d'entre eux ont une activité pharmacologique et ont des propriétés antimicrobienne, antihypertensive, antivirale et insecticide (**Justin *et al.*, 2014; Roba, 2021**).

## 2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe de molécules structurellement diverses et non liées sur le plan biogénique en englobant une classe d'environ 12 000 produits naturels. Le terme alcaloïde, dérive du mot « alcalin », a été introduit par W. Meisner au début du dix-neuvième siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Les alcaloïdes provenant d'extraits des plantes, généralement les angiospermes, caractérisés par la présence d'un atome d'azote basique qui forment des sels avec les acides et qui, lorsqu'elles sont solubles, donnent des solutions alcalines (**Bribi, 2018**). Sur la base de leur précurseur biosynthétique et de leur système d'anneau hétérocyclique, les alcaloïdes ont été classés en plusieurs catégories, dont les alcaloïdes indole, pipéridine, tropane, purine, pyrrolizidine, imidazole, quinolozidine, isoquinoline et pyrrolidine. Chacun de ces groupes est subdivisé en plusieurs sous-groupes en fonction des caractéristiques structurelles de ses représentants. De nombreux alcaloïdes ont été utilisés pendant plusieurs centaines d'années en médecine comme ingrédients de médicaments liquides et de poisons pour le traitement des affections, notamment les morsures de serpents, la fièvre et la folie et aujourd'hui encore, certains alcaloïdes sont utilisés comme antiseptiques, anticancéreux, analgésiques et antimicrobiens (**Debnath *et al.*, 2018; Roy, 2017**).

### 2.3. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent un groupe hétérogène de métabolites secondaires qui regroupe plus de 8000 molécules. Sur le plan structural, ces composés se caractérisent par la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (noyau benzénique) auquel sont liés un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH) et pouvant contenir un groupe fonctionnel supplémentaire distinctif (éther, méthyle, ester, sucre...) (**Luna-Guevara et al., 2019**). Ils sont responsables de fonctions structurales et protectrices dans les plantes, contribuant à la saveur, à la couleur, à l'astringence et à l'amertume des fruits et légumes. Leur rôle basé sur leur capacité antioxydante contre les ERO impliquées dans le vieillissement et dans les maladies chroniques, auto-immunes, inflammatoires, coronariennes et dégénératives (**Soto et al., 2011**). Bien qu'il n'existe pas de classification unique, les polyphénols peuvent être classés en sept groupes : les flavonoïdes, les acides phénoliques (AP), les tanins simples et condensés, les stilbènes, les coumarines, les lignanes et les lignines (**Ambriz-Pérez et al., 2016; Cheynier, 2012**).

## 3. Monographie de la *Withania frutescens* comme source de molécules bioactives

### 3.1. Systématique de *Withania frutescens*

*Withania* est un genre de plantes à fleurs de la famille des solanacées avec 23 espèces. *Withania frutescens*, anciennement appelée *Atropa frutescens* L., est l'une des espèces qui appartiennent à ce genre. Elle a été identifiée pour la première fois par le botaniste français Charles Louis Constant Pauquy (1800–1854), en 1825, d'où son nom *Withania frutescens* (L.) Pauquy. Elle porte le nom vernaculaire Arabe « Benour » (**Ferrer-Gallego et Laguna, 2014; Quézel et al., 1962**).

*Withania frutescens* L. Pauquy est classée Selon la classification phylogénétique APG II (Angiosperm Phylogeny Group) (**Bremer et al., 2003**) en :

**Embranchement** : Spermaphyta.

**Sous-embranchement** : Angiospermae.

**Division** : Astéridées.

**Classe** : Lamiidées.

**Ordre** : Solanales.

**Famille** : Solanaceae.

**Genre** : *Withania*.

**Espèce :** *Withania frutescens* Pauquy.

### 3.2. Distribution botanique

La *W. frutescens* (**Fig. 09**) est un arbuste rameux qui peut atteindre un mètre et demi de hauteur, pubescent-glanduleux et très ramifié, avec des petites feuilles coriaces vertes de 2 à 3 cm (**Quézel et al., 1962**). Il s'agit d'une espèce polygame, les fleurs jaunâtres sont unisexuées axillaires solitaires, avec des calices à 5 lobes lancéolés comprenant des fruits en baies sphériques de 7-9 mm de diamètre, rougeâtres, luisantes. Elle fleurit d'avril à décembre (**Montes, 2004**).



**Figure 09 :** La forme biologique de la plante *Withania frutescens* L Pauquy [**Originale**].

### 3.3. Répartition géographique

*W. frutescens* est une plante rare dont la répartition est extrêmement restreinte au bassin méditerranéen occidental, fréquemment dans des zones non loin du littoral, à travers le nord de l'Afrique (Algérie et Maroc) et dans l'Ibérie (Espagne et Portugal) (**Ferrer-Gallego et Laguna, 2014**). On le trouve dans les haies, lieux arides et rocaille (**Quézel et al., 1962**).

### 3.4. Composés chimiques

*W. frutescens* est riche en withanolides, pentacarbonyl (13,22%), du 2-phénazine carbonitrile (10,64%), du Terpinenol-4 (10,04%), du 4H-1-benzopyran-4-one ,2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2phényl(S) (8,76 %) et bicyclo heptane, 6,6-diméthyl-2-méthylène (28,48 %). Des

travaux récents ont montré la présence de certaines classes de composés, notamment les tanins, les coumarines, les saponines et les mucilages (**EI Moussaoui et al., 2019a, 2020a; Singh et al., 2022**).

### **3.5. Intérêt et utilisations**

*W. frutescens* est largement utilisée comme bois de chauffage (**Martinez-Lirola et al., 1996**). En médecine traditionnelle, elle est fréquemment employée pour lutter contre les infections bactériennes, les empoisonnements, les ulcérations gastriques, le traitement de la dysenterie, la conjonctivite, l'inflammation, la tuberculose, le stress, la bronchite, l'anxiété, les troubles neurologiques et les ulcères ainsi que les maladies du foie et la maladie de Parkinson (**Bellakhdar, 1997**).

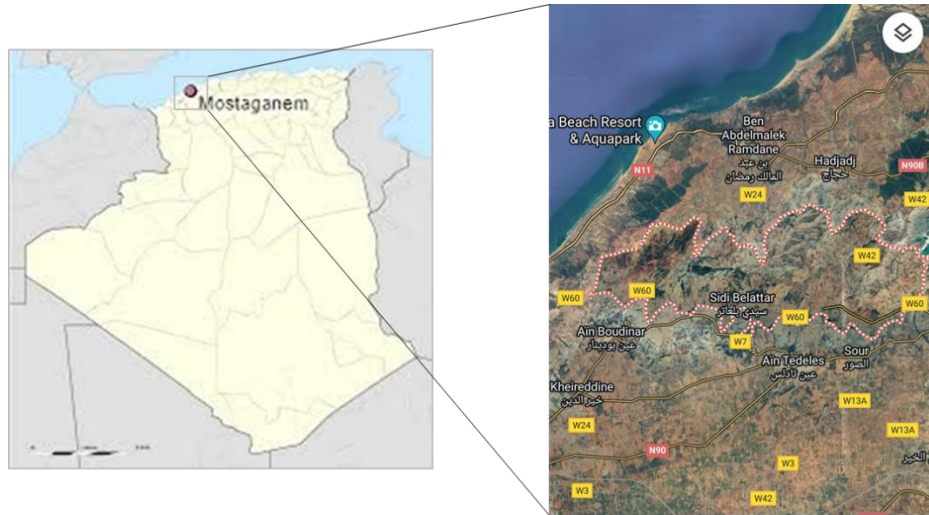
De nos jours, cette plante démontre un profil de bioactivité intéressant incluant des activités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, antidiabétiques et antiplasmodiales (**EL Bouzidi et al., 2017; EL Moussaoui et al., 2022; Mechchate et al., 2021**). In addition, le décocté de ses feuilles est employé, en inhalation, contre l'asthme (**El Azzouzi et Zidane, 2015**). En outre, l'extrait de feuilles de *W. frutescens* possède une action protectrice et curative contre l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) (**Montilla et al., 1990**), et une activité cytotoxique contre HepG2 (hépatocellulaire) et HT29 (adénocarcinome du côlon) grâce à la présence de composants withanolides (**EL Bouzidi et al., 2013**).

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

Les racines de *Withania frutescens* L. Pauquy utilisées dans cette étude ont été récoltées durant le mois de mars 2019 dans la région de Sidi Belattar (36° 1' 36.11" N, 0 ° 16' 9.52" E) (**Annexe 01**), Mostaganem (**Fig. 10**). La plante a été identifiée par le docteur Mostari Abbassia, botaniste au département de biologie, université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.



**Figure 10** : Carte géographique de la zone de collecte de *Withania frutescens*.

### 1.2. Matériel animal

Les animaux qui ont été choisis pour cette étude, comme c'est le cas dans la plupart des études toxicologiques, sont des rats blancs de laboratoire, espèce *Rattus norvegicus*, souche *Wistar* provenant de l'Institut Pasteur d'Alger. C'est l'espèce largement utilisée en raison de sa similarité génétique considérable avec les humains, sa capacité à se reproduire et croître rapidement, sa taille de manipulation et son prix raisonnable. L'expérimentation a été réalisée au niveau de l'animalerie du laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA), Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

Les rats mâles, sexuellement matures âgés de 03 mois avec une masse corporelle moyenne de  $110 \pm 10$ g, ont été gardés dans des cages en plastique dans des conditions contrôlées (température ambiante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode 12/12 h) et ayant libre accès à l'eau et à la nourriture (Granules à base de maïs ONAB, **annexe 02**) tout au long de la période d'expérimentation. Les animaux ont été acclimatés à leur nouvel environnement pendant deux semaines avant le début du traitement.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Séchage et préparation du matériel végétal

Les racines de la plante étudiée ont été rincées puis séchées dans des conditions ambiantes à l'obscurité dans une période de 20 à 30 jours (**Fig. 11**), puis réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique afin d'augmenter la surface de contact avec le solvant lors de l'extraction. L'échantillon a été récupéré dans un sac propre et conservé à une température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 11** : Échantillonnage et séchage de *W. frutescens* [Originale].

### 2.2. Préparation de l'extrait brut

L'extrait brut a été obtenu par la méthode de macération en utilisant un mélange d'éthanol/eau. Ce dernier a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés et pour éviter la toxicité des autres solvants (méthanol, acétone, chloroforme... etc) lors de l'exposition chez les rats (**Boorman et al., 1999; Dietz et al., 1991; Tephly, 1991**). La macération est une procédure d'extraction très répandue et peu coûteuse afin d'épuiser le matériel végétal de toutes substances solubles dans un solvant d'extraction.

Pour la préparation de l'extrait hydro-éthanolique 100 g de poudre de racines de *W. frutescens* ont été macérés dans 1 L d'éthanol/eau distillée (80/20) pendant 72 heures à température ambiante sous agitation à l'abri de la lumière. Après double filtration sous vide à l'aide d'un papier filtre Whatman N° 01, le filtrat a été évaporé sous vide à une température de 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif et lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST Alpha 1-4 LD plus). Après le calcul du rendement d'extraction, l'extrait brut a été conservé à 4°C et

à l'obscurité jusqu'à son utilisation (Messaoudi *et al.*, 2016). Pour éviter les variations de la teneur totale en phénols et de leur activité par différentes préparations, une grande quantité d'extrait a été préparée (Fig. 12).



**Figure 12 :** Filtration sous vide et évaporation du solvant d'extraction de l'extrait éthanolique de *W. frutescens* [Originale].

### 2.3. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée avant l'extraction (Falleh *et al.*, 2008).

$$R\% = (M_{Ext}/M_{Ech}) \times 100.$$

**R** : rendement en % ;

**M<sub>Ext</sub>** : masse de l'extrait obtenue après évaporation du solvant d'extraction en mg ;

**M<sub>Ech</sub>** : masse de l'échantillon végétale utilisée en mg.

### 2.4. Étude phytochimique

#### 2.4.1. Dosage des composés phénoliques

La concentration des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) dans notre extrait a été déterminée par les techniques colorimétriques en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type Jenway (6715 UV-Vis). Ce type de molécules est doté de diverses propriétés biologiques remarquables chez les plantes.

##### 2.4.1.1. Dosage des polyphénols totaux

###### a) Principe

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon le protocole de **Li et al. (2006)** ; **Talbi et al. (2015)**. Cette méthode basée sur la détermination de la concentration des groupements hydroxyles présents dans l'extrait en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif, acide de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxydes métalliques bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). L'intensité de la couleur bleue produite, qui est mesurable à 760 nm, est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le mélange.

### b) Mode opératoire

En bref, 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois dans le méthanol a été ajouté à 200  $\mu$ L d'échantillon ou d'étalon. Après 4 min, la réaction a été neutralisée avec 800  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L). L'absorbance a été mesurée à 760 nm après 2 h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière contre un blanc (tous les constituants en remplaçant l'échantillon par 200  $\mu$ L de méthanol).

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0 à 250  $\mu$ g/mL). L'opération a été répétée trois fois pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) selon la formule suivante (**Bhandari et Rajbhandari, 2014**):

$$PT = C * V / M$$

**C** = concentration d'acide gallique (mg/mL) trouvée à partir de la courbe d'étalonnage ;

**V** = volume de l'extrait utilisé selon le protocole en ml ;

**M** = poids de l'extrait de la plante en gramme.

### 2.4.1.2. Dosage des flavonoïdes

#### a) Principe

La méthode du trichlorure d'aluminium décrite par **Bahorun et al. (1996)** a été utilisée pour déterminer les flavonoïdes. Au cours de cette réaction, l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium entraîne la formation d'un complexe de couleur rose qui absorbe à 430 nm.

**b) Mode opératoire**

1 ml d'extrait de racines de *W. Frutescens* (1 mg/mL) ou de quercétine, dilués dans le méthanol, a été ajouté à des volumes égaux de solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2% (préparé dans le méthanol). Le mélange a été incubé 10 min dans l'obscurité à température ambiante et l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration en flavonoïdes est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 à 20 µg/mL).

La teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) selon la formule suivante (**Bhandari et Rajbhandari, 2014**):

$$FT = C * V / M$$

**C** = concentration de quercétine (mg/mL) trouvée à partir de la courbe d'étalonnage ;

**V** = volume de l'extrait utilisé selon le protocole en mL ;

**M** = poids de l'extrait de la plante en gramme.

**2.4.1.3. Dosage des tanins condensés**

**a) Principe**

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines, sont caractérisés par la formation de pigments anthocyaniques lors de leur oxydation en milieu acide. La méthode colorimétrique de vanilline en milieu acide a été adoptée pour le dosage de ces métabolites en raison de sa sensibilité et sa simplicité. Au cours de cette réaction, la vanilline va réagir avec le groupement flavonoïde terminal des tanins condensés qui se dépolymérisent pour former des complexes de couleur rouge (anthocianidols) qui absorbent à 550 nm (**Schofield et al., 2001**).

**b) Mode opératoire**

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de **Ali-Rachedi et al. (2018)**. Un volume de 50 µL de l'extrait ou du standard a été ajouté à 1500 µL de solution de vanilline (4% dilué dans le méthanol). Le mélange a été vortexé puis un volume de 750 µL de l'acide chlorhydrique concentré a été additionné. Après incubation de 20 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 550 nm contre un blanc (tous les constituants en remplaçant l'échantillon par 50 µL de méthanol).

Une gamme de concentration entre 0 et 2000 µg/mL de catéchine a été préparée pour tracer la courbe d'étalonnage qui permet d'exprimer la teneur des tanins condensés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

#### **2.4.2. Analyse phytochimique de l'extrait éthanolique des racines de *Withania frutescens* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)**

La technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) a été utilisée pour la séparation, l'identification et la détermination structurale des constituants d'un mélange. Le principe de cette méthode est basé sur la transformation des molécules séparés (par chromatographie en phase gazeuse) dans le spectromètre de masse afin d'être fragmentés en ions de masses différentes pour les séparer ensuite en fonction de leur masse (détection des fonctions chimiques caractéristiques de chaque famille de molécules). L'analyse GC/MS a été réalisée à l'aide d'un chromatographe TRACE GC ULTRA THERMO équipé d'une colonne 5MS (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm et épaisseur de film 0,25 mm), couplé à un spectromètre de masse D.S.QII THERMO et un Système Automatique de Déconvolution et d'identification spectrale de masse (AMDIS). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur de la colonne à un débit constant de 0,9 mL/s. L'extrait a été dissous dans du N-méthyl-N-triméthylsilyl trifluoroacétamide (MSTFA : agent de dérivation) et incubé à 37°C pendant 30 min. Une quantité de 0,1 µL de cette solution a été injectée dans l'instrument avec une température d'injecteur de 250°C, tandis que la température du détecteur a été réglée à 290°C. La séparation totale a été observée à 20 minutes au cours desquelles le programme de température du four a été ajusté entre 70 et 270°C à une vitesse de 4°C/min (EL Moussaoui *et al.*, 2021a).

L'identification des composés chimiques, basée sur leur temps de rétention (min), a été effectuée à l'aide de la bibliothèque de l'Institut National des Standards et Technologies (NIST).

#### **2.4.3. Analyse phytochimique de *Withania frutescens* par GC-MS/MS**

La séparation de l'extrait de *W. frutescens* a été effectuée par la colonne DB-5MS 122-5532UI (30 m × 250 µm, 0,25 µm) avec un système de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS-TQ8050, Shimadzu). Un volume d'échantillon de 2 µL a été injecté dans l'instrument. La température du port d'injection était de 280°C. La température du four programmée pour la séparation des pics était la suivante : initialement maintenue à 80°C pendant 1 min, augmentée à 220°C à un taux de 25°C/min et maintenue pendant 2 min, puis finalement augmentée à 300°C à un taux de 25°C/min et maintenue pendant 10 min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1,2 mL/min. Un système MS/MS équipé d'une ionisation électronique (EI) a été utilisé. Les

paramètres MS/MS étaient les suivants Températures de la ligne de transfert MS : 280°C ; température de la source d'ionisation : 250°C ; énergie EI : 70 eV et le mode de surveillance des réactions multiples (MRM) a été utilisé.

## **2.5. Évaluation des activités biologiques**

Les métabolites secondaires des plantes ont une action bénéfique dans la prévention et le traitement de certaines maladies entraînées par le stress oxydant (**Pradhan et al., 2021**). Pour cela, nous avons choisi d'étudier les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires *in vitro* de *W. frutescens* pour s'assurer de leur capacité de neutraliser ou réduire les dommages induits par les métaux lourds *in vivo*.

### **2.5.1. Détermination de l'activité antioxydante in vitro**

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par les techniques colorimétriques en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible dont deux tests différents ont été réalisés : le premier test est basé sur la mesure de la capacité des composés de l'extrait à piéger le radical libre DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle) pour le transformer en composant plus stable. Alors que le deuxième test permet de mesurer le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

#### **2.5.1.1. Test de DPPH**

##### **a) Principe**

Le DPPH est considéré comme un radical libre relativement stable à température ordinaire et soluble dans le méthanol. Ce composé chimique possède un électron non apparié sur un atome d'azote, cette délocalisation empêche la dimérisation de ce radical et provoque aussi sa couleur violette. Le DPPH est capable de réagir avec les groupements hydroxylés des molécules antioxydantes (gagne un atome d'hydrogène) provoquant une diminution de la coloration violette qui est mesurable à 517 nm par le spectrophotomètre (**Brand-Williams et al., 1995**).

##### **b) Mode opératoire**

Une solution stock de DPPH à 0,004% a été préparée dans le méthanol et 1250 µL de cette solution ont été ajoutés à 50 µL de l'échantillon ou du standard à différentes concentrations. Les mélanges ont ensuite été vortexés et incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. L'acide ascorbique a été utilisé comme molécule de référence de la même manière

(Nasri *et al.*, 2017). Le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux DPPH a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité de piégeage des radicaux DPPH (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

**A0** : absorbance du contrôle (solution DPPH) ;

**A1** : absorbance de l'échantillon/étalon.

L'activité antiradicalaire a été exprimée en quantité d'antioxydant nécessaire pour piéger 50% de la concentration inhibitrice de DPPH (IC<sub>50</sub>).

### **2.5.1.2. Test de FRAP**

#### **a) Principe**

L'évaluation du pouvoir réducteur du fer est basée sur la présence d'un réducteur dans l'échantillon testé capable de donner des électrons pour transformer les ions ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>) dans un milieu réactionnel. Cette réaction est caractérisée par un changement de couleur jaune en une couleur bleue mesurable à 700 nm. Le complexe FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> permet de déterminer la concentration des composés phénoliques participant dans la réduction de fer (Berker *et al.*, 2007).

#### **b) Mode opératoire**

1 mL d'extrait ou de standard à différentes concentrations, dilué dans le méthanol, a été mélangé avec 2,5 mL de solution tampon phosphate 0,2 M à pH 6,6 et 2,5 mL de ferricyanure de potassium à 1 % (K<sub>3</sub>Fe [CN]<sub>6</sub>). Le mélange a été incubé dans l'étuve à 50°C pendant 20 min. La réaction a été arrêtée avec 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10 %. Après centrifugation à 1000 tr/min pendant 10 min, 2,5 mL du surnageant ont été ajoutés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure de fer à 0,1 % (FeCl<sub>3</sub>). L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc où l'extrait a été remplacé par le méthanol. L'acide ascorbique a été utilisé comme molécule de référence. Le pouvoir réducteur a été exprimé en concentration efficace médiane (EC<sub>50</sub>) (Gheffour *et al.*, 2015).

### **2.5.2. Détermination de l'activité anti-inflammatoire *in vitro***

L'effet anti-inflammatoire des plantes médicinales est considéré comme un caractère très important à évaluer dans les préparations pharmaceutiques. L'activité anti-inflammatoire de notre échantillon a été évaluée par deux tests, le test de stabilisation de la membrane des érythrocytes via l'induction d'hémolyse par la chaleur, et le test de protection de l'albumine

dans une température élevée. Ces tests pourraient avoir une large application pour la détection des agents anti-inflammatoires sans l'utilisation des animaux.

### **2.5.2.1. Test d'inhibition de l'hémolyse**

#### **a) Principe**

L'hémolyse est un facteur important à évaluer dans les études pharmacologiques car même si une plante médicinale possède une propriété antioxydante puissante, son utilisation est impossible en présence de son effet hémolytique qui est considéré comme un indicateur de toxicité cellulaire. Ce test est basé sur la capacité de l'extrait à stabiliser et protéger la membrane des globules rouges dans un milieu tamponné à une température élevée (**Haddouchi et al., 2016**).

#### **b) Mode opératoire**

Selon la méthode de **Gunathilake et al. (2018)**, un échantillon de sang humain a été prélevé dans un tube hépariné sur un donneur sain qui n'avait pris aucun médicament anti-inflammatoire pendant deux semaines avant l'expérience.

Le sang a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 3min, après élimination du plasma le culot a été lavé trois fois avec une solution saline normale (0,9% NaCl). La suspension d'érythrocytes obtenue a été diluée 10 fois avec un tampon phosphate de sodium 10 mM pH : 7,4. Différentes concentrations d'extrait de racines de *W. frutescens* ont été préparées (4000, 2000, 1000, 500, 250 µg/mL). À chaque concentration de l'extrait, 50 µL de suspension d'érythrocytes et 2950 µL de tampon phosphate ont été ajoutés. Après incubation à 54°C pendant 20 min, le mélange a été centrifugé à 2500 tr/min pendant 3 min et l'absorbance a été mesurée à 540 nm.

Un échantillon d'érythrocytes incubé à 54°C a été utilisé comme témoin d'hémolyse. Le diclofénac sodique a été utilisé comme anti-inflammatoire de référence. L'inhibition de l'hémolyse a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = 100 \times (1 - A_0/A_1)$$

**A<sub>0</sub>** = absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse : 50 µL méthanol, 50 µL de suspension d'érythrocytes et 2950 µL de tampon phosphate) ;

**A<sub>1</sub>** = absorbance des échantillons.

Le résultat obtenu est exprimé en concentration d'extrait pour inhiber 50% d'hémolyse érythrocytaire (IC<sub>50</sub>).

### **2.5.2.2. Test d'inhibition de la dénaturation des protéines**

#### **a) Principe**

La stabilisation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) par les produits naturels est une caractéristique de sélection des molécules anti-inflammatoires thérapeutiquement intéressantes. **Williams *et al.* (2008)** ont développé un test de protection de la BSA lorsqu'elle est exposée à une température élevée.

La stabilisation thermique de la BSA implique que la protéine est incapable de perdre sa structure et donc sa fonction, et sera aussi incapable d'exprimer les antigènes pathogènes (**Williams, 2009**).

#### **b) Mode opératoire**

Le test de dénaturation des protéines a été réalisé en adoptant la méthode décrite par **Chandra *et al.* (2012a)**. Un mélange réactionnel de 5 mL a été préparé, composé de 200 µL de BSA, 2800 µL de tampon phosphate salin pH 6,4 et 2000 µL d'extrait de racines de *W. frutescens* à différentes concentrations. Le mélange a été incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 20 min puis chauffé à 70°C pendant 5 min. Le diclofénac, utilisé comme un médicament de référence a été préparé d'une manière similaire. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 660 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Inhibition de la dénaturation (\%)} = 100 \times (1 - A_2/A_1)$$

**A1** = Absorbance du contrôle (100 % de dénaturation des protéines : 200 µL de BSA, 2800 µL de tampon phosphate salin et 2000 µL méthanol) ;

**A2** = Absorbance de l'échantillon.

Le résultat obtenu est exprimé en concentration d'extrait pour inhiber 50% de dénaturation de la BSA (IC50).

**NB :** pour éviter la dénaturation de la structure moléculaire globale de l'albumine par le méthanol, et aussi l'hémolyse, il faut utiliser des concentrations de 0,1 à 10% de méthanol (**Williams *et al.*, 2008**).

## **2.6. Traitement des animaux**

### **2.6.1. Répartition des animaux**

Les rats Wistar mâles âgés de trois mois, pesant environ  $110 \pm 10$ g, ont été divisés en neuf groupes composés chacun de 06 rats.

**Groupe A** : (témoin) a reçu de l'eau physiologie, le véhicule utilisé pour dissoudre l'extrait de racines de *Withania frutescens* (ERWF).

**Groupe B** : (traité au Pb-Ac) a reçu de l'eau potable contenant 1 g/l d'acétate de plomb.

**Groupe C** : (Pb-Ac + 200 mg/kg/j de ERWF) a reçu de l'eau potable contenant 1 g/l de Pb-Ac et 200 mg/kg/j de ERWF par gavage.

**Groupe D** : (Pb-Ac + 400 mg/kg/j de ERWF) a reçu de l'eau potable contenant 1g/l de Pb-Ac et 400 mg/kg de ERWF par gavage.

**Groupe E** : (traité au Cd-Cl<sub>2</sub>) a reçu de l'eau potable contenant 10 mg/l de chlorure de cadmium.

**Groupe F** : (Cd-Cl<sub>2</sub> + 200 mg/kg/j de ERWF) a reçu de l'eau potable contenant 10 mg/l de Cd-Cl<sub>2</sub> et 200 mg/kg/j de ERWF par gavage.

**Groupe G** : (Cd-Cl<sub>2</sub> + 400 mg/kg/j de ERWF) a reçu de l'eau potable contenant 10 mg/l de Cd-Cl<sub>2</sub> et 400 mg/kg/j de ERWF par gavage.

**Groupe H** : (200 mg/kg/j de ERWF) a reçu 200 mg/kg/j de ERWF par gavage.

**Groupe I** : (400 mg/kg/j de ERWF) a reçu 400 mg/kg/j de ERWF par gavage.

L'intoxication aux plomb et au cadmium a été précédée selon les protocoles rapportés par **Dorostghoal et al. (2014)** et **Saygi et al. (1991)** respectivement. Cette exposition, dans l'eau de boisson, est l'une des principales sources de contamination aux métaux lourds chez les humains et les animaux (**Kadhun, 2019**).

L'administration de l'extrait de racines de *Withania frutescens* par gavage (**Fig. 13**) ressemble au mode de consommation chez l'homme et les doses sélectionnées sont basées sur les résultats de test de toxicité aiguë et subaiguë qui n'a montré aucun effet toxique sur les souris traitées avec l'extrait hydro-éthanolique des racines et des feuilles de cette plante pendant 14 et 28 jours jusqu'à la dose maximale de 2000 mg/kg (**EL Moussaoui et al., 2020a, b**). En prenant cette hypothèse, nous calculons 1/10 de 2000 mg/kg comme dose efficace pour l'administration, 200 mg/kg, et pour obtenir une dose comparative nous prenons le double de 200 mg/kg, 400 mg/kg. Les deux derniers groupes considérés comme des témoins positifs de deux doses pour avoir la toxicité chronique de notre plante.



**Figure 13 :** Gavage des rats avec l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* [Originale].

### 2.6.2. Prélèvement de sang et sacrifice des rats

Après une exposition prolongée de trois mois, les animaux ont été sacrifiés le matin après un jeûne de 12 heures par injection intramusculaire de la kétamine à la dose de 150 mg/kg de poids corporel.

Des échantillons de sang ont été prélevés, dans des tubes héparinés et secs, à partir du sinus rétro-orbitaire à l'aide d'un capillaire à hématocrite pour l'analyse hormonale. Les tubes ont été centrifugés à 30000 tr/10 min, le plasma a été aliquoté dans des tubes Eppendorf et stocké à -20°C jusqu'à leur analyse. Les organes de l'appareil reproducteur (testicule, épидидyme) ont ensuite été prélevés, pesés, rincés avec l'eau physiologie puis fixés dans le formol à 10% pour l'étude histologique (Fig. 14).



**Figure 14 :** Prélèvement du sang et des organes reproducteurs [Originale].

### **2.6.3. Évolution du poids corporel et du poids relatif des organes**

Le poids corporel des animaux a été enregistré chaque semaine pendant toute la période d'expérimentation (3 mois). Après le sacrifice, le poids des organes reproducteurs a été noté et le poids relatif des organes a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Poids relatif de l'organe} = (\text{poids de l'organe} / \text{poids corporel du rat}) * 100$$

### **2.7. Dosage hormonal**

Le dosage hormonal de la testostérone totale a été réalisé au niveau du laboratoire d'analyses médicales du docteur Adnane Hassen, Mostaganem.

Le taux sérique de testostérone total a été déterminé par la technique immunologique à l'aide d'un système d'analyse automatique (Mindray) utilisant le kit Mindray Testostérone (CLIA).

### **2.8. Evaluation de la concentration en spermatozoïdes**

Pour l'évaluation de la concentration en spermatozoïdes, le recueil du sperme a été réalisé à partir de l'épididyme distal. Ce dernier a été placé dans une boîte de Pétri contenant 1 ml de solution physiologique saline à 0,9 % pH 7,4 en effectuant de petites incisions sur la section distale de la queue de l'épididyme proche du canal déférent puis une légère force physique a été appliquée sur la surface de l'épididyme pour faciliter la sortie du sperme (**Fig.15**) (**Boudou et al., 2020**). Le mélange a été homogénéisé et stocké à 4°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à son analyse. Une quantité de 10 µl de suspension homogénéisée de spermatozoïdes a été incubée à 35-37°C pendant 15 à 30 min, puis transférée dans chaque chambre de comptage de l'hémocytomètre (cellule de Malassez). Le nombre total de spermatozoïdes a été compté au microscope optique (grossissement x400), puis exprimé en millions/ml de suspension.

L'analyse du sperme a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyses médicales du docteur Italhi, Mostaganem.



**Figure 15** : Prélèvement du sperme [Originale].

## 2.9. Étude histologique

Les prélèvements histologiques ont été traités au niveau du laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'hôpital Makour Hamou, wilaya d'Ain Defla. Les organes prélevés ont été soumis aux différentes étapes successives selon la méthode de **Hould (1984)**.

### 2.9.1. Fixation

La fixation consiste à désactiver toutes les propriétés mitotiques et enzymatiques afin d'éviter les destructions tissulaires (autolyse) et préservant le tissu avec un aspect plus proche de leur état vivant. Les échantillons ont été immédiatement rincés avec du NaCl à 0.9 % puis fixés dans le formol dilué dix fois (**Fig. 16**). Les organes y seront totalement immergés dans le fixateur dont le volume doit être 20 fois celui du prélèvement. Les organes volumineux ont été coupés en petit morceaux pour assurer la fixation en profondeur des tissus. Après 24 à 48 heures de fixation, les échantillons ont été placés dans les cassettes pour la déshydratation.



**Figure 16** : Fixation des prélèvements histologiques dans le formol à 10% [Originale].

### **2.9.2. Déshydratation, éclaircissement et imprégnation en paraffine**

La déshydratation a pour but l'élimination de l'eau intracellulaire et intratissulaire pour la remplacer par la paraffine en immergeant les pièces dans l'alcool (éthanol ou acétone) de concentration croissante : 50°, 70°, 90° et 100° pour pouvoir réaliser une coupe sans perdre la structure cellulaire au moment de la rupture de la membrane plasmique. La paraffine, substance d'inclusion insoluble dans les alcools, est un mélange d'hydrocarbure solide satiné avec un poids moléculaire élevé.

Pour que cette substance pénètre dans le tissu, il faut éclaircir le fragment déshydraté, par le toluène ou le xylène. En effet, la paraffine n'étant pas soluble dans l'alcool, d'où la nécessité de passer par l'étape d'éclaircissement avec le toluène ou le xylène pour supprimer l'alcool.

Les prélèvements histologiques ont été déshydratés dans un automate composé de 12 bains :

**Premier bain** : Fixation, contient du formol à 10% pour assurer une bonne fixation (1 heure).

**Du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> bain** : Déshydratation, les pièces baignent dans l'éthanol 50°, 70°, 90°, 96° respectivement (1 heure dans chaque bain) pour remplacer l'eau par l'éthanol.

**Du 6<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> bain** : Éclaircissement, les échantillons sont immergés dans le toluène (1 heure dans chaque bain) pour remplacer l'éthanol par toluène. En raison de la non miscibilité de la paraffine dans l'éthanol.

**Du 10<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> bain** : Imprégnation, les pièces sont plongées dans la paraffine fondue à 56°C (1 heure dans les deux premiers baigns et 10 heures dans le dernier bain) pour supprimer le toluène et le remplacer par la paraffine fondue.

### **2.9.3. Inclusion en paraffine**

L'inclusion en paraffine consiste à mettre en blocs les fragments imprégnés afin d'être prêt à la coupe. Les prélèvements histologiques ont été déposés dans des moules d'inclusion métalliques, puis la paraffine fondue a été versée au-dessus de ces fragments. Les moules ont été ensuite placés dans le congélateur pour refroidir (**Fig. 17**).



**Figure 17** : Inclusion dans la paraffine [Originale].

#### **2.9.4. Coupe et étalement**

La coupe permet d'obtenir des sections très fines d'épaisseurs variables de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de tissus destinés à être observés au microscope optique. Les blocs de paraffine obtenus ont été coupés au microtome et l'épaisseur du ruban formé avait une épaisseur de 3 $\mu\text{m}$  (**Fig. 18**). Ces rubans (2 à 3 coupes) ont été ensuite collés sur une lame de verre contenant quelques gouttes d'une solution d'albumine (2g albumine + 50 ml glycérine + 1000 ml d'eau distillé). L'étalement des coupes a été fait sur une platine chauffante réglée à une température de 40°C. Les lames ont été égouttées et séchées à température ambiante ou à l'étuve pendant une nuit à 45 ou 37°C.



**Figure 18** : Coupe des blocs de paraffine à l'aide d'un microtome et formation de rubans [Originale].

### **2.9.5. Coloration et montage des lames**

Puisque les colorants sont hydrophiles, la coloration des coupes doit être passée premièrement par une étape de déparaffinage et réhydratation, cette étape consiste à plonger d'abord les lames étalées et séchées dans des bains de solvant (xylène ou toluène) pour l'élimination de paraffine puis dans des bains d'alcool de concentration décroissant : 96°, 70° and 50° pour réhydrater les tissus, et enfin un rinçage avec l'eau courante pour assurer une réhydratation finale.

La coloration à l'hématoxyline-éosine est la coloration topographique de routine, l'hématoxyline est un colorant basique qui colore les objets acides en bleu-violet, en revanche, l'éosine est acide et teinte donc les structures basiques en rose.

Avant le montage des coupes, une étape inverse de celle menée au début doit être suivie, la déshydratation et éclaircissement est réalisée en plongeant les lames colorées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes puis dans des bains de solvant.

La coloration des lames histologiques a été faite dans un automate de coloration formé de 21 bains répartis comme suit :

**Du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> bain :** Bains de toluène (10 min dans chaque bain) pour le déparaffinage.

**Du 4<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> bain :** Bains d'éthanol de concentrations décroissantes (10 min dans chaque bain).

**Le 7<sup>ème</sup> bain :** est rempli d'eau courante pour rinçage et réhydratation finale (01 min).

**Du 8<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> bain :** sont remplis par l'hématoxyline de Haris qui colore les composants acides (noyaux) en bleu-violet (02 min dans chaque bain).

**Le 10<sup>ème</sup> bain :** est rempli d'eau pour le rinçage du colorant (02min).

**Le 11<sup>ème</sup> bain :** est rempli d'eau acide pour l'élimination de l'excès de colorant (01min).

**Le 12<sup>ème</sup> bain :** est rempli d'eau d'ammoniaque pour fixer la coloration bleue violet sur les composants acides (01min).

**Du 13<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> bain :** sont remplis d'éosine alcoolique à 2% qui colore les composants basiques (cytoplasme) en rose (02 min dans chaque bain).

**Le 15<sup>ème</sup> bain :** est rempli d'eau pour le rinçage et l'élimination de l'excès de colorant (02min).

**Du 16<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> bain :** sont remplis d'éthanol de concentrations croissantes (02 min dans chaque bain).

**Du 19<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> bain :** sont remplis de toluène pour l'éclaircissement (10 min dans chaque bain).

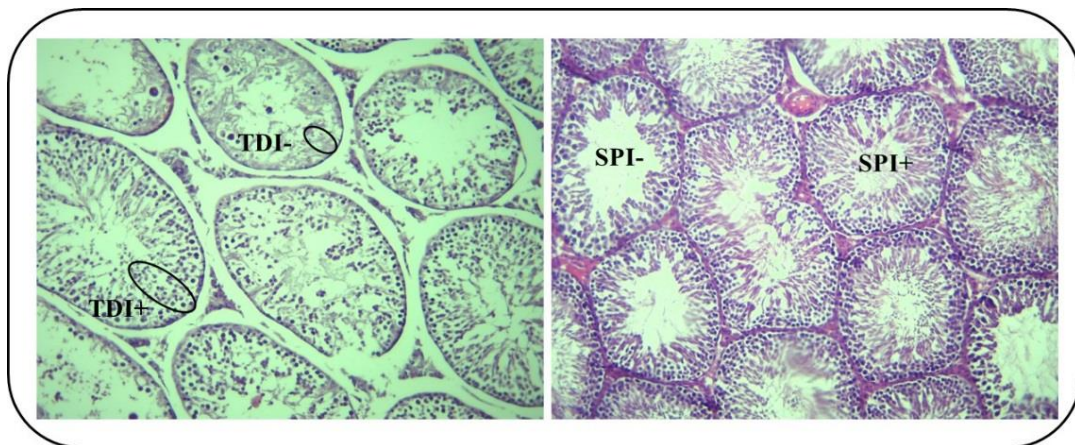
À la fin, une goutte d'Eukitt de montage a été déposée sur la coupe et une lamelle a été immédiatement appliquée sur l'objet en évitant toute bulle d'air entre les deux. Les lames ont été ensuite laissées sécher à l'air libre pour être examinée au microscope.

### 2.9.6. Observation des lames au microscope

L'observation des lames histologiques ainsi préparées a été effectuée sur un microscope optique couplé à une caméra couleur digitale (Optika vision lite 2.1). Toutes les images ont une résolution de  $2592 \times 1944$  pixels.

### 2.10. Étude histo-morphométrique des paramètres testiculaires

L'étude histo-morphométrique du testicule chez les rats témoins et traités a été réalisée à l'aide du logiciel IC Measure (**Fig. 19**). Plus de 50 sections histologiques pour chaque groupe de rats ont été examinées au microscope optique (x400). L'indice de différenciation tubulaire (TDI) a été estimé comme le pourcentage de tubules séminifères qui ont plus de trois couches de cellules germinales différenciées provenant de spermatogonies de type A. Alors que l'indice de spermiogénèse (SPI) a été calculé comme le rapport entre le nombre de tubules séminifères contenant des spermatozoïdes (SPI positif) et le nombre de tubules vides (SPI négatif) (**Mehranjani et al., 2020**).



**Figure 19** : Détermination des indices de spermatogenèse (TDI) et de spermiogénèse (SPI)

[Originale].

### **2.11. Étude statistique**

L'analyse statistique des résultats a été déterminée par le test ANOVA à un facteur, suivie d'un test de Tukey's pour les inter-comparaisons entre les groupes en utilisant le logiciel Past3.

Les taux sériques de testostérone, le poids des animaux et le poids absolu et relatif des organes, le nombre de spermatozoïdes et les indices de différenciation tubulaire (TDI) et de spermiogénèse (SPI) ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart type et  $P < 0,05$  a été considérée comme une différence significative.

### **2.12. Note éthique**

Toutes les expériences étaient conformes à la législation algérienne (loi n°95-322/1995) relative à la protection des animaux utilisés à des objectifs expérimentaux et à d'autres fins scientifiques, ainsi qu'aux directives de l'Association algérienne des sciences animales expérimentales (AASEA, numéro d'autorisation 45/DGLPAG/DVA/SDA/14) relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres objectifs scientifiques.



## *Résultats et discussion*

---

### 1 Rendement d'extraction

La préparation de l'extrait des racines de *W. frutescens* par macération, en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol 80%, a donné un rendement d'extraction égal à **15,79 %** par rapport à 100 g de la masse initiale de matière végétale sèche. En comparant ce résultat avec les travaux précédents, au Maroc, la préparation d'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de cette plante par macération dans l'éthanol et le méthanol à 70% a révélé un rendement d'extraction très proche de notre valeur pour l'extrait éthanolique (15,34%), par contre l'extrait méthanolique a manifesté une valeur légèrement élevée (17,67%) (**EL Moussaoui et al., 2019a**). D'autre part, les feuilles de *W. frutescens* récoltée à Tlemcen, Algérie et macérées dans le méthanol à 80° ont donné un rendement d'extraction supérieur au nôtre (18,06%) (**Bereksi et al., 2018**).

Par ailleurs, une étude menée sur un espèce proche, *Withania somnifera*, dont les racines ont subi une macération dans l'éthanol 70% a donné un rendement d'extraction de 22,19%, plus important à celui trouvé dans notre étude chez *W. frutescens* (**Munir et al., 2022**). Bien qu'auparavant, un rendement moyen de 15,40 % a été obtenu lors de l'extraction hydro-éthanolique des racines de *W. somnifera* (**Machado-Neves, 2022**). Une autre espèce du genre *Withania*, *Withania adpressa* (Coss.) dont les feuilles ont été soumises à une macération méthanolique chauffée à 50°C a révélé un rendement d'extraction de 13,81% (**Salamatullah, 2022a**). Dans son étude réalisée sur *W. somnifera* **Dhanani et al., (2013)** évoquent le solvant et la méthode d'extraction dans la variabilité du rendement d'extraction. La même hypothèse a été formulée par (**Ezez et al., 2023**). Une solanacée du genre *Solanum*, *Solanum elaeagnifolium* collectée à Fez au Maroc en novembre 2021 a exhibé dans ses extraits hydro-éthanolique et hydro-acétonique des rendements d'extraction de 10.2% et 9.36% respectivement, les auteurs de cette étude ont stipulé que le rendement dépendait du solvant et de la partie de la plante (**Boulamti et al., 2022**).

D'une manière générale, le rendement moyen d'extraction considéré comme un indicateur des effets des conditions d'extraction : les conditions de séchage, la méthode d'extraction utilisée, la nature du solvant, la durée d'extraction et les métabolites secondaires présents (**Do et al., 2014**). De plus, la variation du rendement peut être attribuée à la partie de la plante étudiée et à l'origine géographique spécifique de cette espèce (**Mansouri et al., 2011**). Selon **Boulamti et al., (2022)** Il est important de noter que plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement d'extraction, notamment la durée de macération, la période de récolte, la durée de séchage, le solvant d'extraction et la partie de la plante utilisée.

## 2 Teneur en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tanins)

La teneur en : polyphénols totaux (PT), flavonoïdes totaux (FT) et tanins condensés (TC) dans l'extrait hydro-alcoolique des racines de *W. frutescens* a été déterminée selon les courbes d'étalonnage tracées en utilisant l'acide gallique, la quercétine et la catéchine comme standards à différentes concentrations (**Annexe 03**). Tous les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait), en milligramme équivalent de quercétine (mg EQ/g d'extrait) et en milligramme équivalent de catéchine (mg EC/g d'extrait) et sont présentés dans le **Tableau 02**.

**Tableau 02** : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés dans l'extrait hydro-éthanolique des racines de *W. frutescens* exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type.

Echantillons	PT (mg EAG/g d'extrait)	FT (mg EQ/g d'extrait)	TC (mg EC/g d'extrait)
<i>W. frutescens</i>	<b>63,23 <math>\pm</math> 3,82</b>	<b>1,56 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>2,57 <math>\pm</math> 0,23</b>

On observe que l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* possède une quantité appropriée de polyphénols, de flavonoïdes et de tanins. Ces composés phénoliques sont connus pour agir comme des donneurs d'hydrogène et des agents réducteurs pour éviter les dommages générés par les radicaux libres engendrés par le stress oxydant.

Dans notre étude, la teneur moyenne en polyphénols totaux qui est égale à **63,23  $\pm$  3,82 mg EAG/g d'extrait** est relativement élevée par rapport à d'autres résultats de la littérature scientifique. Dans les extraits éthanolique à 70° de racines et de feuilles de la même espèce collectée en avril 2018 (saison du pic du développement et de la floraison) à partir d'un arbuste dans la province de Sefrou au Maroc, les valeurs sont de 53,33  $\pm$  1,20 mg EAG/g d'extrait et 12.04  $\pm$  0.61 mg EAG/g d'extrait respectivement) (**EL Moussaoui et al., 2019b**). La même espèce récoltée au nord du Maroc exprime dans son extrait hydro-éthanolique des feuilles une concentration en polyphénols de 21,704  $\pm$  0,138 mg EAG/g d'extrait (**EI Moussaoui et al., 2020c**). Par contre, **EL Bouzidi et al. (2011)** ont signalé des quantités significativement élevées de polyphénols dans les extraits méthanolique et éthanolique des racines et des feuilles de cette espèce collectée en mars 2009 à El Hassania (20 Km de Marrakech) au Maroc, les valeurs enregistrées sont : 142,0  $\pm$  1,6 mg EAG/g d'extrait dans l'extrait méthanolique des racines, 144,1 $\pm$ 3,7 mg EAG/g d'extrait dans l'extrait méthanolique des feuilles, 166.6  $\pm$  1.8 mg EAG/g

## Résultats et discussion

d'extrait dans l'extrait éthanolique des racines et  $254.8 \pm 2.9$  mg EAG/g d'extrait dans l'extrait éthanolique des feuilles. Ces quantités sont nettement supérieures à la nôtre. Une autre étude menée sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Withania adpressa* a enregistré une valeur faible de  $15,38 \pm 0,72$  mg EAG/g d'extrait (**Salamatullah, 2022a**). Dans l'extrait hydro-méthanolique de racines et de feuilles de *W. somnifera*, **Alam et al., (2011)** rapportent des teneurs en polyphénols de 17,80 mg EAG/g d'extrait dans les racines et  $32.58 \pm 3.16$  mg EAG/g d'extrait dans les feuilles. Au contraire, dans l'extrait hydro-éthanolique des racines de *W. somnifera*, **Hussain et al., (2021)** signalent une quantité fortement élevée de  $183.37 \pm 1.86$  mg EAG/g, tandis que **Munir et al., (2022)** rapportent récemment une concentration encore plus élevée en polyphénols totaux de  $372.81 \pm 7.71$  mg EAG/g d'extrait.

Dans les extraits des feuilles de *W. somnifera*, préparés avec le reflux et la macération dans différents solvants, la quantité des PT obtenue avec la méthode de reflux dans l'extrait méthanolique ( $198,24 \pm 1,16$  mg EAG/g) était la plus élevée, suivi par l'extrait aqueux ( $140,59 \pm 1,82$  mg EAG/g), l'acétone ( $123,83 \pm 1,07$  mg EAG/g) et l'acétate d'éthyle ( $109,48 \pm 1,24$  mg EAG/g) ; cependant, les valeurs des PT en macération avec les différents solvants d'extraction étaient significativement différentes et la teneur en PT la plus élevée était trouvée dans l'extrait méthanolique, qui était de  $187,74 \pm 1,02$  mg EAG/g, suivie de l'extrait à l'acétate d'éthyle avec un taux de  $144,06 \pm 2,01$  mg EAG/g, suivie de l'extrait d'acétone d'une valeur de  $110,69 \pm 1,19$  mg EAG/g et enfin de l'eau d'une valeur de  $101,41 \pm 1,07$  mg EAG/g ; les différences sont très significatives. Comparées à notre valeur, ces teneurs en PT dans les feuilles de *W. somnifera* sont élevées. Les valeurs des PT les plus élevées avec l'extrait au méthanol par rapport à d'autres solvants sont attribuées à sa meilleure polarité et à sa meilleure solubilisation des composants phénoliques chez *W. somnifera* (**Ezez et al., 2023**). Cependant, **Raj et al. (2017)** ont mis en évidence dans les extraits aqueux des racines de *Withania somnifera* et des fleurs de *Withania coagulans* une teneur relativement faible en polyphénols totaux de  $33.1 \pm 0.82$  et  $14.5 \pm 0.78$  mg EAG/g respectivement. Des valeurs faibles similaires pour les PT ont été obtenues par **Dhanani et al., (2013)** dans les extraits aqueux de racines de *W. somnifera* ( $14,90-18,72$  mg EAG/g d'extrait). Cette différence quantitative dans la teneur en polyphénols totaux peut probablement être due à la localisation géographique, aux conditions climatiques et environnementaux, à la période de récolte, au stade de développement de la plante et à la méthode d'extraction utilisée dont les solvants et le temps d'extraction. Par ailleurs, une étude antérieure réalisée sur des fleurs de *Withania somnifera* collectées dans deux zones géographiques différentes (Uttarakhand et Rajasthan) en Inde pour effectuer une étude comparative sur les contenus en polyphénols totaux et les activités antioxydantes, a conclu que la localisation géographique

exerce des effets bénéfiques et vitaux sur la production des constituants actifs et sur la capacité antioxydante des plantes (Adhikari *et al.*, 2020). Plusieurs auteurs supposent que la variabilité du contenu phénolique des plantes pourrait s'expliquer par les différentes procédures d'extraction et des méthodes d'analyses utilisées dans chaque travail. De plus, il a été suggéré que les composés phénoliques présents dans les plantes varient en fonction des conditions de croissance tels que la sécheresse, les changements de température, l'humidité relative, la pollution, les rayons UV et les attaques d'agents pathogènes, entre autres, ou du génotype testé (Chrysargyris *et al.*, 2020; Vinogradova *et al.*, 2023). En plus de ces facteurs, EL Moussaoui *et al.* (2021b) relatent des facteurs liés aux traitements post-récolte (récolte, séchage et extraction). Une étude détaillée met en valeur l'impact des propriétés physicochimiques du sol sur le contenu en polyphénols et flavonoïdes et leur pouvoir antioxydant (Kundra *et al.*, 2017). Dans une étude récente conduite pour évaluer les répercussions de la période de maturation sur la teneur en polyphénols dans les fruits de plusieurs espèces de solanacées du genre *Solanum*, les auteurs affirment que les quantités de polyphénols et l'activité antioxydante sont à leur plus haut degré pendant la pleine maturation du fruit (Staveckienė *et al.*, 2023).

Aucune étude n'a été réalisée sur les teneurs en flavonoïdes totaux et en tanins condensés de cette espèce. La concentration en flavonoïdes de notre extrait est de  $1,56 \pm 0,12$  mg EQ/g d'extrait. Comparativement aux autres espèces du genre *Withania*, des valeurs plus importantes en flavonoïdes ont été enregistrées par Azhar *et al.* (2020) dans les extraits méthanoliques de racines de *W. Coagulans* et *W. somnifera* ( $42.82 \pm 1.189$  mg ER/g d'extrait et  $39.13 \pm 0.607$  mg ER/g d'extrait respectivement), et qui sont supérieures à notre résultat. De même, l'extrait méthanolique des racines et des feuilles de *W. somnifera* a exhibé des taux élevés en flavonoïdes ( $15.49 \pm 1.02$  mg EQ/g et  $31.58 \pm 5.07$  mg EQ/g respectivement) (Alam *et al.*, 2011). Une teneur en flavonoïdes de  $40.54 \pm 0.24$  µg EQ/mg d'extrait a été trouvée dans l'extrait aqueux des feuilles de *W. somnifera* (Alagesan et Venugopal, 2019). Sur la base du poids sec, la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits aqueux des racines de *W. somnifera* variait de 0,64 à 1,10 mg EC/g selon le génotype et la variété étudiée alors que dans l'extrait éthanolique, la teneur totale en flavonoïdes variait de 0,96 à 1,59 mg EC/g (Gulati *et al.*, 2017). Ces valeurs sont proches de la nôtre. Une forte quantité de flavonoïdes a été signalée dans l'extrait hydro-éthanolique des racines de *W. somnifera*, la valeur est de  $148.79 \pm 6.39$  µg EC/g (Munir *et al.*, 2022) tandis que Hussain *et al.* (2021) ont rapporté dans le même extrait une quantité de  $44.02 \pm 1.23$  mg EC/g de flavonoïdes. En Asie, Shahriar *et al.*, (2012) ont rapporté des teneurs élevées en flavonoïdes dans les extraits de méthanol et de chloroforme de racines de *W. somnifera* à  $88,761 \pm 1,032$  mg et  $122,094 \pm 1,351$  mg EQ/g, respectivement. Au contraire,

(Udayakumar *et al.*, 2010) ont noté une quantité faible de 17,32 mg/g de flavonoïdes dans les extraits de racines de *W. somnifera*. Dans les extraits méthanoliques des feuilles, des tiges et des racines de *W. coagulans*, le taux de flavonoïdes étaient respectivement de  $47.00 \pm 0.660$ ,  $44.41 \pm 0.360$ ,  $42.82 \pm 1.189$  mg ER/g d'extrait (Azhar *et al.*, 2020).

Différentes teneurs en flavonoïdes ont été trouvées dans les extraits des feuilles de *W. somnifera* préparés dans différents solvants organiques avec la méthode de reflux et la macération, les valeurs les plus élevées ont été relevées dans l'extrait méthanolique ( $31,52 \pm 0,91$  mg EQ/g), suivi de l'extrait aqueux ( $26,19 \pm 0,62$  mg EQ/g), de l'extrait acétonique ( $17,21 \pm 1,22$  mg EQ/g) et de l'extrait à l'acétate d'éthyle ( $12,89 \pm 1,29$  mg EQ/g). Lors de l'extraction par macération, le TFC le plus élevé a été noté dans l'extrait au méthanol ( $24,10 \pm 0,97$  mg EQ/g), suivi par l'extrait à l'acétone ( $18,25 \pm 1,48$  mg EQ/g), l'extrait aqueux ( $12,06 \pm 1,68$  mg EQ/g) et l'extrait à l'acétate d'éthyle ( $9,72 \pm 1,37$  mg EQ/g) (Ezez *et al.*, 2023). Des valeurs significativement faibles en flavonoïdes ont été obtenues dans les extraits hydro-méthanolique et aqueux de 18 spécimens des racines de *W. somnifera* ramenées du commerce, les valeurs variaient de 0.01 à 0.64 mg EQ/g d'extrait pour l'extrait méthanolique et de 0.02 à 3.41 mg EQ/g d'extrait pour l'extrait aqueux (Polumackanycz *et al.*, 2023).

En revanche, Mahto *et al.* (2022) ont noté une valeur en tanins condensés de 5.89 mg EAT/g de matière sèche dans les racines de *W. somnifera*, ce qui est plus important à nos résultats lors de la conversion de notre valeur en tanins par rapport à la matière sèche de la plante (environ 0.405 mg EC/g de matière sèche). Alagesan et Venugopal, (2019) rapportent un taux de  $156.33 \pm 14.53$  µg EAT/mg d'extrait de tanins dans l'extrait aqueux des feuilles de *W. somnifera*. Alors que, dans les extraits hydro-méthanolique, méthanol-chloroforme-eau et aqueux, la concentration en tanins était de 37,75-36,00-18,19 µg EAT/mg d'extrait (Ganguly *et al.*, 2017).

L'interaction entre la plante et son écosystème (le substrat géologique, la topographie et le climat) joue un rôle modificateur majeur au niveau des polyphénols. Ces métabolites secondaires confèrent à *W. frutescens* une résistance et diverses stratégies d'adaptation pour persister dans des conditions de stress biotiques et abiotiques (EL Moussaoui *et al.*, 2021b).

### 3 Identification phytochimique des phyto-constituants de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* par GC-MS.

La technique d'analyse en GC-MS présentent l'avantage d'avoir des banques de données nécessaires à l'identification des molécules. L'analyse GC-MS avec la méthode de dérivatisation permet d'analyser les composés polaires non volatils qui ne peuvent être

directement analysés en CPG (température d'ébullition ou stabilité à la température inadaptée, sélectivité ou seuil de détection trop faible, ...). La dérivation basée sur la synthèse d'un sous-produit dont les propriétés facilitent son analyse par chromatographie en utilisant la N-Methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA). Le produit obtenu est plus volatil, thermiquement plus stable, et moins polaire que les composés de départ, grâce à l'ajout d'un radical tertio diméthyl silyl sur le groupement acide carboxylique (**Kattan *et al.*, 2012**).

L'analyse GC-MS de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* a permis d'identifier 10 composants majeurs qui sont présents dans le **Tableau 03 et annexe 04**.

D'autres composés bioactifs étaient présents dans cet extrait en quantité insuffisante, notamment le gamma-tocophérol (4,1209 min), la codéine (4,5579 min), le paracétamol (5,2525 min), la mébévérine (5. 2665 min), Ibuprofen-M (5.2952 min), Lincomycine -H<sub>2</sub>O (5.8742), Metformine (6.0529 min), Allopurinol (6.3392 min), Cyclobarbitol (6.5354 min), Methylephedrine (6.8667 min) et Acide caféique (7.5730 min).

**Tableau 03 :** Composants phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* par GC-MS.

Pics	Temps de rétention (min)	Nom de composants
1	3.3228	Phenylephrine 2TMSTF
2	4.3654	1-Ethylpiperidine
3	4.7696	Glycerol 3AC
4	5.4801	Acide Homovanillique MEAC
5	7.8212	Xylitol 5AC
6	8.2394	Bunitrolol-M(HO-) artifact AC
7	8.5394	Fructose 5AC
8	8.6256	Mannose 5AC
9	8.6633	Glucose 5AC
10	15.4003	Saccharose 8AC

Cette analyse indique que l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* est riche en sucre, en composants organiques et en molécules bioactives présentant des activités antioxydante (acide caféique et gamma-tocophérol), anti-inflammatoire (Ibuprofène), anti hyperglycémiant (Metformine), analgésique (Paracétamol), antimicrobienne (Lincomycine), antispasmodique (Mébévérine), effets dépressifs (Codéine, Cyclobarbitol), effet bloquant bêta-adrénergique (Bunitrolol), traitement de la toux et du rhume (Méthyléphédrine) et effet hypouricémiant (Allopurinol).

La présence de ces composés bioactifs justifie les utilisations traditionnelles et actuelles de cette espèce végétale dans la population nord-africaine (**EL Bouzidi et al., 2011; EL Moussaoui et al., 2020c; Mechchate et al., 2021**). Les plantes appartenant au genre *Withania* sont bien connues pour leur riche source de composés bioactifs et leurs propriétés pharmacologiques, elles sont donc couramment utilisées comme plantes médicinales dans le système de santé ayurvédique (**Singh et al., 2022; Verma et al., 2021**).

#### **4 Identification phytochimique des phyto-constituants de l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* par GC-MS/MS**

La GC-MS/MS est similaire à la GC-MS en ce sens que les échantillons subissent une séparation par chromatographie en phase gazeuse avant d'être analysés par le spectromètre de masse. Cependant, la GC-MS/MS utilise un spectromètre de masse en tandem qui nous permet de sélectionner des analytes spécifiques pour une fragmentation individuelle. Cela permet d'analyser plus facilement des mélanges plus complexes.

Le profil chromatographique en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse en tandem, de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* nous a permis de séparer et d'identifier 36 composants (**Tableau 04 et annexe 04**). Parmi eux, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl, 4H-Pyran-4-one, acide n-hexadécanoïque, 1,8,11-Heptadecatriène, acide 9-octadécénoïque, et 7-Isopropenyl-1,4a-diméthyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one, sont des composés majoritaires à des pourcentages de 20,30%, 16,15%, 13,26%, 10,27%, et 7,74% respectivement. D'autres composants sont également présents à des taux appréciables : ester éthylique de l'acide linoléique (5%), 2-Ethenyl-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran (4.44%), ester éthylique de l'acide (E)-9-octadécénoïque (3.6%), Phénol, 3-cyclohexyl (1.63%), acide hexadécanoïque, ester éthylique (1.57%), Pyrazine, 2-ethyl-6-méthyl (1,24%).

**Tableau 04 :** Composants phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* par GC-MS/MS.

Pics	Temps de rétention (min)	Pourcentage d'area (%)	Nome de composant
1	9.80	0.32	2-(methylsulfanylmethoxy) isoindole-1,3-dione
2	10.00	20.30	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl, 4H-Pyran-4-one
3	10.68	0.28	Thiophène, 2,3-dihydro
4	10.92	0.26	Thiophène, 2,3-dihydro
5	11.27	0.30	Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl
6	11.55	0.29	Acide nonanoïque
7	11.63	1.24	Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl-
8	14.74	0.33	Acide pentanoïque, 5-hydroxy-, esters de 2,4-di-t-butylphényle
9	14.87	0.30	2-Hydroxy-1-(1'-pyrrolidiyl)-1-buten-3-one
10	15.05	0.38	Acide 5-méthylsalicylique
11	17.32	0.22	Benzène, 1,2,4,5-tetrachloro-3,6-dimethoxy
12	17.57	0.76	Phénol, 2,3,5,6-tetrachloro-4-methoxy-
13	17.78	0.41	<b>Inconnu</b>
14	18.06	0.33	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-1.alpha., 3a.beta., 4.alpha., 7.beta.)]-
15	18.26	7.74	7-Isopropenyl-1,4a-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one
16	18.38	0.56	Tricyclo[3.2.1.0(2,7)]oct-3-en-6-ol, 3,5,7-trimethyl-8-methylene-, stereoisomer
17	18.43	0.28	<b>Inconnu</b>
18	18.57	4.44	2-Ethenyl-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran
19	18.97	0.68	2,2'-Bipyridine, 4,4'-dimethyl
20	19.09	1.63	Phénol, 3-cyclohexyl
21	19.70	4.77	<b>Inconnu</b>

## Résultats et discussion

22	19.75	16.15	Acide n-hexadécanoïque
23	19.95	1.57	Acide hexadécanoïque, ester éthylique
24	20.41	0.30	Acide cis-10-Heptadécénoïque
25	20.59	0.46	Acide heptadécanoïque
26	20.92	0.27	Méthyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate
27	20.98	0.26	Acide 9-octadécénoïque (Z)-, ester méthylique
28	21.40	13.26	1,8,11-Heptadecatriene, (Z, Z)
29	21.44	10.27	Acide 9-octadécénoïque, (E)
30	21.56	5.00	Ester éthylique de l'acide linoléique
31	21.60	0.60	Ester éthylique de l'acide (E)-9-octadécénoïque
32	21.62	0.64	<b>Inconnu</b>
33	21.80	0.25	Acide octadécanoïque, ester éthylique
34	22.43	0.26	Acétylcitrate de tributyle
35	22.83	0.70	Fercomin
36	23.56	0.99	Ester bis(2-éthylhexyle) de l'acide hexanedioïque

Cette analyse montre que l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* est principalement constitué de métabolites bioactifs avec des profils biologiques différents. Il a été constaté que les composants majeurs qui représentent 20,3% et 16,15% de l'extrait, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl, 4H-Pyran-4-one ou DDMP et l'acide n-hexadécanoïque (ou acide palmitique), ont des capacités antioxydantes puissantes en piégeant le radical cationique ABTS<sup>•+</sup>, le radical DPPH et le radical galvinoxyle (**Chen et al., 2021**); **Hwang et al., 2013**; **Parthipan et al., 2015**). De plus, les études structurales et cinétiques permettent de conclure que l'acide palmitique est un inhibiteur de la phospholipase A2 et donc un agent anti-inflammatoire (**Aparna et al., 2012**). En outre, des résultats précédents ont montré que le 7-Isopropenyl-1,4a-diméthyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one, qui est connu par le nom  $\alpha$ -Cyperone, réduisait considérablement le stress oxydatif et l'apoptose cellulaire induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la libération de LDH et la production de ERO. Cette activité anti-inflammatoire de l' $\alpha$ -cyperone est associée à la régulation à la baisse de COX-2 et IL-6 via la régulation négative de la voie NF $\kappa$ B (**Huang et al., 2020**). De plus, des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et rubéfiantes/contre-irritantes ont été détectées chez le composant 10, l'acide 5-Methylsalicylique (**Dasgupta et Wahed, 2021**; **Miles, 2007**). Et d'autre propriété antimicrobienne est mentionnée chez le composant 12, Phénol, 2,3,5,6-tetrachloro-4-methoxy- (Drosophiline A) (**Teunissen et al., 1997**).

## 5 Evaluation des activités biologiques

Les activités antioxydantes et anti-inflammatoires in vitro ont été exprimées en IC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub> pour FRAP). Il convient de noter que plus la valeur de l'IC-50 est faible plus l'activité antioxydante/anti-inflammatoire du produit est élevée. Tous les résultats sont présentés dans le **tableau 05 et annexe 05**.

**Tableau 05 :** Activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* exprimées en moyenne ± écart-type.

Echantillons	Activité antioxydante		Activité anti-inflammatoire	
	DPPH (µg/mL)	FRAP (µg/mL)	Inhibition d'hémolyse (µg/mL)	Inhibition de la dénaturation des protéines (µg/mL)
<i>W. frutescens</i>	25.16 ± 1.21	163.19 ± 6.01	12.71± 1.06	6.85 ± 0.90
Acide ascorbique	4.82 ± 0.11	2.09 ± 0.23	/	/
Diclofénac	/	/	45.12± 10.07	325.53 ± 4.44

Sur la base des résultats obtenus, nous observons que l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* a une activité de piégeage des radicaux libres moins importante que celle mesurée dans l'acide ascorbique, ainsi qu'un pouvoir réducteur modéré.

A partir de l'activité de piégeage du radical DPPH, il est noté que le pouvoir d'inhibition des radicaux libres pour l'extrait de racines de *W. frutescens* dont l'IC<sub>50</sub> est de 25.16 ± 1.21µg/ml était important par rapport à la valeur du contrôle, l'acide ascorbique (une différence de 20 µg/ml) et faible par rapport à d'autres études. *Withania frutescens* étudiée au Maroc a montré une activité anti-radicalaire plus élevée dans l'extrait de racines (IC<sub>50</sub> = 0,36 µg/mL), cette valeur est plus proche du contrôle utilisé, le BHT (IC<sub>50</sub> = 0.12 µg/mL) (une différence de 0,20 µg/ml) (**EI Moussaoui et al., 2019b**). La variété marocaine est donc meilleure en terme de potentiel antioxydant que l'espèce algérienne. Cette variation des valeurs IC<sub>50</sub> dépend de la méthode DPPH et du contrôle utilisé ; le BHT a une valeur IC<sub>50</sub> trois fois inférieure à celle de l'acide ascorbique (**Boulebd, 2019**). Alors que **EL Bouzidi et al. (2011)** ont trouvé une activité antiradicalaire sur DPPH proche de la nôtre dans l'extrait méthanolique.

## Résultats et discussion

L'activité antioxydante sur DPPH a révélé que la concentration ( $IC_{50}$ ) de l'extrait éthanolique des racines de *Withania aristata* (RWA) a été déterminée à  $14 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ , ce qui est important par rapport au BHT et à la quercétine qui ont enregistré  $10,5 \pm 0,4$  et  $12 \pm 1 \mu\text{g/ml}$  respectivement. L'extrait de racines de *Withania somnifera* présentait une  $IC_{50}$  de  $18 \mu\text{g/ml}$ , supérieure à celle enregistrée pour le RWA (Munir *et al.*, 2022). Les extraits méthanoliques des feuilles, des racines et des fleurs de *Withania somnifera* présentaient une  $IC_{50}$  de  $101.73 \pm 8.96$ ,  $801.93 \pm 7.92$ ,  $345.68 \pm 8.98 \mu\text{g/ml}$  respectivement contre une  $IC_{50} = 25.95 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}$  pour l'acide ascorbique et une  $IC_{50} = 38.14 \pm 0.89 \mu\text{g/ml}$  pour le BHT (Alam *et al.*, 2012). Dhanani *et al.*, (2013) ont déterminé l'activité antioxydante dans des extraits aqueux de racines de *W. somnifera* et ont obtenu une valeur DPPH comprise entre 0,40 et 1,20 mg/mL. En revanche, Chaudhary *et al.*, (2020) ont rapporté une valeur DPPH plus élevée (4612,17  $\mu\text{g/mL}$ ), tandis que Ganguly *et al.*, (2017) ont obtenu une valeur plus faible de DPPH (111,31  $\mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50}$ ). Nos résultats de l'activité antioxydante par les méthodes DPPH et FRAP sont supérieurs à ceux enregistrés pour *Withania aristata* (Alzahrani, 2022).

L'extrait brut de *Withania adpressa* possède une capacité d'inhibition des radicaux libres DPPH et un pouvoir réducteur plus faible par rapport à notre résultat ( $49,01 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$  et  $119,61 \pm 1,81 \mu\text{g/mL}$  respectivement) (Salamatullah, 2022b). La fraction riche en polyphénols préparée à partir des feuilles de *Withania adpressa* a enregistré une valeur  $IC_{50}$  de  $27,84 \pm 1,48 \mu\text{g/mL}$ , ce qui peut être considéré comme important par rapport à celle obtenue avec le BHT ( $13,42 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ ) et la quercétine ( $14,27 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$ ) (Salamatullah, 2022a). Chez *Solanum elaeagnifolium*, collectée au Maroc dans la ville de Fès en novembre 2021, les valeurs DPPH étaient  $IC_{50} = 0,081 \pm 0,004 \text{ mg/mL}$  pour l'extrait hydro-éthanolique (HEE) et  $0,198 \pm 0,019 \text{ mg/mL}$  pour l'extrait hydro-acétonique (HAE), les deux extraits étant supérieurs au BHT ( $0,122 \pm 0,021 \mu\text{g/mL}$ ). Dans le test FRAP, L'HAE a présenté une activité antioxydante plus élevée ( $EC_{50} = 0,08256 \pm 0,005105 \text{ mg/mL}$ ) que l'HEE ( $EC_{50} = 0,1157 \pm 0,0400 \text{ mg/mL}$ ), mais cette activité est restée inférieure à celle du BHT ( $0,362 \pm 0,010 \mu\text{g/mL}$ ). Bien que le test FRAP ait montré de faibles valeurs du pouvoir réducteur de fer pour les deux extraits par rapport au BHT, l'activité antioxydante globale des deux extraits s'est avérée considérable (Bouslamti *et al.*, 2022). L'activité antioxydante de notre extrait pourrait être en étroite corrélation avec la présence de DDMP, l'acide palmitique et les acides caféique et homovanillique.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* a manifesté une activité anti-inflammatoire intéressante. En effet, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse qui traduit la stabilisation de la membrane érythrocytaire est plus élevé ( $12.71 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$  vs  $45.12 \pm 10.7 \mu\text{g/ml}$ ) et la stabilisation thermique de l'albumine est nettement supérieure

## *Résultats et discussion*

( $6.85 \pm 0.90$   $\mu\text{g/ml}$  vs  $325.53 \pm 4.44$   $\mu\text{g/ml}$ ) comparativement à celle obtenue avec le diclofénac. Cette propriété est vraisemblablement attribuée à sa richesse en composants anti-inflammatoires qui sont mentionnés précédemment.

La thérapeutique anti-inflammatoire est basée sur l'utilisation d'agents stabilisants la membrane du lysosome pour empêcher la sécrétion des enzymes hydrolytiques qui endommagent les tissus en induisant la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et l'activation de protéines responsables de l'inflammation (pro-inflammatoires) (**Tasneem et al., 2018**). Les érythrocytes sont largement utilisés comme modèle de la membrane lysosomale pour tester la toxicité et les effets protecteurs des composants actifs car ils sont très sensibles au stress oxydatif endogène ainsi que leur membrane est similaire à la membrane lysosomale (**Bonam et al., 2019**).

La stabilisation de la membrane des érythrocytes lors du traitement avec l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* pourrait être intimement liée à l'existence de l'Ibuprofène. En effet, des recherches indiquent que cette plante a une activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition maximum de  $82.20 \pm 8.69\%$  obtenu à la dose de 450 mg/kg (**EL Moussaoui et al., 2020ca**). Les résultats de l'activité cytotoxique de l'extrait éthanolique des racines de *W. somnifera* suggèrent que cette plante médicinale possède un potentiel significatif ( $P < 0,05$ ) de stabilisation membranaire (antihémolytique) ainsi qu'un potentiel thrombolytique et protecteur de l'ADN (**Munir et al., 2022**).

Dans des modèles d'induction de l'inflammation *in vivo*, l'œdème de l'oreille induit par le xylène et l'œdème de la patte induit par le blanc d'œuf et la carragénane chez des rats Wistar, l'extrait hydro-éthanolique des racines de *Withania somnifera*, a illustré respectivement une inhibition en fonction du temps et dose dépendante avec un maximum à 4 heures et à la dose de 500mg/kg de  $49.28 \pm 1.90\%$ ,  $43.00 \pm 12.44\%$ ,  $66.28 \pm 9.31\%$  contre respectivement l'indométacine ( $56.42 \pm 13.17\%$ ), la chlorphéniramine ( $62.02 \pm 12.21\%$ ) et le diclofénac ( $89.93 \pm 18.53\%$ ) (**Hussain et al., 2021**). Au contraire, la fraction riche en polyphénols des feuilles de *Withania adpressa* a fortement atténué l'effet inflammatoire de la carragénane injectée dans le fascia plantaire des rats, entraînant une inhibition allant jusqu'à  $89,0 \pm 2,08 \%$  à la dose testée la plus élevée (500 mg/kg), l'inhibition du diclofénac est de  $91.51 \pm 2.41\%$  (**Salamatullah, 2023**). De même, l'extrait de la partie aérienne de *Withania coagulans* préparé dans un mélange de méthanol-chloroforme (1:1) a diminué l'effet inflammatoire de la carragénane injectée dans la patte droite des rats, de 70.0% alors que dans le modèle d'œdème induit avec l'histamine, le pourcentage d'inhibition est de 74.3%, à la dose maximale de

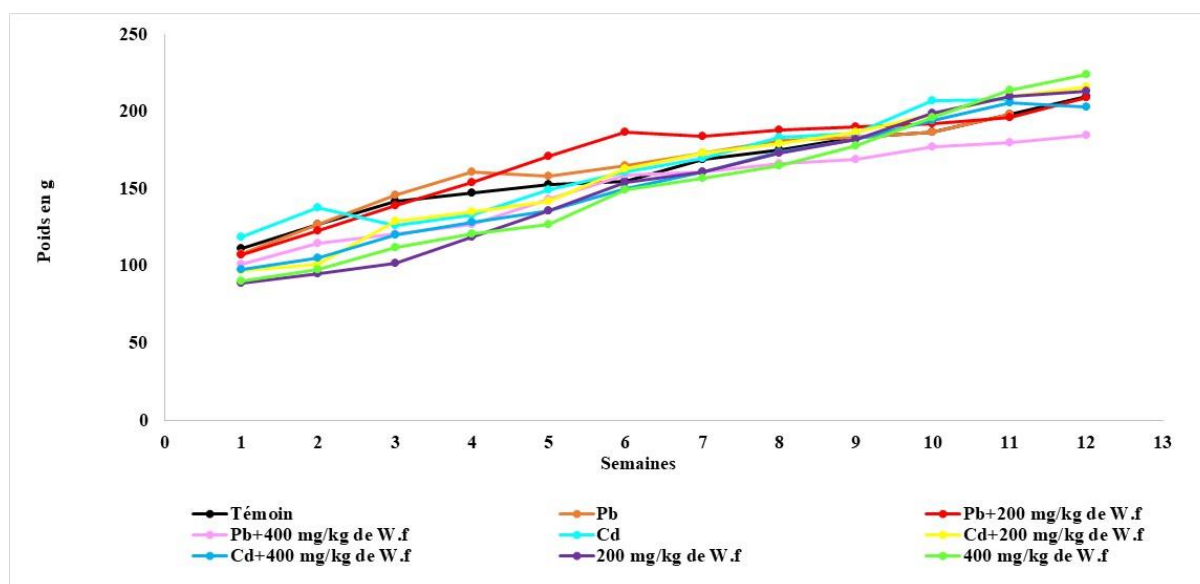
200mg/kg tandis que le maléate de chlorphéniramine (témoin positif) présentait une inhibition de l'œdème de 77 % (Ismail *et al.*, 2017).

La dénaturation des protéines est l'une des causes majeures et bien documentées de l'inflammation, Une étude a été conduite pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait hydro-alcoolique d'ashwagandha (*W. somnifera*) contre la dénaturation des protéines *in vitro*. Les résultats ont montré une inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines (albumine) par l'extrait d'ashwagandha, l'effet du diclofénac sodique s'est avéré être moindre par rapport à l'extrait test, les auteurs ont conclu que l'ashwagandha possédait un effet anti-inflammatoire marqué contre la dénaturation des protéines *in vitro* (Chandra *et al.*, 2012b). C'est le cas aussi de notre plante, *Withania frutescens*. Une autre étude menée sur la *W. somnifera* a montré que l'extrait brut a provoqué un inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines avec un effet maximal de 59.48% à 500 mg/mL (Khan *et al.*, 2015).

Les extraits méthanoliques de feuilles, de fruits et de racines de *Solanum khasianum* de la famille des Solanacées, genre *Solanum* ont été étudiés pour leur activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la stabilisation membranaire des globules rouges humains (HRBC). L'extrait de racines de *S. khasianum* a révélé une forte activité anti-inflammatoire dose-dépendante *in vitro* avec  $83,97 \pm 0,36$  % d'inhibition de l'hémolyse à 1 mg/ml, par rapport aux extraits des fruits ( $81,68 \pm 0,82$  %) et des feuilles ( $70,93 \pm 0,38$ %), Le diclofénac, un médicament anti-inflammatoire standard, a montré comparativement une activité anti-inflammatoire maximale ( $85,49 \pm 0,51$  %) à une concentration de 1 mg/ml (Chirumamilla et Taduri, 2023). Auparavant, Gogoi *et al.*, (2021) ont trouvé avec le test de dénaturation des protéines, dans les extraits méthanoliques des feuilles et des baies de *Solanum khasianum* un pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines de  $69.40 \pm 0.301$ % et  $72.38 \pm 0.032$ % respectivement, contre celui du diclofénac de  $73.01 \pm 0.106$ % à la concentration de 30µg/ml avec des IC<sub>50</sub> de 23.37 µg/ml pour les feuilles et 20.96 µg/ml pour les baies et 18.88 µg/ml pour le diclofénac.

## 6 Evolution du poids corporel et du poids relatif des organes

Les animaux peuvent répondre de manière différente à l'alimentation après une période d'exposition chronique aux conditions expérimentales. Certains ont une vitesse de croissance plus importante comparativement aux autres. Le résultat de l'évolution du poids corporel pendant la durée de l'expérimentation a été illustré dans la figure 20.



**Figure 20** : Evolution du poids corporel des animaux pendant la durée de l'expérimentation.

D'après les résultats obtenus de l'évolution pondérale, les rats intoxiqués aux plomb ont une vitesse de croissance élevée au début de l'expérimentation, mais cette croissance n'a pas persisté après la quatrième semaine et ensuite elle est devenue identique à celle des témoins. Par ailleurs, le poids corporel des rats intoxiqués au cadmium a augmenté parallèlement au groupe précédant et le témoin, puis une légère diminution a été remarquée après la deuxième semaine avec une vitesse de croissance faible.

Les rats intoxiqués au plomb plus 200 mg/kg de l'extrait de *W. frutescens* ont une vitesse de croissance accélérée par rapport à tous les autres groupes. Après la 9<sup>ème</sup> semaine cette croissance devient similaire à celle des rats témoins.

Tandis que, chez le groupe exposé au plomb plus 400 mg/kg de l'extrait de *W. frutescens*, la vitesse de croissance est faible par rapport à celle des autres groupes et sans pouvoir atteindre le poids des rats témoins.

De plus, une croissance élevée a été notée chez les rats exposés aux cadmium plus 200 mg/kg de l'extrait de *W. frutescens*, mais cette croissance reste moins importante à celle des rats témoins jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine puis ré-augmente comparativement à ce dernier.

Tandis que, le groupe des rats intoxiqués aux cadmium plus 400 mg/kg de l'extrait de *W. frutescens* a montré une vitesse de croissance faible en comparaison avec les témoins.

Les deux derniers groupes, 200 et 400 mg/kg de l'extrait de *W. frutescens*, ont une vitesse de croissance presque identique et similaire au groupe témoin.

## Résultats et discussion

A la fin de l'expérimentation, le poids corporel des animaux a été calculé pour étudier les changements pondéraux. Les organes prélevés ont été pesés afin de calculer le poids relatif de ces derniers. Ces résultats sont cités dans le **tableau 06**.

**Tableau 06** : Poids finaux, corporel, absolu des organes et relatif des organes. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type.

Groupes	Poids corporel (g)	Poids absolu des organes (g)		Poids relatif des organes (g)	
		Testicules	Epididyme	Testicules	Epididyme
Témoin	210.66 $\pm$ 22.58	1.42 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.25	0.67 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.16
Pb	219,16 $\pm$ 34.74	1.62 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.06
Pb+200 mg/kg de W.F	209.83 $\pm$ 20.15	1.52 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.22	0.73 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.10
Pb+400 mg/kg de W.F	177.83 $\pm$ 17.72	1.49 $\pm$ 0.18	0.74 $\pm$ 0.18	0.84 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.11
Cd	218.33 $\pm$ 46.92	1.54 $\pm$ 0.25	0.89 $\pm$ 0.35	0.73 $\pm$ 0.2	0.36 $\pm$ 0.15
Cd+200 mg/kg de W. F	222 $\pm$ 23.24	1.58 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.10	0.72 $\pm$ 0,07	0.30 $\pm$ 0.05
Cd+400 mg/kg de W. F	211.33 $\pm$ 9.28	1.36 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.02
200 mg/kg de W.F	213,5 $\pm$ 22.55	1.52 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.35	0.71 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.01
400 mg/kg de W. F	211.5 $\pm$ 23.39	1.55 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.02

A partir de ces données, il a été observé qu'il n'y a pas d'influence des métaux lourds sur le poids corporel des animaux après exposition quotidienne durant trois mois, même lors du traitement avec l'extrait de la plante. Aucune différence significative n'a été observée entre le poids corporel des animaux intoxiqués aux plomb et cadmium ainsi que les animaux co-traités avec l'extrait de racines de *W. frutescens* et celui des animaux témoins. De plus, des variations non significatives ont été observées dans les poids absolu et relatif des testicules et épидидymes chez les groupes traités par rapport aux non traités. Comparativement aux travaux précédents, ce résultat est bien cohérent avec les études précédentes de la littérature scientifique (**Gorbel et al., 2002; Hachfi et al., 2008**). Des rats soumis à 50mg de CdCl<sub>2</sub>/l dans l'eau de boisson pendant 40 jours n'ont pas subi de changement pondéral corporel, mais sur le testicule une baisse pondérale significative a été notée ( $p < 0.05$ ) (**Venditti et al., 2021**).

D'autre part, contrairement à nos résultats, une augmentation du poids relatif des testicules chez des souris exposées à 150 mg/kg/jour d'acétate de plomb pendant un cycle de l'épithélium

séminifère (34,5 jours) a été rapportée par **Khodabandeh et al. (2020)**. Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats soumis à 8 mg/kg/jour de plomb, 5 jours par semaine pendant 35 jours (**Thoreux-Manlay et al., 1995a**). Cependant, l'acétate de plomb administré à des rats Wistar par voie intrapéritonéale pendant 56 jours a provoqué une diminution significative du poids des testicules, de la prostate, de l'épididyme et des vésicules séminales (**Olanian et al., 2022**). Ceci s'accorde avec les résultats obtenus chez des rats mâles exposés à une toxicité reproductive chronique induite par le plomb par **Abdel-Emam et Ahmed (2021)**, il a été formulé que l'acétate de plomb a conduit à une diminution significative du poids corporel, absolu et relatif des testicules des rats par rapport au groupe témoin négatif, ce qui corrobore les résultats rapportés précédemment par **Udefa et al., (2020)** chez des rats Wistar exposés chroniquement (60 jours) à l'acétate de plomb.

De plus, des données similaires à nos résultats ont été notées dans le poids des testicules chez les rats exposés à 5, 50, et 100 ppm de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) durant 100 jours, tandis qu'une diminution significative a été observée dans les poids de l'épididyme, des glandes séminales et de la prostate spécifiquement chez les traités avec 100 ppm de  $\text{CdCl}_2$  par rapport à celui des témoins (**Elgawish et Ghanem, 2014**). Au contraire, une variation significativement différente du poids corporel chez les rats intoxiqués au chlorure de cadmium par rapport au rats témoins a été mentionnée dans l'étude de **Nna et al. (2017)**, le poids absolu et relatif du testicule et de l'épididyme était significativement diminué dans le groupe  $\text{CdCl}_2$ , par rapport au contrôle. Chez des souris mâle C57BL/6 exposées in utero et pendant 24 semaines après le sevrage à une faible dose de cadmium (5ppm) dans l'eau de boisson, un effondrement pondéral s'est produit dans le corps et les testicules (**Xiong et al., 2022**). De même chez des souris mâles C57BL/6 injectées par voie intrapéritonéale au cadmium à différentes doses pendant 10 jours, au cours de la période d'exposition, le poids corporel des souris a diminué à partir de la deuxième semaine après le traitement avec 2 mg/kg de cadmium alors qu'il a diminué à partir de la troisième semaine après le traitement avec 0,5 et 1 mg/kg de cadmium. Cependant, il n'y avait pas de différence significative en terme de poids testiculaire/corps entre les quatre groupes à la fin de l'exposition (**Yi et al., 2022**).

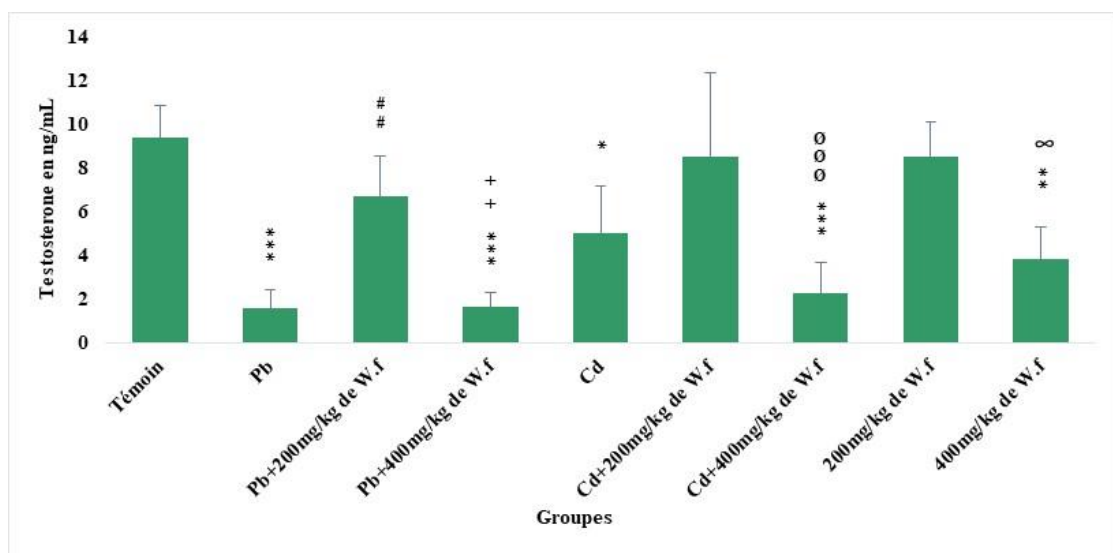
Une exposition aiguë de 15 jours au cadmium chez des rats a entraîné une chute pondérale significative du poids du corps, celui-ci a chuté de 28g, les poids absolus des testicules et de l'épididyme n'ont pas variés mais les poids relatifs des testicules et de l'épididyme ont significativement augmenté (**Iqbal et al., 2021**). Pareillement, des rats soumis à une exposition sub-chronique (90 jours) au cadmium ont montré une augmentation significative du poids des testicules ( $P < 0.05$ ) et de l'épididyme ( $P < 0.01$ ) ; de plus, des augmentations significatives du

poids des testicules ( $P < 0,01$ ) et de l'épididyme ( $P < 0,001$ ) suite à une exposition simultanée au cadmium et au diazinon ont été détectées (Adamkovicova *et al.*, 2014). Des camélidés élevés dans un environnement situé à proximité d'un site industriel source de pollution au cadmium et au plomb ont fait l'objet d'une étude pour examiner l'impact de cette exposition environnementale au plomb et cadmium sur le testicule et il s'est avéré que le poids et le volume de cet organe ont fortement diminué sous les effets négatifs de ces contaminants (Ullah *et al.*, 2023).

L'absence de variation significative dans le poids corporel ainsi que dans les poids absolus et relatifs des testicules et de l'épididyme dans nos expériences pourrait indiquer que les doses administrées d'acétate de plomb et de chlorure de cadmium étaient probablement inférieures au seuil pouvant provoquer une réduction de poids. Le poids corporel et le poids des organes des animaux intoxiqués au cadmium et au plomb séparément et co-traités avec l'extrait hydro-éthanolique de *W. frutescens* n'ont pas été affectés. Il a été observé que les rats traités avec l'extrait hydro-éthanolique de racines et de feuilles de *W. frutescens* dans des conditions de toxicité aiguë et subaiguë n'ont pas montré d'effets toxiques sur le poids corporel (EL Moussaoui *et al.*, 2020b).

## 7 Dosage hormonal

Le taux de testostérone sérique des différents groupes d'animaux, exprimé en moyennes  $\pm$  écart-type est représenté dans la figure 21.



**Figure 21** : Taux de testostérone sérique dans les différents groupes. \* comparativement au témoin, # comparativement au groupe traité par le plomb, + comparativement au groupe traité par le plomb plus 200 mg/kg de *W. frutescens*, Ø comparativement au groupe traité par le cadmium

## ***Résultats et discussion***

plus 200 mg/kg de *W. frutescens*, ∞ comparativement au groupe traité par 200 mg/kg de *W. frutescens*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Après 90 jours d'expérimentation, une réduction hautement significative de la testostérone a été observée chez le groupe traité par le plomb ( $1.58 \pm 0.82$  ng/mL,  $p < 0.001$ ) et significative chez le groupe traité par le cadmium ( $5.008 \pm 1.52$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) par rapport au témoin ( $9.39 \pm 1.45$  ng/mL) avec un pourcentage de diminution de 83% et 46% respectivement. Partant de ces résultats, on peut déduire que les deux métaux présentent une toxicité élevée sur le taux de testostérone sérique mais la toxicité du cadmium est moindre que celle du plomb. Ces données s'alignent avec celles de plusieurs études toxicologiques approfondies qui ont démontré une réduction du niveau de testostérone sérique lors de l'exposition aux plomb et au cadmium (**Chabchoub et al., 2021; Olaniyan et al., 2022**). Concernant le plomb, des résultats similaires ont également été trouvés par **El-Sayed et El-Neweshy (2010)** et **Hachfi et al. (2008)** chez des rats exposés au Pb pendant 60 jours, où le taux de testostérone plasmatiques a diminué avec un pourcentage de diminution de 45% et 46% respectivement. De plus, une baisse significative de testostérone, de LH et de FSH sériques a été notée par **Abdel-Emam et Ahmed (2021)** chez des rats exposés à 50mg/kg de plomb par voie orale pendant 40 jours. Des résultats comparables de chute hormonale (testostérone, LH et FSH) ont été obtenus chez des rats exposés à l'acétate de plomb pendant 60 jours (**Behairy et al., 2022**), et des rats soumis à une administration orale de plomb à la concentration de 1000 ppm/kg pendant 35 jours (**Soleimanzadeh et al., 2018**).

Concernant le cadmium, des résultats rapportés par **Orororo et al. (2018)** ont confirmé que l'administration de ce métal a abaissé les niveaux de LH et de testostérone sériques et augmenté les niveaux plasmatiques de FSH. **Saeed (2013)** a noté que la bioaccumulation de Cd dans les cellules de Sertoli diminue la synthèse et la libération de l'inhibine (le principal signal inhibiteur de la sécrétion de FSH) provoquant alors l'augmentation de la FSH plasmatique. Un déclin de la testostérone a été également observé chez des souris exposées par voie orale pendant 35 jours à 10mg/kg de cadmium (**Annie et al., 2023**).

La testostérone en tant que stéroïde à 19 carbones est le principal androgène sécrété essentiellement par les cellules de Leydig et largement évalué au niveau clinique par dosage immunologique lors des troubles endocriniens (**Wang et al., 2017**). La diminution de cette hormone suite à l'exposition aux deux métaux, le Pb et le Cd est due soit à une variation de la sécrétion de LH, alors qu'il a été rapporté que ces métaux perturbent le système nerveux central (SNC) en affectant l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire sous différents aspects ce qui a

entraîné des changements dans le schéma quotidien des niveaux de LH plasmatique (**Klein et al., 1994; Wang et Du, 2013**), soit au déclin de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, ce qui a été confirmé par la diminution du niveau de testostérone interstitielle chez le rat exposé au Pb pendant 60 jours (**Olaniyan et al., 2022**). De plus, il a été démontré que la concentration de testostérone chez les rats traités par le Pb restait inférieure à celle des rats témoins, même après stimulation par l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante (LHRH) (**Thoreux-Manlay et al., 1995a**). Une autre étude a rapporté que le Pb a entraîné une diminution de l'activité des marqueurs et enzymes de la stéroïdogénèse : StAR, CYP17A1, 3 $\beta$ -HSD et 17 $\beta$ -HSD (**Ajarem et al., 2021**). Par ailleurs, le Cd a également diminué l'expression génétique de la 3 $\beta$ -HSD, de la StAR et de la 17- $\beta$  HSD dans les cellules de Leydig (**Akinola et al., 2021; Kadry et Megeed, 2018; Yang et al., 2022**). En effet, chez des souris mâles traitées avec des injections intrapéritonéales de 0, 0,5, 1,5 et 2,5 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg/jour pendant 10 jours, Le marquage immuno-histochimique de la 17- $\beta$  HSD dans les cellules de Leydig a montré que dans le groupe témoin, la coloration immunologique de la 3 $\beta$ -HSD a été fortement détectée dans le compartiment interstitiel du testicule ( $8,10 \pm 0,78$ ), la coloration a été légèrement diminuée dans les groupes 0,5 et 1,5 mg/kg ( $5,23 \pm 0,63$  et  $3,16 \pm 0,20$ ), mais a disparu complètement dans le groupe 2,5 mg/kg ( $0,23 \pm 0,03$ ) (**Yang et al., 2022**). Aussi, chez des rats recevant 50mg/kg d'acétate de plomb pendant 3 semaines, cette intoxication aiguë au plomb a provoqué une altération de l'axe hypophyso-testiculaire se manifestant par une diminution des taux sériques de gonadotrophines et de testostérone. Le Pb a aussi réduit les marqueurs et les enzymes de la stéroïdogénèse StAR, CYP17A1, 3 $\beta$ -HSD et 17 $\beta$ -HSD dans les testicules des rats (**Ajarem et al., 2021**).

Pour déterminer si le plomb a un effet direct sur les cellules de Leydig, des chercheurs ont examiné les effets de ce métal sur la biosynthèse des hormones stéroïdes par les cellules de Leydig chez des rats en injectant par voie intrapéritonéale 8 mg de plomb/kg/jour, 5 jours par semaine pendant 5 semaines, l'effet négatif du plomb sur la production de testostérone était corrélé à de faibles expressions des enzymes cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11 A1), P450<sub>c17</sub> (CYP17) et la 3 $\beta$ -HSD, toutes impliquées dans la biosynthèse des hormones stéroïdes ; selon les auteurs de cette étude, ces résultats indiquent que le Pb peut nuire au fonctionnement des cellules de Leydig en altérant directement la stéroïdogénèse (**Thoreux-Manlay et al., 1995b**). La testostérone sérique et testiculaire, la FSH, le nombre des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli, la StAR, le cytochrome P450 A1, la 3 $\beta$ -HSD, et la 17 $\beta$ -HSD ont significativement diminué chez des rats intoxiqués au Pb (20 mg/kg b.w. i.p.) pendant 21 jours (**Udefa et al., 2020**). Des porcelets mâles âgés de 42 jours ont été nourris avec un régime contenant du CdCl<sub>2</sub>

## *Résultats et discussion*

(20 mg de Cd/kg) pendant 40 jours afin d'explorer les effets toxiques du Cd sur la fonction testiculaire, une diminution de l'expression de l'ARNm de la StAR, CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, CYP17A1 et 17 $\beta$ -HSD ainsi que les concentrations de testostérone a été notée (**Li et al., 2023**). Tous ces résultats arguent en faveur de la baisse de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et soutiennent l'hypothèse que le Pb et le Cd exercent un effet direct sur leur fonction en altérant la machinerie enzymatique impliquée dans la biosynthèse de la testostérone.

La co-administration du Pb/Cd avec l'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* à la dose de 200 mg/kg/j a entraîné des élévations dans les niveaux de testostérone sérique. Concernant le plomb, une augmentation très significative ( $p < 0.01$ ) a été observée chez les rats traités par le Pb+200 mg/kg de *W. frutescens* ( $6.68 \pm 1.84$  ng/mL) par rapport aux rats exposés au Pb ( $1.58 \pm 0.82$  ng/mL). Au sujet du cadmium, par rapport au taux de testostérone sérique des rats exposés au Cd seul ( $5.008 \pm 1.52$  ng/mL), une hausse non significative de la testostérone a été constatée chez les animaux traités avec le Cd+200 mg/kg de *W. frutescens* ( $8.55 \pm 3.78$  ng/mL), or cette valeur est comparable à celle des témoins ( $9.39 \pm 1.45$  ng/mL).

L'effet de l'extrait de *W. frutescens* sur la concentration sérique de la testostérone reste conséquent puisqu'il est comparable à celui des témoins. En effet, selon nos résultats la toxicité du cadmium est réduite comparée à celle du plomb, ce qui explique la non significativité de la différence entre les deux lots. De plus, les rats traités avec l'extrait seul à la dose de 200 mg/kg de *W. frutescens* ont présenté un taux de testostérone ( $8.54 \pm 1.58$  ng/mL) proche à celui des rats témoins ( $9.39 \pm 1.45$  ng/mL). Il découle de ce dernier résultat que la *W. frutescens* n'a pas d'impact sur la production de testostérone chez les rats sains. Cette amélioration de l'extrait de racines de *W. frutescens* sur le niveau de testostérone sérique à la dose de 200 mg/kg chez les rats empoisonnés au plomb et au cadmium pourrait être dû à son activité antioxydante, qui était importante selon les résultats de notre étude. En effet, des travaux récents ont montré que l'astaxanthine (ASTA), un puissant antioxydant naturel de la famille des caroténoïdes a favorisé l'expression des gènes et des protéines de la voie de biosynthèse de la testostérone et a augmenté le niveau de sécrétion de testostérone chez des coqs âgés nourris avec un régime supplémenté en ASTA (**Gao et al., 2022**).

Le mécanisme par lequel *W. frutescens* exerce cet effet thérapeutique peut probablement s'expliquer par l'activation du système antioxydant dans les testicules et le SNC, ou la sécrétion endocrine testiculaire ou par la réduction de la production de ERO, qui peut minimiser les dommages oxydatifs dans la cellule de Leydig. Il est également possible qu'il augmente la sensibilité à la LH ou qu'il élève l'expression des enzymes stéroïdogènes impliquées dans la biosynthèse de la testostérone. Cette plante est l'une des 70 plantes appartenant à la famille des

Solanaceae, qui contiennent des withanolides, des composés stéroïdes polyoxygénés avec un squelette d'ergostérol dans lequel les C-22 et C-26 sont oxydés pour former une  $\delta$ -lactone (Ha *et al.*, 2022). Les withanolides, avec 28 carbones de stéroïdes naturels, sont les principaux constituants chimiques du genre *Withania* (Singh *et al.*, 2022). Il est connu que ces constituants agissent comme précurseurs des hormones stéroïdiennes, qui peuvent être directement transformées en hormones physiologiques stimulant les testicules pour activer leur fonction endocrine (Narayan et Madhu, 2018). Ceci peut expliquer la restauration du niveau de testostérone après le traitement avec cette plante. En comparaison avec d'autres espèces du genre *Withania*, de nombreuses études cliniques et expérimentales antérieures ont validé l'effet fertilisant de *Withania somnifera*, y compris l'amélioration de l'équilibre hormonal et les paramètres spermatiques (Kumar *et al.*, 2015; Munir *et al.*, 2022). De plus, des effets similaires ont été rapportés chez des rats mâles exposés à 100 mg/kg de Pb-Ac avec 200 mg/kg d'extrait éthanolique de ginseng quotidiennement pendant 5 semaines et 10 semaines (Ali *et al.*, 2018).

Contrairement à la dose 200 mg/kg/j de *W. frutescens*, les niveaux de testostérone sérique chez tous les groupes co-traités avec la dose de 400 mg/kg/j de *W. frutescens* ont montré des diminutions hautement significatives par rapport au groupe témoin avec un pourcentage de réduction de 82% et 76% chez les groupes traités avec Pb+400 mg/kg de *W. frutescens* ( $1.62 \pm 0.70$  ng/mL) et Cd+400 mg/kg de *W. frutescens* ( $2.24 \pm 1.46$  ng/mL) respectivement, alors qu'un pourcentage de diminution très significative de 59% a été observé chez le groupe traité avec l'extrait seul à la dose de 400 mg/kg de *W. frutescens* ( $3.83 \pm 1.47$  ng/mL) par rapport au groupe témoin ( $9.39 \pm 1.45$  ng/mL). Cette observation nous porte à croire, d'une part, que la dose de 400 mg/kg/j de *W. frutescens* aurait induit un rétrocontrôle négatif, à travers les withanolides, sur la synthèse ou/et la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. De plus, ces doses pourraient avoir généré des ROS qui auraient provoqué une déplétion des hormones stéroïdes sexuelles comme l'ont suggéré Jambor *et al.*, (2022) pour l'extrait de *Lepidium sativum* ou 250  $\mu$ g/mL d'extrait expérimental ont provoqué une augmentation significative de testostérone et une dose appliquée plus élevée de 2000  $\mu$ g/mL a induit un déclin significatif de testostérone. Donc, à forte dose l'extrait de racines de *W. frutescens* aurait pu être toxique sur certaines activités de la fonction reproductrice telle que la stéroïdogénèse. Bien que la non-toxicité de cette plante (racines et feuilles) a été validée jusqu'à 2g/kg ou aucun signe clinique, biochimique et histopathologique n'a été observé par EL Moussaoui *et al.* (2020b) dans leurs tests de toxicité aiguë (14 jours) et subaiguë (28 jours) chez des souris âgées de 28 semaines selon l'OCDE, 1998, Ligne directrice n° 407.

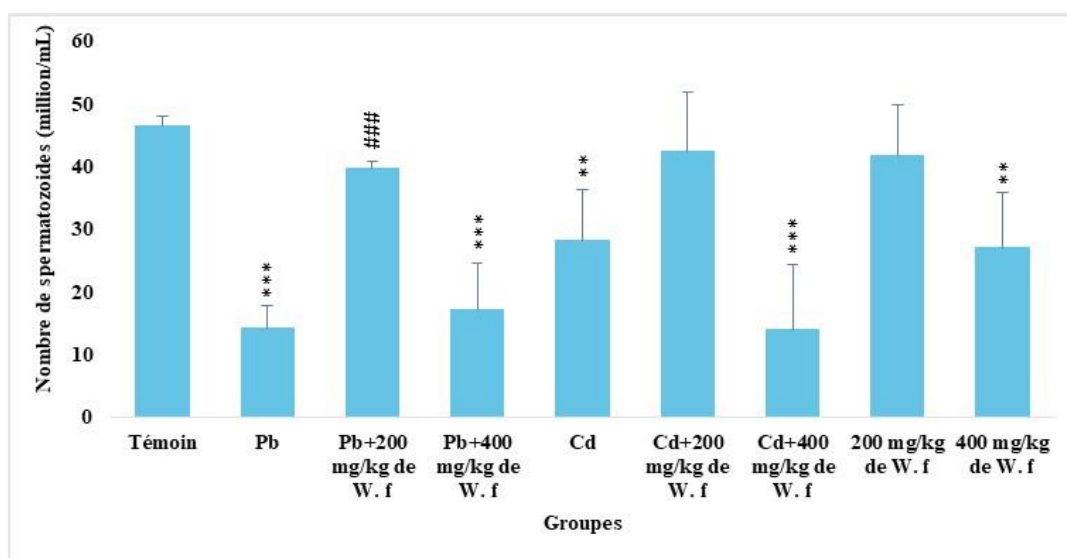
D'autre part, **Li et al. (2011)** ont montré que l'apigénine et certains composés phénoliques réduisent la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et augmentent la sécrétion de FSH et LH avec un effet de rétroaction positive sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Tandis que (**Wang et al., 2016**) ont stipulé que l'apigénine inhibent les enzymes responsables de la biosynthèse de la testostérone (stéroïdogénèse) dans les cellules de Leydig (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase, and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3). Et comme on a noté précédemment que cette plante contient ce composé, et sachant que la dose est doublée, donc on peut conclure que la réduction du taux de testostérone sérique serait dû à ce métabolite.

Une autre étude similaire à la nôtre a montré que les composés polyphénoliques d'*Origanum vulgare* peuvent agir sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique en réduisant le taux sérique de testostérone de manière dose-dépendante (100, 200, et 400 mg/kg) lors de l'administration orale de finastéride à la dose de 25 mg/kg, qui a entraîné une baisse significative des taux de FSH et de LH et une augmentation significative des taux de testostérone (**Chen et al., 2020**).

### 8 Détermination des paramètres spermatiques

D'après les résultats des paramètres spermatiques illustré dans la **figure 22**, il a été observé que le nombre de spermatozoïdes chez les rats exposés au Pb ( $14.25 \pm 3.69$  millions/mL) et au Cd ( $28.25 \pm 8.27$  millions/mL) indique une diminution significative par rapport au groupe témoin ( $46.6 \pm 1.65$  millions/mL), la différence est hautement significative pour le Pb ( $p < 0.001$ ) et très significative pour le Cd ( $p < 0.01$ ). Le co-traitement par *W. frutescens* avec la dose de 200 mg/kg/j chez les groupes exposés aux Pb ( $39.87 \pm 1.5$  millions/mL) et Cd ( $42.5 \pm 9.44$  millions/mL) signale une sensible augmentation de concentration des spermatozoïdes par rapport aux rats intoxiqués, la différence est hautement significative ( $p < 0.001$ ). De plus, le nombre de spermatozoïdes chez le groupe traité par l'extrait seul à la dose de 200 mg/kg/j de *W. frutescens* ( $41.8 \pm 8.16$  millions/mL) est resté intact et n'était pas différent significativement de celui des rats témoins ( $46.6 \pm 1.65$  millions/mL). Par contre, l'administration de l'extrait de *W. frutescens* à la dose de 400 mg/kg/j chez les groupes intoxiqués au Pb ( $17.27 \pm 7.51$  millions/mL) et au Cd ( $14 \pm 10.48$  millions/mL) a exercé une répercussion négative très sévère sur la concentration des spermatozoïdes en diminuant significativement leur nombre, comparativement aux témoins et aux traités à la dose de 200mg/kg. Egalement, le témoin positif traité par 400 mg/kg/j de *W. frutescens* seul ( $27.2 \pm$

8.78 millions/mL) enregistre aussi une réduction très significative ( $p < 0.01$ ) du nombre de spermatozoïdes par rapport au rats témoins.



**Figure 22** : Nombre de spermatozoïdes dans les différents groupes. \* comparativement aux témoins, # comparativement au groupe traité par le plomb. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La réduction du nombre de spermatozoïdes chez les groupes traités au Pb et au Cd peut être due à une baisse du taux de testostérone induite par ces métaux, car la production des spermatozoïdes (spermatogenèse) est sous le contrôle de cette hormone (**Christin-Maitre et Young, 2022; Walker, 2021**). Les répercussions du Pb et du Cd sur les paramètres spermatiques concordent avec beaucoup de résultats précédents rapportés dans la littérature scientifique. En effet, l'injection intrapéritonéale de 20 mg/kg/j d'acétate de plomb pendant 35j a entraîné une diminution significative du nombre, de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes chez les rats (**Masoud et al., 2015**). De plus, l'administration de 0.1% d'acétate de plomb par voie orale à des rats pendant 70j a entraîné une diminution significative de la concentration des spermatozoïdes et du pourcentage des spermatozoïdes mobiles (**Dorostghoal et al., 2014**). Des résultats similaires ont été relevés lors de l'exposition au Cd, dont l'injection intrapéritonéale de 1 mg/kg pendant 16 j a conduit à une baisse du nombre, de la motilité et de la vitalité des spermatozoïdes (**Asadi et al., 2014**). En outre, Des rats injectés par 0,5 mg/kg de chlorure de cadmium ont présenté une diminution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles, du degré de motilité et du nombre de spermatozoïdes avec une augmentation significative du pourcentage moyen de spermatozoïdes morphologiquement anormaux (**Hamidi et al., 2015**). Il est bien connu que les métaux lourds exercent un impact génotoxique sur les cellules

germinales (**Bhardwaj et Panchal, 2021**). Selon une étude récente, le cadmium entraîne une fragmentation de l'ADN et un défaut dans le processus de réparation de l'ADN au niveau des spermatoocytes (**Li et al., 2023**).

Cet dépérissement de la densité des spermatozoïdes peut aussi être provoqué par le stress oxydatif qui est l'un des principaux mécanismes de la toxicité de ces métaux (**Behairy et al., 2022**). Effectivement, les spermatozoïdes sont très sensibles au stress oxydatif car ils ne disposent pas d'une protection antioxydante significative en raison de leurs quantités importantes d'acides gras polyinsaturés membranaires (dont l'acide docosahexanoïque), leur volume limité et de leur distribution restreinte de cytoplasme qui contient une seule et unique source limitée d'ADN et un mécanisme unique et limité de détection et de réparation des dommages causés à l'ADN (l'enzyme de la 8-oxoguanine ADN glycosylase). De plus, à cause de la morphologie particulière du spermatozoïde (SPZ), les enzymes antioxydantes ne parviennent pas à protéger la membrane plasmique entourant l'acrosome et la queue ; la santé et la fertilité des SPZ dépend principalement du système antioxydant du plasma séminal (**Aitken et al., 2016; Petrone et al., 2023**). Physiologiquement, les spermatozoïdes sont caractérisés par la génération d'une faible quantité de ERO mitochondriales afin d'entraîner l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine associée à leur capacitation (**Bisht et al., 2017; O'Flaherty et Scarlata, 2022; Takalani et al., 2023**). La susceptibilité aux attaques oxydatives est exacerbée lors de l'inhibition des enzymes antioxydantes testiculaires. En effet, l'exposition au Pb peut induire une diminution des activités des enzymes SOD, glutathion peroxydase (GPX) et catalase, et une augmentation du MDA dans le tissu testiculaire (**Hassan et al., 2019; Rao et al., 2016**). De même, l'exposition aiguë ou chronique au Cd peut perturber l'activité de SOD et la concentration de MDA (**Djuric et al., 2015**). L'inhibition de ces enzymes antioxydantes conduit à l'oxydation des lipides membranaires qui activent la voie apoptotique intrinsèque dans les spermatozoïdes et inhibent leur mouvement (**Aitken et al., 2016**).

L'extrait éthanolique des racines de *W. frutescens* a amélioré le niveau de testostérone plasmatique, ce qui s'est traduit évidemment par l'activation de la spermatogenèse et donc l'augmentation certaine du nombre de spermatozoïdes. En plus, en tant qu'antioxydant, avec ses constituants actifs dotés de propriétés antioxydantes, il peut réduire la production des ERO ou piéger les radicaux libres générés par le Pb et le Cd ou encore activer le système antioxydant dans les testicules. L'analyse phytochimique a révélé que cette plante est riche en alcaloïdes, saponines, mucilages, polyphénols et tanins (**El Moussaoui et al., 2019a**). De plus, son analyse HPLC a montré la présence de deux composés flavonoïdes (épicatéchine et apigénine) et de trois acides phénoliques (acide caféique, acide férulique et acide p-coumarique) (**El Moussaoui**

*et al.*, 2020c). Ces composés sont bien connus pour leur bioactivité antioxydante, qui peut réduire la génération de radicaux libres et la peroxydation lipidique produite par la toxicité de ces métaux. Le rôle bénéfique des antioxydants naturels pour améliorer l'infertilité induite par les métaux lourds a été largement élucidé dans de nombreux travaux récents (Behairy *et al.*, 2022; Iftikhar *et al.*, 2022; Marini *et al.*, 2022; Unsal *et al.*, 2020). Comparativement à d'autres travaux, les rats intoxiqués à l'arsénite de sodium et traités par l'extrait hydro-éthanolique de *Withania somnifera* avec la dose 100 mg/kg/j pendant 30 jours ont subi une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes, ce qui indique une normalisation du fonctionnement des testicules (Kumar *et al.*, 2015). Lorsque la dose de l'extrait des racines de *W. frutescens* est doublée (400 mg/kg/j), cela entraîne le déclin du taux de testostérone sérique et par conséquent, la diminution de la quantité des spermatozoïdes suite à l'inactivation de la spermatogenèse.

### 9 Résultats histopathologiques

L'étude histologique du testicule et de l'épididyme a mis en évidence plusieurs changements histopathologiques induits par le Pb et le Cd ainsi que par l'extrait de racines de *W. frutescens*.

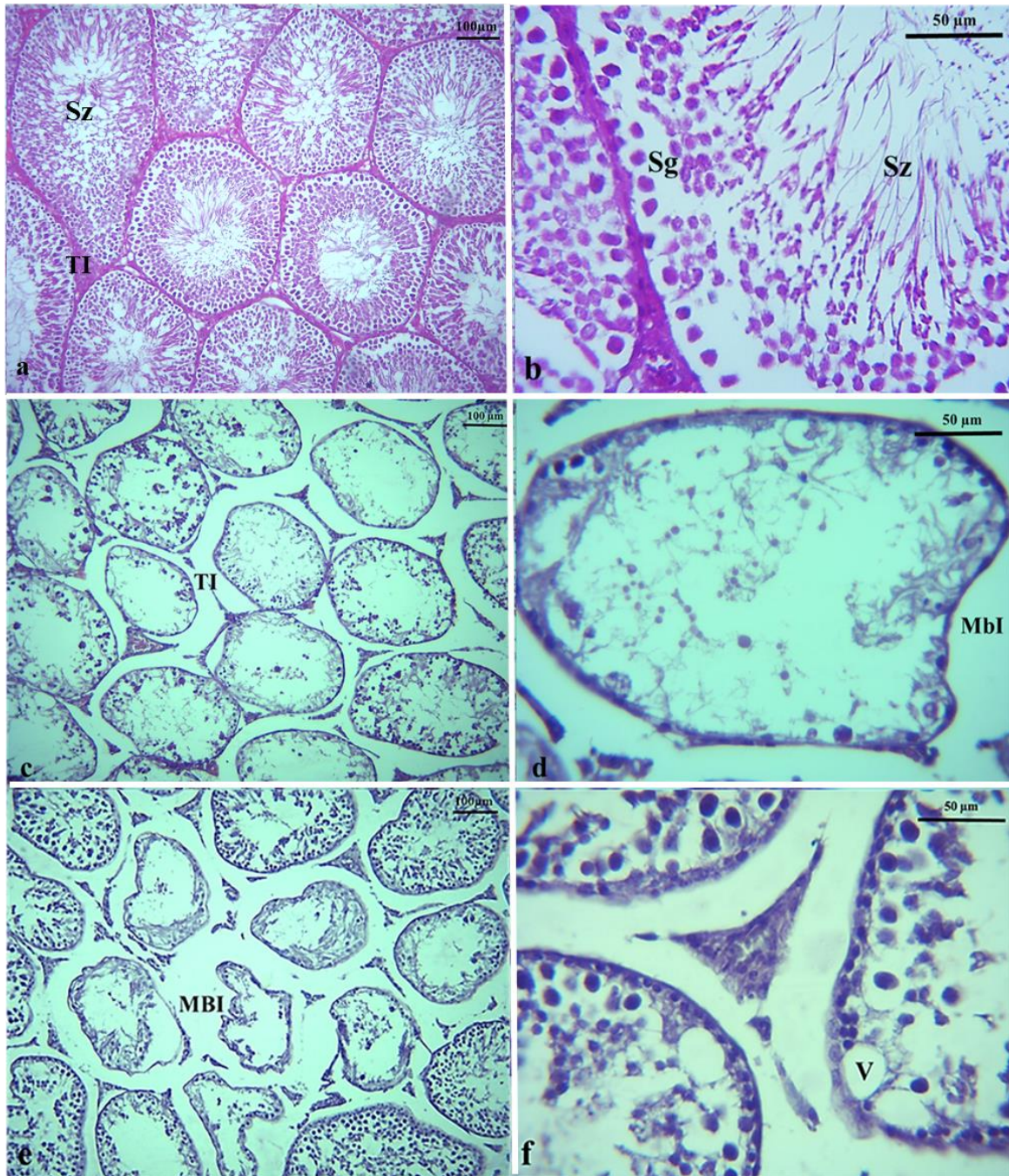
#### 9.1. Histologie de testicule

L'examen microscopique du testicule du groupe témoin (**Fig. 23 : a, b**) a montré des signes normaux de la spermatogenèse. Les tubules séminifères à pourtour régulier, sont entourés de tissu interstitiel contenant des cellules de Leydig autour des vaisseaux sanguins. À l'intérieur des tubules et à proximité de la lame basale résident des spermatogonies qui forment la première couche de la lignée germinale, suivi des spermatocytes primaires de taille élevée avec noyau arrondi caractéristique, des spermatides rondes, des spermatides allongées et des spermatozoïdes (SPZ) à un stade précoce ou avancé de la spermiogenèse, attachés à l'apex des cellules de Sertoli, une densité importante de SPZ matures est rassemblée dans la lumière des tubules séminifères.

L'intoxication par le Pb et le Cd (**Fig. 23 : c, d, e, f**) a sérieusement affecté la morphologie des tubules séminifères et le processus de la spermatogenèse à différents niveaux. Ces métaux ont provoqué une dégénérescence de l'épithélium germinale et une atrophie des tubules séminifères dont le diamètre et le volume ont fortement diminués et le pourtour est devenu irrégulier avec une structure lâche, et où les cellules de Sertoli présentaient de nombreuses vacuoles, toutes placées sur un plan irrégulier de la membrane basale. Les

## Résultats et discussion

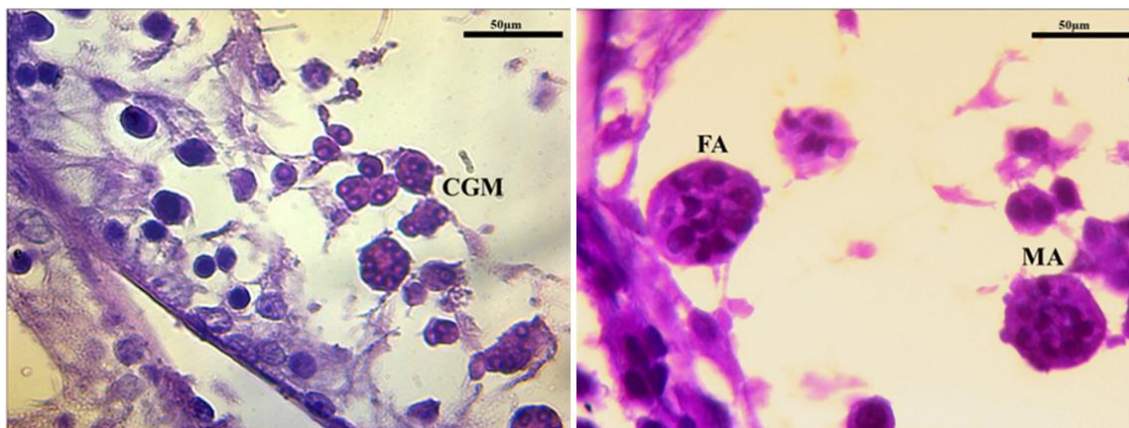
spermatogonies se sont détachées de la lame basale et des cellules de Sertoli et ont migré vers la lumière, et dans la lumière des tubules les spermatozoïdes sont absents. Certains tubules séminifères sont vides et d'autres sont désorganisés en totalité. L'espace interstitiel s'est élargi et renferme un nombre sensiblement réduit de cellules de Leydig.



**Figure 23 :** Coupes histologiques du testicule chez le groupe témoin (a et b), le groupe traité avec le Pb (c et d) et le groupe traité avec le Cd (e et f). MBI : membrane basale irrégulière, Sg : spermatogonies, Sz : spermatozoïdes, TI : tissu interstitiel, V : vacuole. (HE).

## Résultats et discussion

D'autres modifications histologiques ont également été observées (**Fig. 24**) chez le groupe traité au Pb ; un agrégat de cellules géantes multinucléées est clairement apparu dans les tubules séminifères et certaines des spermatogonies présentaient un aspect d'apoptose.



**Figure 24** : Coupes histologiques du testicule chez le groupe traité avec le Pb ; CGM : cellules géantes multinucléées, FA : fragmentation d'ADN, MA : membrane apoptotique (HE).

La dégénérescence des tubules séminifères, la perte des cellules germinales et l'absence de SPZ dans la lumière des tubules séminifères causées par le Pb et le Cd sont tous des signes pathologiques comme ceux rapportés précédemment (**Kelainy et al., 2019; Massányi et al., 2020**). Les manifestations néfastes occasionnées par le cadmium sur le testicule des mammifères sont largement exposés dans l'article review de **Zhu et al., (2020)**. Des études ont également noté une atrophie des tubules séminifères, une apoptose des cellules germinales avec la formation de nombreuses vacuoles dans les cellules de Sertoli, l'apparition de cellules géantes multinucléées et une réduction du nombre de cellules de Leydig et une structure lâche (**Abdel Moniem et al., 2010; Al-Okaily et Murad, 2021; Garu et al., 2011; Makhoulf et al., 2008; Predes et al., 2010; Sayed et al., 2014; Shan et al., 2009**). Une exposition continue au plomb a entraîné une diminution significative du nombre, de la motilité, de la viabilité et de la morphologie des spermatozoïdes ( $P < 0,001$ ). Le nombre de cellules germinales, de cellules de Leydig, de spermatocytes et le diamètre des tubes séminifères étaient significativement diminués ( $P < 0,001$ ) dans le groupe soumis au plomb (**Bajgiran et al., 2023**).

D'autres métaux lourds tels que le vanadium, l'arsenic, le cuivre et le mercure ont conduit aux mêmes altérations tels que la vacuolisation de l'épithélium séminifère, le détachement des cellules germinales et la dégénérescence de l'épithélium séminifère en plus de la mort des cellules germinales et des dommages aux cellules de Leydig (**Bhardwaj et al., 2021; Ghorbel-**

**Koubaa et al., 2022; Machado-Neves, 2023; Massányi et al., 2020; Rachamalla et al., 2022).** Chez le rat géant d'Afrique (*Cricetomys gambianus*) exposé au metavanadate de sodium (3mg/kg) par voie intrapéritonéale pendant 14 jours consécutifs, l'analyse ultrastructurale du testicule a révélé une vacuolisation du cytoplasme et du noyau des cellules germinales et de Sertoli, ainsi qu'un gonflement et une vacuolisation mitochondriale. Il y avait une désintégration sévère des tubules séminifères, une atrophie et une dégénérescence des cellules myéloïdes et une apoptose des cellules de Leydig, de Sertoli et germinales (**Usende et al., 2022**).

La dégénérescence de l'épithélium germinale est probablement associée aux faibles concentrations de testostérone. **Walker, (2021)** a indiqué que la fonction des cellules de Sertoli et le développement des cellules germinales au cours de la spermatogénèse dépendent de niveaux adéquats de testostérone, tandis que sa réduction entraîne la rupture des jonctions cellules de Sertoli-cellules germinales et l'apoptose des cellules germinales (**Concessao et al., 2023; Venditti et al., 2021**).

La vacuolisation des cellules de Sertoli est considérée comme un marqueur morphologique de leur lésion affectant leur régulation paracrine où la plupart des vacuoles révélées sont formées par la dilatation et la vésiculation des citernes du réticulum endoplasmique et le gonflement des mitochondries (**Nolte et al., 1995**). De plus, **Zhou et al. (2019)** ont démontré que le traitement au plomb augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui entraîne l'apoptose des cellules de Sertoli.

Dans le même sens, il a été conclu que le Pb et le Cd modifient probablement la jonction serrée entre les cellules Sertoli-Sertoli qui composent la barrière hémato-testiculaire protégeant les cellules germinales des molécules cytotoxiques pendant la spermatogénèse et créant un compartiment immunologiquement privilégié (**Zhou et al., 2022**). Considérant qu'il convient de noter que les cellules de Sertoli bloquent la réponse immunitaire aux auto-antigènes en sécrétant une molécule immunosuppressive (**Cheng et Mruk, 2012**). Effectivement, l'administration du Pb et du Cd perturbent significativement la barrière hémato-testiculaire et l'expression des gènes impliqués dans sa structure et sa fonction ainsi qu'ils modifient les interactions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (**Adhikari et al., 2000; Dolati et al., 2020; Luaces et al., 2023; Venditti et al., 2021**). On outre, le chlorure de cadmium testé sur les lignées de cellules de Sertoli SerW3 altère les interactions directes entre les cellules de Sertoli-Sertoli de deux manières : soit en modifiant les niveaux de protéines de jonction (principalement la N-cadhérine et la connexine 43), soit en induisant une délocalisation

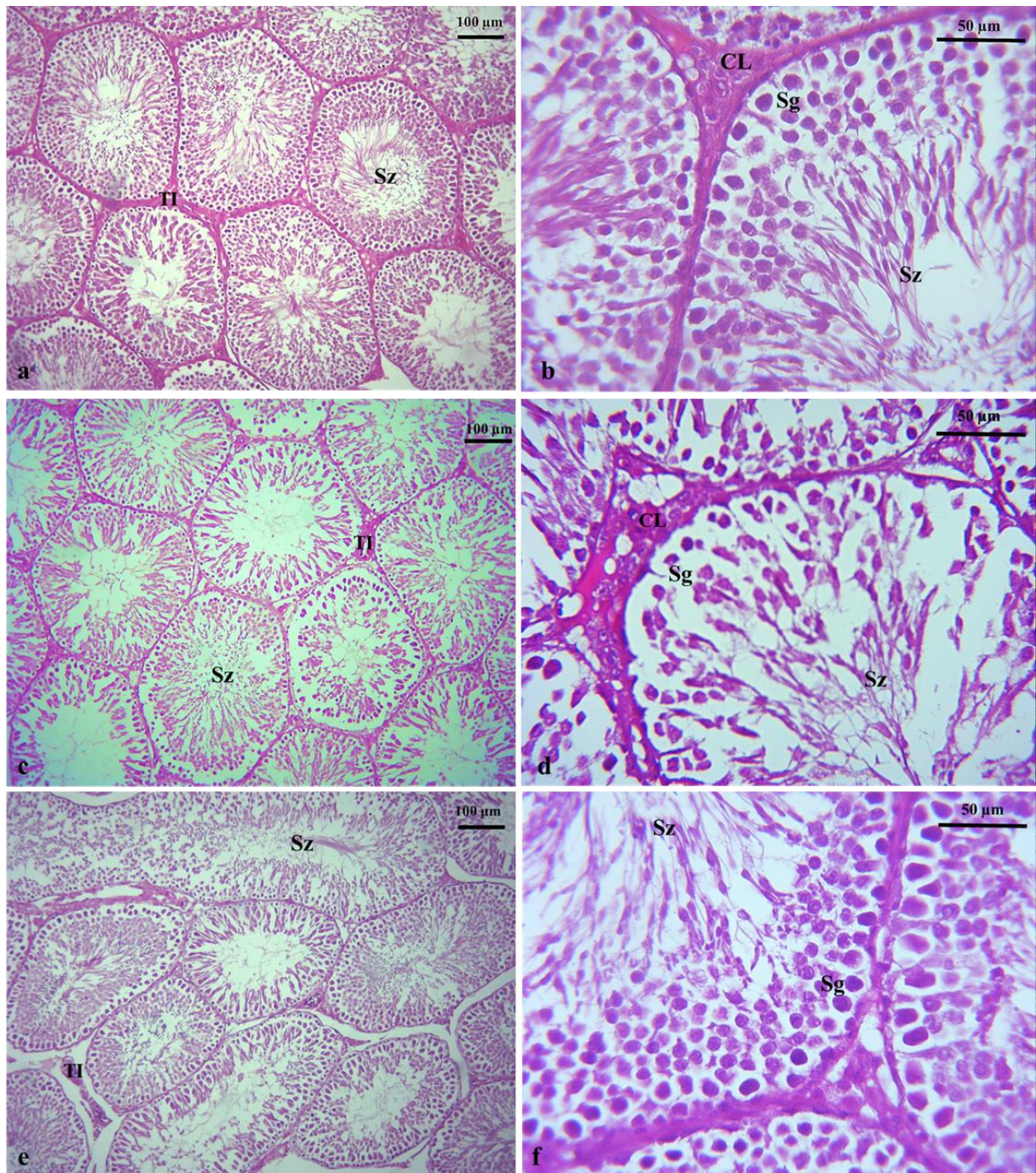
cytoplasmique rapide de ces protéines membranaires (**Fiorini et al., 2004; Ramos-Treviño et al., 2018; Zhu et al., 2020**).

Ces dommages testiculaires observés peuvent aussi être corrélés à la perturbation de l'équilibre entre les ERO et les enzymes antioxydantes sachant que le testicule est le principal organe cible du stress oxydatif en raison de sa teneur élevée en lipides membranaires polyinsaturés (**Takalani et al., 2023; Walke et al., 2023**). **Abdel Moniem et al., (2010) et Udefa et al., (2020)** ont constaté une réduction des niveaux d'antioxydants testiculaires, notamment le glutathion, la catalase, la superoxyde dismutase, ainsi qu'une peroxydation lipidique chez les rats exposés à l'acétate de plomb. En interférant avec les groupes sulfhydryles, le Cd influence non seulement la fonction des protéines kinases activées par des agents mitogènes, mais aussi l'état redox de la cellule, par conséquent, le niveau des ERO s'élève (**Shojaeepour et al., 2021**). Certains chercheurs ont suggéré que les cellules géantes multinucléées pouvaient résulter de la fusion des spermatides adjacentes endommagées due à des altérations des ponts intercellulaires (**Chapin et al., 1983; Singh et Abe, 1987**), ou générées lors de l'échec de la réplication des chromosomes ou de la division cellulaire (**Chinoy et al., 2004**), ou lors d'une augmentation de la capacité phagocytaire des cellules spermatogènes apoptotiques (**Khattab, 2007**). Ces cellules semblent être l'un des signes vitaux de l'atrophie testiculaire et sont positivement engagées dans la génération de radicaux libres (**Barbhuiya et Sengupta, 2015**).

En outre, l'inflammation testiculaire est l'un des facteurs clés de l'infertilité masculine (**Kucukler et al., 2020**). Une étude récente a indiqué que le Pb provoque une inflammation en augmentant la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) et les niveaux de NF- $\kappa$ B et TNF- $\alpha$  (**Ileriturk et al., 2020**). Egalement, le Cd induit l'augmentation de l'ADN p65 de NF- $\kappa$ B, du p-IKK $\beta$ , des niveaux de TNF- $\alpha$  et la diminution des niveaux d'IL10 (**Yu et al., 2020**). Chez des rats intoxiqués au Pb, l'expression génique des médiateurs pro-inflammatoires dans les testicules ainsi que leurs taux sériques ont été déterminés. L'analyse des ARNm testiculaires de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et iNOS a montré une augmentation remarquable et significative chez les rats ayant reçu du Pb par rapport au contrôle ( $P < 0,001$ ) (**Alotaibi et al., 2023**).

En revanche, l'observation microscopique chez les groupe co-traités avec l'extrait de racines de *W. frutescens* à la dose de 200 mg/kg (**Fig. 25**) montre une amélioration de la quasi-totalité des dommages testiculaires occasionnés par le Pb et le Cd, y compris les tubules atrophiés, cellules germinales dégénérées, apoptose, cellules géantes et vacuolisation des cellules de Sertoli. Les coupes histologiques présentaient une spermatogenèse normale dans la plupart des tubules séminifères avec une membrane basale intacte et régulière et une lumière

pleine de spermatozoïdes. En outre, le traitement à la *W. frutescens* sans exposition au Pb et Cd a permis d'obtenir une architecture histologique normale comparable à celle des témoins.

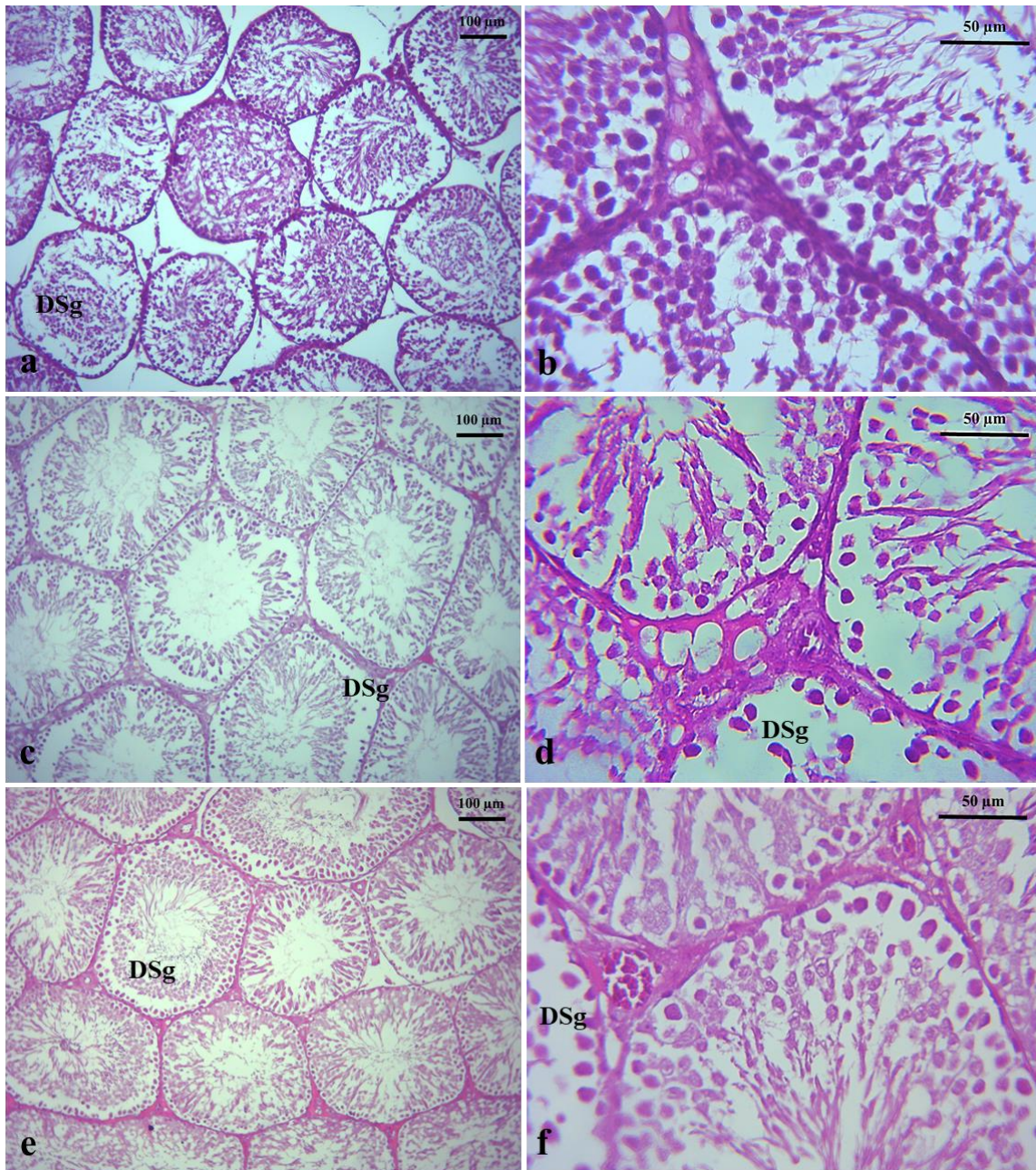


**Figure 25 :** Coupes histologiques des testicules chez le groupe traité avec le Pb + 200 mg/kg de *W. frutescens* (a et b), le groupe traité avec le Cd + 200 mg/kg de *W. frutescens* (c et d) et le groupe traité avec 200 mg/kg de *W. frutescens* seul (e et f). CL : cellule de Leydig, Sg : spermatogonies, Sz : spermatozoïdes, TI : tissu interstitiel. (HE).

## *Résultats et discussion*

Les mécanismes par lesquels *W. frutescens* a diminué les dommages testiculaires induits par le Pb et le Cd peuvent être probablement due à sa propriété antioxydante via la réduction de la production de ERO. En effet, notre analyse phytochimique a révélée qu'elle est riche en composants antioxydants et anti-inflammatoires (acide caféique, acide homovanilique, DDMP, acide palmitique,  **$\alpha$ -Cyperone**, et drosophiline A). Comme il a été noté précédemment, cette plante est riche aussi en alcaloïdes, saponines, mucilages, polyphénols, tanins, flavonoïdes (épicatéchine et apigénine) et acides phénoliques (acide caféique, acide férulique et acide p-coumarique) (**EL Moussaoui et al., 2019a, 2020c**). Ces composés sont bien connus pour leur bioactivité antioxydante, qui peut réduire la génération de radicaux libres et la peroxydation des lipides. D'autre part, son puissant potentiel anti-inflammatoire peut réguler l'apparition excessive des cellules apoptotiques dans les tubules séminifères. Par ailleurs, il a été constaté que les withanolides ont des effets prometteurs sur l'inhibition du NO, le facteur clé de l'inflammation testiculaire. En effet, le docking (ou amarrage moléculaire) a révélé de fortes affinités de ces composés avec la protéine de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (**Dong et al., 2019**). Ces phytostéroïdes servent fréquemment de molécules de signalisation et semblent être essentiels au maintien de la perméabilité et de la fluidité des membranes. Ils ont également été utilisés pour traiter une série de maladies, notamment le cancer, le diabète et l'inflammation (**Marahatha et al., 2021**). En outre, le rôle bénéfique des antioxydants naturels dans la lutte contre l'infertilité causée par les métaux lourds a été largement élucidé dans de nombreux travaux récents (**Ghafouri-Fard et al., 2021; Iftikhar et al., 2022; Marini et al., 2022; Takalani et al., 2023**).

Cependant, l'examen microscopique du testicule des groupes de rats soumis au co-traitement métaux-extrait de *W. frutescens* à la dose de 400 mg/kg a révélé une mosaïque de tubules séminifères différents, allant de tubules présentant une spermatogenèse complète, ou incomplète bien que réduite, à des tubules dont la maturation est arrêtée jusqu'au niveau des spermatocytes (**Fig. 26**). Les images histologiques ont montré que le tissu testiculaire reste endommagé y compris la diminution des spermatozoïdes dans la lumière et l'éloignement des spermatogonies de la lame basale plaiderait en faveur de la séparation des compartiments cellulaires basaux (les spermatogonies) et adluminaux (Les spermatocytes, spermatides...etc.) dans certains tubules. Par contre, l'absence des cellules géantes et apoptotiques a été remarqué.



**Figure 26 :** Coupes histologiques des testicules chez le groupe traité avec le Pb + 400 mg/kg de *W. frutescens* (a et b), le groupe traité avec le Cd + 400 mg/kg de *W. frutescens* (c et d) et le groupe traité avec 400 mg/kg de *W. frutescens* seul (e et f), DSg : détachement des spermatogonies. (HE).

Les premiers signes de dégénérescence des cellules germinales pourraient entraîner une perturbation de la structure de leurs plasmalemme, ce qui provoquerait leurs détachements et leurs apparitions dans la lumière des tubules séminifères. Par conséquent, la réduction des niveaux plasmatiques de testostérone peut avoir entraîné cet effet négatif sur la spermatogenèse. Plusieurs études ont supposé que la consommation élevée de fructose chez les rats pubères et

péripubères provoque une altération de la spermatogenèse et de la production quotidienne de spermatozoïdes. Effectivement, des rats Wistar exposés au fructose (30 % ou 20%) ont présenté une dégénérescence, une nécrose, une atrophie des tubules séminifères, une vacuolisation des cellules de Sertoli et des spermatogonies, des cellules immatures dans la lumière et une apoptose des cellules germinales (Dokumacioglu *et al.*, 2018; Medaglia *et al.*, 2021; Meydanli *et al.*, 2018; Yildirim *et al.*, 2018). Or, l'analyse GC-MS de l'extrait de racines de *W. frutescens* a démontré la richesse de cet extrait en fructose, en plus du saccharose qui sera métabolisé en glucose et fructose, on peut conclure que l'extrait de notre plante dosé à 400mg/kg contiendrait une quantité supérieure de fructose. Cette teneur élevée en fructose dans l'extrait à la dose de 400mg/kg aurait été probablement l'agent responsable de la genèse de toutes ces altérations testiculaires. Toutefois, l'effet inhibiteur de l'extrait à 400mg/kg sur la fonction testiculaire mérite d'être élucidé.

### **9.2. Résultats morphométriques des paramètres testiculaires**

Les indices de différenciation tubulaire (TDI) et de spermiogénèse (SPI) sont exprimés en pourcentage dans le tableau 07. D'après ces résultats, il a été remarqué que le TDI et le SPI chez les rats exposés au Pb et au Cd ont montré une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport au groupe témoin avec des pourcentages de diminution de 49,2 % et 67,2 % respectivement pour le Pb, et 75.4 % et 79.1% respectivement pour le Cd.

En revanche, Il est important de souligner que l'administration de l'extrait de *W. frutescens* à la dose de 200 mg/kg à des rats intoxiqués au Pb et au Cd a restauré de manière hautement significative ( $p < 0.001$ ) les TDI et SPI par rapport aux groupes exposés au Pb et au Cd seuls. Alors que, aucune différence n'a été montrée dans ces paramètres par rapport au groupe non traité (témoin). De même, chez les rats traités uniquement avec l'extrait de *W. frutescens* dosé à 200 mg/kg, les paramètres mentionnés ne différaient pas de manière significative par rapport aux rats témoins.

L'exposition des rats aux métaux lourds Pb/Cd combinée à l'extrait de *W. frutescens* concentré à 400mg/kg, les pourcentages de ces deux paramètres (TDI et SPI) sont réduits de façon hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport aux témoins. De plus, le groupe traité avec l'extrait de *W. frutescens* seul dosé à 400 mg/kg a manifesté une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) dans ces deux paramètres par rapport aux témoins.

**Tableau 07 :** Indice de différenciation tubulaire (TDI) et indice de spermiogénèse (SPI) dans les différents groupes.

<b>Groupes</b>	<b>TDI (%)</b>	<b>SPI (%)</b>
Témoin	79.61 ± 17.40	78,74 ± 12.69
Pb	40.37 ± 17.74 ***	25.78 ± 19.47 ***
Cd	19.51 ± 11.55 ***	16.38 ± 10.75 ***
Pb + 200 mg/kg de <i>W. f</i>	75.86 ± 13.46 ###	74.48 ± 11.83 ###
Cd + 200 mg/kg de <i>W. f</i>	76.28 ± 13.95 ØØØ	80.72 ± 11.35 ØØØ
Pb + 400 mg/kg de <i>W. f</i>	54.93 ± 22.36 ***	43.76 ± 10.10 ***
Cd +400 mg/kg de <i>W. f</i>	44.54 ± 11.56 *** ØØØ	41.99 ± 12.45 ***
200 mg/kg de <i>W. f</i>	84 ± 7.95	78.93 ± 11.06
400 mg/kg de <i>W. f</i>	41.16 ± 9.75 ***	51.53 ± 22.01 ***

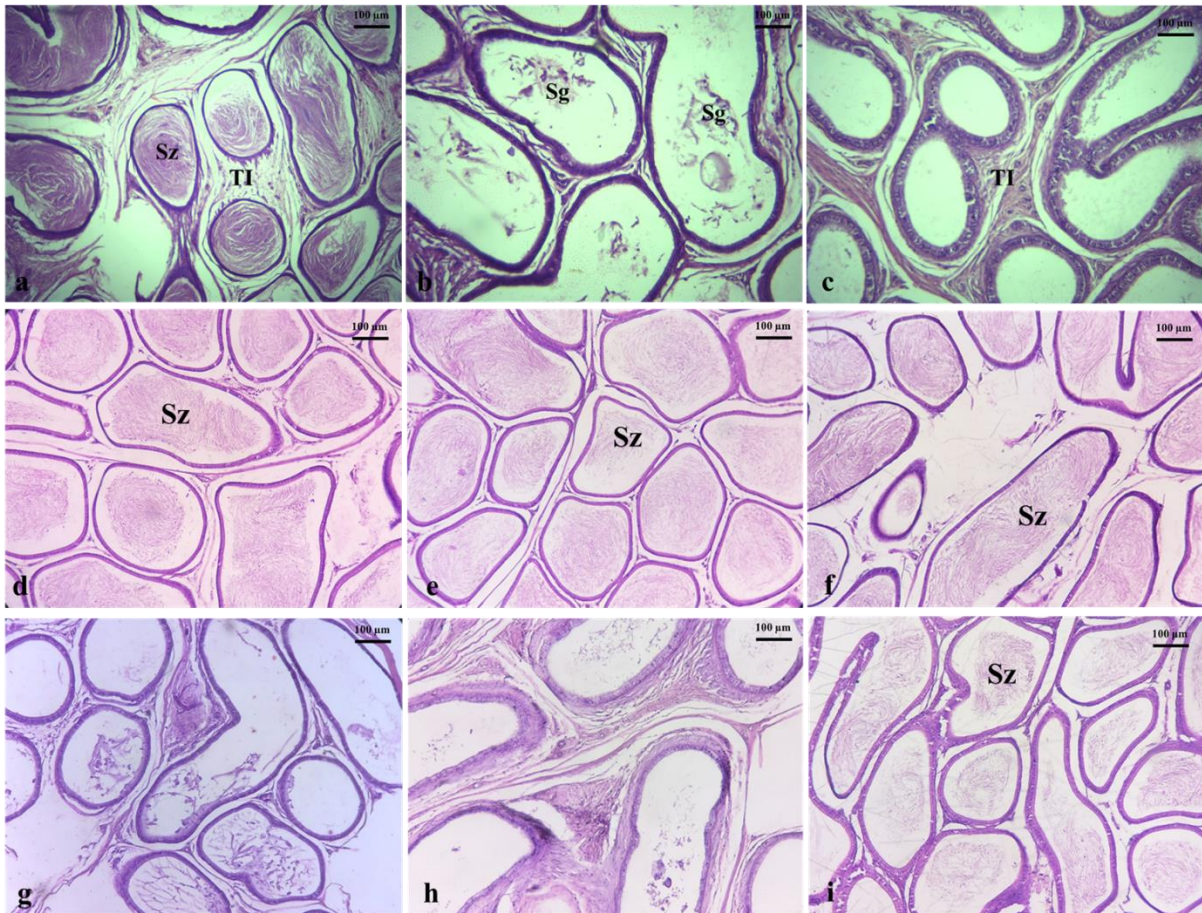
\*\*\*  $p < 0.001$  en comparaison avec le groupe témoin, ###  $p < 0.001$  en comparaison avec le groupe traité au Pb, ØØØ  $p < 0.001$  en comparaison avec le groupe traité au Cd.

Les indices de différenciation tubulaire (TDI) et de spermiogénèse (SPI) peuvent fournir des informations sur le degré d'endommagement du testicule en tant que conséquence de la perte de cellules germinales. Le processus d'oxydation induit par le Pb et le Cd entraîne la production de radicaux libres, qui provoquent par conséquent une diminution du niveau de testostérone d'un côté, et une réduction significative de ces indicateurs dans les tubules séminifères d'un autre côté. Plusieurs études dans la littérature scientifique ont également exprimé ces résultats (Chen *et al.*, 2020; Masoud *et al.*, 2015; Shubina et Dudenkova, 2016).

La testostérone en tant qu'hormone essentielle pour la spermatogenèse, la maturation et la motilité des spermatozoïdes, toute perturbation de sa biosynthèse ou sa sécrétion peut affecter négativement la structure et la fonction du testicule et conduire à une infertilité.

### **9.3. Histologie de l'épididyme**

Les coupes histologiques de l'épididyme distale (EPD) du groupe témoin ont illustré des tubules réguliers et circulaires avec un épithélium cylindrique pseudostratifié qui est séparé du tissu conjonctif par une membrane basale intacte. Une quantité dense de spermatozoïdes a été observée dans la lumière tubulaire. L'espace extra-tubulaire contenait des vaisseaux sanguins dans le tissu conjonctif interstitiel (**Fig. 27 a**). L'examen histologique de l'EPD des groupes de rats traités au plomb et au cadmium n'a révélé aucune différence dans la morphologie de l'épididyme, à l'exception de l'absence des SPZ dans la lumière et la présence de quelques débris cellulaires pouvant être des cellules germinales dégénérées qui se sont détachées de l'épithélium germinal (**Fig. 27 b, c**). La structure histologique de l'EPD des rats intoxiqués au plomb et au cadmium et traités avec l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens* à la dose de 200mg/kg, est comparable à celle des rats témoins, les tubules ont un pourtour régulier et sont remplis de nombreux spermatozoïdes (**Fig. 27 d, e**). Les mêmes caractéristiques structurales ont été observées dans le groupe de rats traités avec l'extrait de *W. frutescens* seul à la dose de 200mg/kg (**Fig. 27 f**). Au contraire, une prolifération du tissu conjonctif intertubulaire et un épaississement de la paroi musculaire avec une nette réduction de la densité des SPZ dans la lumière de l'EPD ont été examinés dans les trois groupes de rats exposés aux métaux Pb/Cd mélangés avec l'extrait dosé à 400mg/kg (**Fig. 27 g, h**) et ceux administrés avec l'extrait seul (**Fig. 27 i**).



**Figure 27 :** Coupes histologiques de l'épididyme distal chez le groupe témoin (a), les groupes traités avec le Pb et le Cd (b et c). Les groupes traités avec les Pb/Cd + 200 mg/kg de *W. frutescens* (d et e) et le groupe traité avec 200 mg/kg de *W. frutescens* seul (f). Les groupes traités avec les Pb/Cd + 400 mg/kg de *W. frutescens* (g et h) et le groupe traité avec 400 mg/kg de *W. frutescens* seul (i). Sg : spermatogonies, Sz : spermatozoïdes, TI : tissu interstitiel. (HE).

La diminution des spermatozoïdes dans la lumière des tubules chez les groupes traités par le Pb et le Cd a été notée dans plusieurs études précédemment (Abarikwu *et al.*, 2018; Ouarda *et al.*, 2021; Sayed *et al.*, 2014). Un impact dévastateur du cadmium sur la morphologie de l'épididyme et une nette diminution des SPZ dans sa lumière ont été mentionnés par (Lamas *et al.*, 2017) chez le rat recevant 1.2 mg/kg de Cd par voie injectable pendant 80 jours. Cette observation est le reflet des résultats histologiques des testicules et leur faible densité de spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères. Chez des rats, après une administration per-orale subchronique de cadmium à 30 mg/L, de diazinon à 40 mg/L, de cadmium à 30 mg/L et de diazinon à 40 mg/L, respectivement, l'analyse histologique n'a pas révélé de différences dans la morphologie de l'épididyme des rats, à l'exception de la formation de vacuoles au sein

de l'épithélium pseudostratifié suite à l'exposition au cadmium et à l'exposition combinée au cadmium et au diazinon dans laquelle en outre un élargissement de l'espace interstitiel a été constaté. De plus, aucune altération marquée de l'intégrité structurale de l'épididyme n'a été observée chez les rats après exposition au diazinon seul (**Adamkovicova et al., 2014**). D'autres métaux lourds tel que l'arsenic provoquent des effets défectueux sur la morphologie et la physiologie de l'épididyme (**da Cunha de Medeiros et al., 2019; Machado-Neves, 2023**).

De même, des altérations structurales avec hypertrophie du tissu interstitiel, une augmentation des marqueurs de l'inflammation et un effondrement des enzymes du système antioxydant avec une augmentation du MDA et RONS (reactive oxygen and nitrogen species) ont été rapportés chez des rats exposés au manganèse (15 mg/kg p.c.) par gavage pendant 14 jours consécutifs (**Owumi et al., 2020**). Les mêmes altérations sur les paramètres spermatiques, le profil hormonal, l'histologie du testicule et les marqueurs du stress oxydant ont été démontrés dans les testicules des rats sous injection intramusculaire chronique d'une faible dose de 0.07µg/kg/j de chlorure de Mercure (HgCl<sub>2</sub>) pendant 60 jours (**Martinez et al., 2014; Massány et al., 2020**).

L'amélioration de ce paramètre chez les rats co-administrés avec le mélange métaux lourds/extrait de *W. frutescens* à la dose de 200 mg/kg renvoie toujours au taux de testostérone sérique qui a été rétabli à une valeur similaire à celle des témoins. Par contre, la réduction du taux de cette hormone chez les rats traités avec l'extrait seul à la dose 400 mg/kg peut avoir entraîné cet effet négatif sur la densité des spermatozoïdes dans les tubules.

## *Conclusion et perspectives*

---

## *Conclusion et perspectives*

L'infertilité est un problème de santé publique majeur car la santé reproductive est cruciale pour la survie de l'espèce humaine. La littérature actuelle établit un lien entre les contaminants environnementaux et l'infertilité, et les métaux lourds sont considérés comme l'un des principaux composés responsables du déclin de la fertilité masculine. La médecine conventionnelle se retrouve inapte à apporter le remède approprié. Or, même si la solution à l'infertilité réside dans la médication de synthèse, cette dernière n'est pas réellement efficace et est associée à de nombreux effets secondaires. Le recours à la médecine traditionnelle est indispensable car elle a fait ses preuves sur l'amélioration de la fertilité dans de nombreux cas d'infertilité. En plus, elle est peu coûteuse, aisément accessible et sans effets indésirables. L'objectif de cette étude est l'utilisation d'une plante médicinale, *Withania frutescens* contre la reprotoxicité liée aux métaux lourds (cadmium et plomb). La *Withania frutescens* appartient au patrimoine végétal algérien non valorisé car elle n'a fait l'objet d'aucune étude pharmacologique, ethnobotanique et phytochimique en Algérie.

Les résultats obtenus ont révélé la richesse de l'extrait éthanolique des racines de *Withania frutescens* en composés phénoliques avec une valeur de  $63,23 \pm 3,82$  mg EAG/g d'extrait. La GC-MS et GC-MS/MS a identifié plusieurs composés phénoliques dotés de diverses activités biologiques. Une activité antiradicalaire importante a été notée sur DPPH ( $25.16 \pm 1.21$  µg/ml) et un pouvoir réducteur du fer modéré a été révélé avec le FRAP ( $163.19 \pm 6.01$  µg/ml). Par contre, les racines de la plante sont pourvues d'une capacité antiinflammatoire importante, mise en évidence avec les tests, d'inhibition de l'hémolyse (stabilisation de la membrane érythrocytaire) et d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines (BSA).

L'étude *in vivo* a démontré un sérieux endommagement histopathologique et morphométrique du testicule, exprimé sur des cellules germinales dégénérées avec absence de spermatozoïdes et des cellules de Leydig et de Sertoli vacuolisées ; les paramètres spermatiques et la production de testostérone sont extrêmement altérés.

Le traitement avec *W. frutescens* à la dose de 200 mg/kg a nettement amélioré la quasi-totalité des changements pathologiques hormonal, spermatique et tissulaire. Cette dose a rétabli les niveaux de testostérone sérique à la valeur normale ce qui a conduit à l'activation de la spermatogenèse et donc l'augmentation de la densité spermatique. Contrairement à la dose 400mg/kg dont les répercussions sont négatives sur tous les paramètres étudiés. Ce qui nous amène à conclure que *W. frutescens* est inhibitrice à dose élevée.

Ce modeste travail est considéré comme une étape préliminaire et pose les bases scientifiques pour démontrer et valider les avantages thérapeutiques de *W. frutescens* comme

## *Conclusion et perspectives*

plante médicinale avec un statut antioxydant et antiinflammatoire par excellence. Les désordres occasionnés à la fonction testiculaire par les métaux lourds testés ont été nettement améliorés par les racines de cette plante. Les données présentées caractérisent, le plomb et le cadmium comme étant sérieusement toxiques pour les processus de la spermatogénèse et la stéroïdogenèse ainsi que l'axe gonadotrope, et apportent des informations précieuses sur le bénéfice de la plante alloué à la sphère génitale juste avec une faible dose de 200mg/kg/j. *Withania frutescens* peut donc être considéré comme un produit thérapeutique naturel potentiel recommandé dans le traitement des troubles de la fertilité masculine liés à ces agents polluants et dans la prise en charge de l'infertilité en général.

Cette investigation ouvrira de nouvelles perspectives, pour tirer profit pleinement des vertus thérapeutiques de cette plante, il est important de :

- Etendre l'étude sur les parties aériennes de la plante et varier les solvants.
- Doser les métaux lourds dans les homogénats tissulaires et dans le plasma séminal par le SAA.
- Evaluer les paramètres du stress oxydatif dans les homogénats tissulaires et le plasma séminal.
- Envisager de mener une étude sur les prépubères, in utero et les femelles.
- Compléter et confirmer les résultats histologiques par des données ultra-structurales avec l'usage de la microscopie électronique.
- Focaliser un travail approfondi sur la cellule de Leydig et la cellule de Sertoli.
- Approfondir le travail sur les effets hépatoprotecteur, néphroprotecteur, antiinflammatoire et antioxydant *in vivo*, antidiabétique *in vitro* et *in vivo*, et antimicrobien.
- Envisager de tester la plante contre les effets délétères des perturbateurs endocriniens et des agropesticides sur les fonctions physiologiques et essentiellement sur la fonction de reproduction.

## *Conclusion et perspectives*

- Elargir le travail sur les autres organes reproducteurs et l'axe gonadotrope en dosant la FSH et la LH et éventuellement d'autres hormones.
- Aborder le volet enzymatique telles que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leur rôle déterminant dans le remodelage tissulaire en particulier sur la barrière hémato-testiculaire et les remaniements structuraux du compartiment intertubulaire et la lame basale.
- Etendre l'étude sur les éventuelles répercussions de la plante sur les désordres neurologiques, métaboliques et les néoplasies. Les bénéfiques analgésiques, sédatifs, antispasmodique et gastro-intestinaux.
- Employer d'autres méthodes (immunohistochimie, western blot, PCR, etc.)

# *Références Bibliographiques*

---

**Références Bibliographiques**

- Abarikwu, S. O., Oruitemeka, S., Uwadileke, I. A., Omeodu, S. I., Okoye, N. F., Mgbudom-okah, C. J., and Ohanador, R. (2018).** Oral administration of cadmium depletes intratesticular and epididymal iron levels and inhibits lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48(April), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.04.011>
- Abdel-Emam, R. A., and Ahmed, E. A. (2021).** Ameliorative effect of L-carnitine on chronic lead-induced reproductive toxicity in male rats. *Veterinary Medicine and Science*, 7(4), 1426. <https://doi.org/10.1002/VMS3.473>
- Abdel Moniem, A., Dkhil, M. A., and Al-quraishy, S. (2010).** Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7216–7223. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1041>
- Abd Elnabi, M.K., Elkaliny, N.E., Elyazied, M.M., Azab, S.H., Elkhalfifa, S.A., Elmasry, S., Mouhamed, M.S., Shalamesh, E.M., Alhorienny, N.A., Abd Elaty, A.E., Elgendy, I.M., Etman, A.E., Saad, K.E., Tsigkou, K., Ali, S.S., Kornaros, M., and Mahmoud, YA. (2023).** Toxicity of Heavy Metals and Recent Advances in Their Removal: A Review. *Toxics*, 11(7), 580. doi: 10.3390/toxics11070580.
- Adamczewska, D., Słowikowska-Hilczer, J., and Walczak-Jędrzejowska, R. (2022).** The Fate of Leydig Cells in Men with Spermatogenic Failure. *Life (Basel)*, 12(4), 570. doi: 10.3390/life12040570.
- Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V., and Duranova, H. (2014).** Effects of Subchronic Exposure to Cadmium and Diazinon on Testis and Epididymis in Rats. *The Scientific World Journal*, 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/632581>
- Adhikari, L., Kotiyal, R., Pandey, M., Bharkatiya, M., Sematy, A., and Semalty, M. (2020).** Effect of Geographical Location and Type of Extract on Total Phenol/Flavon Contents and Antioxidant Activity of Different Fruits Extracts of *Withania somnifera*. *Current Drug Discovery Technologies*, 17(1), 92–99. <https://doi.org/10.2174/1570163815666180807100456>
- Adhikari N., Inha, N., and Saxena, D. K. (2000).** Effect of lead on Sertoli germ cell coculture of rat. *Toxicology Letters*, 116, 45–49.
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., and Shah, R. (2021).** Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333.

## Références bibliographiques

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., and Chyatte, M. R. (2015).** A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., and Gharagozloo, P. (2016).** Causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Reproduction, Fertility and Development*, 28, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00793-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00793-1)
- Ajarem, J. S., Hegazy, A. K., Allam, G. A., Allam, A. A., Maodaa, S. N., and Mahmoud, A. M. (2021).** Effect of Visnagin on Altered Steroidogenesis and Spermatogenesis, and Testicular Injury Induced by the Heavy Metal Lead. *Comb Chem High Throughput Screen*, 24(6), 758–766. <https://doi.org/10.2174/1386207323999200918124639>.
- Akinola, A. O., Wahab, O. A., and Raji, Y. (2021).** *Carpolobia lutea* Root Extract Improved Steroidogenic Activity in Male Wistar Rats Exposed to Cadmium. *Niger. J. Physiol. Sci*, 36(December), 181–187.
- Al-Okaily, B. N., and Murad, H. F. (2021).** Role of alpha lipoic acid in protecting testes of adult rats from lead toxicity. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 305–312. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.126814.1386>
- Alagesan, V., and Venugopal, S. (2019).** Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of *Withania somnifera* and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities. *BioNanoScience (2019)*, 9, 105–116.
- Alam, N., Hossain, M., Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., and Gan, S. H. (2011).** High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-65>
- Alam, N., Hossain, M., Mottalib, M. A., Sulaiman, S. A., Gan, S. H., and Khalil, M. I. (2012).** Methanolic extracts of *Withania somnifera* leaves, fruits and roots possess antioxidant properties and antibacterial activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-175>
- Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., and Sabrina, M. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d’une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. Maritima L. *Bulletin de La Societe Royale Des Sciences de Liege*, 87, 13–21. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.7398>
- Ali, H., and Khan, E. (2018).** What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition.

## Références bibliographiques

- Toxicological and Environmental Chemistry*, 100(1), 6–19.  
<https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>
- Ali, S. A., Al-Derawi, K. H., and Al monsour, N. A. A. (2018).** Testicular toxic effect of lead acetate on adult male rats and the potential protective role of alcoholic extract of ginseng (histological, histomorphometrical and physiological). *Scientific Journal of Medical Research*, 02(06), 87–92. <https://doi.org/10.37623/sjmr.2018.2607>
- Alotaibi, M. F., Al-Joufi, F., Seif, H. S. A., Alzoghaibi, M. A., Alotaibi, L. D. M. F., Al-Joufi, F., Seif, H. S. A., Alzoghaibi, M. A., Djouhri, L., Ahmeda, A. F., Mahmoud, A. M., 5, A. F. A., and Mahmoud, A. M. (2023).** Umbelliferone Inhibits Spermatogenic Defects and Testicular Injury in Lead-Intoxicated Rats by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation , and Improving Nrf2 / HO-1 Signaling. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 4003–4019. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265636>.
- Alzahrani, A. J. (2022).** Promising Antioxidant and Antimicrobial Potencies of Chemically-Profiled Extract from *Withania aristata* (Aiton) Pauquy against Clinically-Pathogenic Microbial Strains. *Molecules Article*, 27, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27113614%0AAcademic>
- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., and Heredia, J. B. (2016).** Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food and Agriculture*, 2. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>
- Anand, U., Jacobo-herrera, N., Altemimi, A., and Lakhssassi, N. (2019).** A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites*, 9, 1–13.
- Annie, L., Nicy, V., Rempuia, V., Marak, C.C., Gurusubramanian, G., and Roy, V.K. (2023).** Morin mitigates cadmium-induced testicular impairment by stimulating testosterone secretion and germ cell proliferation in mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 37(9):e23400. doi: 10.1002/jbt.23400.
- Anses. (2022).** Document relatif à l’expertise en vue de la fixation de valeurs limites d’exposition à des agents chimiques en milieu professionnel - Evaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d’exposition sur le lieu de travail pour le plomb et ses composés inorganiques. (Saisine 2013-SA-0042). Maisons-Alfort : Anses, 169 p.
- Aparna, V., Dileep1, K. V., Mandal, P. K., Karthe, P., Sadasivan, C., and Haridas, M. (2012).** Anti-Inflammatory Property of n -Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chem Biol Drug*, 2 (November), 434–439.

## Références bibliographiques

<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01418.x>

- Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Yari, A., and Alizadeh Miran, R. (2014).** Saffron Improves Epididymal Sperm Parameters in Rats Exposed to Cadmium. *Nephro-Urology Monthly*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.5812/numonthly.12125>
- Assi, M. A., Hezme, M. N. M., Haron, A. W., Sabri, M. Y. M., and Rajion, M. A. (2016).** The detrimental effects of lead on human and animal health. *Veterinary World*, 9(6), 660–671. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.660-671>
- Auger, J. (2018).** Spermatogenic Cells—Structure. *Encyclopedia of Reproduction*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64561-0>
- Avellar, M. C. W., and Hinton, B. T. (2019).** Epididymis. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (2nd ed., Vol. 2, pp. 807–813). I Huhtaniemi & L Martini.
- Azhar, M. F., Naseer, U., Aziz, A., Zafar, S., Qadir, I., Farooq, M., Ahmad, I., and Anjum, K. (2020).** Antioxidant and Phytochemical composition of Leaves, Stem and Root Extracts of *Withania coagulans* and *Withania somnifera*. *Journal of Medicinal and Spice Plants*, 24(1), 27–30.
- Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., and Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11), 1086–1089. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100167>
- Bajgiran, F. A., Koozpar, Z. K., and Salehzadeh, A. (2023).** Effects of N-Acetylcysteine Supplementation on Oxidative Stress and Expression of Apoptosis-Related Genes in Testicular Tissue of Rats Exposed to Lead. *Biological Trace Element Research*, 201(5), 2407–2415. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03325-0>.
- Barbhuiya, S. A. S. K., and Sengupta, M. (2015).** The Toxic Effects of Lead on Testicular Macrophage Immunomodulation and Sperm Cell Parameters in Mice. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 9(5), 1–10. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/17937>.
- Behairy, A., Hashem, M. M., Abo-el-sooud, K., El-metwally, A. E., and Hassan, B. A. (2022).** Quercetin Abates Aluminum Trioxide Nanoparticles and Lead Acetate Induced Altered Sperm Quality, Testicular Oxidative Damage, and Sexual Hormones Disruption in Male Rats. *Antioxidants*, 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11112133>
- Bellakhdar, J. (1997).** The traditional Moroccan pharmacopoeia, medicine and Arabic popular knowledge. In M. Guy (Ed.), *Traditional Moroccan Pharmacopoeia* (pp. 465–466).

## Références bibliographiques

- Bereksi, M. S., Hassaïne, H., Bekhechi, C., and Abdelouahid, D. E. (2018).** Evaluation of Antibacterial Activity of some Medicinal Plants Extracts Commonly Used in Algerian Traditional Medicine against some Pathogenic Bacteria. *Pharmacogn J*, 10(3), 507–512.
- Berker, K. I., Guclu, K., Tor, Izzet, and Apak, R. (2007).** Comparative evaluation of Fe ( III ) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline , batho -phenanthroline , tripyridyltriazine ( FRAP ), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Bernard, A., and Lauwerys, R. (1986).** Effects of Cadmium Exposure in Humans. In E. C. Foulkes (Ed.), *Cadmium* (pp. 135–177). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70856-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70856-5_5)
- Bernhoft, R.A. (2013).** Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal*, 2013, 7.
- Bhandari, L., and Rajbhandari, M. (2014).** Isolation of quercetin from flower petals, estimation of total phenolic, total flavonoid and antioxidant activity of the different parts of rhododendron arboreum smith. *Scientific World*, 12, 34–40.
- Bhardwaj, J. K., Paliwal, A., and Saraf, P. (2021).** Effects of heavy metals on reproduction owing to infertility. *J Biochem Mol Toxicol*, 35(8), e22823. <https://doi.org/10.1002/jbt.22823>
- Bhardwaj, J. K., and Panchal, H. (2021).** Quercetin mediated attenuation of cadmium-induced oxidative toxicity and apoptosis of spermatogenic cells in caprine testes *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 62, 374–384. <https://doi.org/10.1002/em.22450>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., and Dada, R. (2017).** Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Bonam, S. R., Wang, F., and Muller, S. (2019).** Lysosomes as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18, 923–948. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0036-1>
- Boorman, G. A., Dellarco, V., Dunnick, J. K., Chapin, R. E., Hunter, S., Hauchman, F., Gardner, H., Mike, C., and Sills, R. C. (1999).** Drinking water disinfection byproducts: Review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspectives*, 107(SUPPL. 1), 207–217. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s1207>
- Boroujeni, S. N., Malamiri, F. A., Bossaghzadeh, F., Esmaeili, A., and Moudi, E. (2022).** The most important medicinal plants affecting testosterone production : a systematic

## Références bibliographiques

- review sperm and. *JBRA Assisted Reproduction*, 26(3), 522–530. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20210108>
- Boskabady, M., Marefati, N., Farkhondeh, T., Shakeri, F., Farshbaf, A., and Boskabady, M. H. (2018).** The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. *Environment International*, 120(August), 404–420. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.013>
- Boudou, F., Bendahmane-SALMI, M., Benabderrahmane, M., Belakredar, A., Benalia, A., Beghdadli, B., and Kandouci, B. dine A. (2020).** Effect of *Curcuma longa* Aqueous Extract on Male Fertility in Aluminum Exposed Wistar Rats. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5), 11–17. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4275>
- Boulebd, H. (2019).** Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127210>
- Bouslamti, M., El Barnossi, A., Kara, M., Alotaibi, B. S., Al Kamaly, O., Assouguem, A., Lyoussi, B., and Benjelloun, A. S. (2022).** Total Polyphenols Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaves of *Solanum elaeagnifolium* Cav. from Morocco. *Molecules*, 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27134322>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 28, 25–30.
- Bremer, A. A., and Miller, W. L. (2014).** Regulation of Steroidogenesis. *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, 207–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5>
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M. W., Reveal, J. L., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Anderberg, A. A., Fay, M. F., Goldblatt, P., Judd, W. S., Källersjö, M., Kårehed, J., Kron, K. A., Lundberg, J., Nickrent, D. L., Olmstead, R. G., Oxelman, B., Pires, J. C., Rodman, J. E., Rudall, P. J., Savolainen, V., Sytsma, K. J., Van Der B, M., Wurdack, K., Xiang, J Q.Y., and Zmarzty, S. (2003).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(4), 399–436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>
- Bribi, N. (2018).** Pharmacological activity of Alkaloids : A Review. *Asian Journal Of Botany*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.63019/ajb.v1i2.467>
- Bromfield, J. J., Ibrahim, L. A., and Rizo, J. A. (2018).** Seminal Vesicle Gland Overview. *Encyclopedia of Reproduction*, 341–343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238->

## Références bibliographiques

3.64598-1

**Cadmium et composés minéraux. (2022).** Biotox-Inrs.

**Carlson, B. M. (2019).** The Reproductive System. *The Human Body*, 373–396.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00014-4>

**Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., and Genchi, G. (2016).** Lead Toxicity , Antioxidant Defense and Environment. *Environmental Contamination and Toxicology*,. <https://doi.org/10.1007/398>

**Chabchoub, I., Nouioui, M. A., Araoud, M., Mabrouk, M., Amira, D., Aribia, M. H. Ben, Mahmoud, K., Zhioua, F., Merdassi, G., and Hedhili, A. (2021).** Effects of lead, cadmium, copper and zinc levels on the male reproductive function. *Andrologia*, 53(9), e14181. <https://doi.org/10.1111/AND.14181>

**Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., and Bhattacharya, S. (2012b).** Evaluation of Anti-inflammatory Effect of Ashwagandha : A Preliminary Study in vitro. *Pharmacognosy Journal*, 4(29), 47–49. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.29.7>

**Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., and Bhattacharya, S. (2012a).** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178–S180. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60154-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60154-3)

**Chang, C.-N. (2016).** Oxidative stress in human Reproduction. In *International Journal of Epilepsy* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijep.2015.12.011>

**Chapin, R. E., Morgan, K. T., and Bus, J. S. (1983).** The Morphogenesis of Testicular Rats by Orally Administered Degeneration Induced. *EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY*, 38, 149–169.

**Chaudhary, N., Sabikhi, L., Hussain, S. A., and H, S. K. M. (2020).** A Comparative Study of the Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Selected Herbal Extracts. *Journal OfHerbal Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100343>

**Chen H., Ge, R. S., and Zirkin, B. R. (2009).** Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1–2), 9–16.  
<https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.01.023>

**Chen X., Feng, H., El-kott, A. F., and Abd-Ella, E. M. (2020).** *Origanum vulgare* L. leaves extract alleviates testis and sperm damages induced by finasteride: Biochemical, Immunohistological and apoptosis genes based evidences. *Andrologia.*, June, 1–17.  
<https://doi.org/10.1111/and.13823>

**Chen, Y.-B. (2023).** Cowper gland. *Uro pathology*, 10–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

## *Références bibliographiques*

323-65395-4.00012-9

- Chen, Z., Liu, Q., Zhao, Z., Bai, B., Sun, Z., Cai, L., Fu, Y., Ma, Y., Wang, Q., and Xi, G. (2021).** Effect of hydroxyl on antioxidant properties of 2,3- dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one to scavenge free radicals. *RSC Advances*, *11*, 34456–34461. <https://doi.org/10.1039/D1RA06317K>
- Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2012).** The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, *64*(1), 16–64.
- Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2017).** Spermatogenesis, Mammals. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07191-0>
- Cheyrier, V. (2012).** Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, *11*. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Chinoy, N. J., Tewari, K., and Jhala, D. D. (2004).** Fluoride and / or arsenic toxicity in mice testis with formation of giant cells and subsequent recovery by some antidotes. *Fluoride*, *37*(3), 172–184.
- Chirumamilla, P., and Taduri, S. (2023).** Assessment of in vitro anti - inflammatory , antioxidant and antidiabetic activities of *Solanum khasianum* Clarke. *Vegetos*, *36*, 575–582. <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00410-6>
- Christin-Maitre, S., and Young, J. (2022).** Androgens and spermatogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)*, *83*(3), 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2022.04.010>
- Chrysargyris, A., Mikallou, M., and Petropoulos, S. (2020).** Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agronomy*, *10*, 1–28.
- Clulow, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., and Man, S. Y. (1998).** Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT-*, 1–14.
- Concessao, P. L., Bairy, K. L., and Raghavendra, A. P. (2023).** Ameliorating effect of *Mucuna pruriens* seed extract on sodium arsenite- induced testicular toxicity and hepatorenal histopathology in rats. *Veterinary World*, *16*(1), 82–93. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.82-93>.
- Cooper, T. G. (2007).** Sperm maturation in the epididymis: A new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*, *9*(4), 533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00285.x>
- Cornwall, G. A. (2009).** New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, *15*(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>

## Références bibliographiques

- Cornwall, G. A. (2018).** Epididymis: Sperm Maturation and Motility. *Encyclopedia of Reproduction*, 292–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64369-6>
- COTRUVO, J. A. (2017).** WHO Guidelines for Drinking Water Quality : First Addendum to the Fourth Edition. *American Water Works Association*, 109(7). <https://doi.org/10.5942/jawwa.2017.109.0087>
- Creasy, D. M., and Chapin, R. E. (2018).** Male Reproductive System. *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition*, 459–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00017-4>
- Crocetto, F., Risolo, R., Colapietro, R., Bellavita, R., Barone, B., Ballini, A., Arrigoni, R., Francesco Caputo, V., Luca, G., Grieco, P., Santini, G., and Brancorsini, S. (2023).** Heavy Metal Pollution and Male Fertility: An Overview on Adverse Biological Effects and Socio-Economic Implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 23(2),129-146. doi: 10.2174/1871530322666220627141651.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., and Lewis, N. G. (2000).** Natural Products ( Secondary Metabolites ). In R. J. B. Buchanan, W. Gruissem (Ed.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (pp. 1250–1318). Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists, [2000].
- da Cunha de Medeiros, P., Samelon, R.R., Silvan, A.P.G., da Silva Araujo Santiago, M., Duarte, F.A., de Castro, Í.B., and Perobelli, J.E. (2019).** Prepubertal exposure to low doses of sodium arsenite impairs spermatogenesis and epididymal histophysiology in rats. *Environ Toxicol*, 34(1), 83-91. doi: 10.1002/tox.22660.
- Daku, A. B., Salisu, A. I., and El-ta’alu, A. B. (2016).** Age-related effects of lead poisoning on sex hormones in adult male Wistar rats. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 7(4), 23–27. <https://doi.org/10.5897/JPAP2015.0104>
- Dasgupta, A., and Wahed, A. (2021).** Common poisonings including heavy metal poisoning. In A. Dasgupta & A. Wahed (Eds.), *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control (Second Edition)* (Second Edi, pp. 405–419). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815960-6.00025-X>
- Debnath, B., Somraj, W., Das, M., Goswami, S., Kumar, M., Maiti, D., and Manna, K. (2018).** Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*, 9, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>
- Denison, F. C., Smith, L. B., Muckett, P. J., O’Hara, L., Carling, D., and Woods, A. (2011).** Lkb1 is an essential regulator of spermatozoa release during spermiation in the mammalian testis. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028306>

## Références bibliographiques

- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., and Kumar, S. (2013).** Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(March), S1193–S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>
- Dietz, D. D., Leininger, J. R., Rauckman, E. J., Thompson, M. B., Chapin, R. E., Morrissey, R. L., and Levine, B. S. (1991).** Toxicity studies of acetone administered in the drinking water of rodents. *Toxicological Sciences*, 17(2), 347–360. <https://doi.org/10.1093/toxsci/17.2.347>
- Djuric, A., Begic, A., Gobeljic, B., Ninkovic, M., Stanojevic, I., Vojvodic, D., Pantelic, A., Zebic, G., Prokic, V., Dejanovic, B., Stojanovic, I., Pavlica, M., Djukic, D., Saso, L., Djurdjevic, D., Pavlovic, M., Topic, A., Vujanovic, D., Stevnovic, I., and Djukic, M. (2015).** Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.004>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., and 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, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dokumacioglu, E., Iskender, H., Yenice, G., Kapakin, K. A. T., Sevim, C., Hayirli, A., Saral, S., and Comakli, S. (2018).** Effects of astaxanthin on biochemical and histopathological parameters related to oxidative stress on testes of rats on high fructose regime. *Andrologia*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.13042>
- Dolati, P., Khodabandeh, Z., Zamiri, M. J., Jamhiri, I., and Mehrabani, D. (2020).** The Effect of Lead Acetate and Quercetin on the Tight and Gap Junctions in the Mouse Testis. *Biol Trace Elem Res*, 198(2), 535–543. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02079-x>.
- Dong, B., An, L., Yang, X., Zhang, X., Zhang, J., Tuerhong, M., Jin, D. Q., Ohizumi, Y., Lee, D., Xu, J., and Guo, Y. (2019).** Withanolides from *Physalis peruviana* showing nitric oxide inhibitory effects and affinities with iNOS. *Bioorganic Chemistry*, 87, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.051>
- Dorostghoal, M., Seyyednejad, S. M., and Jabari, A. (2014).** Protective effects of *Fumaria parviflora* L. on lead-induced testicular toxicity in male rats. *Andrologia*, 46(4), 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.12100>
- El-Sayed, Y. S., and El-Neweshy, M. S. (2010).** Impact of lead toxicity on male rat reproduction at “ Hormonal and Histopathological Levels .” *Toxicological &*

## Références bibliographiques

- Environmental Chemistry*, 92(4), 765–774. <https://doi.org/10.1080/02772240902984453>
- EL Azzouzi, F., and Zidane, L. (2015).** La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 91(1), 8493–8502. <https://doi.org/10.4314/jab.v91i1.8>
- EL Bouzidi, L., Bakrim, W. Ben, Mahiou, V., Azas, N., and Larhsini, M. (2017).** In vitro antiplasmodial activity of *Withania frutescens* Solanaceae. *European Journal of Integrative Medicine*, 14, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.08.009>
- EL Bouzidi, L., Larhsini, M., Mohammed, M., and Abbad, A. (2011).** Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Withania frutescens*. *Natural Product Communications*, 6(10), 1447–1450. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601009>
- EL Bouzidi, L., Mahiou-Leddet, V., Bun, S.-S., Larhsini, M., Abbad, A., Markouk, M., Mabrouki, F., Boudon, M., Ollivier, E., and Bekkouche, K. (2013).** Cytotoxic withanolides from the leaves of Moroccan *Withania frutescens*. *Pharm Biol*, 51(May 2014), 1040–1046. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.775162>
- Elgawish, R. A. R., and Ghanem, M. E. (2014).** Effect of Long Term Cadmium Chloride Exposure on Testicular Functions in Male Albino Rats. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(4), 182-188. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2014.182.188>.
- EL Moussaoui, A., Allali, A., Bourhia, M., Chebbac, K., Salamatullah, A. M., Soufan, W., Nafidi, H.-A., Aboul-Soud, M. A. M., Ouahmane, L., and Bari, A. (2022).** Insecticidal and Antifungal Activities of Chemically-Characterized Essential Oils from the Leaves of *Withania frutescens* L. *Life*, 12(88), 1–14.
- EL Moussaoui, A., Bourhia, M., Jawhari, F. Z., Es-safi, I., Ali, S. S., Bari, A., Mahmood, H. M., Bousta, D., and Bari, A. (2020a).** *Withania frutescens* . L Extract : Phytochemical Characterization and Acute and Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Studies in Mice. *BioMed Research International*, 2020, 7.
- EL Moussaoui, A., Bourhia, M., Jawhari, F. Z., Khalis, H., Chedadi, M., Agour, A., Salamatullah, A. M., Alzahrani, A., Alyahya, H. K., Alotaibi, A., Bousta, D., and Bari, A. (2021b).** Responses of *Withania frutescens* (L.) Pauquy (Solanaceae) Growing in the Mediterranean Area to Changes in the Environmental Conditions: An Approach of Adaptation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.666005>
- EL Moussaoui, A., Bourhia, M., Jawhari, F. Z., Mechchate, H., Slighoua, M., Bari, A., Ullah, R., Mahmood, H. M., Ali, S. S., Ibenmoussa, S., Bousta, D., and Bari, A. (2020b).** Phytochemical Identification , Acute , and Sub-Acute Oral Toxicity Studies of

## Références bibliographiques

- the Foliar Extract of *Withania frutescens*. *Molecules*, 25, 1–12.
- EL Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Almehdi, A. M., Elmsellem, H., Benbrahim, K. F., Boust, D., and Bari, A. (2019b)**. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*.L. *Bioorganic Chemistry*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103337>
- EL Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Bourhia, M., Maliki, I., Sounni, F., Mothana, R. A., Boust, D., and Bari, A. (2020c)**. *Withania frutescens* : Chemical characterization , analgesic , anti - inflammatory , and healing activities. *Open Chemistry*, 18, 927–935.
- EL Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Boust, D., and Bari, A. (2019a)**. Phytochemical characterization and antioxidant activity of the northern moroccan species: *Withania frutescens* L . *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Reserch*, 12(6), 276–279.
- EL Moussaoui, A., Mechchate, H., Bourhia, M., Es-safi, I., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S., Alyahya, H. K., Boust, D., and Bari, A. (2021a)**. Glycemic Control Potential of Chemically Characterized Extract from *Withania frutescens* L . Roots in Severe Diabetes-Induced Mice. *Applied Sciences*, 11, 9.
- Elgawish, R. A. R., and Abdelrazek, H. M. A. (2014)**. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicology Reports*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.010>
- Ezez, D., Mekonnen, N., and Tefera, M. (2023)**. Phytochemical analysis of *Withania somnifera* leaf extracts by GC-MS and evaluating antioxidants and antibacterial activities. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 581–590. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2173229>
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., and Abdelly, C. (2008)**. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(5), 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.008>
- Ferrer-Gallego, P. P., and Laguna, E. (2014)**. Typification of the Linnaean name *Atropa frutescens* (Solanaceae) of an endemic western mediterranean species. *Flora Mediterranea*, 24(July), 37–38. <https://doi.org/10.7320/FIMedit24.037>
- Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., and Pointis, G. (2004)**. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, 18(3), 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.01.002>
- Flannigan, R., and Goldstein, M. (2018)**. Vas Deferens. *Encyclopedia of Reproduction*, 305–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64371-4>

## Références bibliographiques

- Flück, C. E., and Pandey, A. V. (2017).** Testicular Steroidogenesis. *Endocrinology Of the Testis and Male Reproduction*, 343–371. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3_10)
- Ganguly, B., Kumar, N., Ahmad, A. H., and Rastogi, S. K. (2017).** Influence of phytochemical composition on in vitro antioxidant and reducing activities of Indian ginseng [*Withania somnifera* (L.) Dunal] root extracts. *Journal of Ginseng Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.05.002>
- Gao, S., Zhao, B., Long, C., Heng, N., Guo, Y., Sheng, X., Wang, X., Xing, K., Xiao, L., Ni, H., Wu, S., and Qi, X. (2022).** Natural Astaxanthin Improves Testosterone Synthesis and Sperm Mitochondrial Function in Aging Roosters. *Antioxidants*, 11, 1–16.
- Garu, U., Sharma, R., and Barber, I. (2011).** Effect of lead toxicity on developing testis of mice. *IJPSR*, 2(9), 2403–2407.
- Gauntner, T. D., and Prins, G. S. (2018).** Prostate Cell Biology and Secretion. *Encyclopedia of Reproduction*, 325–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64372-6>
- Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Mohaqiq, M., Tahmasebi, M., Seify, M., and Taheri, M. (2021).** Counteracting effects of heavy metals and antioxidants on male fertility. *BioMetals*, 34, 439–491. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00297-x>
- Gheffour, K., Boucherit, K., and Boucherit-Otmani, Z. (2015).** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 7. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0917-8>
- Ghorbel-Koubaa, F., Chaâbane, M., Chiab, N., Jdidi, H., Sefi, M., Boudawara, O., Turki, M., Bouzid, R. G., Sellami, T. B., Ayadi, F. M., and Feki, A. El. (2022).** Beneficial effects of *Salvia officinalis* essential oil on vanadium-induced testicular injury, DNA damage and histological alterations in Wistar rats. *Biometals*, Jun 28. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00407-3>
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., and Groneberg, D. A. (2006).** The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1(22), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>
- Gogoi, R., Sarma, N., Pandey, S. K., and Lal, M. (2021).** Phytochemical constituents and pharmacological potential of *Solanum khasianum* C.B. Clarke., extracts: Special emphasis on its skin whitening, anti-diabetic, acetylcholinesterase and genotoxic activities. *Trends in Phytochemical Research*, 5(2), 47–61. <https://doi.org/10.30495tpr.2021.1917249.1190>
- Gorbel, F., Boujelbene, M., Makni-Ayadi, F., Guermazi, F., Croute, F., Soleilhavoup, J. P., and Feki, A. El. (2002).** Impact of lead given in drinking water on the endocrine and

## Références bibliographiques

- exocrine sexual activity in pubescent rats. Determination of an apoptic process. *Comptes Rendus Biologies*, 325, 927–940. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(02\)01492-0](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01492-0)
- Griswold, M. D. (2015).** The initiation of spermatogenesis and the cycle of the seminiferous epithelium. *Sertoli Cell Biology*, 233–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00008-9>
- Gulati, S., Madan, V. K., Jangra, S. S., and Yadav, I. S. (2017).** Determination of total phenolics, total flavonoids and evaluation of DPPH free radical scavenging activity of Ashwagandha (*Withania somnifera* L.) roots. *Asian Journal of Chemistry*, 29(8), 1660–1664. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20537>
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., and Rupasinghe, H. P. V. (2018).** In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. *Biomedicines Article*, 6(107), 1–10. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040107>
- Ha, J. W., Yu, J. S., Lee, B. S., Kang, D. M., Ahn, M. J., Kim, J. K., and Kim, K. H. (2022).** Structural Characterization of Withanolide Glycosides from the Roots of *Withania somnifera* and Their Potential Biological Activities. *Plants (Basel)*, 11(6), 767. <https://doi.org/10.3390/plants11060767>
- Hachfi, L., Trimèche, M., Chekir, A., Kerkeni, A., fadhel, N. M., and Sakly, R. (2008).** Effects of oral intoxication by lead acetate on pituitary-testicular axis in the pubertal rat. *IJPH*, 5(4), 297–303.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., and Nouredine, H. (2016).** Screening phytochimique , activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d ' Algérie. *Phytothérapie*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1086-8>
- Hamidi, M., Ziaee, M., Delashoub, M., Marjani, M., Karimitabar, F., Khorami, A., and Ahmadi, N. A. (2015).** The effects of essential oil of *Lavandula angustifolia* on sperm parameters quality and reproductive hormones in rats exposed to cadmium. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 121–128.
- Hamilton, D. W. (1975).** Structure and function of the epithelium lining efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. *Handbook of Physiology, Sect 7*, 259–301.
- Hansen, L. A., Clulow, J., and Jones, R. C. (1999).** The role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in fluid and solute transport in the rat efferent ducts. *Experimental Physiology*, 84(3), 521–527.
- Harrison, J. E., Weber, S., Jakob, R., and Chute, C. G. (2021).** ICD-11: an international classification of diseases for the twenty-first century. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 21. [10.1186/S12911-021-01534-6](https://doi.org/10.1186/S12911-021-01534-6)
- Hassan, E., Kahilo, K., Kamal, T., Hassan, M., and Saleh Elgawish, M. (2019).** The

## Références bibliographiques

- protective effect of epigallocatechin-3-gallate on testicular oxidative stress in lead-induced toxicity mediated by Cyp19 gene / estradiol level. *Toxicology*, 422(October 2018), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.04.015>
- Heinrich, A., DeFalco, T. (2020).** Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8(4),903-914. doi: 10.1111/andr.12703
- Hermo, L., and Robaire, B. (2002).** Epididymal Cell Types and Their Functions. In: Robaire, B., Hinton, B.T. (eds) *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0679-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0679-9_5)
- Hess, R. A. (2002).** The efferent ductules: structure and functions. In *The epididymis: from molecules to clinical practice* (pp. 49–80). Springer.
- Hess, R. A. (2003).** Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 52.
- Hess R A. (2005).** Structure of the Sertoli Cell. In M. Griswold and M. Skinner (Eds.), *Sertoli Cell Biology* (1st ed., pp. 19–39). Elsevier Academic Press.
- Hess, R. A. (2015).** Small tubules, surprising discoveries: from efferent ductules in the turkey to the discovery that estrogen receptor alpha is essential for fertility in the male. *Animal Reproduction*, 12(1), 7–23.
- Hess, R. A. (2018).** Efferent Ductules: Structure and Function. *Encyclopedia of Reproduction*, 270–278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64593-2>
- Ho, H.-J., Shirakawa, H., and Komai, M. (2017).** Menaquinone-4 Enhances Steroidogenesis in Testis Derived Tumor Cells Via the Elevation of cAMP Level. In J. O. Gordeladze (Ed.), *Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing* (Vol. 4, pp. 189–198). <https://doi.org/10.5772/63982>
- Hosseini-Khannazer, N., Azizi, G., Eslami, S., Alhassan Mohammed, H., Fayyaz, F., Hosseinzadeh, R., Usman, A. B., Kamali, A. N., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Dehghanifard, E., and Noorisepehr, M. (2020).** The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1697284>
- Hould, R. (1984).** Histopathology and cytopathology techniques. In *Paris – Montréal, Maloine - Décarie*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.004>
- Huang, B., Liu, J., Fu, S., Zhang, Y., Li, Y., He, D., Ran, X., Yan, X., Du, J., Meng, T., Gao, X., and Liu, D. (2020).**  $\alpha$ -Cyperone Attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SH-SY5Y Cells via Activation of Nrf2. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00281>

## Références bibliographiques

- Hu, X., Lin, R., Zhang, C., Pian, Y., Luo, H., Zhou, L., Shao, J., and Ren, X. (2023).** Nano-selenium Alleviates Cadmium-Induced Mouse Leydig Cell Injury, via the Inhibition of Reactive Oxygen Species and the Restoration of Autophagic Flux. *Reprod Sci*, 30(6), 1808-1822. doi: 10.1007/s43032-022-01146-z.
- Huhtaniemi, I. T. (2018).** LH and the Male. *Encyclopedia of Reproduction*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64579-8>
- Huhtaniemi, I., and Teerds, K. (2018).** Leydig Cells. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (2nd ed., pp. 30–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0>
- Hussain, A., Aslam, B., Muhammad, F., and Faisal, M. N. (2021).** In vitro Antioxidant Activity and In vivo Antiinflammatory Effect of *Ricinus communis* (L.) and *Withania somnifera* (L.) Hydroalcoholic Extracts in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200783>
- Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Lee, S. H., Lee, J., and Jeong, H. S. (2013).** Isolation and Identification of the Antioxidant DDMP from Heated Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Prev Nutr Food Sci*, 18(1), 76–90. <https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.1.076>
- Iftikhar, A., Akhtar, M. F., Saleem, A., Riaz, A., Zehravi, M., Rahman, M. H., and Ashraf, G. M. (2022).** Comparative Potential of Zinc Sulfate, L-Carnitine, Lycopene, and Coenzyme Q10 on Cadmium-Induced Male Infertility. *Int J Endocrinol*. <https://doi.org/10.1155/2022/6266613>.
- Ileriturk, M., Benzer, F., Aksu, E. H., Yildirim, S., Kandemir, F. M., Dogan, T., and Dortbudak, B. M. (2020).** Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant , anti-inflammatory , and antiapoptotic properties. *Food Biochemistry*, 45, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13593>
- Ilieva, I., and Sainova, I. (2022).** Mechanisms Of Heavy Metal Toxicity in The Male Reproductive System. *Open Access Research in Anatomy*, 2(5), 1–11. <https://doi.org/10.31031/OARA.2022.02.000546>
- Iqbal, T., Cao, M., Zhao, Z., Zhao, Y., Chen, L., Chen, T., Li, C., and Zhou, X. (2021).** Damage to the Testicular Structure of Rats by Acute Oral Exposure of Cadmium. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jun 4;18(11):6038. doi: 10.3390/ijerph18116038.
- INRS. (2022).** Cadmium et composés minéraux, Bases de données. Fiches toxicologiques. <http://www.inrs.fr/fichetox>.
- Ismail, H., Rasheed, A., Haq, I., Jafri, L., Ullah, N., Dilshad, E., Sajid, M., and Mirza, B. (2017).** Five Indigenous Plants of Pakistan with Anticoagulant Properties in Sprague

## Références bibliographiques

- Dawley Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10.
- Jambor, T., Zajickova, T., Arvay, J., Ivanisova, E., Tirdilova, I., Knizatova, N., Greifova, H., Kovacik, A., Galova, E., and Lukac, N. (2022).** Exceptional Properties of *Lepidium sativum* L. Extract and Its Impact on Cell Viability, Ros Production, Steroidogenesis, and Intracellular Communication in Mice Leydig Cells In Vitro. *Molecules*, 27(16). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27165127>
- Järup, L. (2002).** Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(2), 35–39. [https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl\\_2.35](https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_2.35)
- Jeégou, B., and Rolland, A. D. (2018).** Sertoli Cell. *Encyclopedia of Reproduction*, 24–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64359-3>
- Joseph, A., Shur, B. D., and Hess, R. A. (2011).** Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of Reproduction*, 84(2), 207–217.
- Justin, K., Edmond, S., Ally, M., and Xin, H. (2014).** Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(January), 377–392.
- Kabata-Pendias, A., and Szteke, B. (2015).** *Trace Elements in Abiotic and Biotic Environments* (1st Editio). <https://doi.org/10.1201/b18198>
- Kadhun, S. A. H. (2019).** Effect of different dosage from lead acetate administrated on the liver enzymes and histopathological of liver in white male rats. *J. Pharm. Sci. and Res*, 11(4), 1657–1661.
- Kadry, M. O., and Megeed, R. A. (2018).** Probiotics as a Complementary Therapy in the Model of Cadmium Chloride Toxicity: Crosstalk of  $\beta$ -Catenin, BDNF, and StAR Signaling Pathways. *Biological Trace Element Research*, 185(2), 404–413. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1261-x>
- Kattan, D., Millet, M., et ElMoll, A. (2012).** Développement de méthodes d’analyse pour la détermination de molécules polaires dans des matrices atmosphériques par GC-MS couplée à une étape de dérivatisation. *Lebanese Science Journal*, 13(2), 117–136.
- Kelainy, E. G., Laila, I. M. I., and Ibrahim, S. R. (2019).** The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Khan, M. A., Khan, H., Rauf, A., and Ben Hadda, T. (2015).** Inhibition of thermal induced protein denaturation of extract / fractions of *Withania somnifera* and isolated withanolides. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007138>

## *Références bibliographiques*

- Khattab, F. K. I. (2007).** Histological and Ultrastructural Studies on the Testis of Rat after Treatment with Aluminium Chloride. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(1), 63–72.
- Khodabandeh, Z., Dolati, P., Zamiri, M. J., Mehrabani, D., Bordbar, H., Alaei, S., Jamhiri, I., and Azarpira, N. (2020).** Protective Effect of Quercetin on Testis Structure and Apoptosis Against Lead Acetate Toxicity: an Stereological Study. *Biological Trace Element Research* 2020 199:9, 199(9), 3371–3381. <https://doi.org/10.1007/S12011-020-02454-8>
- Kim, J., Kim, Y., and Kumar, V. (2019).** Heavy metal toxicity: an update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
- Klein, D., Wan, Y. Y., Kamyab, S., Okuda, H., and Sokol, R. Z. (1994).** Effects of Toxic Levels of Lead on Gene Regulation in the Male Axis : Increase in Messenger Ribonucleic Acids and Intracellular Stores of Gonadotrophs within the Central Nervous System. *Biology of Reproduction*, 50, 802–811.
- Knoblauch, S. E., True, L., Tretiakova, M., and Hukkanen, R. R. (2018).** Male Reproductive System. *Comparative Anatomy and Histology*, 335–363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00018-X>
- Kopera, I. A., Bilinska, B., Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2010).** Sertoli germ cell junctions in the testis : a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1546), 1593–1605. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0251>
- Kretser, D. M. (2018).** Hypothalamic Pituitary Testis Axis. *Encyclopedia of Reproduction*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64576-2>
- Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioglu, E., and Mehmet, F. M. (2020).** Morin attenuates acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating the NF- $\kappa$ B, Bax / Bcl-2 and PI3K / Akt / mTOR signaling pathways. *Life Sciences*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118301>
- Kumar, A., Kumar, A., Chaturvedi, A. K., Shabnam, A. A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Gupta, D. K., Malyan, S. K., Kumar, S. S., Khan, S. A., and Yadav, K. K. (2020).** Lead Toxicity : Health Hazards , Influence on Food Chain , and Sustainable Remediation Approaches. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072179>
- Kumar, A., Kumar, R., Rahman, M. S., Iqbal, M. A., Anand, G., Niraj, P. K., and Ali, M. (2015).** Phytoremedial effect of *Withania somnifera* against arsenic-induced testicular

## Références bibliographiques

- toxicity in Charles Foster rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(4), 355–364.  
<https://doi.org/10.22038/ajp.2015.4353>
- Kumar N., and Singh, A. (2015).** Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191–196. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>
- Kundra, R., Samant, S. S., Nandi, S. K., and Sharma, R. K. (2017).** Investigation of antioxidant properties of *Withania somnifera* ( L .) Dunal and influence of physico-chemical properties of soil along the topographic gradients in sub-tropical sub tropical region of the Indian Himalaya. *International Journal of Phytomedicine*, 9, 407–415. <https://doi.org/10.5138/09750185.1986>
- Lahlou, M. (2013).** The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 04(03), 17–31. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.43a003>
- Lamas, C. D. A., Cuquetto-leite, L., Thomazini, B. F., Cordeiro, G. S., and Dolder, H. (2017).** Grape juice concentrate alleviates epididymis and sperm damage in cadmium-intoxicated rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 98, 86–99. <https://doi.org/10.1111/iep.12227>
- Lara, N. L. M., Costa, G. M. J., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Hess, R. A., and França, L. R. (2018).** Testis Physiology Overview and Histology. *Encyclopedia of Reproduction*, 105–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1>
- Leaver, R. B. (2016).** Male infertility: an overview of Causes and Treatment Options. *British Journal of Nursing*, 25(18), 35–41.
- Leung, G. P. H., Cheung, K. H., Leung, C. T., Tsang, M. W., and Wong, P. Y. D. (2004).** Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1–2), 5–13.
- Li, B. B., Smith, B., and Hossain, M. M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>
- Li R-Y, Yang, D., He, Y., Zhou, Y., Li, C., Li, L., Liao, M., Deng, Z., Zhao, L., Zhang, T., Luo, Y., Wang, Y., and Gao, Y. (2023).** Heavy metal ions exchange driven protein phosphorylation cascade functions in genomic instability in spermatocytes and male infertility. *Nucleic Acids Research*, 51(7), 3150–3165.
- Li, W., Pandey, A. K., Yin, X., Chen, J., Stocco, D. M., Grammas, P., and Wang, X. (2011).** Effects of apigenin on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory gene expression

## Références bibliographiques

- in mouse Leydig cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(3), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.01.004>.
- Liu, Q., Sun, M., Wang, T., Zhou, Y., Sun, M., Li, H., Liu, Y., and Xu, A. (2023).** The Differential Antagonistic Ability of Curcumin against Cytotoxicity and Genotoxicity Induced by Distinct Heavy Metals. *Toxics*, 11(3), 233. doi: 10.3390/toxics11030233.
- Luaces, J.P., Toro-Urrego, N., Otero-Losada, M., and Capani, F. (2023).** What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1114769. doi: 10.3389/fcell.2023.1114769.
- Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., and Ochoa-Velasco, C. E. (2019).** Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 59, pp. 79–108). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>.
- Machado-Neves, M. (2023).** Arsenic exposure and its implications in male fertility. *Animal Reproduction*, 19(4), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0119>.
- Machado-Neves, M. (2022).** Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, 291(Pt 2). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
- Mahto, H., Mahato, D., and Sharma, H. P. (2022).** Phytoconstituent estimation and LC-MS studies of eld grown *Withania somnifera* (L.) Dunal root extract in Jharkhand and Bihar. *Research Square*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules27113614%0AAcademic>
- Makhlouf, M. M. M., Eldien, H. M. S., Zagloul, D. A. M., Dief, E. E. A., and Haliem, N. G. A. (2008).** The effect of lead acetate on testicular structure and protective effect of vitamin E in adult albino rat. *Egyptian Journal of Histology*, 31(2), 406–418.
- Man, Y., Liu, Y., Xiong, C., Zhang, Y., Zhang, L. (2023).** Non-Lethal Concentrations of CdCl<sub>2</sub> Cause Marked Alternations in Cellular Stress Responses within Exposed Sertoli Cell Line. *Toxics*, 11(2), 167. doi: 10.3390/toxics11020167.
- Manouchehri, A., Shokri, S., Pirhadi, M., Karimi, M., and Abbaszadeh, S. (2022).** The Effects of Toxic Heavy Metals Lead , Cadmium and Copper on the Epidemiology of Male and Female Infertility. *JBRA Assisted Reproduction*, 00(0), 1–4. <https://doi.org/10.5812/numonthly.12125>
- Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., Ghadraoui, L. E. L., and Aaf, A. (2011).** Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. lycia et *Juniperus phoenicea* ssp. turbinata du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(3), 415–424.

## Références bibliographiques

- Marahatha, R., Gyawali, N., Gyawali, K., Tandan, P., Sharma, K., Adhikari, A., and Bhattarai, S. (2021).** Pharmacologic activities of phytosteroids in inflammatory diseases : Mechanism of action and therapeutic potentials. *Phytotherapy Research.*, April, 1–22. <https://doi.org/10.1002/ptr.7138>
- Marini, H. R., Micali, A., Squadrito, G., Puzzolo, D., Freni, J., Antonuccio, P., and Minutoli, L. (2022).** Nutraceuticals: A New Challenge against Cadmium-Induced Testicular Injury. *Nutrients*, 14(3), 663. <https://doi.org/10.3390/nu14030663>.
- Martinez-Lirola, M. J., Gonzalez-tejero, M. R., and Molero-mesa, J. (1996).** Ethnobotanical Resources in the Province of Almería , Spain : Campos de Nijar. *Economic Botany*, 50(1), 40–56.
- Martinez, C. S., Torres, J. G. D., Pecanha, F. M., Anselmo-Franci, J. A., Vassallo, D. V., Salaices, M., Alonso, M. J., and Wiggers, G. A. (2014).** 60-Day Chronic Exposure to Low Concentrations of HgCl<sub>2</sub> Impairs Sperm Quality : Hormonal Imbalance and Oxidative Stress as Potential Routes for Reproductive Dysfunction in Rats. *PLoS One*, 9(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111202>
- Masoud, A., Hassan, M., Hamid, R. M., Mohammad-Taghi, S., Jamileh Salar, A., Ramin Mazaheri Nezhad, F., and Ali Kalantari, H. (2015).** Protective Effects of Wheat Sprout on Testicular Toxicity in Male Rats Exposed to Lead. *Reproductive System and Sexual Disorders*, 04(04). <https://doi.org/10.4172/2161-038x.1000156>
- Massányi, P., Massányi, M., Madeddu, R., Stawarz, R., and Lukáč, N. (2020).** Effects of Cadmium, Lead, and Mercury on the Structure and Function of Reproductive Organs. *Toxics*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxics8040094>.
- Mechchate, H., Es-safi, I., Louba, A., Alqahtani, A. S., Nasr, F. A., Noman, O. M., Farooq, M., Alharbi, M. S., Alqahtani, A., Bari, A., Bekkari, H., and Bousta, D. (2021).** In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and in vivo antidiabetic activity of *Withania frutescens* L. Foliar extract. *Molecules*, 26, 10. <https://doi.org/10.3390/molecules26020293>
- Medaglia, D. S. A., Vieira, H. R., Silveira, S. da S., Gláucia Eloisa Munhoz de L. Siervo<sup>1, 2</sup>, M. S. da S. M., Mathias, P. C. de F., and Fernandes, G. S. A. (2021).** High-fructose diet during puberty alters the sperm parameters , testosterone concentration , and histopathology of testes and epididymis in adult Wistar rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. <https://doi.org/10.1017/S2040174420001385>
- Mehranjani, M. S., Azizi, M., and Sadeghzadeh, F. (2020).** The effect of melatonin on testis histological changes and spermatogenesis indexes in mice following treatment with

## Références bibliographiques

- dexamethasone. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–10.  
<https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1809672>
- Melila, M., Poutouli, W., Amouzou, K., Tchangbedji, G., Tchaou, M., Doh, A., et Goto, C. (2012).** Induction du stress oxydatif chez l'homme suite à la bioconcentration des éléments traces métalliques (cadmium et plomb) par voie trophique à Kpémé (Sud du Togo). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(3), 1263–1270.  
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i3.29>
- Messaoudi, D., Bouriche, H., Kada, S., and Kernouf, N. (2016).** Anti-inflammatory and antioxidant properties of Algerian *Santolina chamaecyparissus*. *Der Pharmacia Lettre*, 8(13), 80–88.
- Meydanli, E. G., Gumusel, A., Ozkan, S., Tanriverdi, G., Balci, M. B. C., Develi Is, S., Hazar, A. I., Uysal, M., and Bekpinar, S. (2018).** Effects of resveratrol on high-fructose-induced testis injury in rats. *Ultrastructural Pathology*, 42(1), 65–73.  
<https://doi.org/10.1080/01913123.2017.1397075>
- Migdal, C., et Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 27(4), 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274405>
- Miles, S. (2007).** Methyl Salicylate. In S. J. Enna and D. B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–6). Elsevier.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62158-0>
- Miller, W. L., and Auchus, R. J. (2011).** The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151.  
<https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Mollineau, W., Jasper, N. V, Garcia, G. W., Mollineau, W., Adogwa, A., Jasper, N., Young, K., and Garcia, G. (2018).** The Gross Anatomy of the Male Reproductive System of a Neotropical Rodent: the Agouti (*Dasyprocta leporina*). *Wiley Online Library*, 35(1), 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00656.x>
- Montes, F. T. (2004).** NOMBRES Y USOS TRADICIONALES DE LAS PLANTAS SILVESTRES EN ALMERIA. In *Suparyanto dan Rosad (2015)* (Vol. 5, Issue 3).
- Montilla, M. P., Cabo, J., Navarro, M. C., Risco, S., and Jiménez, J. (1990).** The Protective and Curative Action of *Withania frutescens* Leaf Extract against CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatotoxicity. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 4(6), 212–215.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., Parajo, J. C., and ADepa. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.

## Références bibliographiques

- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2015).** The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*, 36(6), 681. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1127>.
- Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R. B., and Mishra, S. (2010).** Effect of Toxic Metals on Human Health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1), 94–99. <https://doi.org/10.2174/1876396001003010094>
- Munir, N., Mahmood, Z., Shahid, M., Afzal, M. N., Jahangir, M., Shah, S. M. A., Tahir, I. M., Muhammad Riaz, Shoukat Hussain, M. A., and Yousaf, F. (2022).** *Withania somnifera* Chemical Constituents ' In Vitro Antioxidant Potential and Their Response on Spermatozoa Parameters. *Dose-Response: An International Journal*, 1–13. <https://doi.org/10.1177/15593258221074936>
- Narayan, J. S., and Madhu, C. S. (2018).** Health Benefits and Medicinal Potency of *Withania somnifera* : A Review. *Int. J. Pharm*, 48(01), 22–29.
- Nasri, M., Bedjou, F., Porras, D., and Martínez-Flórez, S. (2017).** Antioxidant, Anti-inflammatory, and Analgesic Activities of Citrus reticulata Blanco Leaves Extracts: An In Vivo and In Vitro Study. *Phytotherapie*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1094-8>
- Nayernia, K., Li, M., and Engel, W. (2004).** Spermatogonial stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 253, 105–120. <https://doi.org/10.1385/1-59259-744-0:105>
- Nna, V. U., Ujah, G. A., Mohamed, M., Etim, K. B., Igba, B. O., Augustine, E. R., and Osim, E. E. (2017).** Cadmium chloride induced testicular toxicity in male wistar rats ; prophylactic effect of quercetin , and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 94, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.087>
- Nolte, T., Harleman, J. H., and Jahn, W. (1995).** Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 47, 267–286. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80260-5](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80260-5)
- O'Donnell, L., and Stanton, P. G. (2018).** Spermiation. *Encyclopedia of Reproduction*, 145–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64571-3>
- Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., and Misrahi, M. (2021).** The Roles of Luteinizing Hormone , Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12735. doi: 10.3390/ijms222312735.
- O'Flaherty, C., and Scarlata, E. (2022).** The protection of mammalian spermatozoa against oxidative stress. *Reproduction*, 164, 67–78.
- Olaniyan, O. T., Ojewale, O. A., Dare, A., Adebayo, O., Enyojo, J. E., Okotie, G. E.,**

## *Références bibliographiques*

- Adetunji, C. O., Mada, B. S., Okoli, B. J., and Eweoya, O. O. (2022).** *Cocos nucifera* L. oil alleviates lead acetate-induced reproductive toxicity in sexually-matured male Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 33(3), 297–303. <https://doi.org/10.1515/JBCPP-2020-0281/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Orororo, O. C., Asagba, S. O., Tonukari, N. J., Okandeji, O. J., and Mbanugo, J. J. (2018).** Hibiscus Sabdariffa L . Anthocyanins-Induced Changes in Reproductive Hormones of Cadmium-Exposed Rats. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 8(4), 308–311. <https://doi.org/10.29322/IJSRP.8.4.2018.p7642>
- Ouarda, M., Hamamdia, Z., and Abdennour, C. (2021).** Protective Effects of Wheat Grass on Histopathology of Some Organs and Biomarkers Parameters Against Lead Acetate Toxicity in Wistar Rats. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 17(3), 78–94.
- Owumi, S. E., Danso, O. F., and Nwozo, S. O. (2020).** Gallic acid and omega-3 fatty acids mitigate epididymal and testicular toxicity in manganese-treated rats. *Andrologia.*, 52(7), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.13630>
- Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N., and Tsatsakis, A. M. (2005).** Lead toxicity update . A brief review. *Med Sci Moni*, 11(10), 329–336.
- Parthipan, B., Mgt, S., and Mohan, V. R. (2015).** GC-MS Analysis of Phytochemicals in Pleiospermium. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(1), 216–222.
- Patra, R. C., Rautray, A. K., and Swarup, D. (2011).** Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/457327>.
- Peana, M., Pelucelli, A., Chasapis, C.T., Perlepes, S.P., Bekiari, V., Medici, S., and Zoroddu, MA. (2023).** Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium. *Biomolecules*, 13(1), 36. doi: 10.3390/biom13010036.
- Petrone, O., Serafini, S., Yu, B. Y. K., Filonenko, V., Gout, I., and O’Flaherty, C. (2023).** Changes of the Protein CoAlation Pattern in Response to Oxidative Stress and Capacitation in Human Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms241512526>.
- Pizzol, M., Thomsen, M., and Skou, M. (2010).** Long-term human exposure to lead from different media and intake pathways. *Science of the Total Environment*, 408, 5478–5488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.077>.
- Plunk, E.C., and Richards, S.M. (2020).** Endocrine-Disrupting Air Pollutants and Their Effects on the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis. *Int J Mol Sci*, 21(23), 9191. doi: 10.3390/ijms21239191.

## Références bibliographiques

- Polumackanycz, M., Petropoulos, S. A., Śledziński, T., Goyke, E., Konopacka, A., Plenis, A., and Viapiana, A. (2023).** *Withania somnifera* L.: Phenolic Compounds Composition and Biological Activity of Commercial Samples and Its Aqueous and Hydromethanolic Extracts. *Antioxidants*, 12. <https://doi.org/10.3390/antiox12030550>
- Pradhan, B., Nayak, R., Patra, S., Jit, B. P., Ragusa, A., and Jena, M. (2021).** Bioactive Metabolites from Marine Algae as Potent Pharmacophores against Oxidative Stress-Associated Human Diseases: A Comprehensive Review. *Molecules*, 26(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010037>
- Predes, F. D. S., Diamante, M. A. S., and Dolder, H. (2010).** Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(2), 125–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00692.x>
- Prins, G. S., and Lindgren, M. (2015).** Accessory Sex Glands in the Male. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set, 1*, 773–804. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00018-1>
- Qu, C., Ma, Z., Yang, J., Liu, Y., Bi, J., and Huang, L. (2012).** Human Exposure Pathways of Heavy Metals in a Lead- Zinc Mining Area , Jiangsu Province , China. *PLoS*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046793>
- Quézel, P., Santa, S., and Schotter, O. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Centre National de la Recherche Scientifique).
- Rachamalla, M., Chinthada, J., Kushwaha, S., Putnala, S.K., Sahu, C., Jena, G., and Niyogi, S. (2022).** Contemporary Comprehensive Review on Arsenic-Induced Male Reproductive Toxicity and Mechanisms of Phytonutrient Intervention. *Toxics*, 10, 744. <https://doi.org/10.3390/toxics 10120744>.
- Rahman, M.M., Hossain, M.K.F.B., Afrin, S., Saito, T., Kurasaki, M. (2022).** Effects of Metals on Human Health and Ecosystem. In: Tanaka, S., Kurasaki, M., Morikawa, M., Kamiya, Y. (eds) Design of Materials and Technologies for Environmental Remediation. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 115. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/698\\_2021\\_825](https://doi.org/10.1007/698_2021_825).
- Raj, N., Agarwal, A., and Chaturvedi, N. (2017).** In Vitro Study on total Phenols , Flavonoids Content and DPPH Activity of *Withania* Species. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(2), 946–950.
- Ramah, A., EL-shwarby, R. M., M.A., N., and El-shewey, E. A. (2015).** The effect of lead toxicity on male albino rats reproduction with ameliorate by vitamin E and pumpkin seeds

## Références bibliographiques

- oil. *BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL*, 28(1), 43–52.
- Raman, P., and Chand, R. G. (2019).** Meiotic studies in genus *Withania* Pauquy, from Indian Thar Desert. *Cayologia*, 72(1), 15–21. <https://doi.org/10.13128/cayologia-247>
- Ramos-Treviño, J., Bassol-Mayagoitia, S., Hernández-Ibarra, J. A., Ruiz-Flores, P., and Nava-Hernández, M. P. (2018).** Toxic Effect of Cadmium, Lead, and Arsenic on the Sertoli Cell: Mechanisms of Damage Involved. *DNA and Cell Biology*, 37(7), 600–608. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.4081>
- Rao, F., Zhai, Y., and Sun, F. (2016).** Punicalagin mollifies lead acetate-induced oxidative imbalance in male reproductive system. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081269>
- Roba, K. (2021).** The Role of Terpene ( Secondary Metabolite ). *Natural Products Chemistry and Research*, 09(08), 1–11.
- Robaire B., and Hinton, B. T. (2015).** The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00017-X>
- Roy, A. (2017).** A Review on the Alkaloids an Important Therapeutic Compound from Plants. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3(2), 1–9.
- Ryu, D. Y., Lee, S. J., Park, D. W., Choi, B. S., Klaassen, C. D., and Park, J. D. (2004).** Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicology Letters*, 152(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.03.015>
- Saeed, B. T. (2013).** Effects of Cadmium on sperm parameters , histological and hormonal changes in testes of mature rats . *Iraqi J. Embryos and Infertility Researches*, 3(6).
- Sahmoun, A. E., Case, L. D., Jackson, S. A., Schwartz, G. G., Carolina, N., and Schwartz, G. G. (2005).** Cadmium and Prostate Cancer : A Critical Epidemiologic Analysis. *Cancer Investigation*, 23, 256–263. <https://doi.org/10.1081/CNV-200055968>
- Salamatullah, A. M. (2022a).** Antioxidant and antimicrobial properties of polyphenolics from *Withania adpressa* (Coss.) Batt. against selected drug-resistant bacterial strains. *Open Chemistry*, 20(1), 474–483. <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0159>
- Salamatullah, A. M. (2022b).** Promising Antioxidant and Insecticidal Properties of Chemically Characterized Hydroethanol Extract from *Withania adpressa* Coss . ex Batt. *Horticulturae*, 8.
- Salamatullah, A. M. (2023).** Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Analgesic Properties of Chemically Characterized Polyphenol-Rich Extract from *Withania adpressa* Coss. ex Batt. *Life*, 13. <https://doi.org/10.3390/life13010109>

## *Références bibliographiques*

- Salim, A. A., Chin, Y.-W., and Kinghorn, A. D. (2008).** Drug Discovery from Plants. In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 1–24). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4>
- Sarkar, A., Ravindran, G., Krishnamurthy, V., and Campus, K. K. B. G. (2013).** A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR)*, 3(1), 17–36.
- Sasaki, T., Franco, O. E., and Hayward, S. W. (2018).** Prostate: Overview. *Encyclopedia of Reproduction*, 309–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64595-6>
- Sayed, M. M., Hassanein, K. M. A., and Senosy, W. (2014).** Protective Effects of Thymoquinone and L-cysteine on Cadmium-induced Reproductive Toxicity in Rats. *Toxicology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.001>
- Saygi, S., Deniz, G., Kutsa, Sman, and Vural, N. (1991).** Chronic Effects of Cadmium on Kidney , Liver , Testis , and Fertility of Male Rats. *Biological Trace Element Researc*, 31, 209–214.
- Schjenken, J. E., Sharkey, D. J., and Robertson, S. A. (2018)** Seminal Vesicle—Secretion. In: Skinner, M. K., ed. *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition), pp. 349-354, Academic Press, Oxford.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., and Pell, A. N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21–40.
- Sengupta, P. (2013).** Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 353–368. <https://doi.org/10.3109/01480545.2012.710631>
- Sengupta, P., Dutta, S., and Krajewska-Kulak, E. (2017).** The Disappearing Sperms : Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *American Journal of Men's Health*, 11, 1279–1304. <https://doi.org/10.1177/1557988316643383>
- Shahriar, M., Hossain, M. I., Bahar, A. N. M., Akhter, S., Haque, M. A., and Bhuiyan, M. A. (2012).** Preliminary phytochemical screening, in vitro antioxidant and cytotoxic activity of five different extracts of *Withania somnifera* root. *International Journal of Pharmacy*, 2(3), 450–453. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2510>
- Shan, G., Tang, T., and Zhang, X. (2009).** The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 29(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/s11596-009-0114-4>
- Shi, Z., Zhang, H., Liu, Y., Xu, M., and Dai, J. (2007).** Alterations in gene expression and

## Références bibliographiques

- testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicological Sciences*, 98(1), 206–215. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm070>
- Shojaepour, S., Dabiri, S., Dabiri, B., Imani, M., Abadi, M. F. S., and Hashemi, F. (2021).** Histopathological findings of testicular tissue following cadmium toxicity in rats. *Iranian Journal of Pathology*, 16(4), 348–353. <https://doi.org/10.30699/ijp.2021.130581.2443>
- Shubina, O. S., and Dudenkova, N. A. (2016).** The effect of lead on the process of spermatogenesis in sex glands of male albino rats. *Veterinary World*, 9(10), 1129–1134. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1129-1134>
- Singh, A., Raza, A., Amin, S., Damodaran, C., and Sharma, A. K. (2022).** Recent Advances in the Chemistry and Therapeutic Evaluation of Naturally Occurring and Synthetic Withanolides. *Molecules*, 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27030886>
- Singh, S. K., and Abe, K. (1987).** Light and Electron Microscopic Observations of Giant cells in the mouse testis after Efferent Duct Ligation. *Archiv Histol Jap*, 50(5), 579–585.
- Soleimanzadeh, A., Kian, M., Moradi, S., and Malekifard, F. (2018).** Protective effects of hydro-alcoholic extract of *Quercus brantii* against lead-induced oxidative stress in the reproductive system of male mice. *Avicenna J Phytomed*, 8(5), 448–456.
- Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2011).** Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010>
- Srivastav, A., Singh, B., Chandra, A., Jamal, F., Khan, M.Y., and Chowdhury, S.R.. (2004).** Partial characterization, sperm association and significance of N-and O-linked glycoproteins in epididymal fluid of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Reproduction*, 127(1), 343–357. <https://www.academia.edu/download/72758476/1270343.pdf>
- Staveckienė, J., Kulaitienė, J., Levickienė, D., Vaitkevičienė, N., and Vaštakaitė-Kairienė, V. (2023).** The Effect of Ripening Stages on the Accumulation of Polyphenols and Antioxidant Activity of the Fruit Extracts of *Solanum* Species. *Plants (Basel)*, 12(14), 2672. doi: 10.3390/plants12142672.
- Steger, K., and Weidner, W. (2011).** Anatomy of the Male Reproductive System. *Practical Urology: Essential Principles and Practice*, 57–68. [https://doi.org/10.1007/978-1-84882-034-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-034-0_4)
- Sullivan, R., and Mieusset, R. (2016).** The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMW015>.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., and Frenette, G. (2005).** Role of exosomes in sperm

## Références bibliographiques

- maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.* 35(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.005>.
- Takalani, N.B., Monageng, E.M., Mohlala, K., Monsees, T.K., Henkel, R., and Opuwari, C.S. (2023).** Role of oxidative stress in male infertility. *Reprod Fertil*, 4(3), e230024. doi: 10.1530/RAF-23-0024.
- Talbi, H., Boumaza, A., El-, K., Talbi, J., and Hilali, A. (2015).** Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. *Mater. Environ*, 6(4), 1111–1117.
- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., and Wang, W. (2018).** Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>
- Tephly, T. R. (1991).** The toxicity of methanol. *Life Sciences*, 48, 1031–1041. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90504-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90504-5)
- Teunissen, P. J. M., Swarts, H. J., and Field, J. A. (1997).** The de novo production of drosophilin A (tetrachloro-4-methoxyphenol) and drosophilin A methyl ether (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by ligninolytic basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(6), 695–700. <https://doi.org/10.1007/s002530050997>
- Thompson, R. P., Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2018).** Peritubular Myoid Cells in Testis. *Encyclopedia of Reproduction*, 42–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64361-1>
- Thoreux-Manlay, A., de la Calle, J. F. V., Olivier, M. F., Soufir, J. C., Masse, R., and Pinon-Lataillade, G. (1995a).** Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology*, 100, 101–109. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03066-O](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03066-O)
- Thoreux-Manlay, A., le Goascogne, C., Segretain, D., Jégou, B., and Pinon-Lataillade, G. (1995b).** Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology*, 103(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03107-Q](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03107-Q)
- Tortora, G. J., and Derrickson, B. (2014).** Principles of Anatomy and Physiology 14th Edition. In B. Derrickson (Ed.), *Wiley* (14th ed.).
- Tortora, G. J., and Derrickson, B. H. (2011).** Principles of Anatomy and Physiology (B. Derrickson (Ed.); *Wiley* (13th ed.)). [https://books.google.com/books/about/Principles\\_of\\_Anatomy\\_and\\_Physiology](https://books.google.com/books/about/Principles_of_Anatomy_and_Physiology).
- Turner, T. T. (2008).** De Graaf's Thread: The Human Epididymis. *J Androl*, 29(3), 237–250. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004119>

## *Références bibliographiques*

- Udayakumar, R., Kasthuriengan, S., Vasudevan, A., Mariashibu, T. S., Rayan, J. J. S., Choi, C. W., Ganapathi, A., and Kim, S. C. (2010).** Antioxidant effect of dietary supplement *Withania somnifera* L. reduce blood glucose levels in alloxan-induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0146-8>
- Udefa, A. L., Amama, E. A., Archibong, E. A., Nwangwa, J. N., Adama, S., Inyang, V. U., Inyaka, G. U., Aju, G. J., Okpa, S., and Inah, I. O. (2020).** Antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of hydro-ethanolic extract of *Cyperus esculentus* L. (tigernut) on lead acetate-induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110491>
- Ullah, S., Ennab, W., Wei, Q., Wang, C., Quddus, A., Mustafa, S., Hadi, T., Mao, D., and Shi, F. (2023).** Impact of Cadmium and Lead Exposure on Camel Testicular Function : Environmental Contamination and Reproductive Health. *Animals*, 13.
- Unsal, V., Dalkıran, T., Çiçek, M., and Kölükçü, E. (2020).** The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity: A Review. *Adv Pharm Bull*, 10(2), 184-202. doi: 10.34172/apb.2020.023.
- Usende, I.L., Oyelowo, F.O., Adikpe, A.O., Emikpe, B.O., Nafady, A.A.H.M., and Olopade, J.O. (2022).** Reproductive Hormones Imbalance, Germ Cell Apoptosis, Abnormal Sperm Morphophenotypes and Ultrastructural Changes in Testis of African Giant Rats (*Cricetomys gambianus*) Exposed to Sodium Metavanadate Intoxication. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(28), 42849-42861. doi: 10.1007/s11356-021-18246-z.
- Venditti, M., Ben Rhouma, M., Romano, M.Z., Messaoudi, I., Reiter, R.J., and Minucci, S. (2021).** Evidence of melatonin ameliorative effects on the blood-testis barrier and sperm quality alterations induced by cadmium in the rat testis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 226, 112878. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112878.
- Verma, N., Gupta, S. K., Tiwari, S., and Mishra, A. K. (2021).** Safety of Ashwagandha Root Extract: A Randomized, Placebo-Controlled, study in

## *Références bibliographiques*

- Healthy Volunteers. *Complementary Therapies in Medicine*, 57, 102642. <https://doi.org/10.1016/J.CTIM.2020.102642>.
- Vinogradova, N., Vinogradova, E., Chaplygin, V., Mandzhieva, S., Kumar, P., Rajput, V.D., Minkina, T., Seth, C.S., Burachevskaya, M., and Lysenko, D. (2023).** Phenolic Compounds of the Medicinal Plants in an Anthropogenically Transformed Environment. *Molecules*, 28, 6322. <https://doi.org/10.3390/molecules28176322>.
- Walke, G., Gaurkar, S. S., Prasad, R., Lohakare, T., and Wanjari, M. (2023).** The Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function : Exploring the Role of Antioxidant Supplementation. *Cureus*, 15(7), 1–13. <https://doi.org/10.7759/cureus.42583>
- Walker, W. H. (2021).** Androgen Actions in the Testis and the Regulation of Spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1288, 175–203. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1_9).
- Wang, B., and Du, Y. (2013).** Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 12. <https://doi.org/10.1155/2013/898034>
- Wang X., Wang, G., Li, X., JianpengLiu, Hong, T., A, Q. Z., Huang, P., and Ge, R.-S. (2016).** Suppression of rat and human androgen biosynthetic enzymes by apigenin: Possible use for the treatment of prostate cancer. *Fitoterapia*, 111, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.014>
- Wang Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., and Chen, H. (2017).** Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction*, 154, R111–R122. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0064>
- Wani, A. L., Ara, A., and Usmani, J. A. (2015).** Lead toxicity : a review. *Interdiscip Toxicol*, 8(2), 55–64. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>
- Waqas, M. S. (2021).** Spermatogenesis. *Bovine Reproduction*, 32–39. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.CH3>
- Wen, Q., Cheng, C. Y., and Liu, Y. X. (2016).** Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.03.003>
- Whitney, K. M. (2018).** Male Accessory Sex Glands. *Boorman's Pathology of the Rat*, 579–587. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00029-0>
- Williams, L. (2009).** Further Insight into the Bovine Serum Albumin Assay ( The in vitro Anti-inflammatory Assay ). *West Indian Med J*, 58(2), 2–3.
- Williams, L., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., and Kraus, W. (2008).** The in vitro Anti-denaturation Effects

## Références bibliographiques

- Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals. *West Indian Med J*, 57(4), 327–331. <https://doi.org/10.1215/9780822388630-010>.
- Xiong, L., Zhou, B., Young, J. L., Wintergerst, K., and Cai, L. (2022).** Exposure to low-dose cadmium induces testicular ferroptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113373>
- Yang, S. H., Chen, S. T., Liang, C., Shi, Y. H., and Chen, Q. S. (2022).** Effects of Cadmium Exposure on Leydig Cells and Blood Vessels in Mouse Testis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph19042416>
- Yi, L., Shang, X., Lv, L., Wang, Y., Zhang, J., Quan, C., Shi, Y., and Liu, Y. (2022).** Cadmium-induced apoptosis of Leydig cells is mediated by excessive mitochondrial fission and inhibition of mitophagy. *Cell Death and Disease*, 13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05364-w>
- Yildirim, O. G., Esra Sumlu, E. A., Koca, H. B., Pektas, M. B., Sadi, G., and Akar, F. (2018).** High-fructose in drinking water initiates activation of inflammatory cytokines and testicular degeneration in rat. *Toxicology Mechanisms and Methods*. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1543745>
- Yu, W., Xu, Z., Gao, Q., Xu, Y., Wang, B., and Dai, Y. (2020).** Protective role of wogonin against cadmium induced testicular toxicity: Involvement of antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118192>
- Zalups, R. K., and Ahmad, S. (2003).** Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186, 163–188. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00021-2)
- Zhang, H., and Reynolds, M. (2019).** Cadmium exposure in living organisms : A short review. *Science of the Total Environment*, 678, 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>.
- Zhou, GX., Liu, W.B., Dai, L.M., Zhu, H.L., Xiong, Y.W., Li, D.X., Xu, D.X., and Wang, H. (2022).** Environmental cadmium impairs blood-testis barrier via activating HRI-responsive mitochondrial stress in mice. *Sci Total Environ*, 2022, 810, 152247. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152247.
- Zhou, L., Wang, S., Cao, L., Ren, X., Li, Y., Shao, J., and Xu, L. (2019).** Lead acetate

## *Références bibliographiques*

induces apoptosis in Leydig cells by activating PPAR  $\gamma$  / caspase-3 / PARP pathway. *International Journal of Environmental Health Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1625034>.

**Zhu, Q., Li, X., and Ge, R.S. (2020).** Toxicological Effects of Cadmium on Mammalian Testis. *Front Genet*, 26 (11), 527. doi: 10.3389/fgene.2020.00527.

**Zhu, H., Chen, L., Xing, W., Ran, S., Wei, Z., Ameer, M., Wassie, M., Niu, H., Tang, D., Sun, J., Du, D., Yao, J., Hou, H., Chen, K., and Sun, J. (2020).** Phytohormones-induced senescence efficiently promotes the transport of cadmium from roots into shoots of plants: a novel strategy for strengthening of phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122080>.

**Zhushan, F., and Shuhua, X. (2019).** The Effects of Heavy Metals on Human Metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>

# *Annexes*

---

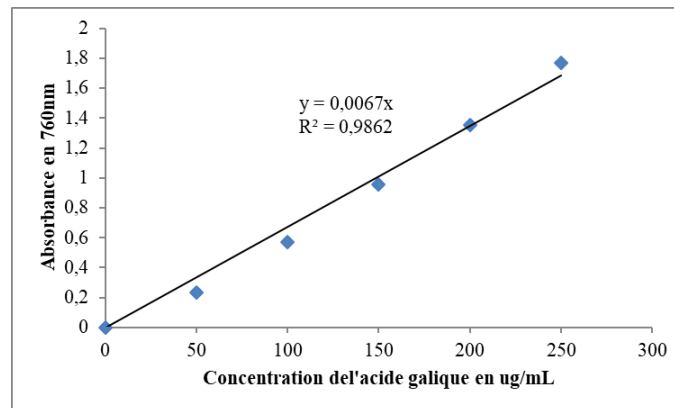
**Annexe 01** : Géographie de Sidi Belattar.

<b>Coordonnées géographiques</b>	Latitude: 36.0267, Longitude: 0.26931 36° 1' 36" Nord, 0° 16' 10" Est
<b>Altitude</b>	12 m
<b>Climat</b>	Semi-aride sec et chaud (Classification de Köppen: BSh)
<b>Superficie</b>	8 800 hectares (88,00 km <sup>2</sup> )

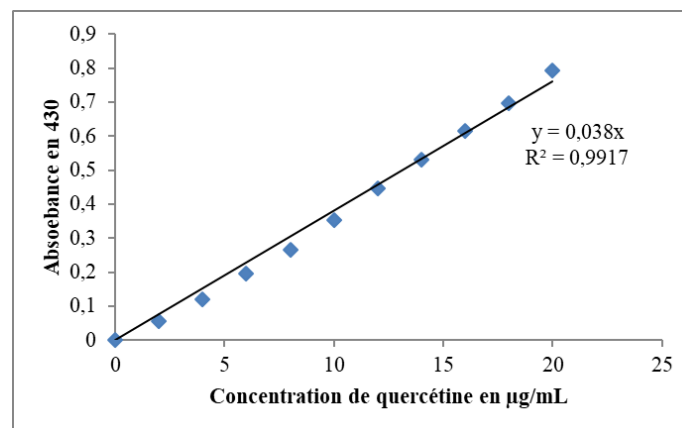
**Annexe 02** : Composition des granules à base de maïs ONAB (régime standard)

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (%)</b>
Protéines	14.5
Lipides	7.5
Glucides	55.8
Cellulose	5.4
Eau	11
Matériel minérales	9.5
Energie métabolisable (KJ/g)	14.6

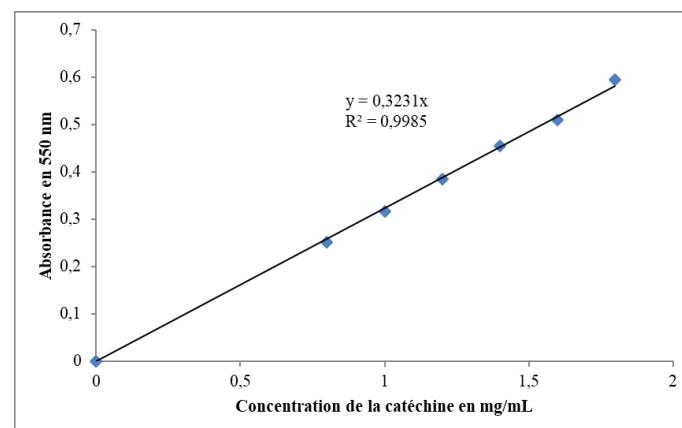
**Annexe 03 :** Courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine et la catéchine.



**Figure 01 :** Droite d'étalonnage d'acide gallique.



**Figure 02 :** Droite d'étalonnage de la quercétine.



**Figure 03 :** Droite d'étalonnage de la catéchine.

Annexe 04 : Chromatogramme des compositions phytochimiques

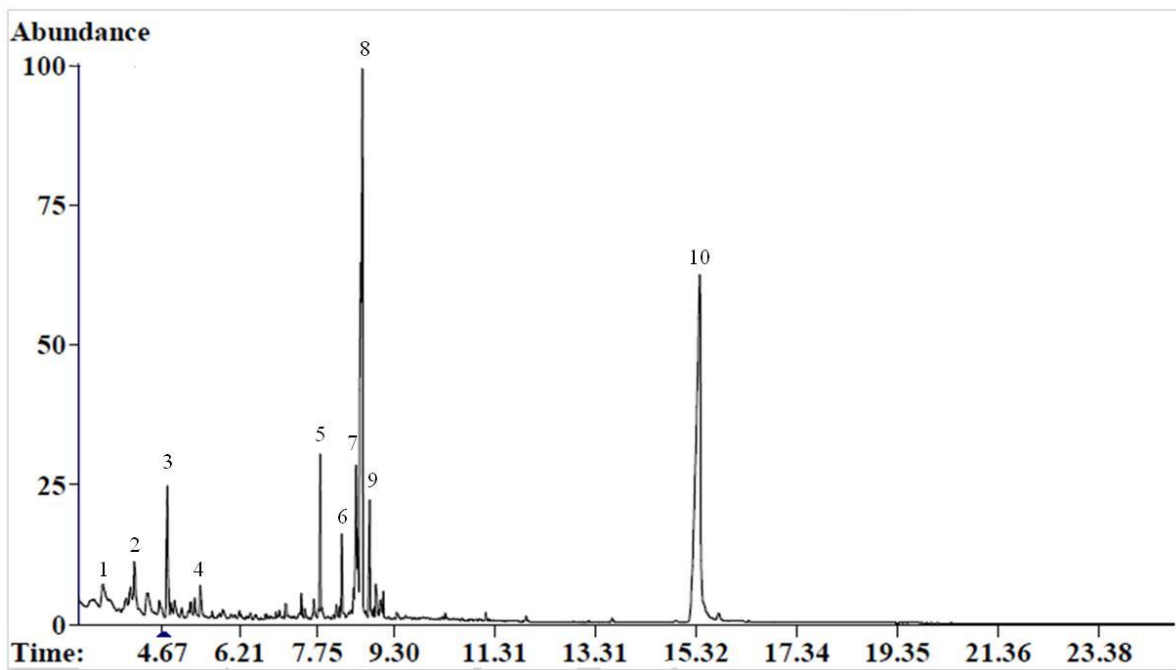


Figure 01 : Chromatogramme de GC-MS de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens*.

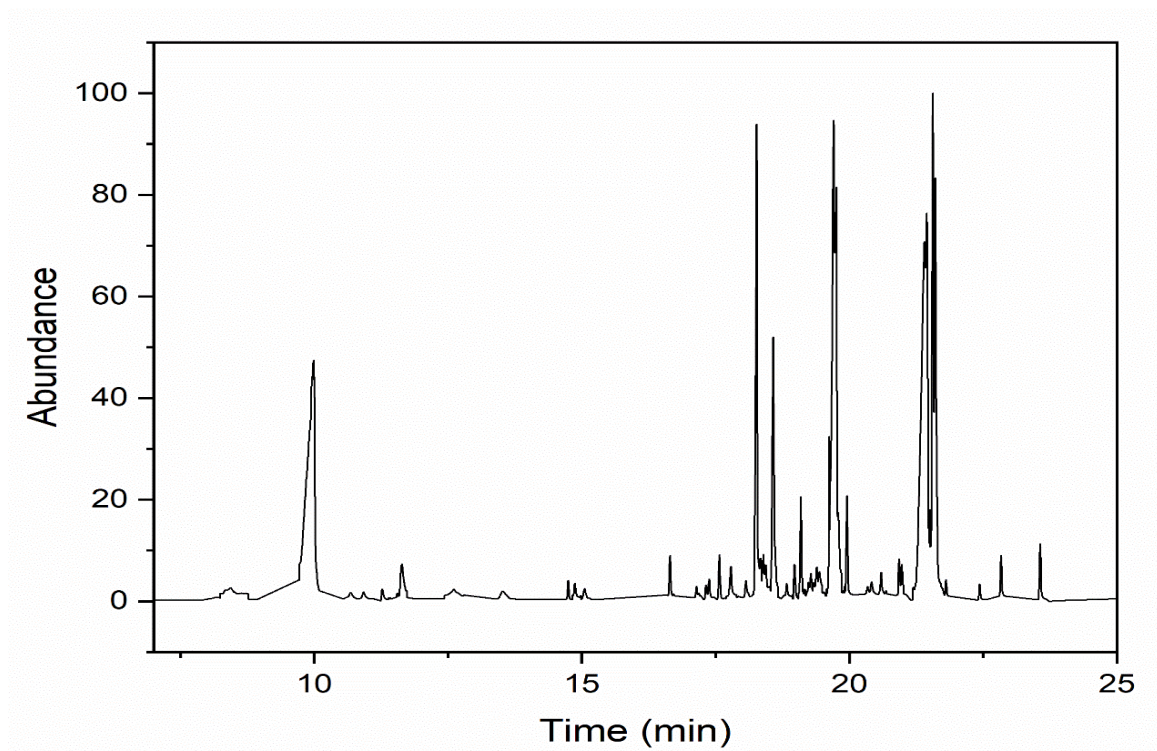
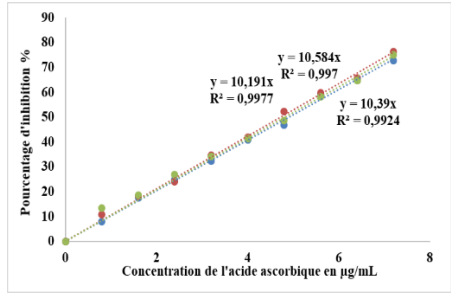
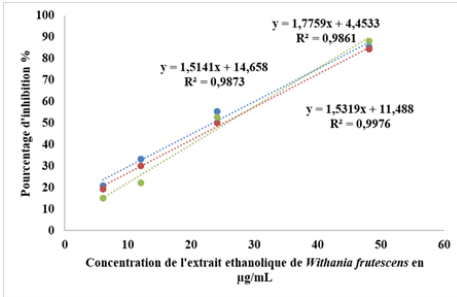
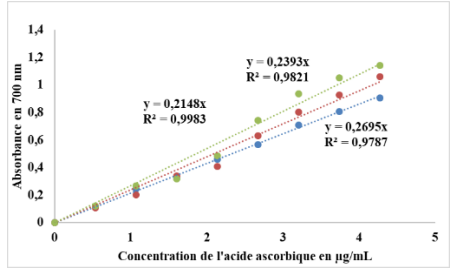
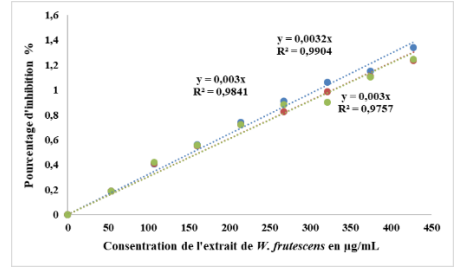
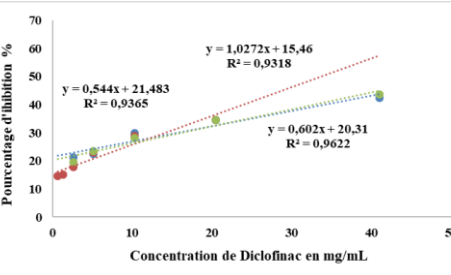
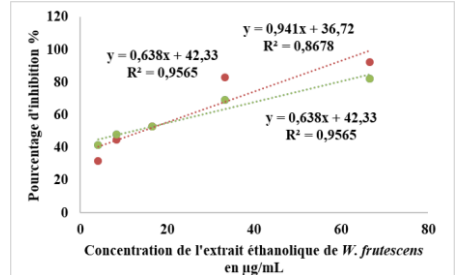
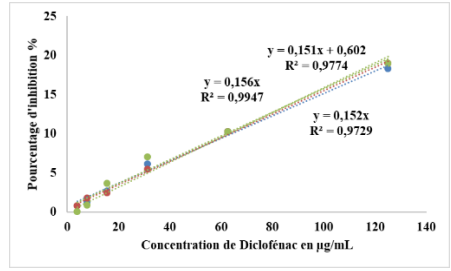
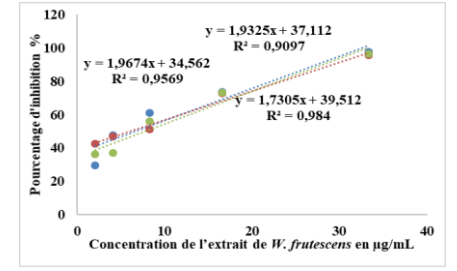


Figure 02 : Chromatogramme de GC-MS/MS de l'extrait éthanolique de racines de *W. frutescens*.

Annexe 05 : Activités biologiques.

Testes	Standard	Extrait de racines de <i>W. frutescens</i> (ERWF)
DPPH	 <p><b>Figure 01 :</b> Pourcentages d'inhibition de DPPH en présence de l'acide ascorbique.</p>	 <p><b>Figure 02 :</b> Pourcentages d'inhibition de DPPH en présence de ERWF.</p>
FRAP	 <p><b>Figure 03:</b> Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.</p>	 <p><b>Figure 04:</b> Pouvoir réducteur de ERWF.</p>
Inhibition d'hémolyse	 <p><b>Figure 05:</b> Pouvoir anti-hémolytique de Diclofénac.</p>	 <p><b>Figure 06:</b> Pouvoir anti-hémolytique de ERWF.</p>
Inhibition de la dénaturation des protéines	 <p><b>Figure 07:</b> Inhibition de dénaturation d'albumine par Diclofénac.</p>	 <p><b>Figure 08:</b> Inhibition de dénaturation d'albumine par ERWF.</p>

# *Travaux scientifiques*

---

**Publication internationale :**

**Bentaiba, K., Belhocine, M., Chougrani, F., Bououdina, M., Mostari, A., Fernini, M., and Bouzouina, M. (2023).** Effectiveness of *Withania frutescens* root extract on testicular damage induced by lead acetate in adult albino rats. *Reproductive Toxicology*, 115, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.12.006>.

**Communications nationales :**

- 10<sup>èmes</sup> Journées Nationales des Sciences de la Nature et de la Vie (JNSNV 2021). Les 16, 17 et 18 novembre, Université : Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem : Titre : Cadmium et infertilité masculine. Auteurs : Bentaiba Karima, Belhocine Mansouria, Chougrani Fadela, Homrani Abdelkader.
- 1<sup>er</sup> séminaire national sur : Valorisation des ressources naturelles et de l'environnement (VNRE 2022) tenu le 30 mars 2022, Université : Université de Sétif. Titre : Etude de l'activité antioxydante de l'extrait de *Withania frutescens*. Auteurs : Bentaiba Karima, Belhocine Mansouria, Chougrani Fadela, Homrani Abdelkader.

**Communications internationales :**

- 1<sup>er</sup> Séminaire International sur les perturbateurs endocriniens, l'environnement et la reproduction (PEER 2021), Université : Saad Dahlab BLIDA 1, Faculté des sciences naturelles et de la vie, Prix de la meilleure "communication par affiche électronique". Titre : Effets toxiques du plomb sur les testicules des rats Wistar. Auteurs : Bentaiba Karima, Belhocine Mansouria, Chougrani Fadela, Homrani Abdelkader.
- 1<sup>ère</sup> Journées Internationales des Sciences de la Nature et de la Vie (INDNS 2022) Organisées les 01 et 02 mars 2022. Université de Ouargla. Titre : Effets toxiques du cadmium sur les testicules des rats Wistar. Auteurs : Bentaiba Karima, Belhocine Mansouria, Chougrani Fadela, Homrani Abdelkader.
- 1<sup>er</sup> International Seminar on Valorisation of Bioresources in Environment and Health (VBEH 2023), Organisées les 10 et 11 May 2023, Université Echahid Hamma Lakhdar-El Oued, Titre : L'activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait hydroalcoolique des racines de *Withania frutescens*, Auteurs : Bentaiba Karima, Belhocine Mansouria, Chougrani Fadela.