

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE RECHERCHE D'ECOPHYSIOLOGIE ANIMALE

Thèse en vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat En Biologie

Spécialité : Ecophysiologie animale

Intitulée :

**Rôle cytoprotecteur du curcuma contre les
dommages oxydatifs induits par le chromate
chez le rat**

Présentée par : M^{lle} SAIDI Malika

Membres du Jury

Présidente:	MALLEM Leila	Prof	Université Badji M - Annaba
Promoteur:	SAKA Saad	Prof	Université Badji M - Annaba
Examineur:	OUALI Kheireddine	Prof	Université Badji M - Annaba
Examinatrice:	BOUSSEKINE Samira	MCA	Université L. Tébéssi-Tébéssa
Examinatrice:	GRARA Noujoud	Prof	Université 8 Mai 1945-Guelma

Année Universitaire: 2018 - 2019

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes chers parents. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenue, encouragée et aidée. Ils ont su croire en moi et me donner tous les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Mes plus profonds remerciements s'adressent tout naturellement à mon directeur de thèse SAKA Saad, Professeur à l'Université Badji M- Annaba, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé tout au long de cette formation, ses qualités pédagogiques et ses précieux conseils pratiques, techniques et scientifiques. J'exprime tout ma gratitude pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour son soutien continu qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse mes plus profonds respects.

Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury de thèse, les professeurs : « Mallem Leila, Ouali Kheireddine, Boussekine Samira, et Grara Noujoud » d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amis pour leur soutien et tous les sympathiques moments partagés et ceux à venir.

Enfin, Je n'oublie pas de présenter mes remerciements à tous ce qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Le chrome est un polluant environnemental qui est considéré comme le métal lourd le plus toxique en raison de son pouvoir redox puissant. Cette étude a été conçue pour évaluer les capacités antioxydantes du curcuma sur les effets sub-chronique des altérations et des dysfonctionnements induits par le chrome dans le système antioxydant. L'étude comprenait quatre groupes de traitement, désignés comme groupe I (0-0): les rats témoins ont reçu de l'eau minérale par gavage (*per os*) et ont été nourris selon un régime alimentaire normal. Groupe II (0-Cur): les rats ont été reçu de l'eau minérale et ont été nourris avec un régime alimentaire supplémenté par 2% de curcuma en poudre. Groupe III (Cr-0): les rats ont été traités *per os* avec du chromate sous forme de bichromate de potassium à 15 mg / kg de poids corporel et ont été nourris avec un régime alimentaire normal. Le groupe IV (Cr-Cur): les rats ont été reçu une dose orale de bichromate de potassium à 15 mg / kg de poids corporel et un régime expérimental contenant 2% de curcuma en poudre. Les rats ont reçu leurs doses respectives par voie orale pendant 30 jours consécutifs. L'exposition des rats au chrome a entraîné une diminution significative de leur poids corporel accompagnée d'une augmentation des indices organo-somatiques. En plus, une perturbation significative des paramètres hématologiques a été observée. Une diminution significative du nombre de GR, de HGB, de VGM, de TCMH, de CCMH, de HCT et de PLT, avec une élévation des niveaux de GB, NEUT, MO et LY. Cependant, une perturbation des marqueurs biochimiques (glycémie, triglycérides, cholestérol, PAL, LDH, TGO, TGP, créatinine, urée, acide urique, albumine et protéines totales) a été observée. Bien que, ont été remarqués une réduction significative des paramètres liés au stress oxydatif (GSH, GSH-Px, CAT et GSH-ST). Ces perturbations étaient accompagnées de modifications histologiques dans les sections d'organes des rats traités par le chrome, alors que l'administration au curcuma améliore considérablement la plupart des paramètres mentionnés précédents. Les résultats ont révélé le pouvoir antioxydant du curcuma, démontrée par ses effets améliorants sur l'intoxication au chrome.

Mots clés: Chrome, Curcuma, Stress oxydant, Toxicité, Antioxydant, Rats

Abstract

Chromium is an environmental contaminant considered to be the most toxic heavy metal because of its potent redox power. This study has been designed to investigate the antioxidant capacities of curcuma against sub-chronic effects of chromium induced alterations and dysfunctions in the antioxidant system. The study included four treatment groups, designated as group I (0-0): the control rats received mineral water through gavage (*per os*) and were fed on normal diet. Group II (0-Cur): rats received mineral water and were fed on experimental diet supplemented with 2% of powdered curcuma. Group III (Cr-O): rats were treated *per os* with chromate in the form of potassium dichromate at 15 mg / kg body weight and were fed a normal diet. The last group IV (Cr-Cur): rats received an oral dose of potassium dichromate at 15 mg / kg of body weight and an experimental diet containing 2% powdered curcuma. The rats received their respective doses orally for 30 consecutive days. Exposure of rats to chromium induced a significant decrease in their body weight accompanied with an increase in organo-somatic indexes. In addition, significant perturbations in hematological parameters were observed. A significant decrease in RBC, HGB, MCV, MCH, MCHC, HCT, and PLT count, with an elevation in WBC, NEUT, MONO, and LYMP levels. However, a disturbance in biochemical markers (glycemia, triglycerides, cholesterol, ALP, LDH, ALT, AST, creatinine, urea, uric acid, albumin, and total proteins) has been observed. Although, were noticed a significant reduction in the oxidative stress related parameters (GSH, GSH-Px, CAT, and GSH-ST). These disruptions were accompanied by histological changes in organ sections of rats intoxicated with chromium, whereas treatment with curcuma restored all the parameters mentioned above to near normal. The results revealed the potent antioxidants activity of curcuma that were demonstrated by its ameliorative effects on chromium intoxication.

Key words: Chromium, Curcuma, Oxidative stress, Toxicity, Antioxidant, Rats

الملخص

يعتبر الكروم أحد الملوثات البيئية بسبب سهولة أكسدته و بالتالي فهو أكثر المعادن الثقيلة سمية. تم إنجاز هذه الدراسة بغرض تقييم خواص الكركم المضادة للأكسدة مقابل السمية الحادة لمعدن الكروم وما يصاحبه من خلل في النظام المضاد للأكسدة. اشتملت الدراسة على 40 جرد مقسمة على أربع مجموعات تجريبية على النحو التالي: المجموعة الأولى (O-O): تلقت الجرذان مياه معدنية و تغذيتها على نظام غذائي عادي. المجموعة الثانية (O-Cur): تلقت الجرذان مياه معدنية وتم تغذيتها على حمية غذائية محتوية على 2 % من مسحوق الكركم. فيما يخص المجموعة الثالثة (Cr-O): فقد تم معاملة الجرذان بثنائي كرومات البوتاسيوم (15 مغ/كغ من وزن الجسم) عن طريق التغذية القسرية و تغذيتها بنظام غذائي عادي. أما بالنسبة للمجموعة الرابعة (Cr-Cur): فقد تلقت الجرذان جرعة قسرية من ثنائي كرومات البوتاسيوم (15 مغ/كغ من وزن الجسم) وحمية تجريبية تحتوي على 2 % من مسحوق الكركم. استمرت هذه الدراسة التجريبية مدة 30 يوما متتالية. أدى تعرض الجرذان للكروم الى نقص حاد في الوزن مصحوبًا بزيادة في الأوزان النسبية للأعضاء. كما تم ملاحظة اضطرابات كبيرة في المعايير الدموية، حيث تم تسجيل انخفاض ملحوظ في مستويات كل من GR, HGB, VGM, TCMH, CCMH, HCT وPLT إلى جانب ارتفاع في مستويات GB, NEUT MO, LY و. كما أظهرت النتائج وجود اضطراب في العلامات البيوكيميائية (نسبة السكر، الدهون الثلاثية، الكوليسترول، PAL، LDH، TGO، TGP، الكرياتينين، اليوريا، حمض اليوريك، الألبومين، والبروتينات الكلية). علاوة على ذلك، لوحظ انخفاض كبير في المؤشرات المرتبطة بالإجهاد التأكسدي (GSH، GPx، CAT، و GST). و كانت هذه الاضطرابات مصحوبة بتغيرات نسيجية في بعض الأعضاء الداخلية للجرذان المعاملة بالكروم، بالمقابلة، فإن إضافة الكركم الى غذاء الجرذان المعاملة بالكروم أدى الى اعادة غالبية المعايير المذكورة أنفا إلى مستواها الطبيعي. النتائج المتحصل عليها كشفت عن قوة نشاط مضادات الأكسدة للكركم وذلك من خلال تخفيف سمية الكروم.

الكلمات المفتاحية : الكروم، الكركم، الإجهاد التأكسدي، السمية، مضادات الأكسدة، الجرذان

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	---

Partie bibliographique

Premier Chapitre

1. Le chrome	4
1.2. Propriétés physicochimiques du chrome	4
1.3. Sources d'exposition du chrome	4
1.3.1. Sources naturelles du chrome	4
1.3.1.1. Dans le sol et les roches	4
1.3.1.2. Dans les eaux de surface et souterraines	5
1.3.1.3. Dans l'atmosphère	5
1.3.2. Sources anthropiques du chrome	5
1.3.2.1. Dans le sol	5
1.3.2.2. Dans les matériaux agricoles.....	6
1.3.2.3. Dans les boues d'épuration.....	6
1.3.2.4. Dans l'élimination du charbon et des cendres volantes.....	6
1.3.2.5. Dans l'eau	6
1.3.2.6. Dans l'atmosphère	6
1.4. Toxicocinétique du chrome	7
1.4.1. Absorption	7
1.4.2. Distribution	8
1.4.3. Métabolisme.....	9
1.4.4. Excrétion.....	9
1.5. Le chrome et le stress oxydant	10
1.6. Toxicodynamie du chrome	10
1.6.1. Effet du chrome sur l'appareil respiratoire	10
1.6.2. Effet du chrome sur le tractus gastro-intestinal	10

1.6.3. Effet du chrome sur le tissu sanguin	11
1.6.4. Effet du chrome sur le système reproductif	11
1.6.5. Effets hépatiques du chrome	12
1.6.6. Effets rénaux du chrome	12
1.6.7. Effet du chrome sur le poids corporel.....	12
1.6.8. Les risques cancérogènes du chrome.....	13
1.6.9. Dommages oxydatifs créés à l'ADN par le chrome	13

Deuxième Chapitre

2. Le curcuma.....	14
2.1. Origine et histoire sur le curcuma.....	14
2.2. Zone et production du curcuma.....	14
2.3. Description botanique du curcuma	14
2.4. Les composés chimiques de curcuma	15
2.5. Utilisation du curcuma	17
2.5.1. Utilisation du curcuma en cosmétologie.....	17
2.5.2. Usages du curcuma dans la médecine traditionnel.....	17
2.5.3. Utilisation du curcuma comme additif alimentaire.....	17
2.6. Propriétés médicinales du curcuma	18
2.6.1. Propriétés hépatoprotectrices	18
2.6.2. Propriétés néphroprotectrices.....	18
2.6.3. Propriétés cardioprotectrices.....	19
2.6.4. Propriétés gastroprotectrices	19
2.6.5. Propriété antioxydantes.....	19
2.6.6. Propriété anti-inflammatoire.....	20
2.6.7. Propriétés antidiabétiques	20
2.6.8. Propriétés anti-carcinogènes	21
2.6.9. Propriétés antimicrobiennes.....	21

2.6.10. Propriétés dermoprotectrices	21
2.7. Toxicité du curcuma.....	22

Troisième Chapitre

3. Le stress oxydant.....	23
3.1. Définition du stress oxydatif.....	23
3.2. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)	24
3.2.1. Définition des ROS	24
3.2.2. Différents types des ROS.....	24
3.2.3. Origine des radicaux libres	24
3.2.4. Conséquences des biomarqueurs du stress oxydant.....	26
a. Peroxydation lipidique	26
b. Oxydation des glucides	26
c. Oxydation des protéines	27
d. Oxydation de l'ADN	27
3.3. Le système de défense antioxydant.....	27
3.3.1. Classification des antioxydants.....	28
3.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques.....	28
3.3.1.2. Les antioxydants non-enzymatiques	30
3.3.2. Modulation des radicaux libres par les antioxydants.....	33
3.4. Pathologies liées au stress oxydant	35

Partie expérimentale

Quatrième Chapitre

4. Matériel et méthodes.....	36
4.1. Matériel	36
4.1.1. Matériel végétal.....	36
4.1.2. Produit chimique.....	36
4.1.3. Entretien des rats	36

4.1.4. Procédure expérimentale	36
4.1.4.1. Prélèvement sanguin	38
4.1.4.2. Prélèvement des organes	38
4.2. Méthodes de dosage	39
4.2.1. Dosage des paramètres hématologiques	39
4.2.2. Dosage des paramètres biochimiques	39
4.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant	39
4.2.3.1. Mesure le taux de glutathion (GSH)	39
4.2.3.2. Mesure l'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px)	41
4.2.3.3. Mesure l'activité de la glutathion S-transférase (GSH-ST)	42
4.2.3.4. Mesure l'activité de la catalase (CAT).....	43
4.2.3.5. Dosage des protéines.....	44
4.2.4. Etude histologique	45
4.2.4.1. Fixation	45
4.2.4.2. Déshydratation	45
4.2.4.3. Inclusion et réalisation des blocs.....	45
4.2.4.4. Confection des coupes histologiques	46
4.2.4.5. Coloration et montage	46
4.2.5. Analyse statistique des résultats	47

Cinquième Chapitre

5. Résultats	48
5.1. L'effet du traitement sur les paramètres pondéraux	48
5.2. L'effet du traitement sur les paramètres hématologiques	49
5.3. L'effet du traitement sur les paramètres biochimiques	50
5.3.1. Taux de glycémie.....	50
5.3.2. Bilan lipidique.....	50
5.3.3. Bilan hépatique	51

5.3.4. Bilan rénal.....	51
5.4. L'effet du traitement sur les paramètres de stress oxydant.....	52
5.4.1. Le contenu en glutathion (GSH).....	52
5.4.2. Activité des enzymes antioxydants (CAT, GSH-Px, GSH-ST).....	56
5.5. L'effet du traitement sur l'histologie.....	59
5.5.1. Etude histologique du foie.....	59
5.5.2. Etude histologique des reins.....	61

Sixième Chapitre

6. Discussion.....	62
Conclusion & perspectives.....	71
Références bibliographiques.....	73
Annexes.....	93

Liste des abréviations

A

AC-U: Acide urique

ADR: Adriamycine

ALAT: Alanine amino-transferase

ALB: Albumine

ASA: Acide acétylsalicylique

ASAT: Aspartate aminotransferase

ATP: Adénosine triphosphate

B

BDL-T: Bilirubine total

BIL-D: Bilirubine direct

BSA: Albumine de sérum bovin

C

CAT: Catalase

CCl₄: Isoprotérénol

CCMH: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CDNB: 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène

CHOL: Cholestérol

CMV: Complexe Minéralo-Vitaminé

Cr (0): Chrome métallique

Cr (II): Chrome divalent

Cr (III): Chrome trivalent

Cr (VI): Chrome hexavalent

Cr₂O₇²⁻: Dichromate

CREA: Créatinine

CrO₃: Trioxyde de chrome

CrO₄²⁻: Chromate

Cu⁺²: Cation cuivreux

Cur: Curcuma

D

DMR: Multirésistance aux médicaments

DTNB: Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman

E

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique

F

Fe²⁺: Ion ferreux

Fe³⁺: Ion ferrique

FeCr₂O₄: Chromite

FNS: Formule numération sanguine

FSH: Hormone folliculo-stimulante

G

GB: Globule blanc

GR: Globules rouges

GSH: Glutathion réduit

GSH-R: Glutathion réductase

GSH-Px: Glutathion peroxydase

GSH-ST: Glutathion S-Transférases

GSSG: Glutathion oxydé

H

4-HNA: 4-hydroxyl nonéal

H & E: Hématoxyline-Eosine

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HCl: Acide hydrochlorique

HCrO₄⁻: Hydro-chromate

HCT: Hématocrite

Hg: Mercure

HGB: Hémoglobine

HO₂•: Radical hydroperoxyde

HOCl: Acide hypochloreux

K

K₂Cr₂O₇: Dichromate de potassium

L

LDH: Lactate déshydrogénase

LDL: Lipoprotéine de basse densité

LH: Hormone lutéinisante

LOO•: Radical peroxyde

LOOH: Hydroperoxyde

LY: Lymphocytes

M

MDA: Malondialdéhyde

MICI: Maladie intestinale inflammatoire

MO: Monocytes

N

Na₂Cr₂O₇: Dichromate de sodium

Na₂HPO₄: Hydrogénophosphate de sodium

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NaH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de sodium

NDEA: Nitrosodiéthylamine

NEUT: Neutrophiles

NO•: Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique

NOS: Oxyde nitrique synthase

NOX: NADPH Oxydase

O

•OH: Radical hydroxyle

¹O₂: Oxygène singulet

O₂: Dioxygène

O₂^{•-}: Anion superoxyde

OH⁻: Ion hydroxyde

ONOO⁻: Peroxynitrite

P

PAL: Phosphatase alcaline

PbCrO₄: Chromate de plomb

PGI₂: Prostacycline

PLT: Plaquettes

ppb: Une partie par milliard (part per billion)

R

RNS: Espèces réactives de l'azote

RO•: Radical alkoxy

ROO•: Radical peroxy

ROOH: Hydroperoxyde organique

ROS: Espèces réactives oxygénées

§

SCA: Sperm Class Analyzer

Se-Cys: Sélénocystéine

SEM: Erreur standard de la moyenne

-SH: Groupement sulfhydryle (thiol)

SO₄²⁻: Ion sulfate

SOD: Superoxyde dismutase

SSA: Acide sulfosalicylique

STZ: Streptozotocine

T

TBA: Acide thiobarbéturique

TBS: Tris buffer salin

TCA: Acide trichloroacétique

TCMH: Hémoglobine corpusculaire moyenne

TGO: Aspartame aminotransférase (ASAT)

TGP: Alanine aminotransférase (ALAT)

TRIG: Triglycérides

TrxR: Thioredoxin reductases

V

VGM: Volume globulaire moyen

Vit: Vitamine

VLDL: Lipoprotéine de très basse densité

Liste des tableaux

Tableau 1: Sources de chrome [VI]	7
Tableau 2: Pourcentage des constituants chimiques du <i>Curcuma longa</i>	16
Tableau 3: Les différents types des espèces radicalaires	25
Tableau 4: Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment	37
Tableau 5: Profil hématologique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	49
Tableau 6: Le taux de glycémie sériques chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	50
Tableau 7: Marqueurs lipidique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	50
Tableau 8: Marqueurs hépatique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	51
Tableau 9: Marqueurs rénal chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	52

Liste des figures

Figure 1: Les mécanismes moléculaires intracellulaires de l'absorption-réduction de Cr [VI].	8
Figure 2: Réducteurs biologiques de Cr [VI] et ses réactions	9
Figure 3: La plante <i>Curcuma longa</i>	15
Figure 4: Rhizomes de curcuma et la structure chimique des curcuminoïdes	16
Figure 5: Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les pro-oxydants.....	23
Figure 6: Activités antioxydantes de glutathion, de vitamine C, et de vitamine E	31
Figure 7: Le réseau antioxydant humain	34
Figure 8: Photos montrant le régime alimentaire préparé	37
Figure 9: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	38
Figure 10: Gain moyen du poids corporel (g) des rats témoins (T) et traités (0-0; 0-Cur; Cr-0; Cr-Cur) après 30 jours de traitement	48
Figure 11: Variations des rapports organo-somatiques (%) chez les rats témoins (T) et traités (0-0; 0-Cur; Cr-0; Cr-Cur) après 30 jours de traitement.	48
Figure 12: Teneur en glutathion hépatique (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	52
Figure 13: Teneur en glutathion rénal (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	53
Figure 14: Teneur en glutathion cardiaque (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	53
Figure 15: Teneur en glutathion splénique (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	54
Figure 16: Teneur en glutathion dans le cerveau (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	54

Figure 17: Teneur en glutathion intestinal (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	55
Figure 18: Teneur en glutathion testiculaire (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	55
Figure 19: Activité de la catalase hépatique ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prt}$) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	56
Figure 20: Activité de la catalase rénal ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prt}$) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	57
Figure 21: Activité de la glutathion peroxydase hépatique (nM GSH/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	57
Figure 22: Activité de la glutathion peroxydase rénal (nM GSH/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	58
Figure 23: Activité de la glutathion S-transférase hépatique (nM GSH-CDNB/min/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	58
Figure 24: Activité de la glutathion S-transférase rénal (nM GSH-CDNB/min/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement.....	59
Figure 25: Coupes histologiques du foie chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	60
Figure 26: Coupes histologiques des reins chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement	61
Figure 27: Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin	94

Introduction Générale

Introduction

Les métaux lourds sont des éléments très nocifs représentent une préoccupation mondiale importante, en raison de leur degré de toxicité élevé (Tchounwou *et al.*, 2012). Parmi plusieurs métaux lourds, le chrome (Cr) a été identifié comme étant le métal toxique ayant une incidence sur la santé humaine (Sun *et al.*, 2015), c'est l'un des huit polluants les plus courants (Hussain *et al.*, 2017). Le chrome est un élément d'origine naturelle présent dans les roches, les poussières, les gaz volcaniques, les sols, ainsi que chez les plantes et les animaux (Wilbur *et al.*, 2012). Ce métal est généralement rejeté dans l'environnement provenant d'opérations industrielles telles que les procédés réfractaires, la préservation du bois, la pigmentation, le placage, le soudage, le tannage du cuir, et la fabrication d'acier inoxydable (Blade *et al.*, 2007). Son niveau dans les déchets industriels est toujours un problème de santé lié à la contamination de l'environnement (Mishra et Bharagava, 2016).

L'apport oral, la nourriture et l'eau, constituent la principale voie d'exposition au chrome (Sun *et al.*, 2015). Ce métal de transition peut être trouvé dans l'environnement sous différents états, allant des formes hexavalent [VI] aux formes trivalentes [III]. On estime que le Cr [III] est la forme la moins toxique, tandis que la forme la plus toxique a été attribuée au Cr [VI] (De Flora *et al.*, 2016). Ce dernier est un puissant agent oxydant et corrosif connu pour causer divers problèmes de santé, notamment les ulcères, les lésions de la muqueuse nasale, l'asthme, l'allergies, l'irritation de la peau et peut également entraîner des graves lésions majeures sur les organes (Coetzee *et al.*, 2018) tels que les poumons (Stout *et al.*, 2009), le foie (Al-Heidery *et al.*, 2008), les reins (Chih-Hong *et al.*, 2009), le cœur (Mishra et Bharagava, 2016) et la rate (Krim *et al.*, 2013). Le chrome a été signalé pour son potentiel de génotoxicité et cytotoxicité (Patlolla *et al.*, 2009) ainsi que, de leurs effets cancérogènes (Kim *et al.*, 2018).

Après avoir pénétré dans les cellules, le chrome peut générer des radicaux libres, provoquant des lésions tissulaires et de plusieurs maladies (Sun *et al.*, 2015). En fait, son exposition a été liée à des dommages cellulaires accompagnés d'une perturbation de la structure de l'ADN et de différentes pathologies (Khalil *et al.*, 2013). En outre, l'un des dommages les plus importants causés par les composés du chrome c'était dans le tissu hépatique et rénal. Ils sont bien connus des principaux organes ciblés par la toxicité des métaux lourds, entraînant un stress oxydatif en altérant la défense antioxydante et en stimulant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), avec des modifications histopathologiques et des altérations des marqueurs biochimiques (Elshazly *et al.*, 2016).

Les herbes et les épices font partie intégrante de la nutrition humaine depuis l'antiquité. Ils ont été utilisés non seulement pour améliorer la saveur, la couleur et l'arôme des aliments; mais aussi par la médecine traditionnelle pour ses valeurs conservatrices, antioxydantes, antimicrobiennes et de nombreuses autres propriétés médicinales (Lim, 2016 ; Kehili *et al.*, 2017). Les études sur les produits naturels ayant une valeur thérapeutique potentielle contre la toxicité des métaux lourds ont longtemps été un sujet d'intérêt (Nwokocha *et al.*, 2012; Winiarska-Mieczan, 2018).

Le curcuma, utilisé dans cette étude, est un remède à base de plantes bien connu depuis des siècles (Lim, 2016), est une plante herbacée vivace de la famille du gingembre, est largement cultivée en Inde, en Chine, en Indonésie et dans d'autres pays tropicaux. L'élément le plus bioactif dans le curcuma, est la curcumine (Paulucci *et al.*, 2013), qui possède des propriétés médicinales puissantes, décrit depuis des siècles, bien considéré pour ses composés phénoliques (Liu *et al.*, 2018).

La curcumine présente un large spectre de propriétés thérapeutiques et une gamme remarquable d'effets bénéfiques dans diverses maladies. Celles-ci incluent des activités, anti-fongiques, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, anti-virales, anti-oxydantes et anti-cancéreuses (Luthra *et al.*, 2001, Aggarwal *et al.*, 2013). Il s'est avéré avoir des effets anti-invasion, anti-métastatiques, de la régulation de la croissance cellulaire, de radio-protection, de radio-sensibilisation, d'immuno-modulation, de protection des affections cutanées, d'effets cardio-protecteurs et de protection contre les affections pulmonaires aiguës et chroniques, ainsi que d'activités anti-diabétiques et anti-tumoraux, (Aggarwal *et al.*, 2007). L'extrait de curcuma a diminué l'incidence de la formation de tumeurs, induisant la suppression de la libération de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'apoptose des neutrophiles (Jacob *et al.*, 2007).

En outre, de nombreuses études ont montré que le curcuma avait un puissant effet antioxydant naturel et un piègeur de nombreuses espèces réactives de l'oxygène produites par les métaux lourds, notamment les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) (García-Niño et Pedraza-Chaverrí, 2014), également avoir des activités améliorées sur différents systèmes antioxydants tels que la CAT, la SOD, le GSH et le GSH-Px (Hussein *et al.*, 2014). Une des principales activités antioxydantes des extraits de curcuma est de prévenir les dommages oxydatifs (Tanvir *et al.*, 2017). La curcumine, agent protecteur potentiel, réduit la toxicité induite par les métaux lourds et évite les dommages histologiques et elle a également un effet sur les marqueurs du stress oxydatif,

améliorant le statut antioxydant des dommages induits par les métaux lourds (García-Niño et Pedraza-Chaverri, 2014; Momeni et Eskandari, 2017).

Dans la présente étude, nous avons élucidé le rôle protecteur de curcuma contre les lésions oxydatives induites au cours d'une exposition sub-aiguë au chrome chez les rats, en analysant quelques paramètres hématologiques, biochimiques et antioxydants ainsi que des observations histologiques.

Chapitre 1

[Le Chrome]

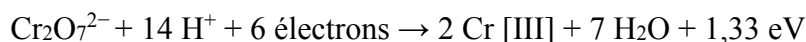
1. Le chrome

1.2. Propriétés physicochimiques du chrome

L'élément chrome a d'abord été isolé et identifié comme un métal par le chimiste français Vauquelin en 1798 dans du minerai de plomb rouge de Sibérie (crocoïte, PbCrO_4). Il tire son nom des couleurs vives que ce métal et ses composés forment (Costa et Klein, 2006).

Le chrome (numéro atomique 24, masse atomique relative 51,996) apparaît dans chacun des états d'oxydation de -II à +VI, mais seuls les états 0, +II, +III et +VI sont communs. Le chrome divalent (+II) est instable dans la plupart des composés car il est facilement oxydé en forme trivalente par l'air. En conséquence, seules les formes trivalentes Cr [III] et hexavalent Cr [VI] sont importantes pour la santé humaine (Dayan et Paine, 2001).

Egalement, le chrome [VI] est la deuxième forme de chrome la plus stable et un puissant agent oxydant, notamment en milieu acide. En solution, le chrome [VI] existe sous forme d'hydro-chromate (HCrO_4^-), chromate (CrO_4^{2-}), et dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Le Cr [VI] est lié à l'oxygène sous forme de chromate et de bichromate avec une forte capacité oxydative et à un pH très bas, l'espèce de bichromate prédomine. La relation entre les états hexavalent et trivalent du chrome est décrite par l'équation:



Ainsi, la différence de potentiel électrique entre Cr [VI] et Cr [III] reflète le fort potentiel oxydant du chrome [VI] et l'énergie substantielle (1,33 eV) nécessaire pour oxyder le Cr [III] en forme Cr [VI]. Cependant, l'oxydation du Cr [III] ne se produit jamais dans les systèmes biologiques. En revanche, la réduction de Cr [VI] se produit spontanément dans l'organisme sauf si elle est présente sous une forme insoluble. Le Cr [VI] serait de nature hautement toxique par rapport à toute autre forme de chrome et réagit avec les acides nucléiques et d'autres composants cellulaires pour produire des effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes (Dayan et Paine, 2001; Mishra et Bharagava, 2016).

1.3. Sources d'exposition du chrome

1.3.1. Sources naturelles du chrome

1.3.1.1. Dans le sol et les roches

Le chrome se présente naturellement sous ses formes les plus concentrées en tant que minerai. Le matériel végétal géologique est généralement constitué de fortes concentrations de chrome. Cependant, de nombreuses roches sédimentaires et schistes contiennent de très fortes concentrations de chrome, suivies de calcaire et de grès. En outre, les volcans émettaient des

niveaux élevés de chrome avec certains autres métaux lourds et gaz toxiques. Le chrome est naturellement présent dans le sol, généralement sous forme de chromite (FeCr_2O_4). Le granite, les carbonates et les sédiments sableux auraient la plus faible teneur en chrome (Mishra et Bharagava, 2016).

1.3.1.2. Dans les eaux de surface et souterraines

Dans les systèmes hydrologiques naturels, le chrome se comporte géochimiquement de manière unique. Le chrome [III] est la forme la plus courante de chrome d'origine naturelle, mais il est en grande partie immobile avec des eaux naturelles ne contenant que des traces, sauf si le pH est extrêmement faible. Le chrome peut se présenter sous forme de chrome [VI] et persister sous forme anionique polyatomique sous forme de CrO_4^{2-} dans des conditions fortement oxydantes (Saha *et al.*, 2011).

1.3.1.3. Dans l'atmosphère

Les rejets naturels de chrome dans l'atmosphère proviennent du sable soufflé par le vent, l'activité volcanique, les incendies de forêt, la poussière de météorite, et les embruns ou les particules de sel marin (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2. Sources anthropiques du chrome

Le chrome est également un contaminant environnemental (tableau 1), mais à des niveaux bien inférieurs à ceux rencontrés en milieu professionnel. L'apport anthropique a considérablement augmenté depuis la révolution industrielle (Mishra et Bharagava, 2016). Les sources de contamination comprennent les sources en suspension dans l'air (provenant de procédés industriels), les sols contaminés et la contamination directe par le chrome dans les eaux souterraines (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.1. Dans le sol

Les sols et, dans certaines conditions, les eaux souterraines peuvent être contaminés avec le chrome et d'autres métaux par infiltration directe de lixiviat provenant de l'enfouissement des déchets solides, des eaux usées, ou des boues d'épuration (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.2. Dans les matériaux agricoles

La population en général est le plus susceptible d'être exposée à des traces de chrome dans les aliments consommés (Wilbur *et al.*, 2012). Le chrome présent dans les aliments, principalement sous la forme de chrome [III], se trouve dans des produits tels que la levure de bière, le foie de veau, le fromage et le germe de blé. D'un point de vue agricole, la concentration de chrome dans les engrais, le calcaire et le fumier d'animaux présente un intérêt. La quantité de chrome est plus importante dans les engrais phosphatés. La quantité de chrome utilisée dans les phosphates et le calcaire (ce dernier servant à ajuster l'acidité du sol) est supérieure à celle existant dans les sols naturels (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.3. Dans les boues d'épuration

Le chrome provenant d'affluents de sources naturelles, domestiques ou industrielles peut se concentrer dans les matières organiques retenues dans les installations de traitement des eaux usées. Près de 100 % du chrome [III] peut être extrait des boues d'eaux usées. Cependant, seuls 26 à 48 % du chrome [VI] ont été éliminés (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.4. Dans l'élimination du charbon et des cendres volantes

La plus grande quantité de chrome appliquée directement sur la surface du sol provient de l'élimination des cendres volantes piégées et de fond. L'élimination de grandes quantités de ces cendres dans le sol peut entraîner des concentrations de chrome élevées par rapport aux niveaux de fond naturels, notamment autour des centrales au charbon (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.5. Dans l'eau

Dans l'eau de mer, la concentration de chrome est estimée à 0,6 ppb. Les concentrations de chrome dans les eaux de surface sont estimées à 1 ppb. Le chrome existe normalement sous forme de chrome [III] relativement immobile dans des conditions réductrices et de chrome [VI] très mobile et toxique dans des conditions oxydantes (Saha *et al.*, 2011).

1.3.2.6. Dans l'atmosphère

Le plus important total de chrome rejeté dans l'atmosphère est constitué de particules en suspension issues des industries de fabrication métallurgique, chimique, de la combustion de gaz naturel, de pétrole, et de charbon. Cependant, l'industrie du fer et de l'acier est la plus grande source anthropique d'émissions de chrome dans le monde (Saha *et al.*, 2011).

Dans les industries de la métallurgie et du tannage, un grand nombre de travailleurs sont potentiellement exposés à des concentrations élevées dans l'air (Wilbur *et al.*, 2012).

Tableau 1. Sources de chrome [VI] (Saha *et al.*, 2011).

Pigments pour peintures, encres et plastiques	Plomb chromate (jaune, vert chrome, orange molybdène), chromate de zinc, chromate de baryum, chromate de calcium, dichromate de potassium, chromate de sodium.
Revêtements anti-corrosion	Trioxyde chromique (acide chromique), chromate de zinc, chromate de baryum, chromate de calcium, chromate de sodium, chromate de strontium.
Acier inoxydable	Le chrome [VI] est dégagé lorsque l'acier inoxydable est coulé, soudé, ou coupe au chalumeau.
Teintures textiles	Dichromate d'ammonium, chromate de potassium, chromate de sodium.
Produits de préservation du bois	Trioxyde de chrome.
Tannage du cuir	Dichromate d'ammonium.

1.4. Toxicocinétique du chrome

1.4.1. Absorption

Le chrome peut pénétrer dans le corps par inhalation, ingestion ou absorption cutanée. La population en général est exposée le plus souvent par ingestion d'aliments et d'eau contaminés par le chrome (Mishra et Bharagava, 2016).

Après être entré dans le corps, le Cr [III] se lie directement à la transferrine, une protéine plasmatique qui transporte le fer. Au contraire, le Cr [VI] est rapidement absorbé par les érythrocytes. L'absorption de chromate par les érythrocytes augmente de manière asymptotique, par rapport les cellules de prépuce humain. L'absorption cellulaire de Cr [VI] se fait via les canaux anioniques de la manière illustrée à la figure 1, tels que les canaux SO_4^{2-} et HPO_4^{2-} . Contrairement aux chromates solubles, les particules de Cr [VI] insolubles, PbCrO_4 , sont phagocytés par les cellules. Ce mécanisme d'absorption peut être plus dommageable pour les cellules que l'absorption de Cr [VI] soluble par les canaux anioniques (Valko *et al.*, 2005; Levina *et al.*, 2006).

1.4.2. Distribution

Après l'absorption et la réduction en Cr [III] à l'intérieur de la cellule. Le Cr [III] est largement distribué dans le corps et représente la majeure partie du chrome dans le plasma ou les tissus. Le chrome s'accumule dans les cellules, entraînant des concentrations plus de 20 fois supérieures à celles présentes au niveau extracellulaire. La plus grande absorption de Cr [III] en tant que complexe protéique se fait par la moelle osseuse, les poumons, les ganglions lymphatiques, la rate, les reins, et le foie (Valko *et al.*, 2005; Levina *et al.*, 2006). Chez le rat et la souris l'administration de Cr [VI] dans l'eau de boisson pendant 4 ou 8 semaines provoque des taux de chrome substantiellement élevés s'accumulent dans tous les tissus (Costa, 1997).

Le transport du chromate à travers la membrane cellulaire avec préservation de l'état d'oxydation du chrome [VI] peut être considéré comme faisant partie de l'équilibre pré-rédox impliquant des espèces de chrome [VI]. La similarité structurale du chromate, du sulfate et du phosphate est un facteur important du transport biologique du chrome [VI]. L'arginine (Arg) joue un rôle important dans la liaison de CrO_4^{2-} par les transporteurs d'anions grâce à la formation d'un réseau de liaisons hydrogène (Saha *et al.*, 2011).

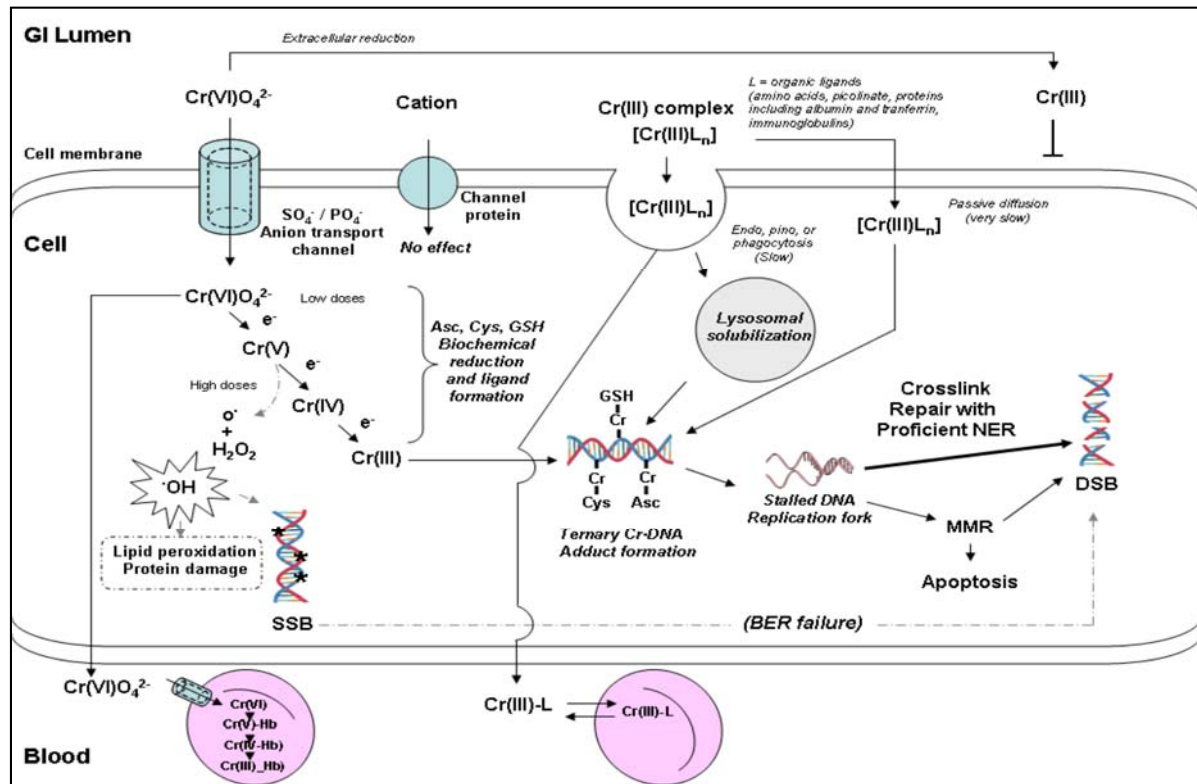


Figure 1. Les mécanismes moléculaires intracellulaires de l'absorption-réduction de Cr [VI] (EPA, 2010).

1.4.3. Métabolisme

Une fois à l'intérieur de la cellule, le chrome [VI] est métabolisé en chrome [III], de manière enzymatique (via des enzymes microsomiales) ou non enzymatique (via l'ascorbate et le GSH) (figure 2). Cette réduction intracellulaire donne des intermédiaires réactifs, chrome [V] et chrome [IV]. Ces intermédiaires sont formés avec des radicaux oxygène générés via des réactions de type Fenton et d'autres réactions possibles se produisant pendant la réduction intracellulaire. Le chrome [VI] introduit dans les globules rouges subit une réduction et forme des complexes avec l'hémoglobine et d'autres protéines intracellulaires suffisamment stables pour retenir le chrome pendant une fraction importante de la durée de vie des globules rouges. Le GSH semble dominer la réduction du chrome [VI] dans les érythrocytes (figure 1). Dans les cellules parenchymateuses et phagocytaires, le chrome [VI] réduit dans les compartiments cytosoliques et microsomaux (EPA, 2010).

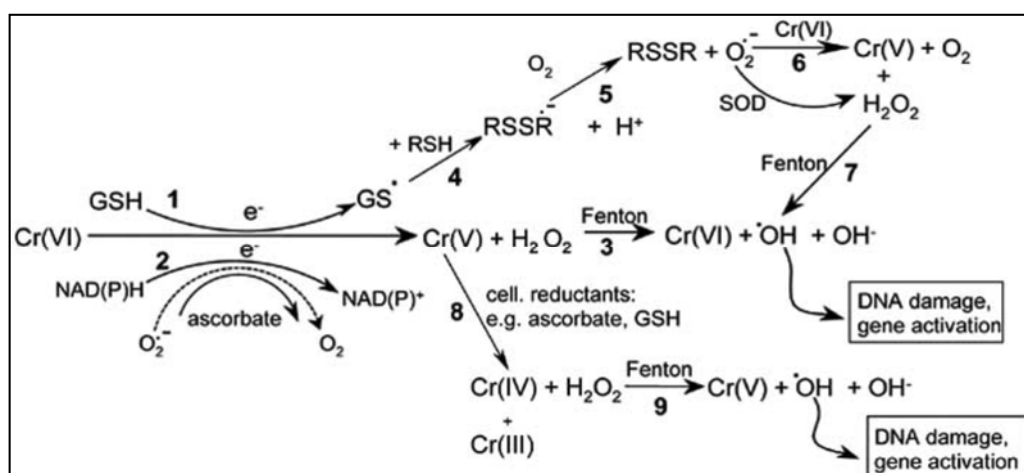


Figure 2. Réducteurs biologiques de Cr [VI] et ses réactions (Valko *et al.*, 2005).

1.4.4. Excrétion

L'excrétion du chrome se fait principalement par l'urine. En effet, le foie et les reins constituent la principale voie d'excrétion du chrome (Mishra et Bharagava, 2016). Environ 10 % de la dose absorbée est éliminée par excrétion biliaire, de petites quantités étant excrétées dans les cheveux, les ongles, le lait, et la sueur. La clairance plasmatique est généralement rapide (en quelques heures), tandis que l'élimination des tissus est plus lente (demi-vie de plusieurs jours) (Valko *et al.*, 2005). Trois demi-vies d'élimination du Cr [VI] ont été estimées chez soudeurs en acier inoxydable exposés professionnellement: 7 jours pour 40 % de Cr [VI], 15 à 30 jours pour 50 % de Cr [VI] et 5 années pour les 10 % restants de Cr [VI] (Costa, 1997).

1.5. Le chrome et le stress oxydant

Une fois que le Cr [VI] pénètre dans la cellule épuise le pool de réducteurs intracellulaires (figures 1, 2), ce qui entraîne une perturbation de la balance redox de la cellule, connu sous le nom de stress oxydatif. Les modifications des taux de réducteurs cellulaires non enzymatiques après une exposition au Cr [VI] ont été utilisées comme indicateurs du stress oxydatif (Levina *et al.*, 2006).

Au sein de la cellule, le glutathion (GSH) forme rapidement un complexe avec Cr [VI], suivi d'une réduction lente de Cr [VI] pour donner du Cr [V] (figure 2). Ainsi, le glutathion peut agir en tant que stabilisant intramoléculaire du Cr [VI] via la formation d'un ester de thiolate. Une fois formés, les espèces de Cr [V] altéraient la conformation de l'ADN. Diverses autres substances étaient capables de réduire le Cr [VI] comprennent l'ascorbate, la cystéine, l'acide lipoïque, le NAD(P) H+H⁺, le fructose, le ribose (Valko *et al.*, 2005).

Cinétiquement, l'ascorbate serait encore plus favorisé dans la réduction du Cr [VI] que le GSH. La formation d'espèces Cr [V] et le radical thiyle dérivé du glutathion (GS•), peut réagir via la réaction de Fenton avec H₂O₂ formant le radical hydroxyle (OH•) susceptible de causer des dommages à l'ADN (Valko *et al.*, 2005).

1.6. Toxicodynamie du chrome

1.6.1. Effet du chrome sur l'appareil respiratoire

Les voies respiratoires sont la principale cible d'exposition par inhalation aux composés du chrome [VI]. Ces effets sur la santé incluent une irritation de la muqueuse du nez et des troubles respiratoires (Singhal *et al.*, 2015a). Des problèmes respiratoires similaires observés chez des animaux. Une perforation du septum nasal, une hyperplasie et une métaplasie du larynx, de la trachée et des bronches et un emphysème se sont développés chez des souris exposées à des brouillards de trioxyde de chrome (CrO₃) pendant un an (Wilbur *et al.*, 2012). Chez les travailleurs exposés au Cr [VI] employés dans une usine de chromage. Les biomarqueurs de stress oxydatif de condensat du souffle expiré (exhaled breath condensate EBC) ont été évalués. Les taux de Cr-EBC ont augmenté en corrélation avec ceux de H₂O₂-EBC et de MDA-EBC (Caglieri *et al.*, 2006).

1.6.2. Effet du chrome sur le tractus gastro-intestinal

Le système gastro-intestinal est une cible primaire d'exposition orale au chrome [VI]. Après une exposition 90 jours via l'eau de boisson, des modifications ont été observées dans le tractus gastro-intestinal des rats et des souris. Chez les rats exposés à 0,1-182 mg/L de chrome

hexavalent, des tumeurs de la muqueuse buccale et de l'intestin, une infiltration histiocytaire du duodénum a été observée (Thompson *et al.*, 2012).

L'exposition orale aiguë de l'homme à des doses mortelles ou quasi-mortelles a eu des effets gastro-intestinaux indésirables, notamment des douleurs abdominales, vomissements, ulcération gastro-intestinale (Wilbur *et al.*, 2012).

1.6.3. Effet du chrome sur le tissu sanguin

Le chrome [VI] est distribué et accumulé par les érythrocytes, dans la cellule, il est rapidement réduit en chrome [III], et se lie à l'hémoglobine et à d'autres ligands. Le complexe chrome-hémoglobine est relativement stable et reste séquestré dans la cellule tout au long de la vie des érythrocytes (Wilbur *et al.*, 2012).

Les rats exposés de Cr [VI] sous forme de dichromate de sodium pendant 28 jours ont présenté une diminution significative des valeurs d'hémoglobine, de volume globulaire moyen (VGM) et de teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) (Vihol *et al.*, 2012). Ces changements étaient plus prononcés chez les travailleurs présentant des troubles hématologiques. Les globules rouges, l'hémoglobine, et le TCMH étaient significativement plus faibles (Ateeq *et al.*, 2017).

1.6.4. Effet du chrome sur le système reproductif

Des dommages aux spermatozoïdes et au système reproducteur masculin ont également été observés chez les animaux de laboratoire exposés au chrome [VI]. L'examen histopathologique des testicules des rats *Wistar* exposés à 1 ou 2 mg/kg de chrome [VI] sous forme de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) pendant 15 jours consécutifs a révélé des altérations morphologiques remarquables. De plus, une diminution de la motilité des spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes épидидymaires ainsi qu'un taux accru d'anomalies des spermatozoïdes. Avec une augmentation dose-dépendante des taux de chrome dans le sang et les testicules ainsi qu'une augmentation de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et une diminution des taux sériques de LH (hormone lutéinisante) et de testostérone ont été détectées (Marouani *et al.*, 2012). L'exposition des lapins à dichromate de potassium provoque la détérioration dans la qualité du sperme. Une augmentation de malondialdéhyde (MDA) et une diminution de GSH-ST dans le plasma séminal (Yousef *et al.*, 2006).

1.6.5. Effets hépatiques du chrome

Le chrome [VI] aurait des effets hépatiques graves, une étude sur 200 ouvriers de chromage, le taux du chrome, de phosphatase alcaline (PAL) et d'alanine transaminase (TGP) étaient plus élevées, tandis que le taux d'albumine était plus bas (Ateeq *et al.*, 2017). L'exposition des rats à du Cr [VI] sous forme de bichromate de potassium pendant 2 mois, a induit une élévation des activités de TGO et de la phosphatase alcaline (PAL) dans le sang et le tissu hépatique (Al-Heidery *et al.*, 2008). L'exposition au chrome [VI] favorisait le stress oxydatif. Une augmentation significative du taux de MDA hépatique accompagnée avec diminution de la teneur en GSH et de l'activité de la CAT. En conséquent des altérations histopathologique du foie a été marquées (Elshazly *et al.*, 2016).

1.6.6. Effets rénaux du chrome

L'exposition au Cr [VI] sur le lieu de travail peut entraîner la génération d'espèces d'oxygène hautement réactives. Chez des travailleurs exposés au Cr [VI] dans des usines de galvanoplastie à Taïwan. Présente des concentrations urinaires de Cr, de 8-OHdG (la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine) et de MDA supérieures à celles des sujets témoins. Les concentrations urinaires de 8-OHdG étaient corrélées positivement aux concentrations de Cr urinaire (Chih-Hong *et al.*, 2009). Une autre étude dans laquelle des lésions rénales ont été causées chez des rats femelles *Wistar* et leur progéniture à la suite d'une exposition au Cr [VI] dans l'eau de boisson. Une augmentation des niveaux de MDA, de GSH dans les reins. Ces modifications étaient accompagnées de taux plasmatiques plus élevés et de taux urinaires moins élevés de créatinine. Une augmentation significative de clairance de la créatinine a également été observée. Les études histologiques ont montré une infiltration des cellules mononuclées, une nécrose et une congestion vasculaire (Soudani *et al.*, 2011b). Des altérations histologiques a été marqué aussi dans une étude récente, des modifications de la fonction rénale chez les souris *Swiss albino* mâles traitées par dichromate de potassium à une dose de 10 mg pendant 30 jours (Shil et Pal, 2017).

1.6.7. Effet du chrome sur le poids corporel

Dans un cas d'exposition aiguë à des quantités massives de fumées de trioxyde de chrome, le patient est devenu anorexique et a perdu 20 à 25 kilos au cours d'une période de trois mois suivant l'exposition. Chez les rats exposés à un aérosol de bichromate de sodium pendant 30 ou 90 jours, ou pendant 90 jours suivis de 30 jours supplémentaires de non-exposition, le gain de poids corporel a été significativement réduit. Le poids corporel était significativement

réduit chez les rats mâles exposés à 1,15 mg de chrome [VI]/m³ sous forme de brouillard de trioxyde de chrome pendant 90 jours (Wilbur *et al.*, 2012).

1.6.8. Les risques cancérigènes du chrome

Les composés du chrome [VI] sont classés évidemment comme cancérogènes pour l'homme (IARC, 1990). Chez les travailleurs, l'inhalation de chrome [VI] s'est avérée causer le cancer du poumon. Des résultats ont été trouvés dans des études de populations vivant dans des zones à forte teneur en chrome [VI] dans l'eau de boisson. Une exposition chronique à faible dose de Cr [VI] 0,25 µM de K₂Cr₂O₇ pendant 20 et 40 semaines contribuait de manière importante à la formation de cellules souches cancéreuses dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Wang *et al.*, 2018a). Chez les animaux de laboratoire, les composés de chrome [VI] provoquaient des tumeurs à l'estomac, au tractus intestinal et aux poumons (Stout *et al.*, 2009).

1.6.9. Dommages oxydatifs créés à l'ADN par le chrome

Les résultats des études d'exposition professionnelle chez l'homme, fournissent des preuves de ruptures de brin d'ADN induites par le chrome [VI], d'aberrations chromosomiques, d'augmentation des échanges de chromatides sœurs, de synthèse d'ADN non programmée et de liaisons croisées ADN-protéine (Wilbur *et al.*, 2012). Trois types de dommages oxydatifs à l'ADN détectés dans les cultures cellulaires et les animaux vivants traités au Cr [VI] sont les cassures simple brin, les sites labiles aux alcalins et les bases ADN oxydées; ces derniers sont le plus souvent détectés dans les globules rouges (Levina *et al.*, 2006).

Chapitre 2

[Le Curcuma]

2. Le curcuma

2.1. Origine et histoire sur le curcuma

Le curcuma a été domestiqué dans les pays de l'Asie du Sud-Est. Ses propriétés en font un ingrédient pharmaceutique et nutraceutique très efficace (Prabhakaran, 2013). La première référence sur le curcuma peut être vue à Atharvaveda, médecine traditionnelle indienne, dans laquelle le curcuma est prescrit pour éliminer la jaunisse. Il a également été recommandé dans le traitement de la lèpre. Pour les anciens, le curcuma n'était pas une épice, mais un colorant et un remède contre de nombreux maux. Il a été introduit dans la cuisine pour conserver les produits alimentaires et était généralement utilisé pour imprimer de la couleur aux plats. Pour de telles utilisations, les autres espèces de curcuma pourraient ne pas avoir été préférées en raison de leur goût très amer. Le goût, la couleur, et les propriétés médicinales ont tous fusionné dans *Curcuma longa* (Ravindran *et al.*, 2007).

2.2. Zone et production du curcuma

Environ 70 à 110 espèces du genre ont été signalées dans toute l'Asie tropicale. Les espèces existantes en Inde, au Myanmar et en Thaïlande présentent la plus grande diversité (Velayudhan *et al.*, 1999). Le curcuma, originaire d'Inde, atteint les côtes chinoises en 700 ans et en Afrique de l'Est 100 ans plus tard et l'Afrique de l'Ouest 500 ans plus tard. L'Inde est le plus grand producteur, consommateur et exportateur. Environ 80% de la production mondiale de curcuma provient d'Inde. Les producteurs d'outre-mer sont la Thaïlande, la Chine, l'Amérique du Sud, et les îles du Pacifique (Prabhakaran, 2013).

La production annuelle du curcuma en Inde est d'environ 635,950 tonnes sur une superficie de 175,190 ha (2002 à 2003). Cela représente environ 5,5 et 20,6 % de la superficie et de la production d'épices en Inde, respectivement. Le curcuma indien est considéré comme le meilleur sur le marché mondial en raison de sa forte teneur en curcumine (Ravindran *et al.*, 2007).

2.3. Description botanique du curcuma

Le curcuma (figure 3) est une plante herbacée vivace érigée, cultivée chaque année et, dans certains cas, tous les deux ans. Il atteint une hauteur d'environ 120 cm. Le *Curcuma longa* appartient à la famille des Zingiberaceae qui relève de l'ordre des Zingiberales des monocots. La famille est composée de 47 genres et de 1400 espèces. Les feuilles sont portées en touffe, alternes, obliquement droites. Les pousses feuillues dépassent rarement 1 m de hauteur. Habituellement, il y a 6 à 10 feuilles dans une pousse feuillue. Le rhizome est la tige

souterraine du curcuma, qui peut être divisée en deux parties, le rhizome mère central en forme de poire et ses branches axillaires latérales appelées doigts. Normalement, il n'y a qu'un seul axe principal. Un doigt complet ou un rhizome mère est utilisé comme matériel de plantation. La couleur à l'intérieur du rhizome orange foncé à l'extérieur orange jaunâtre, fortement aromatique. Les fleurs sont fines blancs fugaces et mesurent environ 5 cm de long. Après 109-155 jours de plantation, la floraison commence. L'inflorescence dure environ 1 à 2 semaines après l'émergence. Les fruits ne sont normalement pas trouvés (Ravindran *et al.*, 2007; Motaleb *et al.*, 2013; Prabhakaran, 2013).



Figure 3. La plante *Curcuma longa* (Esenbeck, 1828)

2.4. Les composés chimiques de curcuma

Les rhizomes de *Curcuma longa* (figure 4- a, b) contiennent des substances volatiles et non volatiles. Les constituants chimiques de l'huile volatile sont l'Art-Turmerone, la Turmerone, le Zingiberene et la Curlone. Plus de 20 composés ont été identifiés dans l'huile de feuille, dont l' α -phellandrène, le 1,8-cinéole, le p-cymène et le β -pinène en sont les principaux. Les composés non volatils du curcuma sont des agents colorants. Les principaux composants bioactifs du curcuma, appelés curcuminoïdes (figure 4- c). Ces derniers sont une source riche en composés phénoliques, à savoir la curcumine I (diferuloyl méthane), la curcumine II (déméthoxycurcumine) et la curcumine III (bisdéméthoxy curcumine). La curcumine est soluble dans l'éthanol et l'acétone mais insoluble dans l'eau. La composition de curcuma

(tableau 2) contient également des glucides, des matières minérales, des protéines et des vitamines (Ravindran *et al.*, 2007; Motaleb *et al.*, 2013; Prabhakaran, 2013; HMPC, 2010)

Tableau 2. Pourcentage des constituants chimiques du *Curcuma longa*
(Ravindran *et al.*, 2007)

Composition	Pourcentage (%)
Humidité	6–13
Glucides	60–70
Protéines	6–8
Fibre	2–7
Matières minérales	3–7
Graisse	5–10
Huile volatile	3–7
Curcuminoïdes	2–6

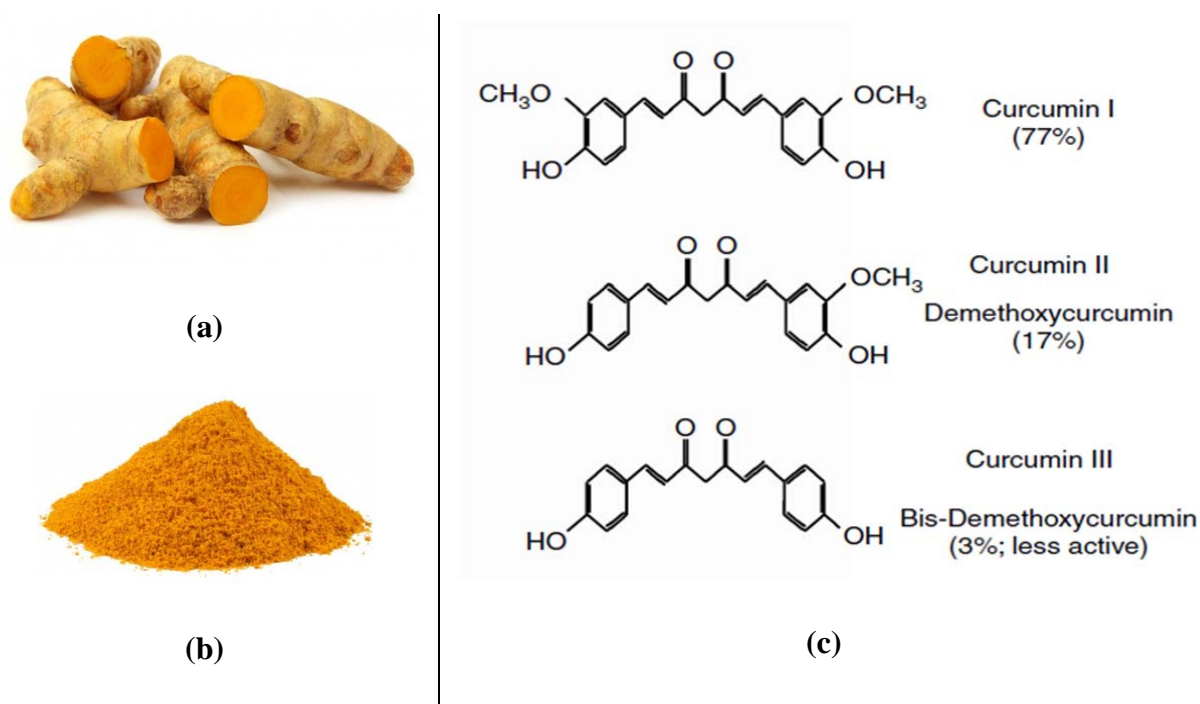


Figure 4. Rhizomes de curcuma et la structure chimique des curcuminoïdes. (a) La racine de curcuma. b) Poudre de curcuma cristallisée. La curcumine I est le principal ingrédient actif dérivé de la racine de curcuma (Aggarwal *et al.*, 2005)

2.5. Utilisation du curcuma

2.5.1. Utilisation du curcuma en cosmétologie

Le curcuma comme une herbe capable de donner un éclat à la peau. Les propriétés antibactériennes du curcuma aident au traitement de l'acné. Et ses propriétés anti-inflammatoires traitent les boutons. Le curcuma peut être utilisé pour les peaux grasses comme un nettoyant pour le visage ou un masque facial. Il pourrait également obstruer les enzymes inflammatoires liées au psoriasis (Tadimalla, 2018).

Selon une étude japonaise, le curcuma peut prévenir la formation de rides et de mélanine. Il empêche la réduction de l'élasticité de la peau causée par une exposition chronique aux UVB (Sumiyoshi et Kimura, 2009). Il a trouvé son utilisation même en dentisterie il blanchit et protège les dents (Chaturvedi, 2009).

2.5.2. Usages du curcuma dans la médecine traditionnelle

Le curcuma est un remède bien connu utilisé dans la médecine et les cosmétiques traditionnels indiens, couramment utilisé aussi comme antiseptique, le curcuma aurait un effet de rajeunir l'état postnatal de la mère après l'accouchement. Utilisé pour le traitement de l'inflammation des articulations, au rhume, à la grippe, et pour la conservation d'aliments grâce à ses propriétés antimicrobiennes. Ce traitement ancien combat également les problèmes dentaires et les troubles digestifs tels que la dyspepsie par l'indigestion, l'acidité, l'indigestion, les flatulences, et les ulcères (Prabhakaran, 2013).

La fumée obtenue en saupoudrant du curcuma sur du charbon brûlé servait à soulager la douleur provoquée par les piqûres de scorpion (Hoppe, 2001). Dans le système de médecine Unani (indien), le curcuma est utilisé pour l'hydropisie, la jaunisse, et l'inflammation. En revanche dans le système de médecine himalayen, le curcuma est utilisé comme contraceptif et tonique pour la peau, ainsi que pour traiter l'enflure, les plaies, la coqueluche, les lésions internes, les boutons, et également les lésions externes (Sakarkar *et al.*, 2006).

2.5.3. Utilisation du curcuma comme additif alimentaire

Le curcuma, connu sous le nom de «safran indien», est utilisé depuis 4000 ans. Il a été codé comme additif alimentaire «E 100» (Prabhakaran, 2013). Utilisé largement comme épice dans la cuisine de l'Asie du Sud et du Moyen-Orient. Il est utilisé comme agent colorant dans le fromage, et le beurre. Le curcuma est également utilisé dans les produits alimentaires manufacturés tels que les boissons en conserve, les produits laitiers, les produits de

boulangerie, les glaces, le yaourt, le jus d'orange, les biscuits, le maïs soufflé, les bonbons, les glaçages pour gâteaux, les céréales, les sauces et les gélatines. C'est un ingrédient important dans la plupart des poudres de curry commerciales. Il peut être incorporé dans les aliments, notamment les plats à base de riz et de haricots, pour améliorer la digestion et réduire les gaz et les ballonnements. C'est un cholagogue qui stimule la production et excrétion de la bile dans le foie (Prasad et Aggarwal, 2011).

2.6. Propriétés médicinales du curcuma

2.6.1. Propriétés hépatoprotectrices

Les propriétés médicinales de la curcumine pouvaient réduire l'hépatotoxicité. La tacrine est connue pour son activité destructive des cellules T et son hépatotoxicité. Dans une étude portant sur des cultures d'hépatocytes humains, détruits par la tacrine, la curcumine s'est révélée presque dix fois plus efficace que le traitement régulier d'acide ascorbique (Song *et al.*, 2001).

Eybl *et al.* (2004) ont étudié l'effet préventif de la curcumine sur les lésions hépatiques induites par le cadmium chez le rat et la souris. Les animaux ont été traités avec de la curcumine (50 mg/kg) et du chlorure de cadmium (rats 0,025 mmol/kg et souris 0,03 mmol/kg). La curcumine a amélioré la peroxydation des lipides hépatiques induite par le cadmium.

2.6.2. Propriétés néphroprotectrices

L'effet du xanthorrhizol isolé des rhizomes de curcuma, sur la néphrotoxicité induite par le cisplatine, agent néphrotoxique, chez la souris a été étudié par Kim *et al.* (2005). Une dose unique de cisplatine (45 mg/kg, ip) a entraîné une élévation des taux d'urée, de créatinine sérique et du rapport poids / rein. Un prétraitement *per os* (200 mg/kg/jour) pendant 4 jours atténué la néphrotoxicité induite par le cisplatine.

Venkatesan *et al.* (2000) ont montré que la curcumine prévient la néphrotoxicité induite par l'adriamycine (ADR) chez le rat. Le traitement à la curcumine est nettement protégé contre la protéinurie, l'albuminurie, l'hypoalbuminémie et l'hyperlipidémie induite par l'ADR. La curcumine était protégée contre les lésions rénales induites par les réactions ADR en supprimant le stress oxydatif et en augmentant la teneur en GSH et l'activité de la GSH-Px dans les reins.

2.6.3. Propriétés cardioprotectrices

Une restauration notable de la pression artérielle a été observée chez les rats nourris avec un régime alimentaire à base d'ail et de curcuma (Zahid Ashraf *et al.*, 2005). Srivastava *et al.* (1986) ont examiné l'effet de la curcumine sur l'agrégation plaquettaire. Les effets *in vitro* et *ex vivo* de la curcumine et de l'acide acétylsalicylique (ASA) sur la synthèse de la prostacycline (PGI₂) et sur l'agrégation plaquettaire ont été étudiés chez le rat. Les deux médicaments inhibent l'agrégation plaquettaire induite par le collagène dans le plasma. Dans le système *in vitro*, la curcumine a également entraîné une légère augmentation de la synthèse de PGI₂, alors que l'ASA l'a inhibée. La curcumine peut donc être préférable chez les patients prédisposés à une thrombose vasculaire et nécessitant un traitement antiarthritique.

Selon Naik *et al.* (2011) l'augmentation du poids relatif du cœur et l'apparition de la nécrose cardiaque induite par l'isoprotérénol et le CCl₄ chez les rats ont également été réduites par le traitement à la curcumine. Même les altérations de l'histoarchitecture observées dans la nécrose cardiaque ont été partiellement améliorées.

2.6.4. Propriétés gastroprotectrices

Le curcuma est bénéfique pour les maux d'estomac, les crampes abdominales et les flatulences. Les extraits de curcuma ont réduit la sécrétion d'acide gastrique et ont été protégés contre les lésions telles que les inflammations le long des parois de l'estomac ou de l'intestin et les ulcères causés par certains médicaments (Ravindran *et al.*, 2007).

La curcumine diminue la motilité intestinale chez les rats Albinos après l'administration intra-gastrique d'une dose unique de curcumine, 1 g/kg de poids corporel, ce qui pourrait expliquer en partie l'utilisation traditionnelle de la curcumine dans différents troubles tels que la diarrhée, les crampes abdominales et le syndrome du côlon irritable (Kumar *et al.*, 2010).

2.6.5. Propriété antioxydantes

Les propriétés antioxydantes du curcuma intervient également dans ses diverses activités pharmacologiques (Araujo *et al.*, 1999).

Dans une étude de Sahin Kavaklı *et al.* (2011), la capacité de piégeage des radicaux libres par la curcumine via son effet antioxydant a été évaluée sur les lésions de la moelle épinière chez le rat. Le niveau de SOD dans le groupe curcumine était plus élevé que dans le groupe témoin. Par contre, le taux de MDA dans le groupe curcumine était inférieur à celui du groupe témoin. Les résultats ont indiqué que la curcumine protège efficacement les tissus de

la moelle épinière contre les dommages oxydatifs. La curcumine mobilise l' α -tocophérol du tissu adipeux, ce qui permet de protéger contre les dommages oxydatifs produits pendant le développement de l'athérosclérose. Elle augmente le transport du VLDL cholestérol dans le plasma, ce qui entraîne une augmentation des taux d' α -tocophérol (HMPC, 2010).

Haryuna *et al.* (2017) ont signalé que la curcumine (200 et 400 mg/kg de poids corporel) en tant qu'antioxydant il augmente l'expression du SOD dans les fibroblastes de la paroi latérale cochléaire dans des modèles de diabète sucré chez le rat.

2.6.6. Propriété anti-inflammatoire

La curcumine est extrêmement anti-inflammatoire et utilisée comme onguent topique pour le traitement de l'inflammation en Inde pendant des siècles. Au niveau moléculaire, la curcumine bloque une protéine appelée NF- κ B, qui se déplace dans les noyaux des cellules et active les gènes liés à l'inflammation (Edwards *et al.*, 2017).

La maladie intestinale inflammatoire (MICI) est caractérisée par un stress oxydant et nitrosatif, une infiltration de leucocytes et une régulation positive des cytokines pro-inflammatoires. Les études dose-réponse ont révélé que le prétraitement des souris, un modèle de MICI, avec la curcumine à raison de 50 mg/kg par jour pendant 10 jours résulte une amélioration significative de la diarrhée et de la perturbation de l'architecture colique. Des doses plus élevées (100 et 300 mg/kg) ont eu des effets comparables. Chez les souris prétraitées à la curcumine, il y avait une réduction significative du degré d'infiltration des neutrophiles et de la peroxydation des lipides dans le côlon enflammé (Aggarwal *et al.*, 2005).

2.6.7. Propriétés antidiabétiques

Les rhizomes de curcuma ont récemment été utilisés pour lutter contre le diabète. Les rats diabétiques induits par la streptozotocine (STZ) ont présenté une augmentation significative de la glycémie, de la polyurie et une diminution du poids corporel. Le traitement chronique à la curcumine a permis de réduire considérablement le stress oxydatif chez les rats diabétiques (Sharma *et al.*, 2006).

L'alimentation en curcumine améliore le statut métabolique chez les diabétiques. Des rats albinos recevant 0,5 % de diète de curcumine ou 1 % de cholestérol ont été rendus diabétiques par injection de streptozotocine. Les rats diabétiques maintenus au régime de curcumine pendant 8 semaines ont excrété moins d'albumine, d'urée, de créatinine et de phosphore inorganique (Aggarwal *et al.*, 2005).

L'administration de curcumine a réduit le sucre dans le sang et les taux d'hémoglobine glycosylée de manière significative chez un modèle de diabète de type 2 induit par l'alloxane (Sethi *et al.*, 2009).

2.6.8. Propriétés anti-carcinogènes

In vivo, la curcumine a permis de supprimer la carcinogenèse cutanée (Das et Kumar, 2015), de l'estomac (Sintara *et al.*, 2012), du côlon (Alizadeh *et al.*, 2012) et du foie (Wang *et al.*, 2018b). Elle est reconnue comme un agent anti-carcinogène en raison de sa propension à induire un suicide cellulaire ou une apoptose *in vivo* et *in vitro*. La glycoprotéine P est une pompe d'efflux de médicament dépendante de l'ATP, liée au développement de la multirésistance aux médicaments (DMR) dans les cellules cancéreuses. Il a été prouvé que la curcumine module efficacement le DMR et peut être utilisée en association avec des médicaments chimiothérapeutiques classiques pour inverser le DMR dans les cellules cancéreuses (Chearwae *et al.*, 2004).

Dans une étude sur l'héptocarcinogenèse induite par la nitrosodiéthylamine (NDEA) chez le rats ayant reçu du curcuma avant, pendant et après l'exposition à NDEA ont montré une diminution significative de l'incidence de dysplasie focale et carcinomes hépatocellulaires (Thapliyal *et al.*, 2003).

2.6.9. Propriétés antimicrobiennes

L'un des usages médicaux traditionnels du curcuma étant attribué à sa propriété antimicrobienne, un extrait éthanolique ont été évaluées contre plusieurs souches de bactéries et de champignons. L'extrait de rhizome était efficace contre les champignons *Fusarium Oxysporium*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans* et *Alternaria solani* et les bactéries *Staphylococcus albus*, *E. coli* et *Pseudomonas pyocyanea* (Saju *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2003). Teow *et al.* (2016) ont démontré l'activité fongicide du curcuma contre *Staphylococcus aureus*.

2.6.10. Propriétés dermoprotectrices

La curcumine s'est révélée efficace contre diverses affections cutanées (Thangapazham *et al.*, 2007), notamment la carcinogenèse cutanée, le psoriasis (Heng *et al.*, 2000), la sclérodermie et la dermatite (Tourkina *et al.*, 2004). De nombreux rapports suggèrent que la curcumine accélère la cicatrisation des plaies. Emiroglu *et al.* (2017) ont examiné le pouvoir cicatrisant

de la curcumine chez le rat. Les plaies perforées ont fermé plus rapidement chez les animaux traités à la curcumine que chez les animaux non traités.

Le prétraitement avec de la curcumine diminuerait le temps moyen de cicatrisation des plaies, augmenterait la synthèse du collagène, de l'hexosamine, de l'oxyde nitrique et les densités vasculaires (Jagetia et Rajanikant, 2004).

2.7. Toxicité du curcuma

Le curcuma et les ingrédients actifs, parmi les autres curcuminoïdes, il est considéré comme sûrs lorsqu'il est pris aux doses recommandées. L'utilisation excessive de curcumine pure peut provoquer des maux d'estomac et, dans des cas extrêmes, des ulcères (Ammon et Wahl, 1991). Les essais cliniques menés chez l'homme ont indiqué qu'il n'existait aucune toxicité limitant la dose lorsqu'ils étaient administrés à des doses allant jusqu'à 10 g/j (Aggarwal *et al.*, 2003). Un essai sur des sujets humains, mené auprès de 25 sujets et utilisant jusqu'à 8000 mg/jour de curcumine pendant 3 mois, n'a révélé aucune toxicité (Chainani-Wu, 2003). Au cours d'une étude pharmacocinétique sur des extraits de curcuma chez des patients cancéreux, il a été démontré que cet extrait pouvait être administré sans danger aux patients à des doses allant jusqu'à 2,2 g par jour (Sharma *et al.*, 2001).

Chapitre 3

[Le Stress Oxydant]

3. Le stress oxydant

3.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif apparaît lorsqu'un déséquilibre existe entre la formation de radicaux libres et leur dégradation (Pizzino *et al.*, 2017). En d'autres termes, le stress oxydatif peut survenir lorsque les cellules ne peuvent pas détruire de manière adéquate l'excès de radicaux libres formés (Pham-Huy *et al.*, 2008). De plus, au cours du processus d'oxydation la concentration d'espèces réactives n'est pas contrôlée par des mécanismes de défense internes tels que des antioxydants (tocophérols, acide ascorbique, et glutathion) ou des enzymes impliquées dans le piégeage radicalaire de l'oxygène (catalase, peroxydase, et superoxyde dismutase). Des dommages oxydatifs surviennent chez les protéines, les lipides et l'ADN, qui pourraient entraîner une cytotoxicité, une génotoxicité et même une carcinogenèse lorsque des cellules endommagées (Gagné, 2014). L'équilibre pro-oxydant et antioxydant (figure 5) peut être perturbé et conférer un stress oxydatif. En raison de l'induction d'enzymes pro-oxydantes et de la production s'accumulent d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En revanche, en raison de l'augmentation de la perte, de la redistribution ou de l'utilisation métabolique, les niveaux d'antioxydants protecteurs diminuent. En fin de compte, cela peut entraîner des dommages aux cellules, aux tissus et finalement aux organes (Koekkoek et van Zanten, 2016).

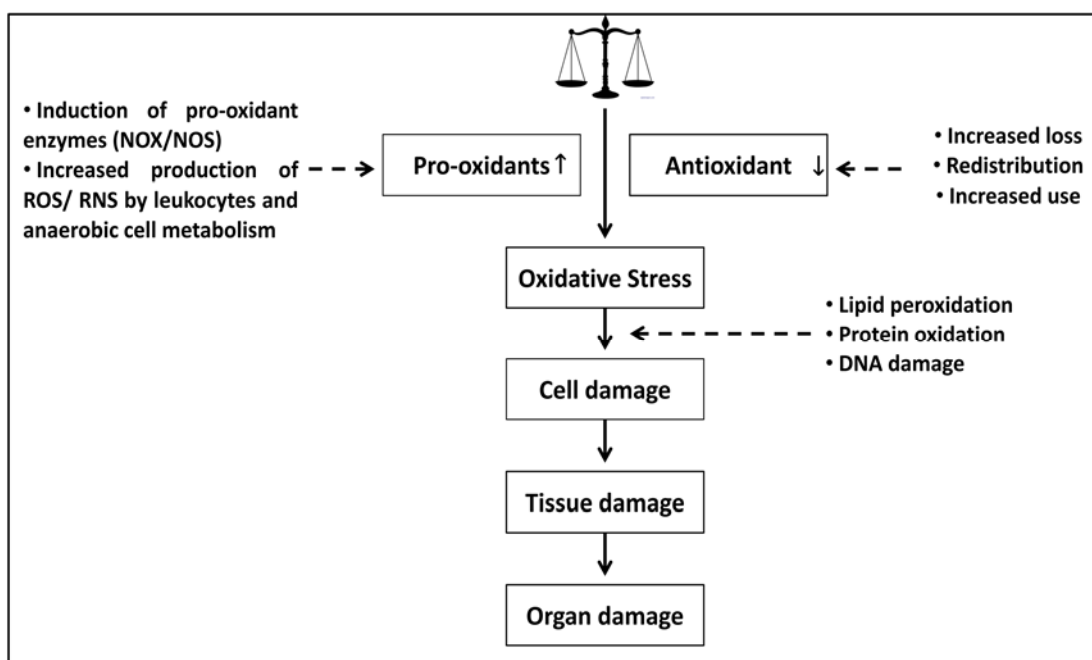


Figure 5. Déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les pro-oxydants (Koekkoek et van Zanten, 2016)

3.2. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

3.2.1. Définition des ROS

Un radical libre peut être défini comme toute espèce moléculaire capable d'existence indépendante qui contient un électron non apparié dans une orbitale atomique, une molécule ou un ion d'oxygène qui confère une réactivité à l'espèce. Selon cette définition, la molécule d'oxygène est le radical le plus faible, car l'état fondamental comporte deux électrons non appariés bien qu'il soit non réactif. De nombreux radicaux sont instables et hautement réactifs. Ils peuvent soit donner un électron, soit accepter un électron d'autres molécules, se comportant donc comme des oxydants ou des réducteurs (Lobo *et al.*, 2010; Quaye, 2012).

3.2.2. Différents types des ROS

Les radicaux libres (cités dans le tableau 3) proviennent de trois éléments: l'oxygène, l'azote et le soufre, créant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* 'ROS'), des espèces réactives de l'azote (RNS) et des espèces réactives du soufre (RSS). Les ROS incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) et d'autres espèces telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et le peroxyde nitrite ($ONOO^-$). Les RNS dérivent de NO_x en réagissant avec $O_2^{\bullet-}$ et en formant $ONOO^-$. Les RSS sont facilement formés par la réaction des ROS avec les thiols (Carocho et Ferreira, 2013).

3.2.3. Origine des radicaux libres

La formation de radicaux libres se produit de manière continue dans les cellules à la suite des réactions enzymatiques qui servent de source des radicaux libres interne, incluent celles impliquées dans la chaîne respiratoire, dans la phagocytose, dans la synthèse de prostaglandines et dans le système du cytochrome P450. Des quantités modérées de ROS sont générées par le transport d'électrons, les activités des cellules du muscle lisse vasculaire et des cellules endothéliales. Parmi les ROS générés à partir de sources externes on trouve, l'exposition aux rayons X, à l'ozone, au tabagisme, aux polluants atmosphériques, aux produits chimiques industriels, aux pesticides, à la radiation, et à certains médicaments (Lobo *et al.*, 2010; Quaye, 2012).

Tableau 3. Les différents types des espèces radicalaires (Lobo *et al.*, 2010).

Radicaux libres	Description
$O_2^{\bullet-}$, anion superoxyde	<ul style="list-style-type: none"> ➤ État de réduction d'un seul électron d'O_2, formé dans de nombreuses réactions d'auto-oxydation et par la chaîne de transport d'électrons. ➤ Plutôt non réactif, mais peut libérer du Fe^{2+} à partir de protéines de fer - soufre et de ferritine. ➤ Subit une dismutation pour former du H_2O_2 spontanément ou par catalyse enzymatique et est un précurseur de la formation du radical $\bullet OH$ catalysée par un métal.
H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etat de réduction à deux électrons, formé par dismutation d'$O_2^{\bullet-}$ ou par réduction directe d'O_2. ➤ Liposoluble et donc capable de diffuser à travers les membranes.
$\bullet OH$, radical hydroxyle	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etat de réduction à trois électrons, formé par la réaction de Fenton et la décomposition du peroxydinitrite. ➤ Extrêmement réactif, attaque la plupart des composants cellulaires.
ROOH, hydroperoxyde organique	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Formé par des réactions radicalaires avec des composants cellulaires tels que les lipides et les nucléobases.
RO \bullet , radical alkoxy et ROO \bullet , radical peroxy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Radicaux organiques centrés sur l'oxygène. Les formes lipidiques participent aux réactions de peroxydation lipidique. ➤ Produit en présence d'oxygène par addition radicalaire à des doubles liaisons ou par captation d'hydrogène.
HOCl, acide hypochloreux	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Formé à partir de H_2O_2 par la myéloperoxydase. ➤ Lipide soluble et très réactif. ➤ Oxydera facilement les constituants protéiques, notamment les groupements thiol, les groupements amino- et la méthionine.
ONOO $^-$, peroxydinitrite	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Formé dans une réaction rapide entre $O_2^{\bullet-}$ et NO. ➤ Liposoluble et réactivité similaire à l'acide hypochloreux. ➤ La protonation forme de l'acide peroxydinitreux, qui peut subir un clivage homolytique pour former un $\bullet OH$ et NO_2.

3.2.4. Conséquences des biomarqueurs du stress oxydant

D'après Valko *et al.* (2004), chaque jour une cellule humaine est ciblée par le radical hydroxyle et par d'autres espèces du même genre et qu'elle est en moyenne 10^5 fois induisant un stress oxydatif. Les ROS sont des espèces hautement réactives et biologiquement pertinentes nuisibles, ses principales cibles sont les noyaux et les membranes des cellules. De plus les radicaux libres attaquent d'importantes macromolécules, entraînant des lésions cellulaires et une perturbation homéostatique (Lobo *et al.*, 2010).

a. Peroxydation lipidique: les composants lipidiques de la membrane subissent une peroxydation sous l'action des radicaux libres (Sharma, 2014), entraînant une perte de fonctionnement de la membrane (une diminution de la fluidité, une inactivation des enzymes et des récepteurs liés à la membrane) (Phaniendra *et al.*, 2015). Ce phénomène se produit sur les acides gras polyinsaturés par une réaction en chaîne radicalaire (Lobo *et al.*, 2010). La peroxydation lipidique est initiée lorsque tout radical libre attaque et extrait l'hydrogène d'un groupement méthylène ($-CH_2$) dans un acide gras, ce qui entraîne la formation d'un radical lipidique centré sur le carbone ($L\cdot$). Le radical lipide peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical lipide peroxyde ($LOO\cdot$). Ce radical subit un réarrangement via une réaction de cyclisation pour former des endopéroxydes, qui forment finalement le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyl nonéanal (4-HNA), 2-alcénals (Sharma, 2014; Phaniendra *et al.*, 2015). Ces composés sont utilisés comme marqueurs dans le dosage de la peroxydation lipidique et ont été vérifiés dans de nombreuses maladies (Lobo *et al.*, 2010).

b. Oxydation des glucides: les glucides sont attaqués par des radicaux libres tels que $\cdot OH$, qui soustrait de manière aléatoire un atome d'hydrogène à l'un des atomes de carbone, produisant un radical carboné. Ce phénomène entraîne des ruptures de chaînes dans des molécules telles que l'acide hyaluronique (Sharma, 2014). Au cours des étapes initiales de la glycosylation non enzymatique, la fragmentation du sucre produit des espèces à chaîne courte, telles que le glycoaldéhyde, dont la chaîne est trop courte pour être cyclisée et qui sont donc sujettes à l'auto-oxydation, formant ainsi le radical superoxyde. La réaction en chaîne résultante propagée par ce radical peut former des β -dicarbonyles, qui sont des mutagènes bien connus (Carocho et Ferreira, 2013).

c. Oxydation des protéines: les protéines peuvent être modifiées par oxydation de trois manières: par oxydation d'un acide aminé spécifique, par clivage du peptide et par formation d'une réticulation protéique due à une réaction avec des produits de peroxydation lipidique (Lobo *et al.*, 2010). La dégradation des acides aminés se produit en grande partie par la réactivité des radicaux hydroxyles. Ces radicaux non seulement perturbent le squelette protéique mais s'engagent également dans des clivages de liaisons peptidiques. Les ROS peuvent également oxyder presque toutes les chaînes latérales d'acides aminés, en particulier les acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine. Les acides aminés oxydés ont une plus grande tendance à la réticulation, ce qui affecte le repliement et la fonction (Quaye, 2012). La plupart de ces formes oxydées des acides aminés sont rapidement éliminées, mais leur accumulation sur une période de temps peut contribuer aux dommages associés au vieillissement et à diverses maladies (Sharma, 2014).

d. Oxydation de l'ADN: les dommages induits par les radicaux libres sur l'ADN provoquent plusieurs types de modifications telles que: fragmentation de l'ADN, cassures à un ou deux brins, échange de chromatides sœurs, liaisons croisées ADN-ADN et protéines-ADN, modifications de bases. Une réaction importante impliquée dans les dommages à l'ADN est la production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Ce radical est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN: les bases purine et pyrimidine ainsi que le squelette désoxyribose. Les radicaux peroxyde (ROO•) et hydroxyl (•OH) interviennent également dans l'oxydation de l'ADN (Quaye, 2012; Carochio et Ferreira, 2013; Sharma, 2014). L'ADN mitochondrial c'est le plus susceptible aux dommages oxydatifs qui jouent un rôle dans de nombreuses maladies, notamment le cancer. La 8-hydroxy-2-désoxyguanosine puisse être utilisée comme marqueur biologique du stress oxydatif (Lobo *et al.*, 2010).

3.3. Le système de défense antioxydant

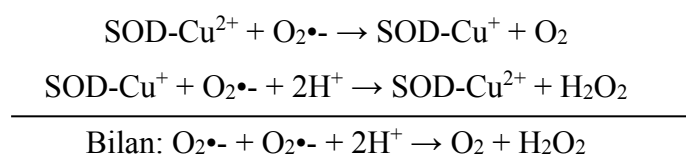
Le corps humain possède un mécanisme inhérent de protection contre les radicaux libres appelés stress antioxydant. Ce dernier agit sur le déséquilibre entre antioxydants et pro-oxydants en les balayant leur formation ou en s'opposant à leur action (Kattappagari *et al.*, 2015). Un antioxydant est une molécule suffisamment stable pour donner un proton (H⁺) à un radical libre déchaîné et le neutraliser, ce qui réduit sa capacité à s'endommager. Ils sont des substances pouvant empêcher l'oxydation du substrat à de faibles concentrations. Les antioxydants agissent comme des capteurs de radicaux, des donneurs d'hydrogène, des donneurs d'électrons, des décomposeurs de peroxydes, des extincteurs d'oxygène singulet, des

inhibiteurs d'enzymes, et des agents chélateurs des métaux. L'homéostasie redox de la cellule est assurée par son système de défense antioxydant endogène complexe, qui comprend des enzymes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GSH-Px), et des composés non enzymatiques tels que le glutathion (GSH), les protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine et même albumine), et des capteurs de faible poids moléculaire, tels que l'acide urique, le coenzyme Q et l'acide lipoïque. D'autres antioxydants plus légers se trouvent dans le régime alimentaire comme les micronutriments qui sont, la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), et le β -carotène. Le corps ne peut pas fabriquer ces micronutriments, ils doivent donc être fournis à partir de régime alimentaire (Lobo *et al.*, 2010; Pisoschi et Pop, 2015; Sarangarajan *et al.*, 2017).

3.3.1. Classification des antioxydants

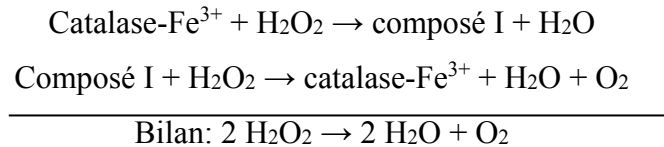
3.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques

a. Superoxyde dismutase (SOD): les superoxydes dismutases (SOD) sont une classe d'enzymes étroitement apparentées qui catalysent la décomposition de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en oxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Lobo *et al.*, 2010). Chez l'homme, il existe trois formes de SOD: le cytosolique Cu/Zn-SOD, le Mn-SOD mitochondrial et la SOD extracellulaire (EC-SOD). La dismutation du superoxyde se produit au niveau des centres de cuivre, de manganèse ou de fer. La SOD détruit l' $O_2^{\bullet-}$ par oxydation et réduction successives de l'ion du métal de transition au site actif dans un mécanisme de type Ping Pong avec des vitesses de réaction remarquablement élevées (Denisov et Afanas'ev, 2005; Krishnamurthy et Wadhwani, 2012).

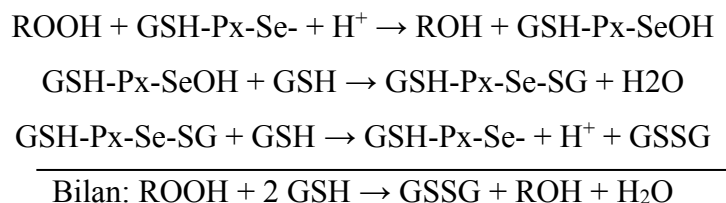


b. Catalase (CAT): la catalase est constituée de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupe hème et des molécules de NADPH. Cette enzyme est principalement présente dans les peroxysomes de la cellule et dans les lysosomes (Kattappagari *et al.*, 2015). La catalase l'une des principales enzymes antioxydantes qui entre en action, contient l'un des taux de rotation les plus élevés pour toutes les enzymes: une molécule de catalase peut convertir environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène chaque minute (Denisov et Afanas'ev, 2005; Sisein, 2014).

La réaction de CAT se déroule en deux étapes. Une molécule de peroxyde d'hydrogène oxyde l'hème en une espèce d'oxyferryle. Un radical cation de porphyrine est généré lorsqu'un équivalent d'oxydation est retiré du fer et un du cycle de la porphyrine. Une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène agit en tant qu'agent réducteur pour régénérer l'enzyme à l'état de repos en produisant une molécule d'oxygène et d'eau (Krishnamurthy et Wadhwani, 2012).



c. Glutathion peroxydases (GSH-Px): les peroxydes de glutathion synthétisent principalement dans les reins. Les cellules hépatiques auront la concentration la plus élevée, principalement dans le cytosol et les mitochondries (Kattappagari *et al.*, 2015). La glutathion peroxydase (GSH-Px, EC: 1.11.1.19) est une enzyme qui a besoin de sélénium (sélénodépendante: une sélénocystéine sur le site actif) pour leur action, il agit en association avec le glutathion réduit (GSH), qui est présent à des concentrations élevées dans les cellules et catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou du peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool. Elle est également en concurrence avec la catalase pour le peroxyde d'hydrogène en tant que substrat et constitue la principale source de protection contre les faibles niveaux de stress oxydatif. Les enzymes GSH-Px éliminent les H₂O₂ en l'utilisant pour oxyder le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) (Sisein, 2014).



Cinq isoenzymes de GSH-Px ont été trouvées chez les mammifères. Les niveaux de chaque isoforme varient en fonction du type de tissu. La GSH-Px1 est principalement présente dans les érythrocytes, les reins et le foie; et la GSH-Px4 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales rénales et les testicules. Les GSH-Px2 cytosoliques et les GSH-Px3 extracellulaires sont faiblement détectés dans la plupart des tissus, à l'exception du tractus gastro-intestinal et du rein, respectivement (Krishnamurthy et Wadhwani, 2012).

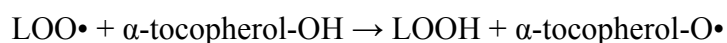
d. Glutathion S-Transférases (GSH-ST)

Les GSH-ST appartiennent à une famille d'enzymes multifonctionnelles impliquées dans la détoxification des protéines électrophiles xénobiotiques ou métabolites électrophiles (Singhal *et al.*, 2015). Les GSH-ST régulent également la biosynthèse et le transport intracellulaire des hormones. Sur la base de leur similarité de séquence et de leurs spécificités de substrat, les GSH-ST sont subdivisées en au moins dix sous-familles: alpha, delta, epsilon, kappa, mu, pi, sigma, thêta, zêta et oméga (Kim *et al.*, 2017). Étant donné que la protection contre la peroxydation lipidique est principalement fournie par les GSH-ST de la classe Alpha via leur activité GSH-Px indépendante du sélénium (Sharma *et al.*, 2004).

3.3.1.2. Les antioxydants non-enzymatiques

a. Glutathion: le glutathion est un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine), qui est le thiol le plus abondant dans les cellules de mammifères. Le groupe thiol dans son fragment cystéine est un agent réducteur et peut être oxydé et réduit de manière réversible (figure 6). La classe riche en cystéine représentée par les métallothionéines capable de se lier aux métaux lourds du fait de la présence des groupes -SH. En tant que composé cyclo-rédox, le glutathion peut agir de deux manières: en éliminant les radicaux libres et en donnant d'électrons dans le cycle rédox enzymatique de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase (GSH-R), catalysant la réduction des peroxydes (Denisov et Afanas'ev, 2005; Lobo *et al.*, 2010; Pisoschi et Pop, 2015).

b. Vitamine E: la vitamine E est le nom collectif d'un ensemble de huit tocophérols et tocotriénols apparentés, des vitamines liposolubles dotées de propriétés antioxydantes. Parmi ceux-ci, l' α -tocophérol (figure 6) a été le plus étudié, car il possède la biodisponibilité la plus élevée, le corps absorbant et métabolisant préférentiellement cette forme (Lobo *et al.*, 2010). La vitamine E était le seul antioxydant liposoluble présent dans le plasma sanguin humain et les érythrocytes. Il agit comme un «casseur de chaîne» lors de la peroxydation des lipides dans les membranes cellulaires et diverses particules lipidiques, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL). Elle intercepte les radicaux peroxydes lipidiques (LOO•) et met fin aux réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Denisov et Afanas'ev, 2005; Nimse et Pal, 2015).



c. Vitamine C: la vitamine C ou acide ascorbique, est un antioxydant monosaccharide que l'on trouve chez les animaux et chez les plantes (Lobo *et al.*, 2010). Sa renommée légendaire repose sur deux événements: son rôle exceptionnellement important dans le traitement du scorbut et la proposition d'utiliser les énormes doses d'acide ascorbique pour la prévention du rhume. Cette dernière proposition, basée évidemment sur ses propriétés antioxydantes (figure 6). L'acide ascorbique, qui est principalement présent dans les systèmes biologiques sous forme d'anion ascorbate possède un groupement hydroxyle (-OH) très actif et constitue donc un éliminateur de radicaux libres très efficace. D'autre part, l'acide ascorbique est un réducteur par excellence. Réduire facilement les ions ferriques en ions ferreux, catalyseurs de la réaction de Fenton (Denisov et Afanas'ev, 2005). De plus, il régénère la vitamine E dans les membranes cellulaires en combinaison avec du GSH ou des composés capables de donner des équivalents réducteurs (Nimse et Pal, 2015).

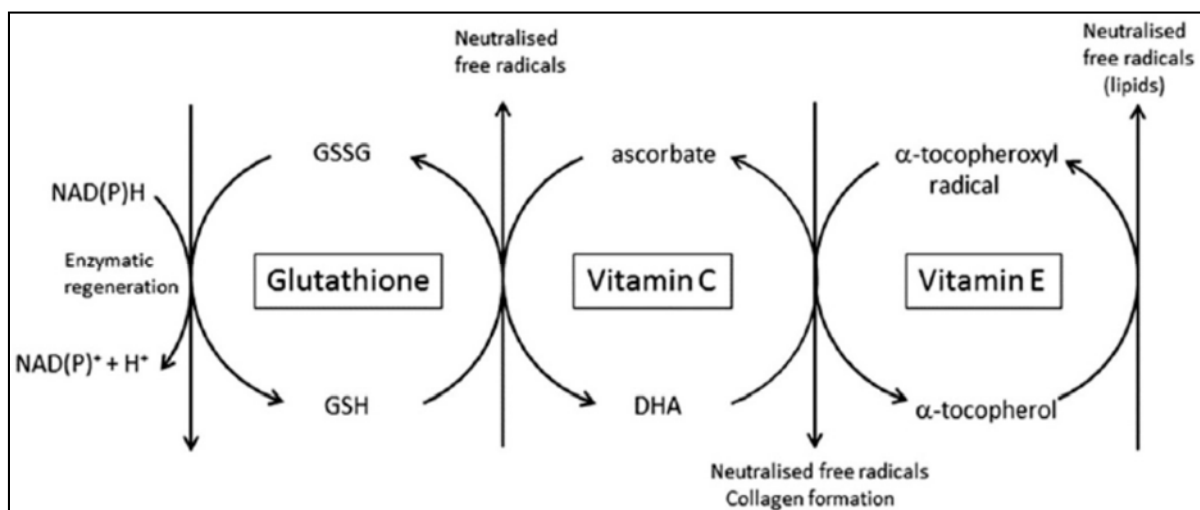


Figure 6. Activités antioxydantes de glutathion, de vitamine C, et de vitamine E (Pullar *et al.*, 2017)

d. Caroténoïdes: les caroténoïdes sont parmi les phytonutriments liposolubles de groupe tétraterpénoïdes les plus courants. Il existe principalement 2 classes de caroténoïdes: les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont des caroténoïdes hydrocarbonés et les xanthophylles contiennent de l'oxygène sous la forme de groupes hydroxyle, méthoxyle, carboxyle, céto ou époxy. Le lycopène et les β -carotènes sont des carotènes typiques, tandis que la lutéine dans les feuilles vertes et la zéaxanthine dans le maïs sont des xanthophylles typiques (Sisein, 2014; Nimse et Pal, 2015).

Les caroténoïdes peuvent réagir avec les radicaux libres selon trois mécanismes: le transfert d'électrons, l'abstraction d'hydrogène et l'addition de radicaux. Les caroténoïdes sont

connus pour jouer un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les ROS en raison de leur activité de piégeage des radicaux peroxyde. Le lycopène est l'antioxydant le plus puissant naturellement présent dans de nombreux fruits et légumes. Il démontre la forte capacité d'extinction de l'oxygène singulet par rapport à l' α -tocophérol ou au β -carotène. Le β -carotène est un caroténoïde naturel de couleur orange, que l'on trouve abondamment dans les fruits jaune orangé et dans les légumes à feuilles vert foncé. Il est bien connu que le β -carotène désaltère l'oxygène singulet avec un rendement supérieur à celui de l' α -tocophérol. En outre, le β -carotène, en particulier le β -carotène-15,15'-dioxygénase, peut être converti en deux molécules de vitamine A par clivage (Nimse et Pal, 2015; Pisoschi et Pop, 2015).

e. Polyphénols: les polyphénols sont des composés phytochimiques se trouve dans les légumes, les céréales, et les légumineuses sèches contribuent également à l'apport total en polyphénols (Scalbert *et al.*, 2005). Il existe plus de 8 000 polyphénols identifiés dans la nature et leurs principales fonctions sont en tant qu'antioxydant. La consommation de ces polyphénols offrait une meilleure protection contre les maladies chroniques telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, les maladies cérébro-vasculaires, le diabète, le vieillissement et les maladies neurodégénératives (Ganesan et Xu, 2017).

La caractéristique structurelle typique commune à la plupart des polyphénols est le système cyclique à noyau flavan à trois chaînons. Cependant, les polyphénols sont divisés en plusieurs sous-groupes telles que les catéchines flavonols, les flavanols, les flavones, les anthocyanes, les proanthocyanidines, et les acides phénoliques (Perron et Brumaghim, 2009).

Les flavonoïdes sont un groupe caractérisé par un faible poids moléculaire. Leur activité antioxydante dépend de la réactivité des substituants hydroxyle dans les réactions d'abstraction d'atomes d'hydrogène. Contrairement aux vitamines E et C antioxydantes classiques, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la formation de radicaux libres en tant que piègeurs de radicaux libres et en tant que chélateurs des métaux de transition. En ce qui concerne la fonction de chélation, leur activité inhibitrice est une conséquence de la formation de complexes de métaux de transition incapables de catalyser la formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. De plus, les flavonoïdes pouvaient inhiber la production de superoxyde par la xanthine oxydase à la fois par le piégeage du superoxyde et par l'inhibition de l'activité enzymatique (Denisov et Afanas'ev, 2005).

f. Oligoéléments

- ✓ **Sélénium (Se):** plusieurs rôles physiologiques de l'élément sélénium sont directement attribués à sa présence dans au moins 25 protéines, appelées sélénoprotéines, collectivement essentielles à la vie et également impliquées dans le contrôle du stress oxydant. Il fonctionne principalement comme cofacteur sous la forme de sélénoprotéine dans plusieurs enzymes antioxydantes, telles que GSH-Px, TrxR et iodothyronine déiodinases (Pisoschi et Pop, 2015; Liguori *et al.*, 2018).
- ✓ **Zinc (Zn):** le zinc est un oligo-élément essentiel pour le fonctionnement normal de système immunitaire, de contrôle du glucose, de la cicatrisation des plaies et de la réponse au stress oxydatif. Il est bien connu pour son rôle de cofacteur du plus de 300 enzymes et joue un rôle important dans la synthèse de l'ADN, la prolifération cellulaire, la synthèse des protéines et l'intégrité de la membrane cellulaire. Il intervient principalement dans la défense antioxydante, une carence en zinc peut donc perturber l'équilibre oxydant/antioxydant et induire un stress oxydatif (Koekkoek et van Zanten, 2016). Le zinc est un stabilisateur sur les membranes, en déplaçant éventuellement les ions des métaux de transition liés et empêchant la peroxydation des lipides membranaires (Evans et Halliwell, 2001).
- ✓ **Le cuivre (Cu):** Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau. Il est le cofacteur de plusieurs enzymes comme les SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) (Haleng *et al.*, 2007).

3.3.2. Modulation des radicaux libres par les antioxydants

Les principaux mécanismes d'action des antioxydants sont soutenus généralement par des interactions entre les enzymes et les oligoéléments (figure 7). Les SOD situées dans le cytosol et les mitochondries, convertissent de manière catalytique l' $O_2^{\bullet-}$ en oxygène et H_2O_2 en présence des cofacteurs d'ions métalliques tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn) ou le manganèse (Mn). L'enzyme CAT présente dans le peroxysome convertit le H_2O_2 en eau et en oxygène. Les GSH-Px se trouvent à la fois dans le cytoplasme et extra cellulièrement dans presque tous les tissus humains, convertit le H_2O_2 en eau. L'enzyme GSH-Px a une forte activité vis-à-vis du H_2O_2 et des hydroperoxydes d'acides gras. La peroxyrédoxine, une

enzyme, catalyse la réduction de H_2O_2 , d'hydroperoxydes organiques et du peroxy-nitrite (ONOO^-). Les CAT, GSH-Px et SOD montrent un effet synergique dans le balayage d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Nimse et Pal, 2015).

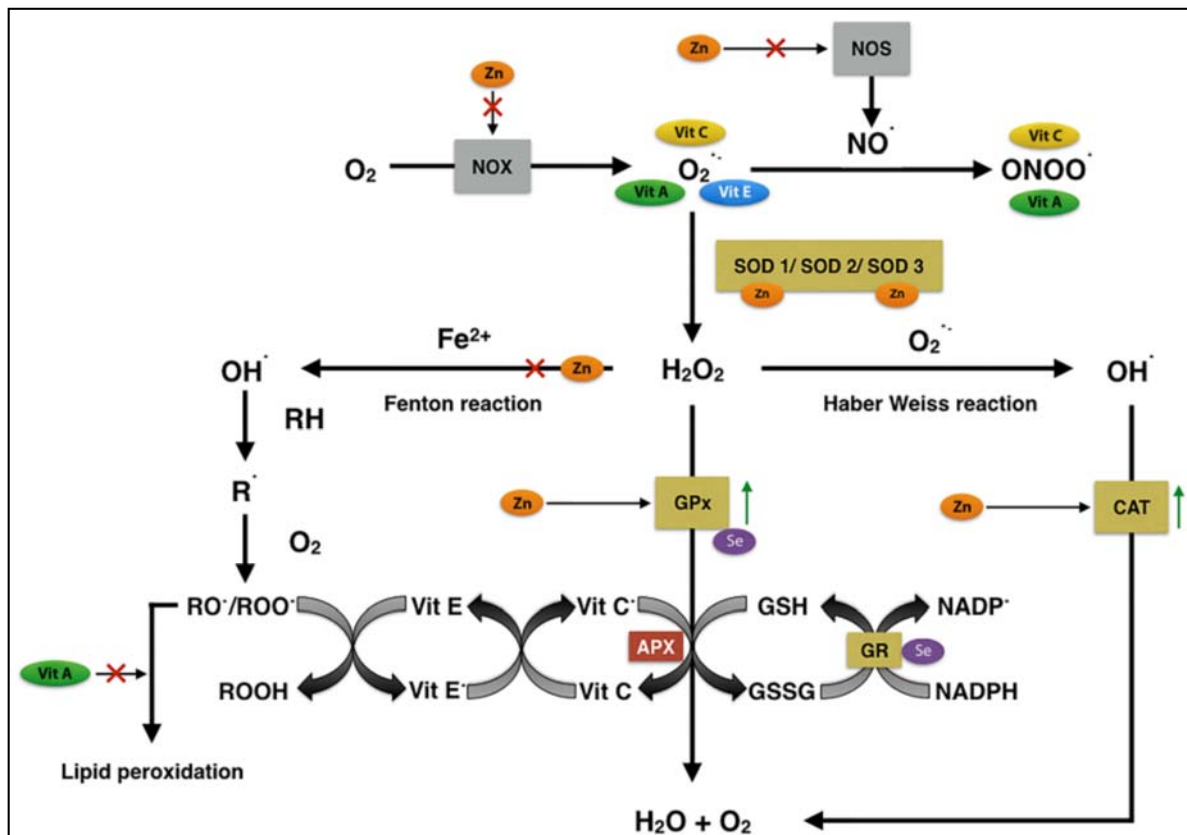


Figure 7. Le réseau antioxydant humain (Koekkoek et van Zanten, 2016)

(1) le zinc inhibe les enzymes pro-oxydantes NOX et NOS; augmente l'activité des enzymes antioxydantes SOD, GSH-Px et CAT; est un cofacteur de SOD1 et SOD3; et entre en compétition avec les métaux de transition, interdisant ainsi la réaction de Fenton et la génération d'espèces réactives de l'oxygène. (2) Le sélénium est incorporé dans GSH-Px et GSH-R, les deux sélénoprotéines. (3) La vitamine A est un antioxydant qui brise la chaîne dans le processus de peroxydation des lipides et qui piège directement le superoxyde, le peroxy-nitrite et le radical hydroxyle. (4) La vitamine C régénère la vitamine E et nettoie directement les espèces d'oxygène réactif solubles dans l'eau. (5) La vitamine E est un antioxydant qui brise la chaîne dans le processus de peroxydation des lipides et élimine directement les ROS liposolubles (Koekkoek et van Zanten, 2016).

3.4. Pathologies liées au stress oxydant

Les ROS/RNS peuvent également endommager les protéines, entraînant des modifications structurelles et une perte d'activité enzymatique. Le stress oxydatif peut provoquer diverses maladies chroniques et dégénératives (Pham-Huy *et al.*, 2008).

La maladie cardiovasculaire a une étiologie multifactorielle associée au stress oxydatif tels que l'athérosclérose, l'ischémie, l'hypertension, la cardiomyopathie, l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque congestive. Le stress oxydatif a été étudié dans le cadre de maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique, la perte de mémoire et la dépression. Diverses maladies rénales ont été les résultats stress oxydatif telles que la glomérulonéphrite et la néphrite tubulo-interstitielle, l'insuffisance rénale chronique, la protéinurie et l'urémie via la peroxydation lipidique. Les différentes formes de néphropathie et de cancérogénicité induites par les métaux lourds (Cd, Hg, Pb, As) et les métaux de transition (Fe, Cu, Co, Cr) (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Le processus de vieillissement est le résultat de dommages cumulatifs induits par des radicaux endogènes, générés notamment par les mitochondries. Le stress oxydatif a également été impliqué dans la pathogenèse du diabète sucré et de ses complications. L'inflammation a été désignée comme l'une des situations critiques dans lesquelles il est possible de produire des radicaux libres et d'initier un stress oxydatif (Giustarini *et al.*, 2009).

Chapitre 4

[Matériel et Méthodes]

4. Matériel et méthodes

4.1. Matériel

4.1.1. Matériel végétal

Les rhizomes de curcuma ont été achetés localement sur le marché. Pour obtenir la poudre fine de curcuma, les rhizomes ont été broyés en laboratoire à l'aide de mortier et de pilon, pulvérisés avec un mixeur, puis passer au tamis pour obtenir une gamme de tailles uniforme. Ce curcuma diététique a été donné aux rats à raison de 2 % dans l'aliment.

4.1.2. Produit chimique

Nous avons utilisé le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) (Biochem Chemopharma Company, USA). Il a été dissous dans l'eau minérale et administrée aux rats par gavage (*per os*), le volume de chaque dose a été ajusté pour délivrer 15 mg/kg de poids corporel par jour.

4.1.3. Entretien des rats

Nous avons utilisé 40 adulte rats mâles de la souche *Wistar* pesant 160 ± 10 g ont été obtenus de l'Institut Pasteur d'Alger - Algérie. L'élevage des rats a été effectué au niveau de l'animalerie de l'université Badji Mokhtar - Annaba. Ils sont élevés dans des cages en polyéthylène, tapissés d'une litière en copeaux de bois. Les cages ont été nettoyés et la litière changée une fois tous les deux jours avec un accès libre à la nourriture. Les rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux semaines dans des conditions environnementales standard à l'animalerie (cycle lumière/obscurité de 12 h, température à 21 ± 2 °C et humidité relative à 50 ± 10 %).

Les rats ont été nourris avec un régime alimentaire spécifique que nous avons préparé selon Upreti *et al.* (1989) (Tableau 4), l'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*. Les procédures de recherche ont été effectuées conformément aux directives pour le soin des animaux de l'institut national de la santé et approuvées par le comité d'éthique animale.

4.1.4. Procédure expérimentale

Les animaux ont été divisés au hasard en quatre groupes de dix rats chacun. Les rats ont été traités pendant trente jours successifs comme suit:

- ✓ Le premier groupe (0-0) a servi de témoins ont reçu de l'eau minérale par gavage avec un régime alimentaire normal (figure 8-a).

- ✓ Le deuxième groupe (0-Cur), les rats ont reçu de l'eau minérale et ont été nourris avec un régime expérimental contenant 2 % de curcuma en poudre (figure 8-b).
- ✓ Le troisième groupe (Cr-0) ont été traités *per os* avec une dose de dichromate du potassium (15 mg/kg de poids corporel) et nourrie par un régime alimentaire normal.
- ✓ Le quatrième groupe (Cr-Cur), les rats ont été reçu à la fois une dose orale de bichromate du potassium (15 mg/kg) et un régime expérimental contenant 2 % de curcuma en poudre.

NB: Cette durée a été évoquée de la littérature ainsi que les deux doses de dichromate de potassium et la quantité de la poudre de curcuma.

Tableau 4. Composition du régime alimentaire pour 1 kg d'aliment (Upreti *et al.*, 1989)

Composant	Quantité en g/kg	Pourcentage (%)
Amidon	420	42
Saccharose	210	21
Soja	260	26
CMV	30	3
Huile	20	2
Son	60	6

CMV: Complexe Minéralo-Vitaminé; Amidon: maïs



Figure 8. Photos montrant le régime alimentaire préparé d'après la méthode de Upreti *et al.*, (1989). (a) Le régime donné aux groupes (0-0, Cr-0). (b) Le régime donné aux groupes (0-Cur, Cr-Cur).

4.1.4.1. Prélèvement sanguin

Pendant les 30 jours de traitement, les animaux ont été pesés quotidiennement. À la fin de la période expérimentale, tous les animaux ont été sacrifiés par décapitation, le sang a été immédiatement recueilli dans deux tubes différents:

- Le tube à EDTA: destiné au dosage des paramètres hématologiques (la formule de numération sanguine, FNS).
- Le tube sec : subi une centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 minutes pour obtenir un sérum qui a ensuite récupéré puis stocké à -20 °C, il est destiné au dosage des paramètres biochimique (glycémie, bilans lipidique, hépatique, et rénal).

4.1.4.2. Prélèvement des organes

Les animaux ont ensuite été disséqués, le foie, les reins, les testicules, le cœur, la rate, et les intestins ont été prélevés. D'abord ont été lavés avec un tampon phosphate (0,1 M et pH = 7,4) pour éliminer l'excès de sang et les tissus adhérents puis pesés, excepté les intestins. L'indice organo-somatique montre le poids d'organe en pourcentage du poids corporel (Berté *et al.*, 2008). Un fragment de foie et de rein, de chaque groupe, sont fixés séparément dans une solution à 10 % de formol afin d'effectuer les coupes histologiques, le reste des organes sont conservés à -20 °C pour le dosage des paramètres de stress oxydant. La figure 9, résume les différentes étapes du protocole expérimental.

Figure 9. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

4.2. Méthodes de dosage

4.2.1. Dosage des paramètres hématologiques

La mesure de la formule de numération sanguine (FNS) a été effectuée par automates d'hématologie (MINDRAY bc-3200). Le tube à EDTA contenant le sang a été placé dans l'automate, et la mesure de la FNS commence. Au bout de 2 minutes les résultats s'affichent sur l'écran.

Les paramètres hématologiques mesurés sont: globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (HGB), hématocrite (HCT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), neutrophiles (NEUT), volume globulaire moyen des hématies (VGM), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), et teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH).

4.2.2. Dosage des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés à l'aide d'un analyseur automatique de biochimie (ARCHITECT ci4100) en utilisant des kits fournis par Spinreact (Espagne) pour estimer:

- ✓ La glycémie.
- ✓ Le bilan hépatique: les transaminases (TGO, TGP), le lactate déshydrogénase (LDH), la phosphatase alcaline (PAL), la bilirubine totale (BIL-T) et directe (BIL-D), les protéines total, et l'albumine.
- ✓ Le bilan rénal: l'urée, la créatinine, et l'acide urique.
- ✓ Le bilan lipidique: le cholestérol, les triglycérides, et les lipides totaux.

4.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant

4.2.3.1. Mesure le taux du glutathion (GSH)

- **Préparation de l'homogénat pour le dosage de GSH:** 200 mg de tissu (foie, reins, cœur, rate, intestins, et testicules) ont été mis en présence de 8 mL d'une solution d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid (4 °C) à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.
- **Principe:** le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Weckbecker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour

cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

➤ **Mode opératoire**

- Prélever 0,8 mL de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 mL d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0,25 %.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 mL du surnageant.
- Ajouter 1 mL du tampon Tris + EDTA (0,4 M Tris + 0,02 M d'EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 mL de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques (DO) à 412 nm contre le blanc.

➤ **Calcul:** la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525 \times 1000}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg prot}}$$

GSH: nM GSH/ mg protéines.

DO: Densité optique.

1: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 mL homogénat + 0,2 mL SSA).

1,525: Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 mL surnageant + 1 mL Tris + 0,025 mL DTNB).

13100: Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

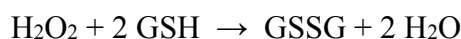
0,8: Volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml.

0,5: Volume du surnageant trouvé dans 1,525 ml.

4.2.3.2. Mesure l'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

➤ **Préparation de l'homogénat pour le dosage de GSH-Px:** 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid (4 °C) en présence de 5 mL d'une solution de tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

➤ **Principe:** l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de Flohé et Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé à sa forme oxydée (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante:



➤ **Mode opératoire:**

- Prélever 0,2 mL de l'homogénat.
- Ajouter 0,4 mL de GSH (0,1 mM).
- Ajouter 0,2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).
- Incuber au bain marie à 25 °C, pendant 5 minutes.
- Ajouter 0,2 mL de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 mL de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours/minutes.
- Prélever 0,48 mL du surnageant.
- Ajouter 2,2 mL de la solution tampon TBS à pH 7,4.
- Ajouter 0,32 mL de DTNB (1 mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

- **Calcul:** la détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante:

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

$$\text{GPx (nM GSH/min/mg prot)} = \frac{Q \times 1000}{\text{mg prot}}$$

Q: Quantité de GSH disparue (oxydée) dans 0,2 ml extrait dans 1 ml.

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration du substrat (GSH).

4.2.3.3. Mesure l'activité de la glutathion S-transférase (GSH-ST)

- **Préparation de l'homogénat pour le dosage de GSH-ST:** 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid (4 °C) en présence de 5 mL d'une solution de tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

- **Principe:** la mesure de l'activité des GSH-STs a été réalisée par la méthode de Habig *et al.* (1974), celle-ci consiste à fournir l'enzyme un substrat en général le 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec le glutathion sous l'action de nombreuses isoformes de GSH-ST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm.

- **Mode opératoire:** la méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSH-STs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée cinétiquement pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. Cette cinétique est réalisée parallèlement dans le blanc et les échantillons contre la solution du tampon phosphate.

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 6,5	850	830
CDNB (0,02 M)	50	50
GSH (0,1 M)	100	100
Homogénat	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée de la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

➤ **Calcul:** l'activité enzymatique de la GSH-ST est obtenue par la formule suivante:

$$\text{GST} = \frac{(\text{DO échantillon/min} - \text{DO blanc/min})}{9,6 \times \text{mg prot}}$$

GSH-ST: nM GSH-CDNB/min/mg
proteins.

DO échantillon/min: Densité optique de
l'échantillon par minute.

DO blanc/min: Densité optique du blanc
par minute.

9,6: Coefficient d'extinction du GSH-
CDNB exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.3.4. Mesure l'activité de la catalase (CAT)

➤ **Préparation de surnagent pour le dosage de CAT:** 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid (4 °C) en présence de 5 mL d'une solution de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat, ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes afin d'obtenir un surnagent.

➤ **Principe:** la méthode utilisée est celle d'Aebi (1984). La CAT catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. L'activité de la CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la diminution du H₂O₂ à une température d'incubation de 25 °C.

➤ **Mode opératoire:**

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 7,5	800	780
H ₂ O ₂ (0,5 M)	200	200
Surnagent (S9)	-	20

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.

- La quantité de l'homogénat (S9) doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui comprise entre 1 et 1,5 mg/mL, soit une quantité de 10 à 20 µL de S9 dilué.
- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve en quartz au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

➤ **Calcul:** l'activité enzymatique de la CAT est calculée par la formule suivante:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta\text{DO} \times 10}{\varepsilon \times L \times X \times \text{Fd}}$$

CAT: µM H₂O₂/min/mg protéines.

ΔDO: Variation de la densité optique par minutes.

ε: Coefficient d'extinction du H₂O₂ (0,04 mM⁻¹.Cm⁻¹).

L: Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm).

X: Quantité des protéines en mg/ml.

Fd: Facteur de dilution du H₂O₂ dans le tampon (0,02).

NB: On note que le dosage de plusieurs paramètres (GSH, GSH-Px, GSH-ST) est mesuré par apport à 1 mg de protéines. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

4.2.3.5. Dosage des protéines

➤ **Principe:** la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines dans l'échantillon.

➤ **Mode opératoire:**

- Prélever 0,1 mL de l'homogénat.
- Ajouter 5 mL du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.
- La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

- **Calcul:** la concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovin (BSA) réalisée dans les mêmes conditions (figure 14).

4.2.4. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologie au niveau de l'Hôpital Ibn Rochd - Annaba. La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984), qui comporte les étapes suivantes :

4.2.4.1. Fixation

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de foie et de rein (surface 1 à 2 cm² et épaisseur 2 mm) ont été alors mis dans le liquide de Bouin alcoolique (voir préparation aux annexes) qui constitue de fixateur classique le plus utilisé. Il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du Bouin puis rincées à l'eau distillée. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

4.2.4.2. Déshydratation

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

4.2.4.3. Inclusion et réalisation des blocs

Elle ne peut être satisfaisante que si l'échantillon est complètement déshydraté et ne contient plus de solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont alors plongées (2 heures) dans des

bains de paraffine liquide fondue à 60 °C. Les échantillons étant imbibés de paraffine viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide (10 à 15 min) du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés «Microtomes». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

4.2.4.4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont marquées au nom des différents lots à l'aide d'un crayon d'argent, ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

4.2.4.5. Coloration et montage

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (HE); qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 mL d'alcool éthylique à 70 % + 50 mL d'acide HCl), eau ammoniacale (100 mL d'eau distillée + 2 mL Ammoniaque) et solution d'Eosine (100 mL Eosine solution aqueuse à 3 %, 125 mL alcool éthylique à 95 %, 375 mL d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes:

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger les coupes dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux). Rincer à l'eau courante.
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger les coupes dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Le montage consiste à fixer une lamelle en verre sur les coupes histologiques après coloration.

Cette étape permet la:

- Protection mécanique des coupes.
- Protection chimique des colorants.

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

4.2.5. Analyse statistique des résultats

Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm SEM. Les valeurs ont été déterminées par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie par comparaisons multiples de Tukey. Le logiciel GraphPad Prism 5.0 a été utilisé pour effectuer les statistiques et dessiner les graphiques (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Des valeurs de $p < 0,05$, $< 0,01$ et $< 0,001$ ont été considérées comme statistiquement significatives, hautement significatives et très hautement significatives, respectivement (Fisher et Yates 1974).

Chapitre 5

[Résultats]

5. Résultats

5.1. L'effet du traitement sur les paramètres pondéraux: le poids corporel, le rapport organo-somatique

La figure 10 montre une diminution du poids corporel, cette réduction est accompagnée d'une augmentation de l'indice organo-somatique (figure 11) chez les rats traités au chrome (Cr-0) comparativement au groupe témoin et au groupe traité par le curcuma. Une nette amélioration de ces paramètres a été notée après l'administration de curcuma dans le groupe (Cr-Cur) par rapport au groupe (Cr-0).

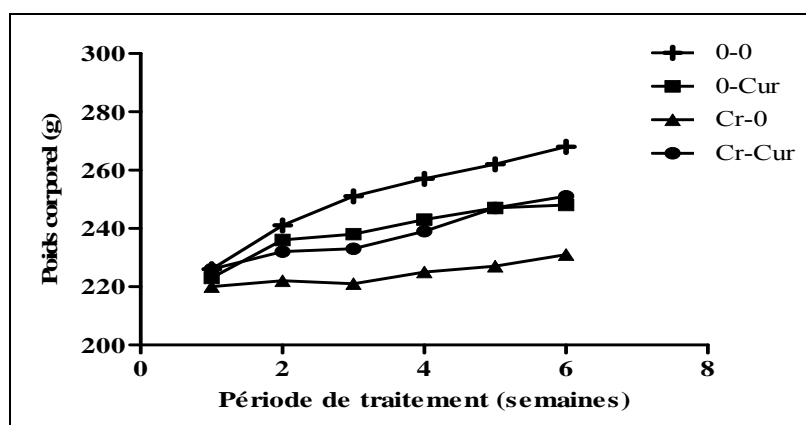


Figure 10. Gain moyen du poids corporel (g) des rats témoins (T) et traités (0-0; 0-Cur; Cr-0; Cr-Cur) durant 30 jours de traitement

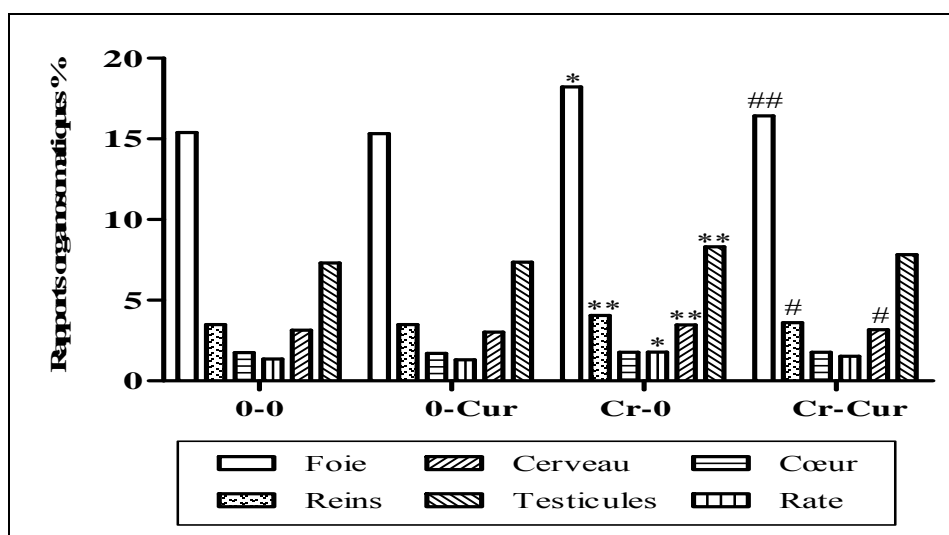


Figure 11. Variations des rapports organo-somatiques (%) chez les rats témoins (T) et traités (0-0; 0-Cur; Cr-0; Cr-Cur) après 30 jours de traitement.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe (0-0).

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ différence significative de groupe (Cr-0).

5.2. L'effet du traitement sur les paramètres hématologiques

Les résultats du profil hématologique illustré dans le tableau 5 révèlent que le traitement des rats par le chrome provoque une diminution du niveau d'hématocrite s'accompagne d'une réduction très significative ($p < 0,01$) du niveau des globules rouges, de l'hémoglobine ainsi que la concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire (CCMH). De plus nous avons enregistré une diminution significative ($p < 0,05$) dans le volume globulaire moyen (VGM) et dans la teneur de l'hémoglobine corpusculaire moyenne (TCMH) associées à une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) des plaquettes comparant au groupe témoin. Le chrome provoque une augmentation très significative ($p < 0,01$) de globules blancs et une augmentation significative ($p < 0,05$) du niveau des neutrophiles, des lymphocytes, et des monocytes par rapport au groupe témoin.

En revanche, la supplémentation de curcuma dans la diète des rats (Cr-Cur) a rétabli les paramètres cités ci-dessus, en comparaison avec le groupe témoin et le groupe (Cr-0).

Tableau 5. Profil hématologique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

Paramètres	Groupes			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
GR ($10^6/\mu\text{l}$)	8,901±0,17	9,054±0,17	5,904±0,79**	7,911±0,41* [#]
HGB (g/dl)	17,27±0,31	17,61±0,45	12,56±1,38**	16,27±0,65 [#]
HCT (%)	43,91±4,51	46,41±1,18	40,93±0,61	44,10±1,40
VGM (fl)	54,05±1,25	57,38±0,89*	46,54±3,11*	50,76±2,14
CCMH (g/dl)	36,61±0,27	36,82±1,0	33,44±0,75**	35,34±0,29* [#]
TCMH (pg)	20,83±0,82	20,78±0,48	18,41±0,41*	19,48±0,27 [#]
GB ($10^3/\mu\text{l}$)	8457±955,4	8129±738,0	13800±11**	11630±10* [#]
NEUT (%)	32,26±2,75	25,24±3,04	39,43±1,69*	34,10±3,63
LY (%)	55,16±2,51	53,39±4,29	66,64±3,33*	57,34±2,81 [#]
MO (%)	8,557±1,32	7,400±0,58	13,54±1,47*	10,49±0,92
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	460,1±43,59	472,3±46,77	194,7±13,87***	326,7±37,65* ^{##}

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (0-0).

[#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$ différence significative de groupe (Cr-0).

GR: globules rouges, HGB: hémoglobine, HCT: hématocrite, VGM: volume globulaire moyen, CCMH: concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire, TCMH: hémoglobine corpusculaire moyenne, GB: globules blancs, NEUT: neutrophiles, LY: lymphocytes, MO: monocytes, PLT: plaquettes.

5.3. L'effet du traitement sur les paramètres biochimiques

Les résultats concernant la détermination des paramètres biochimiques sont présentés dans les tableaux (6-7-8-9) confirment l'existence d'une perturbation métabolique importante.

5.3.1. Taux de glycémie

L'administration orale de chrome a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de glycémie. Tandis que, la supplémentation en curcuma a mis fin à cette perturbation et généralement le ramené à un niveau proche de la normale par rapport aux groupes témoins et traités au chrome (tableau 6).

Tableau 6. Le taux de glycémie sériques chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

Paramètre	Groupes			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
Glycémie (g/L)	0,76±0,03	0,73±0,02	1,02±0,09*	0,91±0,04*

* $p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

5.3.2. Bilan lipidique

Dans le tableau 7, l'administration orale de chrome a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux des lipides totaux, ainsi qu'une augmentation très significative ($p < 0,01$) de cholestérol et triglycérides par rapport au groupe témoin. Inversement, les résultats ont montré une amélioration des paramètres lipidique après l'administration de curcuma dans le groupe Cr-Cur par rapport aux groupes témoins et traités au chrome.

Tableau 7. Marqueurs lipidique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

Paramètres	Groupes			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
Triglycérides (g/L)	0,62±0,07	0,58±0,14	1,39±0,18**	0,78±0,12 [#]
Cholestérol (g/L)	0,35±0,04	0,37±0,05	0,62±0,04**	0,51±0,05*
Lipides T ^{les} (mg/dL)	446,8±63,80	389,10±51,67	623,0±31,92*	529,8±41,82

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

[#] $p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

5.3.3. Bilan hépatique

L'administration orale de chrome a entraîné une augmentation de l'albumine, une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux du LDH, de TGP, de bilirubine totale et directe, et une augmentation très significative ($p < 0,01$) des protéines totales. Ainsi que, une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) a été observée pour les taux de PAL et de TGO par rapport au groupe témoin. En revanche, la supplémentation en curcuma dans le régime alimentaire du groupe Cr-Cur a rétabli les paramètres du profil hépatique à leur niveau normal par rapport aux groupes témoins et traités au chrome (tableau 8).

Tableau 8. Marqueurs hépatique chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

Paramètres	Groupes			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
PAL (UI/L)	140,3±8,03	134,3±13,81	281,6±26,9***	165,5±9,07 [#]
LDH (UI/L)	2559±314,5	2396±199,5	3586±242,8*	3263±256,1
TGP (UI/L)	21,12±2,03	19,65±2,28	34,83±4,16*	29,49±2,09*
TGO (UI/L)	213,7±14,2	181,5±17,25	311,7±10,38***	275,1±12,27** [#]
Albumine (g/L)	32,13±4,15	32,25±2,04	21,88±2,68	25,88±2,48
Protéines T ^{les} (g/L)	65,75±4,01	79,13±4,60*	41,88±4,62**	59,75±3,81 ^{##}
BIL-D (mg/dL)	0,4875±0,02	0,4625±0,01	0,5625±0,02*	0,5125±0,02
BDL-T (mg/dL)	0,65±0,06	0,6±0,06	0,825±0,03*	0,725±0,03

PAL: phosphatase alcaline, LDH: lactate déshydrogénase, TGP: alanine aminotransférase (ALAT), TGO: aspartame aminotransférase (ASAT), BIL-D: bilirubine direct, BDL-T: bilirubine total.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin.

[#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

5.3.4. Bilan rénal

D'après le tableau 9 et par rapport au groupe témoin, l'administration orale de chrome a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux d'urée, d'acide urique. Ainsi qu'une augmentation très significative ($p < 0,01$) de créatinine. Les résultats ont montrés une amélioration des paramètres rénaux après l'administration de curcuma dans le groupe Cr-Cur par rapport aux groupes témoins et traités au chrome.

Tableau 9. Marqueurs rénal chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

Paramètres	Groupes			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
Créatinine (mg/L)	6,68±0,61	6,16±0,68	11,94±1,27**	9,88±0,88*
Urée (g/L)	0,472±0,05	0,425±0,04	0,664±0,04*	0,512±0,05
Acide urique (mg/dL)	2,88±0,40	2,40±0,36	4,68±0,46*	4,52±0,58*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0)

5.4. L'effet du traitement sur les paramètres de stress oxydant

5.4.1. Le contenu en glutathion (GSH)

En comparaison avec le groupe témoin le chrome était à l'origine d'un stress oxydatif, principalement dû à une réduction significative ($p < 0,05$) de tous les biomarqueurs des systèmes de défense antioxydants, en particulier le taux de GSH dans les organes : foie (figure 12), reins (figure 13), cœur (figure 14), rate (figure 15), cerveau (figure 16), intestins (figure 17), et testicules (figure 18).

Alors que, l'administration en curcuma dans le groupe (Cr-Cur) a révélé une amélioration de teneur en glutathion par une augmentation significative par rapport à ceux du groupe témoins et de groupe traité par le chrome (Cr-0).

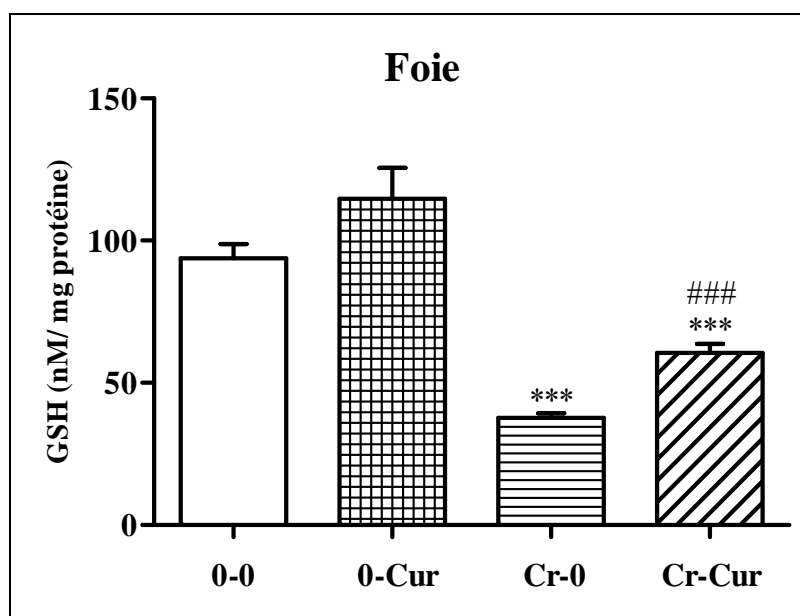


Figure 12. Teneur en glutathion hépatique (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

*** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

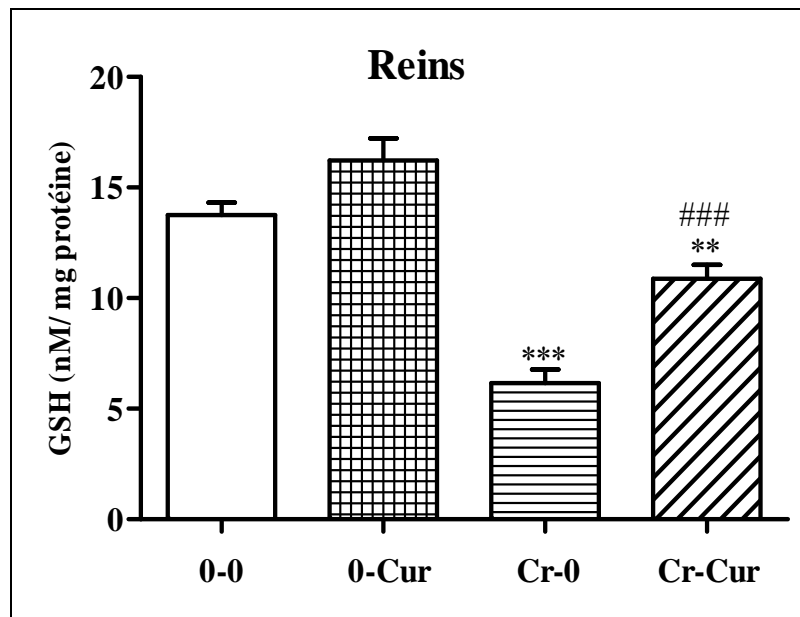


Figure 13. Teneur en glutathion rénal (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

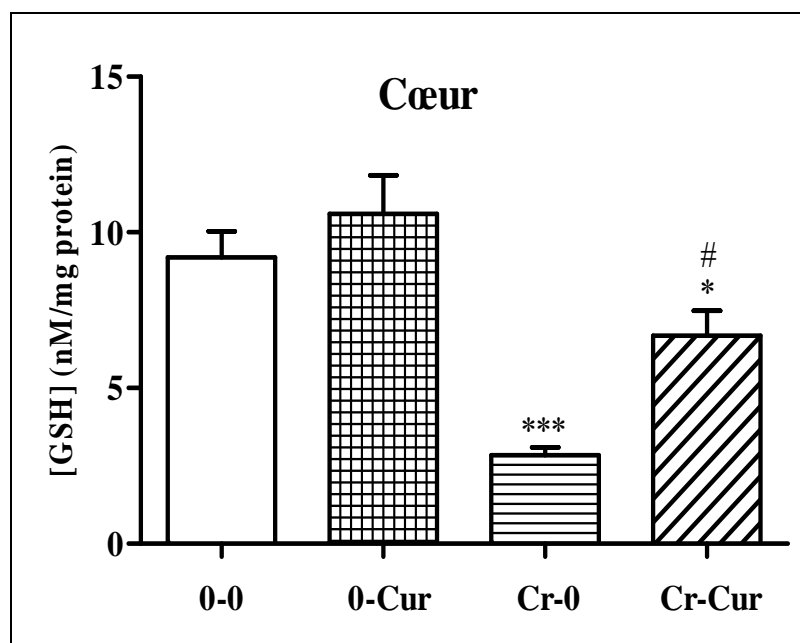


Figure 14. Teneur en glutathion cardiaque (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

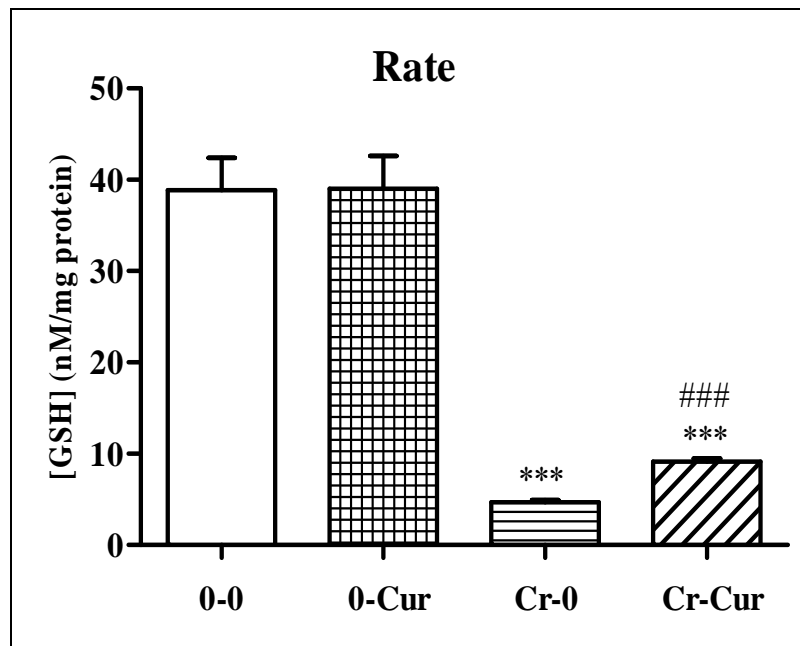


Figure 15. Teneur en glutathion splénique (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

*** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

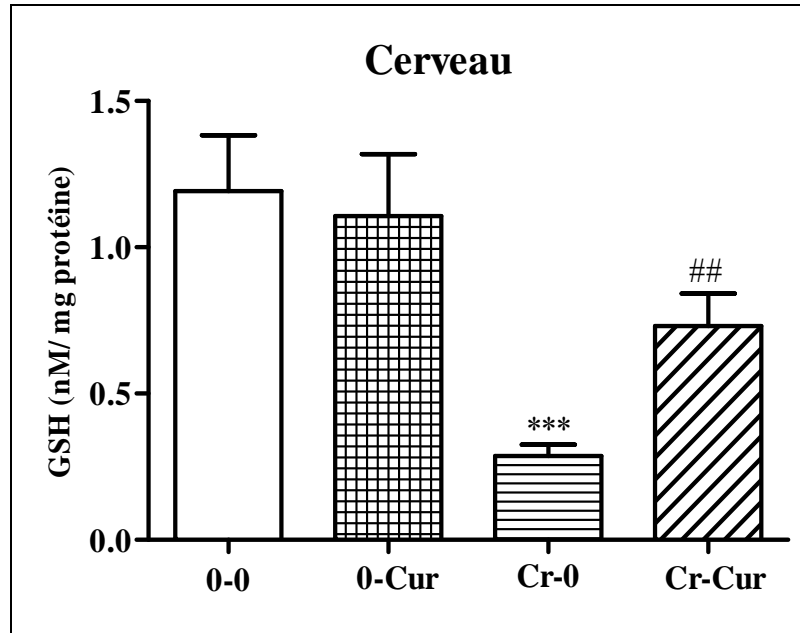


Figure 16. Teneur en glutathion dans le cerveau (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

*** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

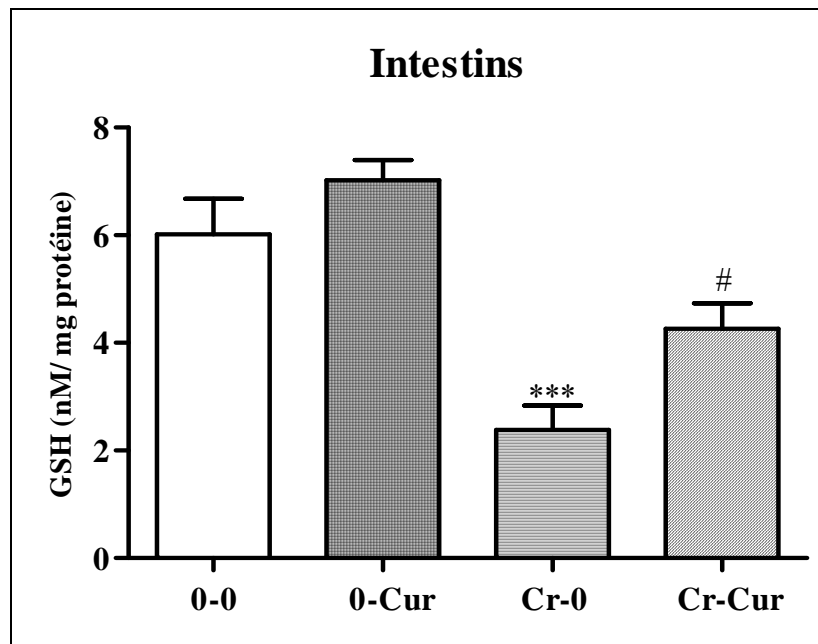


Figure 17. Teneur en glutathion intestinal (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

*** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

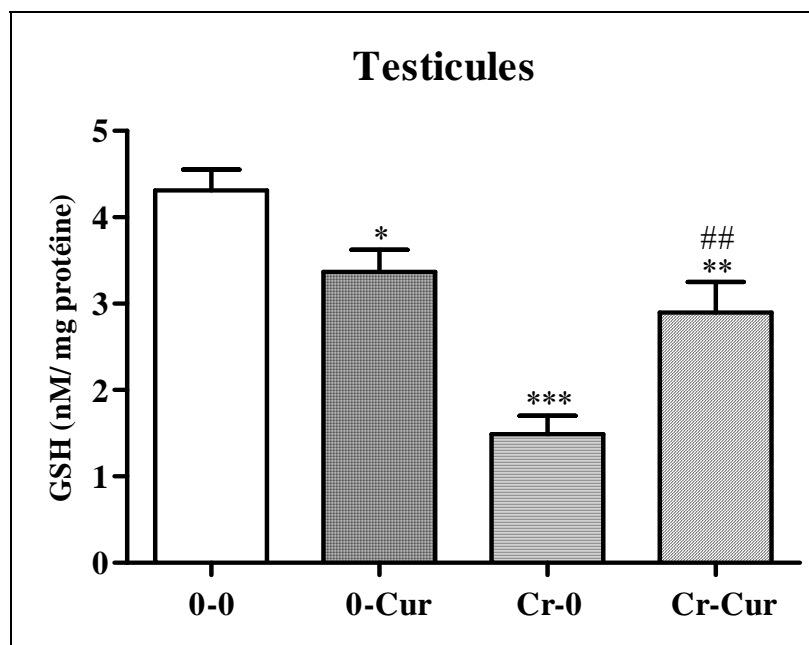


Figure 18. Teneur en glutathion testiculaire (nM/mg de prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin.

$p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

5.4.2. Activité des enzymes antioxydants (CAT, GSH-Px, GSH-ST)

Une diminution dans les activités des enzymes antioxydantes a été signalée dans les tissus hépatique et rénal de groupe traité par le chrome (Cr-0), l'activité de CAT (figures 19, 20), de GPx (figures 21, 22), et de GST (figures 23, 24). Alors que, l'administration en curcuma dans le groupe (Cr-Cur) a révélé une amélioration des marqueurs oxydants susmentionnés par une augmentation par rapport à ceux du groupe témoins et de groupe traité par le chrome (Cr-0).

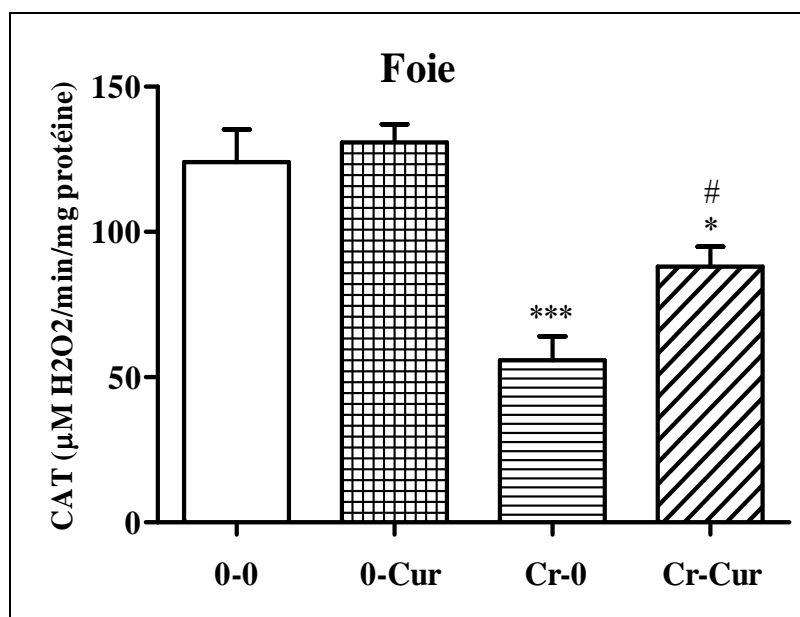


Figure 19. Activité de la catalase hépatique ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prt}$) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

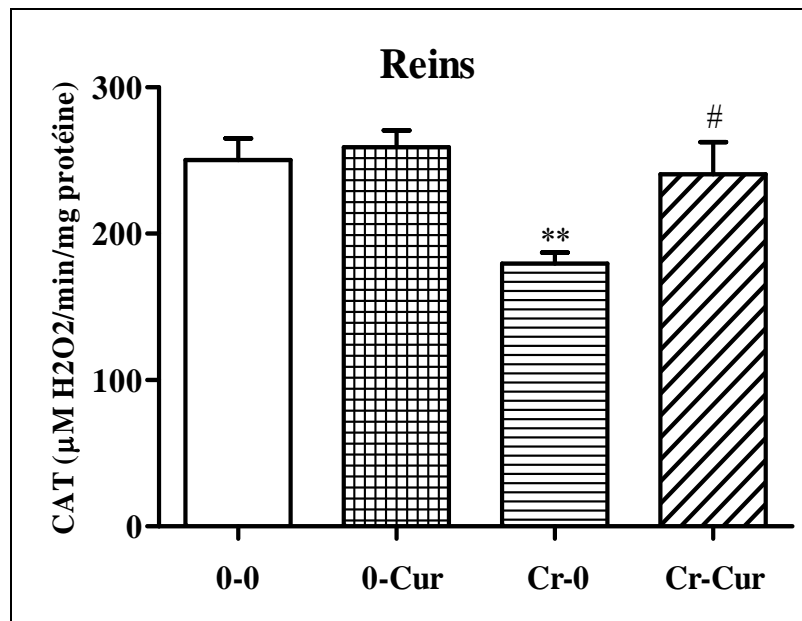


Figure 20. Activité de la catalase rénal ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prt}$) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

** $p < 0,01$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

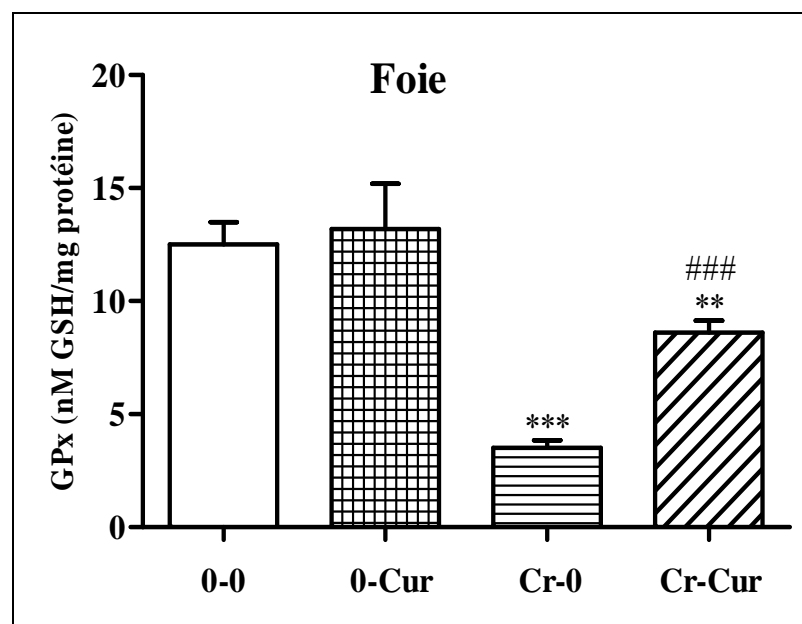


Figure 21. Activité de la glutathion peroxydase hépatique (nM GSH/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$; Différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

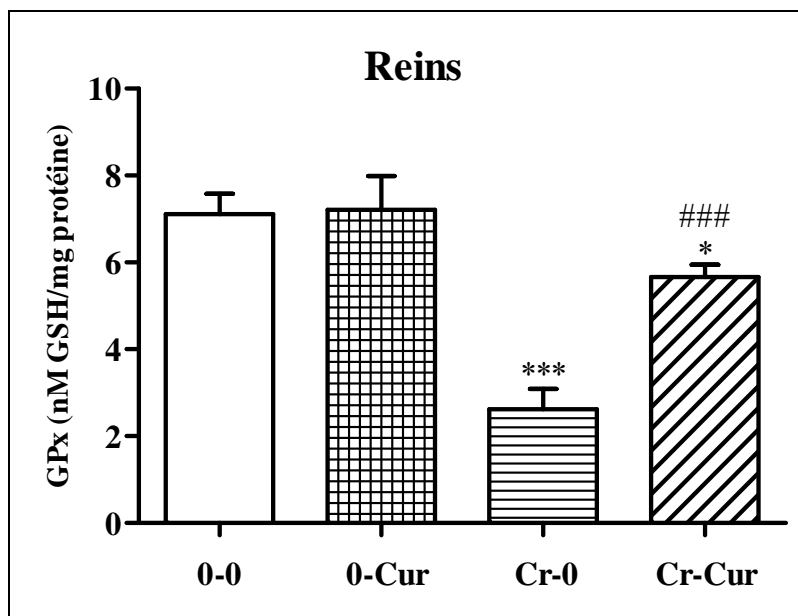


Figure 22. Activité de la glutathion peroxydase rénal (nM GSH/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

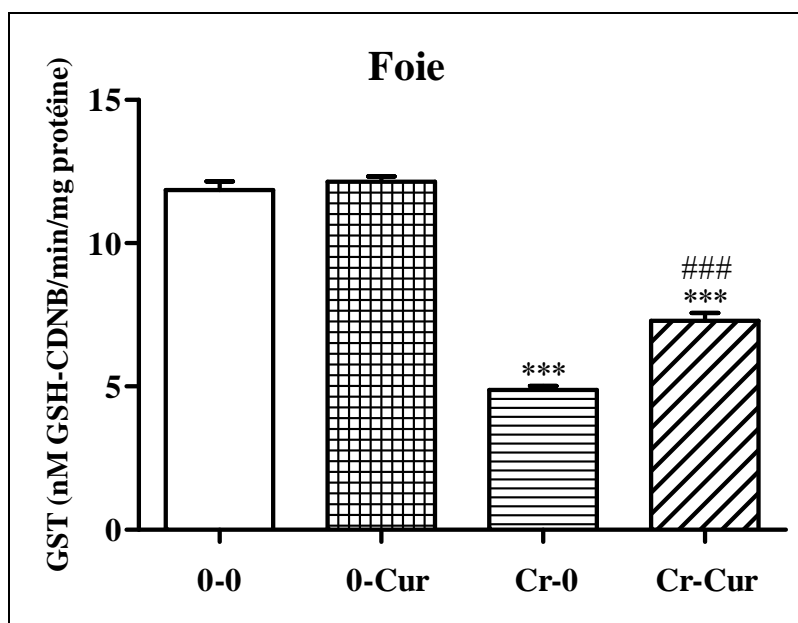


Figure 23. Activité de la glutathion S-transférase hépatique (nM GSH-CDNB/min/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

*** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

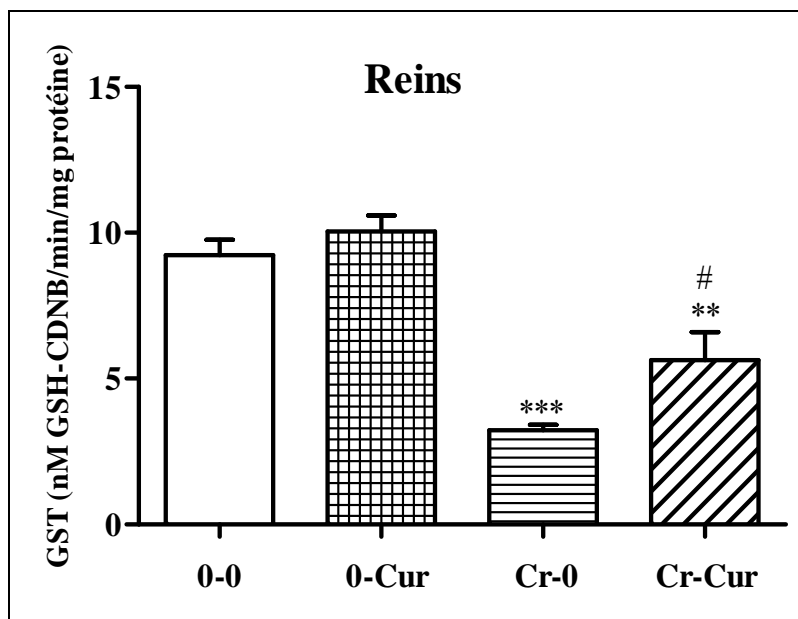


Figure 24. Activité de la glutathion S-transférase rénale (nM GSH-CDNB/min/mg prt) chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différence significative par rapport au groupe témoin (0-0).

$p < 0,05$ différence significative par rapport au groupe (Cr-0).

5.5. L'effet du traitement sur l'histologie

5.5.1. Etude histologique du foie

Les microphotographies représentatives de la figure 25 montrent les coupes transversales du tissu hépatique des groupes étudiés. Le témoin (25a) montre des hépatocytes normaux étroitement attachés les uns aux autres contenant une veine centrolobulaire (CV). Ainsi, le groupe curcuma (25b), présente des cellules hépatiques normales. Contrairement au groupe chrome (25c) présentent des hépatocytes congestionnés (astérisques dans 25c3). De plus, l'intoxication au chrome a provoqué la vacuolisation des hépatocytes (têtes de flèches dans 26c1, 26c2), des dilatations du parenchyme ont été observées dans tout le tissu hépatique (flèches fermées dans 25c1, 25c2, 25c3, 25c5), ainsi qu'une endothélite impliquant la veine centrilobulaire (ouvertures dans 25c4, 25c5) et des cellules inflammatoires leucocytaires (flèche en tête ronde en 25c1). En revanche, le foie du groupe Cr-Cur (25d) montre moins de dommages au foie en présentant des cellules hépatiques et des parenchymes normaux que les rats traités au chrome.

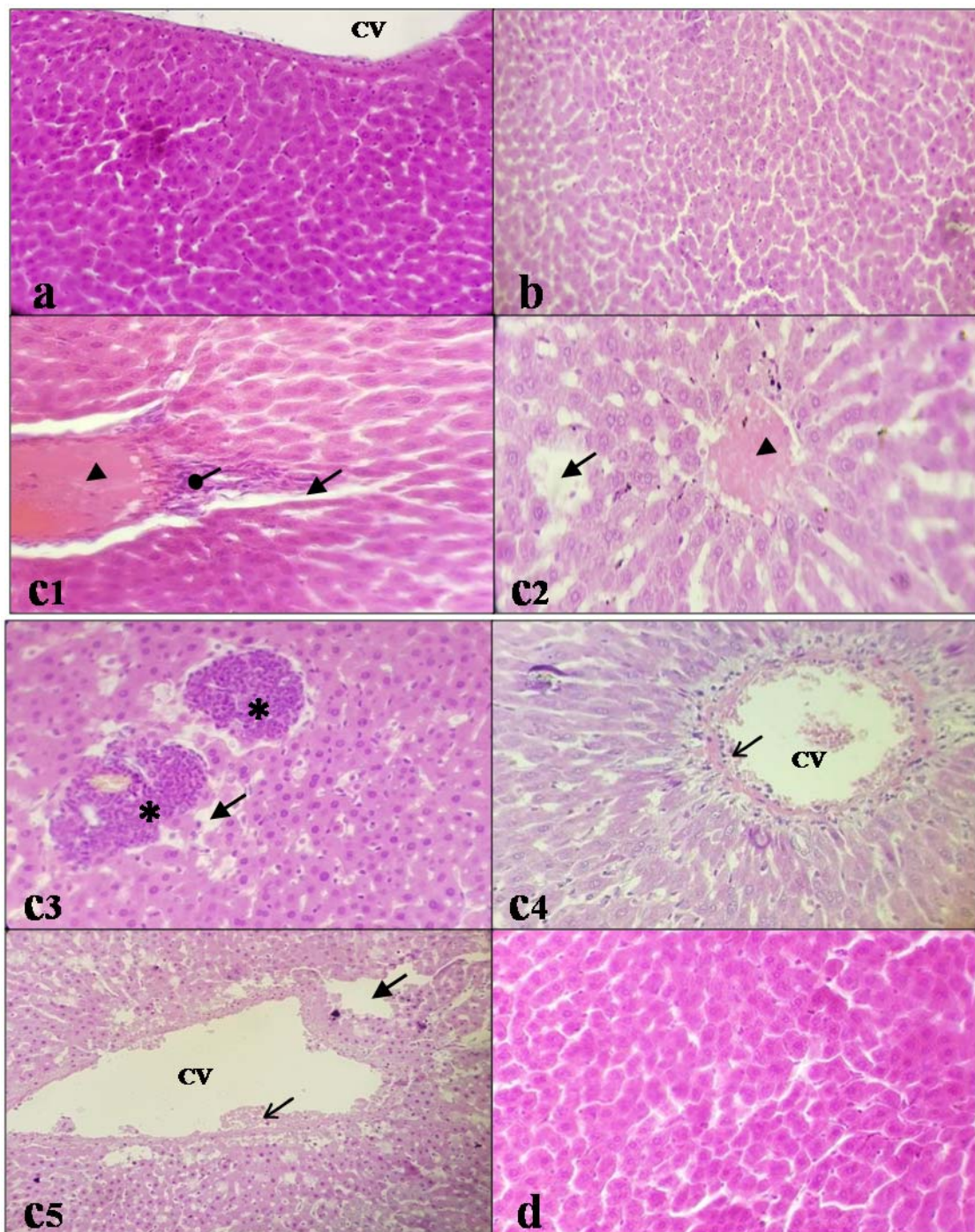


Figure 25. Coupes histologiques du foie chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement. Microscopie optique (x400, x100 H&E).

CV	Veine centrolobulaire		Dilatations du parenchyme
	Vacuolisation des hépatocytes		Hépatocytes congestionnés
	Cellules inflammatoires leucocytaires		Endothélite

5.5.2. Etude histologique des reins

Les microphotographies représentatives de la figure 26 montrent des coupes transversales de tissu rénal de tous les groupes expérimentaux. Dans la figure (26a, 26b), la structure normale est mise en évidence, avec une apparence normale de glomérule chez les rats témoins et les rats nourris au curcuma, respectivement. La section de rats traités au chrome (26c) montre une congestion vasculaire (astérisques), un grand espace de Bowman (têtes de flèches), ainsi qu'une nécrose segmentaire glomérulaire (flèches). En revanche, la supplémentation en curcuma chez le groupe Cr-Cur (26d) montre moins de lésions rénales en présentant une congestion vasculaire (astérisques) avec un glomérule normal.

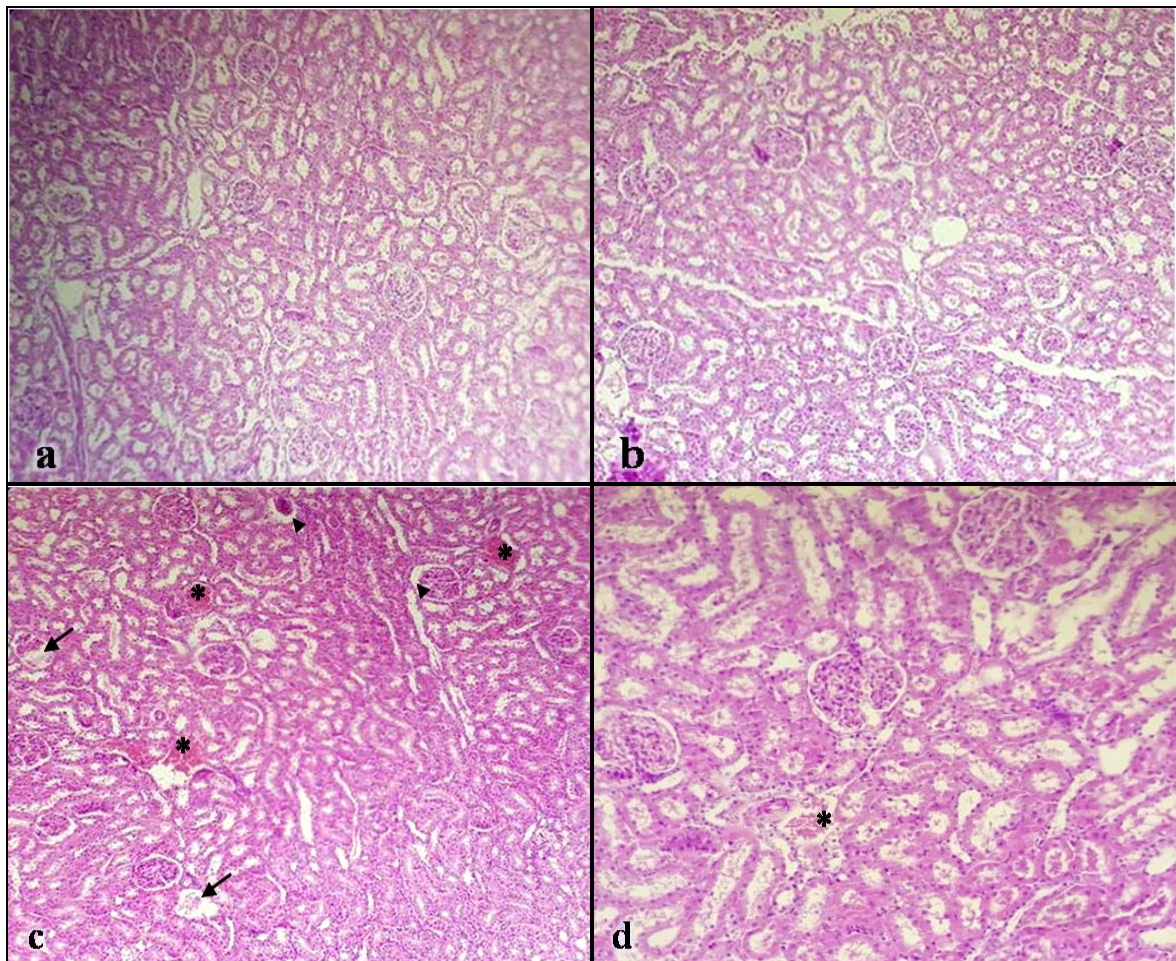


Figure 26. Coupes histologiques des reins chez les rats témoins (0-0) et traités (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) après 30 jours de traitement. Microscopie optique (x400, x100 H&E).

- ← Nécrose segmentaire glomérulaire
- * Congestion vasculaire
- ▲ Espace de Bowman

Chapitre 6

[Discussion]

6. Discussion

Les études sur les produits naturels ayant une valeur thérapeutique potentielle contre la toxicité des métaux lourds sont depuis longtemps un sujet d'intérêt. Les éléments de transition peuvent agir comme catalyseurs de la détérioration oxydative des macromolécules. La production d'espèces réactives de l'oxygène, la formation de la peroxydation lipidique et le stress oxydatif résultant ont été impliqués comme une importante voie de toxicité de ces polluants (Krim *et al.*, 2013; Kehili *et al.*, 2017). Cette étude a pour objectif principal d'évaluer le rôle protecteur potentiel de curcuma contre la toxicité induite par le chrome hexavalent chez le rat *Wistar*.

D'après les résultats de la présente étude, le traitement avec 15 mg/kg de dichromate du potassium pendant 30 jours a entraîné une réduction critique du poids vif des rats accompagnée d'un indice organo-somatique élevé (du foie, des reins, du cœur, de la rate, du cerveau, et des testicules) peut être à cause de l'effet toxique du chrome attribuable à des modifications de la formation osseuse et à des troubles métaboliques (De Lucca *et al.*, 2009).

Une durée de 30 jours d'expérimentation est suffisante pour que l'accumulation intense de ce métal prenne place, résultant de l'hypertrophie des organes internes. Quant à la perte de poids, elle est également due à la perte d'appétit consécutive à la modification des propriétés organoleptiques des aliments provoqués par le chrome (Saka et Aouacheri, 2017). De même, le poids corporel a diminué de manière significative, alors qu'il a eu une augmentation du poids des testicules chez les souris après l'exposition au chrome trivalent et hexavalent (Elbetieha et Al-Hamood, 1997). Une autre étude sur des rats femelles sous le traitement de dichromate de potassium à travers l'eau de boisson provoque une réduction du poids corporel avec une augmentation du poids relative du foie et des reins (Kanojia *et al.*, 1998).

Au cours de la présente expérimentation, la supplémentation en curcuma dans le groupe (Cr-Cur) atténué la toxicité du chrome en maintenant les paramètres précédents à l'état presque normal. La molécule bioactive du curcuma, la curcumine, semblait également empêcher les changements du poids corporel (Hussain, 2002; Banafshe *et al.*, 2014), ceci peut être expliqué par sa propriété stimulante de l'appétit (Bruneton, 1999).

Le système hématologique est l'une des cibles les plus sensibles de l'exposition orale au chrome (VI) (Ray, 2016). Dans la présente étude le taux des globules rouges, de l'hématocrite, de l'hémoglobine, des plaquettes ainsi que la concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire (CCMH), le volume globulaire moyen (VGM), et l'hémoglobine corpusculaire moyenne (TCMH), ont été réduits par l'administration orale de dichromate du

potassium comparativement au groupe témoin. D'un autre côté, les résultats montrent une augmentation du niveau des globules blancs, des neutrophiles, des lymphocytes, et de monocytes par comparaison au groupe témoin. Cela a été confirmé par le résultat d'Adjroud *et al.* (2009).

Semblablement, des études sur les ouvriers dans les tanneries ont révélé des troubles hématologiques. Les travailleurs ont toutefois montré une diminution des plaquettes, du TCMH, et du CCMH (Ahsan *et al.*, 2006). De même, une anémie microcytaire caractérisée par une diminution du VGM, de TCMH, de l'hématocrite et de l'hémoglobine a été observée chez les rats et les souris exposés par voie orale à des composés de chrome (VI) pendant une durée allant de 4 jours à 1 an (Wilbur *et al.*, 2012). Cette perturbation peut être due à l'action du chrome dans la réduction du glutathion des globules rouges, ce qui entraîne une augmentation des radicaux libres susceptible de provoquer des lésions érythrocytaires et d'anémie (Ateeq *et al.*, 2016).

L'érythrocyte a une grande capacité d'absorption du chrome (VI). Ce métal peut pénétrer la membrane des globules rouges (Oehha, 2011) par un canal ionique sulfate; une fois à l'intérieur de la cellule, il est rapidement réduit aux intermédiaires réactifs Cr (V) et Cr (III) puis se lie à la chaîne bêta de l'hémoglobine ainsi qu'à d'autres ligands tels que les protéines et le glutathion. Le complexe chrome-hémoglobine est stable et reste séquestré dans la cellule tout au long de la vie de l'érythrocyte (Ray, 2016). La diminution des valeurs de TCMH, d'hémoglobine et d'hématocrite pourrait être attribuée à la réduction intracellulaire du Cr (IV) en Cr (III) et à la liaison ultérieure du chrome trivalent aux diverses macromolécules et protéines intracellulaires, y compris l'hémoglobine, qui interfère avec l'assimilation du fer dans les globules rouges (Vihol *et al.*, 2012). En outre, une augmentation significative du nombre des globules blancs et des neutrophiles semble être une preuve de l'existence des processus inflammatoires (Yousef *et al.*, 2010).

D'après les résultats obtenus, le traitement au curcuma prévient le déséquilibre hématologique. La curcumine aide à protéger les globules rouges des rats contre les métaux lourds (Abdel-Moneim *et al.*, 2015) cela pourrait être dû à l'effet hémato-protecteur de la curcumine par sa capacité à neutraliser les radicaux libres (Yousef *et al.*, 2010; Kalpravidh *et al.*, 2010). Le curcuma joue un rôle dans l'amélioration de l'absorption du fer au niveau intestinal (Attia *et al.*, 2017) en tant qu'antioxydant membranaire en empêchant la lyse et la peroxydation lipidique des globules rouges, par sa combinaison avec le fer libre (Grinberg *et al.*, 1996). En revanche, Les curcuminoïdes de curcuma préviennent l'inflammation en

bloquant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et en inhibant l'activation des cytokines pro-inflammatoires (Ramadan *et al.*, 2006).

L'exposition au chrome induit une augmentation significative des taux de glucose sérique. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Ghafghazi *et al.* (1979), suggérant que le chrome, en tant que facteur hyperglycémiant, inhibe la libération d'insuline. Cet état indique aussi une perturbation du métabolisme des glucides, peut être imputable à une dégradation accrue du glycogène hépatique (Kumar et Barthwal, 1991). L'hyperglycémie probablement attribuée au stress physiologique causé par la toxicité du chrome hexavalent qui stimule la sécrétion du glucagon et qui éventuellement conduit à une surproduction de glucose (Sridevi et Reddy, 2000).

L'addition du curcuma aux rats traités au chromate, a eu tendance à améliorer la glycémie, ce qui peut être attribué à l'effet anti-hyperglycémique de cette plante. Une action protectrice semblable du curcuma a été révélée par Wickenberg *et al.* (2010), qui ont constaté que cette plante peut avoir un effet sur la sécrétion d'insuline. Mahesh *et al.* (2004) ont rapporté que l'administration orale de la curcumine chez des rats diabétiques a donné lieu à une diminution des niveaux de glucose sanguin en augmentant la sécrétion d'insuline. Cependant, la curcumine est un traitement potentiel du diabète qui améliore la résistance à l'insuline, en interférant dans les cellules β du pancréas et en contribuant à l'hypoglycémie (Zhang *et al.*, 2013). Également, La curcumine réduit, outre le glucose, les niveaux d'hémoglobine glycosylée (Arun et Nalini, 2000), sous l'effet des radicaux libres résultant de l'hyperglycémie (Maithili Karpaga Selvi *et al.*, 2015). À cet égard *in vitro* la curcumine augmente le stockage du glycogène dans le foie et supprime les activités des enzymes gluconéogéniques, réduisant ainsi la glycémie (Fujiwara *et al.*, 2008).

En ce qui concerne le profil lipidique, les résultats de la présente étude ont montrés une augmentation significative de la concentration sérique du cholestérol et des triglycérides chez les rats traités au chrome comparativement aux témoins. Cette hyperlipidémie peut être expliquée par une perturbation intense du métabolisme des animaux (Kumar et Barthwal, 1991).

L'administration orale du dichromate de potassium aux rats femelles pendant 22 semaines a provoqué une augmentation des taux de triglycéride tandis qu'elle n'a eu aucun effet sur le taux du cholestérol (Sedman *et al.*, 2011). Une analyse sur les cellules des fibroblastes des peaux humaines exposées au bichromate de potassium (24 h avec 0,5 μ M de $K_2Cr_2O_7$) a révélé une perturbation de la biosynthèse du cholestérol. En particulier, le traitement par le dichromate de potassium a entraîné une expression très élevée d'un grand

nombre d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol. De manière constante, le traitement par le dichromate de potassium a entraîné une augmentation marquée du taux de cholestérol cellulaire (Guo *et al.*, 2013).

L'administration de curcuma dans le groupe de combinaison (Cr-Cur) a montré une amélioration significative du cholestérol sérique et des triglycérides. Il semble que le curcuma participe à la diminution du profile lipidique (Lee *et al.*, 2014). Peut être il intervient dans la conversion du cholestérol en acides biliaires (Srinivasan *et al.*, 2008). D'autre part le curcuma diminue les dommages oxydatifs des lipides par leur rôle antioxydant (Xu *et al.*, 2009). Selon Charoenwanthanang *et al.* (2011) le curcuma peut diminuer le profile lipidiques des lapins traités avec un régime riche en cholestérol pendant un mois. Une autre expérience chez des rats nourris d'un régime riche en cholestérol pendant 14 jours a entraîné une diminution significative des facteurs d'athérosclérose (Akinyemi *et al.*, 2016). Cependant, la curcumine possède la capacité d'inhiber l'absorption du cholestérol en supprimant l'expression de NPC1L1, principal transporteur du cholestérol dans les entérocytes (Feng *et al.*, 2010).

Les résultats du présent travail ont montrés une élévation significative des activités de la phosphatase alcaline (PAL) et du lactate déshydrogénase (LDH) chez le groupe exposées au Cr (VI). L'augmentation de ces enzymes indique que la lésion hépatique peut-être causée par l'altération de la perméabilité membranaire des l'hépatocytes induite par le chrome, s'explique par la fuite de ces enzymes du tissu vers le plasma. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Al-Heidery *et al.* (2008), et ceux de Susa *et al.* (1997) qui ont indiqués que l'intoxication par le chrome favorise la peroxydation lipidique se qu'il entraîne des lésions membranaires. Ainsi, chez les ouvriers des tanneries exposées au chrome les valeurs de la phosphatase alcaline se trouve plus élevée (Ahsan *et al.*, 2006). Une autre analyse conforme à nos résultats montre qu'en milieu de culture cellulaire les différentes concentrations de dichromate de potassium induisent l'apoptose et augmentent par conséquent la libération de LDH (Das *et al.*, 2015a). En outre, Chorvatovicová *et al.* (1993) ont mis en évidence qu'après l'injection de chromate, le taux de la PAL dans le foie des souris s'élève. En plus, Mazorra *et al.*, (2002) ont signalé que l'activité enzymatique des phosphatases alcalines est considérée comme un biomarqueur de stress induit par les métaux lourds.

Le traitement au curcuma a maintenu l'activité de la PAL et du LDH à l'état presque normal. Le curcuma a un impact potentiel sur la réduction des enzymes libérées par les hépatocytes endommagés et peut également inhiber la sécrétion d'indices de nécrose hépatique tels que le TNF-a et l'IL-1 (Salahshoor *et al.*, 2015). En effet, le curcuma est un inhibiteur de l'activité plasmatique de la PAL (Peschel *et al.*, 2007), et de l'activité de la LDH

chez les rats (Bao *et al.*, 2010). Apparemment, la curcumine inhibe, par son puissant effet antioxydant, la libération de LDH des hépatocytes endommagés en réduisant la peroxydation lipidique, grâce à ses propriétés de piégeage des radicaux libres (Naik *et al.*, 2004). Il a été mentionné que la curcumine administrée à des rats fibrosarcomateux, réduire l'activité de la LDH et de PAL, contrôle la glycolyse et protège la membrane des cellules (Navis *et al.*, 1999). Une autre étude a montré que le post-traitement par la curcumine normalise la libération de LDH dans l'effluent coronaire sur les cœurs des rats perfusés isolés (Duan *et al.*, 2012). La phosphatase alcaline hépatique diminué après traitement avec le curcuma a été soutenu par la correction des résultats histopathologiques (Soni *et al.*, 1992).

Les résultats obtenus ont révélé une élévation significative des activités sériques des transaminases (TGO, TGP) pour le groupe exposé au chrome comparée au groupe témoin, indiquant probablement des lésions hépatiques et cardiaques liée à une altération de la perméabilité membranaire, entraînant une importante fuite d'enzymes dans le plasma (Kumari *et al.*, 2011). Ces résultats sont conformes aux données publiées par Elshazly *et al.* (2016), rapportant que l'exposition au chrome induit l'augmentation des taux sériques des transaminases, ce qui explique la présence des lésions hépatocellulaires et hépatobiliaires, liées à la destruction des cellules. Également le dichromate du potassium provoque chez les rats des lésions dans la membrane des hépatocytes due à la peroxydation lipidique (Geetha *et al.*, 2003). L'interprétation proposée est conforme aux résultats histologiques, qui reflètent une importante altération hépatique (Laborda *et al.*, 1986).

L'addition du curcuma à réduit l'activité des transaminases dans le groupe (Cr-Cur), ce qui recouvrait les dommages au foie et au cœur, par son protection contre la peroxydation lipidique et l'amélioration des systèmes antioxydants (Kim *et al.*, 2014), peut être attribuée à l'effet de groupes phénoliques de la curcumine (HMPC, 2010). Il stabilise les membranes des hépatocytes et répare les altérations en réduisant les fuites d'enzymes par l'élimination des radicaux libres, ce qui améliore également l'architecture histologique (Joshia *et al.*, 2016). Dans l'intention des travaux de Yun *et al.* (2010), la pré-administration de curcumine protège contre la nécrose hépatique. La combinaison de la méthotrexate et de différentes doses de la curcumine a diminué l'hépatotoxicité de moitié par la réduction des taux des transaminases (Banji *et al.*, 2011).

La présente étude a montré une diminution des protéines totales et de l'albumine après l'exposition des rats au chrome (Kim *et al.*, 2004). Les protéines plasmatiques sont des indicateurs des dommages au foie, plus leur niveau est bas, plus l'incidence des lésions

hépatiques est importante (Rahim *et al.*, 2014). En raison des lésions rénales, certaines protéines s'échappent dans l'urine, entraînant leur réduction sérique (Julian *et al.*, 2009).

Une augmentation significative des protéines totales et de l'albumine a été détectée chez des rats dans le groupe de combinaison (Cr-Cur). Le curcuma joue un rôle crucial dans l'augmentation des protéines (Attia *et al.*, 2017), grâce à la curcumine qu'il contient, il augmente le niveau des protéines par ses phytoconstituants bioactifs (Sreepriya et Bali, 2005). Une étude de Salama *et al.* (2013) utilise l'extrait éthanolique de rhizome de curcuma pour améliorer les niveaux des protéines totales et d'albumine. L'extrait de curcuma augmente les taux des protéines totales chez les poulets recevant l'aflatoxine (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2016).

Les données montrent une augmentation significative des taux de bilirubine total et direct pour le groupe exposé au chrome ce qui est similaire aux résultats obtenus par Venter *et al.* (2017) qui ont rapporté que le taux de bilirubine a augmenté légèrement chez les rats mâles exposés par gavage oral au cadmium et au chrome, seuls et en combinaison. Ceci peut s'expliquer par la contribution de l'hémolyse au hyper-bilirubinémie (Pan *et al.*, 1995 ; Kaplan *et al.*, 2002).

La supplémentation en curcuma dans cette étude diminue le taux de bilirubine total et direct. La curcumine a un effet hépatoprotecteur en régulant le taux de la bilirubine chez les rats (Cerný *et al.*, 2011). Parallèlement, l'utilisation de curcuma dans les régimes des lapins a eu tendance à diminuer la concentration de bilirubine (Wientarsih *et al.*, 2002). Sengupta *et al.* (2011) ont montré que l'administration de curcuma à la dose de 60 mg/kg, rétablit le niveau de bilirubine sérique chez des souris intoxiquées par le tetrachlorure de carbone (CCl₄).

Les résultats de cette étude ont révélé que le traitement au chrome augmente l'urée et la créatinine sérique. Ces résultats sont en accord avec une étude dans laquelle des lésions rénales ont été causées chez des rats adultes et leur progéniture suite à l'exposition au Cr (VI) (Soudani *et al.*, 2011b). Le chrome est un agent néphrotoxique, perturbe l'équilibre des fluides et des électrolytes dans le cortex rénal (Berndt, 1976).

Les résultats ont constaté une augmentation des niveaux d'acide urique dans le groupe traité au chrome. L'acide urique comme il est le produit final du catabolisme des purines (Grassi *et al.*, 2013) son augmentation pouvant être expliqués par le catabolisme extrême du génome ou probablement liés à la présence de radicaux libres générés sous l'effet de l'intoxication par le chrome. Aussi, il est également considéré comme un facteur pro-oxydant

par sa pathogénicité (So et Thorens, 2010), d'où une association entre hyperuricémie et lésions rénales a été rapportée par Vargas-Santos et Neogi (2017).

La présente étude a également révélé des modifications histologiques rénales. Selon Shil et Pal (2017), l'hyperuricémie peut altérer l'histologie du tissu rénal. En d'autre terme, l'urate peut également provoquer des lésions rénales entraînant un dysfonctionnement endothélial (Khosla *et al.*, 2005) et des modifications morphologiques glomérulaires (Nakagawa *et al.*, 2003). En outre, la présence de néphrite interstitielle a été évidente en raison de la précipitation d'acide urique et d'urates dans le tissu interstitiel (Kelley et Weiner, 1978).

Il semble que l'administration de curcuma entraîne une diminution significative de l'urémie et de la créatinémie. En outre, il procure un effet néphron-protecteur contre les radicaux libres grâce à l'induction des enzymes antioxydantes (Aggarwal *et al.*, 2007). En effet, la curcumine possède un effet protecteur contre la néphrotoxicité, cette propriété est liée à la prévention du stress oxydatif mitochondrial (Trujillo *et al.* 2013).

Les résultats ont mis en évidence une perturbation induite par le chrome dans le système antioxydant. Une réduction, de la concentration de GSH hépatique (Bagchi *et al.*, 2002; Afolaranmi *et al.*, 2011; krim *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015), rénal (Hegazy *et al.*, 2016), cardiaque (Soudani *et al.*, 2011a), testiculaire (Dey et Roy, 2009), splénique (krim *et al.*, 2013), intestinal (Sengupta *et al.*, 1990), et dans le cerveau (Iztleuov *et al.*, 2018) a été enregistré. Le Cr (VI) administré est rapidement réduit afin de générer des radicaux libres tels que les superoxydes, les espèces azotées comme le peroxyde d'azote, l'oxyde nitrique et les hydroxydes, provoquant un déséquilibre du système oxydatif (Silbergeld *et al.*, 2000). De plus, l'épuisement du GSH peut altérer la défense cellulaire contre l'action toxique des ROS et peut endommager les cellules (Aouacheri *et al.*, 2015). La déplétion significative des niveaux de GSH peut être aussi expliqué par son participation à la réduction métabolique du chrome (Pourahmad *et al.*, 2005). Des études antérieures, réalisées sur des hamsters exposés aux différentes doses de chrome, ont montré que le Cr (VI) ne peut pas pénétrer dans la cellule, il est réduit par le GSH se qu'il génère des ROS (Lu *et al.*, 1995). Par ailleurs, Lou *et al.* (2013) ont démontré que le traitement des cellules lymphoblastoïdes β humaines au dichromate de potassium et / ou au chlorure de nickel pendant 24 h ou 48 h, ils ont également constaté que le GSH favorise l'activation de Cr (IV) par la réduction en Cr (V) puis en ROS favorisant l'induction des dommages à l'ADN. La diminution de GSH peut être aussi interprété par son rôle crucial dans la réplication de l'ADN et les arrestations de polymérase, le GSH facilite la réduction du Cr (VI) et d'autre part devient également réticulé à l'ADN, La co-incubation de

Cr (III) et du Cr (VI), avec l'ADN en présence de GSH a conduit à la réticulation du GSH en ADN formant des complexes ADN-Cr-GS se lie principalement aux groupements phosphates présents dans l'ADN et qui ont une affinité pour l'ADN plus faible que Cr (III) libre (O'Brien *et al.*, 2001). En outre, il a été évoqué que la L-cystéine peut être oxydée en L-cystine pendant le métabolisme du Cr (VI), ce qui peut limiter la synthèse du GSH contribuant à la déplétion du GSH (Gunaratnam *et al.*, 2002). D'après Mattagajasingh *et al.*, (1995) la déplétion de GSH pourrait être justifiée par une réduction significative des activités des deux enzymes clés responsables de la conservation du glutathion à l'état réduit, à savoir la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la glutathion réductase (GSH-R). Le glutathion il réagisse directement avec les radicaux libres ou il fourni un substrat pour les enzymes apparentées au GSH (Meister, 1995), ce qui provoque peut être leur diminution tant que cofacteur de la GSH-ST et de la GSH-Px.

Le traitement au curcuma a considérablement amélioré les taux de GSH dans les organes. En fait, le curcuma augmente la disponibilité de GSH. Cette amélioration de la teneur de GSH en présence du curcuma est en accord avec les résultats obtenus par García-Niño et Pedraza-Chaverri (2014) et par Nabavi *et al.*, (2012). Il a été rapporté que le traitement avec le curcuma ou de la curcumine corrige les niveaux de GSH (Arun et Nalini, 2002). Cette augmentation en GSH peut être attribuée à l'effet de la curcumine dans la synthèse *de novo* glutathion (Reyes-Gordillo *et al.*, 2007), il améliore l'activité de la γ -glutamyl-cystéinyl synthétase (γ -GCS) et d'autres enzymes détoxifiantes liées au synthèse de GSH (Singhal *et al.*, 1999). Une étude réalisée sur les rats après l'administration des dérivés de curcumine les résultats ont montré une protection contre les dommages oxydatifs causés pendant l'épuisement du GSH, en tant que supplément il améliore à la fois les niveaux de GSH cellulaire et la capacité de piégeage des ROS (Harish *et al.* 2010), ce qui en fait un neutralisateur des ROS (Yousef *et al.*, 2010). Il pourrait être suggéré que la curcumine protège contre le stress oxydatif et les dommages mitochondriaux induits par la déplétion du GSH qu'il exige par son activité antioxydante un rôle dans la synthèse de GSH via une transcription accrue du gène γ -GCS (Jagatha *et al.*, 2008). Il a été signalé que l'administration orale de la curcumine a montré une augmentation des niveaux de GSH et des activités des enzymes antioxydantes (El-Agamy, 2010).

Les résultats obtenus montrent une réduction significative de l'activité des enzymes antioxydant. Une diminution de GSH-Px, GSH-ST et la CAT hépatique et rénal a été enregistré suite à l'exposition au chrome. Elles sont les premières à indiquer l'état d'oxydo-réduction cellulaire (Yang et Lee, 2015). Il serait possible que le chrome hexavalent génère

des quantités élevées de l'ion superoxyde ce qu'il inhibe l'activité enzymatique (Kalayarasan *et al.*, 2008). La diminution de CAT s'explique par l'existence d'une cytotoxicité induit par le chrome (VI) (Susa *et al.*, 1996). Cependant, une étude sur des rats suggère que l'activité enzymatique de la CAT a été inhibée par le traitement au Cr (VI) (Boşgelmez et Güvendik, 2004). L'accumulation intracellulaire de H₂O₂ ainsi que celle des anions superoxydes entraînent la diminution des activités de la CAT et de la GSH-Px. De même, les faibles niveaux de GSH provoquent un déclin de l'activité de la GSH-ST (Sahu *et al.*, 2014).

La diminution de l'activité de la GSH-Px et de CAT est dû à l'accumulation intracellulaire de ROS avec le développement d'une lésion tissulaire. La surproduction de H₂O₂ lors de l'exposition au chrome entraînant une altération du système antioxydant (Dolai *et al.*, 2016), et l'inhibition des enzymes antioxydantes (Soudani *et al.*, 2013).

L'activité des enzymes antioxydantes a été rétablie à la normale de manière significative après le traitement avec le curcuma. Cette amélioration est due à l'effet de la curcumine, il augmente le contenu en GSH, des activités de la GSH-Px et de la GSH-ST (García-Niño *et al.*, 2015). Une étude a suggéré que le traitement à la curcumine à des doses de 10 et 20 mg/kg rétablit l'activité des enzymes antioxydantes et normalise la peroxydation des lipides et le taux de GSH chez les rats (Nabavi *et al.*, 2012). Il diminue la peroxydation lipidique et piège les radicaux libres par sa capacité de chélation pour les ions métalliques, améliore l'état antioxydant et empêche les dommages tissulaires (Rukkumani *et al.*, 2004). De même, il désactive la formation de radicaux libres d'oxygène en inhibant l'anion superoxyde et en empêchant la formation des radicaux hydroxyles soit par l'élimination du radical formé ou par l'inhibition de l'oxydation de Fe²⁺ par le H₂O₂ (Reddy et Lokesh, 1994). Ainsi, la curcumine renforce les activités des enzymes antioxydantes (Agarwal *et al.*, 2010; Trujillo *et al.*, 2013).

Conclusion & perspectives

Notre projet de recherche vise à évaluer d'une part le potentiel toxique d'un métal lourd, le chromate, et d'autre part à montrer les effets bénéfiques du curcuma (*Curcuma longa*).

Pour mener à terme notre projet d'étude des paramètres hématologiques, biochimiques, histologique, et certains marqueurs de stress oxydant ont été mesurés chez des rats témoins et traités par le chromate et/ou curcuma durant une période de 30 jours. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants:

- ✓ L'étude physiologique montre que la croissance des rats a été influencée par le traitement de 15 mg/kg de dichromate du potassium. Une diminution de poids corporel accompagnée d'une augmentation des indices organo-somatiques. L'addition de curcuma dans le régime alimentaire des rats a amélioré ces changements.
- ✓ Le traitement par le chromate a induit une hématotoxicité: Une diminution du niveau d'hématocrite, des globules rouges, d'hémoglobine, de concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire, de volume globulaire moyen et l'hémoglobine corpusculaire moyenne. Le chrome provoque une augmentation de niveau des globules blancs, des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes, et des plaquettes. Néanmoins, l'ajout du curcuma dans la diète des rats a rétabli ces changements hématologiques à l'état presque normal.
- ✓ Sur le plan biochimique, la toxicité du chromate s'est manifestée par un déséquilibre métabolique essentiellement marqué par une hyperglycémie, hyperlipidémie, et une perturbation des paramètres hépatique et rénal. Cependant, La supplémentation du curcuma a restauré ces paramètres biologiques à leurs valeurs normales.
- ✓ Le statut antioxydant a été affecté, suggérant ainsi un stress oxydant généré par le chromate. Une diminution de l'activité enzymatique de la CAT, la GSH-Px et le GSH-ST avec une réduction du taux de glutathion. Ces paramètres ont été équilibrés par la supplémentation du curcuma dans l'alimentation des rats.
- ✓ Une altération structurale du tissu hépatique et rénale a été observée après le traitement des rats par le chromate. Le curcuma en association avec le chromate a protégé la structure tissulaire des organes, ce qui peut certifier l'effet cytoprotecteur du curcuma.

Pour conclure, la supplémentation en curcuma permet de limiter les perturbations provoquées par le chromate. Cette plante médicinale semble avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydants, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit à contracter l'état du stress oxydant. Il est donc considéré comme une thérapie idéale pour faire face aux diverses maladies métaboliques sur les différents systèmes physiologiques. Le développement des nouveaux médicaments à base d'antioxydants naturels doit être à l'ordre de jour.

Comme, perspective, il serait intéressant de compléter notre étude par:

- Détermination du dosage des autres paramètres du statut antioxydant tels que le monoxyde d'azote, la SOD, la GSH-R, le rapport GSH/GSSG, le métallothionéine et certaines vitamines.
- Extraction des substances bioactives responsables des propriétés antioxydantes (curcumine).
- Etude d'autres plantes médicinales plantées en Algérie et comparer leurs propriétés phytothérapeutiques avec celle de curcuma.
- Evaluation de la concentration du chromate dans le sang, les urines et quelques organes cibles.
- Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires des effets protecteurs de curcuma contre la cytotoxicité induite par le chromate.
- Exploration de l'effet protecteur des antioxydants naturels contre la toxicité induite par le chromate chez le rat ou d'autres modèles expérimentaux.
- Détermination de l'effet neurotoxique de chromate par le dosage des concentrations en acétylcholine dans le cerveau.
- Exploration des micro-éléments contenant dans la composition des polluants comme le potassium.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abdel-Moneim A.M, El-Toweissy M.Y, Ali A.M, Awad Allah A.M, Darwish H.S, et al. (2015). Curcumin ameliorates lead (Pb²⁺)-induced hemato-biochemical alterations and renal oxidative damage in a rat model. *Biol Trace Elem Res.* 168(1): 206-20.
- Adjroud O. (2009). Effects of potassium dichromate on haematological parameters in female and male *Wistar* albino rats. *Ass Univ Bull Environ Res.*12: 87-99.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-6.
- Afolaranmi G.A, Henderson C, Grant M.H. (2011). Effect of chromium and cobalt ions on phase I and phase II enzymatic activities in vitro in freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 25(1): 125-30.
- Agarwal R, Goel S.K, Behari J.R. (2010). Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J App Toxicol.* 30(5): 457-68.
- Aggarwal B.B, Kumar A, Aggarwal M.S, Shishodia S. (2005). Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention* (edited by H. Press). Boca Raton: CRC Press. 349-87.
- Aggarwal B.B, Kumar A, Bharti A.C. (2003). Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res,* 23: 363-98.
- Aggarwal B.B, Surh Y.J, Shishodia S. (2007). The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology.* Springer, New York. 595.
- Aggarwal B.B, Yuan W, Li S, Gupta S.C. (2013). Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res.* 57(9): 1529-42.
- Ahsan M.M, Shakoori F.R, Shakoori A.R. (2006). Biochemical and haematological abnormalities in factory workers exposed to hexavalent chromium in tanneries of Kasur district. *Pakistan J Zool.* 38: 239-53.
- Akinyemi A.J, Oboh G, Ademiluyi A.O, Boligon A.A, Athayde M.L. (2016). Effect of two ginger varieties on arginase activity in hypercholesterolemic rats. *J Acupunct Meridian Stud.* 9(2): 80-7.
- Al-Heidery H.H.A, Mashkur S.H, Al-Heidery Z.H.A. (2008). Protective effects of vitamin C on albino rats exposed to hexavalent chromium (Cr VI). *Kufa Med J.* 11(1): 84-8.

-
- Alizadeh A.M, Khaniki M, Azizian S, Mohaghheghi M.A, Sadeghizadeh M, et al. (2012). Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier-curcumin. *Eur J Pharmacol.* 689(1-3): 226-32.
- Ammon H.P.T, Wahl M.A, (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57: 1-7.
- Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I. (2015). The investigation of the oxidative stress related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes.* 39(1): 44-9.
- Araujo M.C.P, Dias F.D.L, Kronka S.N, Takahashi C.S. (1999). Effects of turmeric and its active principle, curcumin, on bleomycin-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. *Genet. Mol. Biol.* 22(3): 407-13.
- Arun N, Nalini N. (2002). Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 57(1): 41-52.
- Ateeq M, Rehman H, kiani B.H, Zareen S, Maqbool T, et al. (2017). Toxic effect of hexavalent chromium on the workers employed in chrome plating. *J Entomol Zool Stud.* 5(1).
- Ateeq M, Rehman H. Ur, Zareen S, Ullah Khan F, Rehman A, et al. (2016). Effect of hexavalent chromium on hematological parameters in chrome plating workers. *J Entomol Zool Stud.* 4(6): 247-8.
- Attia Y.A, Al-Harhi M.A, Hassan S.S. (2017). Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) as a phytogetic growth promoter alternative for antibiotic and comparable to mannan oligosaccharides for broiler chicks. *Rev Mex Cienc Pecu.* 8(1): 11-21.

B

- Bagchi D, Stohs S.J, Downs B.W, Bagchi M, Preuss H.G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicol.* 180(1): 5-22.
- Banafshe H.R, Hamidi G.A, Nouredini M, Mirhashemi S.M, Mokhtari R, et al. (2014). Effect of curcumin on diabetic peripheral neuropathic pain: Possible involvement of opioid system. *Eur J Pharmacol.* 723: 202-6.
- Banji D, Pinnapureddy J, Banji O.J, Saidulu A, Hayath M.S. (2011). Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. *Eur J Pharmacol.* 668 (1-2): 293-8.

-
- Bao W, Li K, Rong S, Yao P, Hao L, et al. (2010). Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol.* 128: 549-53.
- Berndt W.O. (1976). Renal chromium accumulation and its relationship to chromium induced nephrotoxicity. *J Toxicol Environ Health.* 1(3): 449-59.
- Berté S, Kouamélan E.P, Ouattara N.I, Koné T, Goore B.G, et al. (2008). Cycle de reproduction et fécondité de *Distichodus rostratus* dans un bassin ouest-africain (fleuve Bandama, Côte-d'Ivoire). *Tropicultura.* 26: 104-7.
- Blade L.M, Yencken M.S, Wallace M.E, Catalano J.D, Khan A, et al. (2007). Hexavalent chromium exposures and exposure-control technologies in american enterprise: results of a NIOSH field research study. *J Occupational Environ Hygiene.* 4: 596-618.
- Boşgelmez I.I, Güvendik G. (2004). Effects of taurine on oxidative stress parameters and chromium levels altered by acute hexavalent chromium exposure in mice kidney tissue. *Biol Trace Elem Res.* 102(1-3): 209-25.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Bruneton J. (1999). *Pharmacognosy, Phytochemistry, medicinal plants.* 2nd edition. Lavoisier. 915.
- C**
- Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori M.V, et al. (2006). The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect.* 114(4): 542-6.
- Carocho M, Ferreira I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51: 15-25.
- Cerný D, Lekić N, Váňová K, Muchová L, Hořínek A, et al. (2011). Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/-galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system. *Fitoterapia.* 82(5): 786-91.
- Chainani-Wu N. (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med.* 9(1): 161-8.

-
- Charoenwanthanang P, Lawanprasert S, Phivthong-ngam L, Piyachaturawat P, Sanvarinda Y, et al. (2011). Effects of *Curcuma comosa* on the expression of atherosclerosis-related cytokine genes in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Ethnopharmacol.* 134: 608-13.
- Chaturvedi T.P, (2009). Uses of turmeric in dentistry: An update. *Indian J Dent Res.* 20(1): 107-9.
- Chauhan U.K, Soni P, Shrivastava R, Mathur K.C, Khadikar P.V. (2003). Antimicrobial activities of the rhizome of *Curcuma longa* Linn. *Oxidation Commun,* 26(2): 266-70.
- Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandigama K, Ambudkar S.V, Limtrakul P. (2004). Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II and III purified from turmeric powder. *Biochem Pharmacol.* 68 (10): 2043-52.
- Chih-Hong P, Tung-Sheng S, Chiou-Jong C, Jin-Huei H, Yeou-Lih H, et al. (2009). Effects of exposure to hexavalent chromium on male electroplating workers. *Epidemiology.* 20(6): 202.
- Chorvatovicová D, Kováčiková Z, Sandula J, Navarová J. (1993). Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent chromium. *Mutat Res.* 302(4): 207-11.
- Coetzee J.J, Bansal N, Chirwa E.M. (2018). Chromium in environment, its toxic effect from chromite-mining and ferrochrome industries, and its possible bioremediation. *Exposure and Health* 2018: 1-12.
- Costa M, Klein C.B. (2006). Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Crit Rev Toxicol.* 36(2): 155-63.
- Costa M. (1997). Toxicity and carcinogenicity of Cr [VI] in animal models and humans. *Crit Rev Toxicol.* 27(5): 431-42.

D

- Das J, Kang M.H, Kim E, Kwon D.N, Choi Y.J, et al. (2015a). Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Sci Rep.* 5: 13921.
- Das M.K, Kumar R. (2015). Development of curcumin nanoniosomes for skin cancer chemoprevention. *Int J ChemTech Res.* 7(2).
- Dayan A.D, Paine A.J. (2001). Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol.* 20(9): 439-51.

-
- De Flora S, Camoirano A, Micale R.T, La Maestra S, Savarino V, et al. (2016). Reduction of hexavalent chromium by fasted and fed human gastric fluid. I. Chemical reduction and mitigation of mutagenicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 306: 113-9.
- De Lucca R.C, Dutrey P.L, Villarino M.E, Ubios A.M. (2009). Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile *Wistar* rats. *Exp Toxicol Pathol.* 61: 347-52.
- Denisov E.T, Afanas'ev I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. CRC Press. Boca Raton.
- Dey S.K, Roy S. (2009). Effect of chromium on certain aspects of cellular toxicity. *Iran J Toxicol.* 2: 4.
- Dolai D.P, Dey S.K, Dash S.K, Roy S. (2016). Study the chromium-induced oxidative stress on mitochondria from liver and lungs. *Am J App Sci Res.* 2(6): 59-64.
- Duan W, Yang Y, Yan J, Yu S, Liu J, et al. (2012). The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/ STAT3 signaling pathway. *Basic Res Cardiol.* 107(3): 263.

E

- Edwards R.L, Luis P.B, Varuzza P.V, Joseph A.I, Presley S.H, et al. (2017). The anti-inflammatory activity of curcumin is mediated by its oxidative metabolites. *J Biol Chem.* 292(52): 21243-52.
- El-Agamy D.S. (2010). Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol.* 84: 389-96.
- Elbetieha A, Al-Hamood M.H. (1997). Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility. *Toxicol.* 116:39-47.
- Elshazly M.O, Morgan A.M, Ali M.E, Abdel-mawla E, Abd El-Rahman S.S. (2016). The mitigative effect of *Raphanus sativus* oil on chromium-induced geno- and hepatotoxicity in male rats. *J Adv Res.* 7: 413-21.
- Emiroglu G, Coskun Z.O, Kalkan Y, Erdivanli O.C, Tumkaya L, et al. (2017). The effects of curcumin on wound healing in a rat model of nasal mucosal trauma. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017: 9452392.
- EPA: U.S. Environmental Protection Agency. (2010). Toxicological review of hexavalent chromium (CAS No. 18540-29-9). Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS) Washington DC: U.S.

Esenbeck C.N. (1828). Botanique. Épices, Curcuma (*Curcuma longa*), Plantae Medicinales Sammlung und Pflanzen offizineller. Düsseldorf.

Evans P, Halliwell B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br J Nutr. 85 Suppl 2: S67-74.

Eybl V, Kotyzová D, Bludovská M. (2004). The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. Toxicol. Lett. 151: 79-85.

F

Feng D, Ohlsson L, Duan R.D. (2010). Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. Lipids Health Dis. 9(40): 1-5.

Fisher R.A, Yates R. (1974). Statistical tables for biological, agricultural and medical research (London: Longman Group).

Flohé L, Günzler W.A. (1984). Assays of glutathione-peroxidase. Methods Enzymol. 105: 114-21.

Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X, Fujimoto S, Fukuda K, et al. (2008). Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. Diabetes Res Clin Pract. 80(2): 185-91.

G

Gagné F. (2014). Oxidative Stress. In: Biochemical Ecotoxicology: Principles and methods. Elsevier. 2014: 103-15.

Ganesan K, Xu B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. Nutrients. 9(5). PII: E455.

García-Niño W.R, Pedraza-Chaverrí J. (2014). Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. Food Chem Toxicol. 69: 182-201.

García-Niño W.R, Zatarain-Barrón Z.L, Hernández-Pando R, Vega-García C.C, Tapia E, et al. (2015). Oxidative stress markers and histological analysis in diverse organs from rats treated with a hepatotoxic dose of chromium (VI): Effect of curcumin. Biol Trace Elem Res. 167(1): 130-45.

Geetha S, Sai Ram M, Mongia S.S, Singh V, Ilavazhagan G, et al. (2003). Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. J Ethnopharmacol. 87: 247-51.

Ghafghazi T, Maghbareh A, Barnett R. (1979). Chromium-induced hyperglycemia in the rat. Toxicol 12: 47-52.

-
- Gholami-Ahangaran M, Rangsz N, Azizi S. (2016). Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) effect on biochemical and pathological parameters of liver and kidney in chicken aflatoxicosis. *Pharm Biol.* 54(5): 780-7.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 46(5-6): 241-81.
- Grassi D, Ferri L, Desideri G, Di Giosia P, Cheli P, et al. (2013). Hyperuricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk. *Curr Pharm Des.* 19(13): 2432-38.
- Grinberg L.N, Shalev O, Tønnesen H.H, Rachmilewitz E.A. (1996). Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. *Int J pharm.* 132: 251-7.
- Gunaratnam M, Pohlscheidt M, Grant M.H. (2002). Pretreatment of rats with the inducing agents phenobarbitone and 3-methylcholantrene ameliorates the toxicity of chromium (VI) in hepatocytes. *Toxicol in Vitro.* 16: 509-16.
- Guo L, Xiao Y, Wang Y. (2013). Hexavalent chromium-induced alteration of proteomic landscape in human skin fibroblast cells. *J Proteome Res.* 12(7): 3511-8.

H

- Habig W.H, Pabst M.J, Jakoby W.B. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249: 7130-9.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege.* 62(10): 628-38.
- Harish G, Venkateshappa C, Mythri R.B, Dubey S.K, Mishra K, et al. (2010). Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem.* 18(7): 2631-8.
- Haryuna T.S, Munir D, Maria A, Bashiruddin J. (2017). The antioxidant effect of curcumin on cochlear fibroblasts in rat models of diabetes mellitus. *Iran J Otorhinolaryngol.* 29(93): 197-202.
- Hegazy R, Salama A, Mansour D, Hassan A. (2016). Renoprotective effect of lactoferrin against chromium-induced acute kidney injury in rats: Involvement of IL-18 and IGF-1 Inhibition. *PLoS One.* 11(3): e0151486.
- Heng M.C, Song M.K, Harker J, Heng M.K. (2000). Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by

-
- clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br J Dermatol.* 143(5): 937-49.
- HMPC: Committee on herbal medicinal products. (2010). Assessment report on *Curcuma longa* L. rhizoma. Evaluation of medicines for human use, Eur Med Agency, London.
- Hoppe J. (2001). Curcuma: Turmeric. *Medical Herbalism.* 11(4):1,3-5.
- Houlot R. (1984). *Techniques d'histologie et de cytologie.* Paris: Edition Maloine.
- Hussain H.E.A. (2002). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from *Curcuma longa* Linn, and partially purified product from *Abroma augusta* Linn in streptozotocin induced diabetes. *Indian J Clin Biochem.* 17(2): 33-43.
- Hussain J, Husain I, Arif M, Gupta N. (2017). Studies on heavy metal contamination in Godavari river basin. *Appl Water Sci.* 7(8): 4539-48.
- Hussein S.A Ali, Azab M.El-Said, El-Shall S.K. (2014). Protective effect of curcumin on antioxidant defense system and oxidative stress in liver tissue of iron overloading rats. *Asian J Clin Nutr.* 6 (1): 1-17.

I

- IARC: International Agency for Research on Cancer. (1990). Chromium. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 49: 49-256.
- Iztleuov Y, Abilov T, Zhanabayeva G, Ismailova I, Iztleuov M. (2018). Protective effect of sodium tetraborate on chromium-induced brain damage in rats. *Biomed Pharmacol J.* 11(1): 227-36.

J

- Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. (2007). Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- γ activation. *PPAR Res.* 2007: 89369.
- Jagatha B, Mythri R.B, Vali S, Bharath M.M. (2008). Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion in vitro and in vivo: Therapeutic implications for Parkinson's disease explained via in silico studies. *Free Radic Biol Med.* 44(5):907-17.
- Jagetia G.C, Rajanikant G.K. (2004). Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation. *J Surg Res.* 120(1): 127-38.
- Joshia D, Mittal D.K, Shukla S, Srivastav S.K, Dixit V.A. (2016). *Curcuma longa* Linn extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-

induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. *Exp Toxicol Pathol* 69(6): 373-82.

Julian B.A, Suzuki H, Suzuki Y, Tomino Y, Spasovski G, et al. (2009). Sources of urinary proteins and their analysis by urinary proteomics for the detection of biomarkers of disease. *Proteomics Clin App.* 3: 1029-43.

K

Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G. (2008). Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of *Wistar* rats. *J Appl Toxicol.* 28(7): 908-19.

Kalpravidh R.W, Siritanaratkul N, Insain P, Charoensakdi R, Panichkul N, et al. (2010). Improvement in oxidative stress and antioxidant parameters in beta-thalassemia/Hb E patients treated with curcuminoids. *Clin Biochem.* 43(4-5): 424-9.

Kanojia R.K, Junaid M, Murthy R.C. (1998). Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. *Toxicol Lett.* 95(3): 165-72.

Kaplan M, Hammerman C, Rubaltelli F.F, Vilei M.T, Levy-Lahad E, et al. (2002). Hemolysis and bilirubin conjugation in association with UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism. *Hepatology.* 35(4): 905-11.

Kattappagari K.K, Ravi Teja C.S, Kommalapati R.K, Poosarla C, Gontu S.R, et al. (2015). Role of antioxidants in facilitating the body functions: A review. *J Orofac Sci.* 7(2): 71-5.

Kehili N, Saka S, Aouacheri O. (2017). L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie.* 1: 1-10.

Kelley W.N, Weiner I.M. (1978). Handbook of experimental pharmacology: continuation of handbuch der experimentellen pharmakologie. 51: New York. Berlin Heidelberg.

Khalil S, Awad A, Elewa Y. (2013). Antidotal impact of extra virgin olive oil against genotoxicity, cytotoxicity and immunotoxicity induced by hexavalent chromium in rat. *Int J Veterinary Sci Med.* 1(2): 65-73.

Khosla U.M, Zharikov S, Finch J.L, Nakagawa T, Roncal C, et al. (2005). Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 67(5): 1739-42.

Kim H.Y, Lee S.B, Jang B.S. (2004). Subchronic inhalation toxicity of soluble hexavalent chromium trioxide in rats. *Arch Toxicol.* 78: 363-8.

-
- Kim J, Seo S, Kim Y, Kim D.H. (2018). Review of carcinogenicity of hexavalent chrome and proposal of revising approval standards for an occupational cancer in Korea. *Ann Occup Environ Med.* 30: 7.
- Kim S.H, Hong K.O, Hwang J.K, Park K.K. (2005). Xanthorrhizol has a potential to attenuate the high dose cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 43(1): 117-22.
- Kim Y, Cha S.J, Choi H.J, Kim K. (2017). Omega class glutathione S-Transferase: antioxidant enzyme in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017: 5049532.
- Kim Y, You Y, Yoon H.G, Lee Y.H, Kim K, et al. (2014). Hepatoprotective effects of fermented *Curcuma longa L* on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chem.* 151: 148-53.
- Koekkoek W.A, van Zanten A.R. (2016). Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. *Nutr Clin Pract.* 31(4): 457-74.
- Krim M, Messaadia A, Maida I, Aouacheri O, Saka S. (2013). Protective effect of ginger against toxicity induced by chromate in rats. *Ann Biol Clin.* 71(2): 165-73.
- Krishnamurthy P, Wadhvani A. (2012). Antioxidant enzymes and human health. In El-Missiry, M. A. (Ed), *Antioxidant Enzyme*: 3-18.
- Kumar A, Barthwal R. (1991). Hexavalent chromium effects on hematological indices in rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 46: 761-8.
- Kumar A, Purwar B, Shrivastava A, Pandey S. (2010). Effects of curcumin on the intestinal motility of albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 54(3): 284-8.
- Kumari K, Ranjan N, Sinha R.C. (2011). Multiple biomarker response in the fish *Labeo rohita* due to hexavalent chromium. 2nd International Conference on Biotechnol and Food Sci IPCBEE. 7: IACSIT Press, Singapore.

L

- Laborda R, Díaz-Mayans J, Núñez A. (1986). Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 36: 332-6.
- Lee C.H, Kim A.Y, Pyun C.W, Fukushima M, Han K.H. (2014). Turmeric (*Curcuma longa*) whole powder reduces accumulation of visceral fat mass and increases hepatic oxidative stress in rats fed a high-fat diet. *Food Sci Biotechnol.* 23(1): 261-7.
- Levina A, Codd R, Dillon C.T, Lay P.A. (2006). Chromium in biology: Toxicology and nutritional aspects. *Prog Inorg Chem.* 51: 250.

-
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, et al. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 13: 757-72.
- Lim T.K. (2016). *Edible medicinal and non-medicinal plants* (London: Roots, Bulbs).
- Liu Z, Huang P, Law S, Tian H, Leung W, et al. (2018). Preventive effect of curcumin against chemotherapy-induced side-effects. *Front Pharmacol*. 9: 1374.
- Lobo V, Patil. A, Phatak A, Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4(8): 118-26.
- Lou J, Jin L, Wu N, Tan Y, Song Y, et al. (2013). DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. *Food Chem Toxicol*. 55: 533-40.
- Lu Y.Y, Yang J.L. (1995). Long-term exposure to chromium (VI) oxide leads to defects in sulfate transport system in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biochem*. 57(4):655-65.
- Luthra P.M, Singh R, Chandra R. (2001). Therapeutic uses of *Curcuma longa* (turmeric). *Indian J Clin Biochem*. 16(2): 153-60.

M

- Ma F, Zhang Z, Jiang J, Hu J. (2015). Chromium (VI) potentiates the DNA adducts (O (6)-methylguanine) formation of N-nitrosodimethylamine in rat: implication on carcinogenic risk. *Chemosphere*. 139: 256-9.
- Mahesh T, Sri Balasubashini M.M, Menon V.P. (2004). Photo-irradiated curcumin supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats: effect on lipid peroxidation. *Therapie*. 59(6): 639-44.
- Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar M.G, Swaminathan R.P, Sripradha R. (2015). Efficacy of turmeric as adjuvant therapy in type 2 diabetic patients. *Indian J Clin Biochem*. 30(2): 180-6.
- Marouani N, Tebourbi O, Mahjoub S, Yacoubi M.T, Sakly M, et al. (2012). Effects of hexavalent chromium on reproductive functions of male adult rats. *Reprod Biol*. 12(2): 119-33.
- Mattagajasingh S.N, Misra H.P. (1995). Alterations in the prooxidant and antioxidant status of human leukemic T-lymphocyte MOLT4 cells treated with potassium chromate. *Mol Cell Biochem*. 142: 61-70.
- Mazorra M.T, Rubio J.A, Blasco J. (2002). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 131(2): 241-9.

-
- Meister A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251: 3-7.
- Mishra S, Bharagava R.N. (2016). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 34(1): 1-32.
- Momeni H.R, Eskandari N. (2017). Effect of curcumin on kidney histopathological changes, lipid peroxidation and total antioxidant capacity of serum in sodium arsenite-treated mice. *Exp Toxicol Pathol* 69(2): 93-7.
- Motaleb M.A, Hossain M.K, Alam M.K, Mamun M.M. Sultana M. (2013). Commonly used medicinal herbs and shrubs by traditional herbal practitioners: Glimpses from Thanchi upazila of Bandarban. IUCN (International Union for Conservation of Nature), Dhaka, Bangladesh, pp I-XII. 1-294.

N

- Nabavi S.F, Moghaddam A.H, Eslami S, Nabavi S.M. (2012). Protective effects of curcumin against sodium fluoride-induced toxicity in rat kidneys. *Biol Trace Elem Res.* 145: 369-74.
- Naik R.S, Mujumdar A.M, Ghaskadbi S. (2004). Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *J Ethnopharmacol.* 95: 31-7.
- Naik S.R, Thakare V.N, Patil S.R. (2011). Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol.* 63(5): 419-31.
- Nakagawa T, Mazzali M, Kang D.H, Kanellis J, Watanabe S, et al. (2003). Hyperuricemia causes glomerular-hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol.* 23(1): 2-7.
- Navis I, Sriganth P, Premalathau B. (1999). Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumour marker indices in experimental fibrosarcoma. *Pharmacol Res.* 39(3): 175-9.
- Nimse S.B. Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5: 27986-28006.
- Nwokocha C.R, Owu D.U, Nwokocha M.I, Ufearo C.S, Iwuala M.O. (2012). Comparative study on the hepatoprotection to heavy metals of *Zingiber officinale*. *Pharmacognosy Res.* 4(4): 208-13.

O

- O'Brien T, Xu J, Patierno S.R. (2001). Effects of glutathione on chromium-induced DNA crosslinking and DNA polymerase arrest. *Mol Cell Biochem.* 222: 173-82.

Oehha (Office of Environmental Health Hazard Assessment). Public health goal for hexavalent chromium (Cr VI) in drinking water. (2011). Pesticide and environmental toxicology branch, california environmental protection agency.

P

Pan C.G, Leichter H.E, Werlin S.L. (1995). Hepatocellular injury in Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol.* 9(6): 690-3.

Paulucci V.P, Couto R.O, Teixeira C.C, Freitas L.A. (2013). Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Brazilian J Pharmacognosy.* 23(1): 94-100.

Perron N.R, Brumaghim J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. 53(2): 75-100.

Peschel D, Koerting R, Nass N. (2007). Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem.* 18: 113-9.

Pham-Huy L.A, He H, Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 4(2): 89-96.

Phaniendra A, Jestadi D.B, Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 30(1): 11-26.

Pisoschi A.M, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 97: 55-74.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, et al. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017: 13.

Pourahmad J, Rabiei M, Jokar F, O'Brien PJ. (2005). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for chromate and arsenite. *Toxicol.* 206: 449-60.

Prabhakaran N.K.P. (2013). The agronomy and economy of turmeric and ginger: the invaluable medicinal spice crops. *India:* 514.

Prasad S, Aggarwal B.B. (2011). Chapter 13: Turmeric, the Golden Spice. *Traditional Medicine to Modern Medicine. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.* 2nd edition.

Pullar J.M, Carr A.C, Vissers M.C.M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients.* 9: 866.

Q

Quaye I.K. (2012). Oxidative stress in human health and disease, insight and control of infectious disease in global scenario, Priti Kumar Roy, IntechOpen.

R

- Rahim N.A, Hassandarvish P, Golbabapour S, Ismail S, Tayyab S, et al. (2014). Gastroprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma xanthorrhiza* leaf against ethanol-induced gastric mucosal lesions in sprague-dawley rats. *BioMed Res Int.* 2014; 10.
- Ramadan G, Al-Kahtani M.A, El-Sayed W.M. (2006). Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Curcuma longa* (turmeric) versus *Zingiber officinale* (ginger) rhizomes in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflammation.* 34(4): 291-301.
- Ravindran P.N, Nirmal Babu K, Sivaraman K. (2007). Turmeric: the genus curcuma. medicinal and aromatic plants - Industrial Profiles Turmeric. V45. London, New York.
- Ray R.R. (2016). Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview. *Interdiscip Toxicol.* 9(2): 55-65.
- Reddy A.C, Lokesh B.R. (1994). Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem.* 137(1): 1-8.
- Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno M.G, et al. (2007). Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1770 (6): 989-996.
- Rukkumani R, Aruna K, Varma P.S, Rajasekaran K.N, Menon V.P. (2004). Comparative effects of curcumin and an analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress. *J Pharm Pharm Sci.* 7(2): 274-83.

S

- Saha R, Nandi R, Saha B. (2011). Sources and toxicity of hexavalent chromium, *J Coordination Chem.* 64(10): 1782-806.
- Sahin Kavaklı H, Koca C, Alıcı O. (2011). Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 17(1): 14-8.
- Sahu B.D, Koneru M, Bijargi S.R, Kota A, Sistla R. (2014). Chromium-induced nephrotoxicity and ameliorative effect of carvedilol in rats: Involvement of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Chem Biol Interact.* 223: 69-79.
- Saju K.A, Venugopal M.N, Mathew M.J. (1998). Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa L*). *Current Science.* 75: 660-2.
- Saka S, Aouacheri O. (2017). The investigation of the oxidative stress-related parameters in high doses methotrexate-induced albino *Wistar* rats. *J Bioequiv Availab.* 9(2): 372-6.

-
- Sakarkar D.M, Gonsalvis L, Fariha F, Khandelwal L.K, Jaiswal B, et al, (2006). Turmeric: an excellent traditional herb. *Plant Archives*. 6 (2): 451-8.
- Salahshoor M, Mohamadian S, Kakabaraei S, Roshankhah S, Jalili C. (2015). Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *J Tradit Complement Med*. 6(2): 176-83.
- Salama S.M, Abdulla M.A, Alrashdi A.S, Ismail S, Alkiyumi S.S, et al. (2013). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide induced liver cirrhosis in rats. *BMC Complement Altern Med*. 13(56): 1-17.
- Sarangarajan R, Meera S, Rukkumani R, Sankar P, Anuradha G. (2017). Antioxidants: friend or foe. *Asian Pac J Trop Med*. 10(12): 1111-6.
- Scalbert A, Johnson I.T, Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 81(1): 215-7.
- Sedman R, Beaumont J, Budroe J, Vidair C. (2011). Public health goal for hexavalent chromium (Cr VI) in drinking water. California.
- Sengupta M, Sharma G.D, Chakraborty B. (2011). Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 1(3): 193-9.
- Sengupta T, Chattopadhyay D, Ghosh N, Das M, Chatterjee G.C. (1990). Effect of chromium administration on glutathione cycle of rat intestinal epithelial cells. *Indian J Exp Biol*. 28(12): 1132-5.
- Sethi G, Sung B, Aggarwal B.B. (2009). The role of curcumin in modern medicine. In: Ramawat K. *Herbal Drugs: Ethnomedicine to modern medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg: 97-113.
- Sharma N. (2014). Free Radicals, antioxidants and disease. *Biol Med*. 6: 214.
- Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi Y.C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 6(2): 289-300.
- Sharma R.A, McLelland H.R, Hill K.A, Ireson C.R, Euden S.A, et al. (2001). Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 7(7): 1894-900.
- Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. (2006). Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33(10): 940-5.

-
- Shil K, Pal S. (2017). Metabolic adaptability in hexavalent chromium-treated renal tissue: an in vivo study. *Clin Kidney J.* 11(2): 222-9.
- Silbergeld E.K, Waalkes M, Rice J.M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med.* 38: 316-23.
- Singhal S.S, Awasthi S, Pandya U, Piper J.T, Saini M.K, et al. (1999). The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicol Lett.* 109(1-2): 87-95.
- Singhal S.S, Singh S.P, Singhal P, Horne D, Singhal J, et al. (2015). Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 289(3): 361-70.
- Singhal V.K, Deswal B.S, Singh B.N. (2015a). Study of skin and mucous membrane disorders among workers engaged in the sodium dichromate manufacturing industry and chrome plating industry. *Indian J Occup Environ Med.* 19(3): 129-33.
- Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw N. (2012). Curcumin attenuates gastric cancer induced by n-methyl-n-nitrosourea and saturated sodium chloride in rats. *J Biomedicine Biotechnol.*
- Sisein E.A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Sch. Acad. J. Biosci.* 2(2): 110-8.
- So A, Thorens B. (2010). Uric acid transport and disease. *J Clin Invest.* 120(6): 1791-1799.
- Song E.K, Cho H, Kim J.S, Kim N.Y, An N.H, et al. (2001). Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa*. *Planta Med.* 67(9): 876-7.
- Soni K.B, Rajan A, Kuttan R. (1992). Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin. *Cancer Lett.* 66: 115-21.
- Soudani N, Bouaziz H, Sefi M, Chtourou Y, Boudawara T, et al. (2013). Toxic effects of chromium (VI) by maternal ingestion on liver function of female rats and their suckling pups. *Environ Toxicol.* 28(1): 11-20.
- Soudani N, Sefi M, Bouaziz H, Chtourou Y, Boudawara T, et al. (2011b). Nephrotoxicity induced by chromium (VI) in adult rats and their progeny. *Hum Exp Toxicol.* 30(9): 1233-45.
- Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Ben Amara I, Boudawara T, et al. (2011a). Cardioprotective effects of selenium on chromium (VI)-induced toxicity in female rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74(3):513-20.

-
- Sreepriya M, Bali G. (2005). Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine/ phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in *Wistar* rats. *Fitoterapia*. 76(6): 549-55.
- Sridevi B, Reddy S.L.N. (2000). Effect of trivalent and hexavalent chromium on carbohydrate metabolism of a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. *Environ Monit Assess*. 61(2): 293-302.
- Srinivasan M.R, Chandrasekhara N, Srinivasan K. (2008). Cholesterol lowering activity of mango ginger (*Curcuma amada Roxb*) in induced hypercholesterolemic rats. *Eur Food Res Technol*. 227: 1159-63.
- Stout M.D, Herbert R.A, Kissling G.E, Collins B.J, Travlos G.S, et al. (2009). Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6C3F1 mice after chronic oral exposure. *Environ Health Perspect*. 117(5): 716-22.
- Sumiyoshi M, Kimura Y. (2009). Effects of a turmeric extract (*Curcuma longa*) on chronic ultraviolet B irradiation-induced skin damage in melanin-possessing hairless mice. *Phytomedicine*. 16(12): 1137-43.
- Sun H, Brocato J, Costa M. (2015). Oral chromium exposure and toxicity. *Curr Environ Health Rep*. 2(3): 295-303.
- Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. (1996). Protective effect of vitamin E on chromium (VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat Hepatocytes. *Arch Toxicol*. 71(1-2): 20-4.
- Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. (1997). Protective effect of deferoxamine on chromium (VI)-induced DNA single-strand breaks, cytotoxicity, and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 71: 345-50.

T

- Tadimalla R.T. (2018). 25 Best benefits of turmeric (Haldi) for skin, hair and health. *Health and Wellness. Ingredients and Uses*.
- Tanvir E.M, Sakib Hossen M.D, Fuad Hossain M.D, Afroz R, Gan S.H. (2017). Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh. *J Food Quality* 2017: 1-8.
- Tchounwou P.B, Yedjou C.G, Patlolla A.K, Sutton D.J. (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *Exp Suppl*. 101: 133-64.
- Teow S.Y, Liew K, Ali S.A, Khoo A.S.B, Peh S-C. (2016). Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *J Trop Med*. 2016: 2853045.

-
- Thangapazham R.L, Sharma A, Maheshwari R.K. (2007). Beneficial role of curcumin in skin diseases. *Adv Exp Med Biol.* 595: 343-57.
- Thapliyal R, Naresh K.N, Rao K.V.K, Maru G.B, (2003). Inhibition of nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by dietary turmeric in rats. *Toxicol Lett.* 139(1): 45.
- Thompson C.M, Proctor D.M, Suh M, Haws L.C, Hébert C.D, et al. (2012). Comparison of the effects of hexavalent chromium in the alimentary canal of F344 rats and B6C3F1 mice following exposure in drinking water: implications for carcinogenic modes of action. *Toxicol Sci.* 125(1): 79-90.
- Tourkina E, Gooz P, Oates J.C, Ludwicka-Bradley A, Silver R.M, et al. (2004). Curcumin-induced apoptosis in scleroderma lung fibroblasts: role of protein kinase cepsilon. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31(1): 28-35.
- Trujillo J, Chirino Y.I, Molina-Jijón E, Andérica-Romero A.C, Tapia E, et al. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 1: 448-56.

U

- Upreti K.K, Das M, Kumar A, Singh G.B, Khanna S.K. (1989). Biochemical toxicology of argemone oil. IV. Short-term oral feeding response in rats. *Toxicology.* 58: 285-98.

V

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266(1-2): 37-56.
- Valko M, Morris H, Cronin M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12 (10): 1161-208.
- Vargas-Santos A.B, Neogi T. (2017). Management of gout and hyperuricemia in CKD. *Am J Kidney Dis.* 70(3): 422-39.
- Velayudhan K.C, Muralidharan V.K, Amalraj V.A, Gautam P.L, Mandal S.K. (1999). Curcuma genetic resources, Scientific Monograph No.4. National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi: 149.
- Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol.* 129(2): 231-4.
- Venter C, Oberholzer H.M, Cummings F.R, Bester M.J. (2017). Effects of metals cadmium and chromium alone and in combination on the liver and kidney tissue of male Sprague- Dawley rats: An ultrastructural and electron-energy-loss spectroscopy investigation. *Microsc Res Tech.* 80(8): 878-88.

Vihol P.D, Patel J, Varia R.D, Patel J.M, Ghodasara D.J, Joshi B.P. Prajapati K.S. (2012). Effects of sodium dichromate on haemato-biochemical parameters in *Wistar* rats. *J Pharmacol Toxicol.* 7 (1): 58-63.

W

Wang J, Wang C, Bu G. (2018b). Curcumin inhibits the growth of liver cancer stem cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Exp Ther Med.* 15(4): 3650-8.

Wang Z, Wu J, Humphries B, Kondo K, Jiang Y, et al. (2018a). Upregulation of histone-lysine methyltransferases plays a causal role in hexavalent chromium-induced cancer stem cell-like property and cell transformation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 342:22-30.

Weckbecker G, Cory J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse leukaemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* 40: 257-64.

Wickenberg J, Ingemansson S.L, Hlebowicz J. (2010). Effects of *Curcuma longa* (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects. *Nutr J.* 9: 43.

Wientarsih I, Chakeredza S, Meulen U.T. (2002). Influence of curcuma (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) on lipid metabolism in rabbits. *J Sci Food Agric.* 82: 1875-80.

Wilbur S, Abadin H, Fay M, Yu D, Tencza B. et al. (2012). Toxicological profile for chromium. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR) U.S public health service. 1-135.

Winiarska-Mieczan A. (2018). Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress-a review. *Biometals.* 31(6): 909-26.

X

Xu C, Haiyan Z, Hua Z, Jianhong Z, Pin D. (2009). Effect of curcuma kwangsiensis polysaccharides on blood lipid profiles and oxidative stress in high-fat rats. *Int J Biol Macromol.* 44(2): 138-42.

Y

Yang H.Y, Lee T.H. (2015). Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep.* 48(4): 200-8.

Yousef M.I, El-Demerdash F.M, Kamil K.I, Elawad F.A. (2006). Ameliorating effect of folic acid on chromium [VI]-induced changes in reproductive performance and seminal plasma biochemistry in male rabbits. *Reprod Toxicol.* 21(3): 322-8.

Yousef M.I, Omar S.A, El-Guendi M.I, Abdelmegid L.A. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative

stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol.* 48(11): 3246-61.

Yun S.S, Kim S.P, Kang M.Y, Nam S.H. (2010). Inhibitory effect of curcumin on liver injury in a murine model of endotoxemic shock. *Biotechnol Lett.* 32: 209-14.

Z

Zahid Ashraf M, Hussain M.E, Fahim M. (2005). Antiatherosclerotic effects of dietary supplementations of garlic and turmeric: Restoration of endothelial function in rats. *Life Sci.* 77(8): 837-57.

Zhang D.W, Fu M, Gao S.H, Liu J.L. (2013). Curcumin and diabetes: A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 636053: 1-16.

Annexes

Annexe 1.

Préparation de solutions

1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

- ❖ *Solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (1 mg/mL)*: dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- ❖ *Réactif de Bradford*: dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 mL d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 mL d'acide ortho phosphorique (85 %) et 850 mL d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

2. Dosage du glutathion

- ❖ *Solution EDTA (0,02 M)*: dissoudre 7,4856 g EDTA dans 1000 mL d'eau distillée.
- ❖ *Solution DTNB (0,01 M)*: dissoudre 0,08 g DTNB dans 20 mL de méthanol absolu.
- ❖ *Solution d'acide salicylique (0,25 %)*: dissoudre 0,5 g d'SSA dans 200 mL d'eau distillée.
- ❖ *Tampon Tris + EDTA (0,4 M + 0,02 M)*: dissoudre 48,456 g Tris + 7,4856 g d'EDTA dans 1000 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 9,6.

3. Dosage du (GSH-Px)

- ❖ *Solution TBS*: Tris (50 mM, NaCl (150 mM): dissoudre 8,775 g NaCl dans 1 L d'eau distillée, puis poser 6,057 g Tris et compléter le volume à 1 L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- ❖ *Solution du GSH (0.1 mM)*: dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 mL d'eau distillée.
- ❖ *Solution TCA (1 %)*: dissoudre 1 g TCA dans 100 mL d'eau distillée.
- ❖ *Solution DTNB (1,0 mM)*: dissoudre 100 mg DTNB dans 250 mL de méthanol absolu.

4. Dosage du (GSH-ST)

- ❖ *Solution CDNB (0,02 M)*: dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 mL d'éthanol absolu.
- ❖ *Solution GSH (0,1 M)*: dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 mL d'eau distillée.

5. Dosage du (CAT)

❖ Tampon phosphate (0,1 M)

- Solution (A): dissoudre 35,8 g de Na_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée
- Solution (B): dissoudre 13,8 g de NaH_2PO_4 dans 1 L d'eau distillée

Mélanger 61,5 mL de la solution (A) et 438,5 ml de la solution (B), et ajouter 21,39 g de saccharose.

6. Préparation du Bouin alcoolique (100 ml)

Mélanger:

- ❖ 45 mL de solution d'acide picrique 1 % dans de l'éthanol (95 %)
- ❖ 26 mL de Formol.
- ❖ 07 mL d'acide acétique.
- ❖ 22 mL d'eau distillée.

Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines

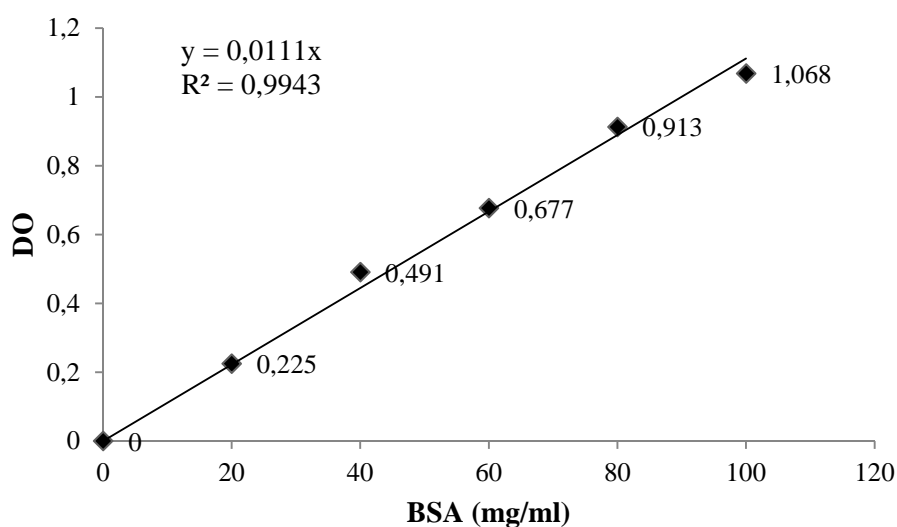


Figure 27. Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin

Annexe 2.**CMV: poulet de chair SACOX 1% (PREMIX)****1. Oligo-élément au kg**

Fer (carbonate) (E 1)	5 030
Cuivre (Sulfate) (E 4)	1 030
Zinc (oxyde) (E 6))	5 060
Manganèse (Oxyde)	7650
Sélénium (Sélénite)	20
Iode (calcium)	152

2. Vitamines (UI ou mg) au Kg

Vit A(E 672)	1000 000 UI
Vit D3 (E 671)	200 000 UI
Vit E (3a700)	2 000 mg
Vit K3 MNB	160 mg
Vit B1 Thiemine	126 mg
Vit B2 Riboflavine	400 mg
Vit PP Acide nicotinique	2 520 mg
Vit B5 Pantothénate de Ca	835 mg
Vit B6 pyridoxine	203 mg
Vit H Biotine	5 mg
Vit BB Acide folique	56 mg
Vit B12 Cyanocobalamine	1.5 mg
Chlorure de choline 3a890	30 030 mg

3. Caractéristique technique

Protéine brute	12%
Cendres brutes (matières minérales)	74%
Calcium	12.8%
Sodium	13.7%
Cendres insoluble dans HCL	2.5%

4. Autre addition**Anti-oxygène**

Ethoxyquine 330 mg

Coccidiostatiques

Saline sodium 6000 mg

Linats/Antiagglomérants

Sépiolite 22500 mg

Acides aminés

DL Méthionine 18%

Activités Scientifiques

Activités scientifiques

Cette thèse s'appuie sur l'effort des années d'études en doctorat troisième cycle L.M.D.

Une partie des résultats rapportés dans cette thèse a donné lieu à la publication citée ci-dessous, le deuxième et la troisième publication sont en cours de réalisation.

Publication

- 1- Saidi M, Aouacheri O. Saka S. (2019). Protective effect of curcuma against chromium hepatotoxicity in rats. *Phytothérapie*. 1: 1-8. DOI 10.3166/phyto-2019-0114

Communication nationale

- 1- Saidi Malika. Saka Saad. Effets d'hémato-toxicité du chrome chez les rats males *Wistar*. 7ème congrès de la Biologie Médicale et Médecine de laboratoire le 06 et 07 mai 2018 Alger-Algérie.

Communications internationales

- 1- Saidi Malika, Saka Saad. Potassium dichromate induced cardiotoxicity and inflammation in rat model. Les 4èmes journées scientifiques internationales de l'institut supérieur de biotechnologie sous le thème: stress oxydatif, inflammation et maladies chroniques, 16-17 et 18 février 2018 Monastire-Tunisie.
- 2- Saidi Malika. Toxicity effects of potassium dichromate induce acute oxidative damage in *Wistar* rats. 6ème congrès international de physiologie et bio-surveillance de l'environnement, du 18 au 21 décembre 2017 Douz-Tunisie.
- 3- Saidi Malika. Saka Saad. Aouacheri Wassila. Renotoxicité du chrome hexavalent chez les rats *Wistar*: Etude histopathologique et biochimique. 7ème Congrès International de Néphrologie qui aura lieu les: 26 – 27 et 28 Avril 2018 Batna-Algérie.
- 4- Saidi Malika. Aouacheri Wassila. Derbel Sara. Saka Saad. Antioxydative effects of *Curcuma longa* against heavy metal in *Wistar* rats. Les Rencontres de l'Agriculture et de la Biologie (RAB) Période du 05 au 07 mai 2018 Constantine-Algérie.
- 5- Saidi Malika. Saka Saad. Aouacheri Wassila. Oral administration of curcuma relieves hepatotoxicity in male *Wistar* rats. Le Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 » 16-17 Octobre 2018 Guelma-Algérie.

Protective Effect of Curcuma Against Chromium Hepatotoxicity in Rats

L'effet protecteur de curcuma contre l'hépatotoxicité du chrome chez les rats

M. Saidi · O. Aouacheri · S. Saka

© Lavoisier SAS 2019

Abstract This study was carried out to investigate the anti-oxidant effects of curcuma against chromium-induced alterations in hepatic indices and dysfunctions in the antioxidant system. Forty male *Wistar* rats were randomly divided into four groups and were treated for 30 consecutive days. The control group (0-0) received per os mineral water and normal diet. The second group (0-Cur) received mineral water and an experimental diet containing 2% of curcuma powder, whereas the third group (Cr-0) was orally fed (per os) with 15 mg/kg body weight/day of potassium dichromate and normal diet. The last group (Cr-Cur) received per os 15 mg/kg of potassium dichromate and a diet with 2% of curcuma. The treatment by chromium was found to elicit a perturbation in biochemical parameters producing a significant increase in glycemia, triglycerides, cholesterol, ALP, ALT, AST, and LDH levels. On the contrary, a significant reduction was observed in the oxidative stress-related parameters (GSH, GPx, CAT, and GST). Moreover, we noticed that liver sections of rats intoxicated with chromium showed a disrupted architecture. However, the administration of curcuma revealed an intense reduction in the oxidative stress induced by chromium, ameliorating the levels of the majority of the previous parameters. The data of this study revealed the potent antioxidant effects of curcuma in reducing oxidative stress damage induced by the hexavalent chromium.

Keywords Chromium · Oxidative stress · Hepatotoxicity · Curcuma · Rats

Résumé L'objectif de ce travail est l'étude des effets antioxydants et hépatoprotecteurs du curcuma contre les altérations induites par le chrome. Quarante rats mâles de la souche

Wistar ont été divisés en quatre groupes de dix rats chacun, puis traités quotidiennement pendant 30 jours consécutifs. Le groupe témoin (0-0) recevant de l'eau minérale per os et un régime alimentaire normal. Le deuxième groupe (0-Cur) recevant de l'eau minérale et un régime alimentaire contenant 2 % de curcuma, tandis que le troisième groupe (Cr-0) a reçu per os 15 mg/kg de poids corporel par jour de dichromate du potassium et un régime normal. Le dernier groupe (Cr-Cur) recevant per os 15 mg/kg de dichromate du potassium et un régime alimentaire à 2 % de curcuma. Le traitement au chrome a provoqué une perturbation des paramètres biochimiques se traduisant par une augmentation significative de la glycémie, des triglycérides, du cholestérol, des TGP, des TGO, de la PAL et de la LDH. Toutefois, une réduction significative des paramètres liés au stress oxydatif (GSH, GPx, CAT et GST) a été observée. Par ailleurs, les différentes coupes histologiques hépatiques des rats traités par le chrome ont montré une architecture tissulaire perturbée. Cependant, l'administration du curcuma a démontré une réduction intense du stress oxydatif induit par le chrome, améliorant ainsi la majorité des paramètres biochimiques et histologiques précédents. Les données de cette étude ont révélé les puissants effets antioxydants et hépatoprotecteurs du curcuma contre les dommages oxydatifs et les altérations induits par l'administration du chrome.

Mots clés Chrome · Stress oxydatif · Hépatotoxicité · Curcuma · Rats

Introduction

Heavy metals are highly toxic compounds widely spread in the environment, due to their high degree of toxicity, arsenic, cadmium, chromium, lead, and mercury rank among the priority metals with high public health significance [1]. Chromium is released in the environment from industrial processes, wood preservation, pigment, plating, welding, leather tanning, manufacture of stainless steel, and metal finishing [2]; therefore, its level in the industrial waste consists

M. Saidi · O. Aouacheri · S. Saka (✉)
Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences,
Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria
e-mail : sakasadz@yahoo.fr

O. Aouacheri · S. Saka
Applied Biochemistry and Microbiology Laboratory,
Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

of an important health concern related to the environmental contamination [3]. Furthermore, chromium has been reported for its potential genotoxicity, cytotoxicity [4], and carcinogenicity effects [5]. In the same way, its exposure has been linked to cell damages and DNA disruption [6].

The organs that are the most affected by chromium bioaccumulation are liver, kidney, and spleen. In fact, liver is one of the main toxicity targets as it is the biotransformation organ of the majority of xenobiotics. The latter lead to an oxidative stress resulting in the alteration of the antioxidant defense as well as the stimulation of the production of reactive oxygen species (ROS), thus an impairment in hepatic function markers, leading to histopathological changes [7].

Curcuma is a perennial herb of the ginger family that is cultivated in India, China, Indonesia, and other tropical countries. The powder of its dried rhizomes (turmeric) is commonly used as a food additive for organoleptic purposes [8]. The most bioactive element in turmeric is curcumin [9], which has been reported for its powerful medicinal properties over many centuries due to its well-considered phenolic content [10]. In addition, curcuma has exhibited excellent therapeutic activities among which we can list anticancer and anti-inflammatory activities [11], as well as antifungal, antibacterial, antiviral, insecticidal, and nematicidal activities [12]. Likewise, many researchers have reported an anti-tumor, anti-invasion, antimetastatic, cell growth regulation, radioprotection, radiosensitization, immune modulation, protection in skin diseases, cardioprotective effects, protection from acute and chronic lung diseases, nephroprotective and hepatoprotective effects, and antidiabetic activities [13]. Moreover, it was found that curcuma has antioxidant effects by being a potent scavenger of many reactive oxygen species including superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) [14,15].

The present study aims to evaluate the modulation of the toxic effects and the oxidative hepatic injury following the chromium sub-chronic exposure using curcuma as a natural antioxidant.

Materials and methods

Animals

Forty male *Wistar* rats were used in this study (160 ± 10 g body weight; 10 weeks old) and were obtained from Pasteur Institute of Algiers, Algeria. Animals were housed in polypropylene cages and were maintained under standard environmental conditions (12 h light/dark cycle, 21 ± 2 °C temperature, and $50 \pm 10\%$ relative humidity). Rats were fed on specific diet prepared according to Upreti et al. [16] regime and water *ad libitum*. The animals were acclimatized for 15 days before the commencement of the experiments. The

research procedures were carried out according to the National Institute of Health Guidelines for Animal Care and approved by the Animal Ethics Committee.

Preparation of chromium solution (induction of oxidative stress)

Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) powder (Biochem Chemopharma Company, USA) was dissolved in mineral water and was administrated orally by gavage (per os); the volume of each dose was adjusted to deliver 15 mg/kg of body weight/day.

Preparation of Curcuma Powder

Curcuma longa rhizomes were purchased locally from the market. To obtain turmeric fine powder, rhizomes were milled in the laboratory using mortar and pestle, and then were pulverized with a knife grinder and sieved to get uniform size range.

Animal treatment

Rats were randomly divided into four groups and were treated for 30 consecutive days. The first group (0-0) served as control and received mineral water only through oral gavage (per os) with a normal diet. The second group (0-Cur) received mineral water and an experimental diet containing 2% of curcuma powder, while the third group (Cr-0) was treated per os with a dose of potassium dichromate (15 mg/kg body weight) and received a normal diet. As for the fourth group (Cr-Cur), it received both an oral dose of potassium dichromate (15 mg/kg) and an experimental diet containing 2% curcuma powder.

Experimental methods

During 30 days of treatment, animals were weighed daily. At the end of the experimental period, all the animals were sacrificed by cervical decapitation and blood samples were collected in serum plain tubes. These samples were centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes to obtain serum, which afterward served for the measurement of various biochemical analyses (glycemia, triglycerides, cholesterol, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferases, and aspartate aminotransferases) using automatic biochemistry analyzer (ARCHITECT ci4100) and kits that were provided by Spinreact, Spain.

Liver was immediately extracted from dissected rats, washed with a phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) to remove the excess blood and adhering tissues, weighed, and then divided into two parts. The first part of the liver was immediately fixed in 10% formol solution for histological study, whereas the second part was preserved at -20 °C to stop

metabolic activities and served for oxidative stress parameters. The hepatosomatic index shows the weight of liver as a percentage of body weight [17]. The hepatic reduced glutathione content (GSH) and protein concentration were determined by spectrophotometry using the methods of Weckbercker and Cory [18], and Bradford [19], respectively. Catalase activity (CAT) was estimated by the Aebi [20] method, while glutathione peroxidase activity (GPx) was measured according to Flohé and Günzler [21] method. Finally, the glutathione S-transferase (GST) activity was estimated by Habig et al. [22] method.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Data were performed by one-way analysis of variance (Anova) by multiple comparisons. The Graph Pad Prism 5.0 software was used to draw the graphs (Graph Pad software, Inc., San Diego, USA). Results were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Physiological Parameters' Study

Exposure of rats to chromium did not produce any overt sign of toxicity/mortality. However, Table 1 shows a significant decrease in body weight accompanied by an increase in liver wet weights and hepatosomatic index in chromium-treated rats (Cr-0) in comparison with control group. On the contrary, the curcuma addition in (Cr-Cur) group ameliorated these settings compared to (Cr-0) group.

Biochemical Parameters' Study

Results about the determination of biochemical parameters, shown in table 2, affirm the existence of a large metabolic

disturbance. The oral chromium administration to rats caused a significant increase in glycemia, triglycerides, cholesterol, ALP, LDH, AST, and ALT compared to those of control group, while the supplementation of curcuma in the diet of the chromium–curcuma-treated group (Cr-Cur) stopped the hepatic profile disturbance and generally restored these biochemical parameters to near normal level.

Oxidative Stress Parameters' Study

Chromium intake was found to cause an impressive oxidative stress which occurs mainly through a significant reduction in all biomarkers of antioxidant defense systems in liver, especially GSH level (Fig. 1) and activities of GPx (Fig. 2), CAT (Fig. 3), and GST (Fig. 4) compared to the control group. Conversely, the co-administration of curcuma with chromium in (Cr-Cur) group pronounced a significant amelioration of the abovementioned oxidative markers by significant increase compared to those of (Cr-0) group.

Histopathological examination

The representative photomicrographs in figure 5 show the transverse sections of liver tissue from the studied groups. Control (5a) shows normal hepatocytes tightly attached to each other containing centrilobular vein zone (CV). Unlike curcuma group (5b), which shows normal hepatic cells, chromium administered rats (5c) show congested hepatocytes (asterisks in 5c3). Moreover, chromium intoxication caused hepatocytes vacuolization (arrowheads in 5c1, 5c2), several parenchyma dilatations were observed throughout the hepatic tissue (closed arrows in 5c1, 5c2, 5c3, 5c5), as well as endotheliitis involving the centrilobular vein (open arrows in 5c4, 5c5), and leucocyte inflammatory cells (round head arrow in 5c1). In contrast, liver of chromium–curcuma-treated group (5d) shows less liver damage by presenting normal hepatic cells and parenchyma when compared to chromium-administered rats.

Table 1 Physiological parameters in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats)					
Parameters		Groups			
		0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
Body weight	Initial (g)	226.3 \pm 3.44	223.7 \pm 1.89	220.7 \pm 3.70	226.7 \pm 3.40
	Final (g)	268.0 \pm 8.29	248.9 \pm 3.31	231.0 \pm 9.76*	251.7 \pm 6.33
	Gain (%)	18.42	11.26	4.66	11.02
Live weight	Wet weight (g)	5.86 \pm 0.30	6.24 \pm 0.19	7.80 \pm 0.22***	6.62 \pm 0.14*###
	Hepatosomatic index (%)	15.39 \pm 0.90	15.32 \pm 0.61	18.23 \pm 0.47*	16.42 \pm 0.32##

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group
 ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Significantly difference from (Cr-0) group

Table 2 Serum biochemical markers in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats)				
Parameters	Groups			
	0-0	0-Cur	Cr-0	Cr-Cur
Glycemia (g/L)	0.76 \pm 0.03	0.73 \pm 0.02	1.02 \pm 0.09*	0.91 \pm 0.04*
Triglycerides (g/L)	0.62 \pm 0.07	0.58 \pm 0.14	1.39 \pm 0.18**	0.78 \pm 0.12 [#]
Cholesterol (g/L)	0.35 \pm 0.04	0.37 \pm 0.05	0.62 \pm 0.04**	0.51 \pm 0.05*
ALP (UI/l)	140.3 \pm 8.03	134.3 \pm 13.81	281.6 \pm 26.9***	165.5 \pm 9.07 [#]
LDH (UI/l)	2559 \pm 314.5	2396 \pm 199.5	3586 \pm 242.8*	3263 \pm 256.1
ALT (UI/l)	21.12 \pm 2.03	19.65 \pm 2.28	34.83 \pm 4.16*	29.49 \pm 2.09*
AST (UI/l)	213.7 \pm 14.20	181.5 \pm 17.25	311.7 \pm 10.38***	275.1 \pm 12.27** [#]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group
[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Significantly difference from (Cr-0) group

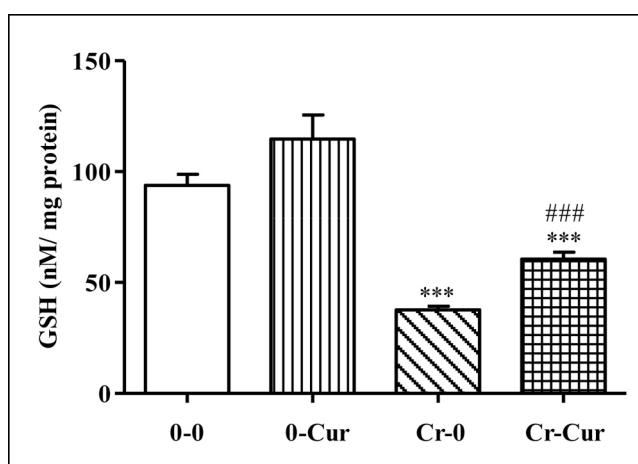


Fig. 1 Glutathione content (nM/mg protein) in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats). *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group, ^{###} $P < 0.001$; Significantly difference from (Cr-0) group

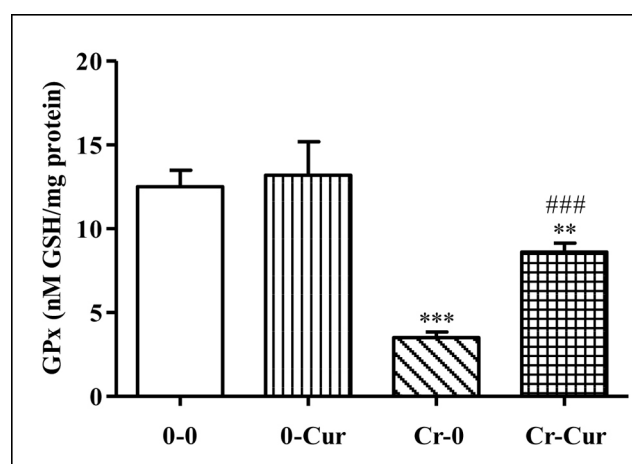


Fig. 2 Glutathione peroxidase activity (nM GSH/mg protein) in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group, ^{###} $P < 0.001$; Significantly difference from (Cr-0) group

Discussion

The protection against heavy metals is a problem that is not been solved so far. Transition metals can act as catalysts for the oxidative deterioration of macromolecules, through the formation of reactive oxygen species (ROS), increased lipid peroxidation, decreased sulfhydryl groups, and oxidative tissue damage [23]. This study has a major aim to evaluate the impact of chromium, a toxic pollutant, on adult *Wistar* rats and the possible protective action of curcuma, a spice rich in natural antioxidants.

Regarding the studied physiological parameters, the 15 mg/kg of potassium dichromate treatment for 30 days induced a critical decrease in the body weight of rats with an increase in liver wet weight leading eventually to a high

hepatosomatic index. Likewise, the study of De Lucca et al. [24] reported the toxic effect of chromium attributed to changes in bone formation and metabolic disorders. This can be explained by the hypertrophy of the liver tissue and the intense accumulation of the metal within the organ. As for the loss of weight, it is also due to the loss of appetite following the alteration of the food organoleptic properties caused by the chromium [25]. Moreover, we have found through our investigation that supplementation with curcuma in (Cr-Cur) group had a protective impact against the adverse action of chromium by keeping the previous parameters in the range of normal values. Similarly, García-Niño et al. [26] reported the potential protective effect of curcumin toward liver damages.

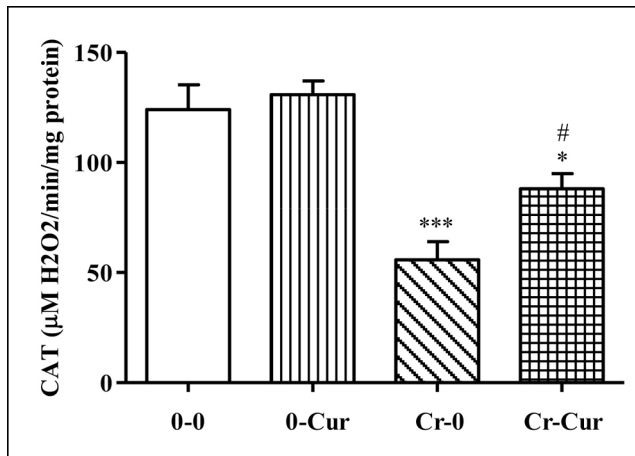


Fig. 3 Catalase activity ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$) in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group, # $P < 0.05$; Significantly difference from (Cr-0) group

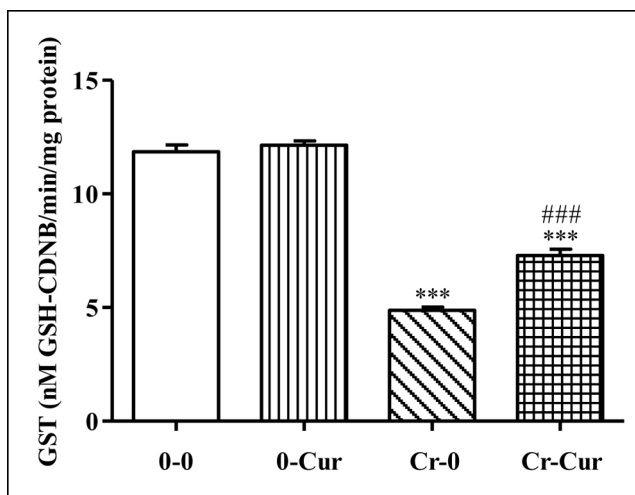


Fig. 4 Glutathione S-transferase activity (nM GSH-CDNB/min/mg protein) in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment (values represent the mean \pm SEM of seven rats). *** $P < 0.001$; Significantly difference from control (0-0) group, ### $P < 0.001$; Significantly difference from (Cr-0) group

In our study, exposure to chromium induced a significant increase in the serum glucose levels; this result is consistent with the study of Ghafghazi et al. [27], suggesting that the chromium, as a hyperglycemic factor, inhibits insulin release correlated with insulin resistance. Our results also revealed that treatment with curcuma ameliorates the glycemia, which can be attributed to the anti-hyperglycemic effect of curcuma. However, previous studies on adult rats mentioned the curcumin as potential treatment for diabetes that enhances

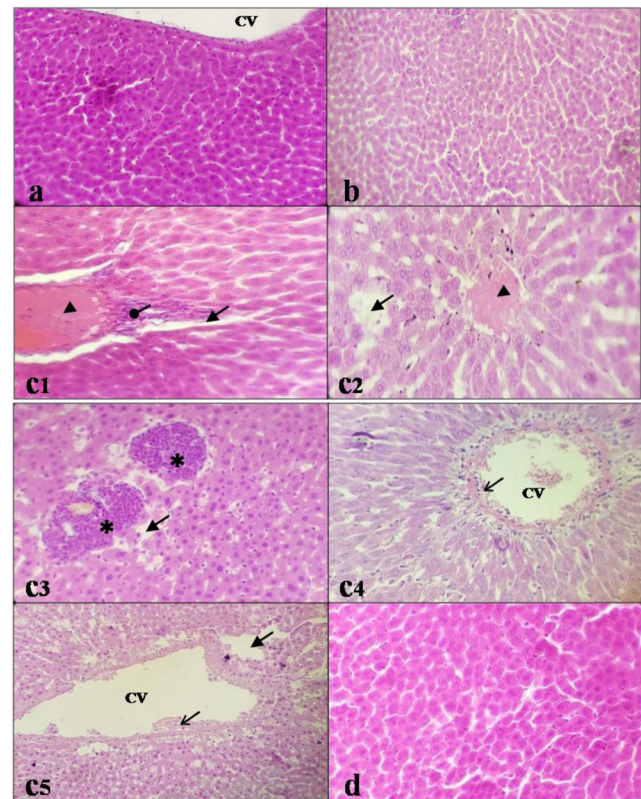


Fig. 5 Histological sections of the liver in control (0-0) and treated rats (0-Cur, Cr-0, Cr-Cur) after 30 days of treatment. Optic microscopy ($\times 400$, H&E)

the insulin resistance, by interfering within the pancreatic β -cells, and contributing to the hypoglycemia [28], which improves the absorption and utilization of glucose.

As for the lipid profile, we observed a significant increase in the serum concentration of cholesterol and triglycerides in rats treated with chromium, and this hyperlipidemia can be explained by intense disruption of lipid and cholesterol metabolism and can be a sign for membrane lipid peroxidation. Experimental studies on rats with chromium administration for 30 days induced hypercholesterolemia due to the hypermetabolic state of the animals, or to the impaired liver function [29]. Conversely, the administration of curcuma in the (Cr-Cur) group demonstrated a significant improvement in the serum cholesterol and triglycerides. In fact, curcuma participates in the decrease of lipid status [30], and it was reported by Feng et al. [31] that curcumin possesses ability to inhibit the absorption of cholesterol by suppressing the expression of NPC1L1, the principal transporter of cholesterol in the enterocytes.

The present study showed a significant elevation in the alkaline phosphatase (ALP) activity following the chromium administration, which probably due to the alteration of the hepatocyte membrane permeability or necrosis. These findings agree with those reported by Al-Heidery et al. [32]. On

the contrary, the pretreatment with curcuma maintained the ALP activity at the normal state. In fact, many studies noted that curcuma is an inhibitor of the ALP activity in the plasma [33]. Apparently, curcuma has a potential protective impact on reducing the enzymes released by damaged hepatocytes (AST, ALT, and ALP) and can also inhibit the secretion of liver necrosis indices such as TNF- α and IL-1 [34].

Lactate dehydrogenase (LDH) is a key enzyme in the anaerobic pathway, playing an important role in the production of energy, by catalyzing the interconversion of pyruvate into lactate in the process of glycolysis. The variations in LDH reflect the metabolic alterations. In cell culture medium, the different concentrations of potassium dichromate induce cell death and consequently increase the LDH release [35]. Similarly, our results revealed a significant increase in LDH activity following the chromium exposure, but it also revealed that the treatment with curcuma in the administrated-chromium rats improved LDH activity. Bao et al. [36] mentioned that the pretreatment with curcumin induces powerful antioxidant effects and inhibits the release of LDH from damaged hepatocytes by decreasing lipid peroxidation, through his scavenging properties for free radicals [37].

Transaminases (AST, ALT) are biomarkers of tissue damage reflecting the functional activity of liver and heart; their increase is generally related to alteration of the hepatocyte membrane permeability, leading to an important leakage of enzymes in the plasma [38]. Our findings showed a significant elevation of serum transaminases activities for the chromium-exposed group, compared to the control group, indicating both liver and heart damages. These results are in line with the data published by Elshazly et al. [7], reporting that the exposure to the chromium induces the increase in serum ALT levels, which indicates the presence of hepatocellular and hepatobiliary lesion, linked to cell destruction. We also found that curcuma reduced the transaminase enzyme activities in chromium-curcuma treated rats, which recovers the liver damage. Moreover, it stabilizes the hepatocytes membranes and repairs the alterations of the liver tissue by scavenging free radicals, which also improves the histological architecture, by suppressing the leakage of extracellular enzymes [39].

The glutathione (GSH) is a tripeptide responsible for the cytoprotection against ROS and the detoxification of endogenous and exogenous toxins of electrophilic compounds [25]. In addition, depletion of GSH can impair the cell defense against the toxic actions of ROS and can result in cell damages [40]. In this study, chromium induced a decrease in hepatic GSH concentration. Kart et al. [41] reported that after intraperitoneal injection of chromium and the GSH in mice, the GSH allows reducing extracellular chromium, preventing then the oxidative stress status. Moreover, the treatment with curcuma significantly improved

GSH levels. In fact, curcuma increases the availability of GSH. Also, it protects the cell against oxidative damages induced during GSH depletion, as a supplement it enhances both cellular GSH levels and ROS scavenging ability [42].

The cell possesses for its protection a first antioxidant defense system, the GSH that has a sulfhydryl function (-SH). The latter permits the GSH to bind to toxic metabolites. Besides, GSH, in synergy with a complex antioxidant system including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), and catalase (CAT), plays an antioxidant role that neutralizes ROS such as hydroxyl radicals ($^{\circ}\text{OH}$), superoxide anions (O_2^{\ominus}), and hydrogen peroxide (H_2O_2). Furthermore, Yang and Lee [43] reported that these antioxidant enzymes can serve as redox biomarkers in various human diseases, because they are the first to indicate the cell oxidoreduction state. Our results showed a significant reduction in the activity of these enzymes following chromium exposure. According to Dolai et al. [44], the decline of GPx activity in male rats induced by chromium is due to the intracellular accumulation of ROS with development of liver injury. While the CAT decrease indicates the overproduction of H_2O_2 during the chromium exposure, thus treatment with chromium leads to an alteration of the hepatic antioxidant system, confirmed by the decline of antioxidant enzymatic activities such as CAT and GPx. In fact, this is due to the inhibition of antioxidant enzymes and leads to the accumulation of H_2O_2 [45]. Conversely, as shown by our results, the pretreatment with curcuma reveals a significant protection against the reduction of the antioxidant enzymatic activities. Similar study performed by García-Niño et al. [46] reported that curcumin induced a significant increase in the GSH content, GPx, and GST activities.

Conclusion

The present study reveals a clear hepatoprotective effect of curcuma through its antioxidant effects resulting in biochemical and physiological improvement against ROS generation. Hence, curcuma can be qualified as a therapeutic agent against chromium toxicity.

Acknowledgements This work supported by research project N $^{\circ}$: F01120140045, funded by the Ministry of Higher Education, Algeria. We would like to thank members of the Algiers Pasteur Institute for providing rats

Conflicts of Interests: we wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

1. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, et al (2012) Heavy metals toxicity and the environment. *Clin Environ Toxicol* 101:133–64
2. Blade LM, Yencken MS, Wallace ME, et al (2007) Hexavalent chromium exposures and exposure-control technologies in American enterprise: results of a NIOSH field research study. *J Occup Environ Hy* 4:596–618
3. Mishra S, Bharagava RN (2016) Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 34:1–32
4. Patlolla A, Barnes C, Hackett D, et al (2009) Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 6:643–53
5. Kim J, Seo S, Kim Y, et al (2018) Review of carcinogenicity of hexavalent chrome and proposal of revising approval standards for an occupational cancer in Korea. *Ann Occup Environ Med* 30:7
6. Khalil S, Awad A, Elewa Y (2013) Antidotal impact of extra virgin olive oil against genotoxicity, cytotoxicity and immunotoxicity induced by hexavalent chromium in rat. *Int J Veterinary Sci Med* 1:65–73
7. Elshazly MO, Morgan AM, Ali ME, et al (2016) The mitigative effect of *Raphanus sativus* oil on chromium-induced geno- and hepatotoxicity in male rats. *J Adv Res* 7:413–21
8. Lim TK (2016) Edible medicinal and non-medicinal plants. Modified Stems & Roots Edition, Bulbs, London, 12 p
9. Paulucci VP, Couto RO, Teixeira CC, et al (2013) Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Braz J Pharmacogn* 23:94–100
10. Caiqin L, Weiqing C, Nan W, et al (2018) Optimization of extraction of antioxidants from turmeric (*Curcuma longa* L) using response surface methodology. *J Natural Sci* 23:63–9
11. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, et al (2013) Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res* 57:1529–42
12. Luthra PM, Singh R, Chandra R (2001) Therapeutic uses of *Curcuma longa* (turmeric). *Indian J Clin Biochem* 16:153–60
13. Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S (2007) The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology*, New York (USA), 595 p
14. García-Niño WR, Pedraza-Chaverrí J (2014) Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol* 69:182–201
15. Tanvir EM, Sakib Hossen MD, Fuad Hossain MD, et al (2017) Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh. *J Food Quality* 2017:1–8
16. Upreti KK, Das M, Kumar A, et al (1989) Biochemical toxicology of argemone oil. IV. Short-term oral feeding response in rats. *Toxicology* 58:285–98
17. Berté S, Kouamélan EP, Ouattara NI, et al (2008) Cycle de reproduction et fécondité de *Distichodus rostratus* (Characiformes, Distichodontidae) dans un bassin ouest africain (fleuve Bandama, Côte-d'Ivoire) [Reproductive cycle and fecundity of *Distichodus rostratus* (Characiformes, Distichodontidae) in a West African basin (Bandama River, Ivory Coast)]. *Tropicultura* 26:104–7 [French]
18. Weckbercker G, Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse leukaemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett* 40:257–64
19. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54
20. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–6
21. Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione-peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–21
22. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–9
23. Kehili N, Saka S, Aouacheri O (2017) L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats [The phytoprotective effect of nigella (*Nigella sativa*) against the toxicity induced by cadmium in rats]. *Phytothérapie* 1:1–10 [French]
24. De Lucca RC, Dutrey PL, Villarino ME, et al (2009) Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 61:347–52
25. Saka S, Aouacheri O (2017) The investigation of the oxidative stress-related parameters in high doses methotrexate-induced albino Wistar rats. *J Bioequiv Availab* 9:372–6
26. García-Niño WR, Tapia E, Zazueta C, et al (2013) Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:1–19
27. Ghafghazi T, Maghbareh A, Barnett R (1979) Chromium-induced hyperglycemia in the rat. *Toxicology* 12:47–52
28. Zhang DW, Fu M, Gao SH, et al (2013) Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:1–16
29. Kumar A, Barthwal R (1991) Hexavalent chromium effects on hematological indices in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 46:761–8
30. Lee CH, Kim AY, Pyun CW, et al (2014) Turmeric (*Curcuma longa*) whole powder reduces accumulation of visceral fat mass and increases hepatic oxidative stress in rats fed a high-fat diet. *Food Sci Biotechnol* 23:261–7
31. Feng D, Ohlsson L, Duan RD (2010) Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis* 9:1–5
32. Al-Heidery HHA, Mashkur SH, Al-Heidery ZHA (2008) Protective effects of vitamin C on albino rats Exposed to hexavalent chromium (Cr VI). *Kufa Med J* 11:1
33. Peschel D, Koerting R, Nass N (2007) Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem* 18:113–9
34. Salahshoor M, Mohamadian S, Kakabaraei S, et al (2016) Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *J Tradit Complement Med* 6:176–83
35. Das J, Kang MH, Kim E, et al (2015) Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Sci Rep* 13921:1–15
36. Bao W, Li K, Rong S, et al (2010) Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol* 128:549–53
37. Naik RS, Mujumdar AM, Ghaskadbi S (2004) Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *J Ethnopharmacol* 95:31–7
38. Kumari K, Ranjan N, Sinha RC (2011) Multiple biomarker response in the fish *Labeo rohita* due to hexavalent chromium. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE vol.7. IACSIT Press, Singapore
39. Joshia D, Mittal DK, Shukla S, et al (2016) *Curcuma longa* Linn extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against

- mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: a protective approach. *Exp Toxicol Pathol* 69:373–82
40. Aouacheri O, Saka S, Krim M, et al (2015) The investigation of the oxidative stress related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes* 39:44–9
 41. Kart A, Koc E, Dalginli KY, et al (2016) The therapeutic role of glutathione in oxidative stress and oxidative DNA damage caused by hexavalent chromium. *Biol Trace Elem Res* 174:387–91
 42. Harish G, Venkateshappa C, Mythri RB, et al (2010) Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: implications for Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem* 18:2631–8
 43. Yang HY, Lee TH (2015) Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep* 48:200–8
 44. Dolai DP, Dey SK, Dash SK, et al (2016) Study the chromium-induced oxidative stress on mitochondria from liver and lungs origin. *Am J Appl Sci Res* 2:59–64
 45. Soudani N, Bouaziz H, Sefi M, et al (2013) Toxic effects of chromium (VI) by maternal ingestion on liver function of female rats and their suckling pups. *Environ Toxicol* 28:11–20
 46. García-Niño WR, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, et al (2015) Oxidative stress markers and histological analysis in diverse organs from rats treated with a hepatotoxic dose of chromium (VI): effect of curcumin. *Biol Trace Elem Res* 167:130–45



SABC

SOCIETE ALGERIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

D114

ATTESTATION de COMMUNICATION

LE COMITE SCIENTIFIQUE CERTIFIE QUE

SAIDI MALIKA

A PARTICIPE AU 7^{ème} CONGRES DE LA BIOLOGIE MEDICALE ET MEDECINE DE LABORATOIRE ORGANISE LE 6 ET 7 MAI 2018
A ALGER PAR UNE COMMUNICATION AFFICHEE, INTITULEE :
EFFETS D'HEMATOTOXICITE DU CHROME CHEZ LES RATS MALES WISTAR

Co-auteurs : SAKA. SAAD

Président du comité scientifique
Pr IMESSAOUDENE Belaid
Président Société Algérienne
de Biologie Clinique

LES 4^{ÈMES} JOURNÉES SCIENTIFIQUES INTERNATIONALES DE L'ISBM

STRESS OXYDATIF, INFLAMMATION ET MALADIES CHRONIQUES

Attestation de Participation



Le comité scientifique des 4^{èmes} Journées Scientifiques Internationales de l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (JS-ISBM) - tenues à Hôtel Skanes Sérail, Monastir, du 16 au 18 Février 2018, atteste que:

Malika SAIDI

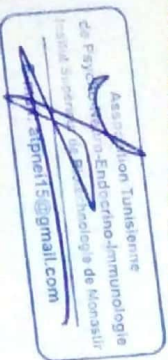
a participé activement aux journées et a présenté une communication par affiche intitulée:

POTASSIUM DICHROMATE INDUCED CARDIOTOXICITY AND INFLAMMATION IN RAT MODEL

Saidi Malika, Saka. Saad

Présidente de l'AT-PNEI

Pr. Besma BEL HAJ JRAD-TENSAOUT



Président du comité scientifique

Pr. Boulbaba SELMI





atpbe
Association Tunisienne de Physiologie
et de Biosurveillance de L'Environnement



Certificate of participation

We affirm that

Mr, Mrs : Malika Saidi

has presented a **poster presentation** entitled

« *Toxicity effect of potassium dichromate induce acute oxidative damage in wistar rats* »

At the 6th International Congress of Physiology and Environmental
Biomonitoring 18-21 December 2017, Douz, Tunisia





Republique Algérienne Démocratique et Populaire
Centre Hospitalo-Universitaire de Batna, Algérie

Service de Néphrologie - Dialyse et transplantation rénale

7^{ÈME} CONGRÈS INTERNATIONAL DE NÉPHROLOGIE
LE REIN FEDERATEUR DES SPECIALITES
26,27 et 28 AVRIL 2018, AU CLS KECHIDA-BATNA

ATTESTATION DE COMMUNICATION

Le Président de la séance atteste que

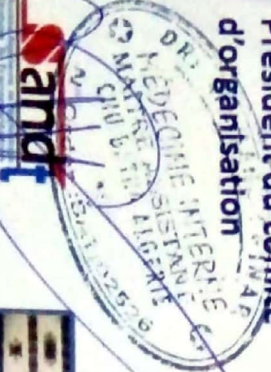
L'auteur : SAÏDI HADILYA.

Co-auteur : SAKA Saad, Aouachouir W

a présenté une communication affichée intitulée:

Rénoxicité du chrome hexavalent chez des rats wistar = étude histopathologique et biochimique

Président du comité d'organisation



Président de la séance



président du comité scientifique



[Handwritten signature]





ARGONAUTES



RAB 2018



الجمعية العلمية للبيولوجيا الزراعية
S.A.A.B. (SOCIÉTÉ ALGERIENNE DE BILOGIE AGRICOLE)

Attestation de participation

Attribuée à Mr/Mme *S.A.I.D.I. Malika*

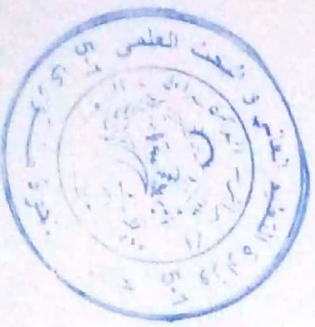
Pour avoir participé au congrès international : **les Rencontres de l'Agriculture et de la Biologie (RAB).**

Période du *05*... au *07*... mai 2018.

Et a présenté son travail par une communication orale/affichée intitulée :

..... *Antioxidative effects of Curcuma longa against heavy metal in Wistar rats.*

Coauteurs : *Aouacheni, Waouia, Derbal, Sara, Saka, Saad*



Président du Congrès
Dr Chouaib MEZIADI





République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

LE DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ORGANISE



Le Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »

Attestation de participation

Le président du **Premier Séminaire International** sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »

organisé le **16 - 17 Octobre 2018**, atteste que Mlle/Mm/Mr. : **SAIDI Malika** a présenté une

communication Affichée intitulée : **Oral administration of curcuma relieves hepatotoxicity in male Wistar rats**

Co-auteurs: SAKA Saad, AOUCHERI Wassila

PRÉSIDENT DU SÉMINAIRE

