

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE
LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* Turrill (Acanthaceae) en traitement curatif contre quelques altérations de la fonction de reproduction induites par la nicotine chez le rat

MEMOIRE

Rédigé en vue de l'obtention du Master-ès Sciences en Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

FANGNWOU TCHIADJIE Grace Divine

Matricule : 18F2881

Licenciée-ès Sciences



Sous la direction de
NGOUATEU Omer Bébé

Chargé de Cours

Année 2024



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE
LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* Turrill (Acanthaceae) en traitement curatif contre quelques altérations de la fonction de reproduction induites par la nicotine chez le rat

MEMOIRE

Rédigé en vue de l'obtention du Master-ès Sciences en Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

FANGNWOU TCHIADJIE Grace Divine

Matricule : 18F2881

Licenciée-ès Sciences

Sous la direction de
NGOUATEU Omer Bébé

Chargé de Cours

Année 2024

DEDICACE

A mes parents,

TCHIADJIE MELAZA Blaise

et

TCHIENDO NGEUYEP Odile

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier **l'Eternel Dieu Tout Puissant** de m'avoir guidée, inspirée et soutenue tout au long de ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes. Je tiens à exprimer toute ma gratitude :

- Au **Docteur NGOUATEU Omer Bébé** pour avoir accepté d'encadrer ce travail de recherche. Votre soutien et vos conseils ont été essentiels dans la réalisation de ce travail ;
- Au **Professeur JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE** pour votre soutien et vos conseils qui ont grandement contribué à enrichir ce travail et à le faire avancer ;
- Au Directeur Général du centre de Schistosomiasés et Parasitologie de Yaoundé (CSP), le **Professeur TCHUEM TCHUENTE Louis Albert** qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et mis à notre disposition le matériel et les équipements qui ont contribué à la réalisation des différents dosages biochimiques ;
- Aux enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de l'Université de Yaoundé I pour leur encadrement et leurs encouragements ;
- Aux **Docteurs FASSI Joseph, FEMOE Ulrich, FEUSSOM Nestor, KENFACK Christian, OWONA Pascal, TCHEUTCHOUA Yannick** pour le soutien et les remarques constructives qui ont contribué au bon déroulement de ce travail ;
- A tous mes aînés académiques de laboratoire en particulier : **FIFEN Rodrigue, HAOUA, KAHOU Rivaldo, KENGNE Ségolène, NKONDO Emilienne, MAGNE Thérèse, MBOLANG Lohik, SIMO Emmanuel**, pour l'assistance lors des différentes manipulations ;
- A mes camarades de promotion: **BINZDI Micheal, BOUGUEM Cynthia, CHOUOLA Ashley, DONFOUET Alvine, MEULADJE Ferdinand, SAMBA Béranger, TALLA Jude, WAGA Gaston et WAMBA Déliot** pour leur assistance ;
- A ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée notamment : mes frères **AGBOR Dylan, NGASSA Validole, NYUYDINKONG Author, TCHIADJIE Daniel, TCHIADJIE Emmanuel, TCHIADJIE Gédéon, TCHIADJIE Joël, TCHIADJIE Josias**, ma cousine **KAMENI Marlyse**, mon cousin **TEDJOU Francise** et mon oncle **Monsieur TCHEMENI Joseph**.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	VIII
RESUME	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I.1- GENERALITES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE L'APPAREIL	
REPRODUCTEUR MALE	3
I.1.1-Testicule	3
I.1.2- Voies génitales mâles.....	7
I.1.3- Glandes annexes.....	8
I.1.4 -Scrotum	9
I.1.5- Verge	9
I.2- COMPORTEMENT SEXUEL	10
I.2.1- Acte sexuel masculin.....	10
I.2.2- Rôle des androgènes dans le comportement sexuel	10
I.3- SPERME	10
I.4- ETIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFERTILITE MASCULINE	11
I.4.1- Causes hypothalamo- hypophysaires ou pré testiculaires de l'infertilité masculine.....	11
I.4.2- Causes gonadiques ou testiculaires de l'infertilité masculine.....	12
I.4.3- Causes post- testiculaires/ problèmes de transport des spermatozoïdes	12
I.4.4- Causes environnementales	13
I.5- STRESS OXYDANT ET INFERTILITE	13
I.6- PRISE EN CHARGE DE L'INFERTILITE MASCULINE.....	14
I.6.1- Prise en charge par la médecine conventionnelle	14
I.6.2-Prise en charge par la phytothérapie	15
I.7- GENERALITES SUR <i>Graptophyllum glandulosum</i>	15
I.7.1-Systématique	15
I.7.2- Description et répartition géographique.....	16
I.7.3- Usages ethnobotaniques et travaux scientifiques antérieurs	16

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	15
II.1- MATERIEL.....	17
II.1.1- Matériel végétal	17
II.1.2- Matériel animal.....	17
II.2- METHODES	18
II.2.1- Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> et détermination de la dose équivalente.....	18
II.2.2- Répartition et traitement des animaux	19
II.2.3- Evaluation des effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur le comportement sexuel des rats	19
II.2.4- Sacrifice des rats et collecte des échantillons	20
II.2.5- Réalisation des homogénats testiculaires et péniers.....	21
II.2.6- Détermination du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes	21
II.2.7- Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes	22
II.2.8- Evaluation des effets du traitement à l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur quelques marqueurs androgéniques	22
II.2.9- Evaluation des effets du traitement à l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur quelques marqueurs du stress	26
II.2.10- Réalisation des coupes histologiques.....	27
II.2.11 Analyses statistiques	29
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	15
III.1- RESULTATS.....	31
III.1.1- Effets de la nicotine sur la concentration sérique de testostérone au jour 28.....	31
III.1.2- Effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur le comportement sexuel des rats mâles.....	31
III.1.3- Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur les masses relatives de quelques organes	34
III.1.4 Effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur quelques marqueurs biochimiques androgéniques	37
III.1.5- Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur quelques marqueurs du stress.....	39
III.1.6- Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur quelques paramètres des spermatozoïdes.....	40
III.1.7- Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur la structure des épидидymes et des testicules	41
III.2- DISCUSSION	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
REFERENCES	44

ANNEXES 44

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Appareil reproducteur masculin.....	3
Figure 2: Coupe transversale d'un testicule.	4
Figure 3: Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig.	5
Figure 4: Etapes de la spermatogénèse.....	6
Figure 5: Photographie de <i>Graptophyllum glandulosum</i>	17
Figure 6: Protocole de préparation de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i>	18
Figure 7: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la testostérone sérique.	23
Figure 8: Courbe d'étalonnage pour le dosage des nitrites.	24
Figure 9 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.	25
Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase.	26
Figure 11 : Schéma synoptique du protocole expérimental.	30
Figure 12 : Effets de la nicotine sur la concentration sérique de testostérone au jour 28.	31
Figure 13: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur les temps de latence de monte (A), d'intromission (B) et d'éjaculation (C) au cours du test de monte.	33
Figure 14: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur les fréquences de monte (A), d'intromission(B), d'éjaculation(C).....	34
Figure 15 : Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur la concentration sérique de testostérone.	37
Figure 16 Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur la concentration des protéines testiculaires.....	38
.Figure 17 : Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur la concentration des nitrites péniers.	38
Figure 18: Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur le taux de MDA testiculaires.	39
Figure 19: Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur le taux de catalase testiculaires.....	40
Figure 20: Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur les paramètres des spermatozoïdes.	41
Figure 21: Effets de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur la structure de l'épididyme et du testicule (HE, 100X).	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition et traitement des animaux	19
Tableau II: Mode opératoire du dosage de la testostérone	23
Tableau III : Protocole de dosage des nitrites	24
Tableau IV: Protocole de dosage des protéines totales.....	25
Tableau V: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage de la catalase.....	26
Tableau VI: Protocole de déparaffinage	29
Tableau VII: Etapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine	29
Tableau VIII: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Graptophyllum glandulosum</i> sur les masses relatives des organes.....	36

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
CAT	: Catalase
DEH	: Dose Equivalente chez l'Humain
DPPH	: 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EROs	: Espèces Réactives de l'Oxygène
GMPc	: Guanosine 3',5' mono phosphate cyclique
GnRH	: <i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
GTP	: Guanosine triphosphate
HRP	: <i>Horseradish peroxidase</i>
MDA	: Malondialdéhyde
NO	: <i>Nitrogen monoxyde</i>
IAM	: Indice d'anomalies multiples

RESUME

Le tabagisme est associé à une détérioration de la qualité des spermatozoïdes en termes de mobilité, de concentration et de morphologie, qui sont les paramètres les plus fréquemment utilisés en milieu clinique pour évaluer la fertilité masculine. La prise en charge de ces troubles implique l'hormonothérapie et les vitamines. Certains de ces traitements induisent des effets indésirables d'où la nécessité d'explorer d'autres alternatives thérapeutiques telle que la phytothérapie. *Graptophyllum glandulosum* est une plante utilisée traditionnellement pour traiter l'infertilité. La présente étude avait pour objectif d'évaluer les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *G. glandulosum* en traitement curatif contre quelques altérations de la fonction de reproduction induites par la nicotine chez le rat. Pour ce faire, 35 rats âgés de 8 à 10 semaines ont été répartis en 2 groupes : le groupe 1 recevait le NaCl 0,9 % et le groupe 2 recevait la solution de nicotine (1mg/kg) quotidiennement pendant 28 jours. Après 28 jours d'administration des solutions, 5 rats normaux et 5 rats malades ont subi le test de monte. Ils ont été par la suite sacrifiés pour la vérification de l'installation de la pathologie. Une fois la pathologie installée, les animaux ont été répartis en 7 groupes de 5 rats chacun et ont été traités pendant 28 jours comme suit : le groupe témoin normal recevait de l'eau distillée (10 ml/kg) et du NaCl 0,9 %; le groupe témoin positif recevait le citrate de clomifène (1ml/kg) et la nicotine (1mg/kg); le groupe témoin négatif recevait de la nicotine (1 mg/kg) et du NaCl 0,9 % ; 3 groupes test recevaient l'extrait aux doses de 75 ; de 150 et de 300 mg/kg et la nicotine (1mg/kg). Le groupe témoin réversible recevait de l'eau distillée pendant la durée du traitement. L'extrait et l'eau distillée ont été administrés par voie orale tandis que la nicotine et le NaCl 0,9 % ont été administrés par voie sous cutanée. Le test de monte a été réalisé en trois séries (au jour 0, jour 28 et jour 56) avec les femelles ovariectomisées dont l'œstrus a été chimiquement induit. Au jour 57, les animaux ont été sacrifiés, le sang a été recueilli, les testicules, épидидymes, prostates, vésicules séminales et pénis ont été prélevés et leurs masses relatives ont été déterminées. Les spermatozoïdes épидидymaires ont été comptés et quelques analyses biochimiques (testostérone, protéines, nitrites, MDA, CAT) et histologiques (testicules, épидидymes) ont été effectués. L'extrait aqueux de *G. glandulosum* a augmenté la motivation et la performance sexuelles chez les rats. Le taux de testostérone sérique a non significativement augmenté ($p > 0,05$) à la dose de 150 mg/kg de 36,81 %. Les taux de protéines testiculaires et de nitrites pénien ont significativement augmenté ($p < 0,001$) de 44,85 % et de 32,17% respectivement. Le taux de MDA et l'activité de la catalase testiculaire ont significativement augmenté à la dose 300 mg/kg 1 fois ($p < 0,001$) et de 3 fois ($p < 0,05$) à la dose 150 mg/kg respectivement. La dose 150 mg/kg a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$), du nombre, et de la viabilité des spermatozoïdes respectivement de 2 fois et 1 fois. La mobilité des spermatozoïdes a augmenté à la dose 75 mg/kg de 3 fois ($p < 0,001$). Ces résultats suggèrent que l'extrait de *G. glandulosum* posséderait des propriétés aphrodisiaque et antioxydante ce qui justifierait son utilisation empirique pour le traitement de quelques altérations de la fonction de reproduction masculine.

Mot clés: nicotine ; infertilité masculine ; extrait aqueux; *Graptophyllum glandulosum*

ABSTRACT

Smoking is associated with a deterioration in sperm quality in terms of motility, concentration and morphology, which are the most frequently used parameters in clinical settings to assess male fertility. The management of these disorders involves hormone therapy and vitamins. Some of these treatments induce adverse effects, hence the need to explore other therapeutic alternatives such as phytotherapy. *Graptophyllum glandulosum* is a plant traditionally used to treat infertility. The objective of this study was to evaluate the effects of the aqueous extract of *G. glandulosum* leaves as a curative treatment on some nicotine-induced alterations in reproductive function in rats. To do this, 35 rats aged 8 to 10 weeks were divided into 2 groups: group 1 received NaCl 0.9% and group 2 received nicotine solution (1mg/kg) daily for 28 days. After 28 days of administration of the solutions, 5 normal rats and 5 diseased rats underwent the breeding test. They were then sacrificed for the verification of the installation of the pathology. Once pathology had set in, the animals were divided into 7 groups of 5 rats each and were treated for 28 days as follows: the normal control group received distilled water (10 ml/kg) and 0.9% NaCl; the positive control group received clomiphene citrate (1 ml/kg) and nicotine (1 mg/kg); the negative control group received nicotine (1 mg/kg) and NaCl 0.9%; 3 test groups received the extract at doses of 75; 150 and 300 mg/kg and nicotine (1mg/kg). The reversible control group received distilled water for the duration of treatment. The extract and distilled water were administered orally while nicotine and 0.9% NaCl were administered subcutaneously. The breeding test was carried out in three series (on day 0, day 28 and day 56) with ovariectomized females whose estrus has been chemically induced. On day 57, the animals were sacrificed, blood was collected, testes, epididymis, prostates, seminal vesicles, and penises were collected, and their relative masses were determined. Epididymal spermatozoa were counted and some biochemical (testosterone, proteins, nitrites, MDA, CAT) and histological (testes, epididymis) analyses were performed. Aqueous extract of *G. glandulosum* increased sexual motivation and performance in rats. Serum testosterone levels were not significantly increased ($p > 0.05$) at 150 mg/kg by 36.81%. Testicular protein and penile nitrite levels significantly increased ($p < 0.001$) by 44.85% and 32.17% respectively. MDA levels and testicular catalase activity were significantly increased at 300 mg/kg 1-fold ($p < 0.001$) and 3-fold ($p < 0.05$) at 150 mg/kg, respectively. The 150 mg/kg dose resulted in a significant increase ($p < 0.001$) in sperm count and viability by 2-fold and 1-fold respectively. Sperm motility increased at 75 mg/kg by 3-fold ($p < 0.001$). These results suggest that *G. glandulosum* extract may have aphrodisiac and antioxidant properties, which would justify its empirical use for the treatment of some alterations in male reproductive function.

Keywords: nicotine; male infertility; aqueous extract; *Graptophyllum glandulosum*

INTRODUCTION

Les altérations de la fonction de reproduction telles que l'oligospermie, l'asthénospermie et la nécropermie peuvent entraîner l'infertilité masculine (Peyronel, 2021). L'infertilité est une affection du système reproducteur masculin ou féminin, définie comme l'incapacité d'obtenir une grossesse après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés (Njiagi *et al.*, 2023). Au sein d'un couple, l'infertilité peut être d'origine exclusivement féminine, masculine ou mixte. Au monde, 15 % des couples nouvellement mariés consultent pour le problème d'infertilité et parmi eux, la cause masculine est environ 20 à 70% (Epoupa *et al.*, 2023). L'infertilité touche 17,50 % de la population adulte et 16,40 % de la population en Afrique-sub saharienne (Njiagi *et al.*, 2023). Au Cameroun, la prévalence de l'infertilité masculine était de 10,08 % à l'Hôpital Central de Yaoundé (Fouda *et al.*, 2022) et de 11,90 % dans trois hôpitaux de la ville de Douala (Ngalle *et al.*, 2023). L'infertilité peut être d'origine congénitale, hormonale, environnementale ou due au tabagisme, (Jungwirth *et al.*, 2015; Peyronel, 2021).

La nicotine, un alcaloïde naturel présent dans la plante *Nicotiana tabacum*, est considérée comme un composant important des cigarettes. Elle est principalement consommée en chiquant, par le biais de cigarettes, de pipes ou de cigares. Les gommes à mâcher à la nicotine et les patchs dermiques sont également d'autres façons de consommer la nicotine (Akomolafe *et al.*, 2017). La nicotine est rapidement absorbée par voie respiratoire, par la muqueuse buccale et la peau (Oyeyipo *et al.*, 2014). Ses effets sur le système reproducteur masculin incluent la diminution du nombre, de la motilité, et de la survie des spermatozoïdes (Arabi, 2004) ainsi que l'inhibition de la biosynthèse des androgènes pouvant ainsi provoquer l'infertilité masculine (Kim *et al.*, 2005). De plus, la nicotine génère les radicaux libres responsables de la peroxydation des cellules de Leydig et donc une chute du taux de testostérone et par conséquent une perte de la libido (Oyeyipo *et al.*, 2014).

Plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées de nos jours pour la prise en charge de l'infertilité masculine. Il s'agit entre autres des technologies de procréation assistée, l'hormonothérapie et la prise d'aphrodisiaque (Khallouk *et al.*, 2010). Malgré le fait que ces traitements soient efficaces, ils induisent cependant les effets secondaires tels que des affections respiratoires, gastro-intestinales et des affections des organes de reproductions (Haute Autorité de Santé, 2015) d'où l'utilisation des plantes médicinales en l'occurrence de *Graptophyllum glandulosum* Turrill. Les études antérieures ont montré l'efficacité de certaines plantes dans le traitement des altérations de la fonction de reproduction telles que *Zingiber officinale*, *Nymphaea lotus* (Kameni *et al.*, 2016), *Hibiscus asper* (Tsakem *et al.*, 2023). *Graptophyllum glandulosum* est une plante de la famille des Acanthaceae qui est consommée sous forme de décoction au Cameroun pour le traitement de nombreuses maladies. Plusieurs rapports ethnobotaniques ont souligné l'importance pharmacologique des feuilles et racines de *Graptophyllum glandulosum* qui sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter : les plaies, les abcès, l'infertilité masculine et les maladies de la peau (Tagousop *et*

al., 2018). Dans le but d'apporter des bases scientifiques à l'utilisation traditionnelle de *Graptophyllum glandulosum* pour le traitement des troubles de la fonction de reproduction mâle, l'objectif principal de la présente étude était d'évaluer les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* en traitement curatifs sur quelques altérations de la fonction de reproduction induites par la nicotine chez le rat Wistar. Il était question de :

- déterminer les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur le comportement sexuel des rats mâles ;
- évaluer l'activité antioxydant de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques organes androgénodépendants ;
- évaluer le potentiel androgénique de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum*.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1- GENERALITES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR MALE

L'appareil génital masculin est constitué de différents organes, ayant des fonctions bien définies, tels que : les gonades, les voies génitales intra testiculaires (les tubes droits et le rete testis), les voies génitales extra testiculaire (la cônes efférents, canal épидидymaire, les canaux déférents, le canal éjaculateur), les glandes annexes (glande de Cowper, prostate, vésicules séminales) et l'organe copulateur (pénis) (Mumbere *et al.*, 2021) (Figure 1).

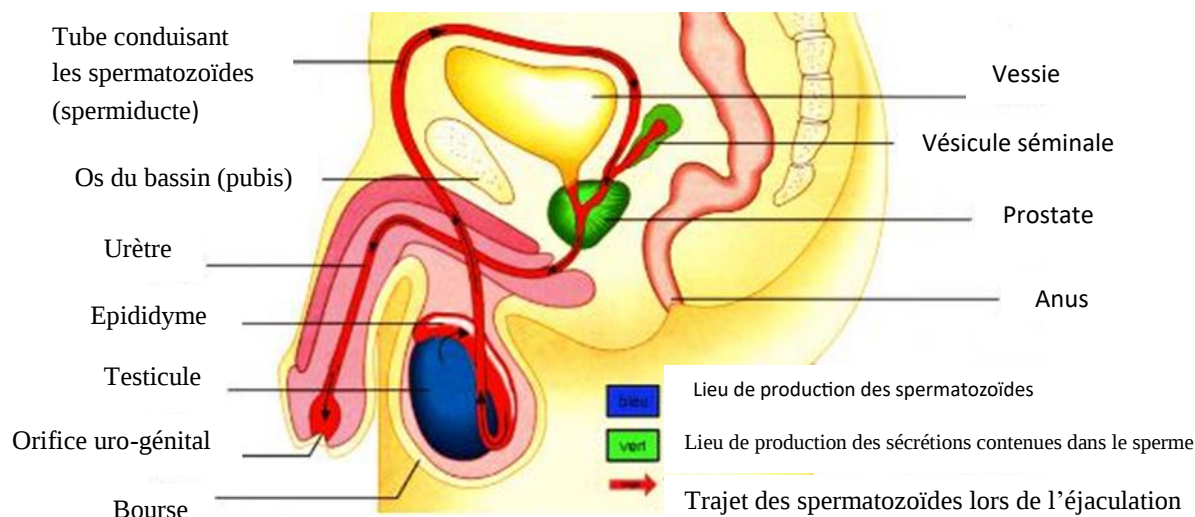


Figure 1: Appareil reproducteur masculin (Blomberg, 2014).

I.1.1-Testicule

Le testicule (Figure 2) est un organe pair de forme ovoïde logé chez les mammifères dans la bourse ou scrotum. Il est entouré d'une tunique épaisse formée d'un tissu conjonctif fibreux appelé albuginée (Zerioush, 2010). Une coupe transversale du testicule présente 250 à 300 lobules contenant chacun 1 à 4 tubes séminifères (Godiot, 2016). Dans un tube séminifère, on trouve des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules nourricières appelées cellules de Sertoli. Cette association entre cellules germinales et cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère (Godiot, 2016). L'épithélium séminifère repose sur une lame basale constituée de cellules myoïdes péri tubulaires dont les contractions participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles du testicule. Dans un tube séminifère, les cellules germinales les moins différenciées sont situées du côté basal et les plus différenciées du côté apical vers la lumière du tube (Zerioush, 2010). Entre les tubes séminifères et spécifiquement autour des vaisseaux sanguins, se trouvent des cellules de Leydig ou cellules interstitielles responsable de la production de testostérone dans le testicule. Les testicules exercent une double fonction : une fonction exocrine qui assure la

production des spermatozoïdes et une fonction endocrine qui est responsable la synthèse des androgènes (Vargas, 2021).

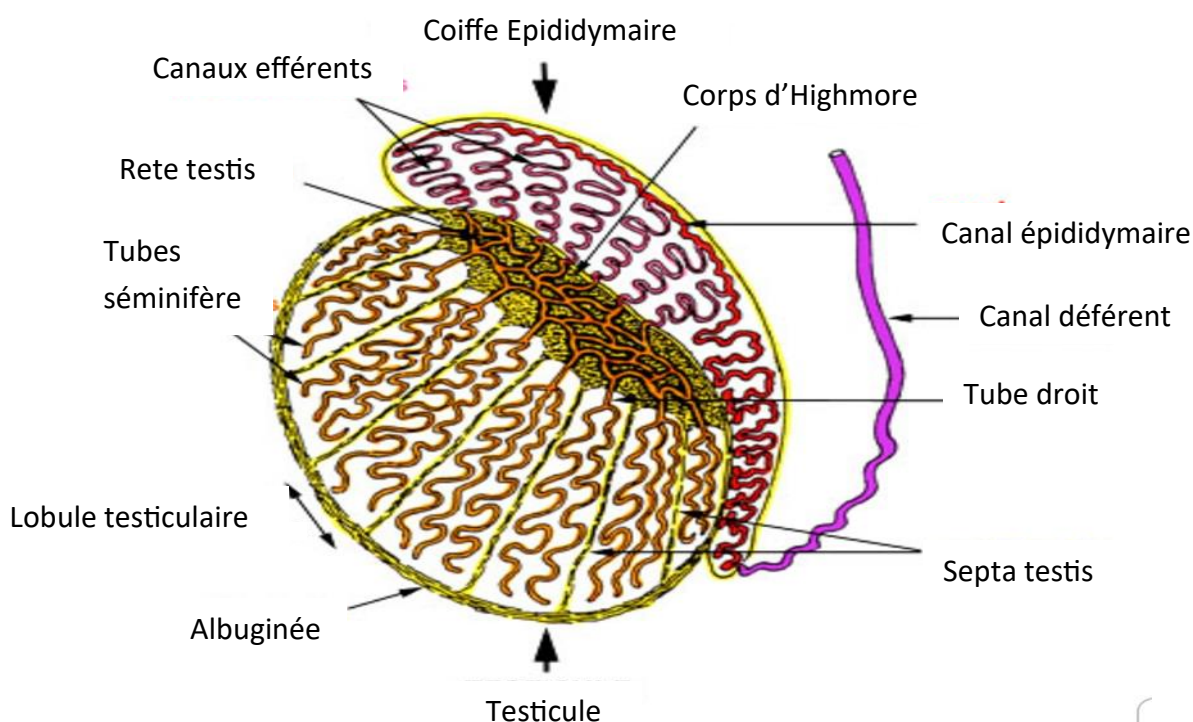


Figure 2: Coupe transversale d'un testicule (Young, 2016).

I.1.1.1- Fonction endocrine du testicule : la stéroïdogénèse

La fonction endocrine du testicule est exercée par les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli. Les cellules de Leydig assurent la sécrétion endocrine des stéroïdes (95 % de la testostérone plasmatique). Elles synthétisent la testostérone et autres intermédiaires (la dihydrotestostérone, la 17 betaœstradiol) à partir du cholestérol (Eecke, 2019). Les cellules de Sertoli immatures chez le fœtus secrètent l'hormone anti-müllérienne (AMH) qui est responsable de la régression des canaux de Müller (Eecke, 2019).

La testostérone est produite par les cellules de Leydig à partir du cholestérol extrait de la fraction de faible densité (LDL) des lipoprotéines plasmatiques. Elle peut aussi être synthétisée à partir de l'acétate (Rommerts, 1998). Le transport du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne des mitochondries dans les cellules de Leydig, est assuré par la «steroidogenic acute regulatory protein » («StAR protein») (Clark et Henderson, 2003). Une fois dans la mitochondrie, le cholestérol (C7) subit une coupure de sa chaîne latérale en présence d'un complexe enzymatique comportant un cytochrome P450 scc (« side chaîne clivage »). Ce qui aboutit à la formation de la prégnénolone (C 21) qui est transférée vers les microsomes du réticulum endoplasmique où se poursuit la stéroïdogénèse (Rosner, 1991). Deux voies existent à partir de la prégnénolone : la voie $\Delta 4$ et la voie $\Delta 5$.

- La voie $\Delta 4$ permet la synthèse de la progestérone grâce au complexe 3β -hydroxydésydrogénase / $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomérase. La progestérone est hydroxylée en 17α -hydroxyprogestérone. Le cytochrome P450C17 la transforme en androstènedione, puis en testostérone.
- La voie $\Delta 5$ a pour premier composé intermédiaire la 17α -hydroxyprégnénolone. Elle fait intervenir le cytochrome P450C17. Le clivage latéral fait apparaître un premier stéroïde la déhydroépiandrostérone (DHEA). Le complexe 3β -hydroxydésydrogénase / $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomérase la transforme en androstènediol, puis en testostérone. La voie $\Delta 4$ peut rejoindre la voie $\Delta 5$ grâce à la 3β hydroxydésydrogénase. La voie $\Delta 5$ est préférentielle chez l'homme et l'autre chez le rat (Figure 3) (Lumbroso *et al.*, 1996).

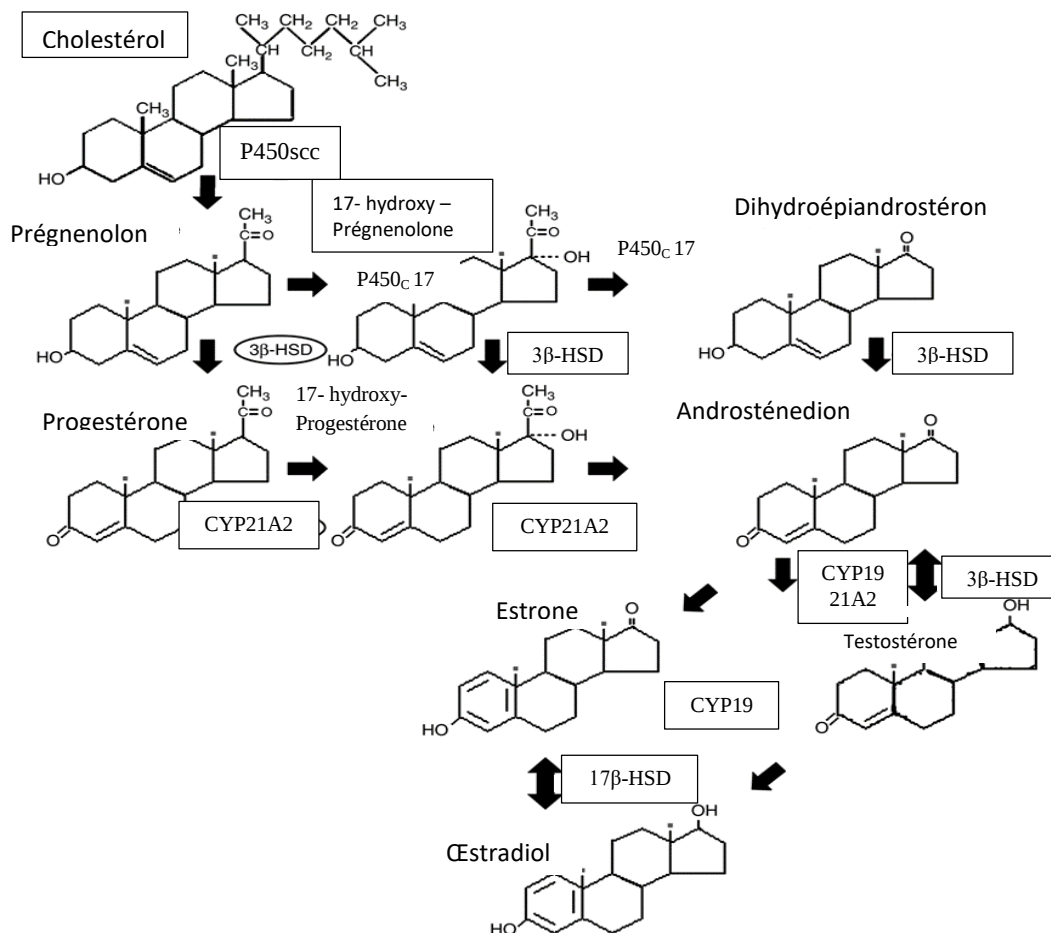


Figure 3: Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig (Luetjens et Weinbauer, 2012).

CYP21A2 : cytochrome p21 ; 3β -HSD : 3beta hydroxy stéroïde désydrogénase 17β -HSD: 17 beta hydroxy stéroïde désydrogénase ; P450 ; cytochrome p45

I.1.1.2- Fonction exocrine du testicule : la spermatogénèse

La spermatogénèse est un processus de division et de différenciation cellulaire par lequel les spermatozoïdes sont produits à partir des spermatogonies situées dans les tubes séminifères des testicules (Laceb *et al.*, 2022). Les tubes séminifères sont organisés de manière à ce que les phases de la spermatogénèse

se déroulent de la paroi vers la lumière du tube. Les spermatogonies sont situées à la base du tube, au niveau de l'épithélium séminifère tandis que les cellules plus différenciées, les spermatozoïdes, se trouvent au niveau de la lumière du tube (Varga, 2021). Chez l'homme, la spermatogenèse dure 74 jours et entre 52 à 53 jours chez le rat. La spermatogenèse (Figure 4) comprend 4 phases successives : la phase de multiplication, la phase d'accroissement, la phase de maturation et la phase de différenciation ou spermiogénèse (Nishimaru et Hernault, 2017).

- **La phase de multiplication** : dans cette phase, les spermatogonies vont subir une succession de divisions mitotiques pour former d'autres spermatogonies (Godiot, 2016).
- **La phase d'accroissement** : ici, les spermatogonies (surtout de type B) subissent une phase de croissance cytoplasmique et forment les spermatocytes I à $2n$ chromosomes (Kato *et al.*, 2004).
- **La phase de maturation** : cette phase se fait grâce à des divisions méiotiques réductionnelles puis équationnelles. Ainsi, la première division méiotique (réductionnelle) permet de passer d'un spermatocyte I à 2 spermatocytes II à n chromosomes bichromatidiens. La deuxième division méiotique (équationnelle) permet de passer d'un spermatocyte II à 2 spermatides à n chromosome mono-chromatidiens. (Champroux, 2018).
- **La spermiogénèse/différenciation** : C'est la dernière phase de différenciation ; étape capitale pendant laquelle la spermatide se transforme en spermatozoïde définitif, c'est-à-dire il perd son cytoplasme superflu et est doté d'une queue. Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité ainsi que leur pouvoir fécondant au cours de la traversée de l'épididyme et du canal déférent. Ce pouvoir fécondant n'est d'ailleurs complet qu'après le parcours des voies génitales féminines : c'est la capacitation (Arimitsu *et al.*, 2011).

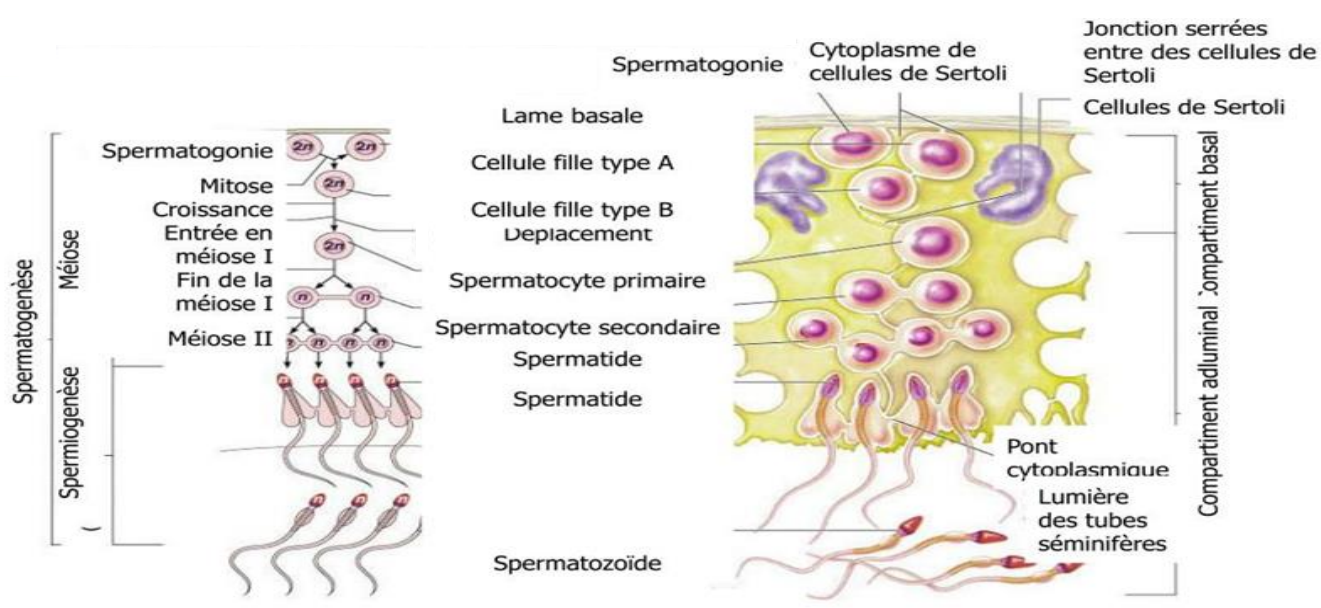


Figure 4: Etapes de la spermatogenèse (Alexandre, 2018).

I.1.1.3- Régulation des fonctions testiculaires

Les fonctions endocrine et exocrine sont soumises à un contrôle hormonal hypothalamo hypophysaire via la production de deux gonadostimulines : l'Hormone Folliculo Stimulante (FSH) et l'Hormone Lutéinisante (LH), mais aussi via un contrôle local.

I.1.1.3.1- Régulation neuroendocrine

- **Gonadolibérine ou Hormone de Libération des Gonadotrophines**

La gonadolibérine est une neurohormone hypothalamique qui contrôle la libération de la FSH et de la LH au niveau de l'antéhypophyse. Sa sécrétion est contrôlée majoritairement par la testostérone qui l'inhibe par « feed back » négatif, exercé au niveau du complexe hypothalamo hypophysaire (Caraty *et al.*, 2001).

- **Hormone Lutéinisante**

La LH et son homologue placentaire « human Chorionic Gonadotrophine » (hCG) sont les principales hormones qui régulent le développement et la fonction des cellules de Leydig. La LH est aussi appelée « Interstitial Cell Stimulating Hormone » (ICSH). Elle stimule la stéroïdogénèse en se liant à un récepteur couplé à une protéine G (Sarz *et al.*, 1995).

- **Hormone Folliculo Stimulante**

La FSH est une hormone glycoprotéique qui agit principalement sur les cellules de Sertoli, influençant ainsi le développement de certaines cellules germinales. Pendant la vie prénatale et pré pubertaire, la FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli. A la puberté, la FSH s'associe à la testostérone pour initier et maintenir la spermatogenèse (Saez, 1994).

I.1.1.3.2- Régulation locale par la testostérone

La testostérone maintient la spermatogenèse et s'associe avec la FSH à son initiation (Wöleinbauer et Nieschlag, 1993). Des facteurs sertoliens (IL- 1, IGF- 1, TGF $-\beta$, l'inhibine et l'ABP) exercent un contrôle local sur le taux de testostérone intra testiculaire en agissant sur les récepteurs de la LH (Lejeune *et al.*, 1994).

I.1.2- Voies génitales mâles

I.1.2.1- Voies spermatiques intra-testiculaires

On distingue :

- **Les tubes droits** : sont des conduits de 1cm de long, tapissés histologiquement d'un épithélium simple cubique ou aplati. Ce sont des canaux excréteurs de lobules. Les canalicules séminifères contenus dans chaque lobule du testicule se réunissent et forment un tube droit. Les tubes droits sont beaucoup plus nombreux que les lobules (Terranova, 2004).
- **Le rete-testis** : est un réseau de canalicules creusés dans le corps d'Highmore où se jettent les tubes droits. Il est recouvert d'un épithélium cubique simple.

Ces deux voies spermatiques apparaissent comme des voies excrétrices du sperme. Les spermatozoïdes observés à ces niveaux ne sont pas doués de mouvement propre (Terranova, 2004).

I.1.2.2- Les voies spermatiques extra-testiculaires

- **Epididymes**

L'épididyme est impliqué dans le stockage des spermatozoïdes entre deux éjaculations (Ouanani, 2022). L'acheminement des spermatozoïdes vers le conduit déférent est assuré par contraction de la paroi musculaire de l'épididyme (Thibault, 2001). C'est lors de leur transit dans l'épididyme que les spermatozoïdes vont acquérir leur pouvoir fécondant (Boguenet, 2021).

- **Canaux déférents**

Les canaux déférents permettent d'acheminer les spermatozoïdes de l'anse épидидymo-déférentielle jusqu'à la prostate en se terminant par l'ampoule déférentielle et participent ainsi à l'élaboration du sperme (Hourié, 2016).

- **Urètre**

L'urètre est la portion terminale des voies génitales mâles. Il se divise en 3 parties : la partie prostatique, la partie intermédiaire et la partie pénienne qui passe dans le pénis et s'ouvre sur l'extérieur par le méat urétral. Il permet le transport de l'urine et du sperme (Marieb et Hoehn, 2016).

I.1.3- Glandes annexes

I.1.3.1-Vésicules séminales

Les vésicules séminales produisent un liquide appelé plasma séminal qui est évacué avec les sécrétions prostatiques lors de l'éjaculation. Il permet la maturation progressive des spermatozoïdes en leur assurant une protection antiinfectieuse et immunologique dans l'appareil génital masculin et féminin (Eecke, 2019).

I.1.3.2- Prostate

La prostate est une glande unique bilobée qui se situe sur le col de la vessie de part et d'autre de l'urètre. La prostate joue un rôle essentiel dans la synthèse et l'émission du liquide spermatique. Elle est entourée par des pédicules vasculonerveux participant à la réponse sexuelle masculine (nerfs caverneux et spongieux, artères pudendales accessoires et plexus veineux de Santorini (Baronne, 2001). Parmi ses constituants, le liquide prostatique renferme la spermine qui est une protéine responsable de l'odeur du sperme (Marieb et Hoehn, 2016).

I.1.3.3-Glande bulbo urétrale

Les glandes bulbo urétrales sont deux petites glandes en forme de pois localisé dans la partie inférieure de la prostate. Leurs sécrétions ont pour rôle d'une part de lubrifier la verge lors du coït, permettant d'éviter des lésions et d'autre part de neutraliser l'acidité de l'urètre avant le passage des spermatozoïdes (Trudel, 2020).

I.1.4 -Scrotum

Le scrotum est un sac à l'intérieur duquel sont logés les gonades mâles. Il joue un rôle protecteur des testicules et un rôle de maintien de la température ambiante au niveau testiculaire (quand il fait froid il se rétracte et quand il fait chaud il se dilate) (Fizazi, 2016).

I.1.5- Verge

La verge ou le pénis est l'organe masculin de la copulation. Elle est composée de trois parties : la racine, le corps, le gland. Elle est parcourue par l'urètre qui ouvre son extrémité distale, par le méat urétral qui permet aussi non seulement l'évacuation du sperme mais aussi des urines. La verge est constituée de deux corps caverneux et d'un corps spongieux qui participent à l'érection. La vascularisation artérielle est assurée par l'artère honteuse interne qui est une branche de l'artère hypogastrique (Bâali, 2020).

L'érection est un phénomène neuro-vasculaire faisant suite à 3 phénomènes essentiels à savoir : le relâchement de la musculature lisse ; la dilatation artérielle avec remplissage des sinusoides caverneux ; la restriction veineuse (Lasseny, 2018). Lors d'une stimulation (tactile, visuelle, auditive, imaginaire), parvenant à l'hypothalamus, ce dernier induit une inhibition du tonus sympathique et une augmentation de celle du parasympathique. Suite à cette stimulation parasympathique, il y a production et libération de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales et qui agit de façon paracrine sur les cellules musculaires lisses (Cartledge *et al.*, 2001). En effet, suite à sa fixation sur ses récepteurs membranaires de la cellule musculaire, le NO active la guanylate cyclase qui induit la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine mono phosphate cyclique (GMPc). Le GMPc active à son tour des protéines kinases spécifiques qui phosphorylent certaines protéines. Il s'en suit alors : l'ouverture des canaux potassiques avec sortie des ions potassium, ce qui provoque une hyperpolarisation ; la séquestration du calcium par le réticulum sarcoplasmique et la fermeture des canaux calciques voltage-dépendant, bloquant l'influx du calcium dans la cellule musculaire (Cartledge *et al.*, 2001).

L'hyperpolarisation et la baisse du taux de calcium intracellulaire résultant sont responsables de la relaxation des fibres musculaires de la paroi des artères (vasodilatation) et de celles formant les espaces sinusoidaux caverneux. Il s'en suit donc un remplissage de ces sinusoides et le développement de l'érection. Les sinusoides étant ainsi dilatés, vont exercer une compression des plexus veineux empêchant ainsi le retour veineux du sang permettant ainsi le maintien de l'érection. Lorsque le stimulus s'estompe ou après une éjaculation, on assiste à la fin de l'érection. En effet, la réactivité du système sympathique, et la dégradation

du GMPc par les phosphodiésterases de type 5 sont à l'origine de la myocontraction des muscles lisses caverneux et de la paroi des artères. Le pénis retrouve alors son état flaccide (Lasseny, 2018)

I.2- COMPORTEMENT SEXUEL

I.2.1- Acte sexuel masculin

L'acte sexuel masculin comporte deux composantes : l'érection ou durcissement du pénis normalement flasque ce qui permet sa pénétration dans le vagin, et l'éjaculation ou émission du sperme par le pénis en érection. De plus, la réponse sexuelle de l'homme répond à un cycle qui peut être divisé en quatre phases : la phase d'excitation qui comporte l'érection et l'exaltation du désir sexuel ; la phase de plateau durant laquelle les réponses précédentes deviennent plus intenses ; la phase d'orgasme qui comporte l'éjaculation et un plaisir physique intense ; la phase de résolution durant laquelle tout rentre à la normale (Sherwood, 2006). Chez un rat normal, les phénomènes copulatoires se déroulent selon la chronologie suivante (Bekker, 1996) :

- **La monte** : le rat mâle grimpe sur la femelle réceptrice en chaleur à partir du flanc arrière, et effectue des mouvements de poussée avec son bassin ;
- **L'intromission** : elle se déroule de manière similaire à la monte, mais immédiatement suivi d'une poussée pelvienne profonde lorsque le pénis pénètre dans le vagin.
- **L'éjaculation** : c'est le point cumulant de la pénétration vaginale. Elle est accompagnée d'un agrippement du mâle sur la femelle, et le plus souvent par un soulèvement des pattes antérieures. Le temps de latence entre l'éjaculation et la prochaine monte dure entre 3 à 5 minutes.

I.2.2- Rôle des androgènes dans le comportement sexuel

La testostérone agit soit directement en activant les récepteurs des androgènes (AR) via la 5 α - dihydrotestostérone ou indirectement en activant les récepteurs oestrogéniques (ER) après être aromatisée en 17 β œstradiol (Matsumoto *et al.*, 2003). Hull a montré qu'il existe une corrélation entre la libération de dopamine dans l'aire pré optique médiane pendant la période pré copulatoire et la capacité à copuler du rat mâle. Chez le rat mâle, la concentration de dopamine dans l'aire pré optique médiane est profondément abaissée après castration (Hull *et al.*, 1995). L'effet périphérique de la testostérone sur le mécanisme local de l'érection s'exercerait par l'intermédiaire de sa transformation en dihydrotestostérone (Lugg *et al.*, 1995). Le mécanisme de l'érection est exercé par le biais d'une androgéno-dépendance de la synthèse et de l'activité du monoxyde d'azote, principal neuromédiateur libéré au sein du tissu érectile en réponse à une stimulation sexuelle et responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses caverneuses (Park *et al.*, 1999).

I.3- SPERME

Le sperme est un fluide biologique complexe contenant un très grand nombre de substances secrétées à différents niveaux de l'appareil génital. Il contient les spermatozoïdes nécessaires à la fertilité de l'homme et

à la fécondation de l'ovule (Mumbere *et al.*, 2021). Les différents paramètres du sperme peuvent être évalués par un examen biologique appelé spermogramme (Khallouck *et al.*, 2010).

Lorsqu'un ou plusieurs des paramètres du spermogramme sont anormaux, l'infertilité sur la base d'un spermogramme peut être déclarée en prenant en compte plusieurs paramètres indiqués de la manière suivante chez l'homme (Khallouck *et al.*, 2010) :

- Le volume : il renseigne sur le fonctionnement du système glandulaire. Un faible volume ($< 2\text{mL}$) est appelé hypospermie et peut traduire un hypogonadisme, une testostérone plasmatique basse, une agénésie vésiculaire, une prostatite ou une vésiculite. Un volume élevé ($> 6\text{mL}$) est appelé hyperspermie et peut traduire une infection
- Le pH : l'éjaculation est un mélange de sécrétion prostatique acides et de sécrétion vésiculaires basiques. Un pH acide ($< 7,2$) traduit une insuffisance ou une absence de sécrétion vésiculaire. Un pH basique ($> 7,8$) évoque une insuffisance prostatique.
- L'absence totale des spermatozoïdes dans le sperme est l'azoospermie. Elle peut être d'origine obstructive (excrétoire) ou non obstructive (sécrétoire). Lorsque le nombre des spermatozoïdes est < 20 millions par millilitre, c'est une oligospermie ou oligozoospermie.
- La mobilité : l'asthénospermie ou l'asthénozoospermie est une diminution de la mobilité des spermatozoïdes par rapport aux valeurs normales.
- La vitalité : lorsque le taux de spermatozoïdes morts est élevé (spermatozoïdes vivants $< 60\%$), c'est la nécrospermie.
- La morphologie : un sperme normal contient plus de 30 % de spermatozoïdes normaux. L'identification, le dénombrement de différentes anomalies multiples. La fertilité commence à baisser significativement quand l'IAM est inférieur à 1,6.

Dans notre étude nous avons évalué le nombre, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes.

I.4- ETIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFERTILITE MASCULINE

I.4.1- Causes hypothalamo- hypophysaires ou pré testiculaires de l'infertilité masculine

La réalisation d'un bilan hormonal permet de découvrir certaines causes d'infertilité masculine comme les défauts de sécrétion hormonale au niveau de l'axe hypothalamo- hypophysaire qui peuvent être congénital. Comme exemple le syndrome de Kallmann de Morsier.

Le syndrome de Kallmann de Morsier est dû à la mutation de certains gènes situés sur le chromosome X et sur les autosomes. Ce syndrome associe un hypogonadisme hypogonadotrope (impubérisme), dû à un déficit en gonadolibérine (GnRH), et une anosmie. C'est une maladie du développement en rapport avec un défaut de la morphogenèse des bulbes olfactifs et l'arrêt de la migration des neurones synthétisant la GnRH

chez le fœtus (Dodé *et al.*, 2008). Elle est liée au développement embryonnaire du système olfactif. Le lien entre la perte de l'odorat et l'absence de synthèse de la GnRH chez les patients s'explique par l'existence transitoire de rapports topographiques étroits entre les neurones synthétisant cette hormone et le système olfactif périphérique au cours de l'embryogenèse chez les mammifères (Schwanzel-Fukuda, 1999).

I.4.2- Causes gonadiques ou testiculaires de l'infertilité masculine

Il s'agit des causes liées à une insuffisance testiculaire. Elles peuvent être congénitales comme la cryptorchidie.

La cryptorchidie est une anomalie fœtale de l'appareil masculin résultant d'un défaut de migration de l'un ou des deux testicules de l'abdomen vers les bourses. C'est l'anomalie congénitale la plus rencontrée de l'appareil génital male, 2-5 % chez les nouveau-nés. Cependant, son incidence diminue spontanément à l'âge de 3 mois 1-2 %. L'étiologie de la cryptorchidie est multifactorielle et inclut une disruption endocrinienne et la défection de plusieurs gènes. Dans les cas de non descente des testicules dans les bourses, on a la dégénérescence des cellules germinales après la première année de vie. Cette dégénérescence varie selon la position des testicules. Durant la seconde année, le nombre de cellules germinales diminue. Dans 10- 45 % de patients affectés, la perte complète des cellules germinales peut être détectée. Les paramètres du sperme sont souvent altérés chez les hommes avec une histoire de cryptorchidie (Jungwirth *et al.*, 2015).

I.4.3- Causes post- testiculaires/ problèmes de transport des spermatozoïdes

Les causes post testiculaires de l'infertilité masculine représentent l'ensemble des problèmes qui empêchent le cheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales de l'homme. Parmi ces causes, il y a l'obstruction des voies séminales qui peut être congénitale.

Dans ce cas, il y a soit une agénésie différentielle unilatérale ou des canaux éjaculatoires et l'agénésie vésiculo-déférentielle bilatérale congénitale. L'agénésie vésiculo-déférentielle bilatérale congénitale est due soit à la mutation du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), responsable d'une maladie, la mucoviscidose (ou fibrose kystique), soit à des anomalies de différenciation du canal du mésonéphros. Les vésicules séminales sont absentes ou atrophiées et les canaux déférents absents. Les individus atteints par cette anomalie présentent une azoospermie, un volume d'éjaculat faible et ayant un pH acide. Les marqueurs épидидymaires sont effondrés. Les testicules sont normaux et la spermatogenèse conservée. La tête de l'épididyme est conservée mais le corps et la queue sont occasionnellement présents (Khallouk *et al.*, 2010 ; Cocuzza *et al.*, 2013).

I.4.4- Causes environnementales

La consommation excessive de tabac peut causer une insuffisance testiculaire. En effet, la cigarette contient plus de 4000 composés chimiques et au moins 400 d'entre eux sont toxiques (Kumar *et al.*, 2012). La nicotine étant la principale substance dangereuse et toxine mortelle dans le tabac (Mishra *et al.*, 2015), induite une perturbation endocrinienne en altérant la synthèse des androgènes et la réduction de la production de FSH et de la LH dans l'hypophyse. Des études menées sur des hommes et des rats mâles indiquent que le tabagisme et l'administration de nicotine augmente les niveaux de prolactine et inhibent la libération de GnRH, altérant ainsi les gonadotrophines FSH et LH. La nicotine augmente les EROs en brisant la chaîne respiratoire mitochondriale et en inhibant la biosynthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig. La production de EROs augmentée par la nicotine altère la spermatogenèse lors de la première étape du transfert du cholestérol vers les mitochondries en supprimant l'expression de la protéine de régulation aigue de la stéroïdogenèse (StAR) (Mosbah *et al.*, 2014).

I.5- STRESS OXYDANT ET INFERTILITE

Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et la capacité de l'organisme pour les détoxifier (Agarwal et Saïd, 2005). Une production excessive des EROs peut avoir différentes origines. Endogène d'une part, via les leucocytes activés du liquide séminal en cas d'infection du tractus génital masculin ou d'inflammation locale, ou via les spermatozoïdes eux-mêmes en cas de spermatogenèse altérée et de varicocèles. Les EROs peuvent également avoir une origine exogène, leur production étant stimulée en cas d'intoxication tabagique et alcoolique (Wright *et al.*, 2014).

Le principal mécanisme à l'origine des EROs dans le spermatozoïde est la réaction redox NAD dépendante au niveau mitochondrial. En effet, les spermatozoïdes sont riches en mitochondries de par leur besoin important d'énergie nécessaire à leur mobilité. La plus fréquente des EROs dans le spermatozoïde est l'anion superoxyde qui se dimerise pour donner l'eau oxygénée (H_2O_2). En présence de métaux comme le fer et le cuivre, le peroxyde hydrogène et l'anion superoxyde subissent une réaction qui aboutit à une substance extrêmement toxique : le radical hydroxyl qui est un puissant initiateur de la cascade aboutissant à une peroxydation lipidique et à l'oxydation de protéines et de l'ADN (Hazout *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2013).

En cas d'excès de production des EROs, le spermatozoïde est normalement apte à se protéger via son système de défense antioxydant tel que les glutathions peroxydases qui agissent comme antioxydants détoxifiants dans le testicule et l'épididyme. Leur action sur la membrane du spermatozoïde confère une protection des constituants lipidiques, préservant ainsi la vitalité et la mobilité des spermatozoïdes. Le glutathiol est le principal protecteur endogène contre les dégâts liés aux radicaux libres et maintient les antioxydants exogènes dans leur forme réduite. La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui protège l'organisme des anions superoxydes en catalysant la conversion du superoxyde en oxygène et en H_2O_2 ,

prévenant ainsi la peroxydation lipidique et améliorant la mobilité. La catalase agit en facilitant la décomposition de H_2O_2 en eau et oxygène. Ainsi, à la fois la SOD et la catalase contribuent à dégrader les EROs qui peuvent endommager les spermatozoïdes (Methorst et Huyghe *et al.*, 2014).

En cas de production incontrôlée des EROs dans un état pathologique, la capacité anti-oxydant se trouve dépassée, les EROs ne sont plus correctement éliminées et un état de stress oxydatif est atteint. Cette production incontrôlée de EROs entraîne une cascade de réactions délétères pour le spermatozoïde comme l'altération de sa fonction mitochondriale et donc de sa mobilité ; une fragmentation de son ADN via l'oxydation des acides nucléiques ; une apoptose accrue ; mais aussi une inactivation de récepteurs et enzymes de surface. Ces phénomènes sont la conséquence de la peroxydation des acides gras polyinsaturés présents en grande quantité au niveau de sa membrane plasmique (Sikka, 2004).

I.6- PRISE EN CHARGE DE L'INFERTILITE MASCULINE

I.6.1- Prise en charge par la médecine conventionnelle

I.6.1.1-Hygiène de vie

L'arrêt de certaines habitudes pouvant altérer la qualité du sperme, comme la consommation d'alcool et de stupéfiants, doit être recommandé. Il faut prendre des mesures préventives concernant l'exposition professionnelle aux toxiques, aux radiations et à la chaleur, sans oublier que de multiples médicaments tels que les antihypertenseurs et les psychotropes peuvent être responsables de l'altération de la spermatogénèse (Khallouk *et al.*, 2010).

I.6.1.2- Traitement des troubles sexuels, érectiles et/ ou éjaculatoires

En cas de troubles sexuels, des conseils peuvent être proposés, avec une éducation, voire une psychothérapie selon la sévérité du trouble. Les troubles de l'érection doivent être traités en fonction de l'étiologie soit par un traitement médicamenteux (inhibiteurs des phosphodiesterases, prostaglandines, hormonothérapie), soit par un traitement chirurgical (prothèse pénienne). Les troubles éjaculatoires sont variables et pour chaque type de trouble, une prise en charge peut être proposée (Khallouk *et al.*, 2010).

I.6.1.3- Autres traitements

En dehors des traitements spécifiques pour des causes potentiellement réversibles tels que la varicocèle, les infections, les toxiques environnementaux et les médicaments, de nombreux traitements non spécifiques ont été proposés en cas de spermogramme anormal. Ce sont : l'androgénothérapie à faible dose, les anti-estrogènes, la « human Chorionic Gonadotrophin » (hCG) et l'administration de substances telles que la vitamine A, l'arginine, la carnitine et le zinc. Les inhibiteurs de l'aromatase pourraient avoir un effet bénéfique chez les patients oligoasthénospermes modérés, présentant un rapport testostéronémie/oestradiol bas. En cas d'azoospermie obstructive, la chirurgie peut être conseillée (Khallouk *et al.*, 2010).

I.6.1.4-Assistance médicale à la procréation

Les techniques d'assistance médicale à la procréation restent malgré leur succès un traitement symptomatique de l'infertilité lorsque la cause n'a pas été identifiée et / ou corrigée :

- ✓ L'insémination artificielle : elle est indiquée dans les troubles de l'éjaculation, de l'hypospadias (malformation qui se manifeste par l'ouverture de l'urètre dans la face inférieure du pénis) sévère, dans les oligozoospermies, dans certaines infertilités immunologiques, ainsi qu'en cas de stérilité inexplicée ;
- ✓ La fécondation *in vitro* : les infertilités masculines, immunologiques ou inexplicées peuvent bénéficier avec succès de ce type de fécondation;
- ✓ L'« Intracytoplasmic Sperm Injection » : elle est réservée aux infécondités masculines sévères, ainsi qu'aux échecs de la fécondation *in vitro* (Khallouk *et al.*, 2010).

I.6.2-Prise en charge par la phytothérapie

Plusieurs études ont été menées sur différentes plantes pouvant traiter l'infertilité masculine et la performance sexuelle ; afin d'apporter des bases scientifiques dans l'utilisation des plantes dans le traitement des troubles de la fonction de reproduction mâle. On peut citer : *Nymphaea lotus* Linn (Nymphaeaceae) (Kameni *et al.*, 2016), *Hibiscus asper* Hook (Malvaceae) (Tsakem *et al.*, 2023).

I.7- GENERALITES SUR *Graptophyllum glandulosum*

I.7.1-Systématique

La systématique de *Graptophyllum glandulosum* issue de L'APG IV (Angiosperm Phylogeny Group IV) (APG IV, 2016) est la suivante :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Lamiales
Famille :	Acanthaceae
Genre :	<i>Graptophyllum</i>
Espèce :	<i>glandulosum</i>
Nom scientifique : <i>Graptophyllum glandulosum</i> Turrill	

I.7.2- Description et répartition géographique

Graptophyllum glandulosum Turrill est un arbuste avec des branches à 4 angles, presque glabres, des feuilles vertes normales et des fleurs rouge-violet. *Graptophyllum glandulosum* pousse principalement en Afrique Occidentale et Centrale mais aussi dans les régions du Pacifique (Barker, 1986).

I.7.3- Usages ethnobotaniques et travaux scientifiques antérieurs

En langue nationale camerounaise, *Graptophyllum glandulosum* a l'appellation de "Ninia seubag" en Ballengou. Les feuilles, racine et autres parties de *G. glandulosum* sont utilisées par les populations camerounaises pour le traitement des maladies telles que les plaies, les abcès, les maladies de la peau (dermatites), les infections des voies respiratoires et les diarrhées (Tagousop *et al.*, 2018). Selon les dires du tradithérapeute, les feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sont utilisées pour traiter les troubles de fertilité masculine. Il est recommandé de faire bouillir les feuilles dans trois litres d'eau et d'ingérer le liquide. Le traitement doit être poursuivi jusqu'à guérison. Les travaux menés par Tagousop ont montré l'activité antimicrobienne et les mécanismes antibactériens des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* (Tagousop *et al.*, 2018). Cet auteur a réalisé une étude Phytochimique qui a mis en évidence la présence des classes de composés suivants dans l'extrait aqueux des feuilles de *G. glandulosum* : des polyphénols et des flavonoïdes, (Tagousop *et al.*, 2017).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1- MATERIEL

II.1.1- Matériel végétal

Les feuilles de *Graptophyllum glandulosum* ont été récoltées en Septembre 2022 en soirée dans la localité de Nkolbisson, dans la Région du Centre Cameroun. Une tige feuillée de la plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon enregistré sous le numéro 49179-1/HNC (Herbier National du Cameroun). (Figure 5)



Figure 5: Photographie de *Graptophyllum glandulosum* (Photo prise à Nkolbisson en Septembre 2022 par Fangnwou Tchiadjie Grace Divine).

A-Partie aérienne, B-Fleur, C-Feuilles

II.1.2- Matériel animal

Les animaux utilisés dans le cadre de ce travail étaient des rats Wistar âgés de 8 à 10 semaines, pesant entre 130 et 150 g. Ces rats ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de L'Université de Yaoundé I. Ils ont été logés dans des cages en plastique, maintenus à température ambiante et ayant un accès libre à l'eau de robinet et à la nourriture. Ces rats ont été nourris à base d'un aliment standard composé ainsi qu'il suit : 60 % de farine de maïs, 20 % de farine de poisson, 10 % de farine de blé, 6 % de farine d'arachides, 3 % de farine d'os et 1 % de complexe vitaminique (vitamine A et vitamine E).

II.2- METHODES

II.2.1- Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* et détermination de la dose équivalente

II.2.1.1- Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum*

Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre puis broyées à l'aide d'un moulin électrique afin d'obtenir une poudre. Trois cent grammes de la poudre obtenue ont été mélangés à 5L d'eau puis le mélange a été porté à ébullition pendant 30 min selon les recommandations du tradithérapeute. Après refroidissement, le mélange a été filtré à l'aide du papier Whatman N°3. Le filtrat a été séché à l'étuve à 45 °C. L'extrait sec qui a été obtenu pesait 30g soit un rendement de 10 % (Figure 6).

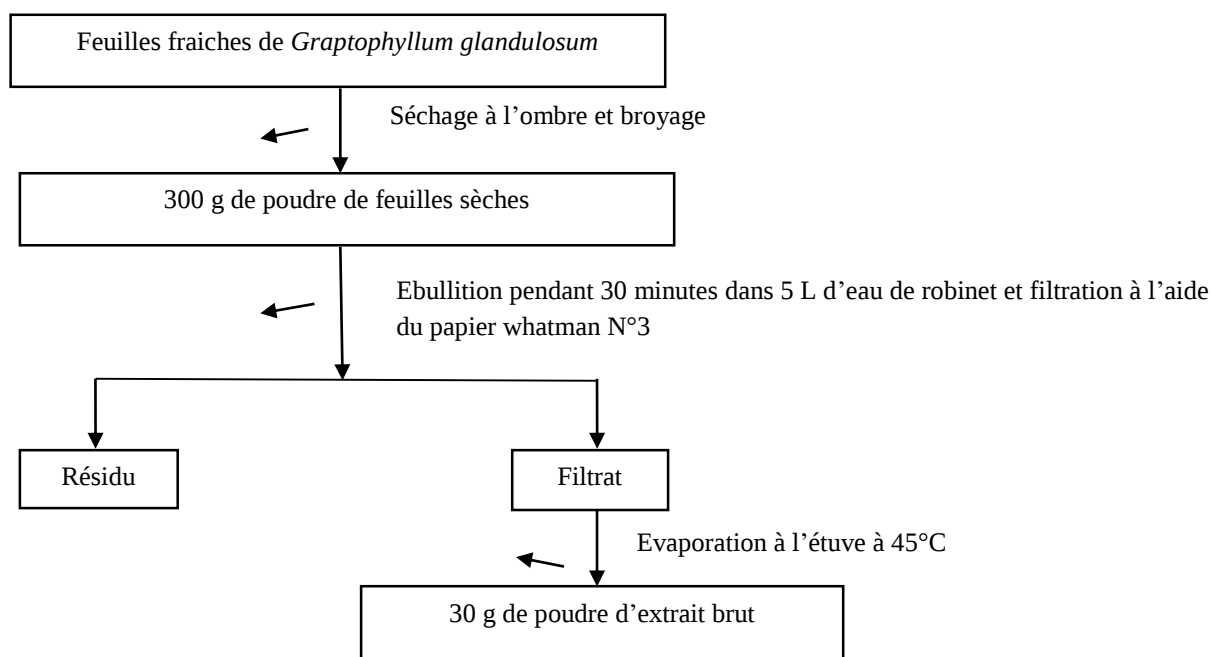


Figure 6: Protocole de préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum*.

II.2.1.2- Détermination de la dose équivalente chez l'humain et la dose chez le rat

Selon les recommandations du tradithérapeute, 50 feuilles sèches (17 g) ont été portée à ébullition dans 1,5 L d'eau. Nous avons obtenu à partir de 250 mL de ce décoctât, 1,70 g d'extrait brut après séchage. Cette masse a par la suite été divisée par 70 kg ce qui a donc permis d'obtenir une dose équivalente chez l'Homme de 0,024 g/kg. Afin d'obtenir 24,28 mg/kg ; 0,024 g/kg a été multiplié par un facteur de 1000. La dose chez le rat de 150 mg /kg a été déterminée en multipliant 24,28 mg/kg par un facteur de 6,2 selon la méthode décrite par Nair (2016). Cette dose de 150 mg/kg a été divisée et multipliée par un facteur de 2 afin d'obtenir respectivement deux doses de 75 et de 300 mg/kg.

II.2.2- Répartition et traitement des animaux

Trente-cinq rats âgés de 8 à 10 semaines ont été utilisés. Ces rats ont été randomisés en fonction de la masse corporelle et ont été répartis en 7 groupes de 5 animaux chacun. Le Tableau I présente la répartition et le traitement administré aux rats.

Tableau I: Répartition et traitement des animaux

Groupes	Nombre de rats	Substances administrées et doses
Témoin normal (ED)	5	Eau distillée de 1mL/kg + NaCl 0,9%
Témoin négatif (NIC 1)	5	Eau distillée de 1mL/kg + Nicotine 1mg/kg
Témoin positif	5	Citrate de clomifène (Safoni) 1 mg/kg + nicotine 1 mg/kg
GG 75	5	Extrait aqueux 75 mg/kg + Nicotine 1 mg/kg
GG 150	5	Extrait aqueux 150 mg/kg + Nicotine à la dose 1 mg/kg
GG 300	5	Extrait aqueux 300 mg/kg+ Nicotine à la dose 1 mg/kg
Témoin réversible (NIC 2)	5	Nicotine uniquement pendant la période d'induction et eau distillée pendant la durée du traitement

GG : *Graptophyllum glandulosum* ; NIC : Nicotine

L'administration de la nicotine se faisait tous les soirs par voie sous cutanée à l'aide d'une seringue à insuline durant les 28 jours d'induction et les 28 jours de traitement. L'extrait était administré par voie orale à l'aide d'une sonde œsophagienne durant les 28 jours de traitement comme décrit par Mosbah *et al.*, 2015. Pour ce qui est du groupe témoin réversible, la nicotine a été administré pendant les 28 jours induction, suivi de l'eau distillée pendant les 28 jours de traitement.

II.2.3- Evaluation des effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur le comportement sexuel des rats

La performance sexuelle des rats a été évaluée en utilisant le test de monte. Pour ce faire, nous avons utilisé les rats mâles qui ont été accouplés avec les ratte chez qui on a induit l'œstrus artificiel.

II.2.3.1- Ovariectomie

Les ratte ont préalablement été anesthésiées par injection d'une dose de 50 mg/kg de kétamine (Trittau) (concentration 10 mg/mL) suivie d'une injection d'une dose de 10 mg/kg de diazépam ou valium (Atrna pharma) de concentration 5 mg/mL, toutes deux par voie intrapéritonéale. Une fois endormi, l'animal a été placé en décubitus ventral sur une planche à dissection en liège. Une portion du bas du dos a ensuite été épilée, et la zone épilée a été désinfectée à l'aide d'un bout de coton imbibé d'alcool 95°. Une fine incision

transversale a été faite sur la peau au niveau de la zone épilée. A l'aide d'une pince fine, le péritoine a été perforé et son ouverture maintenue pour pouvoir extraire la masse graisseuse comportant l'ovaire. Ce dernier a été séparé de la corne utérine à l'aide des ciseaux fins. Ensuite, la corne utérine a été remise à l'intérieur et le péritoine suturé. A la fin, la peau a été suturée et la blessure a été soignée à la povidone iodée (bétadine) (Meda Manu) et à la pénicilline en pommade (Hefei, Anhui) jusqu'à cicatrisation pour éviter les infections post-opératoires (Mengue, 2021).

II.2.3.2- Induction de l'œstrus artificiel chez les femelles ovariectomisées

L'œstrus a été induit chez les femelles après ovariectomie et injection sous-cutanée de la 17 β œstradiol benzoate (E₂B) (Virbac) puis, de la progestérone benzoate (Cyndea Pharma). L'E₂B a été injecté 48 h avant le début de l'expérimentation à un volume de 0,15 mL pour 200 g de poids corporels, tandis que la progestérone (Cyndea Pharma) a été injectée 4 h avant le début de l'expérimentation à un volume de 0,1 mL pour 200 g de poids corporel (Yakubu et Afolayan, 2008).

II.2.3.3- Evaluation du comportement sexuel des animaux

Le test de monte a été réalisé trois fois durant la période de l'expérimentation : au jour zéro (afin de sélectionner les rats sexuellement actifs), au jour vingt-huit dans le but d'observer les effets de la nicotine sur le comportement sexuel des animaux et au jour cinquante-sept dans le but d'observer les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *G. glandulosum* sur le comportement sexuel des animaux. Pendant le test, chaque rat mâle a été placé dans une cage pendant 10 min pour acclimatation. Ensuite, une femelle réceptrice était introduite dans la cage pour une durée de 20 min (Zingue, 2014). Le séjour du couple dans la cage a été filmé à l'aide d'une caméra (Dahua). Les vidéos prises ont été visionnées et les différents paramètres comptabilisés à savoir :

- **le temps de latence de monte** qui est le temps entre le début du test et la première monte ;
- **le temps de latence d'intromission** qui est le temps entre le début du test et la première intromission ;
- **le temps de latence d'éjaculation** qui est le temps entre le début du test et la première éjaculation ;
- **la fréquence de monte** qui est le nombre de montes avec ou sans intromission ;
- **la fréquence d'intromission** qui est le nombre d'intromissions précédant ou non une éjaculation ;
- **la fréquence d'éjaculation** qui est le nombre d'éjaculations enregistré durant le test.
- ✓ le test était négatif si les temps de latence, d'intromission, et d'éjaculation étaient supérieurs à 20 min.

II.2.4- Sacrifice des rats et collecte des échantillons

Au 58^e jour, les animaux ont été euthanasiés. Le sang collecté dans les tubes secs étiquetés a été centrifugé à 3000 trs/minute pendant 15 min à 4°C. Le sérum obtenu a été réparti dans les tubes Eppendorf et conservé à -70 °C en vue de l'évaluation du taux de testostérone et de protéines totales.

Les rats ont ensuite été disséqués. Le pénis, les vésicules séminales, la prostate, les épидидymes et les testicules ont été prélevés et pesés en vue de la détermination de leurs poids relatifs. Un testicule et un d'épididyme gauche ont été fixés dans du liquide de Bouin pour les analyses histologiques. Le testicule droit et le pénis ont servi à la préparation d'homogénats. Le surnageant obtenu a été réparti dans les tubes Eppendorf et conservés à -70 °C en vue de l'évaluation des taux de protéines tissulaires, des nitrites, de MDA, et de l'activité de la catalase.

Les masses des organes susmentionnés ont permis de calculer leurs masses relative à partir de la masse de l'animale selon la formule suivante :

$$\text{Masse relative de l'organe (\%)} = \frac{\text{Masse de l'organe entier (g)}}{\text{Masse de l'animal(g)}} \times 100$$

II.2.5- Réalisation des homogénats testiculaires et pénien

Pour la réalisation des homogénats, 0,4 g de testicule a été pesée à l'aide d'une micro balance puis broyer à l'aide d'un mortier et un pilon en céramique. La réalisation des homogénats a été faite à 20 % grâce au tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,3) pour le testicule. Le surnageant a été recueilli après centrifugation (3000 tours /min à 4 °C pendant 25 min) dans les tubes Eppendorf étiquetés, puis conservé au congélateur à -70 °C.

II.2.6- Détermination du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes

✓ Principe

La queue de l'épididyme dilacérée dans une solution de NaCl 0,9 % libère les spermatozoïdes qui, en suspension peuvent être visualisés pour leur mobilité, et dénombrés (quantifiés) au microscope dans un volume connu de la cellule de Malassez.

✓ Mode opératoire

Après le sacrifice, la queue de l'épididyme gauche de chaque animal a été immédiatement prélevée et dilacérée dans un verre à pied contenant 10 mL de NaCl 0,9 % préalablement incubé dans un bain-marie à 33 °C. De la solution obtenue, 20 µL ont été prélevés à l'aide d'une micropipette, puis déposés sur une cellule de Malassez et recouverts d'une lamelle. Le comptage des spermatozoïdes mobiles et immobiles a été fait dans 5 champs par observation au microscope optique au grossissement 400X (Ngoula *et al.*, 2007). Le nombre des spermatozoïdes a été déterminé grâce à la formule utilisée par Sultan *et al.*, (1982).

$$N = \frac{X \times Fd \times 106}{4}$$

X= Nombre des spermatozoïdes dans 5 quadrillés de 20 petits carrés de la cellule de Malassez ; Fd = Facteur de dilution (20) ; N = Nombre de spermatozoïde.

Le pourcentage des formes mobiles a été déterminé à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de spermatozoïdes mobiles} = \frac{\text{Nombre de spermatozoïdes mobiles}}{\text{Nombre total de spermatozoïdes}} \times 100$$

II.2.7- Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes

✓ Principe

Le test est basé sur la perméabilité des spermatozoïdes à l'éosine. Les spermatozoïdes morts ayant une membrane lésée sont colorés en rouge par l'éosine tandis que les spermatozoïdes vivants restent non colorés.

✓ Mode opératoire

Après le sacrifice, la queue de l'épididyme gauche de chaque animal a été immédiatement prélevée et dilacérée dans un verre à pied contenant 10 mL de NaCl 0,9 % préalablement incubé dans un bain-marie à 33 °C. Vingt microlitres de la solution obtenue et 10 µL d'éosine aqueuse 0,5 % ont été prélevés à l'aide d'une micropipette puis déposés sur une lame et recouverts par une lamelle. Deux minutes plus tard, le pourcentage de spermatozoïdes viables a été déterminé en comptant 100 spermatozoïdes par animal à l'aide du microscope (grossissement ×400).

II.2.8- Evaluation des effets du traitement à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques marqueurs androgéniques

II.2.8.1- Dosage de la testostérone sérique

Le dosage de la testostérone a été réalisé à partir de la technique ELISA à l'aide du kit de dosage de marque *CALBIOTECH* (Etats-Unis)

✓ Principe

La testostérone présente dans l'échantillon à analyser et le conjugué Testostérone-HRP entre en compétition pour se fixer sur les anticorps anti-testostérone tapissant la surface des puits. L'addition du 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) dans le milieu réactionnel amorce une réaction enzymatique marquée par le virage du bleu au jaune en milieu réactionnel. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm et l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone dans l'échantillon.

✓ **Mode opératoire**

Les différents tubes ont été préparés tel qu'indiqué dans la notice du kit *CALBIOTECH* décrit dans le Tableau II.

Tableau II: Mode opératoire du dosage de la testostérone

Réactifs	Contenus des puits	
	Standard (µL)	Echantillon (µL)
Les réactifs ont été placés à température ambiante (20-25°C) avant usage		
Standard	50	0
Echantillon	0	25
Réactif testostérone-HRP	100	100
Réactif anti-testostérone de lapin	50	50
Les plaques ont été agitées (20-30 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 60 minutes puis lavées avec le tampon de lavage (tampon Tris).		
Tampon de lavage	300	300
Après lavage les plaques ont été épongées sur du papier absorbant, puis le substrat a été ajouté		
Substrat TMB	100	100
Les plaques ont été agitées (5 secondes) puis incubées à température ambiante pendant 30 minutes jusqu'au virage de la coloration et la solution STOP a été ajoutée.		
Solution STOP	50	50
Après 15 minutes les absorbances ont été lues contre le blanc au lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde de 450 nm.		

La quantité de testostérone contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la formule suivant $y = 1,99013 + ((-0,0900862 - 1,99013) / (1 + (x/0,985307)^{-0,672109}))$ (Figure 7).

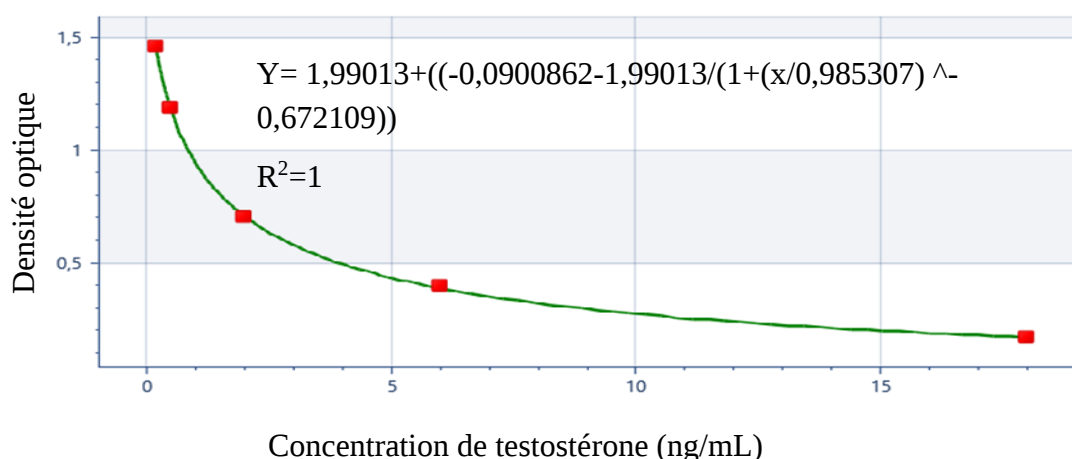


Figure 7: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la testostérone sérique.

II.2.8.2 Dosage des nitrites péniers

✓ Principe

En présence de l' amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) et le dichlorure de N-(naphtyl-1)-diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) en milieu acide, les nitrites subissent une réaction de diazotation. Le produit est proportionnel à la quantité de nitrites présente dans l'échantillon (Green *et al.*, 1982).

✓ Mode opératoire

Le dosage des nitrites a été réalisé suivant le protocole présenté dans le Tableau III.

Tableau III : Protocole de dosage des nitrites

	Blanc			Etalons				Echantillons
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	$X_1 \dots X_n$
Concentration de NaNO_2 (μM)	0	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	-
Volume de NaNO_2 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	-
Echantillons (μL)	-	-	-	-	-	-	-	25
Eau distillée (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100
Réactif de Griess (μL)	125	125	125	125	125	125	125	125

Le contenu de chaque tube a été homogénéisé et incubé à l'abri de la lumière, pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance a été lue contre le blanc au lecteur de plaque ELISA à 560 nm.

Densités optiques lu contre le blanc au lecteur de plaque ELISA Multiskan FC (FINLANDE) à 560 nm (Figure 8).

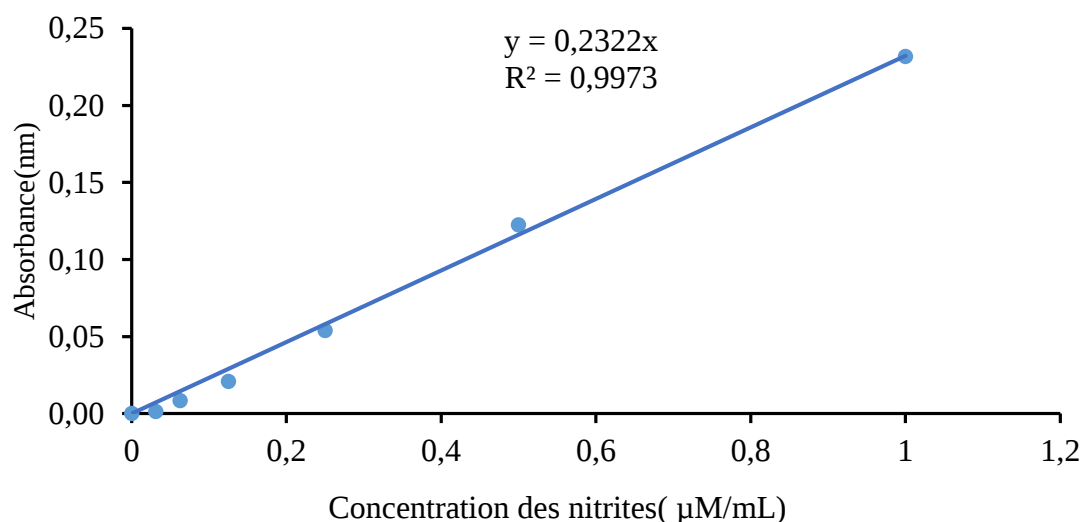


Figure 8: Courbe d'étalonnage pour le dosage des nitrites.

II.2.8.3- Dosage des protéines testiculaires

✓ Principe

En milieu basique, le tartrate de sodium et de potassium forment avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre complexé avec le tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la solution à doser (Gornal *et al.*, 1949).

✓ Mode opératoire

Le dosage des protéines a été réalisé suivant le protocole ci-après (Tableau IV) :

Tableau IV: Protocole de dosage des protéines totales

	Blanc		Etalons					Echantillons
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁ X _n
SAB (µL) [3 mg/mL]	0	50	100	150	200	250	300	-
Eau distillée (µL)	600	550	500	450	400	350	300	590
Réactif de Biuret (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	-	10
Quantité de protéines (mg)	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	-

SAB= Serum Albumin Bovin ; 0 = Tube blanc ; 1-6= Tubes étalons ; X_i-X_n= Tubes échantillons

La courbe d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la quantité de protéines. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = 0,0531x$ (Figure 9).

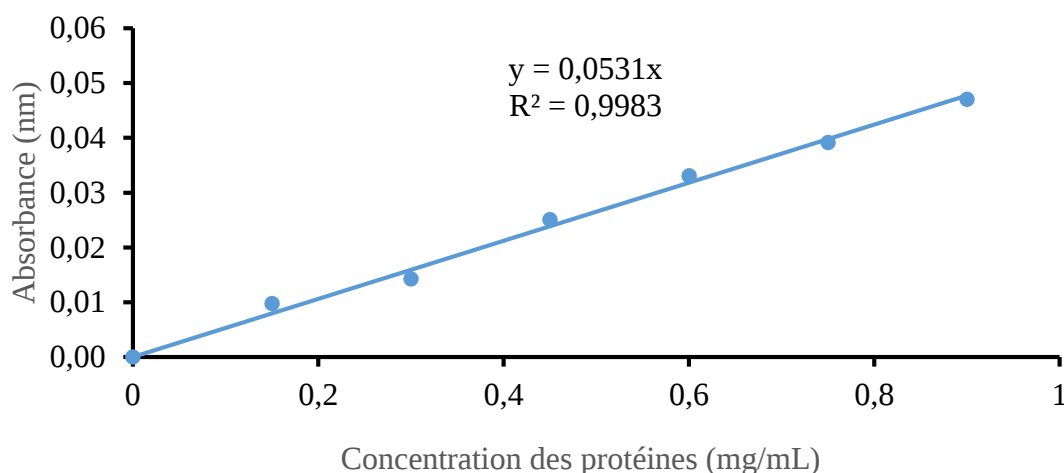


Figure 9 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.

II.2.9- Evaluation des effets du traitement à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques marqueurs du stress

II.2.9.1- Dosage de la catalase testiculaire

✓ Principe

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Le résidu se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable qui va être décomposé par la chaleur et former un complexe vert (Sinha, 1972).

✓ Mode opératoire

Les différents réactifs ont été mélangés comme indiqué dans le Tableau V afin d'établir la courbe d'étalonnage.

TableauVI: Protocole de réalisation de la courbe d'étalonnage de la catalase

	Blanc			Etalon			Echantillons	
Tubes	0	1	2	3	4	5	X1...Xn	
Eau distillée (µL)	50	-	-	-	-	-	-	-
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	50	50
Tampon phosphate (0,1 mM ; pH 7,5) (µL)	750	-	-	-	-	-	750	750
Volume de H ₂ O ₂ (50 mM) (µL)	200	0	20	40	80	160	200	200

Les tubes ont été incubés à 25 °C pendant 1 minute.

Dichromate de potassium/acide acétique glacial (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
---	------	------	------	------	------	------	------	------

Après formation du précipité bleu, les tubes ont été chauffés à 100 °C pendant 10 minutes (apparition de la couleur verte) et refroidis à 25 °C.

Eau distillée (µL)	-	1000	980	960	920	840	-	-
Concentration de H ₂ O ₂ (mM)	-	0	0,004	0,006	0,012	0,029	-	-

Les densités optiques ont été lues au lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde de 540 nm

La courbe d'étalonnage a été tracée en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons aux concentrations de H₂O₂ comme l'indique la Figure 10.

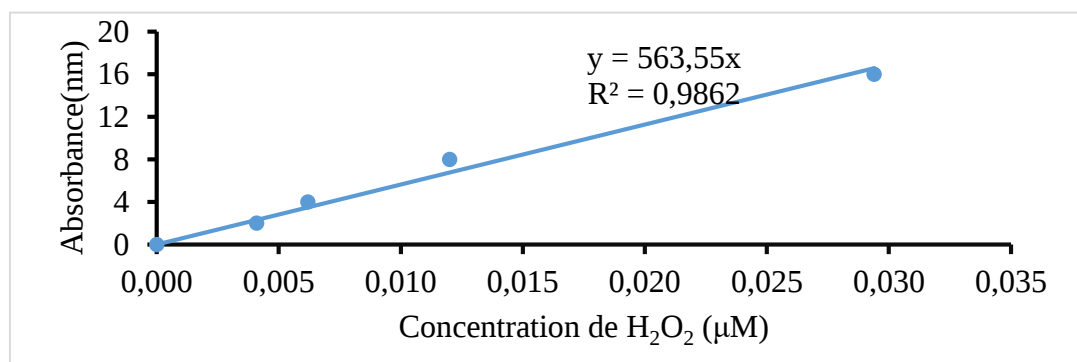


Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la catalase.

L'activité spécifique de la catalase a été déterminée en mM de H₂O₂/min/g de testicule d'après la formule suivante :

$$\text{Act CAT} = \frac{\Delta \text{DO}}{a \times t \times m}$$

Act CAT = Activité de la catalase (mM de H₂O₂/min/g d'organes) ; **ΔDO** = DO essai-DO blanc ; **a** = Pente de la courbe d'étalonnage (563,55) ; **t** = durée de la réaction (1 minute) ; **m** = Masse de l'organe (g).

II.2.9.2- Dosage du malondialdéhyde testiculaire

✓ Principe

La présence de malondialdéhyde (MDA) dans un échantillon se traduit par la formation en milieu acide et chaud (90°C) d'aldéhyde malonique qui réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe rose. L'absorbance est lue au lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde 530 nm contre un tube blanc (Wilbur *et al.*, 1949).

✓ Mode opératoire

Dans des tubes contenant 250 µL d'homogénat (tubes échantillons) ou 250 µL de tampon Tris-HCl 50 mM ; pH = 7,4 (tube blanc) ont été introduits, 125 µL d'acide trichloro-acétique (TCA) 20 % et 250 µL d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %. Les tubes ont été bouchés à l'aide de billes de verre, chauffés à 90 °C au bain-marie pendant 10 minutes, puis refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à une longueur d'onde de 530 nm contre le blanc.

$$[\text{MDA}](\text{mmol/g d'organes}) = \frac{\Delta \text{DO} \times V_t}{\epsilon \times L \times V_i \times m}$$

[MDA]= Concentration de MDA (mol/g d'organes) ; **ΔDO** = DO essai-DO blanc ; **V_t** = volume total de surnageant (mL); **L**= Trajet optique (1 cm) ; **ε** = Coefficient d'extinction molaire (15600 mol⁻¹. cm⁻¹) ; **m**= Masse de l'organe (g).

II.2.10- Réalisation des coupes histologiques

L'analyse histologique est la technique de préparation des tissus et/ou organes en vue de leur observation au microscope. Elle comprend différentes étapes dont la fixation, la recoupe ou « trimming », la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration, le montage et l'observation.

➤ Fixation

L'objectif de la fixation est de maintenir les cellules et les constituants tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui du vivant. Ainsi, après le sacrifice des animaux, les organes ont été prélevés et conservés immédiatement dans du formol 4 % tamponné.

➤ Recoupe

Une fois les organes fixés, ils ont été « trimmes ». A cette étape, il a été question de couper le tissu de manière à lui donner une épaisseur inférieure à celle des cassettes de déshydratation. Les tissus coupés ont été déposés dans des cassettes étiquetées et ont été plongés pour une durée de 1 heure, dans un premier bain d'alcool 70%, première étape du processus de déshydratation.

➤ **Déshydratation**

La déshydratation, s'est déroulée en trois étapes successives. La déshydratation proprement dite, l'éclaircissement et l'imprégnation.

- **Déshydratation proprement dite**

Elle a consisté à laisser les tissus dans des bains d'alcool de concentrations croissantes respectives de 70 % (1 h), 95 % (1 h), 95 % (1 h 30), 100 % (1 h), 100 % (1 h 30), 100 % (2 h).

- **Éclaircissement**

L'éclaircissement a consisté à remplacer la solution de déshydratation qui est l'alcool par le solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Les cassettes ont séjourné dans deux bains de xylène consécutifs. Un premier bain de 1 h et un deuxième bain de 1 h 30 min.

- **Imprégnation**

Cette étape a consisté à introduire les organes dans un bain de paraffine en fusion pendant 4 h 30 min dans la station d'enrobage de marque Microm Heidelberg.

➤ **Inclusion**

L'inclusion est le procédé qui fournit un support externe aux tissus, ce qui permet la réalisation de fines coupes au microtome. Les tissus ont été placés selon une orientation précise (en diagonale) dans des moules en inox qui ont par la suite été remplis de paraffine en fusion. L'ensemble a été mis à solidifier sur une plaque réfrigérée pour en obtenir des blocs.

➤ **Coupe**

La coupe des blocs de paraffine contenant les tissus a été réalisée à l'aide d'un microtome de marque Reichert-Jung 2030. L'épaisseur des rubans après coupe était de 5 µm. Une fois coupées, les sections de rubans ont été mises à déplier dans un bain-marie contenant de l'eau gélifiée à environ 45 °C. Elles ont été récupérées sur des lames de verre étiquetées et séchées à l'étuve à 45 °C, pendant 24 heures avant coloration.

➤ **Coloration**

La coloration a pour but de mettre en évidence les différents éléments tissulaires et de les différencier entre eux afin de permettre l'étude de leur structure, de leur morphologie et des éventuelles modifications pathologiques. Avant l'étape de la coloration, les coupes ont d'abord été déparaffinées (Tableau VI). Immédiatement après l'étape de déparaffinage, les lames portant les coupes de tissus ont été colorées à l'hémaroxyline et à l'éosine (Tableau VII).

Tableau VI: Protocole de déparaffinage

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Xylène	10 minutes	5	Ethanol 100°	3 minutes
2	Xylène	10 minutes	6	Ethanol 100°	3 minutes
3	Xylène	10 minutes	7	Eau distillée	10 minutes
4	Ethanol 100°	3 minutes			

Tableau VII: Etapes de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

Ordre	Solution	Temps de séjour	Ordre	Solution	Temps de séjour
1	Hématoxyline de Mayer	10 minutes	7	Ethanol 100°	1 minute
2	Rinçage à l'eau courante	10 minutes	8	Ethanol 100°	1 minute
3	Carbonate de sodium 0,5%	15 secondes	9	Xylène	5 minutes
4	Rinçage à l'eau distillé	5 minutes	10	Xylène	5 minutes
5	Eosine à l'alcool 0,5%	5 minutes	11	Xylène	5 minutes
6	Ethanol 100°	1 minute	12	Montage entre lame et lamelle avec la résine	

➤ Montage et observation au microscope

L'étape de montage entre lame et lamelle a directement suivi la coloration. Pour se faire, quelques gouttes de résine synthétique de marque Eukit ont été déposées sur la lame portant la coupe colorée avant apposition d'une lamelle. Les coupes de tissus sur les lames ont ainsi été protégées et conservées. Les lames colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis montées ont été observées à différents grossissement, à l'aide d'un microscope optique de marque Scientico STM-50 muni d'une caméra digitale de marque Celestron 44421 connectée à un ordinateur pour la prise des microphotographies. A l'aide du logiciel image J version 1.520.

II.2.11 Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ ESM (Erreur Standard sur la Moyenne). L'analyse des résultats a été faite à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 8.0.1. Le test de l'analyse des variances (ANOVA) suivi du Post test de Tukey a été utilisé pour la comparaison des moyennes entre différents groupes. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives. La Figure 11 ci-dessous récapitule le protocole expérimental utilisé dans ce travail.

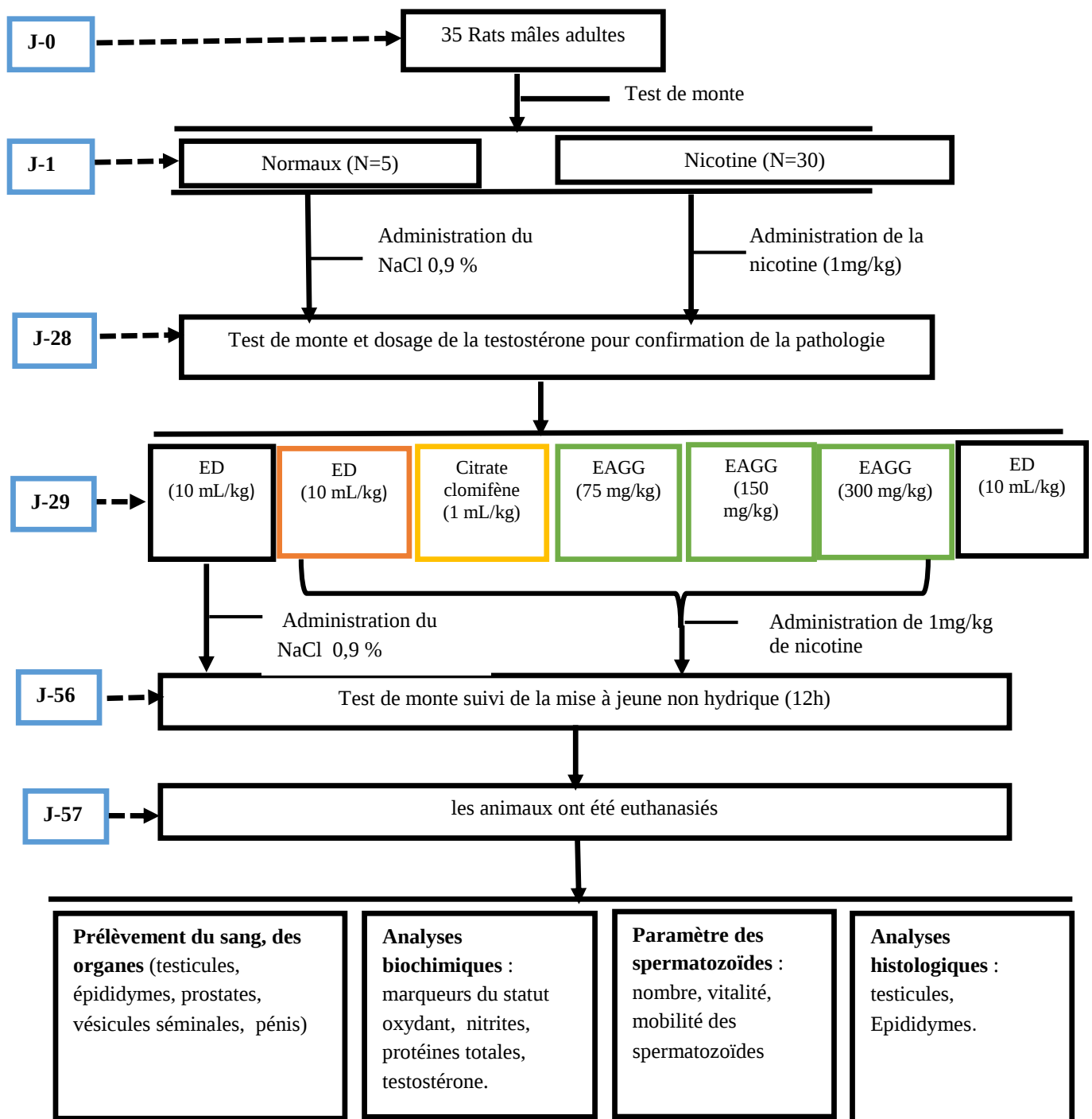


Figure 11 : Schéma synoptique du protocole expérimental.

RESULTATS

III.1- RESULTATS

III.1.1- Effets de la nicotine sur la concentration sérique de testostérone au jour 28.

Les effets de la nicotine sur la concentration sérique de testostérone sont présentés sur la Figure 12. La nicotine a entraîné une diminution significative du taux de testostérone sérique de 32,20 % comparativement aux rats normaux

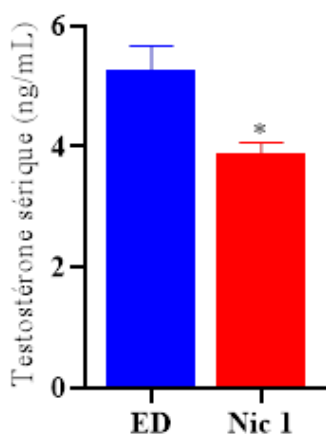


Figure 12 : Effets de la nicotine sur la concentration sérique de testostérone au jour 28.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique / *p < 0,05* : différence significative par rapport au témoin normal.. ED : témoin normal recevant la solution physiologique / NIC 1: témoin négatif recevant la nicotine/

III.1.2- Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur le comportement sexuel des rats mâles

Les résultats obtenus après l'observation des différents paramètres du test de monte aux jours 0, 28 et 56 nous ont permis d'évaluer l'impact de l'extrait aqueux de *G. glandulosum* sur le comportement sexuel.

III.1.2.1. Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur le temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation sont représentés par la figure 13. Il ressort de cette figure qu'au jour 0, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes concernant les temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation. Au jour 28, la nicotine a entraîné comparativement aux rats normaux une augmentation significative ($p < 0,05$) du temps de latence de monte (deux fois), du temps de latence d'intromission (deux fois) ($p < 0,01$) et du temps de latence d'éjaculation de 90,49 % ($p < 0,001$).

Au jour 56, la nicotine a entraîné comparativement aux normaux, une augmentation significative du temps de latence de monte (Figure 13A) de trois fois ($p < 0,001$). Par rapport au lot témoin négatif, le temps de latence de monte du groupe GG75, GG 150 et GG300 a significativement baissé de 84,48 % ($p < 0,001$), 55,47 % ($p < 0,001$) et 78,00 % ($p < 0,001$) respectivement.

Concernant le temps de latence d'intromission (Figure 13B), au jour 56, il a été noté une augmentation significative pour le groupe témoin négatif de 78,61% ($p < 0,01$) par rapport au groupe témoin normal. Comparativement au groupe témoin négatif, une diminution significative du temps de latence d'intromission a été observée chez le groupe GG 75 de 54,04 % ($p < 0,01$), pour le groupe GG 150 de 77,02 % ($p < 0,001$) et pour le groupe GG 300 de 37,33 % ($p < 0,05$).

S'agissant du temps de latence d'éjaculation (Figure 13C), au jour 56, il a significativement augmenté pour le groupe témoin négatif et NIC 2 de quatre fois ($p < 0,001$) et deux fois ($p < 0,001$) respectivement par rapport au groupe témoin normal. Comparativement au groupe témoin négatif, le temps de latence d'éjaculation a significativement baissé pour le groupe GG75 de 76,60% ($p < 0,001$), pour le groupe GG150 de 31,80 % ($p < 0,05$), et le groupe GG 300 de deux fois ($p < 0,001$).

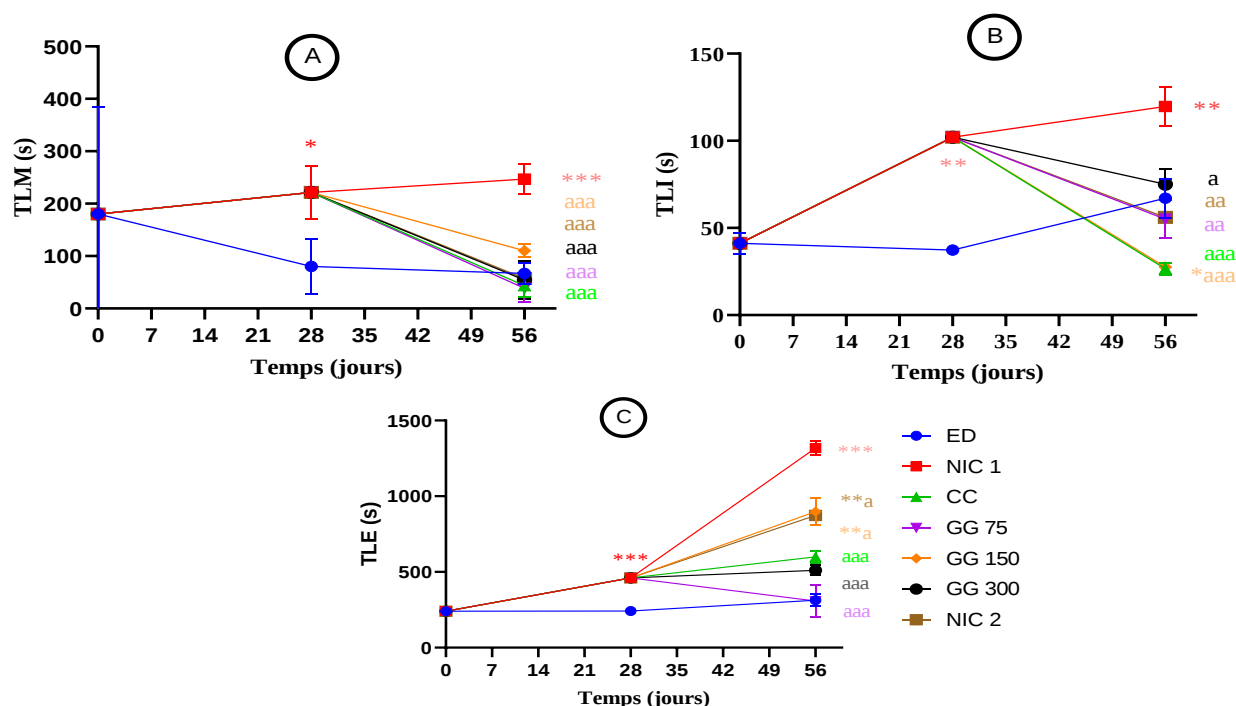


Figure 13: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les temps de latence de monte (A), d'intromission (B) et d'éjaculation (C) au cours du test de monte.

Les points représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique / *p < 0,05 / **p < 0,01 / ***p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin normal. ^ap < 0,05 / ^{aa}p < 0,01 / ^{aaa}p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin négatif. ED : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / NIC 1 : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / CC : témoin positif recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / GG 75, GG 150, GG 300 : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / NIC 2 : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28 / TLM, TLI, TLE = temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation

III.1.2.2- Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les fréquences de monte, d'intromission et d'éjaculation

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les fréquences de monte, d'intromission et d'éjaculation (Figure 14) montrent qu'au jour 0, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les différents groupes concernant les paramètres évalués. Par contre au jour 28, comparativement au groupe témoin normal, il a été noté chez les rats ayant reçu de la nicotine une baisse significative des fréquences de monte, d'intromission et d'éjaculation de 46,67 % ($p < 0,001$), 37,50 % ($p < 0,001$) et 54,55 % ($p < 0,05$) respectivement.

Au jour 56, comparativement aux rats du groupe témoin normal, il a été observé une diminution significative de la fréquence de monte (Figure 14 A) pour le lot témoin négatif de 72,09 % ($p < 0,001$). Par rapport au groupe témoin négatif, la fréquence de monte a significativement augmenté pour le groupe GG 75 de trois fois ($p < 0,01$), pour le groupe GG 150 de quatre ($p < 0,001$), et pour le groupe GG 300 de trois fois ($p < 0,01$).

Comparativement aux rats du groupe témoin normal, il a été observé une diminution significative de la fréquence d'intromission (Figure 14 B) pour le lot témoin négatif de 74,51 % ($p < 0,001$). Par rapport au groupe témoin négatif, la fréquence d'intromission a significativement augmenté pour le groupe GG 75 de quatre fois ($p < 0,001$) pour le groupe GG 150 de six fois ($p < 0,001$), et pour le groupe GG 300 de trois fois ($p < 0,001$).

Pour ce qui est du temps de latence d'éjaculation (Figure 14 C), il a baissé dans le groupe témoin négatif et témoin réversible de 54,55% ($p < 0,05$) et 54,55 % ($p < 0,05$) respectivement comparativement au groupe témoin normal. Par rapport au lot témoin négatif, la fréquence d'éjaculation a augmenté ($p < 0,01$) de deux fois pour les groupes GG 150 et GG 300 de deux fois.

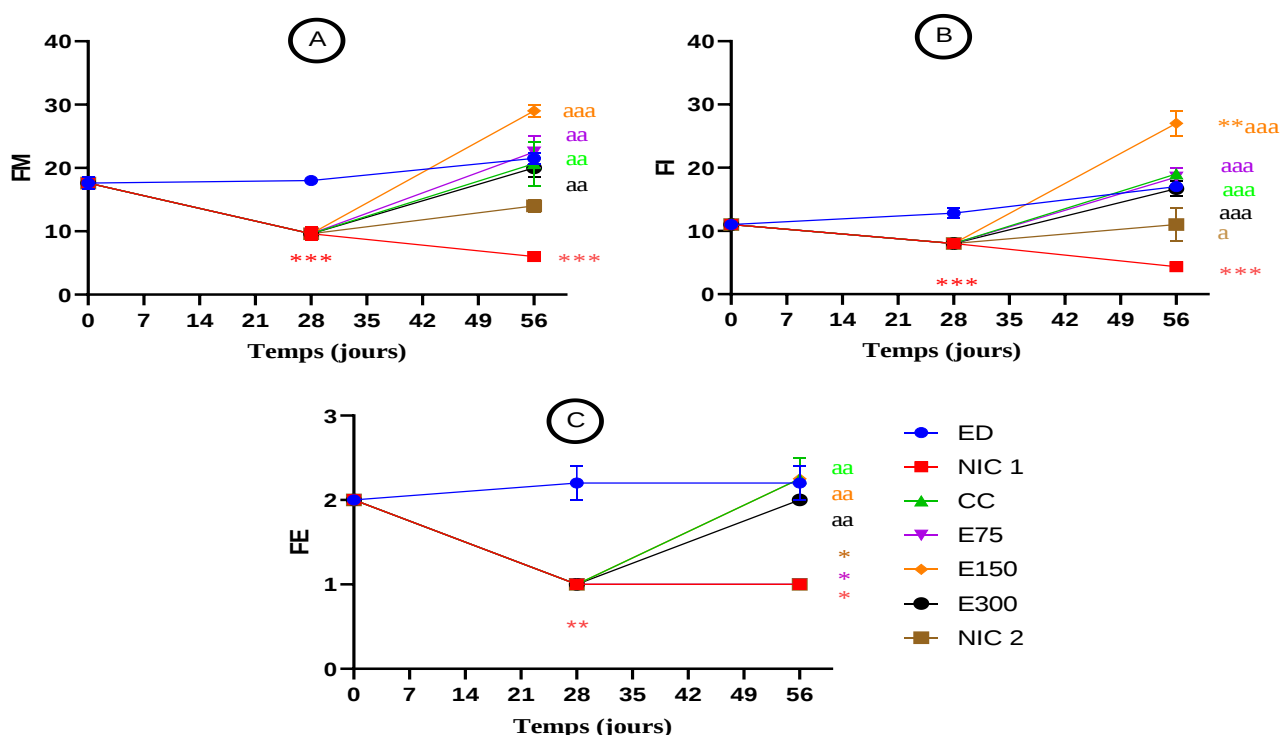


Figure 14: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les fréquences de monte(A), d'intromission(B), d'éjaculation(C).

Les points représentent la moyenne $\pm$ E.S.M/n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique /* $p < 0,05$: / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$: différence significative par rapport au témoin normal. . $a_p < 0,05$ / $aa_p < 0,01$ / $aaa_p < 0,001$: différence significative par rapport au témoin négatif ED : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / NIC 1 : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / CC : témoin positive recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / GG 75, GG 150, GG 300 : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / NIC 2 : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28. FM, FI, FE : temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation et temps de latence d'éjaculation.

III.1.3- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur les masses relatives de quelques organes

Le Tableau VIII présente les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les masses relatives du pénis, muscles élévateurs, prostates, vésicules séminales, épидидymes et testicules. Il

en ressort de ce tableau que dépendamment de la dose et du traitement reçu, les masses relatives des pénis, vésicules séminales, prostates, épидидymes et testicules n'ont connu aucune modification significative.

Tableau VIII: Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur les masses relatives des organes

Groupes	Masse relative (g/100 g)						
	ED	NIC1	CC	GG75	GG150	GG300	NIC2
Organes							
Pénis	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Vésicules séminales	0,44 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,32 ± 0,07	0,44 ± 0,01	0,47 ± 0,09
Prostate	0,13 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Epididymes	0,43 ± 0,02	0,40 ± 0,05	0,46 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,01
Testicules	1,33 ± 0,02	0,94 ± 0,26	1,02 ± 0,04	1,23 ± 0,05	1,01 ± 0,08	1,08 ± 0,06	1,16 ± 0,08

Chaque valeur représente la moyenne ± E.S.M /(n = 5)/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC1** : : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positif recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC2**: témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28 .

III.1.4 Effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques marqueurs biochimiques androgéniques

III.1.4.1- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration sérique de testostérone

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration sérique de testostérone sont présentés sur la Figure 15. La nicotine a entraîné une diminution non significative du taux de testostérone sérique de 32,20 % comparativement aux rats normaux. L'administration de l'extrait aqueux de *Graptophyllum glandulosum* a prévenu la baisse de ce taux de l'ordre de 8,67% et 36,81% respectivement aux doses de 75 mg/ kg et de 150 mg/kg. La dose de 300 mg/kg n'a pas prévenu cette baisse, au contraire elle a semblé renforcer la baisse.

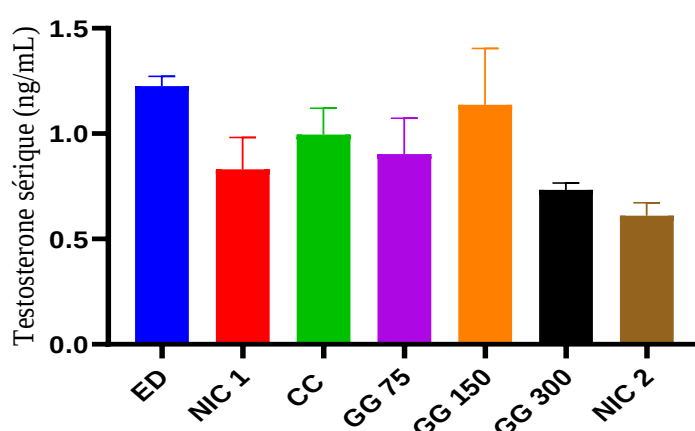


Figure 15 : Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration sérique de testostérone.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1**: témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positif recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** :groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28

III.1.4.2 Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration des protéines testiculaires

L'étude de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration des protéines testiculaires montre que, le taux de protéines testiculaires (Figure 16), des rats du groupe témoin négatif ont présenté une baisse significative de 27,77 % ($p < 0,001$) de ce paramètre comparativement au groupe témoin normal. Par rapport au groupe témoin négatif le taux de protéines testiculaires a significativement augmenté pour le groupe GG 75 de 18,68 % ($p < 0,01$), pour le groupe GG 150 de 44,85 % ($p < 0,001$), pour le groupe GG 300 58,38 % ($p < 0,01$) et pour le groupe NIC 2 de 50,66 % ($p < 0,01$).

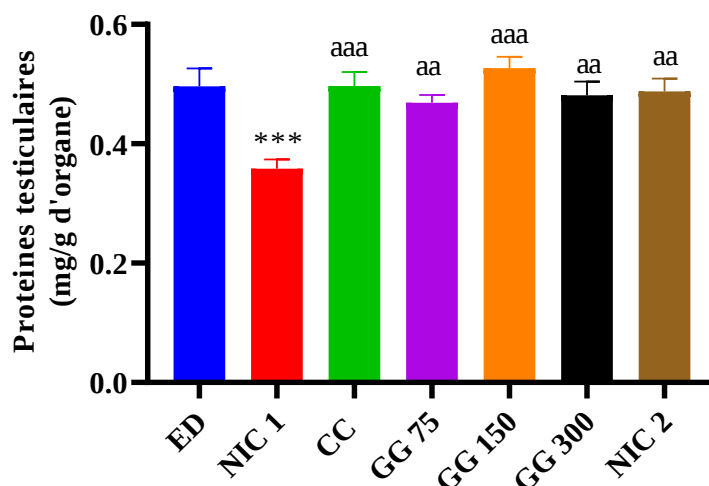


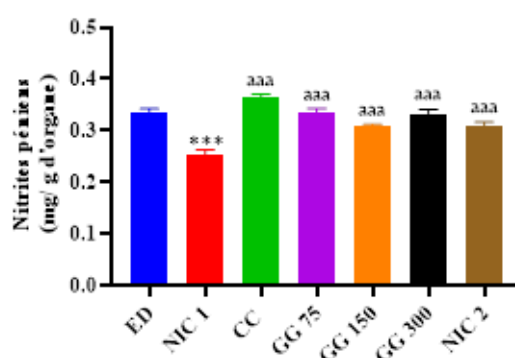
Figure 16 Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration des protéines testiculaires.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique / ***p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin normal. ^{aa}p < 0,01/ ^{aaa}p < 0,001 /: différence significative par rapport au témoin négatif. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positive recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28.

III.1.4.3- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration pénienne des nitrites.

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *G. glandulosum* sur la concentration des nitrites pénienne sont présentés à la Figure 17.

Les résultats obtenus révèlent une baisse significative du taux des nitrites péniers (Figure 16) chez les rats du groupe témoin négatif de 24,70 % (p < 0,001) par rapport au groupe témoin normal. En comparaison au groupe témoin négatif, le taux de nitrites péniers est resté élevé pour les groupes GG 75, GG 150, GG 300 de 32,17 % (p < 0,001), 21,57 % (p < 0,001), 31,37 % (p < 0,001) respectivement.



.Figure 17 : Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration des nitrites péniers.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5 ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique. / ***p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin normal. ^{aaa}p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin négatif. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positive recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28.

III.1.5- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques marqueurs du stress

III.1.5.1- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration de malondyaldéhyde testiculaire

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration de MDA testiculaire (Figure 18) montre que il y a une augmentation significative du taux de MDA testiculaire chez les rats du groupe témoin négatif de 72,90% ($p < 0,01$) comparé au groupe témoin normal. En comparaison au groupe témoin négatif, L'administration de l'extrait à la dose de 150 mg/kg a significativement baissé le taux de MDA de 36,57 % ($p < 0,001$). La dose 300 mg/kg à entrainer une baisse significativement de 56,28 % ($p < 0,001$).

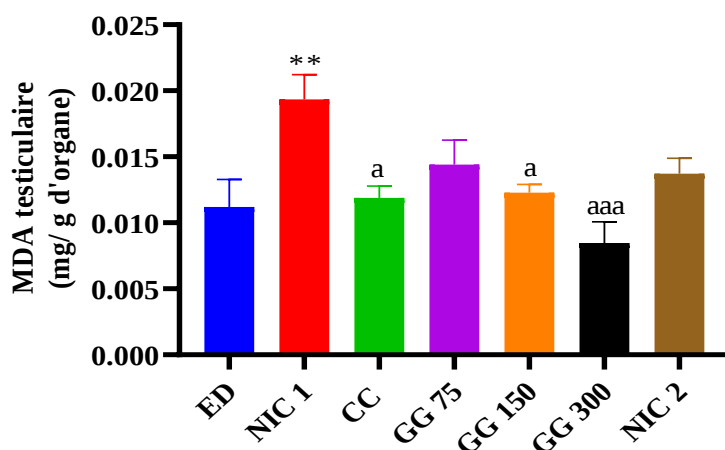


Figure 18: Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur le taux de MDA testiculaires.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique / ** $p < 0,01$: différence significative par rapport au témoin normal. ^a $p < 0,05$, ^{aaa} $p < 0,001$: différence significative par rapport au témoin négatif. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positive recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28.

III.1.5.2- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration de catalase testiculaire

La Figure 19 présente les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur la concentration de catalase testiculaire.

Le taux de catalase testiculaire des rats du groupe témoin négatif a baissé significativement de 66,15% ($p < 0,05$) comparativement au lot témoin normal. L'administration de l'extrait aux doses 150 mg/kg, 300 mg/kg a augmenté significativement ($p < 0,05$) le taux de catalase de trois fois par rapport au lot témoin négatif.

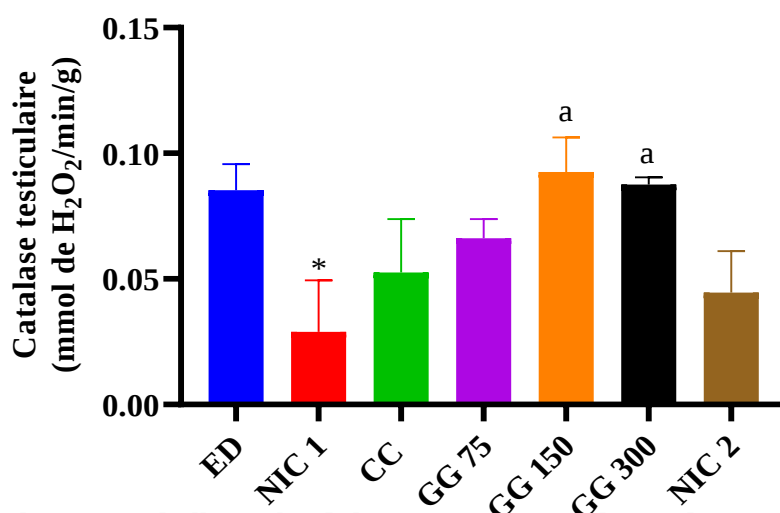


Figure 19: Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur le taux de catalase testiculaires.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique *p < 0,05 : différence significative par rapport au témoin normal. ^ap < 0,05 : différence significative par rapport au témoin négatif. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positif recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28.

III.1.6- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur quelques paramètres des spermatozoïdes

La Figure 20 présente les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *G. glandulosum* sur la mobilité, la vitalité et le nombre des spermatozoïdes. Les résultats obtenus montrent que :

En comparaison au groupe témoin normal, le nombre des spermatozoïdes (Figure 20A) a significativement baissé pour le groupe témoin négatif de 72,00 % (p < 0,001). Comparativement au groupe témoin négatif, le nombre des spermatozoïdes a augmenté pour les groupes GG75, GG150, GG300 de deux fois (p < 0,01).

Pour ce qui est de la mobilité des spermatozoïdes (Figure 20B), il a été observé une baisse significative pour le groupe témoin négatif de 71,04 % (p < 0,001) par rapport au groupe témoin normal. Comparativement au groupe témoin négatif, Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est resté significativement élevé pour le groupe GG75 de trois fois (p < 0,001), et pour le groupe GG150 de deux fois (p < 0,001)

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants (Figure 20C) chez les rats du groupe témoin négatif a baissé significativement de 22,47% (p < 0,05) comparativement au groupe témoin normal. En comparaison au lot témoin négatif le pourcentage des spermatozoïdes vivants est significativement resté très élevé pour le groupe GG 75 de 33,43% (p < 0,01) et pour le groupe GG150 de 38,62% (p < 0,001).

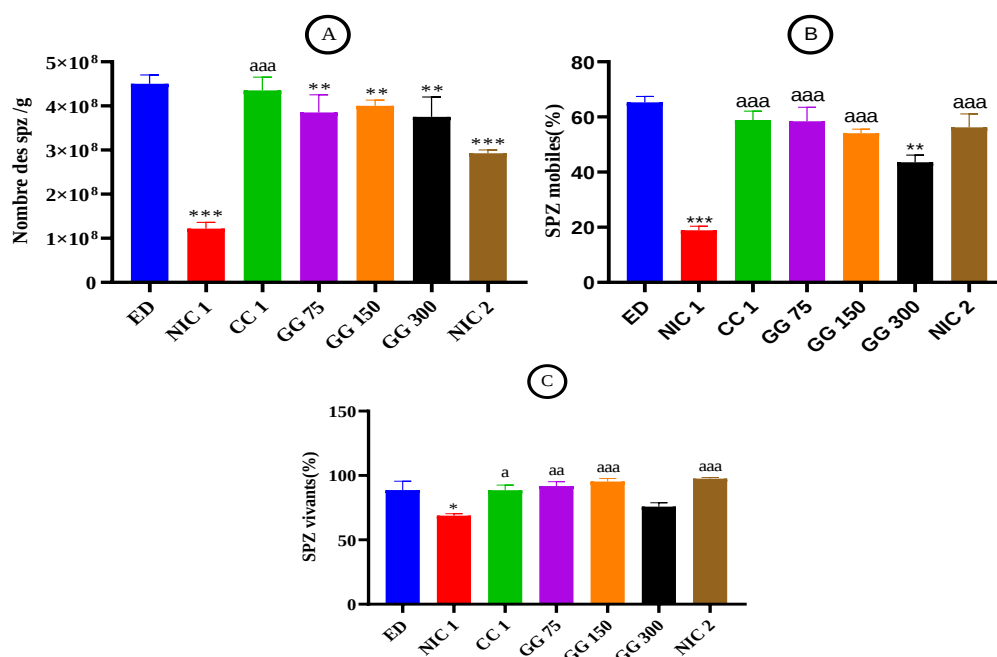


Figure 6: Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur les paramètres des spermatozoïdes.

Les barres représentent la moyenne $\pm$ E.S.M /n = 5/ ANOVA suivi du post test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique / *p < 0,05/ **p < 0,01/ ***p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin normal. ^ap < 0,05, ^{aa}p < 0,01, ^{aaa}p < 0,001 : différence significative par rapport au témoin négatif. **ED** : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC 1** : témoin positive recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28/ **SPZ** : spermatozoïdes.

III.1.7- Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la structure des épидидymes et des testicules

La Figure 21 ci-dessous présente les effets de l'administration de l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* sur la structure de certains organes androgénodépendants (l'épididyme et le testicule)

Chez les rats du groupe normal, il a été noté sur les coupes du testicule, la présence des tubes séminifères présentant des cellules germinales à différents stades de développement allant des spermatogonies aux spermatozoïdes. Sur les coupes de la queue de l'épididyme, il a été noté la présence des spermatozoïdes dans la lumière du tube épидидymaire.

Comparativement aux normaux, les animaux du groupe témoin négatif ont présenté plusieurs modifications histopathologiques. Au niveau des testicules, il a été observé des clarifications de l'épithélium séminifère et une réduction de la densité des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Au niveau de l'épididyme il a été noté également la réduction de la densité des spermatozoïdes. Chez les animaux qui ont reçu l'extrait à différentes doses, il a été observé une réorganisation de la structure testiculaire qui était assez similaire à celle du normal.

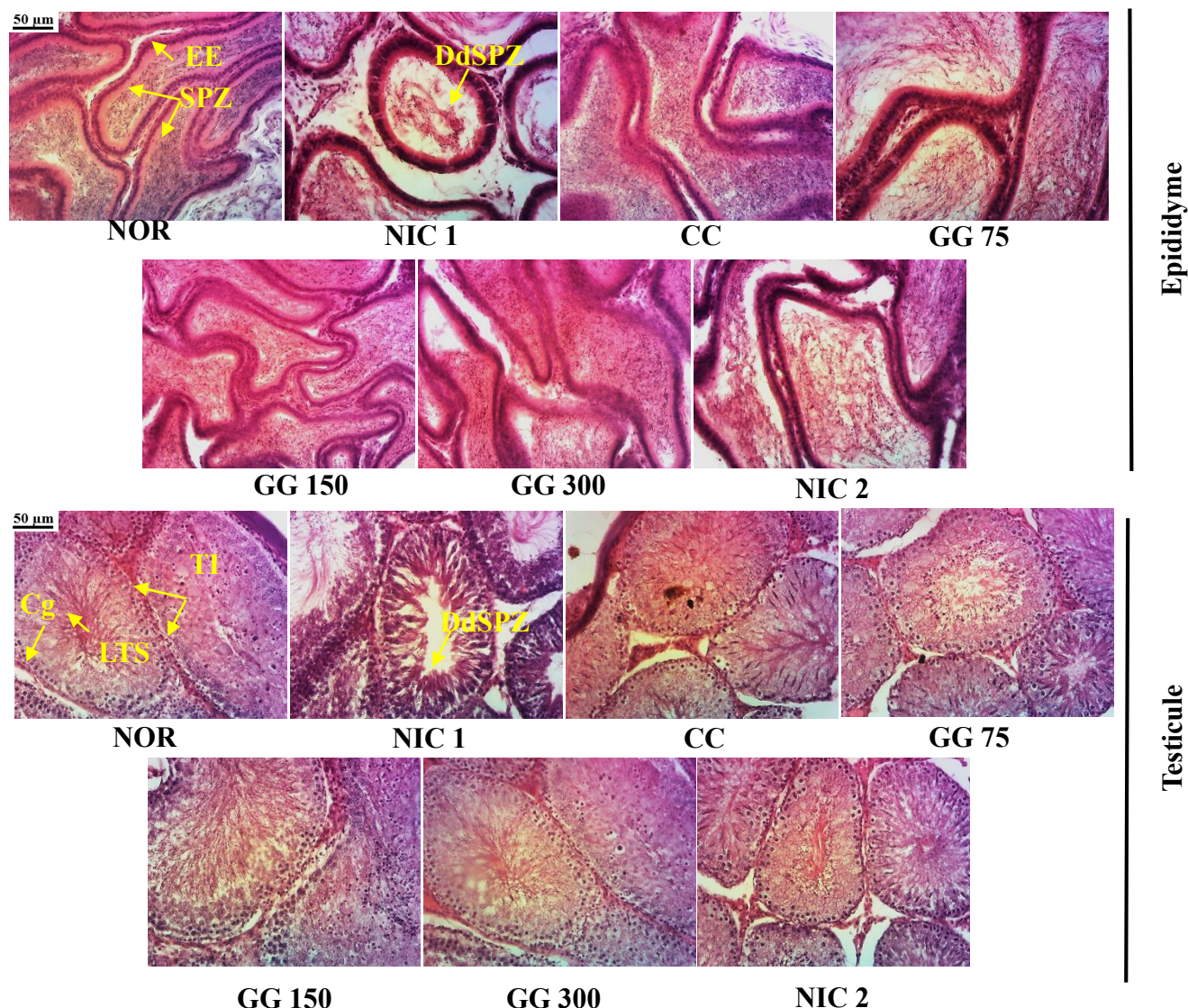


Figure 21: Effets de *Graptophyllum glandulosum* sur la structure de l'épididyme et du testicule (HE, 100X).

Epididyme ; EE = Epithélium épididymaire, Spz = Spermatozoïde ; **Testicule** ; Cg = cellules germinales ; Ti = Tissu interstitiel, Lts = Lumière du tube séminifère; DdSPZ = Diminution de la densité des spermatozoïdes. ED : témoin normal recevant la solution physiologique et l'eau distillée / **NIC 1** : témoin négatif recevant la nicotine et l'eau distillée / **CC** : témoin positif recevant la nicotine et le citrate de clomifène à la dose 1mg/kg / **GG 75, GG 150, GG 300** : groupes recevant de la nicotine et traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* aux doses respectives de 75, de 150 et de 300 mg/kg / **NIC 2** : témoin réversible recevant de la nicotine jusqu'au jour 28/ **SPZ** : spermatozoïdes.

III.2- DISCUSSION

Les effets de *Graptophyllum glandulosum* en traitement curatif sur quelques troubles de la fonction de reproduction mâle induits par la nicotine chez le rat ont été étudiés. Le comportement sexuel constitue une chaîne de réponses comportementales qui commencent par la parade nuptiale et aboutit à la copulation (Sakina *et al.*, 2018). Le comportement sexuel masculin dépend de la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig des testicules et métabolisée dans les cellules cibles en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α -réductase (Mc Ginnis *et al.*, 1989). Le comportement sexuel mâle fait également intervenir les œstrogènes qui assurent le maintien de l'intromission vaginale dans la copulation (O'Hanlon *et al.*, 1981) et résulte de l'aromatisation de la testostérone par l'aromatase au niveau des tissus cibles (Mc Ginnis *et al.*, 1989). Par ailleurs, la testostérone augmente l'irrigation du pénis via l'augmentation de la NO synthase et le taux de GMPc dans les cellules lisses du pénis (Armagan *et al.*, 2006).

Dans ce travail, il a été observé chez les animaux qui ont reçu de la nicotine, une diminution de la motivation et la performance sexuelle se traduisant d'une part par une augmentation du temps de latence de monte, d'intromission, d'éjaculation et d'autre part, par une diminution de la fréquence de monte, d'intromission, et d'éjaculation. Ceci pourrait être due à une altération de la cytoarchitecture testiculaire qui affecte négativement le nombre et la fonction des cellules de Leydig, conduisant à une chute du taux de testostérone sérique (Oyeyipo *et al.*, 2010). En effet, La nicotine déclenche la production des radicaux libres qui induisent à leur tour un stress oxydant dans le testicule (Oyeyipo *et al.*, 2014). Cela entraînerait la peroxydation lipidique des cellules de Leydig réduisant ainsi la sécrétion de testostérone (Hamai et Mehrpour, 2017). Le stress oxydant est marqué dans le présent travail par une élévation du taux de malondialdéhyde (MDA) et la baisse de l'activité de la catalase. De plus, la diminution de la performance sexuelle peut être liée à la baisse des nitrites péniens observée dans la présente étude. Ceci peut être corrélé à la diminution du taux de testostérone. En effet la testostérone stimule la production du eNOS qui catalyse la synthèse du NO. Ce NO libéré stimule la dilatation des muscles lisses des corps caverneux du pénis ; via la production du GMPc (Armagan *et al.*, 2006)

Ces résultats sont similaires à ceux de Oyeyipo *et al.*, 2011 qui a montré que la nicotine diminue la motivation et la performance sexuelle matérialisé par une variation similaire des paramètres sus-évoqués. L'extrait aqueux de *G. glandulosum* a augmenté la fréquence de monte, d'intromission et d'éjaculation chez les animaux traités. Par contre cet extrait a réduit les temps de latence de monte, d'intromission et d'éjaculation. Il est connu que la diminution des temps de latence de monte, d'intromission, et d'éjaculation ainsi que l'augmentation des fréquences de monte, d'intromission et d'éjaculation traduisent respectivement une augmentation des performances et la motivation sexuels (Kenmogne *et al.*, 2016 ; Talla *et al.*, 2019). *G. glandulosum* augmenterait donc la performance et la motivation sexuelle. Ceci peut être attribué à la présence

de certains composés bioactifs présents dans la plante tels que les polyphénols et les flavonoïdes (Udeoyo *et al.*, 2015 ; Keumedjio *et al.*, 2023). Ces composés ont des propriétés aphrodisiaque, androgénique et antioxydant. Les travaux menés par Tagousop *et al.* (2017) montrent que *G. glandulosum* est riche en flavonoïdes et en polyphénols. Les flavonoïdes et les polyphénols sont capables de relaxer les corps caverneux via l'augmentation de l'expression de la eNOS dans le pénis ainsi que le taux de GMPc dans les cellules musculaires du pénis facilitant ainsi un flux sanguin vers ces corps érectiles, ce qui favorise l'érection (Drewes *et al.*, 2003). Les flavonoïdes, inhibent également l'activation de la phosphodiesterase qui réduit l'irrigation sanguine du pénis (Ganiyu *et al.*, 2015). De plus les flavonoïdes stimulent la formation de l'androsténone, hormone stéroïde précurseur dans la biosynthèse de la testostérone (Koffi *et al.*, 2022).

La baisse du poids relatif des testicules induite par la nicotine de même que la baisse du taux de protéines de cet organe pourrait, d'une part, être une conséquence de la baisse du taux de testostérone suite à la dégénérescence et la désorganisation de la cytoarchitecture observée au niveau les coupes histologiques du testicule, et d'autre part au stress oxydant. L'administration de l'extrait a prévenu la baisse du taux de protéines. Ces résultats seraient dûs à la présence des flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont capables d'augmenter la sécrétion de la testostérone au niveau des testicules (Koffi *et al.*, 2022). Cette testostérone exerce un effet anabolisant en stimulant l'absorption des acides aminés et la synthèse des protéines (Vingren *et al.*, 2010). L'activité antioxydante est matérialisée par la baisse du taux de malondialdéhyde (MDA) ainsi que celle de l'activité de la catalase dans les testicules. Les flavonoïdes sont capables d'exercer une activité antioxydante à travers la prise en charge des radicaux libres, l'inhibition de la production des EROs ou l'inhibition de la peroxydation lipidique (Grassi *et al.*, 2010). Ceci pourrait témoigner les potentialités androgéniques et antioxydants de *G. glandulosum*.

La nicotine a induit une baisse du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes. La baisse du nombre des spermatozoïdes totaux était visible sur les coupes histologiques du testicule présentant une baisse de la densité des spermatozoïdes. Ceci pourrait être dû à une baisse du taux de testostérone induite par la nicotine. En effet, la testostérone est nécessaire pour l'initiation et le maintien de la spermatogenèse (Akassa *et al.*, 2019). Dans cette étude, l'extrait a induit une augmentation du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes. L'analyse phytochimique quantitative montre que, l'extrait possède des polyphénols et des flavonoïdes. Ces composés bioactifs augmentent l'expression de la protéine STAR, responsable de l'internalisation mitochondriale du cholestérol, étape limitante de la stéroïdogénèse (Manna *et al.*, 2009).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail nous a permis d'évaluer l'effet l'extrait aqueux des feuilles de *Graptophyllum glandulosum* en traitement curatif sur quelques altérations de la fonction de reproduction mâle induite par la nicotine chez le rat Wistar. Il en ressort que l'extrait aqueux de *Graptophyllum glandulosum* aurait des propriétés aphrodisiaques se traduisant par amélioration du comportement et la performance sexuelle ceci due à la présence des composés tels que les flavonoïdes et les polyphénols. L'extrait a amélioré les altérations provoquées par le stress oxydant. L'extrait a aussi induit une augmentation du taux de protéines testiculaires traduisant son potentiel androgénique. L'administration de l'extrait *Graptophyllum glandulosum* a restauré certaines altérations spermatiques induites chez les rats suite à l'administration de la nicotine notamment le nombre, la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes corrélés par une forte densité de spermatozoïdes testiculaires au niveau histologique. Ces résultats soutiennent son utilisation empirique pour la prise en charge de certains troubles de la fonction de reproduction chez l'homme.

En guise de perspectives nous proposons d'évaluer :

- l'effet de *Graptophyllum glandulosum* sur les sécrétions des glandes annexes ;
- l'effet de l'extrait sur la descendance des animaux traités en les croisant avec les femelles de fertilité prouvée ;
- la toxicité de l'extrait de *Graptophyllum glandulosum*.

REFERENCES

- Agarwal A, Said T.** (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *British Journal of Urology International*. 95:503-507.
- Akassa H, Makemba N, Nkoua B, Etou O, Tamboura H, Abena A.** (2019). Effets de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Ppausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction chez le rat male wistar. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*. 7: 732-740.
- Akomolafe O, Imafidon C, Olukiran O, Oladele A, Akanji B.** (2017). Sub-acute administration of lower doses of nicotine caused sex dependent improvement of renal function in Wistar rats. *Toxicology Reports*. 4: 535 - 542
- APG IV** (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the order families of flozering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 181: 1-20
- Arabi M.** (2004). Nicotine infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia*. 36: 305 - 310.
- Arimitsu N, Kogure T, Baba T, Nakao K, Hamamoto H, Sekimizu K, Yamamoto A, Nakanishi H, Taguchi R, Tagaya M, Tani K.** (2011). P125/Sec23-interacting protein is required for spermiogenesis. *FEBS Letters*; 585: 2171-2176.
- Armagan A, Kim N, Goldstein I, Traish A.** (2006). Dose-response relationship between testosterone and erectile function: Evidence for the existence of a critical threshold. *Journal of Andrology*. 27: 517 - 526.
- Bâali R.** (2020). Examen de spermogramme en cas d'infertilité masculine. *Mémoire en Biologie Animale*. 70p.
- Barker R.** (1986). Graptophyllum nees. *Journal Adelaide Botanic Gardens*. 9:156-166.
- Baronne R.** (2001). Chapitre II : Appareil génital mâle : Anatomie comparé des mammifères domestiques. *Splanchnographie II*. Vigot, Tome 4, 83-250.
- Bekker J.** (1996). Sexual dimorphisms in sexual and non-sexual behaviors: sexual differentiation of the brain and partner preference in the rat. *PhD thesis. Erasmus University, Rotterdam*. pp. 13 - 36.
- Boguenet M.** (2021). L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine. *Médecine humaine et pathologie*. Université d'Angers. Français. 164p.
- Caraty A, Ditoz A, Pelletier J, Thierry J, Tillet Y, Bouchard P.** (2001). Libération pulsatile des gonadotrophines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la pulsatilité de la LH. Charles Thibault et Marie Claire Levasseur : La reproduction chez les mammifères. Ellipse. Paris. pp. 85 – 99.
- Cartledge J, Minhas S, Eardley L.** (2001). The role of nitric oxide in penile erection. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2: 95 - 107.

- Champroux A.** (2018). Impact du stress oxydant sur l'intégrité de l'épi-génome spermatique murin. *Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Sante, Agronomie, Environnement, Université de Clermont Auvergne, France.* 493 p.
- Chen S, Allam J, Duan Y, Haidl G.** (2013). Influence of reaction oxygen species on human sperm function and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 288:191-199.
- Clark A, Hendeson L.** (2003). Behavioral and physiological responses anabolic androgenic steroids. *Neuroscience Biobehavioral Reviews.* 27: 413 - 436.
- Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R.** (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics.* 68: 15- 26.
- Dodé C, Teixeira L, Hardelin J.** (2008). Le syndrome de Kallmann de Morsier : génétique et physiopathologie. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie.* 10 : 131-134.
- Drewes S, Georges J, Khan F.** (2003). Recent findings on natural products with erectile dysfunction activity. *Phytochemistry.* 62: 1019 -1025.
- Eecke V.** (2019). Cause de l'infertilité masculine et intérêt de FIV ICSI/ IMSI. *Thèse de doctorat en Science Pharmaceutique. Université de Picardie Jules Verne.* 50p.
- Epoupa N, Mbouche L, Moby Mpah E, Mekeme Mekeme J, Essomba A, Ebe NkoloD, Feukam D, F Angwafo F Mboudou E** (2023). Profil clinique et morphologique de l'infertilité masculine dans trois hôpitaux de référence de la ville de Douala au Cameroun. *African urologie.* 3 :77-81.
- Fizazi A.** (2016). Evaluation de l'infertilité masculine dans l'ouest algérien: étude épidémiologique et biologique. *Thèse de Doctorat, Université Djillaliabés de Sidi Bel Abbes.* 139 p.
- Fouda J, Mekeme J, Nwaha A, Epoupa N, Owon'Abessolo P, Mbouche L, Mbassi A, Fouda P, Essomba A.** (2022). Aspects Épidémiologiques de l'Infertilité Masculine à l'Hôpital Central de Yaoundé. *Health Sciences and Disease.* 23: 151-153.
- Ganiyu O, Adedayo O, Ademiluyi, AYokunle O, Ademosun, Tosin A, Olasehinde, Sunday I, Oyeleye, Aline A, Boligon, Margareth L, Athayde.** (2015). Phenolic extract from *Moringa oleifera* leaves inhibits key enzymes linked to erectile dysfunction and oxidative stress rats in penile tissues. *Biochemistry Research International.* 8p.
- Godiot C.** (2016). Physiologie et pathologie de la reproduction chez l'âne : étude bibliographique. *Thèse de Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.* 135 p.
- Gornall A, Bardawill C, David M.** (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry.* 177: 167-182

- Talla C, Ilyassa Y, Nnanga N, Dibong S, Mpondo.** (2019). Evaluation of aphrodisiac properties of the aqueous extract of the trunk barks of *Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae) on albino rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 13: 480-486.
- Terranova PF.** (2004). Medical physiology. Part X: *Reproductive Physiology Chapter*. 37: 659-660.
- Thibault C.** (2001). La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Edition Ellipses. 928p.
- Trudel G.** (2020). Évaluation et traitement par des méthodes psychologique, interpersonnelle et biologique. *Les dysfonctions sexuelles*. 2 : 770.
- Tsakem NMJ, Fokou R, Walbadet L, Betene ANM, Owona PE, Kamkumo RG, Tsofack FN, Dimo T.** (2023). Aphrodisiac potentials of the aqueous extract of *Hibiscus asper* Hook of leaves (Malvaceae) in male Wistar rats. *Journal of Phytopharmacology*. 12: 11-19.
- Udeoyo I, Ejikeme C, Eboat A, Arinze R.** (2015). The efficacy *Pycnanthus angolensis* Timber: an assay of its properties, chemical constituents and function group analysis. *Global Journal Biotechnology Biochemistry*. 10: 121-125.
- Vargas A.** (2021). La maturation de la protamine-2 dans l'organisation post-méiotique du génome mâle. *Thèse de doctorat en chimie biologie. Université de Grenoble Alpes, France*. 161p.
- Vingren J, Kraemer J, Ratames A, Anderson M, Volek S, Maresh M.** (2010). Physiologie de la testostérone dans les exercices de résistance et entraînement des éléments régulateurs en amont. *Médecine Sportive*. 40: 1037- 1053.
- Wilbur M, Bernheim F, Shapiro W.** (1949). Determination of lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 24: 305 - 310
- Wöleinbauer G, Nieschlag E.** (1993). Hormonal control of spermatogenesis. In: Molecular biology of the male reproductive system. David de Kretser. Academic press, New York. pp. 99 -142.
- Wright C, Milne S, Leeson H.** (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinique, lifestyle and nutritional factors in male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 28: 684 - 703.
- Yakubu T, Afolayan A.** (2008). Effect of aqueous extract of *Bulbine natalensis* (Baker) stem on the sexual behavior of male rats. *International Journal of Andrology*. 1: 1- 8.
- Young J.** (2016). Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration MCED. *Clinical Endocrinology*. 80: 29 -36.
- Zeriuoh I.** (2010). Etude de la consommation du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle de la souris Swiss. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 24: 84 - 85.

Zingue S. (2014). Effets oestrogéniques des extraits de *Milletia macrophylla* Benth. (Fabaceae) et contribution à sa caractérisation phytochimique. *Thèse de Doctorat en Biologie Animale. Université de Yaoundé, Cameroun. I* 286p.

ANNEXES

Annexe 1: Préparation des solutions

➤ Préparation de la solution de *Graptophyllum glandulosum*

➤ Solution d'extrait aqueux

L'extrait aqueux a été préparé à trois concentrations :

- En dissolvant 0,075 g de l'extrait ou de la fraction dans 10 mL d'eau distillée ;
- En dissolvant 0,15 g de l'extrait ou de la fraction dans 10 mL d'eau distillée ;
- En dissolvant 0,30 g de l'extrait ou de la fraction dans 10 mL d'eau distillée ;

➤ Solution de citrate de clomifène

La solution de citrate de clomifène a été obtenue en dissolvant un comprimé entier, contenant l'équivalent de 50 mg de principe actif, dans 500 mL d'eau distillée. Nous avons déterminé le volume de substance à administrer à chaque dose grâce à la formule

$$V = \frac{P \times D}{C}$$

V = volume de solution à administrer à un rat en mL

P = poids du rat en kg

D = dose administrée en mg/kg

C = concentration de la solution en mg /mL.

➤ Solution de nicotine à administrer aux animaux

La solution à la dose de 1mg/kg de nicotine a été préparée à partir du tartrate de nicotine en poudre et du NaCl 0,9 % en fixant un volume de 0,5 mL de solution pour 100 g de poids corporel.

➤ Solution de NaCl 0,9 %

Le NaCl 0,9% a été acheté dans une pharmacie.

➤ **Réactif de Biuret** : Le réactif de Biuret a été préparé à partir des solutions A et B. La solution A a été obtenue en faisant dissoudre 0,75 g de sulfate de cuivre hydraté (CuSO₄, 5H₂O) et 3 g tartrate de sodium potassium dans 100 mL d'eau distillée. La solution B a été obtenue en faisant dissoudre 15 g de soude dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions ont été mélangées et le volume final a été ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée ;

➤ **Solution SAB (sérum albumine bovine)** : la solution de SAB (3 mg/mL) a été obtenue en dissolvant 0,03 g de SAB dans 10 mL d'eau distillée.

➤ **Solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM** : pour obtenir cette solution, 243 µL de peroxyde d'hydrogène à 35 % ont été dilués dans 50 mL d'eau distillée ;