



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

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat 3^{ème} Cycle

Spécialité : Biologie

Option : Biologie de la reproduction et du développement

INTITULE

**EFFET DE L'EXPOSITION CHRONIQUE AUX ALCALOÏDES TOTAUX DU
TABAC SUR LA FONCTION REPRODUCTRICE CHEZ LES RATS MÂLES
WISTAR: EFFET PREVENTIF DE LA FRACTION D'ACETATE D'ETHYLE DE
L'EXTRAIT DE THE VERT**

Présenté par :

Mr BENALIA ABDELKRIM

Soutenu le : 26/05/2016

Devant le jury composé de :

Président : Mr BENALI Mahmmoud

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbès

Directeur de thèse : Mme BENDAHDANE Malika

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbès

Co-directeur : Mme AIT HAMADOUCHE Nadia

Professeur, Univ. Ben Bella, Oran1

Examineurs : Mr CHABANE-SARI Daoudi

Professeur, Univ. Tlemcen

Mr SLIMANI Miloud

Professeur, Univ. Saida

Mr BEGHADALI Benali

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbès

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

*À Dieu qui nous a nantis de la formidable faculté de
raisonnement et qui nous a donné le courage et la volonté,
pour mener à terme ce modeste travail.*

*Alhamed li Allah le Tout Miséricordieux, le Très
Miséricordieux, L' Omniscient
Et Le Généreux.*

*Au professeur M. Bendahmane, pour nous avoir permis
le privilège d'accéder à ses riches connaissances, pour son
soutien durant tout notre cursus universitaire, et pour ses
sacrifices que je tiens à apprécier énormément.*

*Au Professeur N. Aithamadouche, pour sa fructueuse
collaboration durant la réalisation de ce travail, pour son
temps et pour tout ce qu'elle a fait pour me permettre
d'avancer, labeur que personne n'aurait pu supporter.*

Je vous présente tous mes respects.

*Au Professeur M. Benali d'avoir accepté de présider le
jury de l'évaluation de ce modeste travail.*

*Aux membres du jury : Pr D. Chabane-Sari, Pr
M. Slimani et Pr B. Beghdadli pour l'honneur
qu'ils nous font, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Au docteur N. K. Haldi, pour son aide, pour nous avoir
fourni le matériel biologique nécessaire pour ce travail.*

Pour tout ceci, je vous présente toute ma gratitude.

*Au professeur F. Toumi pour son aide en matière de
produits et pour m'avoir accepté parmi ses adorables
étudiants, je vous remercie énormément.*

*A Monsieur M. Benalia, professeur de français,
économie et statistique, pour ses précieux conseils de langue, et
pour le temps qu'il m'a consacré en corrigeant ce travail.*

*A Mr A. Achemaoui pour son aide et son soutien lors
de la réalisation de la partie pratique.*

*A Mr Dj. Bouloubaque, Mr N. Makhfi, Mlle
D. Laloute, Mme Narimène et Mr A. Lazzazi pour
leur patience et leur confiance.*

*A tous le staff du laboratoire des analyses médicales surtout,
latifa, cherifa, majda et noureddine pour leur collaboration.*

Au groupe de l'animalerie de l'université de Mascara.

*« Mes remerciements les plus sincères à toutes et à tous ainsi
qu'à toutes les autres personnes qui auront contribué de près ou
de loin à l'élaboration de ce modeste travail ».*

Cordialement

Dédicace

À mon père et à ma mère, que Dieu les garde pour moi, pour leur contribution, leur soutien leur amour et leur patience. Pour tous les bons moments dont ils m'ont agrémenté tout au long de ma vie.

À tous mes professeurs que je respecte énormément,

À mon frère A.L.I, et mes deux sœurs Asma et Hadjer, vous être la plus belle fratrie du monde que je n'avais jamais espéré avoir.

À tous mes oncles et mes tantes, et à leurs enfants, je vous adore tous.

À tous mes collègues de promotion, doctorants et doctorantes, Amine A, hicham A, Nour el houda B, Amina Serrou et Awali M, je ne vous souhaite que du Bonheurs mes frères et sœurs du cursus.

Aux merveilleuses filles du monde, que Dieu m'a permis de connaître et qui m'ont beaucoup aidé pendant la réalisation de ce travail, Faiza M, Hanane R, et Hanane S et Amina S et mckhtaria votre frère vous aime.

Aux meilleurs amis du monde, Benameur B, Hamza L Djamel M, Amine M, Ahmed et Slimane J, Salah B, Ammar B, Mohammed D, Sofiane K, Mustapha D, Sofiane B, Assi M, Mohammed B, Abbès D et Nabil M, Felhi B et Mounir C.

À la mémoire de ceux qui nous ont quittés mais dont les noms sont gravés dans nos cœurs:

Hadj Allal, « une dédicace spéciale pour toi, ton fils aurait beaucoup aimé que tu sois là pour me soutenir, tu étais toujours le modèle pour tes enfants. Je ne t'oublierai jamais »

*Hadj Abdelkader, Hadja kheira, Hadja halima Ma tante kheira
Que dieu les bénisse tous,*

Je dédie ce travail



Résumé

Le tabac est l'un des agents les plus incriminés dans les infertilités masculines. Toutefois, ses répercussions sur la reproduction, en dehors de la grossesse et du développement embryonnaire et fœtal, sont peu évaluées. L'objectif principal de notre étude est d'évaluer les effets des alcaloïdes totaux du tabac (ATT) sur la structure histologique des testicules, les paramètres du sperme et le taux des hormones sexuelles, et de mettre en évidence le lien entre ces effets et le stress oxydatif supposé d'être un mécanisme majeur d'induction de ces derniers. Une deuxième partie de la recherche est désignée à examiner l'effet protecteur des polyphénols de thé vert *in vivo*, après avoir réalisé une étude phytochimique *in vitro* en vue d'une optimisation de l'utilisation de thé vert en tant qu'une source d'antioxydants. Pour la première partie, deux groupes de rats mâles de souche WISTAR (n=5) d'un âge moyen de deux mois ont été utilisés. Les rats ont reçus par gavage pendant 30 jours, les ATT à raison de 2,5 mg/kg et 5mg/kg de poids corporel (G1 et G2 respectivement). Quant à la deuxième partie, trois autres groupes ont reçu la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait de thé vert (FAE) à raison de 50mg/kg combinée aux ATT à faible dose (G3) et à forte dose (G4), alors que les animaux du (G5) ont été traités par la FAE seule pour déterminer la sécurité de ce traitement. Le sixième groupe (G6) est considéré comme témoin pour les deux parties de l'étude. Les animaux de ce groupe ont été traités par le véhicule des différents extraits (ATT et FAE). Les résultats de l'étude phytochimique ont montré que la FAE possède l'activité antioxydante la plus puissante par rapport à l'extrait total de thé vert et à ces autres fractions. Nos résultats ont montré un effet reprotoxique dose dépendant considérable des ATT à différents niveaux. La diminution de la qualité du sperme à savoir une réduction du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes a été constatée. Des atteintes histologiques notamment une hypotrophie du tissu interstitiel, une réduction du nombre des cellules de la lignée germinale ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères ont été également notées. Ces effets semblent être plus prononcés à forte dose des ATT atteignant la rupture de la barrière hémato-testiculaire et une diminution du nombre des cellules de Sertoli. Sur le plan hormonal, une diminution sévère du taux de la testostérone quelle que soit la dose administrée des ATT et une diminution moins importante de la FSH associée à une augmentation du taux de la LH ont été enregistrées. Ces effets reprotoxiques ont été liés à une diminution de l'activité antioxydante d'autant plus au niveau testiculaire et épидидymaire qu'au niveau du plasma sanguin, et à une augmentation des taux de TBARS qui témoigne d'une forte peroxydation lipidique. En outre, la FAE a significativement réduit ces effets avec une conservation quasi-complète des différents compartiments et fonctions de la reproduction quand elle est combinée à la faible dose des ATT, alors qu'avec la forte dose, elle a pu significativement minimisée les effets des ATT. Cependant, aucun effet toxique n'a été enregistré chez le groupe traité par la FAE seule. En conclusion, les ATT sont capable d'induire une forte reprotoxicité stress oxydatif dépendante qui peut être réduit par l'utilisation des polyphénols de thé vert.

Mots clés : tabac, thé vert, rats mâles, reprotoxicité, stress oxydatif, antioxydants.

Abstract

Tobacco is one of the most susceptible agents that can induce male infertility. However, its effects on reproductive system, apart from pregnancy, embryonic and fetal development, are not well evaluated. The principal aim of our study is to assess tobacco total alkaloids (TTA) effects on the histological structure of testes, sperm parameters and on sexual hormones, and to highlight the relationship between these effects and oxidative stress supposed to be a major mechanism of their induction. A second part of this study was carried out to assess the *in vivo* green tea protective effects. Before that, an *in vitro* phytochemical study was conducted in order to optimize the green tea use as antioxidants source. First of all, two groups of male WISTAR rats aged of two months (n=5) received during 30 days by gavage, TTA at 2,5 mg/kg and 5mg/kg of bodyweight (G1 and G2 respectively), while, for green tea protective effect assessment, animals received the ethyl acetate fraction of green tea extract (EAF) at 50mg/kg combined with TTA at either low (G3) or high dose (G4), whereas the animals of the fifth group (G5) were treated by the EAF alone, in order to assess its safety. For control group (G6), animals received the vehicle of different extracts (TTA and EAF). Results obtained from the phytochemical study showed that EAF possesses the most powerful antioxidant activity as compared to green tea total extract and its other fractions. The *in vivo* study results showed a dose-dependent reprotoxic effect of TTA on all studied parameters. TTA induced a dose-dependent decrease in sperm count, motility and viability of sperm cells. These observations were associated with a histological alteration of testes with interstitial tissue hypotrophy, reduced sperm cells number in the lumens and a deterioration of spermatogenesis within seminiferous tubules. These effects seem to be more pronounced at high dose of TTA, with ruptured blood-testis barrier and a reduced number of Sertoli cells. The hormonal study showed reduced levels of testosterone and FSH related to a significant increase in LH level at only high dose. These findings were associated with a decrease of blood plasma, testes and epididymis total antioxidant activity and high levels of lipid peroxidation. It is to note that EAF treatment has significantly decreased TTA reprotoxicity in particular on testes histological structure, sexual hormone levels and sperm parameters. Furthermore, no related toxic repercussions of EAF has been observed in G5. In conclusion, TTA exposure can involve a considerable oxidative stress-dependent reproductive toxicity, which can be reduced using green tea phenolic compounds.

Key words: Tobacco, Green tea, male rats, reproductive toxicity, oxidative stress, antioxidants.

مُلَخَّص

ان الهدف من وراء هذه الدراسة هو تقييم آثار التعرض لقلويدات التبغ (ATT) بجرعات مختلفة التركيز على الخصوبة والقدرة الإنجابية، و نخص بالذكر الاثر على التركيب النسيجي للخصية، نوعية الحيوانات المنوية ومستويات الهرمونات الجنسية في الدم، كما تطرقنا للصلة التي قد تكون بين الاثار السالبة الذكر وحالة الاجهاد التأكسدي التي من المفترض أن تكون الآلية الرئيسية لمثل هذه الاثار. احتوت هذه الدراسة ايضا على جزء ثانٍ خصص لدراسة تأثير المواد المضادة للأكسدة كالبوليفينول المستخلص من الشاي الأخضر على ما سبق من اثار. أولاً، استخدمت مجموعتان من الجرذان الذكور من سلالة Wistar (ع = 5) يبلغ متوسط أعمارهم شهرين كاملين. عرضت هاتاه الحيوانات بواسطة أنابيب تصل المعدة و لمدة 30 يوما لـ ATT بتركيز 2.5 ملغ / كغ / 5 ملغ/كغ من وزن الجسم (م1 و م2 على التوالي). و اما الجزء الثاني من الدراسة، فقد اجري على أربع مجموعات من الجرذان الذكور Wistar خصصت احداها كمجموعة شاهدة لكل جزأي الدراسة (م6). تلقت حيوانات هذه المجموعة المركب المستعمل لإذابة المستخلصات فيما تلقت المجموعات الثلاث الأخرى الـ FAE بتركيز 50 ملغ / كغ بمعية جرعة منخفضة (م3) وجرعة عالية (م4) من الـ ATT، في حين أن حيوانات (م5) كانت تعالج بالـ FAE فقط. أظهرت الدراسة ان جزءا واحدا من مستخلص الشاي الاخضر و الذي هو جزء خلاص الإيثيل (FAE) لديه أقوى نشاط مضاد للأكسدة وقد تم اختياره بناء على ذلك لإجراء الدراسة على الحيوانات. أظهرت نتائج هذه الدراسة ايضا ان الـ ATT قد اثر على الخصوبة من مختلف النواحي وفقا للجرعة المقدمة في معظم الاحيان. اهم هاته الاثار كان انخفاض نوعية الحيوانات المنوية و الضرر النسيجي بما في ذلك تقلص حجم النسيج الضام، مما قلل من عدد الخلايا المنتجة لهرمونات الذكورة، وكذا انخفاض عدد الحيوانات المنوية داخل الأنابيب المنوية. أظهرت النتائج ان هذه الاثار تميل الى ان تكون أكثر ارتفاعا عند الحيوانات التي تلقت جرعة عالية من الـ ATT، تصل إلى تمزق الحاجز الفاصل عن الدم في الخصية وانخفاض كبير في عدد خلايا سيرتولي. على المستوى الهرموني، لاحظنا انخفاضا شديدا في مستويات هرمون التستوستيرون و FSH، مرتبطا بزيادة في نسبة LH. وقد تم ارجاع هذه التأثيرات على القدرة التناسلية إلى انخفاض في نشاط مضادات الأكسدة على مستوى الخصية والبربخ وزيادة في مستويات TBARS، كما ان استخدام الـ FAE قد قلل إلى حد كبير من حدة هذه الاثار مع الحفاظ شبه الكامل على مختلف الوظائف الإنجابية. من الجانب الاخر، قد تبين ان هذه الاخيرة ليس لها اي آثار جانبية على عمل الجهاز التناسلي، مما يؤكد فعاليتها في التصدي لآثار التبغ على هذا الاخير.

الكلمات المفتاحية: التبغ، الشاي الأخضر، الجرذان، القدرة التناسلية، الأكسدة، مضادات الأكسدة.

Liste des abréviations

Aas : Acide ascorbique	GCG : GalloCatéchine-3-Gallate
ABP : Androgen-Binding Protein	GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
ABS : Absorbance	GOR : Glutathion OxidoRéductase
AcylCoA : Acyl-Coenzyme A	GPx : Glutathion Peroxydase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	GSH : Glutathion
ADP : Adénosine DiPhosphate	GS-SG : Glutathion-S-S-Glutathion
AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés	H&E : Hématoxyline-Eosine
AlCl ₃ : Trichlorure d'aluminium	H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène
ANOVA : ANalyse de la VAriance	H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ : Acide phosphomolybdique
ASH : Action on Smoking and Health	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ : Acide phosphotungstique
ATB : Acide TioBarbiturique	HAM : Hormone AntiMüllérienne
ATP : Adénosine TriPhosphate	HCG: Hormone Chorionique de Croissance
ATT : Alcaloïdes Totaux du Tabac	HCl : Acide ChlorHydrique
Bax : Protéine Bcl-2-associated X protein	HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
BC12 : B-Cell Lymphoma-2	HTB: Hydroxytoluène Butylé
BHT :Barrière Hémato-Testiculaire	KCl : Chlorure de potassium
C : Catéchine	LDL : Lipoprotéines à faible Densité
C3G : Catéchine-3-Gallate	LH : Hormone Lutéotrope
CAF : Caféine	LH-RH : LH-Releasing Hormone
Caspases : Cystéine-aspartate protéases	LSD : Last Significant Difference
Cd : Cadmium	MDA : MalonDiAldéhydes
CG :Cellules Germinales	nAChRs: Récepteurs nicotiniques d'AcétylCholine
CGP : Cellules Germinales Primordiales	NaCl : Chlorure de sodium
CI50 : Concentration minimale d'Inhibition de 50% de la DPPH	NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CL : Cellules de Leydig	NaHCO ₃ : Bicarbonate de sodium
CNS : Système Nerveux Central	NaNO ₂ : Nitrite de sodium
CS : Cellules de Sertoli	NaOH : Soude
DPPH : 2,2-DiPhenyl-1-Picryl-Hydrazyl	NO : Oxyde d'azote
EC : EpiCatéchine	O ₂ : Dioxygène
ECG : EpiCatéchine-3-Gallate	O ₂ •- : Anion superoxyde
EGC : EpiGalloCatéchine	OH• : Radical hydroxyle
EGCG : EpiGalloCatéchine-3-Gallate	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ELFA : Enzyme Linked Fluorescent Assay	ONOO• : Peroxynitrite
FADH : Flavine Adénine Dinucléotide	PAL : Phosphatase ALcaline
FAE : Fraction d'Acétate d'Ethyle	Pb : Plomb
FAq : Fraction aqueuse	PE : Perturbateurs Endocriniens
FCh : Fraction Chloroformique	PSA : Antigène Spécifique de la Prostate
Fe ²⁺ : Fer ferreux	PT : Phénols Totaux
Fe ³⁺ : Fer ferrique	R• : Radical alkyle
FeCl ₃ : Trichlorure de fer	ROO• : Radical peroxyde
FeSO ₄ : Sulfate ferreux	ROOH : Peroxyde
FnB : Fraction n-Butanolique	ROS : Radicaux libre d'oxygènes
FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power	SE : Spécialisation Ectoplasmique
FSH : Hormone Folliculo-Stimulante	S-N-K : Student-Newman-Keuls
GC : GalloCatéchine	

SOD : SuperOxyde-Dismutase

SPZ : Spermatozoïdes

Sry : Sex determining region

TBARS : ThioBarbituric Acid Reactive
substances

TCA : Acide TriChloracétique

TNF : Tumor Necrosis Factor

TPTZ : 2,4,6-TriPyridyl-sTriaZine

VS : Vésicules Séminales

γ -GT : Gamma-glutamylTranspeptidase

Table des matières

Remerciements.....	3
Dédicace.....	5
Résumé.....	6
Abstract	7
ملخص.....	8
Table des matières	11
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	15
Introduction	1
Chapitre I : Problèmes de la fertilité masculine liés à la reprotoxicité.....	6
1. Rappel anatomophysiologique sur la fonction de la reproduction masculine.....	7
1.1 Le déterminisme génétique à médiation hormonale et différenciation sexuelle masculine au cours de la vie embryonnaire	7
1.2 Différenciation des gonades (Déterminisme génétique)	7
1.3 Différenciation des appareils génitaux (médiation hormonale).....	8
1.4 Anatomie de l'appareil génital mâle	9
2. Physiologie de la reproduction	16
2.1 Déclenchement de la puberté.....	16
2.2 La cinétique de la spermatogenèse	17
2.3 La régulation de la fonction reproductrice chez le mâle	21
3. Infertilité masculine et reprotoxicité.....	28
3.1 Principaux mécanismes d'actions des substances reprotoxiques.....	29
Chapitre II : Substances bioactives des plantes : Exemples étudiés « tabac et thé vert »	32
1. Le développement de la connaissance de l'homme sur l'utilisation des plantes	40
2. Les métabolites secondaires	40
2.1 Rôle des métabolites secondaires.....	41
2.2 Principales classes de métabolites secondaires	41
3. La place du thé vert dans la phytothérapie	43
3.1 Les variétés et les modes de consommation de thé.....	43
3.2 Composition chimique des feuilles de thé vert	45

3.3	Principales utilisations thérapeutiques et préventives du thé vert	49
3.4	Toxicité de thé vert	50
4.	Tabac et santé	51
4.1	L'origine, la fabrication et la consommation du tabac.....	51
4.2	Les produits à base de tabac non combustibles.....	52
4.3	Composition chimique du tabac.....	52
4.4	Pharmacocinétique de la nicotine	55
4.5	Mécanismes de l'induction de l'effet psychoactif et addictif par la nicotine (pharmacodynamique de la nicotine).....	56
4.6	Principales répercussions du tabac sur la santé.....	57
Chapitre III : Matériel et Méthodes		61
1.	Objectif du travail.....	62
2.	Matériel utilisé.....	62
2.1	Matériel végétal	62
2.2	Animaux	62
2.3	Principaux instruments de laboratoire	63
2.4	Produits chimiques.....	63
3.	Méthodes	64
3.1	Étude phytochimique	65
3.2	Traitement des animaux.....	74
3.3	Exploration des effets du tabac et de thé vert sur la fonction reproductrice	76
3.3.3.1	Évaluation de l'activité antioxydante totale du plasma sanguin et des homogénats tissulaires.....	81
3.4	Analyse statistiques	86
3.5	Limites de travail	86
Chapitre IV : Résultats et discussion.....		88
1.	Résultats	89
1.1	Partie-I: Répercussions des alcaloïdes totaux du tabac sur la fonction de la reproduction masculine.....	89
1.2	Partie-II : Effets préventifs de la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait de thé vert	96
1.3	Partie III : Analyse statistique globale	108
2.	Discussion générale	117
Conclusion		128
Références bibliographiques.....		131
Annexes.....		149

Liste des figures

Figure 1 : Schéma récapitulatif représentant la différence selon le sexe, entre le développement des gonades et des organes génitaux internes au cours de la vie embryonnaire de l'homme.	10
Figure 2 : Anatomie du testicule chez l'homme et les mammifères.....	13
Figure 3: Vue ventrale de l'appareil génital du rat mâle.	17
Figure 4 : Déroulement de la spermatogenèse au sein de l'épithélium séminifère.	19
Figure 5 : Les différentes associations cellulaires au cours des cycles de l'épithélium séminifère.	22
Figure 6 : Schéma représentatif des différentes étapes de la spermiogenèse	27
Figure 7 : Régulation de la fonction reproductrice masculine par les différentes	28
Figure 8 : Différentes voies de génération des ROS dans la cellule.....	33
Figure 9 : Neutralisation des ROS par les enzymes antioxydantes	34
Figure10 : Structure chimique d'un phénol.....	42
Figure 11: La forme des feuilles (a), et des fruits (b) du théier (<i>Camellia sinensis</i>), matière première de la fabrication de thé.	45
Figure 12 : Les principales étapes du traitement des feuilles de théier après leur récolte.	46
Figure 13 : La structure de base des flavonoïdes contenant deux cycles aromatiques (A et C) reliés par un cycle pyrane (B).....	47
Figure 14 : Structure chimique des différents catéchines présents dans le thé vert	50
Figure 15 : <i>Nicotiana tabacum</i> , la matière première de la fabrication du tabac.....	53
Figure 16 : Structure chimique des alcaloïdes du tabac	54
Figure 17: Préparation de l'extrait total du tabac par un système de Soxhlet multipostes.	65
Figure 18 : Diagramme récapitulatif de la procédure d'extraction des alcaloïdes totaux.	67
Figure 19 : Elimination des solvants par le rotavapor combiné à une pompe à vide.	69
Figure 20 : Diagramme récapitulatif de l'extraction et de la préparation des fractions de l'extrait de thé vert.	70
Figure 21 : Système HPLC utilisé pour l'identification des composants de la FAE.	73
Figure 22 : Préparation des solutions pour le traitement des rats. (a) extrait de thé vert, (b) extrait de tabac.	75
Figure 23 : Sacrifice des rats et mise en évidence des organes génitaux.	78
Figure 24 : Technique de prélèvement du sang par ponction cardiaque.	79
Figure 25 : Observation microscopique d'un frottis de sperme de rat coloré à l'éosine-nigrosine.	80
Figure 26 : Fixation des organes pour l'étude histologique.	81
Figure 27 : Préparation des homogénats tissulaires de l'étude biochimique.	83
Figure 28 Analyse spectrophotométrique des TBARS.	84
Figure 29 : Automate VIDAS utilisée pour la réalisation du dosage de la FSH et la LH.	85
Figure 30 : Automate Maglumi CLIA utilisée dans le dosage de la testostérone.	86
Figure 31 : Constatation d'état de somnolence chez les rats après le traitement par les ATT.	90
Figure 32 : Effet des ATT sur les paramètres spermatiques.....	91
Figure 33 : Dosage du taux des MDA exprimé en TBARS au niveau tissulaire et plasmatique après traitement par les ATT.....	92
Figure 34 : Mesure de l'activité antioxydante totale dans le plasma et les tissus des rats traités par les ATT.	94

Figure 35 : Observation microscopique de la structure histologique des testicules des rats témoins.....	95
Figure 36 : Observation microscopique des coupes histologique des testicules des rats du G1.....	95
Figure 37 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G2.....	96
Figure 38 : Dosage des taux sériques de la testostérone et des gonadotrophines chez les rats traités par les ATT.	97
Figure 39 : Activité antiradicalaire de l'extrait total et des différentes fractions vis à vis des radicaux libre de DPPH.....	99
Figure 40 : Chromatogramme de l'HPLC de la FAE de l'extrait de thé vert réalisée à 270nm.	100
Figure 41 : Structures biochimiques des différentes substances constituant la FAE	101
Figure 42 : Effet de la FAE sur le nombre, la mobilité (Mob) et la viabilité (Viab) des SPZ.	103
Figure 43 : Effet de la FAE sur la peroxydation lipidique.	104
Figure 44 : Effet de FAE sur l'activité antioxydante totale plasmatique et tissulaire.	105
Figure 45 : Observation microscopique des coupes histologiques des rats du G3.....	106
Figure 46 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G4.....	106
Figure 47 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G5.....	107
Figure 48 : Effet de la FAE sur le taux sérique de la testostérone et des gonadotrophines.	108

Liste des tableaux

Tableau 1 :tableau représentatif des principales sous-classes des flavonoïdes	48
Tableau 2 : Liste du principal matériel utilisé lors de la réalisation des expérimentations.	64
Tableau 3 : Liste des traitements avec les différents extraits et leur véhicule.....	76
Tableau 4: Effet des ATT sur le poids corporel, et le poids relatif (PR) des organes sexuels.....	89
Tableau 5 : Teneurs en phénols totaux (PT), en flavonoides (flav) et valeurs de CI50 des différents extraits.	99
Tableau 6 : Effet de FAE sur l'évolution pondérale et le poids relatif des organes sexuels.	102
Tableau 7 : Analyse statistique globale des résultats du poids corporel.....	109
Tableau 8: Analyse statistique globale des résultats du PR testiculaire.	110
Tableau 9 : Analyse statistique globale des résultats du PR épидидymaire.....	110
Tableau 10 : Analyse statistique globale des résultats du nombre des SPZ.	111
Tableau 11 : Analyse statistique globale des résultats de la mobilité des SPZ.	111
Tableau 12 : Analyse statistique globale des résultats de la viabilité des SPZ.....	111
Tableau 13 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS plasmatiques.....	112
Tableau 14 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS testiculaires.	112
Tableau 15 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS épидидymaires.	113
Tableau 16 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale plasmatique.....	114
Tableau 17 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale testiculaire.	114
Tableau 18 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale épидидymaire.	114
Tableau 19 : Analyse statistique globale des résultats de la testostérone sérique.	115
Tableau 20 : Analyse statistique globale des résultats de la FSH sérique.	115
Tableau 21 : Analyse statistique globale des résultats de la LH sérique.	116

Introduction

Plusieurs facteurs toxiques qui seraient à l'origine de l'infertilité de toute une génération, ont commencé à être répertoriés au cours de la dernière décennie. Ces facteurs peuvent agir dès la vie intra-utérine de la mère: des polluants, qui se comporteraient comme des perturbateurs endocriniens sur le fœtus mâle particulièrement, et d'autres toxiques dépendant du comportement. La fertilité peut également être altérée par des facteurs environnementaux à l'âge adulte tels que le cannabis, les antidépresseurs, le poids excessif lié à une alimentation non équilibrée, le sport intense et le stress, ainsi que l'exposition professionnelle à des substances toxiques (Hassan et Killick, 2004 ; Alvarez et Devouche, 2012).

Il n'y a pas encore si longtemps, la femme était le plus souvent tenue pour responsable de la stérilité tout en se fondant sur une logique primaire (Cohen-Bacrie et *al.*, 2007), cependant, la science vient contredire ce raisonnement traditionnel non fondé et met l'accent sur l'implication de l'homme dans le retard ou l'absence de grossesse. En effet, dans environ un tiers des cas, l'infertilité est d'origine masculine et dans un second tiers les facteurs masculins et féminins sont associés (Khallouk et *al.*, 2010)

Pendant les dernières décennies, aussi bien la compréhension que le traitement des infertilités masculines ne sont pas arrivés à résoudre tous les problèmes liés à cette pathologie. Un traitement spécifique et efficace peut être prescrit seulement dans de très rares cas, dont les mécanismes physiopathologiques sont bien compris (Timothy et Christopher, 2003). En outre, dans une grande proportion des cas, ces mécanismes sont peu ou pas élucidés, et l'infertilité est classée comme idiopathique. De ce fait, plusieurs études en font toujours leur objet. Des enquêtes menées sur l'infertilité masculine depuis les années 1980 ont mis en évidence une diminution de la qualité du sperme par la prise en compte des différents facteurs méthodologiques (standardisation des techniques, délai d'abstinence, etc...) ce qui a exclu la possibilité que ceci soit lié à une fausse exploration, puis a orienté les scientifiques vers la recherche des étiologies pour l'expliquer (Jouannet et *al.*, 2001). Dès lors, plusieurs substances auxquelles l'homme pourrait être exposé ont été soupçonnées d'être responsables des infertilités masculines (Nudell et *al.*, 2002). Malgré cet intérêt accru pour identifier les causes des infertilités idiopathiques, la proportion de ces dernières reste importante de nos jours, avec plus de 30% des cas dans lesquelles aucune cause n'a pu être identifiée (Garg et Kumar, 2015).

Par ailleurs, parmi les différentes substances toxiques auxquelles les infertilités masculines sont attribuables, l'accent a été mis sur le tabac du fait de sa grande consommation à travers le monde (Commenges-Ducos, 2006). Le tabac contient plus de 4000 substances toxiques qui peuvent induire des problèmes de la santé de tout genre à savoir des maladies cardiovasculaires, respiratoire et oncologiques (Rodgman et *al.*, 2000). Cependant les données disponibles sur la reprotoxicité du tabac n'ont pas démontré d'une manière concluante de cette reprotoxicité, mais elles n'ont permis que de considérer le tabac comme facteur de risque qui peut favoriser le développement d'une infertilité masculine (Taymour, 2010). Néanmoins, nombreuses sont les études qui ont rapporté une diminution de la qualité du sperme chez les fumeurs (Shi et *al.*, 2001; Sepaniak et *al.*, 2005). Des oligospermies et des asthénospermies ont été constatées avec une grande proportion chez les fumeurs (Cavallini, 2006 ; Tremellen, 2008), de même que des études expérimentales menées sur des animaux de laboratoire qui ont révélé des répercussions négatives de la fumée de cigarettes sur la structure histologique testiculaire (Miyagawa et Sofikitis, 2004), et le taux de la testostérone (Yardimci Et *Al.*, 1997).

L'élucidation de la relation existante entre la consommation du tabac et ces divers problèmes de la santé a conduit au lancement d'une campagne de sensibilisation contre le tabac (OMS, 2010). Celle-ci a donné de bons résultats qui se résument dans la diminution de la consommation du tabac surtout dans les pays développés, cependant ce problème persiste encore dans les pays en voie de développement (Tweed et *al.*, 2012).

A partir de ce moment-là, les producteurs de tabac ont amplifié la production des produits de tabac non fumés visant la compensation de la diminution de la consommation du tabac (Carpenter et *al.*, 2009). En effet, on estime que 2.4 milliards personnes, hommes et femmes, dans le monde consomment les produits de tabac, représentant presque un tiers de la population mondiale, et dont environ 50 à 55% des hommes fument alors que 50% consomment les produits du tabac non fumé (Marie et *al.*, 2014). Toutefois, ces produits peuvent engendrer un effet psychoactif et addictif semblable à celui du tabac à cause de la présence de la nicotine. Cette dernière constitue 90% des alcaloïdes totaux du tabac et elle est considérée comme la clé de la dépendance à ce dernier. La nicotine peut être absorbée par différentes voies selon le type de tabac consommé. Sa voie d'administration conditionne sa biodisponibilité, pulmonaire par inhalation avec une absorption maximale, percutanée par patch à taux sanguins constants

et digestive par voie orale (comprimé et gomme) avec une dégradation au passage hépatique qui peut réduire la biodisponibilité (Commenges-Ducos, 2006).

De même pour la nicotine, une cytotoxicité a été rapportée par plusieurs chercheurs, chez des animaux de laboratoire et *in vitro* (Bagchi et *al.*, 1998 ; Marinucci et *al.*, 2014). Cependant, il n'est pas encore bien élucidé si la nicotine peut engendrer les mêmes effets sur le sperme que la fumée du tabac, et si elle peut constituer un risque pour la fertilité masculine quel que soit le mode de son usage (Oyeyipo et *al.*, 2011).

Par ailleurs, les mécanismes de toxicité impliqués dans la toxicologie de la reproduction sont difficiles à étudier en raison de la complexité des processus des systèmes reproducteurs. En effet, les substances toxiques peuvent exercer leurs effets nocifs sur le système reproducteur du mâle et perturber la reproduction en agissant à plusieurs niveaux et sur plusieurs processus cellulaires (Hamelin, 2009). Néanmoins, le stress oxydatif est considéré comme un mécanisme contemporain par lequel les substances reprotoxiques peuvent induire leurs effets (Agarwal et *al.*, 2014). Plusieurs substances ont montré la capacité d'induire une infertilité liée à un stress oxydatif (Li et *al.*, 2010 ; Duan et *al.*, 2016). Chez les fumeurs, des anomalies du spermogramme sont associées dans une grande proportion à la présence des radicaux libre d'oxygène (reactive oxygen species (ROS)) dans le sperme, ce qui indique la présence d'un stress oxydatif à ce niveau (Zhang et *al.*, 2001 ; Tremellen, 2008). Ajoutant à ceci, la capacité de la nicotine de générer un stress oxydatif (Muthukumaran et *al.*, 2008), ce dernier est probablement le mécanisme majeur par lequel le tabac peut s'interférer avec la qualité du sperme.

D'autre part, la capacité antioxydante des composants diététiques notamment le thé vert a été postulé être responsable de la prévention de plusieurs maladies à savoir le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative (Khalaf et *al.*, 2012). Ainsi, le thé vert, largement utilisé en phytothérapie, est réputé d'être un modulateur très efficace des effets toxiques surtout cancérigènes et mutagènes liés à l'exposition aux produits toxiques (Tang et *al.*, 2008). Bien qu'il soit très riche en polyphénols, l'activité antioxydante que ces substances lui confèrent, a été supposée d'être responsable de ses effets bénéfiques contre l'hépatotoxicité et la neurotoxicité stress-oxydatif dépendantes de la nicotine chez les animaux de laboratoire (Gawish et *al.*, 2012 ; Khalaf et *al.*, 2012). De ce fait, il semble que ces mêmes substances, ayant des propriétés thérapeutiques,

peuvent avoir des effets préventifs contre les répercussions que le tabac peut induire sur la fertilité masculine.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une évaluation de la reprotoxicité du tabac quelle que soit sa forme de consommation. Dans ce contexte, nous nous sommes proposé de réaliser une étude expérimentale multiparamétrique pour tester les effets des alcaloïdes du tabac, constitué à 90% de la nicotine, chez les rats mâles. Ceci nous donnerait la possibilité de relier les effets toxiques à tous les modes de consommation du tabac, approvisionnant l'organisme par la nicotine. En prenant en considération les données de la littérature sur la relation entre le stress oxydatif et les problèmes de fertilité chez les consommateurs du tabac en l'occurrence l'altération des différents paramètres du liquide séminal, nous nous sommes également proposé de montrer le lien entre le stress oxydatif et la reprotoxicité du tabac. La variété des tests que nous avons proposés, nous a également fourni la possibilité de rechercher d'autres mécanismes par lesquels le tabac peut induire une reprotoxicité.

D'autre part, une deuxième partie de cette étude a été consacrée au développement d'une approche préventive vis-à-vis des répercussions du tabac sur la fertilité masculine. Pour ce fait, différents traitements et tests du potentiel antioxydant de thé vert seront réalisés *in vitro* avant de passer à l'étude *in vivo* tout en visant d'établir une optimisation de l'utilisation de thé vert pour la prévention de la fertilité masculine.

Revue bibliographique

Chapitre I : *Problèmes de la fertilité masculine liés à la reprotoxicité*

« Ce chapitre décrit le fonctionnement et la régulation de la fonction reproductrice masculine, suivie par une synthèse des données en ce qui concerne la toxicologie de la reproduction et les mécanismes qui pourraient être inducteurs de la reprotoxicité, afin de bien connaître ces différents processus et la nature des expériences et des tests qui peuvent être envisagés lors de l'étude de la reprotoxicité d'un produit toxique ».

1. Rappel anatomophysiologique sur la fonction de la reproduction masculine

1.1 Le déterminisme génétique à médiation hormonale et différenciation sexuelle masculine au cours de la vie embryonnaire

La formation des gonades de Vertébrés, testicule ou ovaire, à partir d'ébauches neutres, est une organogenèse au cours de laquelle on peut successivement mettre en évidence l'activité de gènes régulateurs de la différenciation sexuelle mâle et femelle et le rôle d'hormones. À la suite de la détermination génétique du sexe, les ébauches génitales se différencient, avec la collaboration d'autres gènes régulateurs, en un des deux types de gonades. Celles-ci sécrètent différentes hormones qui sont responsables de l'évolution des tractus génitaux par la suite (Le Moigne et Foucrier, 2009).

1.2 Différenciation des gonades (Déterminisme génétique)

Le développement précoce des gonades se déroule d'une façon identique chez le mâle et chez la femelle. Dans les deux sexes, les gonades dérivent d'un précurseur commun formé de deux tissus distincts, le mésenchyme somatique, qui forme la matrice de la gonade et les cellules germinales primordiales (CGP) issues de l'épiblaste, qui migrent dans cette matrice pour la coloniser et former les gamètes. Les crêtes génitales primordiales sont deux renflements de mésenchyme recouverts par un épithélium monostratifié. Dans l'embryon humain, ces ébauches se développent à l'âge de 3 à 5 semaines. Les CGP naissent en dehors de la région de la crête génitale et sont identifiables dans l'embryon humain à partir de la 3^{ème} semaine à proximité de l'ébauche allantoïdienne. Elles sont reconnaissables par leur caractéristiques morphologiques (grande taille comparativement aux cellules voisines, un noyau volumineux arrondi avec de gros nucléoles, du glycogène abondant et de nombreuses gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme), et par leur charge en phosphatase alcaline. A partir du 30^{ème} jour de la vie embryonnaire, la majorité de ces cellules seront arrivées à la région de l'ébauche de la crête génitale. Pendant cette phase de migration et de colonisation précoce des CGP, il est impossible de distinguer les gonades mâle et femelle. La détermination chromosomique « Y » du sexe de la gonade ne devient visible dans l'embryon humain qu'à partir de la 6^{ème} semaine, lorsque sa colonisation par les CGP est quasiment achevée. A ce moment, une

prolifération puissante en profondeur des cordons sexuels vers la région médullaire de la gonade du mâle aura lieu, pour former les cordons testiculaires définitifs. Ces derniers contiendront la plupart des CGP et se délimiteront par la formation d'une membrane basale externe, et ils prendront dès lors le nom des cordons séminifères, lesquels produiront les tubes séminifères de l'adulte (Figure 1) (Johnson et Everitt, 2007). C'est pendant cette période que le gène principal impliqué dans la détermination du sexe situé sur le bras court du chromosome Y; « sex determining region » (*Sry*), chez le mâle seulement, est activé. L'événement impliqué le plus tôt dans la détermination du sexe masculin est l'expression de « *Sry* » dans les cellules pré-Sertoliennes des gonades, qui deviendront sous l'effet de produit protéique de ce gène, des cellules de Sertoli (CS) (Hunt et Hassold, 2002). Par ailleurs, les gonades femelles restent indifférenciées et n'expriment pas ce gène.

1.3 Différentiation des appareils génitaux (médiation hormonale)

À leurs tours, les CS induisent la transformation des cellules originaires du blastème mésonéphrique en cellules de Leydig (CL). Chez l'homme, on détecte la testostérone à partir de la 7^{ème} semaine de grossesse environ. Cette activité est contrôlée par l'hormone chorionique de croissance (HCG) sécrétée par le placenta (Le Moigne et Foucrier, 2009). Plus récemment, d'autres chercheurs ont démontré l'implication d'autres gènes dans le développement testiculaire au cours de la vie embryonnaire. Le « *Sox 9* » semble être activé par le « *Sry* », après quoi le produit de ce gène interviendrait dans la différenciation testiculaire. Par ailleurs, le « *Sox9* » intervient dans l'activation du gène de l'hormone antimüllérienne (HAM) dans les nouvelles CS (Barrionuevo et *al.*, 2006).

Les organes génitaux internes mâles et femelles se développent à partir de deux ébauches uni-potentielles. Les deux structures sont issues du mésonéphros; proches des gonades en développement, elles sont dénommées le canal de Wolff (mâle) et le canal de Müller (femelle). Chez la femelle, le canal de Wolff subit une régression spontanée, alors que le canal de Müller persiste et se développe pour former les oviductes, l'utérus, le col et le tiers supérieur du vagin. En outre, Si un fœtus de sexe féminin est castré, les organes génitaux internes se développent normalement dans le sens féminin. Cette observation démontre que l'activité ovarienne n'est pas indispensable pour ce développement. Chez le mâle, les deux hormones testiculaires (androgènes et HAM) empêchent le développement spontané dans le sens féminin. Les androgènes maintiennent le canal de

Wolff qui se développera en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales, ainsi ils orientent le développement des organes génitaux externes dans un sens masculin (Johnson et Everitt, 2007). Cependant, la régression du canal de Müller est contrôlée par l'HAM, en exerçant un effet autocrine sur les ébauches en voisinage (Figure 1). *In vitro*, l'HAM convertit le profil de la stéroïdogénèse dans les ovaires fœtaux d'ovin, de lapin, et de rat par le blocage de la synthèse de l'aromatase; un autre effet masculinisant de cette hormone (Tsepelidis et *al.*, 2007).

1.4 Anatomie de l'appareil génital mâle

L'appareil génital masculin possède différentes parties qui servent à l'élaboration, la maturation et le transport des gamètes mâles. Une paire de testicules constituant le lieu de la production des spermatozoïdes (SPZ) et de la quasi-totalité des androgènes. Ils sont coiffés par les épидидymes, où s'effectue la maturation des SPZ naïfs. Le reste du tractus génital chez le mâle prend le relais pour l'évacuation des SPZ à l'extérieur du corps, alors que les glandes annexes participent à la formation du sperme éjaculé.

1.4.1 Les testicules

Les testicules, de forme ovoïde, assurent une fonction exocrine (production des SPZ) et endocrine (production des androgènes essentiellement la testostérone) (L'Hôte, 2009). Ils sont localisés dans le scrotum, de part et d'autre du pénis. La descente des testicules dans cet environnement moins chaud (32 °C), un processus stimulé par la testostérone sécrétée par les testicules eux-mêmes, est achevée vers la 34^{ème} semaine de la vie embryonnaire. Cette étape est essentielle pour le bon déroulement de la spermatogénèse qui s'avère sensible aux températures élevées, nécessitant donc une température plus basse que celle du noyau de l'organisme dans laquelle elle ne peut pas avoir lieu, comme c'est le cas chez les sujets atteints d'une cryptorchidie (Johnson et Everitt, 2002). En outre, la contraction réflexe au froid des muscles crémastrs fait remonter le scrotum et rapprocher les testicules de l'environnement abdominale plus chaud, alors que la relaxation de ces muscles au contact de la chaleur permet par contre le déplacement des testicules plus loin du noyau chaud du corps. Chez le rat, les testicules sont normalement localisés dans un scrotum bien apparent entre l'anus et le méat urinaire, cependant, il devrait être noté que le rat est doté de la capacité de rétracter ses testicules dans l'abdomen, et les relâcher lors des coïts (Lohmiller et Swing, 2006).

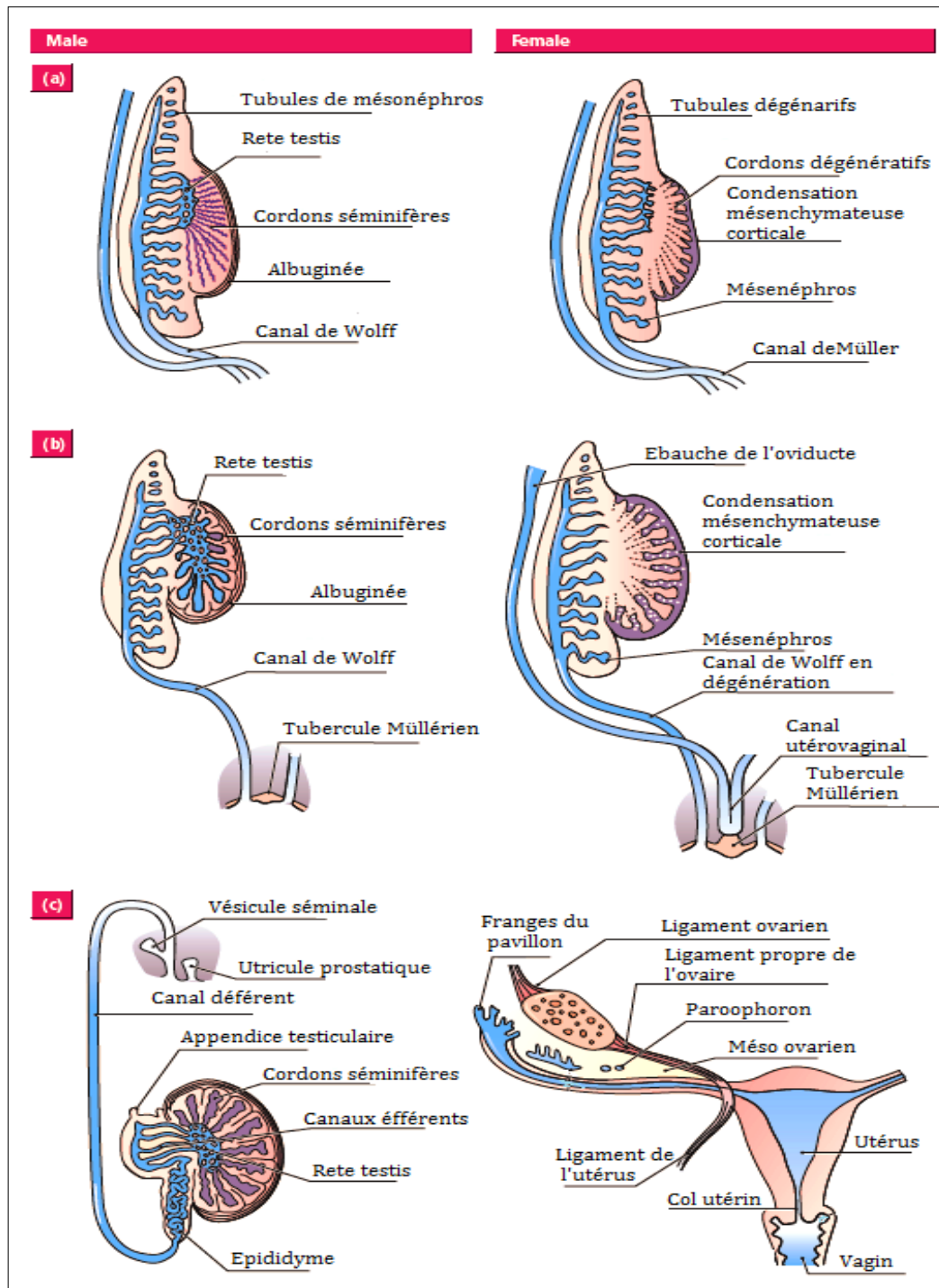


Figure 1 : Schéma récapitulatif représentant la différence selon le sexe, entre le développement des gonades et des organes génitaux internes au cours de la vie embryonnaire de l'homme (Johnson et Everitt, 2007).

(a) 6^{ème} semaine ; (b) 16^{ème} semaine ; (c) 28^{ème} semaine lors de la migration trans-abdominale des testicules. Au début le canal de Wolff d'origine mésonéphrique, et le canal de Müller d'origine paramésonéphrique existent chez les deux sexes. Le premier persiste chez la femme pour donner naissance aux différentes structures du tractus génital féminin spontanément, alors que le deuxième est dépendant des androgènes testiculaires, il forme les voies spermatiques intra et extratesticulaires, et les glandes annexes. Le canal de Müller se dégénère chez l'homme, sous l'effet de l'HAM.

Les testicules sont formés d'un grand nombre de tubes séminifères (siège de la spermatogenèse), entourés d'une capsule conjonctive, l'albuginée. Cette dernière se contracte spontanément et rythmiquement, contribuant à propulser les SPZ et le liquide testiculaire hors du testicule. Au bord supérieur du testicule, l'albuginée s'épaissit et s'enfonce en profondeur pour constituer le corps d'Highmore, perforé par les vaisseaux et les canaux qui constituent le rete testis.

L'espace entre le corps d'Highmore et l'albuginée est occupé par des cloisons qui délimitent les lobules testiculaires contenant les tubes séminifères et le tissu interstitiel. Le réseau en forme de labyrinthe du rete testis se poursuit par les canaux efférents qui assurent la jonction avec le canal épидидymaire (Figure 2) (Brugnon, 2009).

1.4.2 Voies spermatiques extra-testiculaires

1.4.2.1 L'épididyme

L'épididyme est un long tubule unique et contourné qui mesure environ 5m chez l'homme. Il coiffe le testicule sur sa partie dorso-latérale, et relie les canaux efférents et déférents. Cet organe est présent chez tous les mammifères, où, quatre régions anatomiques sont présentes contre trois seulement chez l'homme: le segment initial (absent chez l'homme), la tête, le corps et la queue (parties communes). La lumière de l'épididyme est bordée d'un épithélium pseudo-stratifié cylindrique entouré de cellules musculaires lisses, et composé de plusieurs types de cellules. L'épididyme joue un rôle essentiel dans le développement de la fertilité. Il est responsable du transport, de la maturation, de la protection, et du stockage des SPZ. Le transit épидидymaire prend en moyenne d'une à deux semaines chez la plupart des espèces, la durée pendant laquelle les SPZ subissent une maturation post-testiculaire (Dubé et Cyr, 2007).

1.4.2.2 Différentes types cellulaires de l'épithélium épидидymaire

1.4.2.2.a Les cellules principales

Les cellules principales sont retrouvées majoritairement dans la totalité de l'épithélium épидидymaire (Hermo et Robaire, 2002). Elles sont caractérisées par la présence d'un noyau basal, ainsi que des stéréocils assurant le transport des SPZ encore immobiles. Entre les cellules principales, des jonctions serrées se mettent en place progressivement aboutissant à la formation d'une barrière hémato-épидидymaire, un anneau étanche autour des cellules principales de l'épithélium. Ce n'est qu'au 21^{ème} jour

postpartum chez le rat, que ces jonctions serrées deviennent étanches et la barrière imperméable, ce qui permettra de contrôler la composition du fluide luminal par les cellules principales en appliquant des mécanismes d'absorption et de sécrétion. Cependant l'intégrité de la barrière peut être compromise avec l'âge. Cette diminution de l'intégrité est accompagnée d'une baisse de la spermatogenèse, de la stéroïdogenèse et de la qualité du sperme (Dubé et Cyr, 2007).

1.4.2.2.b Les cellules basales

Les cellules basales sont identifiées dans toutes les espèces étudiées jusqu'à nos jours, y compris l'homme. Elles ont un aspect hémisphérique; elles adhèrent à la membrane basale mais elles n'ont pas un contact direct à la lumière de l'épididyme, bien que ces cellules se prolongent parfois jusqu'à celle-ci. Ces cellules ne sont pas capables de se diviser ni de réagir autant que cellules souches pour remplacer les cellules principales, mais il a été proposé qu'elles agissent autant que régulatrices du transport d'électrolytes et de l'eau par les cellules principales (Hinton et Robaire, 2015).

1.4.2.2.c Les cellules apicales

Les cellules apicales se retrouvent principalement dans l'épithélium du segment initial et de la zone intermédiaire qui le suit, bien qu'elles ont été observées dans d'autres segments chez des rats âgés. Elles ont pris leur nom de position apicale de leur noyau, alors que le rôle de ces cellules n'est pas encore identifié (Hinton et Robaire, 2015).

1.4.2.2.d Les cellules étroites

Chez le rat et la souris, les cellules étroites n'apparaissent que dans l'épithélium du segment initial et de la zone intermédiaire. Elles sont caractérisées par la présence d'un grand nombre de vésicules de position apicale, qui sont impliquées dans l'endocytose. Ces cellules assurent une deuxième fonction sécrétrice des ions H⁺ dans la lumière épидидymaire (Hermo et *al.*, 2000).

1.4.2.2.e Les cellules claires

Les cellules claires sont de grande taille, caractérisées par une région apicale qui contient de nombreuses vésicules, endosomes, lysosomes ainsi que des petites vésicules apicales. Après injection des traceurs dans la lumière de la queue de l'épididyme, les vésicules apicales, les endosomes et les lysosomes des cellules claires ont été marqués, ce qui témoigne de l'activité d'endocytose qui sert normalement à éliminer les lipides

libérés lors des modifications membranaires des SPZ, nécessaires pour l'augmentation de la fluidité de leur membrane au cours de leur maturation trans-épididymaire. D'une autre part, l'acidification du fluide luminal de la queue de l'épididyme est également attribuable aux cellules claires (Robaire et *al.*, 2006).

1.4.2.2.f Les cellules en Halo

Les cellules en halo sont rondes et de petites tailles avec un cytoplasme réduit. Elles sont présentes tout le long de l'épididyme et se situent vers la base de l'épithélium. L'ensemble de ces cellules constitue probablement un système de défense pour l'épididyme. Il s'agirait de lymphocytes T ou de monocytes qui peuvent assurer une réponse immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes au niveau de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002).

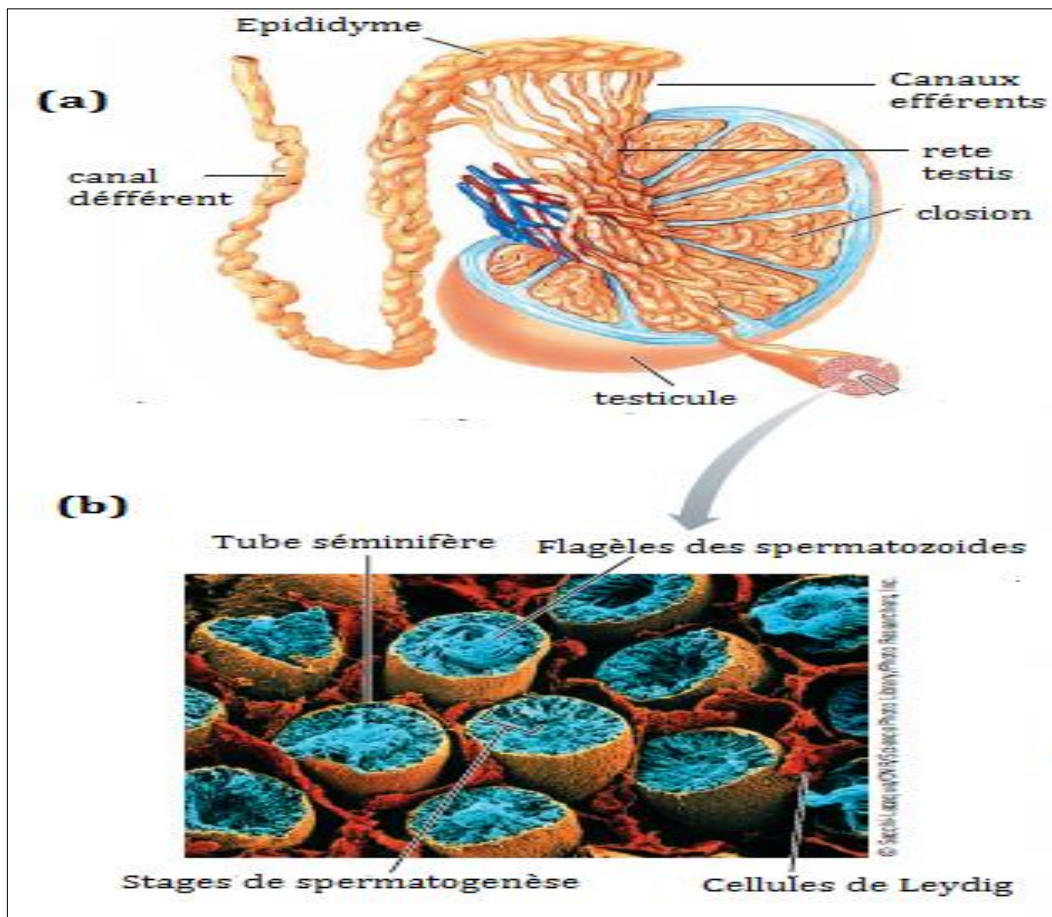


Figure 2 : Anatomie du testicule chez l'homme et les mammifères.
(sherwood, 2010).

(a) coupe longitudinale du testicule montrant la liaison entre les voies spermatiques intra et extra-testiculaire ; (b) une coupe transversale d'un testicule analysée par microscopie électronique à balayage montrant des tubes séminifères contenus dans le tissu conjonctif, et dont la lumière est remplie par les SPZ.

1.4.2.3 Le canal déférent

Le canal déférent est un organe pair qui fait suite à l'épididyme et passe dans le canal inguinal pour entrer dans la cavité pelvienne. Chez l'homme, il se palpe facilement à l'endroit où il passe devant l'os pubien. Le canal déférent se courbe ensuite au-dessus de l'urètre, avant de redescendre le long de la face postérieure de la vessie. Son extrémité terminale s'élargit pour former l'ampoule du conduit déférent, qui s'unit au conduit excréteur de la vésicule séminale pour former le conduit éjaculateur. Les deux conduits éjaculateurs pénètrent dans la prostate où ils déversent leur contenu dans l'urètre (Marieb, 1999). Le canal déférent assure le transport du sperme jusqu'à l'urètre grâce aux muscles lisses qui lui sont propres, en se contractant au moment de l'éjaculation et créant une force qui pousse rapidement les SPZ vers l'urètre (Strauss et Barbieri, 2009).

1.4.2.4 L'urètre

Il constitue la portion terminale des voies génitales; ainsi, il transporte l'urine et le sperme (séparément et dans des moments différents), du fait qu'il fait partie à la fois des deux systèmes génital et urinaire. Il est divisé en trois parties : la partie prostatique, la partie membranacée qui se trouve dans le diaphragme uro-génital et la partie spongieuse qui passe dans le pénis (Marieb, 1999).

1.4.2.5 Les glandes accessoires

Le rat possède essentiellement cinq paires de glandes sexuelles accessoires situées dans la cavité pelvienne et à l'entour de la vessie. Deux paires de prostates, en position dorsale et ventrale de l'urètre; Une paire de glandes vésiculaires et une paire de glandes de coagulation qui leur sont associées, et en fin les glandes bulbo-urétrales nommées aussi glandes de Cowper (Figure 3) (Suckow et *al.*, 2006). Cependant, les glandes accessoires majeures chez l'homme, dont les sécrétions constituent la plus grande partie du sperme, sont les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales (sherwood, 2010).

1.4.2.5.a Les vésicules séminales

Les vésicules séminales (VS) sont des organes glandulaires pairs qui secrètent 40 à 60% du liquide séminal. Elles sont en dérivation sur la voie séminale principale au niveau de la terminaison du canal déférent. Elles sont de forme piriforme et aplatie. Les deux VS sont placées en symétrie, en dessous et en arrière de la vessie et au-dessus de la

prostate. Au bord interne de la vésicule séminale vient se terminer les canaux déférents par leurs ampoules terminales (Brugnon, 2009).

Chez l'homme, les VS secrètent le fructose, première substance énergétique pour les SPZ au cours de leur trajet dans les voies génitales de la femme. Leur sécrétion contribue également à la basification du pH du sperme en provenance des épидидymes qui est déjà acide. Lors des examens biochimiques du liquide séminal, une baisse de fructose et un pH acide sont deux signes évocateurs d'une agénésie des VS ou encore plus une obstruction des canaux éjaculateurs qui leur font suite (Khallouk et *al.*, 2010). Chez le rat, des substances de coagulation sont ainsi produites par les VS en collaboration avec les glandes de coagulation. Ces substances sont indispensables pour la formation du bouchon vaginal. La confirmation d'une monte réussie passe par la présence de ce bouchon blanchâtre, appelé aussi coagulum, au niveau de la vulve de la femelle. Ce bouchon vaginal peut être directement visualisé en soulevant la queue (Doumerc, 2004). Cette coagulation semble être due à des protéines secrétées par les VS; les transgelines chez les rongeurs dont plusieurs homologues ont été décrites chez différentes espèces. En outre, la semenogeline, une protéine majeure exprimée exclusivement chez l'homme indique la coagulation du sperme, qui sera liquéfié plus tard par des enzymes d'origine prostatique. En effet, cette liquéfaction est assurée par l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Cette protéase, sécrétée par la prostate, joue un rôle de protéolyse des semenogelines conduisant à la liquéfaction du sperme (Kaci-Ouchfoun et *al.*, 2013). Lors d'un spermogramme, avant de commencer l'analyse du sperme, une période de temps doit être accordée pour la liquéfaction. La durée normale de liquéfaction chez l'homme est de 30 minutes. Si celle-ci n'est pas réalisée après l'écoulement du temps qui lui est nécessaire, elle sera considérée comme une liquéfaction lente plutôt que normale, indiquant un problème de la viscosité du sperme (Dussault, 2009).

1.4.2.5.b La prostate

Chez l'homme, elle s'agit d'une glande unique constituée de glandes tubulo-alvéolaires ramifiées dont les canaux excréteurs se convergent dans l'urètre prostatique. Elle est responsable des sécrétions de natures variées entrant dans la composition du plasma séminale (Rezgoune, 2007). Lors des examens biochimiques du sperme; le zinc, les citrates et les phosphatases prostatiques sont de bons marqueurs du fonctionnement de cette glande (Poncelet et Sifer, 2011). Les sécrétions prostatiques jouent

essentiellement un rôle dans la liquéfaction du sperme éjaculé, de plus, une forte activité antioxydante induite par le Zinc, dans la protection des SPZ éjaculés est lui attribuable. Le PSA est un marqueur largement utilisé cliniquement pour le contrôle du fonctionnement prostatique. Dans les conditions normales, cette enzyme est principalement impliquée dans la dégradation poste-éjaculatoire des protéines de coagulation (Robert *et al.*, 1997).

1.4.2.5.c Les glandes bulbo-urétrales

Les glandes bulbo-urétrales, ou glandes de Cowper, s'ouvrent par un canal dans l'urètre membraneux (Brugnon, 2009), et ont pour fonction la sécrétion d'un fluide lubrifiant précédant l'éjaculation, pour neutraliser les traces d'acide urique présentes dans le tractus urogénital suite aux mictions urinaires précédentes (Chughtai *et al.*, 2005).

1.4.2.5.d Les glandes préputiales

Il s'avère important de signaler la présence d'un autre type de glandes chez les rongeurs, les glandes préputiales qui sont très développées chez ces animaux, en jouant un rôle très essentiel dans la régulation des comportements reproducteurs, par l'émission de phéromones dans les urines (L'Hôte, 2009).

2. Physiologie de la reproduction

2.1 Déclenchement de la puberté

La puberté chez le mâle se rapporte aux changements morphologiques observés quelques semaines avant l'apparition des SPZ dans l'éjaculat. Ces changements correspondent à une conformation corporelle, une augmentation de l'agressivité envers les autres mâles, une augmentation de la libido ainsi qu'une croissance rapide du pénis et des testicules (Bearden *et al.*, 2004). Dans l'espèce humaine, elle commence généralement à l'âge de 11 à 12 ans et s'étale sur plusieurs années. Néanmoins, des variations importantes selon le sexe et les individus peuvent être constatées.

La leptine, découverte en 1994, est une protéine sécrétée par les adipocytes, elle joue le rôle d'un messenger corporel indiquant au cerveau que l'état des réserves adipeuses et le développement staturo-pondéral est suffisant pour le déclenchement de la puberté (Zhang *et al.*, 1994). Elle agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires situés, en particulier, au niveau de l'hypothalamus. Le moment de la puberté se caractérise

par une augmentation des concentrations des gonadotrophines hypophysaires et des hormones stéroïdes sexuelles qui vont permettre le développement des gonades, l'apparition des caractères sexuels secondaires et la maturation de la fonction reproductrice. Ces modifications hormonales sont sous le contrôle d'une gonadolibérine sécrétée par les neurones hypothalamiques (Styne, 1994).

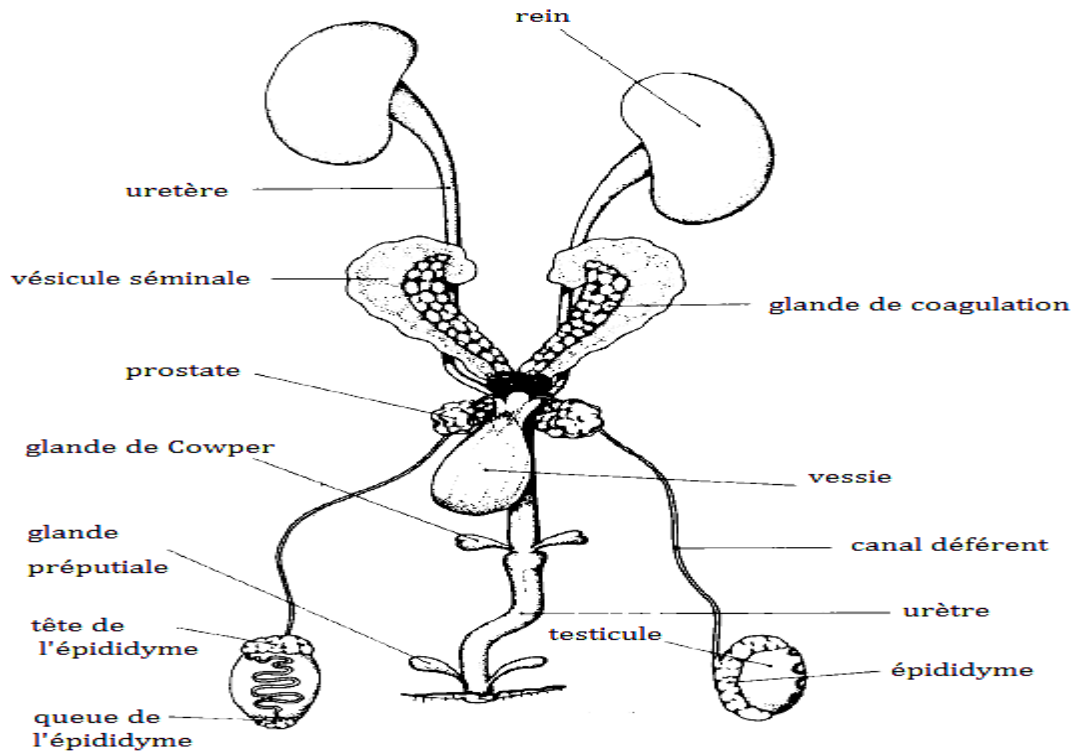


Figure 3: Vue ventrale de l'appareil génital du rat mâle (Suckow et al., 2006).

Ce Schéma représentatif de l'appareil génital interne chez le rat mâle montre la localisation des gonades, des épидидymes et de l'ensemble des glandes accessoires qui participent à la constitution du sperme par la sécrétion de différents liquides et substances qui servent à l'évacuation des spermatozoïdes vers l'extérieur, dans les voies génitales de la femelle.

2.2 La cinétique de la spermatogenèse

2.2.1 Le cycle de la spermatogenèse

La Spermatogenèse, une association complexe et continue de multiplication de différenciation cellulaire et d'apoptose, est le processus de base de la reproduction masculine, aboutissant à la production des SPZ. Elle est effectuée au sein des tubes séminifères du testicule adulte et comprend trois processus principaux. Tout d'abord, les spermatogonies non différenciées subissent une série de division mitotique, la

multiplication, suivie par la réduction méiotique du génome à la moitié pour devenir haploïde. Finalement, les cellules résultantes subissent la transformation morphologique de la spermiogenèse, aboutissant à la sortie des SPZ complètement formés dans la lumière des tubes (Figure 4) (Noakes et *al.*, 2001). Par contraste avec l'ovogenèse chez les femmes qui épuisent progressivement leur réserve d'ovocytes disponibles en fonction de l'âge, les mitoses des spermatogonies qui s'effectuent tout au long de la vie de l'homme aboutissent au réapprovisionnement continu en cellules germinales (CG) et permettent aux hommes de se reproduire même à un âge avancé (Rosenwaks et Wassarman, 2014).

2.2.2 Aspect moléculaire de la spermatogenèse

Au cours de la prolifération mitotique de la spermatogenèse, la division nucléaire est complètement achevée, tandis que la division cytoplasmique reste incomplète. Les spermatocytes primaires répliquent leur acide désoxyribonucléique (ADN) diploïde à $2n$ chromosomes) et entre en prophase-I de la méiose. La première division réductionnelle de la méiose finit par la séparation des chromosomes homologues. Après quoi, chaque spermatocyte secondaire contient un exemplaire de chaque chromosome, constitué de deux chromatides liés par un centromère, entre dans la deuxième division équationnelle caractérisée par la séparation des chromatides sœurs aboutissant à la formation de deux cellules haploïdes à « n » chromosomes. Dans le cas de la souris, d'une seule spermatogonie, un maximum de 64 spermatocytes primaires et 256 spermatides Peut s'en résulter. Cependant, les nombres réels sont significativement moins, en raison de l'élimination des cellules par apoptose (Simon et Pellicer, 2009).

2.2.3 Le cycle de l'épithélium séminifère

Chez l'homme, le processus lent et continu de la spermatogenèse se déroule en 74 jours en moyenne, sans que cette durée ne soit modifiée par la fréquence des éjaculations. Pour permettre la production continue de SPZ, les cellules souches germinales sont programmées pour entrer en division par vagues spermatogénétiques tous les 16 jours. La régulation de ce processus est attribuable aux CS. Les vagues spermatogénétiques ou cycle de l'épithélium séminifère peuvent être identifiées sur les coupes histologiques des testicules (Figure 5). Six associations cellulaires sont classiquement décrites, dont la durée cumulée est de 16 jours, représentant la durée d'un cycle de l'épithélium séminifère (4,6 cycles d'épithélium séminifère pour une spermatogenèse complète) (Poncelet et

Sifer, 2011). Cette organisation est assurée par des associations cellulaires sous forme de ponts cytoplasmiques minces et persistants tout au long du processus de la spermatogenèse (division cytoplasmique non achevée) (Simon et Pellicer, 2009). Cependant, ces associations vont être interrompues en fin de la spermiogenèse pour libérer les SPZ dans la lumière des tubes. Chez le rat, la spermatogenèse dure entre 48 et 53 jours. Le cycle de l'épithélium séminifère chez le rat dure 13 jours, divisé en 14 étapes (Hess et de Franca, 2008).

2.2.4 La spermiogenèse

À la fin de la méiose, les spermatides sont de petites cellules rondes qui ne ressemblent en rien à des SPZ. Elles vont subir par la suite des modifications morphologiques et structurelles pour acquérir les caractéristiques et les fonctions de ceux-ci. Cette phase de différenciation connue sous le nom de la spermiogenèse se déroule en différentes étapes, réparties en fonction de la formation des différentes structures des SPZ (figure 6) (Nobla, 2013).

Ces modifications sont le résultat de la traduction d'ARN synthétisés et stockés depuis le stade de spermatocyte primaire.

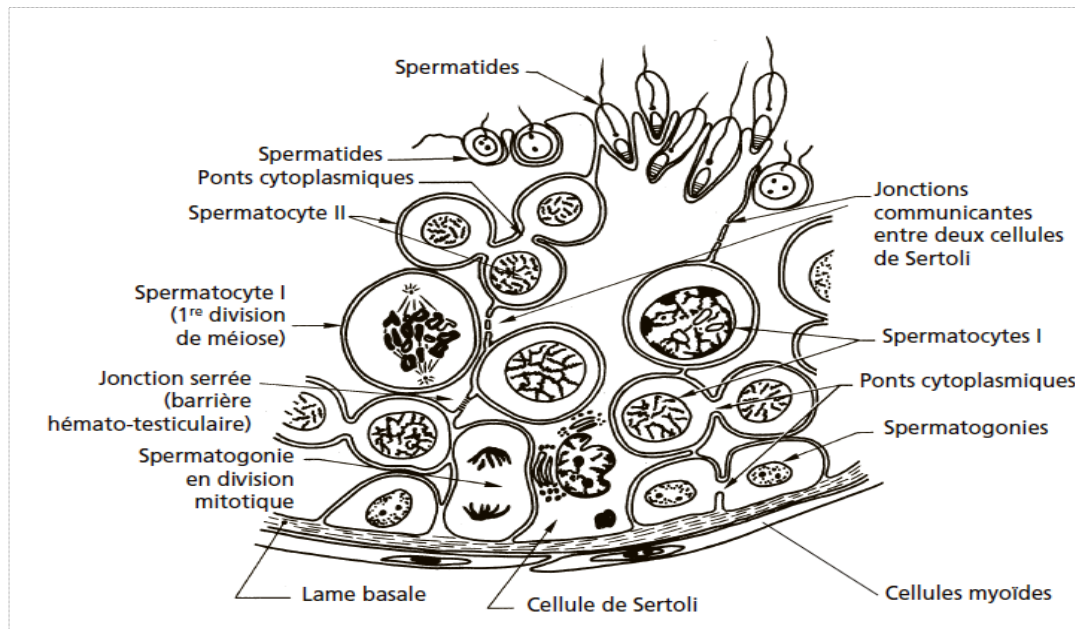


Figure 4 : Déroulement de la spermatogenèse au sein de l'épithélium séminifère (Le Moigne et Foucrier, 2009).

La spermatogenèse se déroule à l'intérieur des tubes séminifère d'une manière concentrique vers la lumière des tubes. La division cytoplasmique n'est pas complète et laisse des ponts cytoplasmiques entre les cellules de la lignée germinale. Ces dernières sont en contact avec les cellules de Sertoli (et ne pas avec le milieu extra-tubulaire) qui contrôlent leur division et leur fournissent les nutriments nécessaires.

La spermiogenèse comporte plusieurs modifications nucléaires et morphologiques. La chromatine se condense progressivement pour donner un noyau compact, alors que l'acrosome va être formé à partir d'un grand nombre de vésicules fournis par l'appareil de Golgi contenant des enzymes d'hydrolyse (hyaluronidase, et les protéases essentiellement). De plus, Les microtubules de l'axonème s'allongent à partir des amorces formés par le centriole distal et repoussent la membrane plasmique pour former le flagelle. Dans le cytoplasme, les mitochondries se regroupent autour de la racine de l'axonème et s'alignent pour former une spirale, réalisant un véritable manchon. L'élimination de la quasi-totalité du cytoplasme sous forme de corps résiduels constitue la dernière étape de la spermiogenèse (Brugnon, 2009).

2.2.5 La maturation épидидymaire

Les SPZ en quittant les testicules ne peuvent pas contribuer à la reproduction et à donner une progéniture sans être passé par plusieurs étapes de maturation aux laboratoires. Dans le cas physiologique, on sait actuellement que les SPZ doivent agir avec une diversité de substances dans les différentes régions de l'épididyme; des réactions préalables à la maturation qui doivent se produire au cours du trajet épидидymaire (Marengo, 2008).

Lors de la maturation épидидymaire, la quantité de phospholipides diminue de 25% à 48% selon les espèces. C'est principalement la proportion des lipides contenus dans le feuillet interne de la membrane plasmique qui décroît. Le contenu en cholestérol de la membrane est également diminué au cours de la maturation (50% chez le rat). Par ailleurs, on note globalement une diminution de la saturation des acides gras membranaires au cours du trajet dans l'épididyme. Ces différents changements de composition lipidique aboutissent à l'augmentation de la fluidité de la membrane plasmique des SPZ (Grignard, 2005).

Le SPZ ne possédant qu'une petite quantité de cytoplasme du fait que la quasi-totalité est éliminée au cours de la spermiogenèse, c'est pourquoi le contrôle de son volume est très important. La plus grande partie du fluide testiculaire est réabsorbée dans les premières régions épидидymaires. Cette réabsorption de l'eau associée au mouvement des ions dans le fluide épидидymaire aboutit à l'atténuation du rapport Na^+/K^+ dans ce dernier, entre la tête et la queue, et conséquemment à la préservation du cytoplasme des SPZ (Dacheux et *al.*, 2003).

De même, de nombreuses modifications de protéines membranaires ont été mises en évidence lors du passage des SPZ dans l'épididyme. Une adsorption ou l'intégration de protéines épидидymaires dans la membrane plasmique des SPZ; la libération de protéines préexistantes dans la membrane du SPZ, le réarrangement des protéines dans des domaines membranaires spécifiques, ainsi que la conjugaison des protéines à des groupements de nature glucidique sous l'effet des glycohydrolases et les glycosyltransférases présentes dans le fluide épидидymaire (Tulsiani, 2003).

Ces changements sont nécessaires pour plusieurs fonctions ultérieures des SPZ. A titre d'exemple, Chez la souris, il a été démontré que les SPZ acquièrent au cours de leur transit épидидymaire des protéines tyrosine kinases fonctionnelles localisées dans le flagelle, dont l'activation sera nécessaire lors de la capacitation et de la fécondation (Brugnon, 2009), cependant les mécanismes par lesquels ces modifications trans-épидидymaires sont assurées sont mal connus. Or, L'adsorption des protéines d'origine épидидymaire à la membrane des SPZ a été proposée comme étant l'un des principaux mécanismes de l'intégration protéique lors de la maturation épидидymaire (Roberts *et al.*, 2002).

De plus, la glutathion peroxydase (GPx) est une protéine antioxydante présente dans le fluide épидидymaire. La protection des SPZ contre les attaques des ROS est quasiment attribuable à la GPx (Rejraji *et al.*, 2002). Dans ce même contexte, Le liquide luminal de l'épididyme est maintenu à un pH acide de 6.6-6.8 et possède une faible concentration d'ions bicarbonate. Ces facteurs contribuent à maintenir les SPZ dans un état de dormance pendant leur séjour dans l'épididyme, pour éviter l'épuisement des réserves énergétiques qui sont leur propres (Breton et Da Silva, 2012).

2.3 La régulation de la fonction reproductrice chez le mâle

2.3.1 Le rôle de cellules de Sertoli dans le maintien de la spermatogenèse

2.3.1.1 Rôle des cellules de Sertoli pendant la vie embryonnaire

Comme nous l'avons déjà rapporté, les CS produisent l'HAM au cours de la vie intra-utérine dès que les cordons séminifères sont mis en place. L'HAM est impliquée dans la régression des canaux de Müller dans les fœtus masculin, et sa sécrétion est maintenue jusqu'à la période pré-pubertaire, où elle assure un blocage de la stéroïdogénèse au niveau des testicules assurant ainsi des taux très bas de testostérone jusqu'à la puberté (Rouiller-Fabre *et al.*, 1998).

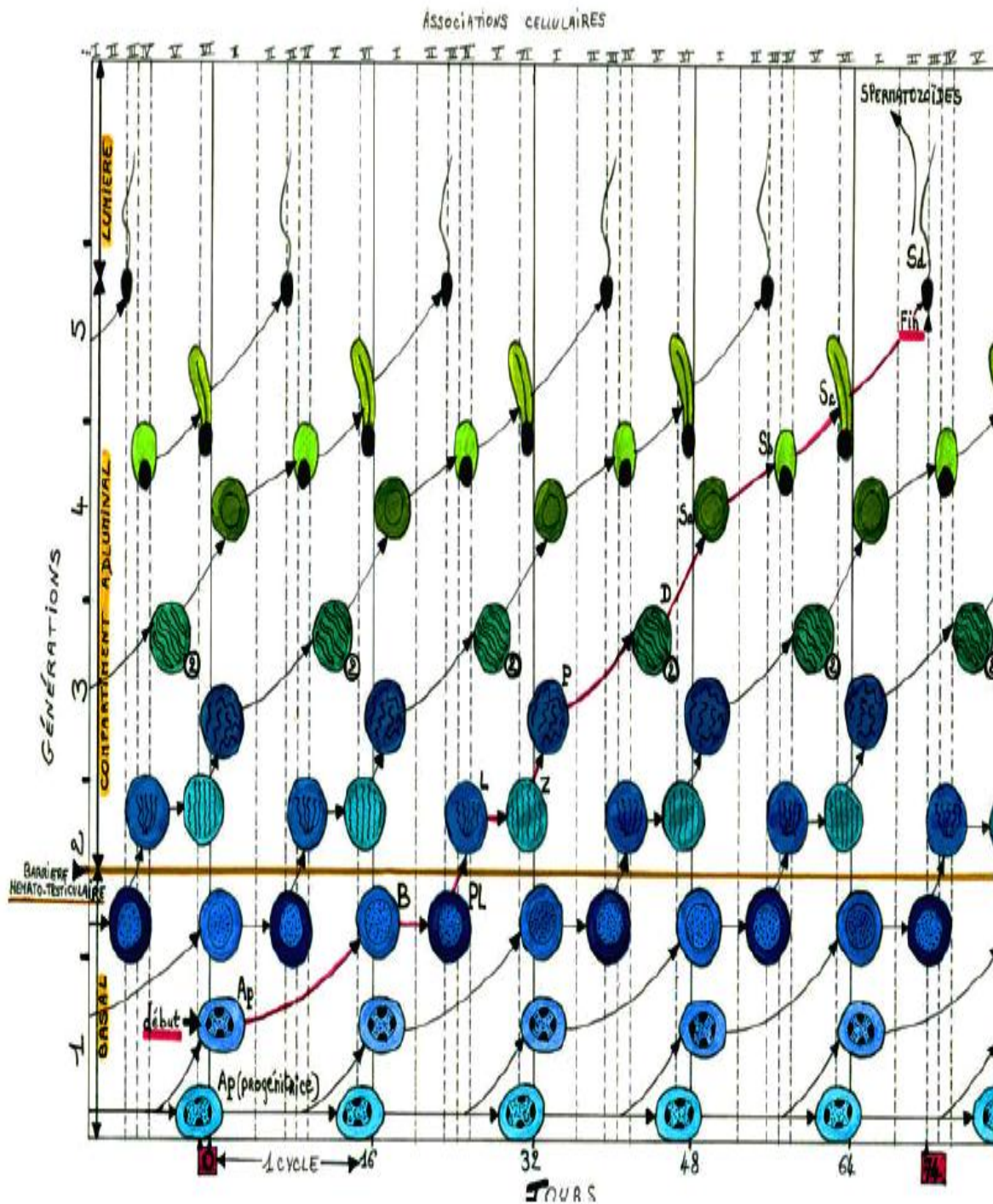


Figure 5 : Les différentes associations cellulaires au cours des cycles de l'épithélium séminifère.

(Poncelet et Sifer, 2011).

Chez l'homme, du début au fin, 4,6 cycles de l'épithélium séminifère se produisent dont l'ensemble constitue un cycle de spermatogénèse commençant par une seule cellule souche germinale Ap qui va aboutir au bout de 74 jours en moyenne à la formation des spermatozoïdes qui vont être libérés dans la lumière des tubes: AP spermatogonie-A pale, B : spermatogonie-B. Spermatocytes aux stades : préleptotène (PL), leptotène (L), zygotène (Z), pachytène (P), diplotène (D). Sa, Sb, Sc, Sd : spermatides en développement. En haut, les numéros latins du I à VI indiquent les différentes associations cellulaires qui peuvent être identifiées.

2.3.1.2 La formation de la barrière hémato-testiculaire

Les CS sont liées entre-elles par plusieurs types de jonctions qui vont former la barrière hémato-testiculaire (BHT) et délimiter l'épithélium séminifère en plusieurs compartiments. Les types de jonctions intercellulaires dans le testicule sont tout à fait similaires aux différents types de jonctions dans d'autres épithéliums, notamment les jonctions communicantes, les desmosomes et les hémidesmosomes. En outre, un type unique de jonction connue sous le nom de « spécialisation éctoplasmique » (SE) est exclusivement trouvé dans les testicules, ce qui rend la BHT une barrière unique et différente de tout autre type de barrière hémato-tissulaire. Une fois les jonctions SE apparaissent en position apicale, elles remplacent les desmosomes et les jonctions communicantes, devenant le seul dispositif d'ancrage des spermatides aux CS, jusqu'à la dernière étape du cycle de l'épithélium séminifère, où elles vont être dégénérées pour faciliter la spermiation et la libération des SPZ qui en résultent dans la lumière des tubes. En effet, différents complexes protéiques contenant des intégrines, des laminines et des connexines sont trouvés dans les SE, ce qui leur confère la capacité de remplacer les fonctions assurées par les différents types de jonctions intercellulaires (Yan *et al.*, 2007). De plus, un autre type de jonctions SE dites « basales » sont présentes dans le compartiment basal entre les CS participant à la formation de la BHT (Cheng et Mruk, 2015).

2.3.1.3 Rôle des cellules de Sertoli pendant la vie adulte

La BHT assure que les étapes postérieures de la spermatogenèse se produisent dans un microenvironnement tout à fait contrôlé. Elle divise le compartiment intra-tubulaire en un compartiment basal avec une communication restreinte avec le milieu interstitiel, et un compartiment adluminal parfaitement isolé, dans lequel la plupart des événements de la spermatogenèse se produisent, ce qui va privilégier la protection des CG en différenciation contre les attaques des cellules immunitaires (Johnson et Everitt, 2007).

Du fait que les CG ne sont pas en contact direct avec le milieu extra-tubulaire ni le sang, les CS vont leur fournir les nutriments nécessaires pour leur développement. Cependant, le nombre de CS dans l'épithélium séminifère est limité à l'âge adulte, à savoir 40 millions de cellules environ chez le rat, où elles cessent de se diviser à partir du 15^{ème} jour du postpartum, et demeurent relativement stable durant toute la vie d'adulte. De

plus, chaque CS ne peut prendre en charge qu'environ 30 à 50 CG à différents stades de développement (Wong et *al.*, 2008). Les CG en excès doivent subir donc une dégénération spontanée par apoptose afin de maintenir un nombre de CG adéquat que les CS peuvent supporter. Ces dernières se comportent comme des cellules phagocytaires, qui vont digérer les corps apoptotiques après endocytose (Pineau et *al.*, 1991).

Elles englobent également les débris cytoplasmiques des spermatides pendant leur transformation en SPZ, et détruisent les CG défectueuses qui ont échoué l'accomplissement de toutes les étapes de la spermatogenèse.

Parmi les plus importantes substances que les CS secrètent, il y a une protéine connue sous le nom d'androgen-binding protein (ABP). Comme son nom l'indique, cette protéine assure la rétention des androgènes (la testostérone) pour maintenir des taux très élevés de cette hormone dans le milieu intra-tubulaire. En effet, La concentration de la testostérone est 100 fois plus élevée dans les tubes séminifères que dans le sang. Cette haute concentration est cruciale pour la production des SPZ. Pour élucider l'importance de l'ABP dans cette rétention de la testostérone, il est à signaler que la nature stéroïde des androgènes les rend très liposolubles et capables de franchir facilement les membranes cytoplasmiques, nécessitant une conjugaison avec d'autres molécules pour diminuer la liposolubilité des androgènes (sherwood, 2010).

2.3.1.4 Transport des CG et dynamique des jonctions Cellule de Sertoli/cellule germinale

Le testicule est doté de la capacité de restructuration des jonctions CS/CG facilitant la migration des CG pendant la spermatogenèse. Plusieurs études ont montré que les laminines $\gamma 3$, $\alpha 3$ et $\beta 3$ formant un ligand fonctionnel (laminine-333) de la membrane des spermatides, assurent l'adhérence aux intégrines des CS. On sait que la phosphorylation des tyrosines associées aux protéines des jonctions intercellulaires jouent un rôle crucial dans la régulation de la dynamique des jonctions dans la BHT, où il a été prouvé que des membres de la famille des tyrosines kinases non membranaires, des « Src » sont localisés dans les SE. En effet, les « Src » sont sous forme inactive ou active phosphorylée (p-Src), localisées au niveau des SE basales et apicales, avec une prédominance apicale des p-Src. La restructuration des protéines semble être assurée par les protéosomes (ubiquitine dépendants), pour la dégradation des celles-ci, alors que l'endocytose des protéines dégradées assure la réintégration de ces dernières dans des nouvelles jonctions. Néanmoins, la coexistence des métalloprotéases avec les complexes protéiques des SE

indique que ces enzymes jouent un rôle dans le clivage des complexes d'adhérence des SE apicales lors de la spermiation. Outre ceci, la suppression de la testostérone intra-testiculaire a provoqué une rupture des SE apicales et le détachement des spermatides de l'épithélium séminifères avant même que la spermiation prend fin, suggérant un rôle régulateur de la dynamique des SE par les androgènes (Wong et *al.*, 2008).

L'intégrité des SE soutenue par les protéines kinases inactives notamment les Src, fait intervenir des filaments d'actine fournissant également des emplacements appropriés d'attachement pour maintenir l'adhérence des complexes des protéines aux SE tel que les laminines/integrines. En fin de cycle séminifère, les changements d'organisation des filaments d'actine favorisent l'endocytose et le trafic des endosomes au sein du cytoplasme des CS, contenant les protéines dégradées, après l'activation des Src par les protéines kinases membranaires, permettant leur réutilisation pour assembler des nouvelles SE apicales avec les spermatides nouvellement formées. En outre, les chaînes de laminine subissent également un clivage induit par les metalloprotéases, produisant des fragments biologiquement actifs de laminine, qui sont réemployés également dans les SE des CS/spermatides (Cheng et Mruk, 2015).

2.3.2 La régulation hormonale de la fonction reproductrice masculine

Au cours de la régulation hormonale de l'activité sexuelle, une gonadolibérine « gonadotropin releasing hormone » (GnRH), un décapeptide sécrété par le noyau arqué de l'hypothalamus (Khallouk et *al.*, 2010), stimule via le système sanguin porte-hypophysaire, la production par l'hypophyse antérieure de deux gonadotrophines hypophysaires : l'hormone lutéotrope (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). La GnRH est parfois désignée sous le terme de LH-RH (pour LH-Releasing Hormone) (Le Moigne et Foucrier, 2009).

La sécrétion de la GnRH est pulsatile. Cette pulsatilité de fréquence et d'amplitude bien définie, est critique pour maintenir une sécrétion normale des gonadotrophines par l'adéno-hypophyse. En effet, après suppression de la sécrétion naturelle de la GnRH, la perfusion continue de la GnRH exogène n'a pas pu restituer la sécrétion de la FSH et de la LH. Cette restitution a nécessité l'utilisation d'un système de pompe programmé à libérer de la GnRH exogène de la même fréquence naturelle. Cette exigence est due à une succession d'étapes préparatoires pour la sécrétion des gonadotrophines qui impliquent une stimulation à nouveau par la GnRH pour passer d'une étape à l'étape suivante.

La biosynthèse, la migration des vésicules sécrétoires chargées de la FSH et de la LH en position sous-membranaire, et la libération progressive du contenu de ces vésicules, requièrent une libération des récepteurs après dégradation de la GnRH déjà liée pour qu'ils soient à nouveau stimuler entraînant le déclenchement du phénomène suivant. Pour cette raison, l'administration continue de la GnRH exogène n'a induit aucune libération des gonadotrophines à cause de l'occupation permanente des récepteurs de la GnRH sur les membranes cellulaires des cellules gonadotropes de l'adénohypophyse (Johnson et Everitt, 2002).

Chez l'homme, la sécrétion de la LH est pulsatile, avec des épisodes irréguliers toutes les 2 à 4 heures. La LH réagit sur les CL, et favorise la stéroïdogenèse en réglant la conversion du cholestérol en prégnenolone, précurseur de la testostérone. Les concentrations sériques maximales de la testostérone surviennent après environ 40 minutes, et diminue à nouveau dans les 40 à 80 minutes qui suivent. La testostérone est essentielle pour la production des SPZ, leur maturation dans l'épididyme, pour le fonctionnement des glandes accessoires et pour le développement des caractéristiques sexuelles secondaires masculines. En fait, dans la lumière des tubes séminifères, la testostérone est convertie en 5 α -dihydrotestosterone, plus efficace que la testostérone elle-même, pour amplifier son effet stimulateur de la spermatogenèse. Ainsi, la testostérone sérique est responsable du feedback négatif sur la sécrétion de la LH par l'axe hypothalamohypophysaire, et contrôle également le comportement masculin (Noakes et al., 2001).

Par ailleurs, la cible principale de la FSH est les CS, où elle stimule la sécrétion de l'ABP. Un autre rôle de la FSH dans la stimulation de la production du pyruvate et du lactate, substrats énergétiques principaux pour les CG, a été également suggéré. De plus, sa sécrétion est réglée par les stéroïdes et l'inhibine B sécrétée par les CS (Figure 7) (Noakes et al., 2001).

D'autre part, lors de l'hypophysectomie de rats mâles, une administration de la FSH et de la LH n'a pas suffi à leur restaurer un rendement normal de la spermatogenèse qui se déroulait pourtant complètement. La prolactine, autre hormone hypophysaire, était nécessaire à l'amélioration de la spermatogenèse. Elle semble jouer un rôle via la facilitation de la stéroïdogenèse. Chez l'homme, la prolactine permet une augmentation du nombre de récepteurs à LH au niveau des CL, et de la fixation de la LH à ses récepteurs (Poncelet et Sifer, 2011).

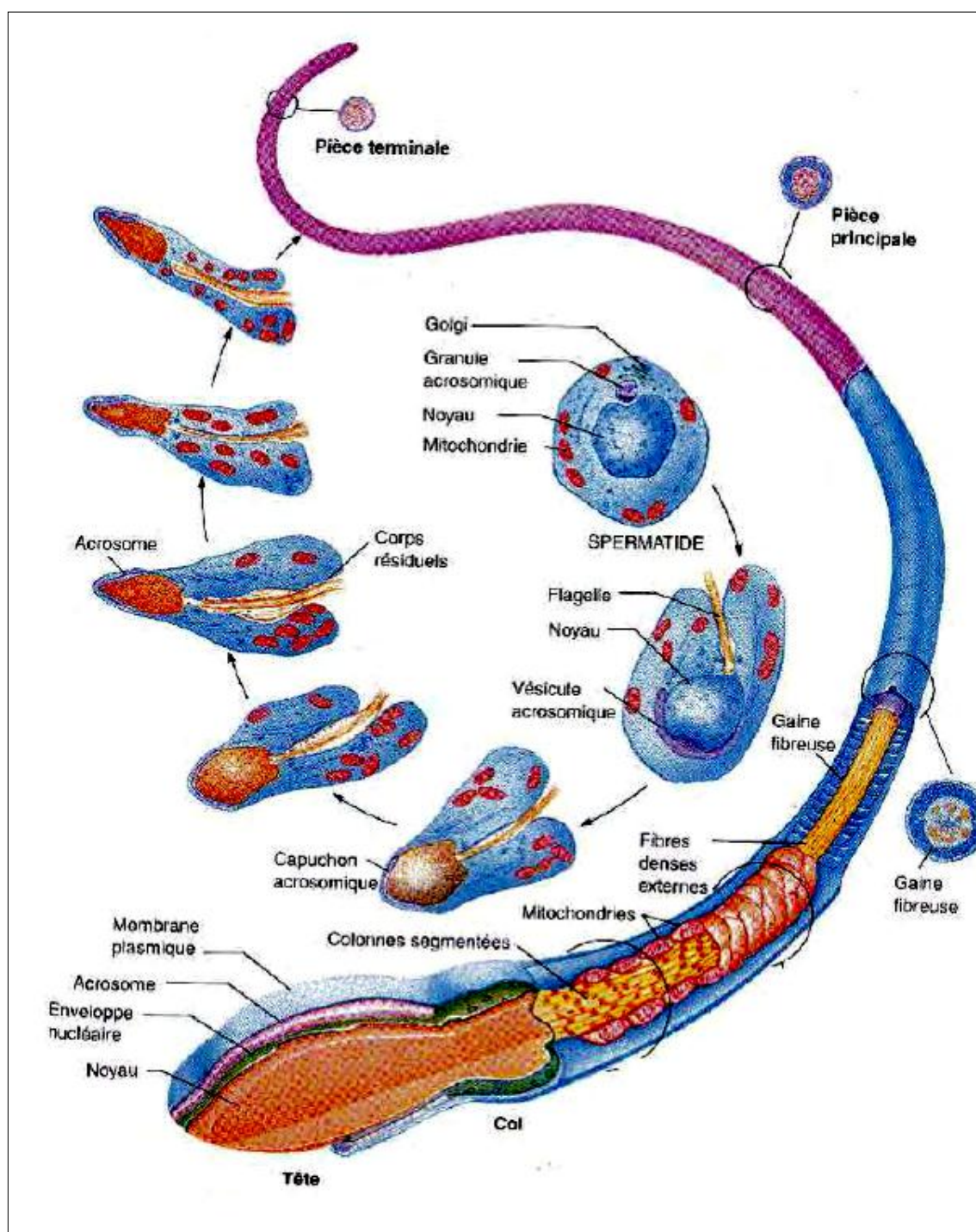


Figure 6 : Schéma représentatif des différentes étapes de la spermiogenèse (Noblanc, 2013).

Les spermatides, des cellules rondes et de petite taille, entre en une succession de modifications morphologiques aboutissant à la formation d'un acrosome, d'un noyau plus condensé, d'un manchon qui contient la quasi-totalité des mitochondries, et d'un flagelle qui se finit par une pièce terminale.

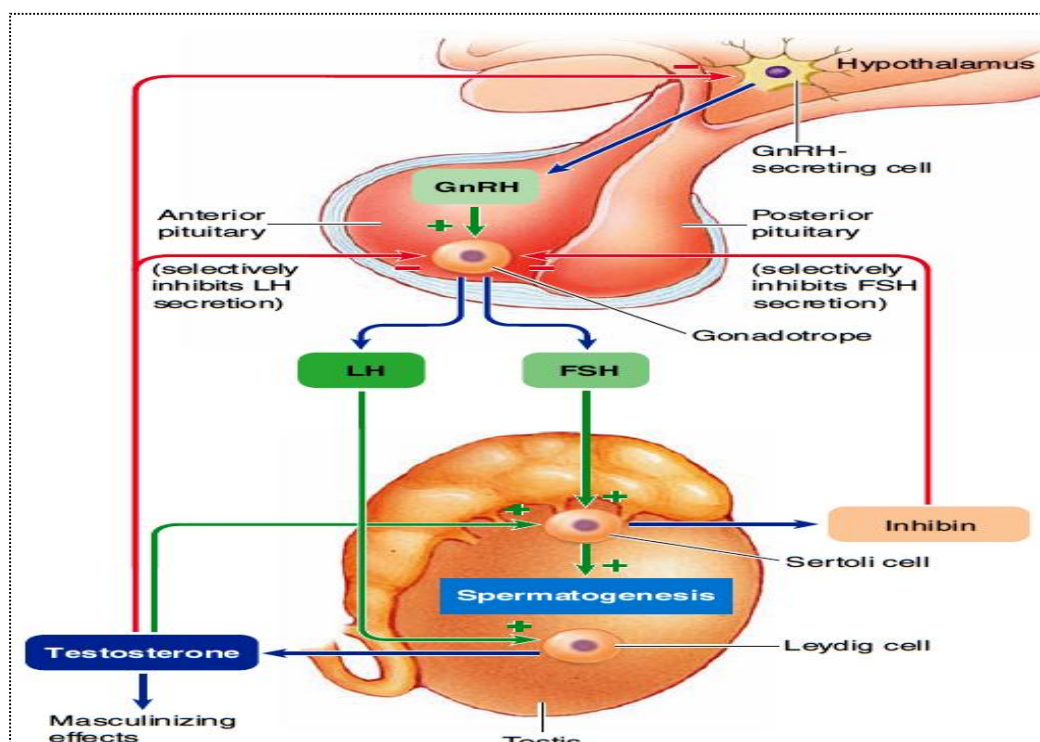


Figure 7 : Régulation de la fonction reproductrice masculine par les différentes hormones gonadiques et gonadotropes (sherwood, 2010).

La production hypophysaire de la FSH et de la LH se fait sous l'action de la GnRH sécrétée par l'hypothalamus. La testostérone produite par les CL, exerce un rétrocontrôle ou feedback négatif sur la LH hypophysaire, alors que l'inhibine produite par la cellule de Sertoli assure le rétrocontrôle négatif sur la production hypophysaire de la FSH.

3. Infertilité masculine et reprotoxicité

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infertilité est définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés. Ces rapports sexuels doivent être normaux en fréquence et en qualité à l'intérieur d'un couple vivant régulièrement ensemble. L'infertilité masculine représente une proportion assez importante des infertilités des couples où dans environ un tiers des cas, une infertilité masculine est toujours signalée, alors que les infertilités d'origine mixte (masculine et féminine) représentent un deuxième tiers des cas (Khallouk et *al.*, 2010).

Les données épidémiologiques récentes concernant l'infertilité masculine indiquent que l'incidence de celle-ci est en augmentation significative durant les dernières décennies (Gorbel et *al.*, 2002). L'infertilité masculine peut résulter d'un dysfonctionnement à divers niveaux le long de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, à savoir des atteintes pré-testiculaires (dommages au niveau de l'hypothalamus ou de la glande pituitaire), testiculaires (cryptorchidie, infections, cancer testiculaire et

chimiothérapie), et post-testiculaires (fonction testiculaire normale avec obstruction ou inflammation des voies spermatiques extra-testiculaires), ou à la combinaison de ces dernières (Agarwal et *al.*, 2014). Dans ces cas, dont les physiopathologies sont bien connues, un traitement de l'infertilité est toujours envisageable (Abid et *al.*, 2008).

Néanmoins, dans une grande proportion des cas, les causes d'infertilité sont indéterminées, ce qui minimise les chances de l'installation d'un traitement adéquat, et l'infertilité persiste. D'autres facteurs sont dès lors incriminés dont notamment l'exposition environnementale aux produits toxiques classifiés comme facteurs de risque pour l'infertilité des hommes (Benalia et *al.*, 2015). La détermination d'une substance en tant que reprotoxique ne semble pas être suffisante, et ça ne constitue qu'une première étape, qui devrait être suivie par une recherche sur ses mécanismes d'action. Cependant, la fonction de la reproduction masculine fait intervenir des processus complexes, et une reprotoxicité peut être induite par de multiples mécanismes. Les études de toxicologie sur les modèles d'animaux sont donc essentielles pour comprendre ces mécanismes (Jana et Sen, 2012).

3.1 Principaux mécanismes d'actions des substances reprotoxiques

La perturbation de la fonction reproductrice masculine peut être induite principalement par l'altération de l'ADN, l'induction de l'apoptose des CG, la dérégulation de la signalisation hormonale et la rupture de l'intégrité et du fonctionnement des CS (Phillips et Tanphaichitr, 2008). En effet, mise à part la perturbation hormonale, le stress oxydatif induit par les toxiques environnementaux pourrait être un mécanisme commun, par lequel les toxiques induisent leurs effets (Wong et Yan Cheng, 2011). Un état de stress oxydatif a été déterminé chez 80% des cas cliniques des hommes infertiles (Tremellen, 2008).

3.1.1 Perturbation de la fonction endocrinienne

Pour les perturbateurs endocriniens (PE), plusieurs définitions ont été proposées. La Commission européenne définit un PE comme toute substance étrangère à l'organisme capable d'induire des effets pathologiques sur l'organisme ou sur la descendance à la suite d'une modification de la fonction hormonale. En outre, l'Agence américaine de l'environnement a donné une autre définition où elle n'a pas inclus l'existence ou pas d'un effet pathologique sur l'organisme ou sur la descendance, et a considéré comme PE, tout

agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones (Adamo et *al.*, 2011).

Comme tout processus homéostatique, la capacité du système endocrinien à maintenir les paramètres physiologiques à l'équilibre est limitée, et une fois dépassée, principalement lors de l'exposition à des produits chimiques, des effets indésirables peuvent s'ensuivre.

Chez l'homme, les conséquences de ces produits chimiques considérés comme des PE sur le système endocrinien peuvent inclure notamment :

- Des altérations des fonctions de reproduction masculine, anomalies du sperme (de la quantité et de la qualité);
- Des malformations du système reproducteur : cryptorchidie, hypospadias, hypoplasie testiculaire, kyste épididymaire;
- Une augmentation de la fréquence de certaines tumeurs testicules; prostatiques;
- Une perturbation de la fonction thyroïdienne (Pillière, 2005).

Selon leur nature chimique, les PE peuvent être classés en deux grandes catégories: les substances synthétiques qui sont utilisées pour un usage industriel (agents de nettoyage, produits antirouille, plastifiants etc...), et dans l'agriculture (pesticides, herbicides, insecticides, fongicides etc...), ou encore plus dans les produits de consommation courante (cosmétiques, produits d'entretien, emballages etc...); et les substances naturelles comme les phyto-estrogènes (soja), et les isoflavonoïdes retrouvées dans certains végétaux comestibles. Chez l'homme, ces PE peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien endogène selon trois mécanismes : par antagonisme de la liaison de l'hormone à son récepteur dans les cellules cibles ; en mimant l'action de l'hormone endogène, induisant ainsi des effets similaires à ceux de l'hormone endogène mais de manière dérégulée (Mauduit et *al.*, 2006).

3.1.2 Stress oxydatif et reprotoxicité

Un état de stress oxydatif ou stress oxydant est traduit par la peroxydation et l'oxydation de beaucoup de molécules cellulaires de différents types, des lipides, des protéines, et même des acides nucléiques. Le stress oxydatif en n'importe quel tissu résulte d'un déséquilibre entre la production des ROS, et le pouvoir de la neutralisation

de ces dernières par le système antioxydant disponible au niveau tissulaire (Turner et LYSIAK, 2008).

3.1.2.1 Sources et production des ROS

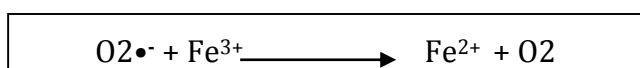
Pouvant s'agir de molécules neutres, d'ions ou de radicaux, les ROS sont des molécules issues du métabolisme aérobie des cellules, qui sont composées d'oxygène et comportent soit des électrons non appariés dans la couche de valence, soit une liaison instable entre deux atomes, ce qui leur confère un pouvoir oxydant exacerbé. Les mitochondries constituent la principale source des ROS, via les complexes de la chaîne respiratoire (Berger, 2006). En fait, la phosphorylation oxydative représente la voie métabolique énergétique principale de l'organisme qui assure une production importante d'adénosine triphosphate (ATP) en permanence, pour fournir de l'énergie à l'organisme. Les mitochondries sont le lieu de la synthèse d'ATP à partir des pyruvates et de l'Acyl-coenzyme A (AcylCoA) issus de glucose et des acides gras. Grâce à l'énergie qui résulte du transfert des électrons du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la Flavine adénine dinucléotide (FADH) à l'oxygène par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons appelés la chaîne de transport d'électrons lors d'un cycle de Krebs, les molécules d'ATP sont synthétisées à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et un phosphate inorganique. Dans ce processus, l'oxygène intervient comme accepteur terminal des électrons transférés par la chaîne de transport d'électrons, et dont plus de 95 % sera converti en molécules d'eau par le système des cytochromes oxydases mitochondriales (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Cependant, le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en ROS particulièrement réactionnelles. Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde est formé (ROS primaire), ce qui conduit par la suite à la production d'autres ROS secondaires, comme le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, etc... (Koppenol, 2001).

Par ailleurs, d'autres sources endogènes dotées des enzymes de type oxydase peuvent être en cause: le réticulum endoplasmique (cytochrome P450), les peroxysomes (voie d'oxydation des acides gras), le cytosol (NO synthétase), et l'espace extracellulaire (xanthine oxydase). De plus, La production des ROS pourra être amplifiée lors d'une exposition de l'organisme à différents facteurs environnementaux, à savoir les radiations, les médicaments, le tabac, et les produits toxiques (Noblanc, 2013).

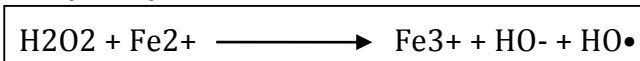
Les ROS étant des molécules instables et réactives, elles forment une cascade de réactions qui s'enchainent les unes après les autres, générant à chaque fois de nouvelles ROS. Cette cascade commence généralement par la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par ajout d'un électron à une molécule de dioxygène (O_2). L'anion superoxyde est une ROS primaire très réactive ce qui rend donc sa durée de vie courte, bien que son action est localisée à son site de production à cause de sa charge négative. Le $O_2^{\bullet-}$ peut être capable de dismuter spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène étant une molécule plus stable et capable de franchir les membranes cellulaires, elle peut avoir des effets à distance de son lieu de production. Elle est peu réactive avec les différentes molécules biologiques, alors que les produits des différentes transformations qu' H_2O_2 peut subir, sont hautement réactifs et donc hautement toxiques, à savoir le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), extrêmement réactif, et qui peut réagir dès sa formation, avec n'importe quelle molécule de son environnement immédiat (lipide, protéine, ADN). En outre, l'oxyde d'azote (NO) naturellement synthétisé à partir de l'arginine peut également réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est plus réactif. Cette réaction se produit uniquement en cas de fortes concentrations des deux réactifs, lors d'un stress oxydatif (Figure 8) (Noblanc, 2013).

Les réactions par les quelles ses ROS secondaires sont formées sont citées ci-dessous :

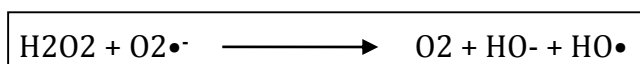
En présence de Fe^{3+} (réduction du fer ferrique en fer ferreux) :



Le peroxyde d'hydrogène va réagir à son tour avec le fer ferreux en aboutissant à la formation du radical hydroxyle selon la réaction de Fenton :



La réaction de Haber-Weiss résume les deux premières réactions en présence de fer entre le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde :



3.1.2.2 Rôles physiologiques des ROS

Les espèces réactives sont générées en permanence dans l'organisme. Ainsi, les ROS générées par le métabolisme normal de l'oxygène, peuvent agir comme des modulateurs des voies de transduction du signal et de l'expression des gènes qui participent à l'homéostasie et à la production des antioxydants, et jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (Human, 2002).

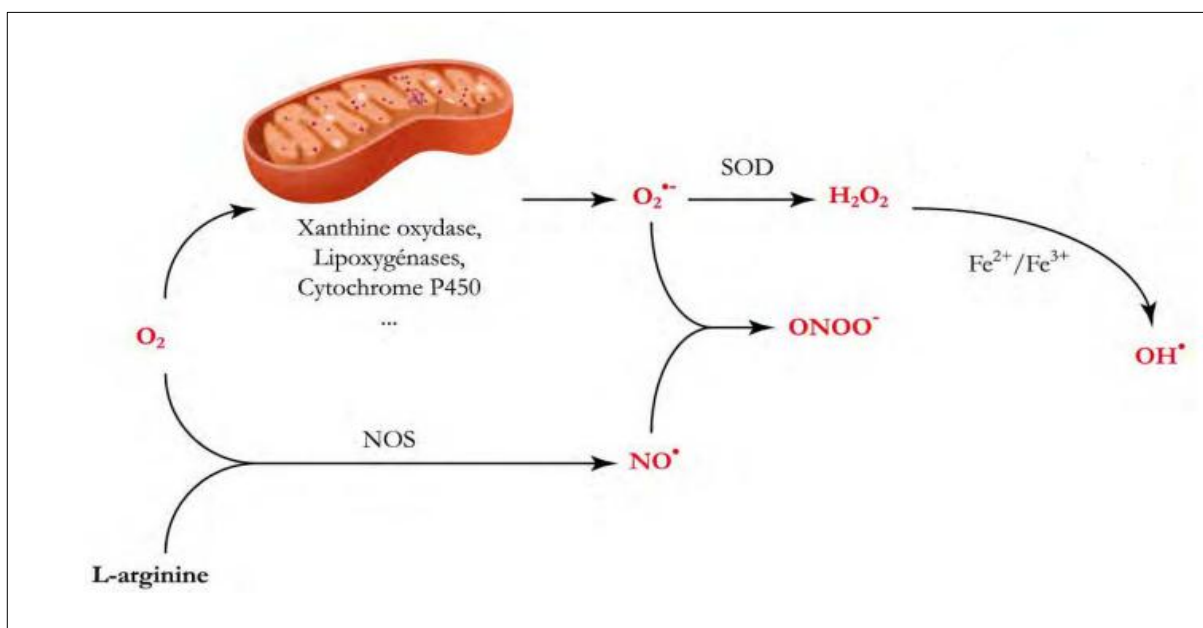


Figure 8 : Différentes voies de génération des ROS dans la cellule (Noblanc, 2013).

La succession de toute une cascade pour la formation des différentes ROS secondaires à partir de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) issu de la chaîne respiratoire mitochondriale: Superoxyde dimutase (SOD). Radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxyde d'azote ($NO^{\bullet}$), NO synthase (NOS), peroxynitrite ($ONOO^-$).

Parmi les exemples les plus communs du rôle physiologique des ROS, on cite la production de superoxyde pendant la phagocytose, et la libération de NO par l'endothélium, qui constitue un des mécanismes de régulation du tonus vasculaire (Berger, 2006).

Le maintien de cette utilité nécessite un équilibre parfait entre la production des ROS et les systèmes de défenses antioxydantes pour éviter leurs effets délétères (Pincemail et al., 2002).

3.1.2.3 Antioxydant enzymatiques et non enzymatiques de l'organisme

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde-dismutase (SOD), la GPx, la catalase et la glutathion réductase ou oxidoréductase (GOR). Comme nous l'avons déjà mentionné, l' $O_2^{\bullet-}$ est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Dès lors, la SOD inactive cet ion superoxyde en le transformant en H_2O_2 . Ce dernier va être lui aussi rapidement catabolisé par la catalase et les GPx en O_2 et en molécules d'eau (H_2O). Ainsi, différentes études ont confirmé que la production de H_2O_2 sous l'action de la SOD était bien le facteur déclenchant des mécanismes naturels de défenses antioxydantes (Figure 9) (Menvielle-Bourg, 2005).

La réduction de H_2O_2 catalysée par la GPx et la catalase aboutit à l'oxydation du glutathion (GSH), un complexe de deux molécules de GSH reliées par un pont de disulfure s'en résulte et un complexe glutathion-S-S-glutathion se forme (GS-SG). Le complexe GS-SG doit être réduit pour qu'il soit renouveler. La GOR est nécessaire pour cette réduction ou elle va catalyser la réduction de de GS-SG en GSH, en présence de NADPH (TAŞER et ÇİFTÇİ, 2012).

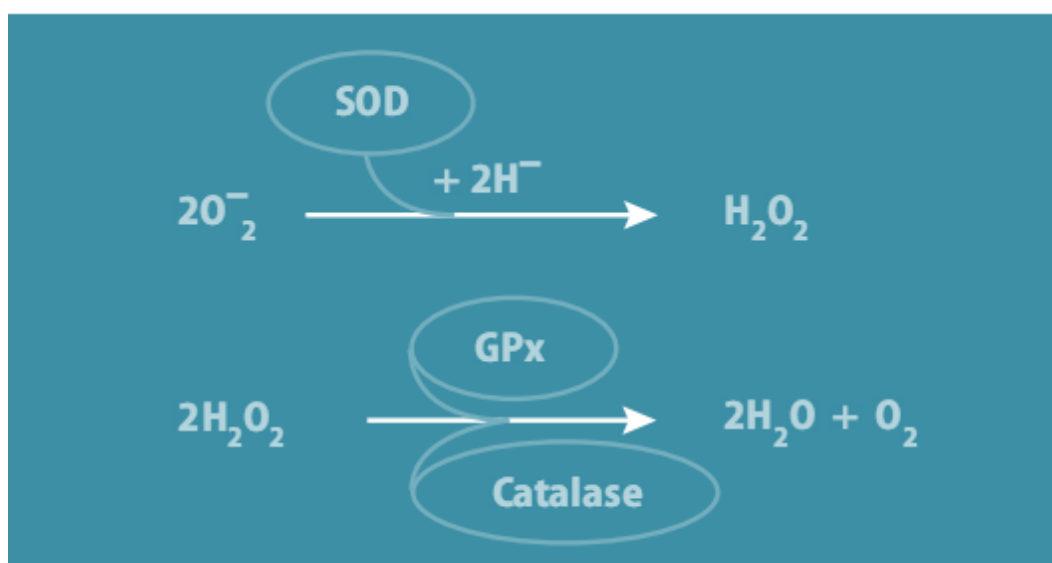


Figure 9 : Neutralisation des ROS par les enzymes antioxydantes
(Menvielle-Bourg, 2005).

La neutralisation des ROS nécessite une collaboration entre les enzymes antioxydantes, superoxyde dimutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et catalase, pour aboutir à la formation des molécules neutres.

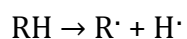
3.1.2.4 Effets des ROS sur le plan macromoléculaire au niveau de la cellule

3.1.2.4.a Dénaturation des protéines

Les ROS provoquent une dénaturation des protéines, après avoir oxydé les groupements thiols, favorisant la formation de ponts disulfures, accentuant le caractère hydrophobe, et favorisant l'agrégation des protéines, ce qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique. Cela concerne en particulier les enzymes cytosoliques et les protéines de transport qui perdent leurs fonctionnalités à la suite de ces modifications délétères (Frédéric, 2011).

3.1.2.4.b Peroxydation des lipides

Les ROS ciblent les doubles liaisons entre les atomes de carbone (C=C) dans les acides gras polyinsaturés (AGPI) afin d'être stables en leur arrachant un hydrogène, ce qui induira la formation d'un radical alkyle (R[•]).



Le R[•] formé lors de l'initiation de la peroxydation va réagir à son tour avec O₂ pour produire un radical peroxyde (ROO[•]). En devenant une espèce instable, le radical peroxyde cherche dès lors à se stabiliser, en réagissant avec un nouvel acide gras insaturé en voisinage pour former des peroxydes (ROOH), en aboutissant à la formation d'un nouveau R[•] au niveau de la nouvelle double liaison entre atomes de carbones. Ce même processus va prendre lieu plusieurs fois si jamais les radicaux ne sont pas neutralisés, en provoquant une propagation de la peroxydation qui risque d'endommager quasiment la membrane cellulaire. Une fois les radicaux lipidiques sont formés, il se produit de nombreux réarrangements aboutissant à la formation des malondialdéhydes (MDA) notamment (Jerzy, 2013).

3.1.2.4.c Action des ROS sur l'ADN

Les dommages oxydatifs de l'ADN par les ROS ciblent principalement les bases azotées ainsi que le groupement « ose », en induisant des délétions, mutations et cassures d'ADN, pouvant mener à l'apoptose. De plus, des liaisons ADN-protéines peuvent également être créées et empêcher les processus de réparation, de réplication ou encore de transcription de l'ADN. Comme la mitochondrie est le premier site de formation de ROS et qu'elle est particulièrement riche en fer ferreux (Fe²⁺), son ADN, dont les systèmes de réparation sont moins efficaces que ceux de l'ADN nucléaire, est particulièrement sensible

à l'attaque des ROS. Ceci altère des processus bioénergétiques importants étant donné que l'ATP synthase est codée par l'ADN mitochondrial (Béguel, 2013).

3.1.2.5 Données sur la relation entre le stress oxydatif et l'hypofertilité

Bien que les ROS ont un rôle physiologique dans la fonction de la reproduction masculine en augmentant la capacité des SPZ à franchir la zone pellucide de l'ovocyte, stimulant la capacitation et l'hyperactivation des SPZ, et permettant la fusion de l'acrosome à l'ovocyte (Saleh et Agarwal, 2002), elle peuvent engendrer en revanche, de graves répercussions en dépassant la capacité antioxydante des organes génitaux et des SPZ. De nombreuses études ont montré que dans 30-80% des infertilités masculines, les pathologies de sperme sont associées à des taux élevés des ROS. Lors d'une infertilité masculine stress oxydatif-dépendante, les ROS peuvent jouer sur l'intégrité de la membrane et d'ADN des SPZ (Tremellen, 2008; Agarwal et *al.*, 2014). En effet, la composition lipidique de la membrane des SPZ n'est plus la même que dans d'autres cellules de l'organisme, avec un taux plus élevé des AGPI, ce qui les rend plus susceptibles aux endommagements induits par les ROS en excès (Alvarez et Storey, 1995). De plus, la structure spécialisée de l'acrosome le rend également une éventuelle cible des ROS, risquant d'affecter négativement sa structure et sa fonction (El-Taieb et *al.*, 2015). En outre, les fragmentations de l'ADN en relation avec la production des ROS peuvent avoir des conséquences non seulement sur les taux de fécondation ou d'implantation, mais aussi sur le développement de la grossesse à plus long terme en entraînant des blocages de division voire des grossesses interrompues ou fausses couches. Un dysfonctionnement métabolique peut s'en résulter de l'atteinte de l'ADN mitochondrial des SPZ, souvent plus vulnérable, par les ROS (Lemkecher et *al.*, 2005). Il s'avère important à signaler que les ROS jouent un rôle crucial lors de la compaction de l'ADN des SPZ, où elles vont être utilisées par la glutathion peroxydase pour oxyder des groupements thiols des protamines. Par contraste, Il a été observé que le stress oxydatif empêche le remplacement des histones par les protamines au cours de la compaction d'ADN des SPZ en réduisant la qualité de l'ADN spermatiques (Boissonnas et *al.*, 2013).

3.1.3 Apoptose des cellules de la lignée germinale

Comme nous l'avons déjà rapporté, l'apoptose des CG constitue un phénomène physiologique lors de la spermatogénèse visant l'élimination des cellules défectueuses, et

des CG en excès tout en évitant de dépasser la capacité des CS d'entretenir les cellules de la lignée germinale au cours de leurs division et maturation pour devenir des SPZ complètement formés à l'issu du cycle de la spermatogenèse.

Cependant, l'intensité de l'apoptose pourra être exacerbée lors d'une exposition aux produits toxiques (Anjum et *al.*, 2011), et une corrélation de cette pathologie avec le stress oxydatif a été également évoquée (Lemkecher et *al.*, 2005).

3.1.3.1 Déclenchement de l'apoptose

Il existe deux voies essentielles de l'activation de l'apoptose, la mort des cellules âgées, endommagées, ou surnuméraires: la voie extrinsèque qui est contrôlée par des récepteurs membranaire de mort cellulaire, et la voie intrinsèque qui est activée dans des conditions de stress cellulaire ou de lésions d'ADN. Les protéines de la famille « B-cell lymphoma-2 » (BCL2), qui incluent des membres pro- et anti-apoptotiques, sont des régulateurs critiques de la voie intrinsèque. La balance entre les membres pro- et anti-apoptotiques est un facteur déterminant du contrôle de la survie ou de la mort cellulaire (Poncelet et Sifer, 2011).

3.1.3.1.a La voie extrinsèque de l'induction de l'apoptose

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort cellulaire est déclenchée par la liaison de ligands à des récepteurs spécifiques appartenant à la super famille des récepteurs du « Tumor Necrosis Factor » (TNF) situés au niveau de la membrane plasmique. Ces récepteurs, via la présence dans leur portion intracellulaire d'un domaine appelé « domaine de mort », assurent la transmission du signal de mort programmée. L'activation consécutive des cystéine-aspartate protéases (caspases-3, 6 et 7), protéases effectrices de l'apoptose responsables de nombreux clivages protéiques, par un clivage protéolytique de la caspase-8 (caspase initiatrice dont le rôle majeur est d'activer les caspases effectrices) induit l'autodestruction cellulaire en clivant des substrats essentiels au maintien de la vie cellulaire (Carmaux, 2008).

3.1.3.1.b La voie intrinsèque de l'induction de l'apoptose

La voie intrinsèque ou « voie mitochondriale » se déclenche dans des cas anormaux à savoir l'absence de facteur de croissance, l'endommagement de l'ADN, et l'irradiation, etc. Dans ces cas, les altérations de l'ADN entraînent l'activation d'un facteur

de transcription de type exonucléase, la protéine p53 qui se trouve inactive dans les cellules normales. Sa fonction principale est de protéger l'organisme contre la prolifération de cellules potentiellement cancérigènes dont l'ADN est endommagé. Son activité enzymatique va lui permettre, en collaboration avec d'autres enzymes, de participer directement à la réparation de l'ADN. Dans le cas où l'altération de l'ADN persiste, la protéine p53 induit l'expression de protéines pro-apoptotiques (Bcl-2-associated X protein (Bax)) qui déclenchent le processus de mort cellulaire programmée. La protéine Bax change de conformation et se fixe à la membrane externe des mitochondries en induisant la perforation de cette dernière, au préalable bloquée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, et la libération par la suite du cytochrome-c mitochondriale. Ce dernier peut intervenir dans l'amplification de la production des ROS qui vont endommager les molécules de base de la cellule (ADN, protéines, lipides) en induisant sa mort. De même, il peut également activer la caspase-9 régulatrice, induisant à son tour l'activation des caspases effectrices telles que les caspases-3, -6 et -7 (Carmaux, 2008).

3.1.3.1.c Apoptose des spermatozoïdes

Il est connu qu'une cellule transcriptionnellement inactive comme le SPZ, ne peut pas entrer en apoptose. Cependant, un certain nombre de signes apoptotiques ont été identifiés dans les SPZ éjaculés de patients infertiles (Marchetti et Marchetti, 2005). Les auteurs de la première étude de ce genre, ont rapporté cette découverte lors de l'analyse des SPZ par microscope électronique à savoir une condensation de la chromatine, une rupture partielle de la membrane nucléaire, et une présence de corps apoptotiques, ce qui a été attribué à un probable apoptose des SPZ (Baccetti et *al.*, 1996). D'autre part, bien qu'il ne soit pas clairement défini si l'expression de cette apoptose dans les SPZ éjaculés est la conséquence d'une apoptose testiculaire initiée et avortée, cette hypothèse est plus logique du fait que l'apoptose des SPZ n'est pas encore confirmée (Brugnon, 2009).

L'analyse de ces données de la littérature nous fait penser que les infertilités idiopathiques doivent faire l'objet de beaucoup plus d'intérêt pour les chercheurs afin de bien élucider l'incrimination des différentes substances toxiques auxquelles les hommes risquent de s'exposer, de bien définir les mécanismes d'action de ces substances sur le large spectre de facteurs qui contrôlent la fonction de la reproduction, et de chercher des solutions préventives ou encore plus, thérapeutiques, qui viseront la préservation de la

fertilité masculine dont l'incidence est toujours en augmentation. De plus, le stress oxydatif s'est avéré un mécanisme majeur, d'une intensité exacerbée et des répercussions graves qui s'en résultent, devant prendre place lors de l'exploration des infertilités masculines. L'accent doit être mis donc sur la recherche de ses marqueurs, sa corrélation avec les infertilités, et les facteurs environnementaux qui peuvent le provoquer, ainsi que sur le développement de toute une stratégie préventive contre les effets délétères que le stress oxydatif pourrait induire sur les différents axes régulateurs et effecteurs de la fonction reproductrice masculine.

Chapitre II : Substances bioactives des plantes : Exemples étudiés « tabac et thé vert »

« Ce chapitre traite essentiellement de la composition chimique des plantes et de leurs substances bioactives qui peuvent avoir un effet toxique ou bénéfique chez l'homme. Ceci concerne essentiellement les deux matières végétales que nous nous sommes proposé d'étudier et les différentes substances que nous pouvons trouver dans les extraits utilisées lors de l'étude expérimentale ».

1. Le développement de la connaissance de l'homme sur l'utilisation des plantes

La connaissance de l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne (Sévenet et Tortora , 1994). Depuis l'antiquité, l'homme a pu développer son utilisation des plantes, non seulement pour se nourrir, mais aussi pour se soigner. Après avoir vécu plusieurs expériences et accidents avec les plantes au cours des siècles, l'homme a acquis la capacité de faire la distinction entre plantes comestibles et plantes toxiques, ainsi que d'autres constatations qui lui ont permis de sélectionner des plantes pour soigner telle ou telle des maladies. Ces connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments, jusqu'au début du XXème siècle, ou presque toutes les thérapies étaient de base végétale (Mekkiou, 2005).

Quelle que soit la forme sous laquelle les plantes sont utilisées, elles vont fournir toute une gamme de substances chimiques, dont quelques-unes seulement sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique de la plante et qui porte le nom des métabolites secondaires; cela a permis la naissance de la science qui étudie les compositions et les activités des substances d'origine végétale.

2. Les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, mise à part les métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), les végétaux produisent également une large gamme de substances ou métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas indispensable pour la croissance de la plante. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées et classées selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpènes (Jeaun et *al.*, 2005).

Dès leur découverte, ces substances ont beaucoup intéressé les chimistes qui en ont isolé et identifié un nombre croissant. Ces études étaient réalisées dans le but de découvrir des applications potentielles comme drogues, médicaments, antibiotiques,

insecticides ou herbicides. En outre, ce n'est que plus récemment que l'on s'est demandé pourquoi les plantes synthétisaient un si grand nombre de métabolites secondaires, et quelles fonctions assurent t'elles dans les organismes végétaux (Courtois , 2010).

2.1 Rôle des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent. Ils sont impliqués comme des signaux chimiques, des moyens de défense contre les herbivores et les pathogènes, comme ils participent également à des réponses allélopathiques (compétition entre les plantes pour la germination et la croissance), et assurent une protection contre les radiations solaires (Bourgaud et *al.*, 2001).

Les métabolites secondaires peuvent aussi être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes, les animaux et les insectes pollinisateurs, où ils interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux par les odeurs et les couleurs qu'ils fournissent à la plantes (Kabera et *al.*, 2014).

2.2 Principales classes de métabolites secondaires

2.2.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes avec une répartition quantitative variable entre les différents tissus dont plus de 8000 structures ont été identifiées, allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins. Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, arôme, amertume) (Boubekri , 2014).

Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et les légumes mais également les produits transformés comme le chocolat et le thé. A titre d'exemple, le régime méditerranéen, caractérisé par une

consommation élevée et variée de légumes et de fruits, est associé à un allongement de l'espérance de vie. De récentes études épidémiologiques suggèrent qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, serait due aux micro-constituants des fruits et légumes dont les polyphénols sont les principaux représentants (Nkhili, 2009).

Les composés phénoliques sont toutes substances chimiques possédant dans leur structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles appelé « phénol » (Figure 10). Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique (Nkhili, 2009).

La structure des composés phénoliques naturels varie des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (flavonoïdes et tanins condensés), avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Macheix et al., 2005).

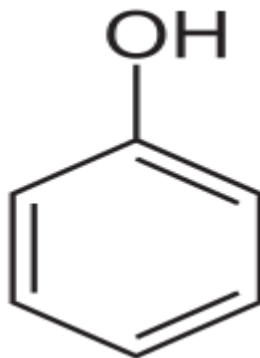


Figure10 : Structure chimique d'un phénol (Nkhili, 2009).

2.2.2 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes contiennent de l'azote (N) et sont généralement dérivés des amino-acides. On distingue plusieurs types d'alcaloïdes en fonction de leur structure chimique et de leur origine biosynthétique. Le rôle de défense des alcaloïdes est confirmé par leur large spectre d'effets physiologiques, toxiques et répulsifs contre les insectes et les autres animaux (Courtois, 2010).

A ce jour, plus de 15 000 alcaloïdes différents ont été isolés. La définition des alcaloïdes étant déjà difficile, la classification de ceux-ci n'est pas plus simple. Les noms des alcaloïdes ne sont pas codifiés par une nomenclature officielle, mais en règle générale, le nom dérive de la plante dont l'alcaloïde a été extrait (Ex : la cocaïne est extraite de la coca) (Dunet, 2009).

Dans la plupart du temps, les alcaloïdes sont dérivés d'acide aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'asparate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces derniers sont ensuite décarboxylés en amines et enfin couplés à d'autres squelettes carbonés pour aboutir à la formation des alcaloïdes. Vu leur toxicité considérable, les alcaloïdes sont efficacement utilisés par les plantes comme système de défense contre les herbivores et les pathogènes (Tikhomiroff, 2001).

2.2.3 Les composés terpéniques

Les terpènes sont des métabolites secondaires, très répandus dans les plantes, constituant le principe odoriférant des végétaux. Ils sont classés selon le nombre de répétitions de leur unité de base « l'isoprène » (à 5 atomes de carbone). A ce jour, avec plus de 30 000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus grandes familles de composés naturels, contenant des hémiterpènes (C₅), des monoterpènes (C₁₀), des sesquiterpènes (C₁₅), des diterpènes (C₂₀), des sesterpènes (C₂₅), des triterpènes (C₃₀), des tetraterpènes (C₄₀) et des polyterpènes (Harkati, 2011).

En effet, il n'y a pas de fonction chimique commune aux terpènes, et seule leur structure et leur biosynthèse en font une catégorie. A titre d'exemple, les monoterpènes sont émis par les plantes et forment des aérosols pouvant servir de noyau de condensation des nuages, alors que les sesquiterpènes jouent le rôle d'agent de défense dans les plantes. Les triterpènes sont facilement transformés en cholestérol, d'où vient le lien entre les terpènes et les stéroïdes, etc. (Mansour, 2009).

3. La place du thé vert dans la phytothérapie

3.1 Les variétés et les modes de consommation de thé

Le thé est obtenu à partir de *Camellia sinensis*, une plante appartenant à la famille des Theaceae. Elle est originaire de la Chine, du sud et du sud-est de l'Asie, bien qu'elle

soit cultivée partout dans le monde surtout dans les régions tropicales et subtropicales. Avec un degré de consommation toujours en augmentation, le thé est la boisson la plus consommée dans monde après l'eau, le plus souvent sous forme d'infusion ou de décoction (Namita et *al.*, 2012).

A l'état sauvage, le théier (*Camellia sinensis*) est un arbuste de cinq à dix mètres d'hauteur, bien qu'il soit taillé à environ 1,20 m dans les plantations pour faciliter la cueillette des feuilles (Figure 11). Les jeunes feuilles à l'extrémité des branches donnent les meilleurs thés, alors que les quatre ou cinq feuilles suivantes servent à la production courante. Les facteurs environnementaux comme le climat, le type de sol et l'altitude contribuent à la teneur en composés bioactifs présents dans le thé (Nkhili, 2009).

Après leur récolte, les feuilles du théier, appelées par abus de langage « feuilles de thé », sont commercialisées en trois grandes variétés : les thés noirs, les thés verts et les thés Oolongs. En fait, l'origine de ces variétés est la même (les feuilles de *Camellia sinensis*), mais la différence se produit lors des traitements subis par les feuilles fraîchement cueillies. Pour le thé vert plus consommé en Chine, les feuilles sont simplement roulées et séchées après la cueillette, alors que le thé noir, plus consommé en Europe, est obtenu après une phase d'oxydation totale des polyphénols présents dans les feuilles par les enzymes polyphénoloxydases. Le thé Oolong ne subit que partiellement, cette phase d'oxydation (Mossion, 2007).

Lors des procédés de la manufacture, le thé vert est obtenu par stabilisation des feuilles de thé sous la chaleur humide ou sèche. Cette opération a pour effet de détruire les polyphénols-oxydases pour inhiber l'oxydation des polyphénols. Par contraste, dans le cas des thés noirs et oolongs, les feuilles sont roulées dans des machines spécialement conçues pour briser les parois cellulaires sans détruire la feuille (thé oolong), ou complètement écraser les feuilles entre deux rouleaux tournant en sens inverse (thé noir). Ce traitement permet l'oxydation des polyphénols après avoir induire des dommages tissulaires facilitant le contact entre ces derniers et les enzymes qui les oxydent, et permettant ainsi une amélioration du goût de thé (Figure 12) (Mossion, 2007).



Figure 11: La forme des feuilles (a), et des fruits (b) du théier (*Camellia sinensis*), matière première de la fabrication de thé (Namita et al., 2012).

*Le théier ou (*Camellia sinensis*), est le nom de l'arbuste cultivés partout dans le monde et utilisés pour la fabrication de thé. La récolte de ses feuilles se fait le plus souvent manuellement, avec des périodes de repos durant toute l'année. Ces feuilles seront traitées par la suite pour fabriquer les différentes variétés de thé existantes de nos jours.*

3.2 Composition chimique des feuilles de thé vert

Le thé contient principalement des polyphénols, en association avec d'autres composés qui sont des alcaloïdes (caféine (CAF)), des acides aminés, des protéines, le fluorure, l'aluminium, et d'autres oligoéléments. Les polyphénols présents dans le thé sont dans la plupart du temps des flavonoïdes, des composés phénoliques dont les effets bénéfiques de la consommation de thé leur sont attribuables. Il est à signaler que ces

avantages concernent plus particulièrement le thé vert qui a gardé sa composition phénolique quasiment intacte lors de la manufacture (Namita et *al.*, 2012).

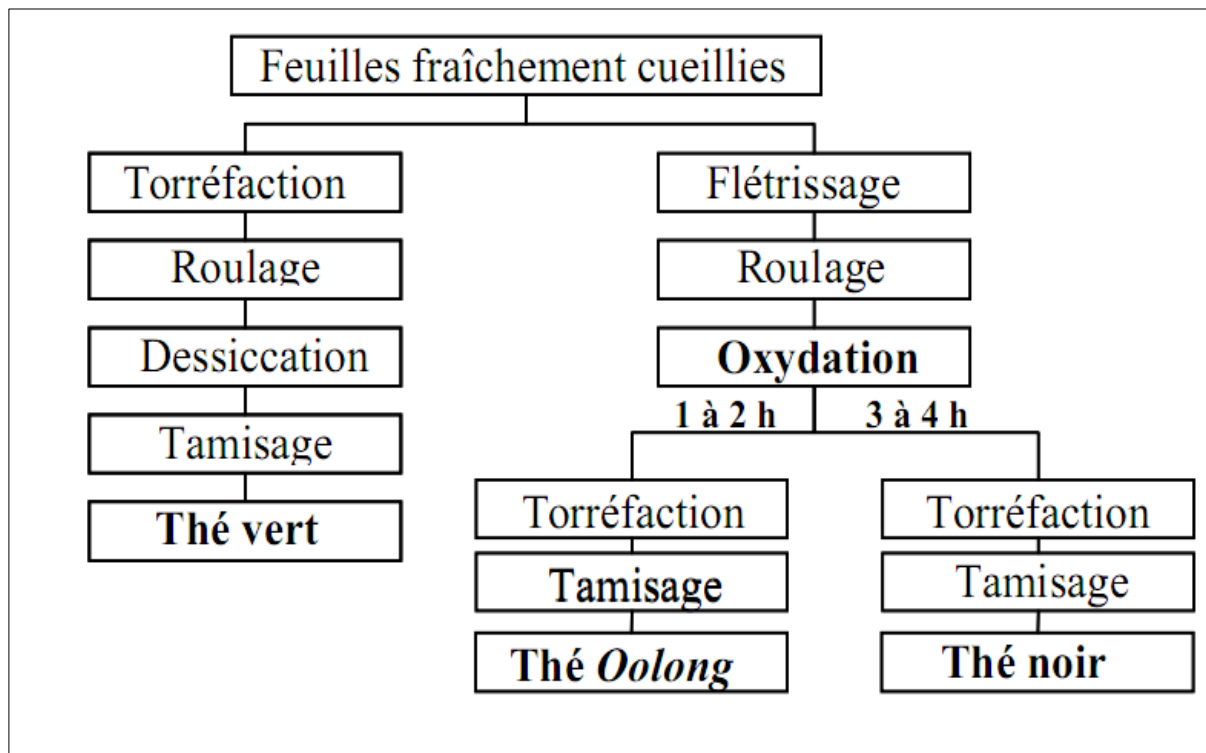


Figure 12 : Les principales étapes du traitement des feuilles de théier après leur récolte (MOSSION, 2007).

3.2.1 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant aux polyphénols. Ils sont des pigments jaunes présents dans tous les végétaux. Selon leur structure, les flavonoïdes peuvent être répartis en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les isoflavanones et les anthocyanes (tableaux 1) (Benguerba, 2008).

L'ensemble des flavonoïdes possède une origine biosynthétique commune contenant tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et C), reliés par un cycle pyranique central (B). Ce sont les radicaux liés à la structure de base qui vont déterminer le type de la molécule (Figure 13) (Nkhili, 2009).

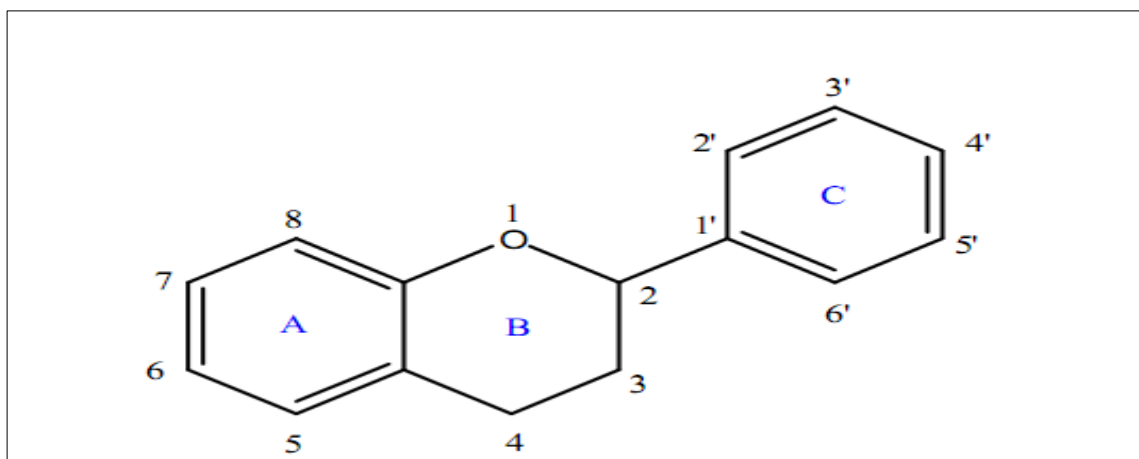


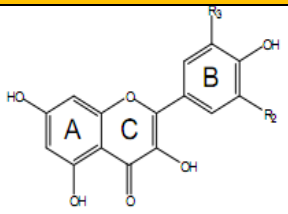
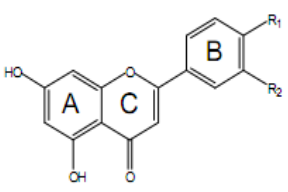
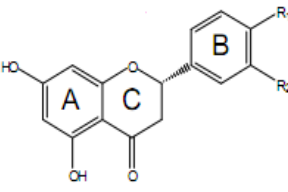
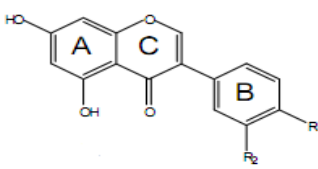
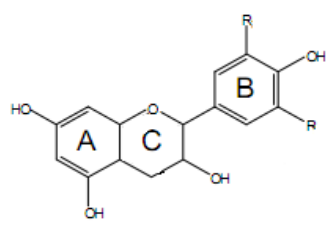
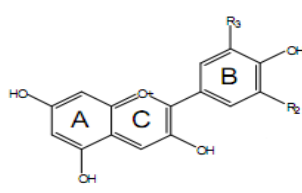
Figure 13 : La structure de base des flavonoïdes contenant deux cycles aromatiques (A et C) reliés par un cycle pyrane (B) (Nkhili, 2009).

3.2.1.1 La pharmacocinétique des flavonoïdes

L'absorption des flavonoïdes commencent dans l'estomac. Elle dépend de la prise alimentaire et de la forme ingérée (par exemple, les extraits contenant des flavonoïdes), de la dose, etc. Les aglycones peuvent être absorbés dans l'estomac. Dès lors, ils sont rapidement transformés en glucuronides et en sulfates dans le foie. Une exception pour les anthocyanines (glycosides), se réside dans leur capacité d'être absorbées intactes dans l'estomac (Erdman et *al.*, 2007).

En outre, La plupart des glycosides atteignent le petit intestin, sans avoir être dégradés. L'épithélium intestinal est riche en enzymes notamment les β -glucosidases qui jouent un rôle important dans le métabolisme des flavonoïdes, en éliminant le glucose (Sauf les anthocyanines) sans changer la structures des flavonoïdes qui seront absorbés dans le petit intestin puis métabolisés au niveau du foie (Erdman et *al.*, 2007). Les composés non absorbés dans le petit intestin passent dans le gros intestin où ils sont catabolisés par la flore bactérienne assurant l'hydrolyse des formes conjuguées et la formation de catabolites de petit poids moléculaire qui vont être absorbés par la suite (Tabart, 2011). Dans le sang, les flavonoïdes sont présents conjugués à d'autres-

Tableau 1 : tableau représentatif des principales sous-classes des flavonoïdes (Erdman et al., 2007).

Sous classe	Structure	Exemple	Source
flavonols		quercétine	oignons, thé
flavones		apigénine	Epices
flavanones		naringine	Agrumes
Isoflavones		glycitéine	Soja et légumes
Flavanols (flavan-3-ols)		catéchine	Thé vert Cacao
Anthocyanes		cyanidine	raisins noirs

substances suite à leur transformation au niveau du foie. La fraction des flavonoïdes conjugués destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée dans les urines. Cependant, d'autres flavonoïdes conjugués pourraient être acheminés vers l'intestin via la bile pour être éliminés dans la matière fécale, cependant les fractions aglycones peuvent être à nouveau réabsorber en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang (Kebieche, 2009).

3.2.2 Les flavonoïdes de thé vert

Le thé vert contient principalement des composés phénoliques de la sous classe des flavanols (flavan-3ols), représentés par des catéchines dont le plus importante est l'épigallocatechine (EGC) et son gallate (de 48 à 55 % du contenu total en polyphénols). L'ensemble des catéchines de thé vert sont: (-) épigallocatechine-3-gallate (EGCG), l'EGC (-) épicatechine-3-gallate (ECG) et (-) épicatechine (EC), (+) gallocatechine-3-gallate (GCG), (+) gallocatechine (GC), (+) catéchine-3-gallate (C3G) et (+) catéchine (C) (Figure 14). De plus, des flavonols ont été également identifiés, principalement la quercétine (2-3% de la composition des polyphénols de thé) (Nkhili, 2009).

3.3 Principales utilisations thérapeutiques et préventives du thé vert

La capacité antioxydante des composants diététiques notamment le thé vert a été postulé être responsable de la prévention du cancer, des maladies cardiovasculaires et neurodégénérative. Les polyphénols de thé vert préviennent ainsi l'athérosclérose en diminuant le taux de la peroxydation des lipides, et en neutralisant les ROS (Khalaf et al., 2012).

Des études expérimentales sur des animaux de laboratoires ont indiqué que les catéchines sont capables de réduire significativement la tension artérielle chez des rats spontanément hypertendus (Potenza et al., 2007), de diminuer la tolérance de glucose et amplifier la sensibilité à l'insuline chez des souris diabétiques (Wolfram et al., 2006).

Des données récentes ont soutenu le rôle des catéchines dans la diminution du poids et l'inhibition du développement d'une obésité. Le thé vert possède également une puissante activité anti-inflammatoire en réduisant l'expression des médiateurs de l'inflammation (Cooper et al., 2005).

De plus, Le thé vert protège le foie contre les effets néfastes de l'alcool et d'autres produits chimiques hépatotoxiques. Le métabolisme d'alcool a comme conséquence la production des ROS en grande quantité, dont un dommage hépatique s'en résulte par la suite. Le thé vert peut empêcher ce processus en neutralisant les ROS en produisant des radicaux stables beaucoup moins toxiques (Sharangi, 2009).

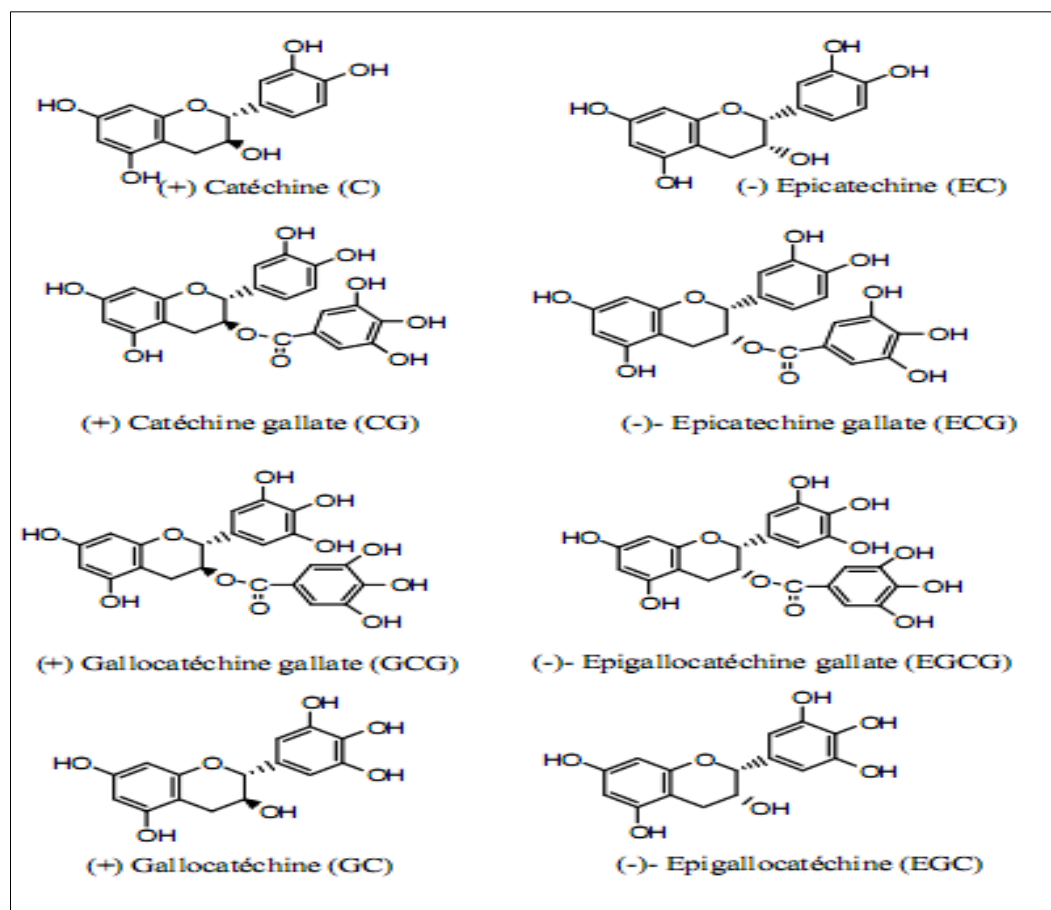


Figure 14 : Structure chimique des différents catéchines présents dans le thé vert (Nkhili , 2009).

3.4 Toxicité de thé vert

Suite à la consommation des produits à base de thé à forte concentration, quelques cas seulement ont présenté une hépatotoxicité associée à une perturbation de l'activité enzymatique du foie, notamment celle de la gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GT) et de la phosphatase alcaline (PAL). Ces observations révèlent une inflammation du foie liée à la consommation de thé, bien qu'elles tentent à disparaître une fois le traitement est interrompu; et les valeurs des marqueurs biologiques seront désormais normales. Dans

d'autres cas, et après des expositions multiples à ce type d'inflammation, le foie n'était pas capable à récupérer ses fonctions. Lors de cette étude épidémiologique, l'éventuelle coexistence d'un ou de plusieurs autres facteurs qui peuvent induire cette hépatotoxicité a été négligée, ce qui rend ces résultats incertains. En effet, la pharmacopée américaine a assuré en 2008, la sûreté de l'usage des produits à base de thé vert, en considérant le nombre de cas de toxicité quasiment négligeable et qui a été pour certains produits de 1 sur 100,000 consommateurs (Sánchez et *al.*, 2013).

4. Tabac et santé

D'après l'OMS, le tabac est l'un des produits mortels les plus consommés, avec de près de 5 millions de décès par an dans le monde (OMS, 2010). De ce fait, la sensibilisation pour la lutte contre le tabagisme est devenue une priorité de santé publique, dont plusieurs initiatives ont été prises au plan international tel que « Pour un monde sans tabac ». La convention cadre proposée par l'OMS et adoptée en mai 2003 par 47 états invite les pays à prendre des mesures reconnues comme efficaces et de les inscrire dans un cadre législatif (hausse des prix et des taxes, interdiction de la publicité, interdiction de fumer sur les lieux de travail et les lieux publics, et des campagnes d'éducation et de sensibilisation (Abrous, 2004).

4.1 L'origine, la fabrication et la consommation du tabac

Nicotiana tabacum, espèce de plante dicotylédone annuelle de la famille des Solanacées (figure 15), est une plante originaire d'Amérique centrale qui est à nos jours cultivée partout dans le monde, pour ses feuilles riches en nicotine qui servent à la préparation du tabac manufacturé. Après leur récolte, les feuilles de tabac sont séchées, puis mises à fermenter pour être fumables. Les tabacs sont classés selon leur variété et leur mode de séchage. Les tabacs bruns sont séchés à l'air et au feu, les tabacs blonds à l'air chaud et les tabacs clairs à l'air ou au soleil (Faure et *al.*, 2014).

Après sa découverte par Christophe Colomb aux Amériques, la *Nicotiana tabacum* a été utilisée en premier lieu pour la fabrication de la chique (feuilles de tabac enroulées sur elles-mêmes et mâchonnées sans être avalées), et du tabac pour la pipe, alors que les premières cigarettes ne sont apparues qu'en 1830, et leur production commençait à être industrialisée dès 1840. A cette époque, le tabagisme restait peu fréquent, et ce n'est qu'au

début de la première guerre mondiale que la cigarette manufacturée est devenue un objet de consommation populaire et gagne peu à peu toutes les classes de la société (Faure et *al.*, 2014). Dès lors, l'augmentation de la consommation des cigarettes n'a pas cessé d'augmenter. Une étude épidémiologique réalisée par l'OMS en 2006, a révélé que 41,1% des hommes et 8,9% des femmes de la population générale mondiale fumaient (OMS, 2010).

4.2 Les produits à base de tabac non combustibles

Dans certaines régions du monde, la consommation de tabac oral sans fumée demeure la forme la plus répandue du tabagisme et des maladies qu'il provoque, constituant la forme majeure de dépendance tabagique. Ces produits oraux sont fortement addictifs et peuvent provoquer également de graves répercussions notamment des cancers de la tête, du cou, de la gorge et de l'œsophage, ainsi que de nombreuses affections buccodentaires. Les formes de tabac « oral » sans fumée peuvent être divisées en deux formes majeures: le tabac à chiquer, broyé comme de l'herbe est destiné à être mâché; le tabac à priser est réduit en particules semblables à une mouture de café grosse, humidifié, et maintenu par pression entre la gencive et la joue (OMS, 2006).

4.3 Composition chimique du tabac

Le tabac comprend plus de 4 000 composants toxiques, notamment les alcaloïdes dont la nicotine, des hydrocarbures et des éléments trace métalliques (Sépaniak et *al.*, 2006).

La composition chimique du tabac est très complexe. Son analyse peut concerner la plante fraîche ou séchée, de même que le tabac de la cigarette et ses additifs. La fumée de cigarette peut être définie comme un aérosol dynamique en mouvement constitué d'une phase vapeur ou gazeuse et d'une phase particulaire. Le filtre en fibre de verre à travers lequel passe la fumée principale lors de l'analyse retient la phase particulaire. Cette dernière correspond au goudron que les cigarettes contiennent, et à partir duquel, il va être possible de doser un grand nombre de substances auxquelles les fumeurs sont exposés. De même, la phase gazeuse peut être également analysée. La fumée du tabac contient principalement des composés inorganiques tels que l'azote, le monoxyde et le dioxyde de carbone, et le sulfure l'hydrogène; des éléments traces métalliques comme le-



Figure 15 : *Nicotiana tabacum*, la matière première de la fabrication du tabac (FAURE et *al.*, 2014)

Nicotiana tabacum est une plante dicotylédone annuelle de la famille des Solanacées, qui a pris son nom de l'ordre Solanum qui signifie « soulagement ». Il s'agit d'un arbuste d'origine américaine (Amérique du centre faisant entre 60 et 180 cm d'hauteur). Cette plante est cultivée presque partout dans le monde. Ces feuilles très riches en substances psychoactives notamment la nicotine sont utilisées pour la fabrication du tabac.

plomb (Pb) et le cadmium (Cd), et des composés organiques essentiellement des hydrocarbures saturés (alcane volatils), et oxygénés (alcools), des aldéhydes, des cétones et des acides; des nitrosamines et des alcaloïdes (Abrous, 2004).

4.3.1 Les alcaloïdes du tabac

La nicotine ((S)-3-(1-méthyl-2-pyrrolidinyl) pyridine) constitue le principal alcaloïde du tabac, représentant 90 à 95% du contenu total en alcaloïdes (Valdes-socin et *al.*, 2010). La nicotine est constituée d'un cycle pyridinique et d'un cycle pyrrolidinique. Sa synthèse s'effectue au niveau des racines. Ensuite, elle est transportée à travers le xylème jusqu'aux feuilles, dans lesquelles elle s'accumule. Il est à noter que les facteurs génétiques et les paramètres climatiques de production peuvent modifier la teneur en nicotine du tabac. La cotinine est un dérivé oxygéné de nicotine, qui porte un groupe cétonique au niveau du noyau pyrrolidine. Elle est présente dans la fumée du tabac en faible quantité, où elle résulte de l'oxydation de la nicotine lors de séchage des feuilles.

En outre, elle constitue le principal métabolite de la nicotine au niveau du foie chez les fumeurs. Mais à part ces deux derniers, le tabac contient également d'autres substances appartenant à la famille des alcaloïdes en concentrations mineurs, notamment la nornicotine, l'anabasine, la myosmine, anatabine, etc. (figure 16) (Delage, 2008).

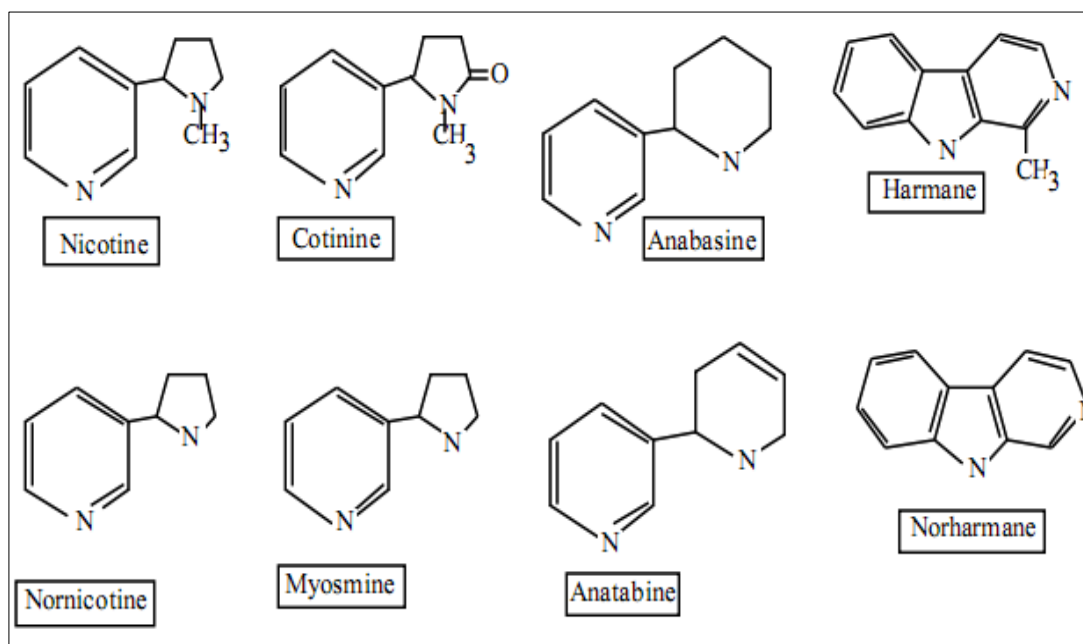


Figure 16 : Structure chimique des alcaloïdes du tabac (Riah, 1996).

4.3.2 Additifs de tabac

L'organisation anglaise « Action on smoking and health » (ASH) a déclaré l'existence de plus de 600 additifs autorisés dans la fabrication des produits à base de tabac, dans un cadre législatif extrêmement flou et fortement décentralisé. Bien que les effets toxiques de ces additifs soient généralement contrôlés, il n'y a aucun contrôle ni évaluation de l'impact de ces additifs sur les comportements tabagiques, ou sur d'autres conséquences néfastes éventuelles. Toutefois, ces additifs peuvent être toxiques soit par eux-mêmes soit en association ou bien après combustion. Le but de l'utilisation de ces substances est de rendre le tabac plus addictif, et son initiation plus facile, ou de faciliter ainsi la poursuite de la consommation de tabac; ceci entre dans le cadre d'une grande concurrence entre les producteurs du tabac dont l'objectif est d'avoir plus de consommateurs. En effet, seuls les fabricants sont en mesure de préciser quels additifs

sont utilisés, et gardent ainsi leurs recettes secrètes pour avoir des produits plus attractifs. En règle générale, certains additifs comme les édulcorants et les arômes sont utilisés pour améliorer le goût de la fumée de tabac, tandis que d'autres peuvent aller plus loin en engendrant une dilatation des voies respiratoires (le cacao), permettant à la fumée de pénétrer plus facilement et plus profondément dans les poumons, pour assurer l'approvisionnement du corps par une grande quantité de nicotine. Du fait que cette dernière est mieux absorbée dans un milieu alcalin, d'autres produits ammoniaqués sont mis en jeu pour amplifier le taux de la nicotine dans l'organisme en augmentant le pH de la fumée (ASH, 1999).

4.4 Pharmacocinétique de la nicotine

La nicotine est dotée de la capacité de franchir les barrières hémato-tissulaires notamment la barrière hématoencéphalique, atteignant très rapidement le cerveau où elle exercera son effet psychoactif. L'absorption de la nicotine peut se produire à travers la cavité buccale, la peau, les poumons et le tube digestif. Cette absorption semble être pH dépendante. Son caractère dibasique peut amplifier son absorption dans les milieux alcalins en augmentant le taux de la nicotine libre non ionisée avec un caractère lipophile (Yildiz, 2004).

Une fois absorbée, la nicotine est rapidement métabolisée par le foie via le système cytochrome P450, en un certain nombre de métabolites majeurs et mineurs. En fait, la nicotine est métabolisée principalement par C-oxydation en cotinine, son métabolite majeur, et en faible quantité, concernant 10% seulement de la nicotine absorbée, par N-méthylation, et N-glucuronidation. De plus, la cotinine peut elle-même être métabolisée par hydroxylation en hydroxycotinine (Tricker, 2003). La demi-vie de la nicotine est relativement courte, et ne dépasse pas les 2 à 6 heures; ceci a rendu difficile son utilisation comme un marqueur précis de la quantité de la nicotine absorbée. D'autre part, la cotinine est le métabolite principal de la nicotine; elle possède une demi-vie plus longue d'environ de 15 à 17 heures, ce qui la qualifie à être le marqueur de choix pour suivre la prise de la nicotine (Boswell et al., 2000).

La nicotine pourrait être excrétée majoritairement dans les urines, mais aussi dans les selles, les sécrétions biliaires, la salive et la sueur. Seulement une faible proportion de la nicotine est éliminée intacte, alors que le reste subit une élimination sous formes

métabolisées. Il est à noter que l'élimination rénale de ces dernières peut être amplifiée par l'acide ascorbique (vitamine C). Elles ont été identifiées également chez des bébés de mères fumeuses, ceci vient confirmer la capacité de franchissement des barrières biologiques que la nicotine et ses métabolites en sont dotées. D'une autre part, le taux de la prise de nicotine chez une personne dépendante peut être influencé par le taux de l'élimination de cette dernière, en essayant de garder une nicotémie constante qui répond à ses besoins (Yildiz, 2004).

4.5 Mécanismes de l'induction de l'effet psychoactif et addictif par la nicotine (pharmacodynamique de la nicotine)

Une fois dans le cerveau, la nicotine agit dès lors en se liant aux récepteurs nicotiniques d'acétylcholine (nAChRs), en induisant une élévation de l'activité cérébrale en termes de mémorisation, concentration et activité motrice. Lors d'une consommation aiguë de tabac, les nAChRs deviennent de plus en plus désensibilisés et moins sensibles à la nicotine. Quand cette consommation devient chronique, un processus appelé up-régulation se développe, consistant en une augmentation du nombre des récepteurs, processus qui semble s'opposer à la désensibilisation des récepteurs. Ce phénomène de l'up-régulation des récepteurs nicotiniques semble être incriminé dans la dépendance et dans la difficulté à arrêter de fumer (Tweed et *al.*, 2012).

D'autres propriétés provoquant une dépendance de la nicotine sont attribuables à sa capacité d'augmenter la neurotransmission synaptique dans le système nerveux central (CNS), des neurones dopaminergiques mésolimbiques. Des récepteurs cholinergiques nicotiniques sont présents sur les corps cellulaires des neurones dopaminergiques dans le noyau accumbens. Les modulations de libération de dopamine dans le noyau accumbens, induite par la nicotine, conduisent à une augmentation de la production de dopamine (neurotransmetteur impliqué dans les récompenses naturelles après la nourriture, l'acte sexuel...etc), stimulent les structures de la récompense ou du plaisir et induisent ainsi une sensation de satisfaction, que les fumeurs prennent l'habitude à avoir (Arib, 2009).

4.6 Principales répercussions du tabac sur la santé

4.6.1 Tabac et cancers

La première étude mettant en évidence les liens entre l'usage du tabac et le cancer, remonte à 1950. Dès lors, les preuves scientifiques n'ont cessé de s'accumuler et désormais, la nature et l'ampleur du problème sont bien connues. Ainsi, on associe la consommation de tabac à 30% de tous les types de cancers, notamment le cancer des lèvres, de la cavité buccale, du pharynx et de la vessie, à l'exception du cancer de la peau ; et à 30% des décès par cancer et à 85% des cancers du poumon, le principal cancer où le tabagisme est en cause en premier lieu. En effet, plusieurs substances présentes dans la fumée du tabac, le goudron, le formaldéhyde, les nitrosamines, le Cd et le Pb et plusieurs autres substances sont tous connues pour leur potentiel cancérigène (Néron, 2005).

4.6.2 Tabac et maladies pulmonaires

L'exposition chronique à la fumée du tabac influence de diverses manières la structure et la fonction des voies respiratoires centrales et périphériques, des alvéoles, mais aussi des capillaires et du système immunitaire, induisant par la suite des pathologies pulmonaires allant des bronchites aiguës, asthmes et fibroses pulmonaires aux carcinomes bronchiques. La fumée du tabac induit une perte des cils de l'épithélium respiratoire, une hypertrophie des glandes muqueuses et une hyperplasie des cellules caliciformes (mucosécrétrices) de l'épithélium bronchique. De plus, une exposition des muqueuses à la fumée du tabac à répétition peut induire d'une manière progressive une réaction inflammatoire chronique de la muqueuse et de la sous-muqueuse bronchique. De même, les substances contenues dans la fumée de tabac peuvent générer des ROS qui peuvent être mis en cause dans des dommages locaux au niveau des voies respiratoires (Krüll et *al.*, 2008).

4.6.3 Tabac et maladies cardiovasculaires

Le tabagisme est responsable, au plan mondial, de plus de 10% de l'ensemble des décès d'origine cardiovasculaire. Non seulement le tabagisme actif, mais aussi une exposition passive à la fumée de tabac peut engendrer une telle pathologie. L'athérosclérose est la principale cause de la survenue d'un infarctus du myocarde. Une

obstruction des vaisseaux sanguins est consécutive à la formation de plaques d'athérome à partir de la fraction du cholestérol liées à des lipoprotéines à faible densité (LDL) après leur oxydations par des ROS, ce qui risque de diminuer progressivement l'apport du sang à une région du myocarde et de favoriser une ischémie locale qui se traduit plus tard par un trouble cardiaque. En fait, l'effet du tabagisme dans ce cas est double. Il s'associe à la fois à une hypercholestérolémie et à une génération des ROS qui peuvent induire une oxydation du LDL favorisant par la suite une athérosclérose. De plus, une augmentation de l'activité thrombocytaire, avec une augmentation de la viscosité sanguine, une atteinte des cellules endothéliales avec diminution consécutive de la sécrétion de prostacycline et de monoxyde d'azote, induisant une perte d'élasticité vasculaire, peuvent également être la cause de maladies cardiovasculaires chez les fumeurs (Krüll et *al.*, 2008).

4.6.4 Tabac et reproduction

Du fait des effets du tabagisme sur le déroulement de la grossesse, notamment les fausses couches spontanées, la rupture prématurée des membranes, le retard de croissance intra-utérine...etc, la relation entre le tabac et la fertilité a concerné les femmes en premier lieu, dont nombreuses études en font l'objet et mis en évidence l'existence d'une relation négative entre tabac et la fertilité féminine spontanée ou dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation. Des composants toxiques de la fumée de cigarette, comme la cotinine, le cadmium, le peroxyde d'hydrogène qui peuvent engendrer des effets cytotoxiques sur le stock ovocytaire, sont retrouvés dans le liquide folliculaire des femmes fumeuses. Ces dernières ont présenté également un profil hormonal perturbé, et un délai nécessaire à concevoir augmenté. Quant à l'homme, les études moins nombreuses effectuées à cet égard montrent également un allongement du délai nécessaire à concevoir. Ceci, est dû principalement à des pathologies touchant la qualité du sperme, dont essentiellement des pathologies du nombre (oligospermie), de la mobilité (asthénospermie), de la forme (téatospermie) et de l'ADN des spermatozoïdes, qui ont constitué les principales observations lors de l'exploration des infertilités chez les fumeurs. En outre, ces pathologies étaient en association, dans la plupart du temps, à la présence des marqueurs de stress oxydatif dans le sperme (Sépaniak et *al.*, 2006).

De ce fait, il s'est avéré essentiel de réaliser d'autres études à l'égard des infertilités masculines liées au tabagisme, pour élucider quels sont, en réalité, les mécanismes par

lesquels la qualité du sperme est altérée consécutivement à la consommation du tabac. En effet, ces études devraient être plus approfondies, et dans un spectre plus large incluant ainsi le fonctionnement des organes génitaux, la régulation hormonale de ceux-ci, et les différents mécanismes physiopathologiques qui peuvent expliquer la survenue des infertilités, conduisant par conséquent à améliorer la prévention et le traitement.

Partie expérimentale

Chapitre III :Matériel et Méthodes

« Ce chapitre décrit entièrement et d'une manière détaillée, la démarche que nous avons suivie lors de la réalisation de ce travail. Le traitement des animaux, le prélèvement des échantillons et les différents protocoles, sont tous décrits en détail afin de permettre la reproduction de notre travail. Les limites et les obstacles qui nous ont empêchés de compléter toutes les démarches qui ont été envisagées sont également expliqués ».

1. Objectif du travail

La présente étude consiste en une évaluation des effets des alcaloïdes totaux du tabac (ATT) sur la fonction de la reproduction chez le rat mâle, en essayant de déterminer la nature, les sites et les mécanismes d'induction de la reprotoxicité. Ensuite, une approche préventive vis-à-vis des répercussions de l'exposition aux ATT sur la fertilité masculine en utilisant la fraction d'acétate d'éthyle (FAE) de l'extrait de thé vert.

2. Matériel utilisé

2.1 Matériel végétal

Les échantillons de tabac et de thé vert utilisés au cours de cette étude ont été préparés à partir des produits destinés à la consommation qui sont vendus localement. La poudre du tabac est préparée à partir du contenu des cigarettes après les avoir déchirés. Les cigarettes choisies sont de marque « RYM »; la marque de référence de la production nationale algérienne. Quant au thé, une marque très réputée au Sahara algérien pour sa bonne qualité, c'est le thé vert qui a été choisi pour l'extraction des substances bioactives antioxydantes. La marque porte le nom de « elrakim », numéro de Lot: « **ZJ415414332** », importé Chine.

2.2 Animaux

Le rat de laboratoire, comme c'est le cas dans la plupart des expériences toxicologiques, a constitué l'animal de choix pour notre étude. Les rats sont les espèces les plus largement utilisées en raison de leur taille manipulable, de leur disponibilité, de leur prix raisonnable, ainsi que pour leur cycle reproducteur assez court.

Des couples de rats de souche WISTAR, espèce *Rattus norvigecus* obtenus de l'animalerie de l'université de Mascara ont été utilisés pour la production d'un nombre suffisant de rats mâles nécessaire pour l'étude expérimentale. L'élevage et les expérimentations ont été réalisés au niveau de l'animalerie de la Faculté des sciences exactes, Université Djillali Liabès UDL, Sidi bel Abbès.

Les conditions d'hébergement (température: 22-24°C, photopériode 12/12), d'alimentation et de reproduction des animaux de laboratoire impliqués ont été

strictement suivies en se référant aux manuels et aux ouvrages disponibles et qui expliquent en détail, les démarches à suivre lors des expérimentations sur les rats.

Lors de notre travail à l'animalerie, nous avons tiré profit d'un aliment à base de maïs pour l'alimentation des animaux tout au long de la période d'élevage et d'expérimentation.

Il est important de mettre l'accent sur un sérieux problème auquel nous pouvons être confrontés en manipulant des animaux de laboratoire, se résume dans la probabilité de contracter des infections ou des allergies aux animaux. Le respect des conditions de protection personnelle et des précautions particulières lors de la manipulation de ces animaux devrait minimiser ces risques.

2.3 Principaux instruments de laboratoire

Le présent travail, réalisé au niveau du laboratoire de biotoxicologie et de du laboratoire de biochimie végétale, Faculté des sciences de la nature et de la vie UDL SBA, nécessitait l'utilisation d'une série de matériel et des automates pour la réalisation des différents tests, tels que le système HPLC, le spectrophotomètre...etc. (tableau 2).

2.4 Produits chimiques

Une série de produits chimiques essentiellement des solvants organiques, des solutions tampon, des kits pour le dosage des hormones, ainsi que d'autres solutions de réaction chromogène qui développent une coloration en réagissant avec les substances recherchées dans les échantillons en formant une substance chromophore dont la densité optique est mesurable par spectrophotométrie, ont été utilisés. Par ailleurs, une deuxième série de colorants a été également employée lors de l'analyse cytologique et histologique pour mettre en évidence la structure cellulaire et tissulaire.

NB : Parmi les produits utilisés, un grand nombre présente un risque plus au moins important d'intoxication par différentes voies. Il est très important pour le manipulateur de prendre toutes les mesures de précaution lors de leur utilisation. Du fait que l'utilisation de petites quantités contenues dans des flacons autres que les originaux, peut amoindrir la connaissance des risques liés à l'utilisation de ces substances, et en prenant en considération les accidents auxquels nous avons été confrontés.

Tableau 2 : Liste du principal matériel utilisé lors de la réalisation des expérimentations.

Matériel	Référence
Broyeur	IKA. A11 Basic
Evaporateur rotatif (rotavapor)	LABOROTA 4000
Soxhlet	Behr. Abor-technik
Système HPLC	AGILENT 1200
Spectrophotomètre	Thermo-spectronic UVB 111801
Balance de précision	RADWAG AS (220) C2 series
Centrifugeuse	Centirion SientificC2 series
Balance digitale	Sartorius
pH mètre	INOLAB
Système d'Immuno-essai par Chimiluminescence (CLIA)	MALGUMI1000
Analyseur ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)	VIDAS ®

3. Méthodes

Cette partie consiste en une étude expérimentale multiparamétrique qui comprend une évaluation de la qualité du sperme, de la structure histologique des gonades, des taux sériques des hormones sexuelles, et des marqueurs du stress oxydatif dans le plasma et dans les organes sexuels, après une période d'exposition aux ATT et aux substances bioactives extraites à partir de thé vert après avoir fait au préalable une étude phytochimique visant à optimiser leur pouvoir antioxydant.

3.1 Étude phytochimique

3.1.1 Extraction des alcaloïdes totaux du tabac

Comme les alcaloïdes se trouvent le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques, la première étape de leur extraction consiste à favoriser une précipitation des sels d'alcaloïdes en milieu acide. L'alcalinisation du milieu libère les alcaloïdes des liaisons qu'ils avaient, et en devenant libres, ces derniers vont perdre leur polarité et deviennent plus solubles dans les solvants apolaires ou à polarité diminuée. Le chloroforme qui est à la fois non miscible à l'eau et apolaire, va assurer par la suite une rétention des alcaloïdes totaux sous formes libres.

3.1.1.1 Mode opératoire

Les alcaloïdes totaux du tabac sont extraits à chaud à partir de la poudre du tabac des cigarettes broyées. L'extraction est réalisée par Soxhlet avec 200mL d'éthanol absolu pendant 5h (Figure 17), en se référant au protocole décrit par Harbone, 1998.

Les extraits éthanoliques sont par la suite évaporés sous vide à 40°C au rotavapor. Les résidus secs sont reconstitués en 20mL de chloroforme et acidifiés par l'acide chlorhydrique (HCl) à 5% jusqu'au pH 3. Après quoi, ils sont laissés en incubation à



Figure 17: Préparation de l'extrait total du tabac par un système de Soxhlet multipostes.

température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Après la séparation des deux phases, la phase superficielle acide est mélangée avec 20ml de chloroforme, puis le pH est justifié à nouveau jusqu'au pH 9 par le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à 5%. Après une deuxième incubation dans les mêmes conditions pendant 15 minutes, la phase chloroformique est évaporée sous vide à l'aide du rotavapor avec l'utilisation combinée d'une pompe à vide. Enfin, les résidus secs, constitués par les alcaloïdes totaux, sont récupérés (Figure 18).

3.1.2 Extraction des phénols totaux et préparation des fractions à partir de thé vert

Après avoir effectué un broyage des échantillons, visant l'augmentation de la surface de contact avec le solvant, la poudre est immergée dans ce dernier sans aucun réchauffement pendant une période prolongée. Ceci va permettre la dissolution des substances solubles dans le solvant approprié. La macération a pour but principal la conservation des principes actifs intacts lors de l'extraction. L'étape suivante consiste à séparer les constituants du « totum » obtenu par la macération, en utilisant une série de solvants organiques à un degré de polarité croissant. Les différentes substances vont être séparées selon leur degré de polarité, de manière que chaque solvant retient les molécules possédant une polarité proche de la sienne.

3.1.2.1 Mode opératoire

3.1.2.1.a) Préparation de l'extrait total 'totum' par macération

L'extraction des phénols totaux (PT) est effectuée par une triple macération avec du méthanol à 80% suivant la méthode de Stocker et *al.*, 2004. Pour ce faire, 100g de poudre de thé vert est homogénéisée dans 200mL d'éthanol (80%) et macérée pendant 24h à température ambiante et à l'obscurité. Cette même procédure est répétée trois fois pour assurer un bon rendement en fin de l'extraction. Après filtration par papier Wathman à 0,5 μm , les trois extraits éthanoliques sont mélangés, homogénéisés puis évaporés sous vide à 40°C (Figure 19). Après quoi, le résidu sec est reconstitué dans 200mL d'eau distillée, puis purifié deux fois avec de l'éther de pétrole (v/v) à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase aqueuse purifiée est enfin récupérée après séparation des deux phases (Figure 20).

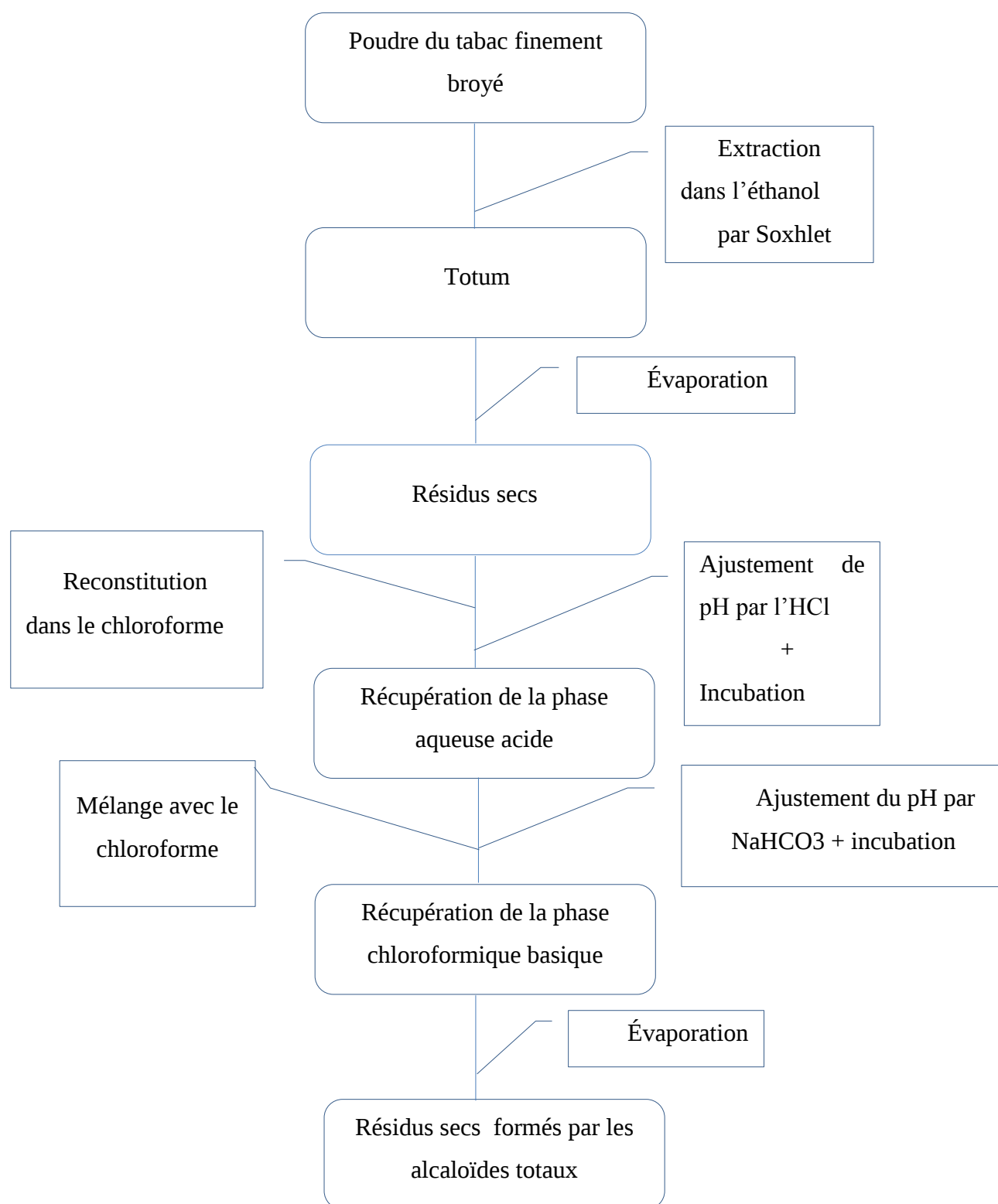


Figure 18 : Diagramme récapitulatif de la procédure d'extraction des alcaloïdes totaux.

3.1.2.1.b Préparation des fractions de chloroforme, d'acétate d'éthyle et de n-butanol

L'élution des substances du « totum » se fait par une succession de décantations de la phase aqueuse préalablement préparée avec des solvants organiques avec un degré croissant de polarité. Dans la présente étude, nous avons utilisé le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol selon l'ordre mentionné. Après avoir mélangé la phase aqueuse (v/v) avec chaque solvant, le mélange est laissé se fractionner à l'obscurité, et les deux phases sont ensuite séparées. Les différentes fractions sont par la suite évaporées sous vide à 40°C pour éliminer les solvants, et les résidus secs sont enfin récupérés (Benhammou et *al.*, 2009). Les rendements (R) sont calculés selon la formule suivante :

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

3.1.3 Dosage des phénols totaux

Le réactif de Folin-Ciocalteu d'une couleur jaune, est composé par un mélange de deux acides : l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). En présence des PT dotés d'une capacité réductrice lors de la réalisation du test, ces deux acides vont être réduits en deux substances chromogènes qui donnent au mélange une couleur bleu. L'oxyde de tungstène et de molybdène issus successivement de l'acide phosphotungstique et de l'acide phosphomolybdique génèrent une coloration bleu proportionnelle à la concentration de PT présents dans le mélange. Le spectre de la lecture est compris entre 725 et 765 nm. L'acide gallique utilisé pour l'élaboration de la gamme d'étalonnage réagit de cette même façon. Si l'intensité de la couleur dépasse cette gamme, une dilution de l'échantillon est nécessaire pour pouvoir procéder à l'analyse spectrophotométrique. Après quoi, le résultat doit être multiplié par le facteur de dilution.

3.1.3.1 Mode opératoire

Le contenu en composés phénoliques est déterminé par l'analyse colorimétrique suivant la méthode de Foline-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi, 1965. 200µL de chaque extrait est ajouté à un mélange contenant 1mL du réactif de Foline-Ciocalteu dilué à 1/10 avec de l'eau distillée (1v/9v) et 0.8mL d'une solution de carbonate de sodium à

7.5%. Après ceci, le tout est incubé pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance (ABS) est lue par un spectrophotomètre à 765 nm contre un blanc contenant la même composition à l'exception des échantillons, qui sont remplacés par 200 μ L de méthanol. L'acide gallique est utilisé pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont ensuite exprimés en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme de résidu sec.



Figure 19 : Elimination des solvants par le rotavapor combiné à une pompe à vide.

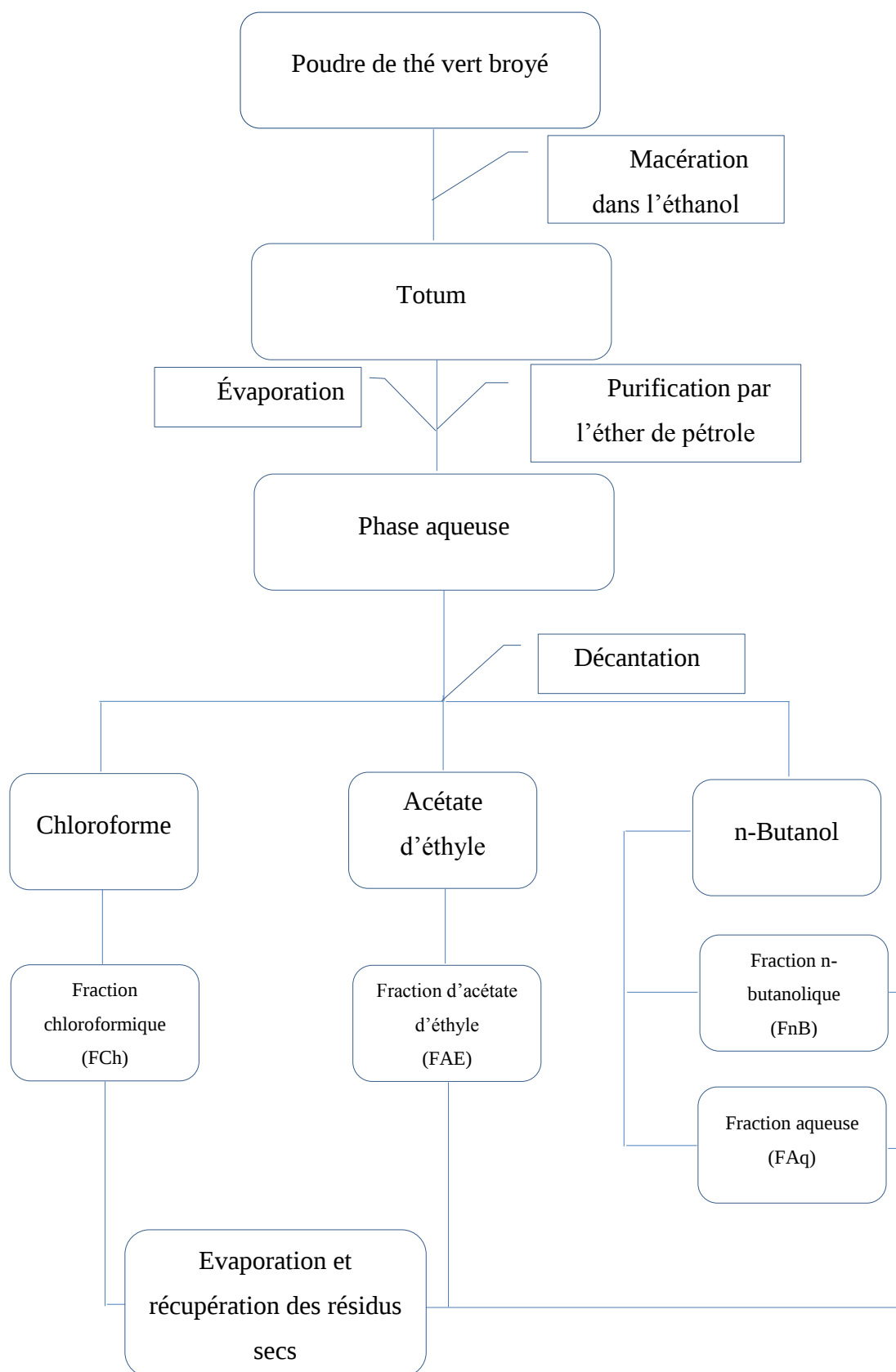


Figure 20 : Diagramme récapitulatif de l'extraction et de la préparation des fractions de l'extrait de thé vert.

3.1.4 Dosage des flavonoïdes

Le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH) utilisés lors de cette expérience vont former des liaisons avec les groupements hydroxyles des flavonoides aboutissant à la génération d'une coloration jaune (AlCl_3) et rose (NaOH). La solution devient rosâtre en fin d'expérience, et l'ABS est lue à 510 nm.

3.1.4.1 Mode opératoire

Des solutions méthanoliques sont préparées à partir de chaque fraction à raison de 1mg/mL. De chaque solution, 500 μL est ajouté à 1500 μL d'eau distillée. 150 μL de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5% est ensuite ajouté, et le mélange est mis en incubation pendant 5 min à l'obscurité et à température ambiante. L'étape suivante consiste à ajouter 150 μL de AlCl_3 à 10% et à réincuber le tout dans les conditions précédemment mentionnées durant 6 min. En fin, 500 μL NaOH à 4% est additionné au mélange, et la lecture est tout de suite réalisée. Par ailleurs, la courbe d'étalonnage est réalisée par la catéchine, utilisée comme standard, à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme d'échantillon (Zhishen et *al.*, 1999).

3.1.5 Evaluation de l'activité antioxydante

Le radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) présent en poudre noir va prendre une couleur violette après dissolution dans le méthanol. L'ajout des antioxydants à cette solution va réduire les radicaux libres en DPPH-H d'une couleur jaune. La décoloration de la solution ou la migration de la couleur violette vers la couleur jaune est proportionnelle à la concentration et au potentiel réducteur des échantillons. L'ajout des échantillons au même volume et à la même concentration va permettre donc une évaluation uniquement du potentiel réducteur. Pour vérifier la réactivité de la solution, l'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif.

3.1.5.1 Mode opératoire

Pour évaluer l'activité antioxydante et orienter le choix pour l'étude *in vivo* ; 3 mg de l'extrait total de thé vert (éthalonique) et de chacune de ses fractions, sont dilués dans le méthanol à des concentrations décroissantes et 10 μL de chaque dilution sont ensuite additionnés à 1990 μL d'une solution de la DPPH à 0,025 mg/mL. Après une incubation de 30 minutes, à l'obscurité et à température ambiante, la diminution d'ABS est mesurée

à 517nm, contre un témoin positif de la DPPH (Liu et *al.*, 2007). Le pourcentage de l'inhibition est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{(\text{ABS blanc} - \text{ABS échantillon})}{\text{ABS blanc}} \times 100$$

La concentration minimale d'inhibition de 50% de la DPPH (CI50) est calculée graphiquement à partir des courbes de tendance linéaire, puis utilisée pour la comparaison de l'activité antioxydante des différents échantillons.

3.1.6 Analyse qualitative de la fraction d'acétate d'éthyle par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Le système HPLC contient essentiellement un réservoir d'une ou de plusieurs phases mobiles polaires ; une pompe qui assure le passage de cette phase à travers une colonne qui contient une phase stationnaire apolaire. À l'issue de la colonne, un détecteur couplé à un système d'enregistrement va permettre la détection et le traçage des pics suite à la traversée du détecteur par les molécules de l'échantillon, aboutissant à l'enregistrement d'un chromatogramme.

Les échantillons sont injectés dans la phase mobile, puis l'ensemble va traverser rapidement la phase stationnaire contenue dans la colonne grâce à la pression exercée par la pompe. Les constituants du mélange, selon leur polarité, vont traverser la phase stationnaire séparément à mesure que les molécules les plus polaires auront un temps de rétention plus court, et passent rapidement, alors que les molécules les moins polaires ou apolaires seront retenues lors de la traversée de la colonne, et se déplacent toutes moins vite.

3.1.6.1 Mode opératoire

L'analyse de la FAE, du fait qu'elle avait l'activité antioxydante la plus importante, et qui a été choisie de ce fait pour l'étude *in vivo*, est effectuée selon la méthode de

Fernández et *al.*, 2000, en utilisant un système HPLC « Agilent 1200 », avec une colonne C18 (250 millimètres de $\times$ 4.6 millimètres, 5.0 μ m) (Figure 21).

Tous les solvants utilisés lors de la préparation des échantillons et des phases mobiles étaient grade HPLC. La préparation des échantillons constitue une étape indispensable à l'analyse, à mesure que ces échantillons sont fortement dilués dans des solvants grade HPLC seulement, puis soigneusement filtrés avant d'être injectés. L'élution est faite suivant un gradient de pression de deux solutions constituant la phase mobile dans la colonne à un débit de 1 mL/min. La première solution (a) est composée de l'eau distillée, l'acétonitrile et l'acide formique à raison de (94.7+4.3+1 v/v) respectivement, alors que la deuxième solution (b) contient la même composition mais à des proportions différentes (49.5+49.5+1 v/v). La phase mobile commence à 90% (a) et 10% (b), suivie par une augmentation de la proportion de la solution (b) dans la phase mobile à 30% (b) pendant 10 min. Enfin, nous avons procédé à une augmentation linéaire de la proportion de la solution (b) jusqu'à 80% pendant 5 minutes.



Figure 21 : Système HPLC utilisé pour l'identification des composants de la FAE.

3.2 Traitement des animaux

3.2.1 Préparation des extraits

Les ATT, et la FAE sont préparés dans de l'eau distillée après avoir ajouté quelques gouttes d'éthanol (50µL), pour stimuler la dissolution des ATT. Le véhicule des différents extraits est administré aux rats témoins à fin d'éliminer tout éventuel effet lié au véhicule lui-même (figure 22). Les quantités préparées sont conservées à 4 C°. Après l'épuisement de ces dernières, de nouvelles solutions sont préparées.

3.2.2 Choix de la méthode d'administration

Dans la présente étude, nous avons utilisé des rats mâles WISTAR pour les raisons précédemment mentionnées. Cependant, sur le plan anatomique, les rats n'ont pas la même anatomie des voies respiratoires que l'homme (les rats possèdent une respiration purement nasale). Ceci rend leur utilisation pour évaluer les effets toxiques du tabac par inhalation non extrapolable chez l'homme. De plus, la fumée de cigarette contient un très grand nombre de substances toxiques qui peuvent induire ou amplifier la reprotoxicité. Pour que les résultats auxquels nous allons aboutir soient liés seulement aux alcaloïdes, notamment la nicotine qui constitue plus que 90% de l'ensemble de ces derniers, et généralisés sur les différents modes de consommation du tabac, nous nous sommes proposé d'administrer l'extrait du tabac par gavage à mesure que les animaux seront exposés aux alcaloïdes seulement. Pour le thé vert, l'administration par gavage ressemble au mode de consommation chez l'homme.

3.2.3 Répartition des animaux

Un groupe de rats mâles de souche WISTAR, d'un nombre de 30, d'un âge moyen de deux mois et d'un poids moyen de $309,90 \pm 23,89$ g sont répartis sur six lots homogènes (N=5). Les animaux du groupe1 (G1) et du groupe2 (G2) ont reçu par gavage pendant 30 jours les ATT à raison de 2,5 et 5 mg/Kg de poids corporel respectivement. Quant aux animaux du 3^{ème} et du 4^{ème} groupe (G3, G4), ils sont traités par les ATT aux mêmes doses, combinés à la FAE à raison de 50mg/Kg de poids corporel pour les deux groupes. Les rats du 5^{ème} groupe sont traités uniquement par la FAE en vue d'une constatation de l'effet de thé vert seulement, alors que les rats témoins (G6) ont reçu le véhicule des différents extraits (Tableau 3).



Figure 22 : Préparation des solutions pour le traitement des rats. (a) extrait de thé vert, (b) extrait de tabac.

3.2.4 Hébergement et traitement des animaux

Les animaux sont hébergés dans l'animalerie au niveau de la Faculté des sciences exactes, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès, dans des cages appropriées, désignées spécialement pour des rats de laboratoire. Tout au long de la durée d'expérimentation, les animaux avaient un accès libre à l'alimentation et à l'eau du matin après le traitement jusqu'à la nuit. Les animaux ont été traités suivant les réglementations du traitement des animaux de laboratoire. Les conditions de la température, de la photopériode, et d'hygiène sont soigneusement respectées. Cependant, l'humidité n'a pas été contrôlée.

Les traitements sont effectués le matin de bonne heure avant la présentation de l'alimentation et après avoir pesé les animaux et calculé les volumes à administrer à partir des solutions préparées par mesure de ne pas dépasser les 2 mL comme volume total d'administration.

Tableau 3 : Liste des traitements avec les différents extraits et leur véhicule.

Groupes de rats	Traitements
G1 (N=5)	ATT 2,5mg/Kg
G2 (N=5)	ATT 5mg/Kg
G3 (N=5)	ATT 2,5mg/Kg + FAE 50mg/Kg
G4 (N=5)	ATT 5mg/Kg + FAE 50mg/Kg
G5 (N=5)	FAE 50mg/Kg
G6 (N=5)	Témoin (50µL éthanol dans 100mL eau distillée)

3.2.5 Anesthésie et sacrifice

A l'issue des 30 jours de traitement, les rats sont sacrifiés au niveau du laboratoire de biologie de développement, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès. L'anesthésie est effectuée par voie respiratoire en provoquant les animaux au chloroforme sous une cloche. Le sacrifice est effectué après un jeûne de 12 heures sur une plaque à dissection (Figure 23). Après quoi, le sang est prélevé par ponction cardiaque et récupéré dans des tubes EDTA et des tubes secs (Figure 24), et les organes génitaux sont ensuite prélevés et rincés à l'eau physiologique (NaCl à 0,9%), puis pesés. Le sang est centrifugé, puis le sérum et le plasma sont récupérés dans des tubes épindorffs. Les échantillons sont conservés à -20 °C en vue de la réalisation des analyses biochimiques et hormonales. Les organes désignés à l'étude histologique sont conservés dans le formol à 10%, et le reste est congelé à -20 °C pour réaliser les autres analyses.

3.3 Exploration des effets du tabac et de thé vert sur la fonction reproductrice

3.3.1 Le spermogramme

Les échantillons du sperme sont prélevés par des micropipettes après incision de la partie distale de la queue épидидymaire. Le sperme est récupéré par la suite dans des tubes épindorffs et dilué par différentes solutions suivant le test à réaliser (Oyeyemi et *al.*, 2008).

Dans cette partie, nous avons évalué le nombre, la mobilité et la viabilité des SPZ. En premier temps, le nombre des SPZ est calculé à l'aide d'une cellule Thoma, après que les SPZ sont colorés au bleu de Trypan à 5% et immobilisés par le liquide de Dasie (10mL de formol à 40% et 990mL de citrate de sodium à 3%) (Dussault, 2009). Le calcul est effectué comme l'indique la fiche technique des cellules de Thoma (Annexe A) selon la formule suivante sous microscope optique au grossissement $\times 400$:

$$\text{Nombre SPZ} = (\text{Nombre calculé sur 5 carrés moyens} / 5) \times \text{facteur de dilution} \times 250000$$

En ce qui concerne la prise en considération des éléments trouvés sur les extrémités des carrés, seulement ceux qui sont à cheval sur la lisière du haut et de la droite sont comptés, alors que les autres sont négligés. La mobilité est ensuite mesurée après le traitement des échantillons par une solution de citrate sodique à 2,9% et la coloration par le bleu de Trypan. Un nombre de 200 SPZ est suivi lors de chaque test. La mobilité est exprimée en (%) de SPZ mobiles par rapport au nombre total observé. Quant à la vitalité, après une fixation au formol à 9% et une coloration à l'Éosine-Nigrosine, un nombre de 200 SPZ est évalué. La coloration mentionnée ci-dessus est basée sur le principe de la perméabilité des SPZ morts à l'éosine (membranes plasmiques lésées), qui vont prendre une couleur rose, alors que les SPZ vivants ne prennent aucune couleur. A ce moment, la nigrosine va assurer un fond sombre au frottis pour bien permettre de faire une distinction entre ces deux catégories (Figure 25).

3.3.2 Etude histologique

Cette étude a pour but la mise en évidence des altérations histologiques des gonades visant l'évaluation de l'effet toxique du tabac sur le plan histologique. Les coupes sont réalisées suivant les techniques classiques de la préparation des coupes histologiques au niveau du laboratoire de l'anatomopathologie, Centre hospitalo-universitaire (CHU) Abdelkader hassani, Sidi Bel Abbès.

3.3.2.1 Technique

Pour rendre visible ce que l'on veut observer, il est nécessaire de suivre un long protocole qui requiert plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, et enfin le montage. Ceci va aboutir à des coupes très fines et bien colorées qui sont ensuite

observées au microscope optique afin de réaliser une évaluation précise à différents grossissements.

3.3.2.2 La fixation

Cette étape vient juste après le prélèvement des organes à étudier, et elle a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces pour faciliter la réalisation des coupes. Après leur prélèvement, les organes sont rincés à l'eau physiologique puis complètement immergés dans le fixateur (Formol à 10%) à mesure que ce dernier recouvre complètement les organes pour au moins 48 heures. Elle se fait dans des récipients spécifiques à cette opération (Figure 26).

3.3.2.3 L'inclusion

Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme ceci est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion des cassettes contenant les organes dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans la paraffine fondue. Après le refroidissement de la paraffine, un bloc dur de paraffine contenant le prélèvement est formé.

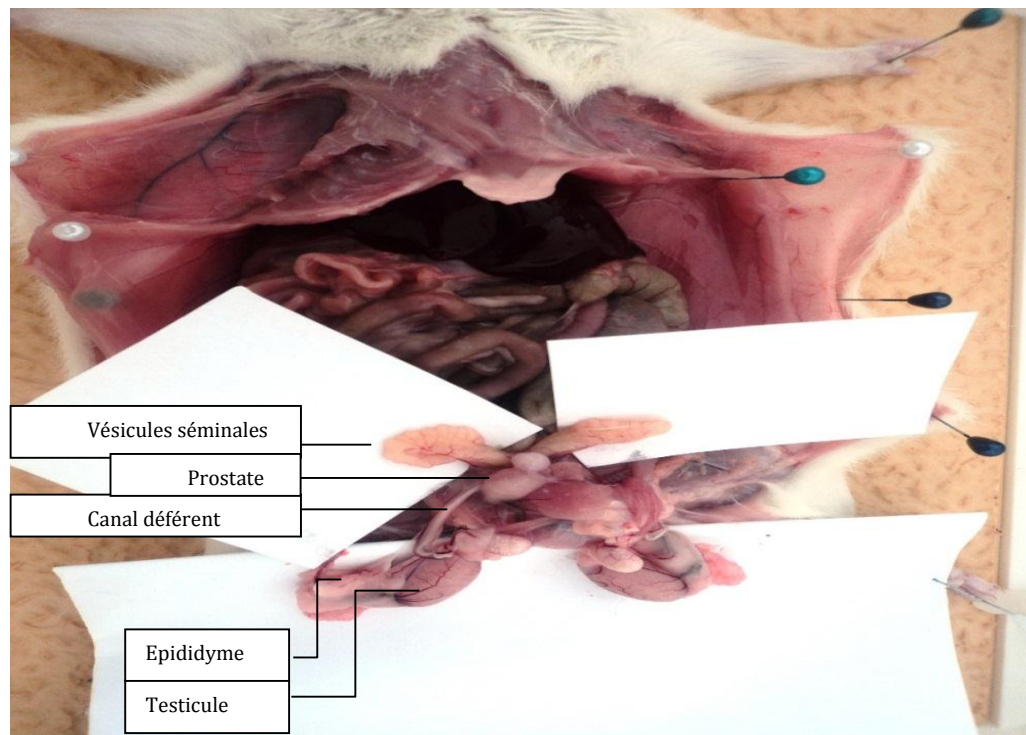


Figure 23 : Sacrifice des rats et mise en évidence des organes génitaux.



Figure 24 : Technique de prélèvement du sang par ponction cardiaque.

3.3.2.4 La réalisation des coupes

A partir de ce bloc, des coupes semi fines d'un diamètre de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome couplé à un bain marie d'une température de 40C⁰ qui sert à la réception des coupes. Ces coupes sont ensuite récupérées sur des lames en verre.

3.3.2.5 La coloration

Les coupes histologiques doivent tout d'abord subir une réhydratation avant de passer à la coloration où Il s'agit d'une coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E). L'hématoxyline est un colorant basique qui donne une couleur bleu foncé aux substances acides basophiles des cellules et tissus, notamment la chromatine contenant de l'ADN, et

le cytoplasme qui est partiellement coloré grâce à l'ARN contenu dans les ribosomes. L'éosine est un colorant acide qui donne une couleur rose aux substances acidophiles telles que les protéines basiques, les fibres de collagène du tissu conjonctif...etc.



Figure 25 : Observation microscopique d'un frottis de sperme de rat coloré à l'éosine-nigrosine.

3.3.2.6 Le montage des lames

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degrés croissants puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle par de la résine synthétique. Dès lors, les lames sont protégées, les échantillons ne s'abîmeront pas, et l'utilisation prolongée de ces lames est assurée. Une série d'observations microscopiques sont donc réalisées afin de mettre en évidence les différentes altérations de la structure histologique.



Figure 26 : Fixation des organes pour l'étude histologique.

3.3.3 Analyses biochimiques

3.3.3.1 Evaluation de l'activité antioxydante totale du plasma sanguin et des homogénats tissulaires

L'activité antioxydante totale du plasma sanguin et des homogénats des testicules et des épидидymes est évaluée par la technique de FRAP (ferric reducing antioxidant power) (Benzie et Strain, 1996). À un pH acide, le complexe fer ferrique (Fe^{3+}) 2,4,6-tripyridyl-striazine (FeIII-TPTZ) est réduit en présence des antioxydants à la forme ferreuse (FeII-TPTZ), et une couleur bleue se produit par la suite. L'ABS est mesurée à 593nm contre un blanc dans lequel les échantillons sont remplacés par de l'eau distillée.

3.3.3.1.a) Mode opératoire

Le réactif de FRAP est préparé en mélangeant la solution tampon d'acétate de 300 mmol/L, et d'un pH de 3.6 avec une solution de TPTZ (10 mM en 40mM HCl), et une solution de trichlorure de fer (FeCl_3) de 20mmol/L suivant un volume ratio de 10:1:1 respectivement pour les trois solutions. Le réactif de FRAP est préincubé à 37 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 100 μl du plasma ou de l'homogénat tissulaire (dilué 1:1 avec de

l'eau distillée), est ajouté à 900 µl du réactif de FRAP. Le mélange est ensuite incubé pendant 25 minutes à 37 °C. L'ABS est mesurée à 593nm contre le blanc. En outre, une solution de FeII (FeSO₄. 7H₂O) est employée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.

3.3.3.2 Dosage des TBARS

La méthode TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) est utilisée pour mesurer les substances réactives à l'acide tiobarbiturique (ATB) qui sont des produits du stress oxydatif notamment de la peroxydation lipidique. Le produit final de cette dernière est les MDA qui résultent de la dégradation des AGPI par les ROS. Ces substances vont former un complexe avec l'ATB (MDA-ATB) générant une couleur rose dont l'intensité est proportionnelle aux MDA présents dans les échantillons.

3.3.3.2.a) Mode opératoire pour les TBARS plasmatique

100µL de plasma dilué dans le le NaCl 0,9% à 1/10, est additionné à 1mL de ATB précédemment préparé dans une solution contenant 15% d'acide trichloracétique (TCA), et 0,375% ATB dans l'HCl 0,5N. Un antioxydant, le hydroxytoluène butylé (HTB) est préparé dans le méthanol à raison de 2%, puis 20 µL de cette solution est ajouté au mélange pour inhiber toute oxydation supplémentaire lors de la réalisation du test. L'ensemble est ensuite incubé à 85 °C pendant 30 min dans un bain marie. Après refroidissement des échantillons à l'eau glaciale, le changement de la couleur est mesuré à 535 nm contre l'eau distillée utilisée comme blanc. Une solution des MDA à différentes concentrations est utilisée pour la préparation de la courbe d'étalonnage (Buege et Aust, 1978).

3.3.3.2.b) Mode opératoire pour les TBARS tissulaires

Pour chaque gramme de tissu, 8mL de TCA à 5%, et 5mL de BHT dans l'hexane (8%), sont préparés dans un tube en plastique (Figure 27). Le tout est ensuite homogénéisé au vortex pendant 30 seconds, puis centrifugé à 3000g pendant 30 minutes. Après quoi, la phase superficielle de l'hexane est éliminée et le reste est complété jusqu'à 10 mL par le TCA à 5%. Enfin, 2,5mL de cette solution est mélangé avec 1,5mL d'ATB préparé dans l'eau distillée à 0,8%, puis incubé à 100 °C pendant 30 min. Après refroidissement, l'ABS est lue à 521 nm contre un blanc contenant la même composition

à l'exception des échantillons (Figure 28). Une deuxième courbe d'étalonnage est préparée par des solutions de MDA suivant ce même protocole (Botsoglou et *al.*, 1994).



Figure 27 : Préparation des homogénats tissulaires de l'étude biochimique.

Les courbes d'étalonnages des différentes analyses spectrophotométriques sont classées dans l'annexe B.

3.3.3.3 Dosage des hormones sexuelles

3.3.3.3.a) Dosage de FSH et LH

Le dosage de la FSH et de la LH est réalisé au niveau d'un laboratoire privé, sur le sérum précédemment conservé, en utilisant des kits VIDAS ®, et un système automatisé qui assure l'ensemble des étapes jusqu'à l'édition des résultats (Figure 29). Les codes donnés aux échantillons sont introduits dans un logiciel qui contrôle le fonctionnement de l'automate selon leur emplacement. Le dosage est effectué par la technique immunoenzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (ELFA). Les kits contiennent des cônes et des cartouches prêts à l'utilisation.



Figure 28 : Analyse spectrophotométrique des TBARS.

Les cônes sont à usage unique et servent à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche. Après l'emplacement des cônes et des cartouches, le premier puits vide est rempli au début du test par 200 μ L de sérum. Toutes les étapes du test sont ensuite automatiquement réalisées. Il s'agit d'une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel. Les substances à doser (FSH, LH) dans les échantillons vont entrer en compétition avec les mêmes substances conjuguées à la phosphatase alcaline qui sont contenues dans les cartouches pour se lier aux anticorps fixés sur la paroi interne des cônes. Ensuite, des étapes de lavage éliminent les composés non fixés. Lors de l'étape finale, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône. L'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit fluorochrome (4-Méthyl-ombellifère) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. L'intensité de la fluorescence est donc inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon. A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée.

3.3.3.3.b) Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone est réalisé dans le même laboratoire en utilisant des kits MAGLUMI (CLIA) et un analyseur MAGLUMI1000, qui assure toutes les étapes automatiquement et incluant le prélèvement de l'échantillon.

Le dosage immuno-luminométrique est basé sur une compétition entre les échantillons liés à des anticorps marqués avec une substance réactionnelle, et la testostérone purifiée liée à des anticorps d'un autre marquage. L'ajout de 40 μ L des échantillons à un mélange contenant la testostérone purifiée conjuguée aux anticorps et des microbilles nano-magnétiques, sur lesquels ce complexe est fixé, va créer une compétition entre les deux complexes. Après une incubation, le mélange est soumis à un champ magnétique qui va permettre la sédimentation des microbilles. Le surnageant est ensuite éliminé et les substrats sont ajoutés. La réaction chimique entre les substrats et la substance réactionnelle va créer une chimiluminescence par un photomultiplicateur après 3 secondes. Cette chimiluminescence est proportionnelle à la concentration de la testostérone dans les échantillons. Cette dernière est automatiquement calculée comme c'était le cas pour toutes les étapes du test (Figure 30).



Figure 29 : Automate VIDAS utilisée pour la réalisation du dosage de la FSH et la LH.

3.4 Analyse statistiques

L'analyse statistique de l'ensemble des résultats obtenus est réalisée par IBM SPSS. Une analyse de la variance (ANOVA) est réalisée pour une vérification de la significativité statistique des résultats suivie par un test Post-Hoc de la différence significative minimale LSD (Last significant difference) pour les comparaisons multiples entre les différents groupes pour chaque partie de l'étude (étude de la reprotoxicité du tabac, étude de l'effet bénéfique de thé). Le test Post-Hoc Student-Newman-Keuls (S-N-K) est ensuite employé pour une analyse statistique globale. Ce test répartit les résultats en plusieurs catégories statistiquement significatives, à mesure que les résultats non significatifs seront classés dans la même catégorie. Une valeur de $P < 0,05$ est considéré significative pour l'ensemble des tests.



Figure 30 : Automate Maglumi CLIA utilisée dans le dosage de la testostérone.

3.5 Limites de travail

Lors de la réalisation de la présente étude, nous nous sommes trouvés dans l'obligation d'orienter la démarche qui a été envisagée au début à cause plusieurs

difficultés que nous avons rencontrées. L'analyse de la fragmentation de l'ADN des SPZ et la mise en évidence des cellules apoptotiques sur coupes histologiques sont les principaux tests pour lesquels la réalisation n'était pas possible à cause d'un manque de produits. En revanche, les principaux points ont été tous étudiés et la valeur du travail a été assurée.

Chapitre IV : Résultats et discussion

« Ce chapitre illustre les résultats de l'étude expérimentale que nous avons réalisée. Ce dernier est divisé en deux parties : une étude multiparamétrique de la reprotoxicité des alcaloïdes totaux du tabac chez le mâle, et une deuxième partie dont le but était de développer une approche préventive contre les différentes répercussions du tabac sur la fonction de la reproduction masculine. Les deux parties ont fait l'objet de deux articles scientifiques publiés dans deux journaux internationaux indexés dans la base de donnée Thamson reteurs » et « scopus ». Une dernière partie est destinée à une analyse statistique globale et une discussion générale des résultats ».

1. Résultats

1.1 Partie-I: Répercussions des alcaloïdes totaux du tabac sur la fonction de la reproduction masculine

Article-I: *“Tobacco total alkaloids induce reduced sperm quality, sexual hormone decrease and testicular damages in male albino WISTAR rats”* (voir Annexe C).

Les résultats auxquels nous avons aboutis ont montré un degré considérable de reprotoxicité des ATT sur la fonction de la reproduction chez les rats mâles avec une altération du développement pondérale, du poids relatif des organes sexuels, des paramètres spermatiques, ainsi qu’une perturbation endocrinienne associée à des altérations de la structure testiculaire sur le plan histologique.

1.1.1 Le développement pondéral et le poids relatif des organes sexuels

Le traitement pendant 30 jours par les ATT à raison de 2,5mg/kg (G1) et 5mg/Kg de poids corporel (G2) a induit une diminution proportionnelle à la dose administrée mais non significative, du poids corporel final et de la valeur du gain corporel moyen des animaux traités comparativement aux rats témoins (G6). Par contraste, le poids relatif des testicules et des épидидymes est significativement atténué chez les animaux du G1 ($P<0,01$) et G2 ($P<0,001$) (Tableau 4). Ces résultats sont en association avec d’autres modifications comportementales des animaux traités, à savoir une diminution de la consommation alimentaire qui n’est pas régulière tout au long de la durée de l’expérimentation. Les animaux ont montré également un comportement très calme avec une diminution de l’activité physique et un état de somnolence très court après l’administration des ATT, ce qui indique l’existence d’un effet sur le système nerveux des animaux (Figure 31).

Tableau 4: Effet des ATT sur le poids corporel, et le poids relatif (PR) des organes sexuels.

Groupes	Paramètres pondéraux				
	Poids initial (g)	Poids final(g)	gain (g)	PR Testicules (%)	PR épидидyme (%)
G1	286 ± 19,21	321 ± 21,10	35,40 ± 10,43*	0,51 ± 0,028**	0,31 ± 0,040**
G2	280± 10,37	308,8± 18,04	28 ± 11,02**	0,47± 0,030***	0,27 ± 0,029***
G6 (Témoin)	285 ± 14,40	338 ± 7, 82	56,62 ± 15,94	0,57 ± 0,017	0,38 ± 0,036

Les résultats sont exprimés en moyenne± écarte type; (n=5). * différence significative ($p<0,05$), **différence très significative ($p<0,01$), ***différence hautement significative ($p<0,001$).

Ces derniers ont développé une forme d'adaptation à ces effets au bout de trois jours de traitement.

1.1.2 Les paramètres du sperme épидидymaire

Le nombre, la mobilité et la viabilité des SPZ sont étudiés chez l'ensemble des animaux. Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré une diminution de la qualité du sperme épидидymaire suite au traitement par les ATT. La diminution du nombre des SPZ est significative ($P < 0,05$) ou hautement significative ($P < 0,001$) selon la dose administrée. Par ailleurs, la mobilité et la viabilité des SPZ sont fortement altérées chez les animaux du G1 et du G2 traités par les ATT en comparaison aux rats témoins.



Figure 31 : Constatation d'état de somnolence chez les rats après le traitement par les ATT.

Bien que le degré de la diminution du nombre des SPZ soit considérable, il reste toujours supérieurs aux valeurs critiques et n'indiquent aucune pathologie. Par contre, l'analyse de la mobilité révèle une asthénospermie modérée suite au traitement par les ATT. La viabilité s'est avérée très altérée par ce même traitement indiquant une forte toxicité des ATT sur le sperme épидидymaire (Figure 32).

1.1.3 La peroxydation des lipides au niveau plasmatique et tissulaire

La mesure des TBARS dans le plasma et dans les homogénats tissulaires constitue un outil évocateur très réputé de l'existence d'un stress oxydatif. Un taux élevé de ces indicateurs est toujours consécutif à une forte présence des ROS indiquant un état de stress.

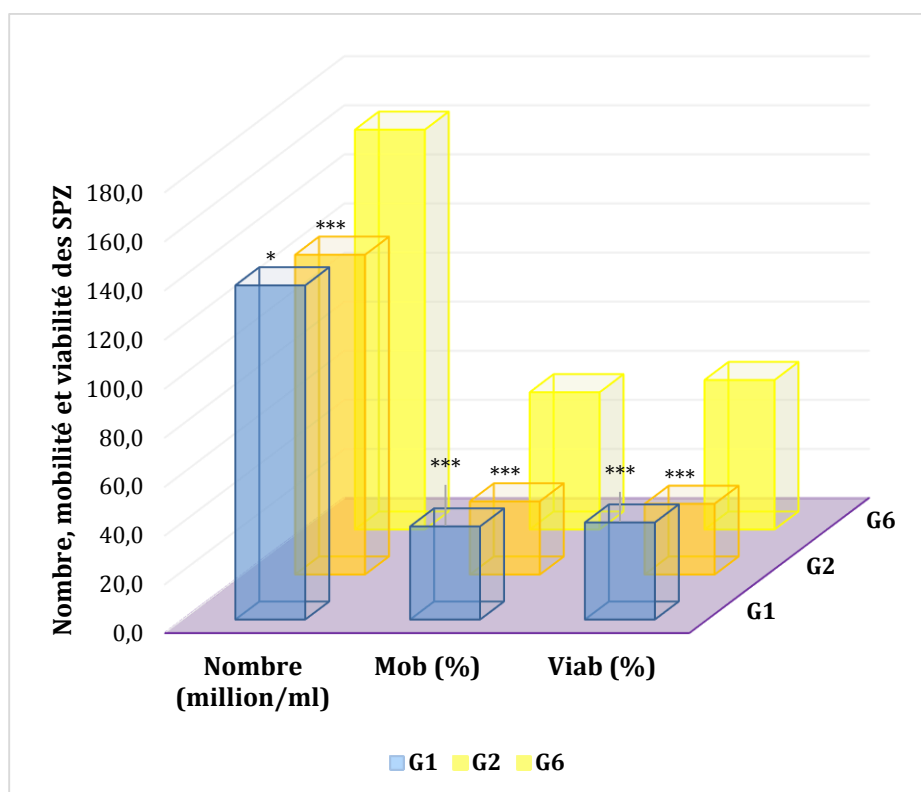


Figure 32 : Effet des ATT sur les paramètres spermatiques.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type; (n=5). * différence significative ($p < 0,05$), ** différence très significative ($p < 0,01$), *** différence hautement significative ($p < 0,001$).

Dans la présente étude, nous avons constaté un taux significativement élevé des TBARS plasmatique proportionnel à la dose des ATT avec ($P < 0,01$) et ($P < 0,001$) respectivement pour G1 et G2. Cette atteinte est plus prononcée au niveau tissulaire dans les testicules et les épидидymes des rats intoxiqués avec un ($P < 0,001$) pour l'ensemble des résultats obtenus comparativement aux rats témoins. Cette forte présence des TBARS essentiellement les MDA montre que les ATT sont dotés de la capacité d'engendrer un état de stress oxydatif très important qui a pu induire une dégradation des éléments structurels surtout au niveau tissulaire (Figure 33).

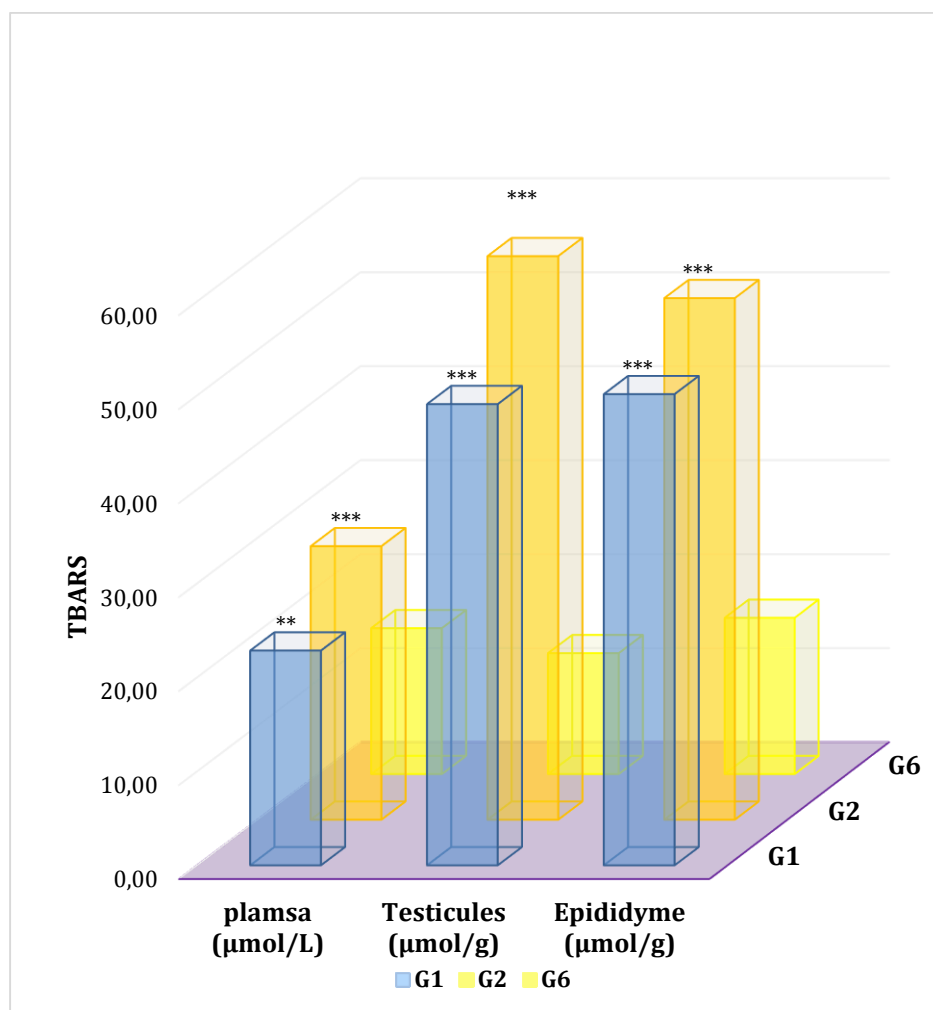


Figure 33 : Dosage du taux des MDA exprimé en TBARS au niveau tissulaire et plasmatique après traitement par les ATT.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type; (n=5). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

1.1.3.1 L'activité antioxydante totale du plasma et des tissus

La technique de FRAP utilisée pour mesurer cette activité est une technique plus rapide et moins coûteuse qui peut nous donner une idée sur le fonctionnement du système antioxydant à la fois enzymatique et non enzymatique de l'organisme. Il s'agit d'un test unique qui peut résumer toutes modifications des moyens de défense antioxydants qui réagissent en synergie pour neutraliser les ROS. Nos résultats ont montré une diminution non significative de l'activité antioxydante totale plasmatique chez les animaux du G1 ($10,62 \pm 1,05 \mu\text{mol/L}$). Par contraste, cette activité est plus altérée et significativement diminuée ($9,59 \pm 1,40 \mu\text{mol/L}$) ($P < 0,05$) dans le G2. Au niveau

tissulaire, l'atténuation de l'activité antioxydante totale testiculaire (G1 : $60,40 \pm 3,36$ $\mu\text{mol/g}$ et G2 : $49,98 \pm 8,37$ $\mu\text{mol/g}$) et épидидymaire (G1 : $14,23 \pm 0,55$ $\mu\text{mol/g}$ et G2 : $12,53 \pm 1,35$ $\mu\text{mol/g}$) est hautement significative ($P < 0,001$) pour les deux groupes par rapport aux témoins ($98,59 \pm 1,80$ et $42,96 \pm 1,15$ $\mu\text{mol/g}$ respectivement pour les testicules et les épидидymes). Les ATT ont induit donc une altération du système de défense antioxydante tant tissulaire que plasmatique (Figure 34).

1.1.4 L'histologie des gonades

L'examen histologique des testicules des rats témoins montre des tubes séminifères d'un diamètre normal et très rapprochés. La spermatogénèse s'est déroulée normalement à l'intérieur des tubes séminifères avec la présence de tous ses stades. Ces différents stades sont disposés en hélices concentriques jusqu'à la lumière des tubes séminifères qui est bien remplie par les SPZ qui viennent d'achever leur spermiation. Le compartiment basal des tubes est riche en SG, cellules souches de la spermatogénèse qui sont en voisinage des CS formant ainsi une barrière hémato-testiculaire qui sert à protéger les cellules de la lignée germinale. D'autre part, le tissu interstitiel est bien formé et vascularisé, montrant la présence des CL (Figure 35).

Chez les rats du G1, le traitement par les ATT à $2,5\text{mg/Kg}$ a entraîné une atteinte histologique facilement constatée. Une grande proportion des tubes séminifères examinés sous microscope optique ne contiennent quasiment que des SG et des SC; cependant, le processus de la spermatogénèse a pu avoir lieu dans le reste des tubes avec un avancement plus au moins perturbé. Quand au tissu interstitiel, il présente une atrophie partielle avec des tubes séminifères largement espacés et une diminution du nombre des CL. Lors de cet examen microscopique, nous avons remarqué la présence de petites cellules rondes dans la lumière des tubes séminifères révélant le détachement des spermatides avant l'achèvement de leur spermiation (Figure 36). Ces atteintes sont plus prononcées chez les rats du G2, avec une destruction de la barrière hémato-testiculaire et une présence de travées vides au sein de l'épithélium séminifère témoignant de la dégénérescence des CS, des lumières de tube vides avec absence des SPZ, et un tissu interstitiel plus atrophié (Figure 37).

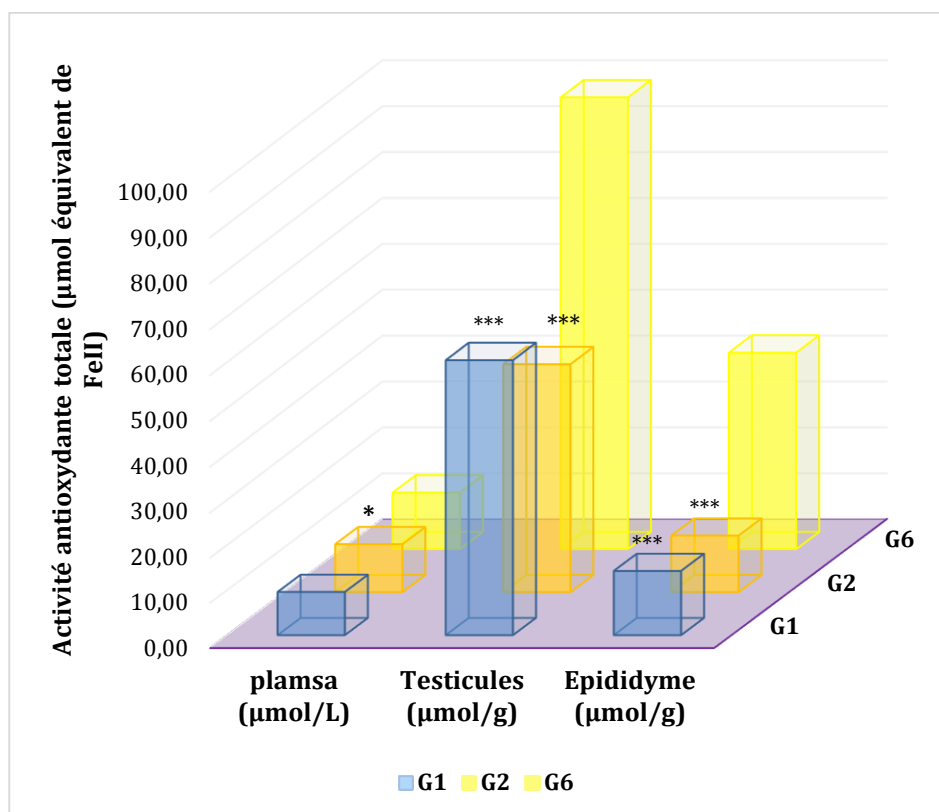


Figure 34 : Mesure de l'activité antioxydante totale dans le plasma et les tissus des rats traités par les ATT.

Les résultats sont exprimés en moyenne écart type; (n=5). * différence significative ($p<0,05$), **différence très significative ($p<0,01$), ***différence hautement significative ($p<0,001$).

1.1.5 Les taux sériques de la testostérone et des gonadotrophines

Du fait qu'une substance toxique peut exercer son effet sur la fonction reproductrice en se comportant comme perturbateur endocrinien, nous avons mesuré les taux sériques des hormones sexuelles. Les résultats du dosage de la testostérone ont indiqué une réduction sévère des taux sériques de cette hormone chez les rats intoxiqués par les ATT comme l'illustre la Figure 38. Cette réduction de la testostérone sérique est proportionnelle à la dose administrée; elle est très significative ($P<0,01$), et hautement significative ($P<0,001$) pour G1 et G2 respectivement par rapport aux témoins. Le taux de la testostérone est passé de $11,18\pm 1,23\text{ng/mL}$ chez les rats témoins à $2,88\pm 0,93\text{ng/mL}$ et $1,20\pm 0,14\text{ng/mL}$ pour G1 et G2 respectivement. La réduction du taux sérique a concerné également la FSH, où nous avons constaté des taux amoindris de la SFH qui n'étaient significatifs que dans le G2 ($P<0,05$).

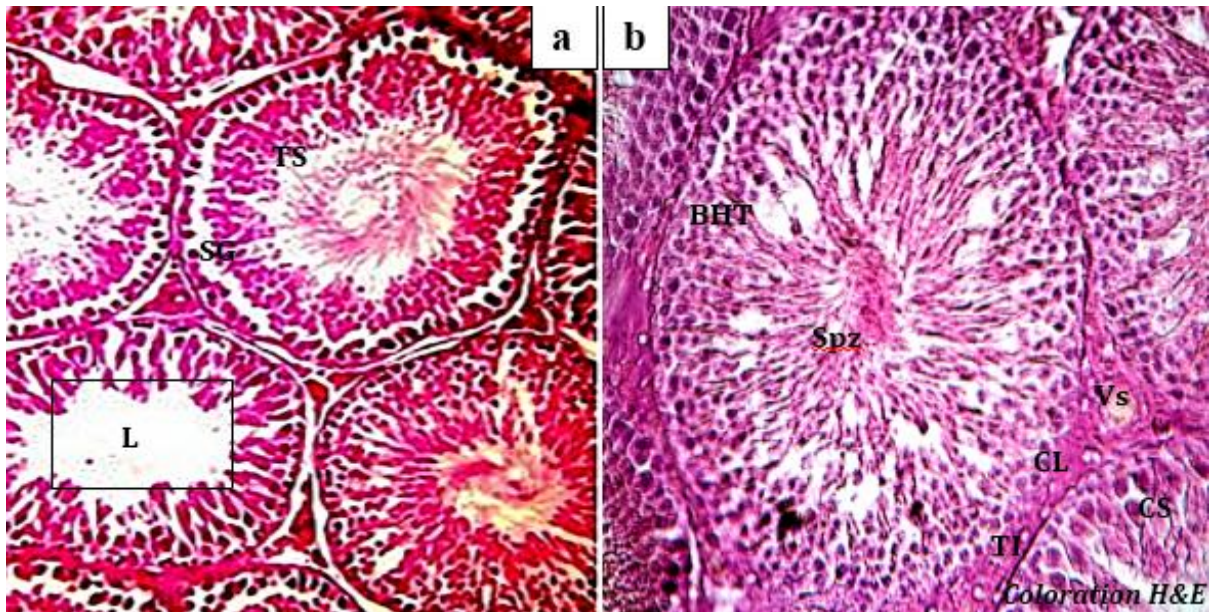


Figure 35 : Observation microscopique de la structure histologique des testicules des rats témoins Coloration H&E, a ($\times 100$), b ($\times 400$).

La structure histologique des testicules des rats témoins est normale avec des tubes séminifères (TS) serrés et un tissu interstitiel (TI) de structure normale montrant la présence des cellules de Leydig (CL) et des vaisseaux sanguins (Vs). La spermatogénèse s'est déroulée normalement au sein des tubes séminifères et les lumières des tubes (L) sont remplies par des spermatozoïdes (Spz). La couche germinale (CG) est épaisse. Les spermatogonies (SG) sont en voisinage des cellules de Sertoli (CS) formant la barrière hémato-testiculaire (BHT).

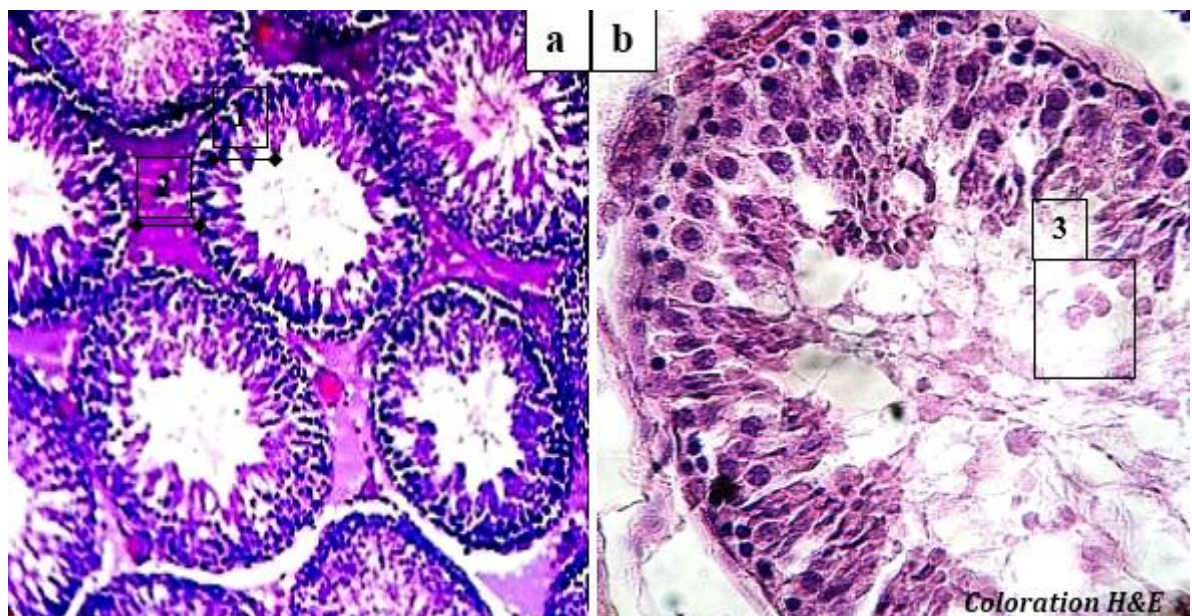


Figure 36 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G1. Coloration H&E, a ($\times 100$), b ($\times 400$).

Le traitement par les ATT à raison de 2,5mg/kg de poids a induit une altération de la structure histologique à savoir une atrophie du tissu interstitiel et un espacement des tubes séminifères (1), une diminution de l'épaisseur de la couche germinale et du diamètre des tubes séminifères avec une réduction du nombre des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ce traitement a provoqué également un détachement des spermatides (3) avant l'achèvement de la spermiation.

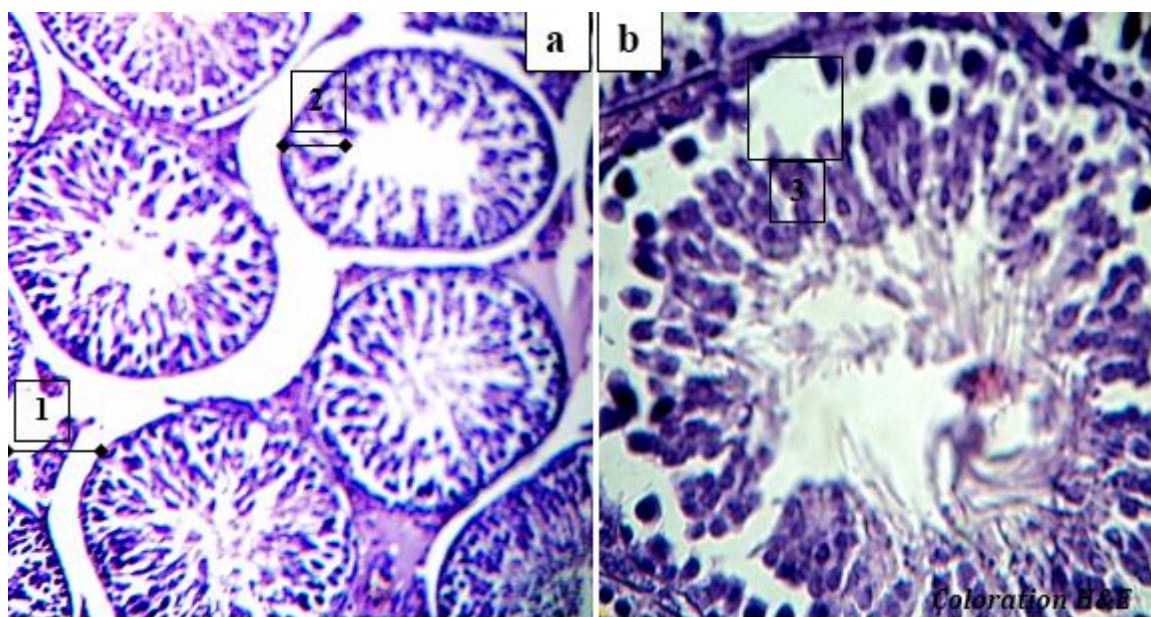


Figure 37 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G2. . Coloration H&E, a ($\times 100$), b ($\times 400$).

L'atteinte histologique des gonades des rats traités par les ATT à raison de 5mg/Kg de poids était plus sévère. L'atrophie du tissu interstitiel était plus prononcée, le diamètre des tubes séminifères plus diminué avec une absence totale des spermatozoïdes dans la lumière d'une grande proportion des tubes séminifères. Au sein de l'épithélium séminifère, des travées vides sont apparues témoignant de la dégénérescence des cellules de Sertoli.

Le taux de la FSH est passé de $0,42 \pm 0,02$ mUI/L à $0,34 \pm 0,02$ mUI/L pour G1 et $0,32 \pm 0,06$ mUI/L pour G2. Par contre, le taux de la LH était élevé suite au traitement par les ATT. L'augmentation dans les taux de la LH est très significative ($P < 0,01$) uniquement pour le G2, alors qu'aucune différence significative n'était observée entre le G1 et les témoins. Le taux de la LH est passé de $1,35 \pm 0,01$ mUI/L chez les témoins à $1,40 \pm 0,03$ mUI/L et $1,47 \pm 0,02$ mUI/L chez les animaux du G1 et G2 respectivement (Figure 38).

1.2 Partie-II : Effets préventifs de la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait de thé vert

Article-II: "Green Tea Protective Effect against Total Alkaloids of Tobacco Inducing Reprotoxic Effects in Male Albino WISTAR Rats". (AnnexeD).

Après avoir confirmé l'existence d'un effet reprotoxique des ATT chez les rats mâles, et mis en évidence les différentes répercussions de l'exposition aux ATT sur plusieurs plans, on est parvenu à confirmer la reprotixicté stress-oxydatif dépendante des

ATT. De ce fait, le thé vert réputé pour son potentiel antioxydant est utilisé pour lutter contre cette reprotoxicité. Avant de passer à l'étude expérimentale, l'activité antioxydante des différents extraits de thé vert est testée *in vitro* afin d'optimiser son utilisation.

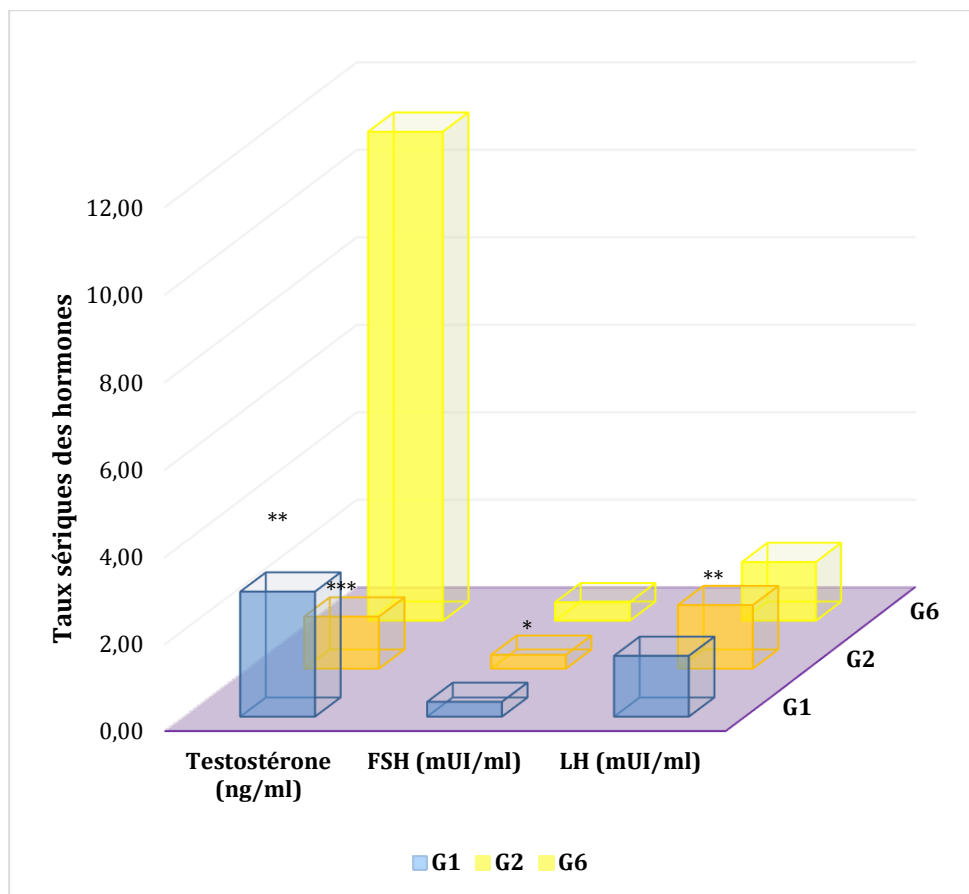


Figure 38 : Dosage des taux sériques de la testostérone et des gonadotrophines chez les rats traités par les ATT.

Les résultats sont exprimées en moyenne $\pm$ écart type; (n=3). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

1.2.1 Résultats de l'étude phytochimique

1.2.1.1 Rendement d'extraction

Au cours de cette expérimentation, les rendements des différents extraits ont été mesurés lors de l'étude *in vitro*. Le rendement de l'extraction des alcaloïdes était de $1,03 \pm 0,13\%$, alors que le rendement de la fraction d'acétate d'éthyle était plus important atteignant les $4 \pm 0,46\%$.

1.2.1.2 Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes

En vue d'une caractérisation de la composition en substances bioactives des différents extraits, nous avons réalisé une série de dosages spectrophotométriques de la teneur en PT et en flavonoïdes. Les résultats auxquels nous avons aboutis ont montré des différences significatives entre les différentes fractions. Ces caractéristiques peuvent influencer la réactivité des fractions vis-à-vis des radicaux libres et des ROS.

La teneur en PT des différentes fractions de l'extrait de thé vert exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon a été mesurée. La FCh a montré la teneur la plus faible en PT en comparaison avec les autres fractions. La FAE, la FnB et la FAq ont montré des teneurs plus importantes et significativement élevées par rapport à la FCh avec ($p < 0,001$), ($p < 0,001$) et ($p < 0,01$) respectivement. Les teneurs en flavonoïdes exprimées en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'échantillon sont réparties de la même façon que les PT avec une prédominance dans la FAE, suivie par la FnB, la FAq et enfin la FCh qui a présenté la teneur la plus faible. La différence entre les teneurs en flavonoïdes est significative pour la FAE ($p < 0,001$), la FnB ($p < 0,001$) et la FAq ($p < 0,01$) comparativement à la FCh (Tableau 5).

1.2.1.3 Activité anti-radicalaire de l'extrait de thé vert et de ses fractions

L'extrait total (ET) de thé vert et ses différentes fractions ont montré une activité antiradicalaire variable vis à vis des radicaux libres de la DPPH (Figure 39). Cette activité antiradicalaire augmente proportionnellement à la dose des différents extraits. La CI50 de la FAE correspond à la valeur la plus faible ce qui signifie avoir l'activité antioxydante la plus importante par rapport aux autres extraits. Cette activité est approximativement dix fois plus importante que celle de l'acide ascorbique (Aas) utilisé comme témoin positif. De ce fait, la FAE a été choisie pour l'étude *in vivo* (Tableau 5).

1.2.1.4 Caractérisation de la composition de la FAE par HPLC

Avant son utilisation dans l'étude *in vivo*, la composition de la FAE a été identifiée par HPLC. Le chromatogramme obtenu a montré quatre pics correspondant à quatre substances avec des temps de rétention différents. Après avoir comparé les pics aux standards, nous avons abouti à l'identification qualitative de la composition de la FAE. Cette dernière contient trois flavanols qui sont : la (C), (EC), (ECG) en association à la CAF (Figure 40). La structure développée de ces substances est présentée dans la figure 41.

Tableau 5 : Teneurs en phénols totaux (PT), en flavonoides (flav) et valeurs de CI50 des différents extraits.

Extraits	ET	FAE	FnB	Faq	FCh	Aas
Caractéristiques						
Teneur en PT (mg Eq AG/g)	/	86,11±7,07***	85,32±1,50***	33,58±0,06**	7,11±0,02	/
Teneur en flav (mg Eq C/g)	/	238,65±13,80***	213,80±1,34***	61,03±0,78**	23,80±2,02	/
CI50 (mg/mL)	0,637	0,0156	0,195	1,056	2,148	0,115

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type; (n=5). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

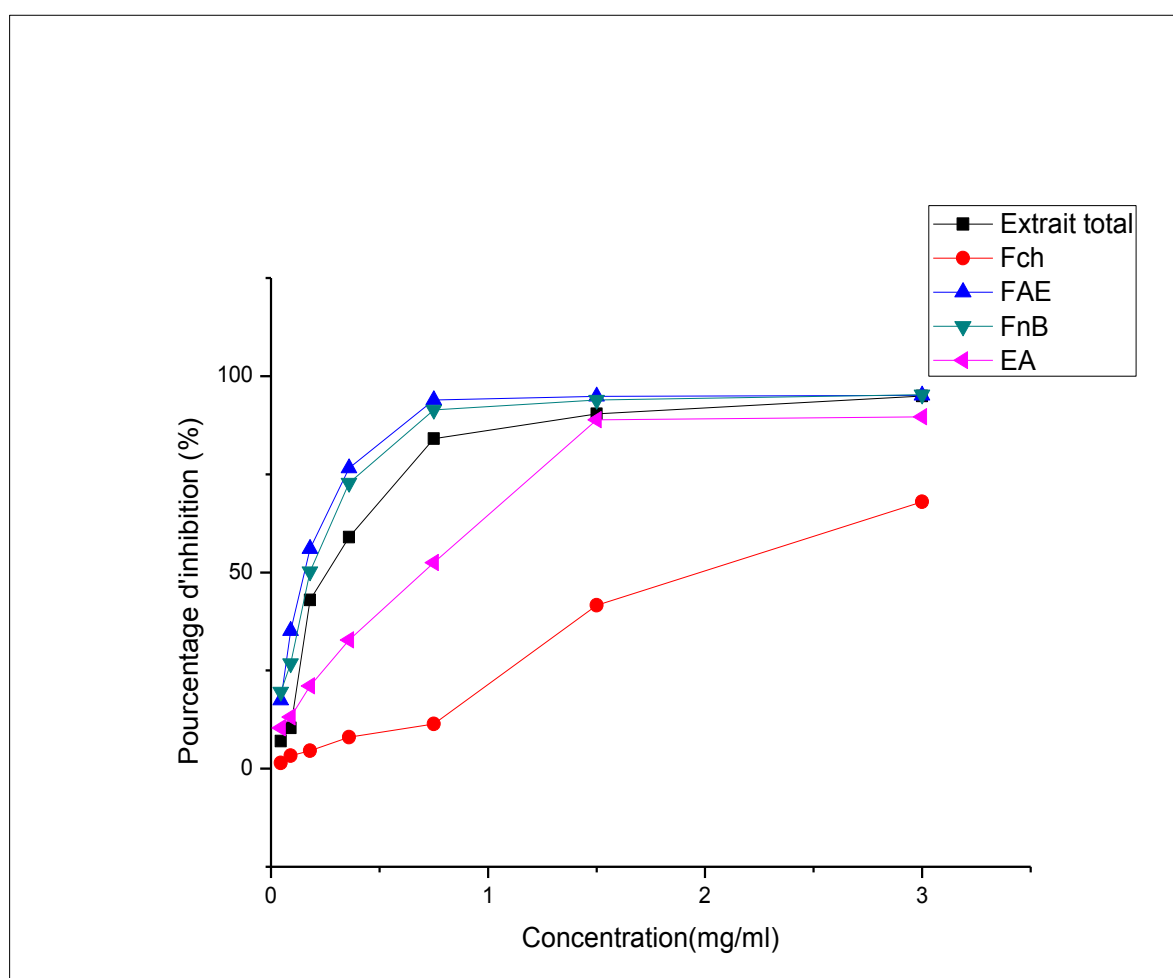


Figure 39 : Activité antiradicalaire de l'extrait total et des différentes fractions vis à vis des radicaux libre de DPPH.

1.2.2 Effets préventifs de la FAE de l'extrait de thé vert

1.2.2.1 Effets de la FAE sur le développement pondéral et sur le poids relatifs des organes sexuels

Dans cette deuxième partie, deux autres groupes (G3, G4) ont été traités par la FAE à raison de 50mg/kg du poids corporel, co-administrée avec les ATT aux mêmes doses (2,5mg/kg et 5mg/kg respectivement pour G3 et G4) et dont le but est de lutter contre le stress oxydatif que les ATT ont provoqué en prenant en considération la forte activité antioxydante de la FAE que nous avons proposé comme pouvant être utile pour conserver une fertilité naturelle chez les rats en diminuant les répercussions stress oxydatif-dépendantes des ATT. Un autre groupe (G5) a reçu uniquement la FAE à raison de 50 mg/kg pour tester si l'extrait de thé vert présente un éventuel effet reprotoxique.

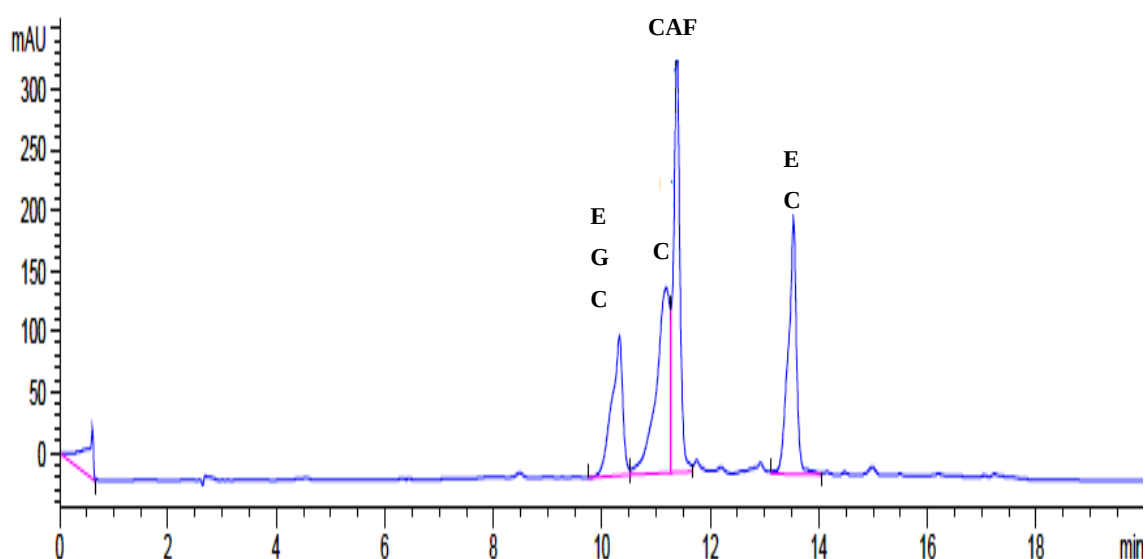


Figure 40 : Chromatogramme de l'HPLC de la FAE de l'extrait de thé vert réalisée à 270nm.

Identification des pics : pic1 : épigallocatechine (EGC), pic2 : catéchine (C), pic3 : caféine (CAF), pic4 : épicatechine (EC).

Lors de cette étude, le développement pondéral des rats traités par la FAE a significativement diminué. Un faible poids final après 30 jours de traitement est constaté chez les rats du G3, G4 et G5 avec ($p < 0,01$) pour l'ensemble des groupes. Les valeurs du gain corporel moyen sont très faibles mais toujours positives indiquant que les rats ont faiblement gagné du poids pendant les 30 jours, et que les poids finaux sont supérieurs aux poids initiaux à l'issue de cette période. Par contre, le poids relatif moyen testiculaire

et épидidymaire est quasiment épargné par la co-administration de la FAE avec les ATT à faible dose (G3), mais reste toujours significativement diminué chez les rats du G4. Les rats du G5 n'ont montré aucune différence significative par rapport aux témoins ce qui indique l'absence de tout effet toxique de la FAE sur le poids relatif des organes sexuels (Tableau 6).

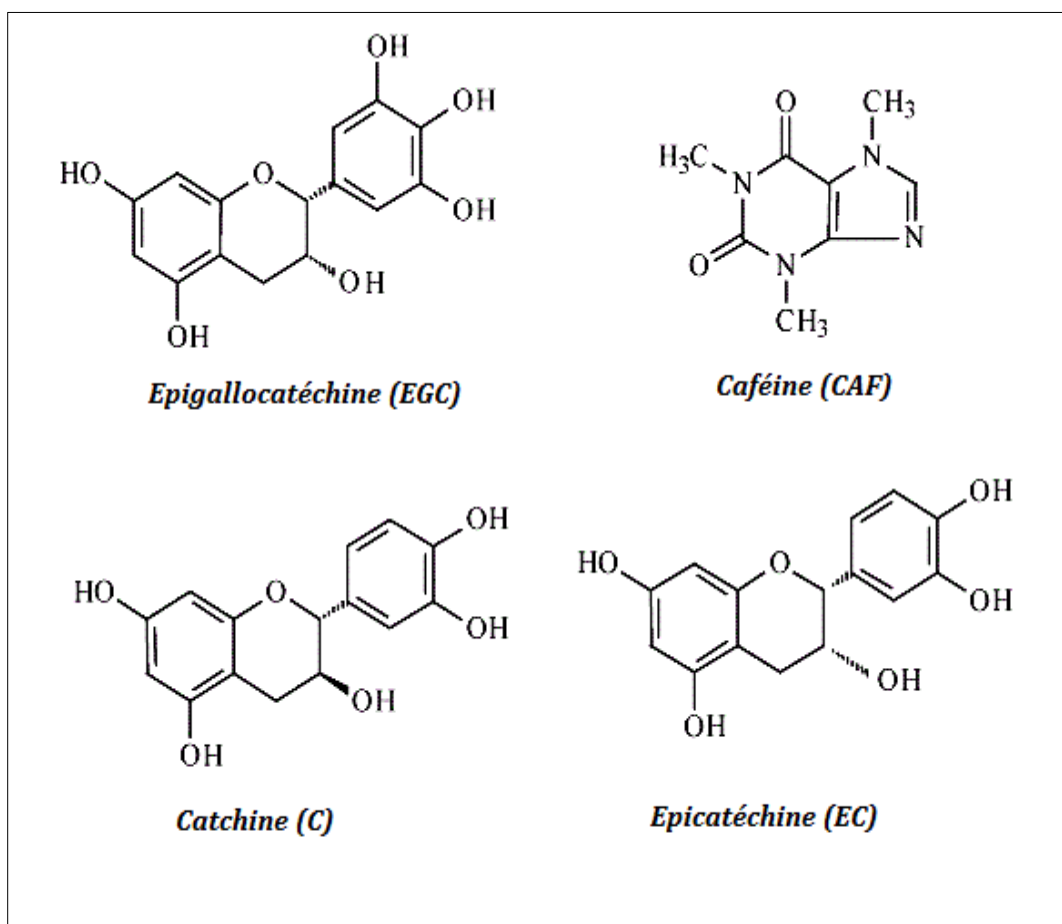


Figure 41 : Structures biochimiques des différentes substances constituant la FAE (NKHILI , 2009).

1.2.2.2 Effet préventif de la FAE sur la qualité du sperme

L'analyse des paramètres du sperme épидidymaire a montré une modification après le traitement par la FAE. En effet, le nombre, la mobilité et la viabilité des SPZ sont améliorés par l'administration de la FAE chez les groupes G3 et G4. Cette amélioration dépend de la dose d'exposition aux ATT et allant d'une conservation complète de l'état à une amélioration légère mais non significative. Aucune différence significative n'a été constatée entre le nombre de SPZ des rats du G3 et celui des rats témoins. Par contre une

diminution significative du nombre des SPZ est notée chez les rats du G4 ($p<0,01$), mais moins importante par rapport aux rats traités par les ATT seuls à la même dose (G2). La mobilité et la viabilité sont également améliorées suite au traitement par la FAE, mais leurs valeurs restent significativement réduites par rapport aux témoins. Malgré que les valeurs constatées pour ces deux paramètres soient significativement diminuées pour le G1, elles dépassent les 50% et peuvent être considérées normales. Pour le G2, la réduction de la mobilité et de la viabilité est restée hautement significative comparativement aux témoins ($p<0,001$), mais ceci n'exclut pas l'existence d'une amélioration de ces deux paramètres par rapport aux rats traités par les ATT seuls. Les paramètres spermatiques chez les rats du G5 traités par la FAE n'ont présenté aucune différence significative en comparativement aux témoins sur l'ensemble des paramètres étudiés témoignant de l'absence d'effet toxique de la FAE sur la qualité du sperme épидидymaire (Figure 42).

Tableau 6 : Effet de FAE sur l'évolution pondérale et le poids relatif des organes sexuels.

Groupes	Paramètres pondéraux				
	Poids initial (g)	Poids Final (g)	gain (g)	PR Testicules (%)	PR épидидymes (%)
G3	288±20,18	298,80±30,95**	10,80±15,70***	0,55±0,03	0,33±0,02
G4	278,40±9,52	293,40±14,06**	15±6,63***	0,49±0,03***	0,31±0,02***
G5	285,20±11,51	298,40±15,17**	13,60±17,30***	0,57±0,01	0,36±0,05
G6 (témoin)	285 ± 14,40	338 ± 7, 82	56,62 ± 15,94	0,57 ± 0,017	0,38 ± 0,036

Les résultats sont exprimés en moyenne± écarte type; (n=5). * différence significative ($p<0,05$), **différence très significative ($p<0,01$), ***différence hautement significative ($p<0,001$).

1.2.2.3 Effet préventif de la FAE sur le plan biochimique

Le taux de la peroxydation lipidique au niveau du plasma est significativement réduit par la FAE. Une différence significative n'est enregistrée que chez les rats du G4 avec une ($p<0,05$), alors que le taux des TBARS chez les rats du G3 est comparable à celui des rats témoins. Au niveau tissulaire, le taux des TBARS est diminué mais il reste significatif par rapport aux témoins chez les deux groupes avec une amélioration plus importante pour le G3 que pour le G4 (Figure 43).

Par ailleurs, l'activité antioxydante totale du plasma est complètement conservée par la FAE pour les deux groupes G3 ($10,97\pm0,95$ $\mu\text{mol/L}$) et G4 ($10,65\pm1,05$ $\mu\text{mol/L}$), où aucune différence significative n'est constatée par rapport aux témoins ($12,46\pm0,25$ $\mu\text{mol/L}$).

Quant à l'activité antioxydante testiculaire, une réduction significative n'est constatée que chez les animaux du quatrième groupe ($78,24 \pm 2,60 \mu\text{mol/g}$) traités par la FAE combinée aux ATT à forte dose ($p < 0,05$). Comparativement aux témoins ($42,96 \pm 1,15 \mu\text{mol/g}$), cette diminution est plus accentuée au niveau des épididymes et reste loin de la normale avec ($p < 0,001$) pour les deux groupes (G3 : $24,76 \pm 1,50 \mu\text{mol/g}$ et $17,24 \pm 0,80 \mu\text{mol/g}$), ce qui explique au moins en partie l'altération plus importante de la mobilité et de la viabilité que du nombre des SPZ aussi bien pour G3 que pour G4 (Figure 44).

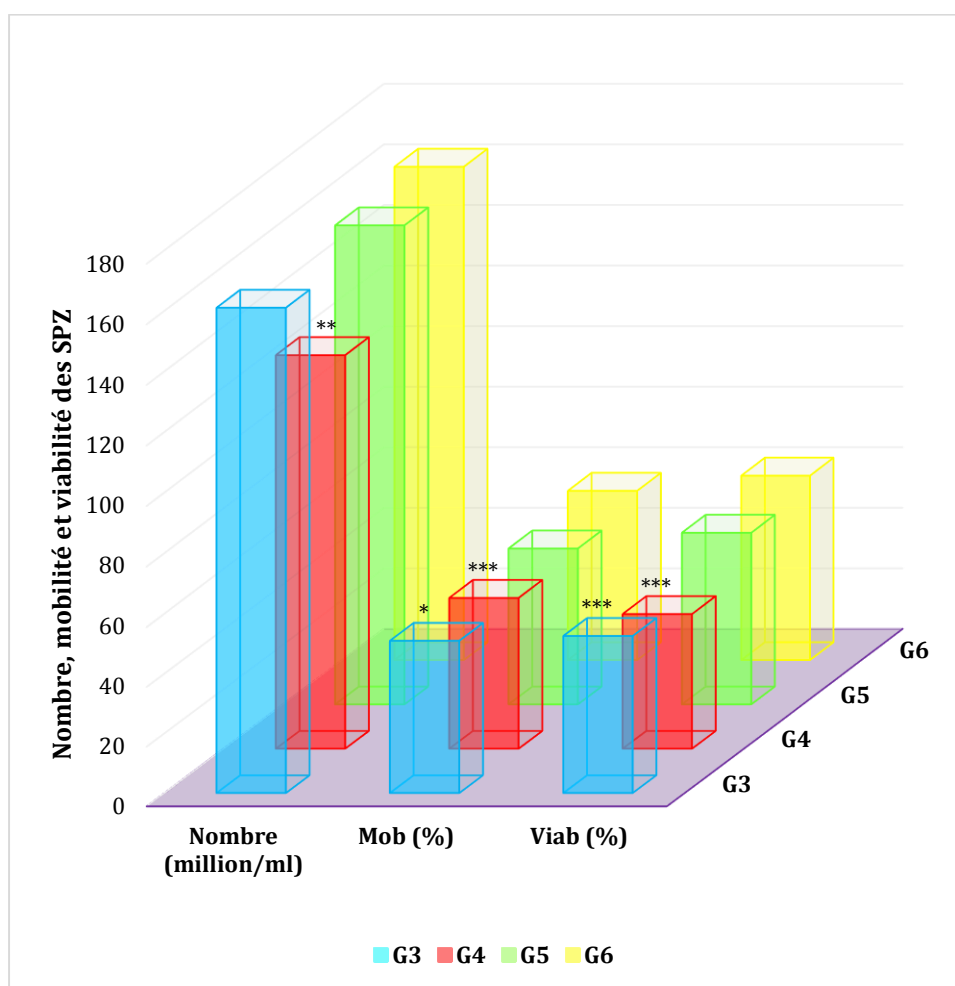


Figure 42 : Effet de la FAE sur le nombre, la mobilité (Mob) et la viabilité (Viab) des SPZ.

Les résultats sont exprimés en moyenne écart type; (n=5). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

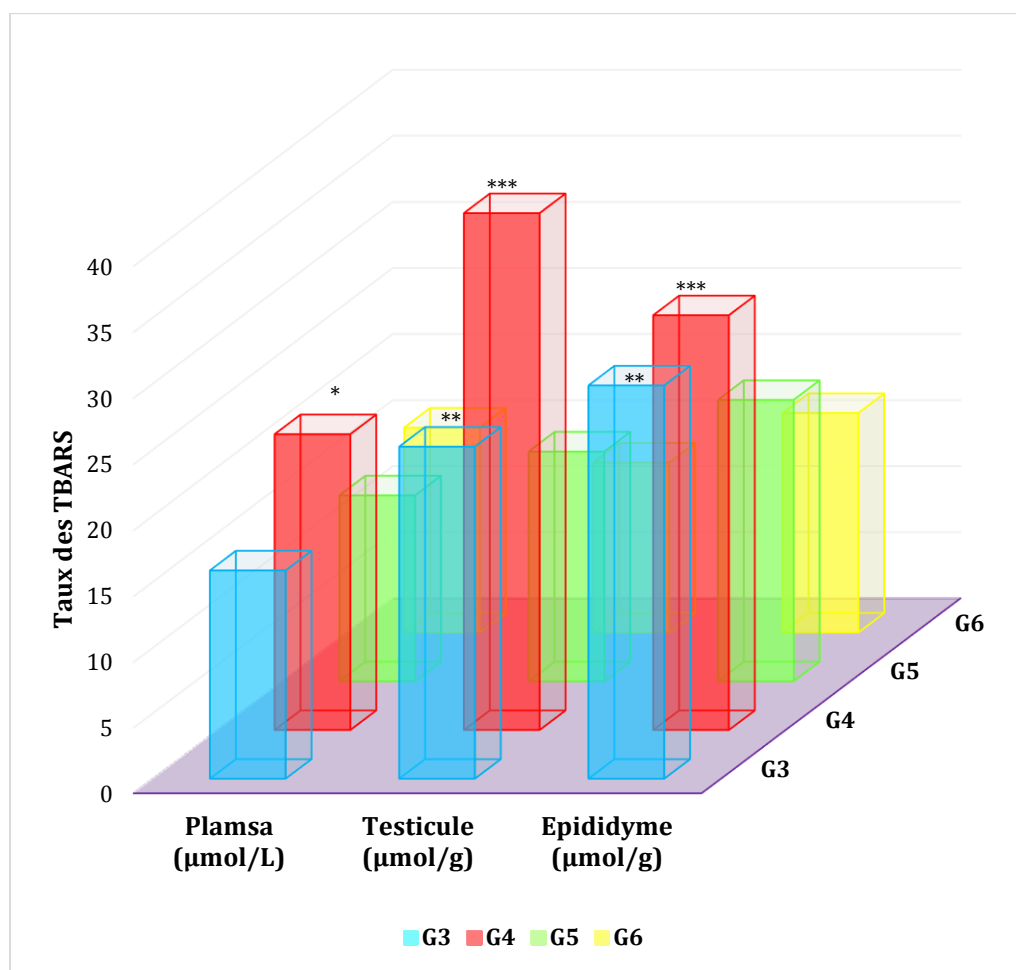


Figure 43 : Effet de la FAE sur la peroxydation lipidique.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type; (n=5). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

L'administration de la FAE seule (G5) n'a induit aucun effet toxique sur le plan biochimique, avec un taux normal de TBARS et une activité antioxydante plus importante que celle des témoins. Ceci indique que la FAE peut avoir un effet amélioratif des défenses antioxydantes même en absence de tout type d'agression exogène par les ROS.

1.2.2.4 Effet préventif de la FAE sur le plan histologique

Une amélioration de la structure histologique est facilement constatée chez les rats du G3 et G4 par rapport aux G1 et G2. Chez les rats du G3, l'observation microscopique des coupes histologiques montre des tubes séminifères plus ou moins serrés avec un tissu interstitiel bien structuré (Figure 45). La lumière des tubes séminifères contient un nombre considérable des SPZ dans une grande proportion des tubes. Chez les rats du G4,

les principales observations que nous avons faites sont une conservation de l'intégrité de la BHT et une diminution de l'altération du tissu interstitiel. Nous avons observé également la présence des SPZ dans la lumière des tubes reflétant que le processus de la spermatogenèse a pu avoir lieu dans ces tubes (Figure 46). La proportion de ces tubes avec une spermatogenèse conservée est faible par rapport aux témoins. Par ailleurs, les testicules des rats du G5 ont révélé une structure histologique homogène comparable à celle des rats témoins sans aucune destruction observée, témoignant de l'absence de tout effet toxique de la FAE utilisé sur les testicules des rats (Figure 47).

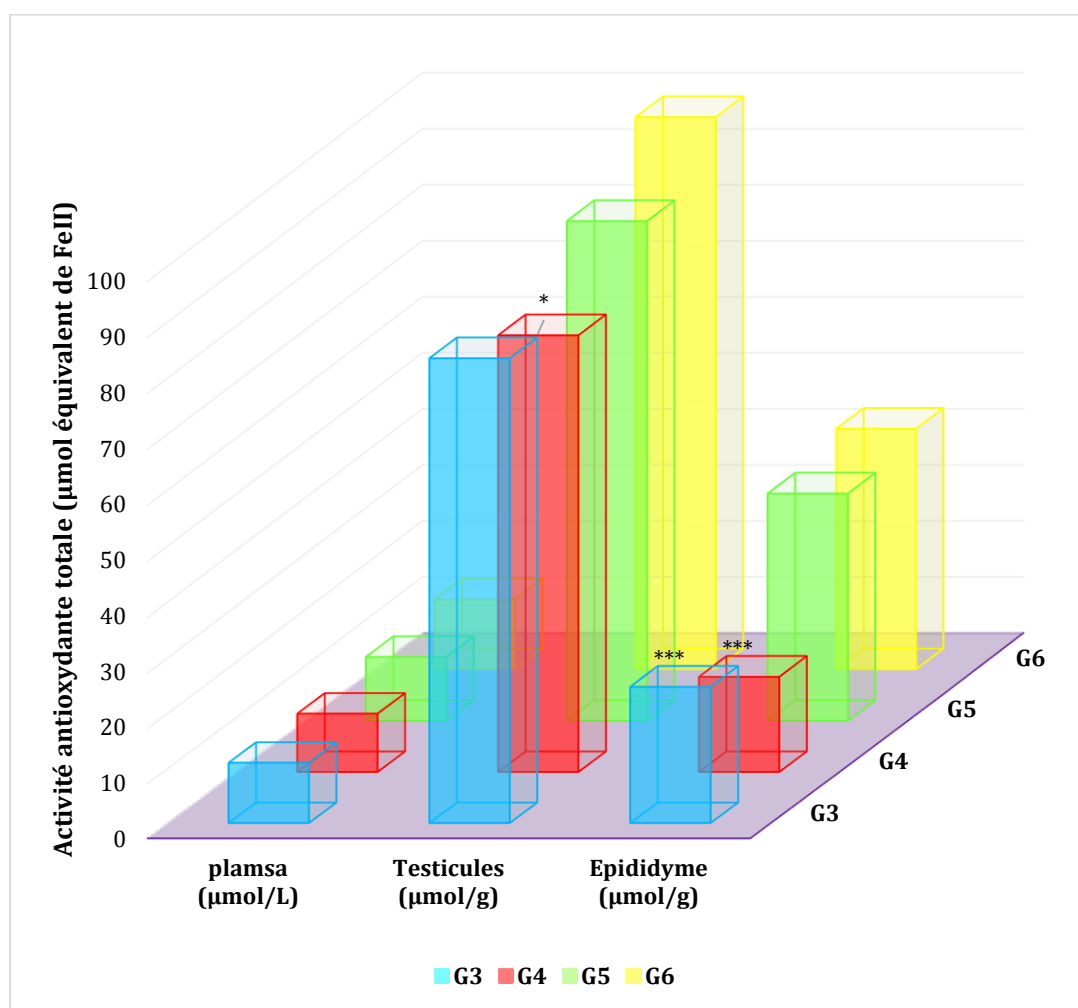


Figure 44 : Effet de FAE sur l'activité antioxydante totale plasmatique et tissulaire.

Les résultats sont exprimés en moyenne écart type; (n=5). * différence significative ($p<0,05$), **différence très significative ($p<0,01$), ***différence hautement significative ($p<0,001$).

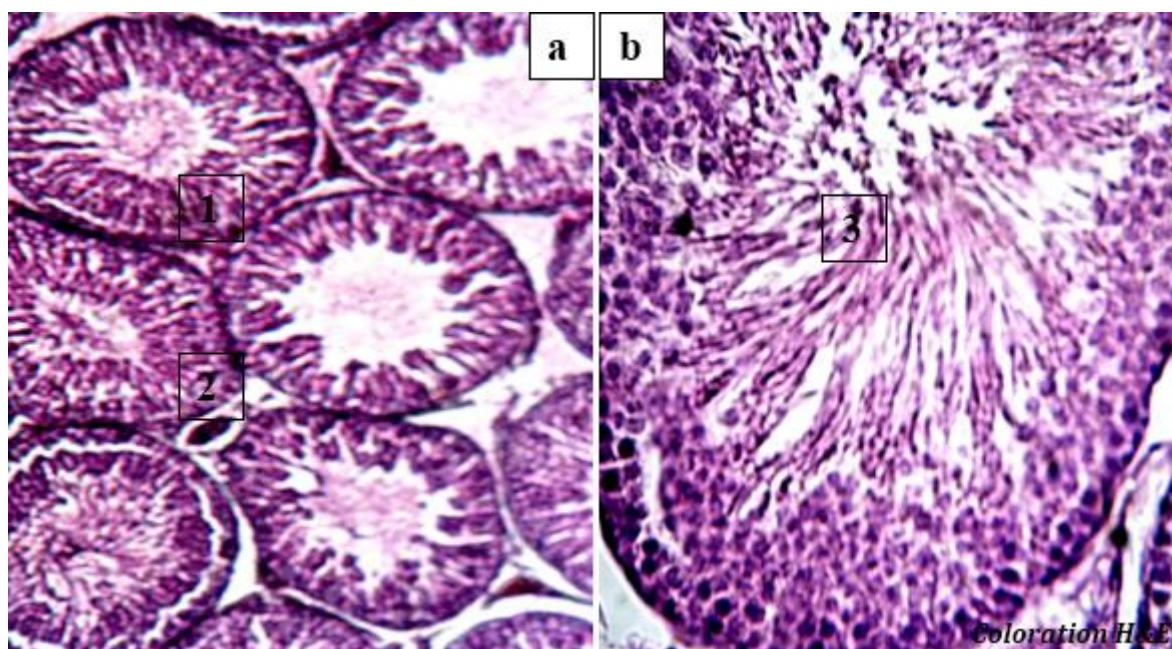


Figure 45 : Observation microscopique des coupes histologiques des rats du G3. Coloration H&E, a ($\times 100$) b, ($\times 400$).

L'examen microscopique des coupes histologiques des testicules des rats traités par la FAE en combinaison aux ATT montre que la structure testiculaire est considérablement conservée. On peut facilement apercevoir des tubes séminifères serrés (1) avec un tissu interstitiel largement conservé (2) et des lumières de tubes pleines de SPZ.

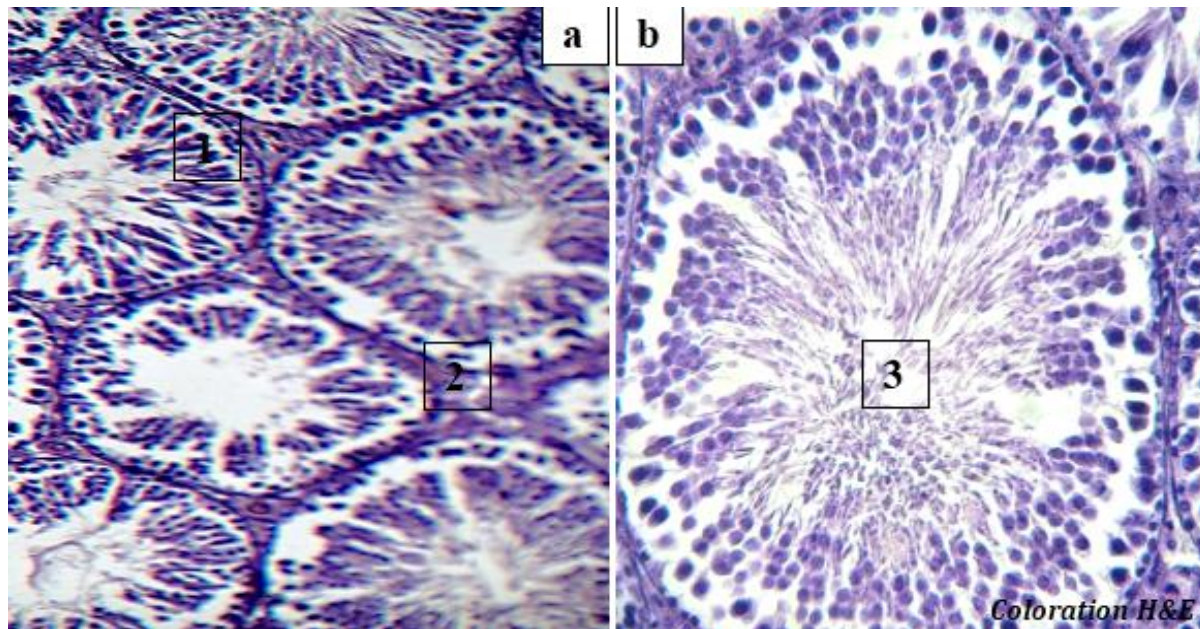


Figure 46 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G4. Coloration H&E, a ($\times 100$) b, ($\times 400$).

La FAE n'a pas conservé totalement la structure histologique testiculaire dans ce groupe. Néanmoins, les atteintes histologiques sont moins accentuées que celles du G2. L'intégrité de la BHT est conservée (1), et l'hypotrophie du tissu interstitiel est remarquablement moins intense. La spermatogenèse a pu avoir lieu dans plusieurs tubes séminifères mais le nombre des SPZ dans la lumière des tubes est faible par rapport aux témoins.

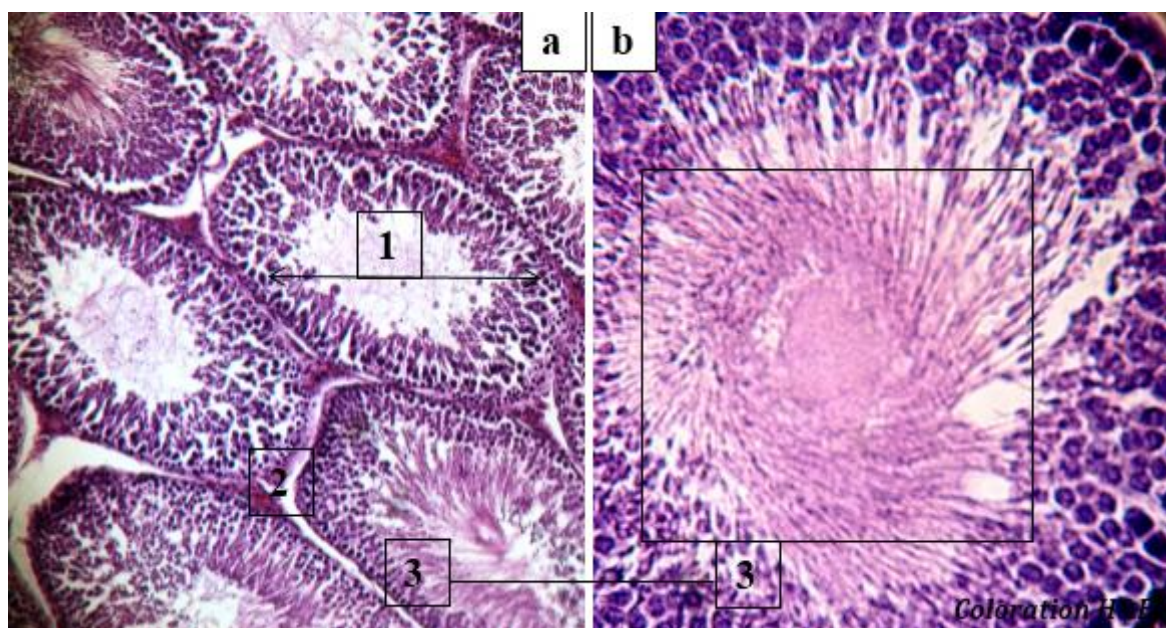


Figure 47 : Observation microscopique des coupes histologiques des testicules des rats du G5. Coloration H&E, a ($\times 100$), b ($\times 400$).

La structure histologique des testicules des rats traités par la FAE seule ne montre aucune altération de la structure histologique comparativement aux rats témoins. Les tubes séminifères sont de diamètre important, montrant la présence des différents stades de la spermatogenèse (1). Le tissu interstitiel est homogène et montre une forte présence des cellules de Leydig (2). Les tubes dans lesquels une spermatogenèse vient d'être achevée sont bien remplis par des SPZ (3).

1.2.2.5 Effet préventif de la FAE sur le plan hormonal

Le traitement par la FAE a pu conserver des taux d'hormones sexuelles plus proches de la normale. Le taux sérique de la testostérone chez les rats du G3 ne présente aucune différence significative, alors qu'il est moins atténué chez les rats du G4 par rapport au G2 avec ($p < 0,05$). Le taux de la testostérone est passé de $11,18 \pm 1,23 \text{ ng/mL}$ chez les témoins à $9,72 \pm 2,19 \text{ ng/mL}$ et $6,81 \pm 1,03 \text{ ng/mL}$ chez les animaux du G3 et du G4 respectivement. En revanche, les taux sériques de la FSH ne présentent aucune différence significative pour les deux groupes G3 et G4 par rapport aux témoins avec respectivement un taux sérique moyen de $0,44 \pm 0,014 \text{ mUI/mL}$ et de $0,38 \pm 0,02 \text{ mUI/mL}$. Quant à la LH, l'augmentation des taux sériques est moins significative ($p < 0,05$) que celle observée chez les rats traités par les ATT seulement. Le taux de LH est passé de $1,35 \pm 0,01 \text{ mUI/mL}$ chez les témoins à $1,43 \pm 0,02 \text{ mUI/mL}$ chez les rats de G3 et à $1,42 \pm 0,03 \text{ mUI/mL}$ chez les rats du G4. L'administration de la FAE aux animaux du G5 n'a induit aucune différence significative entre les taux sériques des hormones sexuelles de ces derniers et ceux des témoins, ce qui confirme que la FAE ne présente aucun risque de reprotoxicité (Figure 48).

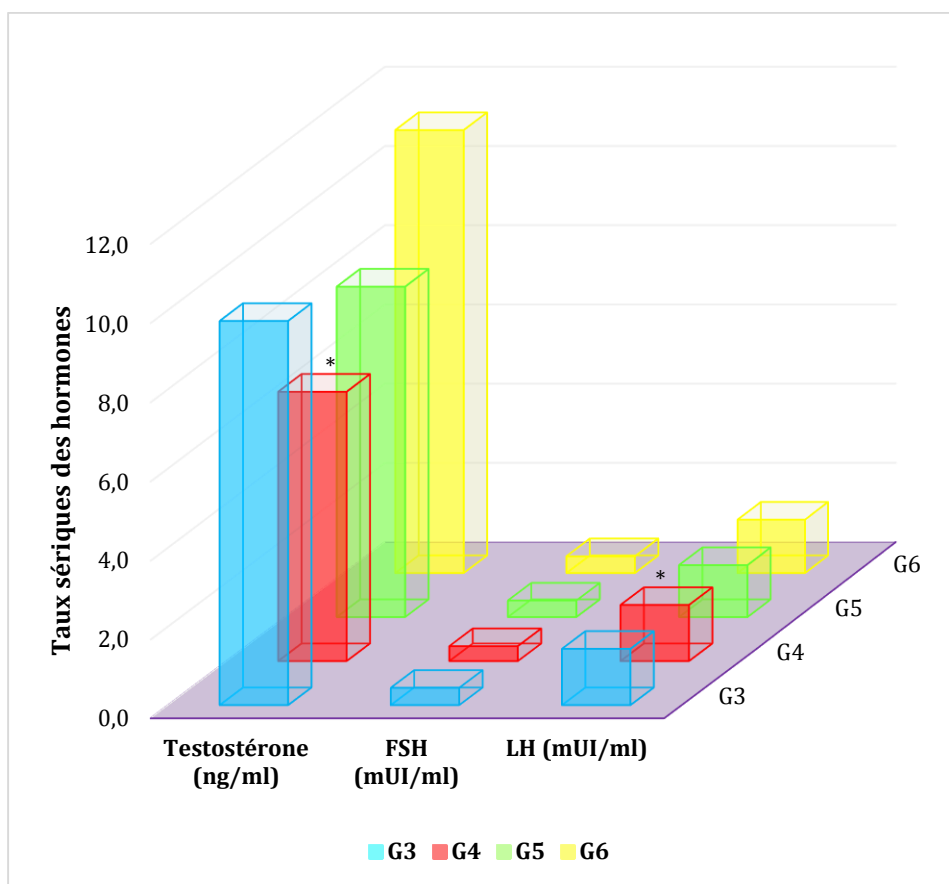


Figure 48 : Effet de la FAE sur le taux sérique de la testostérone et des gonadotrophines.

Les résultats sont exprimés en moyenne écart type; (n=3). * différence significative ($p < 0,05$), **différence très significative ($p < 0,01$), ***différence hautement significative ($p < 0,001$).

1.3 Partie III : Analyse statistique globale

L'ensemble des résultats numériques auxquels nous avons aboutis dans les deux parties de l'étude est analysé par IBM SPSS. 20 en utilisant une analyse des variances (ANOVA) suivie par un test post-hoc de S-N-K. Ce dernier réalise une comparaison multiple deux à deux entre les différentes moyennes que nous avons eues lors de l'étude expérimentale. Ces résultats vont être classés en plusieurs sous-ensembles qui sont significativement différents. Ces derniers sont indiqués par des lettres (a, b, c, d et e), de manière que les groupes portant la même lettre ne présentent aucune différence significative alors que ceux de lettres différentes sont significatifs. Bien que ce test soit plus conservateur que le test LSD, il est conseillé quand les groupes étudiés dépassent les

trois à quatre groupes. Cette étude est réalisée pour vérifier la dose dépendance des effets reprotoxiques des ATT, et l'existence d'un effet préventif significatif de la FAE.

1.3.1 Résultats de l'évolution pondérale et du poids relatif des organes sexuels

Les résultats de la comparaison multiple deux à deux par le test S-N-K a mis en évidence une différence significative entre les groupes traités par la FAE (G3, G4 et G5) et le groupe témoin. Le test montre également que les rats traités par les ATT seuls ont subi une atténuation du poids corporel moins prononcée et comparable à celles des témoins. Ceci indique que la FAE a un effet plus important sur le poids corporel et le gain de la masse pondérale que les ATT avec une absence de l'effet dose-dépendant des ATT sur le poids corporel (Tableau 7).

Tableau 7 : Analyse statistique globale des résultats du poids corporel.

Poids corporel (g)		
Student-Newman-Keuls		
Groupes	alpha = 0.05	
	a	b
G4	293,40	
G5	298,40	
G3	298,80	
G2	308,80	308,80
G1	321,40	321,40
G6		338,60

Quant aux poids relatifs des organes sexuels, l'effet des ATT sur le poids relatif testiculaire est significativement dose dépendant, alors que l'EAF a réussi d'induire un effet protecteur dans le G3 du fait que la moyenne de ce groupe est significativement différente que celle du premier groupe. Cependant, à forte dose des ATT, l'effet de la FAE est moins important comme l'indique le tableau 8. En ce qui concerne le poids relatif des épididymes, l'effet dose dépendant des ATT sur ce paramètre est considéré non significatif du point de vue statistique. L'effet préventif de la FAE sur le poids relatif épididymaire reste toujours moins important avec le traitement à forte dose des ATT (G4), et il est significatif par rapport aux témoins, alors qu'il est plus remarquable et comparable aux témoins lorsque la FAE est administrée ensemble avec les ATT à faible dose (G3) (Tableau 9).

Tableau 8: Analyse statistique globale des résultats du PR testiculaire.

Poids relatif (PR) testiculaire (%)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G2	0,47		
G4	0,49	0,49	
G1		0,51	
G3			0,55
G6			0,57
G5			0,57

Tableau 9 : Analyse statistique globale des résultats du PR épидидymaire.

Poids relatif (PR) épидидymaire (%)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G2	0,27		
G4	0,31	0,31	
G1	0,31	0,31	
G3	0,33	0,33	0,33
G5		0,36	0,36
G6			0,38

1.3.2 Résultats de l'étude séminale

La comparaison multiple des résultats de l'étude séminale montre que les ATT ont un effet significativement dose dépendant sur le nombre, la mobilité et la viabilité des SPZ. D'autre part, le nombre des SPZ est conservé par la FAE dans le G3 montrant une moyenne non significative par rapport aux témoins, alors qu'elle est restée éloignée de celle des témoins dans le G4 bien que cette moyenne soit approximativement le double de la moyenne du nombre des SPZ des rats traités seulement par les ATT à la même dose (Tableau 10). Dans le même contexte, la FAE a efficacement conservé la mobilité des SPZ chez les groupes traités par la FAE combinée aux ATT. Les valeurs moyennes de la mobilité non seulement dépassent les 50% dans ces groupes, mais aussi elles n'ont présenté aucune différence significative par rapport aux témoins par le test S-N-K

(Tableau 11). Néanmoins, l'effet préventif de la FAE sur la viabilité des SPZ est beaucoup moins remarquable (Tableau 12).

Tableau 10 : Analyse statistique globale des résultats du nombre des SPZ.

Nombre des Spz (million/mL)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G2	76,0		
G4		130,50	
G1		136,50	
G5			158,50
G3			161,00
G6			163,00

Tableau 11 : Analyse statistique globale des résultats de la mobilité des SPZ.

Mobilité des SPZ (%)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G2	30,0		
G1		38,20	
G4			50,33
G3			51,00
G5			51,80
G6			56,00

Tableau 12 : Analyse statistique globale des résultats de la viabilité des SPZ.

Viabilité des SPZ (%)				
Student-Newman-Keuls				
Groupes	alpha = 0.05			
	a	b	c	d
G2	29,00			
G1		39,80		
G4		45,00		
G3			52,60	
G5			57,00	57,00
G6				61,00

1.3.3 Résultats de l'étude biochimique

L'analyse statistique des résultats obtenus lors de l'évaluation de la peroxydation lipidique montre un effet dose dépendant clairement significatif des ATT sur le taux de la peroxydation lipidique et la concentration des TBARS au niveau du plasma. À ce niveau, la FAE a pu inhiber remarquablement la peroxydation lipidique au niveau du G3, ce qui s'est traduit par des taux de TBARS plus bas et pas significatifs par rapport aux témoins. Cependant, l'effet inhibiteur est moins important avec la forte dose (Tableau 13). Au niveau testiculaire, l'effet dose dépendant des ATT sur le taux des TBARS est également amoindri par la FAE d'une manière significative par rapport aux groupes traités par les ATT seuls, mais le taux de TBARS reste significativement élevé par rapport aux témoins chez les G3 et G4 (Tableau 14).

Tableau 13 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS plasmatiques.

TBARS plasmatique ($\mu\text{mole/L}$)			
Student-Newman-Keuls			
groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G5	14,10		
G6	15,52		
G3	15,85		
G4		21,45	
G1		22,85	
G2			29,10

Tableau 14 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS testiculaires.

TBARS testiculaire ($\mu\text{mole/g}$)					
Student-Newman-Keuls					
Groupes	alpha = 0.05				
	a	b	c	d	e
G6	12,86				
G5	17,42				
G3		25,22			
G4			39,18		
G1				49,07	
G2					59,96

Au niveau des épididymes, nous avons également constaté qu'une peroxydation lipidique significativement dose dépendante est produite par les ATT, et qui est significativement réduite par la FAE. Cette inhibition de la peroxydation lipidique n'est que partielle car les taux des TBARS dans G3 et G4 restent toujours supérieurs à ceux des rats témoins (Tableau 15).

Quant à l'activité antioxydante totale plasmatique, les différences existantes entre les valeurs moyennes observées chez les différents groupes sont considérées comme non significatives lors de ce traitement statistique des résultats (Tableau 16). A contrario, l'effet des ATT sur l'activité antioxydante testiculaire est efficacement réduit par la FAE dans le G3 et le G4 montrant des niveaux comparables à ceux observés chez les témoins (Tableau 17).

Tableau 15 : Analyse statistique globale des résultats des TBARS épididymaires.

TBARS épididymaire ($\mu\text{mole/g}$)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G6	16,62		
G5	21,33		
G3		29,85	
G4		31,47	
G1			50,13
G2			55,49

Dans le même contexte, l'activité antioxydante totale épididymaire s'est avérée plus intensivement altérée par le traitement des ATT. Une réduction plus remarquable et significativement dose dépendante est observée chez les rats du G1 et G2, au moment où la FAE a induit un effet préventif significatif en conservant une activité antioxydante plus importante chez les rats du G3 et du G4. L'efficacité de l'administration de la FAE pour réduire l'effet des ATT sur l'activité antioxydante totale est significativement élevée avec la faible qu'avec la forte dose des ATT (Tableau 18).

Tableau 16 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale plasmatique.

FRAP plasmatique ($\mu\text{mole/L}$)	
Student-Newman-Keuls	
groupes	alpha = 0.05
	a
G2	9,55
G1	9,58
G4	10,61
G3	10,97
G5	11,50
G6	12,46

Tableau 17 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale testiculaire.

FRAP testiculaire ($\mu\text{mole/g}$)		
Student-Newman-Keuls		
Groupes	alpha = 0.05	
	a	b
G2	49,97	
G1	60,40	
G4		78,24
G3		83,43
G5		89,34
G6		98,59

Tableau 18 : Analyse statistique globale des résultats de l'activité antioxydante totale épидидymaire.

FRAP épидидymaire ($\mu\text{mole/g}$)				
Student-Newman-Keuls				
Groupes	alpha = 0.05			
	a	b	c	d
G2	12,53			
G1	14,23	14,23		
G4		17,24		
G3			24,76	
G5				40,68
G6				42,95

1.3.4 Résultats de l'étude hormonale

L'analyse statistique globale montre l'absence d'un effet dose dépendant significatif des ATT sur le taux sérique de la testostérone, bien que le taux observé chez les rats traités par la faible dose (G1) soit presque le double de celui observé chez les rats traités par la forte dose des ATT(G2). Par contraste, la FAE n'a pu conserver des taux normaux et comparables à ceux des témoins que dans le G3, alors que les résultats obtenus chez les rats du G4 sont significatifs par rapport à ceux du G2 traités par la même dose des ATT, mais ils restent faibles par rapport aux témoins (Tableau 19).

Tableau 19 : Analyse statistique globale des résultats de la testostérone sérique.

Taux de la testostérone (ng/mL)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G2	1,20		
G1	2,88		
G4		6,81	
G5		8,35	8,35
G3		9,72	9,72
G6			11,18

En ce qui concerne la FSH, les résultats obtenus des taux sériques de cette hormone sont considérés comme non significatifs lors de ce traitement statistique (Tableau 20).

Tableau 20 : Analyse statistique globale des résultats de la FSH sérique.

Taux de la FSH (mUI/mL)	
Student-Newman-Keuls	
Groupes	alpha = 0.05
	a
G2	0,32
G1	0,34
G4	0,38
G5	0,42
G6	0,42
G3	0,44

Par ailleurs, l'effet des ATT sur la LH n'est significatif qu'à forte dose en induisant une augmentation des taux sériques de cette hormone par rapport aux valeurs normales observées chez les témoins. La FAE a significativement réduit cet effet mais, les résultats obtenus dans le G4 restent élevés par rapport à ceux des témoins (Tableau 21).

Tableau 21 : Analyse statistique globale des résultats de la LH sérique.

Taux de la LH (mUI/mL)			
Student-Newman-Keuls			
Groupes	alpha = 0.05		
	a	b	c
G5	1,32		
G6	1,35	1,35	
G1	1,40	1,40	1,40
G4		1,42	1,42
G3	1,39	1,39	
G2			1,46

Dans l'ensemble des tests réalisés, il est à signaler que les résultats obtenus chez les rats du G5 traités par la FAE seule n'ont montré aucune différence significative par rapport aux témoins. Ceci vient confirmer que la FAE n'a aucun effet toxique sur les différents compartiments et paramètres étudiés dans le présent travail. D'autre part, la FAE a montré un effet préventif considérable vis-à-vis des effets reprotoxiques des ATT qui a été toujours significatif, et comparable à ceux des témoins si le traitement est effectué en combinaison à la faible dose.

2. Discussion générale

La première partie de notre étude avait pour objet d'évaluer les effets reprotoxiques générés par les alcaloïdes du tabac sur l'histologie testiculaire, sur la qualité du sperme épидидymaire et sur la régulation hormonale de la fonction reproductrice chez les rats mâles, ainsi que de mettre en évidence le lien entre cette reprotoxicité et un état de stress oxydatif consécutif à l'exposition aux alcaloïdes du tabac.

Tout au long de la durée d'expérimentation, nous avons constaté une diminution du poids corporel moyen chez les rats intoxiqués par rapport aux témoins. Ceci était le point commun observé dans de nombreux travaux portant sur des animaux de laboratoire, qui ont fait l'objet d'une évaluation de la toxicité du tabac sur plusieurs plans (Chen et *al.*, 2005; Ahmed et *al.*, 2014). La diminution du poids corporel a été aussi constatée après un traitement par la nicotine dans d'autres études, où cet effet a été attribué essentiellement à la diminution de la prise alimentaire (Ijomone et *al.*, 2014), de l'accumulation viscérale des lipides ainsi qu'à la diminution de l'appétit chez les animaux traités (Perkins et *al.*, 1991). Cette dernière observation semble être réversible, comme il a été noté une hyperphagie suite à l'arrêt du traitement par la nicotine (Bishop et *al.*, 2004). Dans notre étude, il est à noter que l'effet des ATT sur le poids corporel n'était pas significativement modifié. Nos résultats sont supportés par ceux d'Omamuyovwi et *al.*, 2014 qui n'ont constaté une diminution du poids corporel par la nicotine que chez les rates femelles.

Par contre, l'effet des ATT sur le poids relatif des organes sexuels, testicules et épидидymes, s'est avéré plus prononcé. Nos résultats ont montré une diminution du poids relatif significativement dose dépendante. Des résultats similaires ont été observés chez des animaux de laboratoires exposés au tabac et à la nicotine seule, ce qui a été attribué à un effet cytotoxique direct sur les organes génitaux (Mahaneem et *al.*, 2011; Mosbah et *al.*, 2015). D'autres substances comme le plomb ont induit les mêmes répercussions sur les organes génitaux chez les rats mâles, et du fait que le fonctionnement et le poids des organes génitaux sont sous la dépendance des androgènes, une perturbation de la sécrétion de ces hormones a été postulée être en cause de la diminution de leur poids (Anjum et *al.*, 2011). Cette dernière suggestion est supportée par les résultats auxquels nous avons aboutis lors de l'étude hormonale, où nous avons noté des taux sériques très bas de la testostérone.

Par ailleurs, un degré considérable de toxicité a été également induit par les ATT sur la qualité du sperme épидидymaire. Les alcaloïdes totaux ont diminué le nombre, la mobilité et la viabilité des SPZ chez les rats intoxiqués. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs chercheurs qui ont montré que l'exposition chronique à la fumée de cigarette provoquait une diminution de la qualité du sperme chez l'homme et chez les rats, associée dans la plupart du temps à une augmentation des radicaux libres et une diminution simultanée des substances antioxydantes dans le sperme (Peltola *et al.*, 1994 ; Tremellen, 2008; Wright *et al.*, 2014). De plus, une présence de quantité élevée de SPZ morphologiquement anormaux dans le sperme a été constatée en corrélation avec un état de stress oxydatif chez l'homme (Agarwal *et al.*, 2003). Ce paramètre n'a pas été évalué dans notre étude à cause de la difficulté de trouver un tableau commun comparatif qui illustre les anomalies morphologiques des SPZ chez le rat, et de la présence d'une différence entre les anomalies qui ont été prises en considération dans différentes études lors de cet examen (Lee *et al.*, 2015; Akintunde *et al.*, 2015).

Le stress oxydatif peut être donc considéré comme un mécanisme majeur d'induction des effets toxiques sur le sperme par le tabac. En effet, de multiples points évidents supportent le rôle du stress dans la toxicité du tabac et de la nicotine (Kovacic et Cooksy, 2005). Nombreuses études expérimentales chez les rats ont montré que la nicotine est capable de générer des ROS dans le foie (Bagchi *et al.*, 1998), la rate (Ahmed *et al.*, 2014), et les testicules (Jana *et al.*, 2010). L'exposition à la nicotine a provoqué un stress oxydatif et une augmentation des taux de TBARS qui a été attribuée à la capacité de la nicotine d'engendrer une forte production des ROS (Muthukumaran *et al.*, 2008), en entraînant essentiellement des dommages au niveau des mitochondries et provoquant par la suite une forte libération des ROS endogènes (Helen *et al.*, 2003). Ces suggestions sont supportées par les travaux de Bagchi *et al.*, 1998 qui ont constaté une peroxydation mitochondriale au niveau du foie après 45 jours de traitements par l'extrait aqueux du tabac chez le rat. Ils ont supposé qu'une première génération des ROS lors du métabolisme hépatique de la nicotine est responsable de la peroxydation lipidique des mitochondries, qui va induire à son tour, une amplification de la génération des ROS à partir de ces mitochondries. Cependant, la forte génération des ROS ne constitue pas la seule manière par laquelle un stress oxydatif est provoqué. Une diminution de l'activité enzymatique des principales enzymes antioxydantes à savoir la catalase, et la SOD a été de même observée

chez des rats traités par la nicotine au niveau des poumons, du foie et des reins (Kalpana et Menon, 2004).

D'autre part, la forte proportion des AGPI dans les SPZ les rend très fragiles, et plus vulnérables au stress oxydatif (Hazout et *al.*, 2008; Kao et *al.*, 2008; Hekmatdoost et *al.*, 2009). Cette forte présence des AGPI dans la membrane des SPZ qui prend place lors de la maturation épидидymaire est connue pour être responsable de l'augmentation de la flexibilité et de la fluidité des flagelles, en induisant conséquemment l'acquisition de la mobilité par les SPZ qui ne seront matures qu'après cette étape. De plus, l'élimination d'une grande quantité du cytoplasme des CG lors de leur spermiation et transformation en SPZ à l'issue de la spermatogenèse semble être responsable d'une forte diminution des défenses enzymatiques antioxydantes chez les SPZ (Lenzi et *al.*, 1996). Ces deux facteurs associés augmentent la vulnérabilité des SPZ et la possibilité pour qu'ils soient attaqués par les ROS (Kourouma et *al.*, 2015). En fait, les ROS sont des molécules instables et hautement réactives, qui peuvent induire une rupture de l'intégrité des membranes plasmatiques des SPZ (Agarwal et *al.*, 2014). Elles vont facilement saisir un électron à partir des doubles liaisons de carbone (C=C) pour être stables, alors que l'acide gras qui a perdu l'électron va devenir un radical lipidique. Ce dernier, en se liant à une molécule d'oxygène va former un peroxy radical et va chercher à être stabilisé en s'emparant d'un électron de la part d'une autre double liaison en formant ainsi un nouveau radical lipidique, puis les réactions s'enchainent pour produire plusieurs radicaux libres et une propagation de la peroxydation des lipides qui peut mener à des dommages bien considérables à savoir une rupture complète de la membrane cellulaire et la mort de la cellule (Jerzy, 2013). La forte proportion des AGPI au niveau des membranes des SPZ va donc favoriser ces réactions.

Les antioxydants normalement présents dans l'organisme, peuvent lutter contre ce phénomène. Cependant, nous avons constaté une diminution de l'activité antioxydante totale au niveau plasmatique et tissulaire, ce qui peut augmenter le risque de la survenue d'un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants, et d'un état de stress oxydatif consécutif. Dans notre étude, l'altération de la mobilité et de la viabilité est plus prononcée que celle du nombre des SPZ. En outre, nous avons également constaté une diminution plus importante de l'activité antioxydante totale aussi bien au niveau épидидymaire qu'au niveau testiculaire. Ceci, peut expliquer au moins en partie la différence entre les niveaux d'altération des paramètres spermatiques qui semblent être

liés à l'atténuation des défenses antioxydantes des compartiments dans lesquels ces caractères de SPZ sont assurés.

Par ailleurs, d'autres mécanismes ont été postulés pour être responsables de la diminution de la qualité du sperme. Nombreux chercheurs ont suggéré que la production des anticorps anti-SPZ due essentiellement au passage des antigènes spermatiques dans la circulation sanguine dans les cas pathologiques, entraînait une agglutination des SPZ et une diminution de leur mobilité par conséquence (Bohring et Krause, 2005 ; Zini *et al.*, 2010). Plus récemment, d'autres chercheurs ont constaté une corrélation plus importante entre la présence des anticorps anti-SPZ et le taux de la fragmentation de l'ADN des SPZ chez des hommes infertiles, dont le pourcentage des SPZ avec une fragmentation d'ADN chez les hommes présentant des anticorps anti-SPZ était 1.3 fois plus que chez les hommes infertiles qui ne les présentent pas (Bozhedomov *et al.*, 2015). Ceci a été corrélé à une forte présence des ROS dans le sperme, ce qui renforce le rôle du stress oxydatif dans l'induction des anomalies des SPZ. Dans notre étude, nous n'avons constaté que deux cas sporadiques d'agglutination des SPZ lors de l'évaluation de la mobilité. Bien que l'incrimination de ce cas pathologique nécessite une observation plus importante que celle que nous avons relevée, une étude de l'intégrité de la barrière hémato-épididymaire, qui rend l'épididyme un environnement immunosuppresseur, doit être réalisée pour confirmer ceci.

De plus, il est toutefois essentiel que le milieu luminal soit d'un pH acide et de faible concentration de bicarbonate afin d'éviter que les spermatozoïdes n'épuisent leur réserve d'énergie en les maintenant dans un état de dormance pendant leur séjour dans l'épididyme. Ces conditions ne seront modifiées qu'après une éjaculation par une augmentation transitoire de la concentration de bicarbonate dans la lumière épididymaire, sécrétée par les cellules principales, contribuant à pré-activer les spermatozoïdes avant l'éjaculation par l'activation directe de l'adenylate cyclase, l'enzyme responsable de la capacitation des SPZ, par les ions du bicarbonate (Breton et Da Silva, 2012). La possible rupture de la barrière hémato-épididymaire pourrait perturber ce mécanisme de régulation en induisant un épuisement total des réserves énergétiques et une diminution de la viabilité et de la mobilité des SPZ.

Sur le plan histologique, nous avons également observé une atteinte de la structure testiculaire à savoir une hypotrophie du tissu interstitiel, une perturbation de la spermatogenèse, et une altération de l'épithélium séminifère. Ces résultats sont en

concordance avec ceux constatés dans une étude récente qui a évalué les effets reprotoxiques de la nicotine (Mosbah et *al.*, 2015). Comme nous venons de le rapporter, ceci peut être attribué à une peroxydation lipidique au niveau des testicules qui est confirmée par les fortes concentrations en TBARS que nous avons constatées à ce niveau. Ceci n'exclut pas l'existence d'autres effets inducteurs à savoir la diminution du taux de la testostérone. De plus, il a été démontré que la forte présence des ROS au niveau tissulaire est capable d'induire et d'accélérer la mort cellulaire par apoptose, ce qui peut également expliquer la forte diminution des cellules de la lignée germinale, et les cellules régulatrices de la fonction de la reproduction présentes dans les testicules (Koksal et *al.*, 2003). Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme physiologique pour éliminer les cellules surnuméraires ou défectueuses, de nombreuses études expérimentales ont mis le point sur l'effet potentiel des produits toxiques, en amplifiant l'apoptose, d'engendrer des atteintes histologiques et d'éliminer les cellules fonctionnelles de la lignée germinale (Ronis et *al.*, 1996; Elgohary et *al.*, 1999). Chez des rats exposés à la fumée de cigarette, une amplification de l'apoptose des cellules de la lignée germinale a été détectée, et l'apoptose serait considérée comme l'un des mécanismes inducteurs des altérations testiculaires par le tabac sur le plan histologique (Rajpurkar et *al.*, 2003).

L'étude hormonale a révélé une perturbation de la régulation hormonale de la fonction reproductrice chez les rats traités par les ATT. Nos résultats ont montré une forte réduction du taux sérique de la testostérone associée à une augmentation du taux de la LH, tandis que la FSH n'a pas été significativement modifiée par les ATT. Dans ce contexte, les résultats obtenus lors de l'étude des effets du tabac sur les hormones sexuelles chez l'homme sont contradictoires. Dans une étude prospective, aucune corrélation n'a été observée chez les fumeurs en comparaison aux non-fumeurs en ce qui concerne les taux des hormones sexuelles (Halmenschlager et *al.*, 2009).

A contrario, dans une étude clinique plus récente, les fumeurs ont été classés selon le type de cigarettes qu'ils consomment. Une amplification des taux sériques de la LH a été observée chez les hommes qui consomment des cigarettes contenant des concentrations élevées de la nicotine, alors que les cigarettes à faible concentration de la nicotine n'ont induit aucun changement de la LH, ce qui supporte que la nicotine peut se comporter comme un perturbateur endocrinien (Mello, 2010). En effet, une augmentation significative de la LH et de la testostérone a été constatée chez les fumeurs (Svartberg et Jorde, 2007). Cette même observation a été faite par d'autres chercheurs qui ont noté une

augmentation hautement significative de ces deux hormones chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs quel que soit le nombre de cigarettes consommées (Blanco-Muñoz et *al.*, 2012). Ceci supporte nos résultats, où nous n'avons pas constaté une dose-dépendance de l'effet des ATT sur la testostérone qui a été très sévère quelle que soit la dose administrée des ATT, sauf que nous avons constaté une diminution et non pas une augmentation des taux sériques de la testostérone chez les animaux traités par les ATT. De même, la diminution du taux sérique de la testostérone a été également constatée après l'exposition à la nicotine chez des rats mâles, en suggérant que la diminution du nombre des cellules de Leydig était en cause de cette hypostéroïdogénèse (Mosbah et *al.*, 2015). Nos résultats de l'étude histologiques confirment cette suggestion.

Par ailleurs, dans l'ensemble de ces études, aucun effet de la fumée de cigarette ni de la nicotine sur la FSH n'a été noté. Ces observations peuvent être expliquées par l'absence d'un effet direct du tabac sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, attendu que les variations de la LH peuvent être attribuées à une perturbation du feedback négatif de la testostérone sur la sécrétion de cette hormone.

Les résultats auxquels nous avons aboutis révèlent donc un effet reprotoxique considérable des ATT sur différents plans, qui est certainement lié à un stress oxydatif.

Du fait que nous avons pu confirmer que la reprotoxicité des ATT est stress oxydatif-dépendante, nous nous sommes proposé de réaliser une approche préventive visant la préservation d'une fertilité normale chez les rats traités par les ATT en luttant contre le stress oxydatif, par l'utilisation des antioxydants. Avant de passer à l'étude *in vivo*, une évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits obtenus suivant différents protocoles d'extractions a été réalisée visant à optimiser de l'utilisation de thé vert pour lutter contre le stress oxydatif.

Nos résultats de l'étude phytochimique ont montré que les différents extraits de thé vert sont dotés d'une forte activité antioxydante lors du test de la DPPH, qui varie d'un extrait à un autre. Parmi ces derniers, l'FAE a montré la valeur de la CI50 la plus faible, ce qui indique sa possession de l'activité antioxydante la plus importante par rapport aux autres extraits, et à l'acide ascorbique que nous avons utilisé comme témoin positif. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par d'autres chercheurs qui ont mis le point sur l'importance de l'activité antioxydante de l'extrait de thé vert qui dépasse celles de plusieurs substances synthétiques généralement utilisées comme antioxydants surtout dans la conservation des aliments (Chen et *al.*, 1996; VonGadow et *al.*, 1997).

La détermination de la composition de la FAE a révélé la présence de quatre substances seulement (C, EC, ECG et la CAF). Avec seulement ces quatre substances, la FAE aurait présenté une activité antioxydante moins importante que celle de l'extrait total, au moment où nous avons observé l'inverse. Cependant, ceci peut être justifié par la possible interaction entre les molécules antioxydantes présentes dans un mélange appelé « the mixture effect », qui peut diminuer leur réactivité vis-à-vis des ROS (Cuvelier et *al.*, 1996 ; Becker et *al.*, 2007). De plus, la première étape de l'extraction qui a abouti à l'obtention de l'extrait total de thé vert n'est pas spécifique aux flavonoïdes. Selon Ignat et *al.*, 2013, cette méthode risque d'induire une co-extraction d'autres substances tels que les sucres, les lipides et les protéines avec lesquels les substances antioxydantes peuvent former des complexes moins solubles et d'une réactivité réduite. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres chercheurs qui ont évalué l'effet des interactions entre les flavonoïdes dans un mélange. Les valeurs théoriques obtenues par le calcul de la somme des valeurs d'activité antioxydante de chaque molécule étaient supérieures aux valeurs expérimentales obtenues par les mélanges lors de l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (Palafox-Carlos et *al.*, 2012). Ceci a été attribué à la tendance des flavonoïdes à former des complexes lors qu'ils sont présents en mélange, en formant des liaisons d'hydrogènes qui sont favorisées par la présence de molécules de polarité différentes. Cette interaction risque de cacher les groupements hydroxyle qui sont responsables de l'activité antioxydante de ces substances, dont résulte une diminution de cette dernière (Hidalgo et *al.*, 2010). Ces suggestions sont supportées par les travaux de Palafox-Carlos et *al.*, 2011 qui ont démontré qu'une corrélation positive existe entre le nombre des groupements hydroxyles libres et l'activité antioxydante.

Dans notre étude, le fractionnement de l'extrait total a abouti à la séparation des molécules selon leur degré de polarité. Du fait que les molécules présentes dans une même fraction sont de polarité presque identique, ceci aurait empêché la formation d'un grand nombre de liaisons d'hydrogènes entre les molécules. De plus, le faible nombre de molécules de la FAE aurait également minimisé les interactions entre ces dernières.

D'autre part, les travaux de Gramzaa et *al.*, 2006, ont testé l'activité antioxydante de plusieurs extraits de thé et essayé de mettre un lien entre la composition de l'extrait et son activité antioxydante. Ils ont trouvé que cette dernière montre une forte corrélation avec la présence de la C, EC et ECG, mais aucune corrélation n'a été observée avec d'autres catéchines tel que l'EGCG. Deux parmi les trois substances avec lesquelles l'activité

antioxydante est corrélée sont présentes dans la FAE. Ces résultats peuvent justifier l'utilisation de la FAE dans l'étude *in vivo* pour lutter contre le stress oxydatif induit par les ATT.

Par ailleurs, dans une étude clinique, il a été observé que la concentration des catéchines dans le plasma des hommes qui ont consommé le thé vert est très faible constituant entre 0,2% et 2% de la quantité de thé consommé. Ceci a été considéré comme une faible biodisponibilité des catéchines, qui doit être améliorée pour avoir des effets plus remarquables de ces substances (Nakagawa et *al.*, 1997). Selon Serafini et *al.*, 1996, la biodisponibilité des polyphénols dans le plasma est plus importante après la consommation des suppléments préparés à partir de l'extrait de thé qu'après la consommation d'un thé entier. Comme nous venons de le rapporter, l'interaction entre les molécules phénoliques et non phénoliques après la consommation de thé entier risque de diminuer l'absorption à cause de la formation des complexes qui pourront être insolubles (Ignat et *al.*, 2013).

De plus, d'autres mécanismes ont été rapportés. Dans une étude *in vitro*, les catéchines ont montré un degré de stabilité plus important dans des conditions acides, alors qu'elles se dégradent très rapidement dans un pH alcalin (Zhu et *al.*, 1997). Dans ce même contexte, d'autres chercheurs ont supposé que les catéchines peuvent être mieux absorbées dans un estomac vide avec un pH gastrique acide, qu'après un repas dont le pH gastrique va être changé (Chow et *al.*, 2011). Dans notre étude, les animaux ont été traités par la EAF en premier, avant la présentation de l'alimentation ce qui aurait amélioré la biodisponibilité des catéchines. Selon Chow et *al.*, 2005, ceci peut significativement améliorer l'effet biologique des catéchines en augmentant leur concentration plasmatique jusqu'à 3 à 4 fois chez les sujets en bonne santé.

D'autre part, la possible bioaccumulation des catéchines dans les tissus a été confirmée (Terao et Mukai, 2014). Dans notre étude, l'amélioration de l'activité antioxydante totale tissulaire et la diminution du taux de la peroxydation lipidique à ce niveau peuvent être liées à cette bioaccumulation des catéchines dans les tissus visés. Néanmoins, la bioaccumulation dans des tissus non visés qui n'ont pas été attaqués par les ATT, ou qui n'ont pas fait l'objet de notre étude ne doit pas être négligée, car elle peut diminuer le processus de l'élimination des catéchines. Ce dernier point nécessite d'autres études complémentaires pour bien l'élucider.

Dans l'étude *in vivo*, nous avons constaté une diminution du poids corporel moyen plus prononcée chez les rats traités par l'FAE. Des résultats similaires ont été obtenus chez des animaux de laboratoires exposés à l'extrait de thé vert en vue d'une prévention contre l'obésité. Les catéchines de thé vert ont montré une capacité considérable à augmenter la β oxydation des lipides au niveau hépatique, ce qui peut éliminer l'accumulation viscérale des lipides et contribuer à la diminution du poids corporel conséquemment. Néanmoins, d'autres explications ont été supposées pour expliquer des résultats similaires. Les catéchines de thé vert ont induit une réduction de l'accumulation des lipides chez des souris soumises à un régime hyper-gras. Ces résultats ont été en association à une forte présence des lipides dans la matière fécale des souris, ce qui indique que les catéchines ont diminué l'absorption des lipides. Ces résultats viennent confirmer que le thé vert est très utile pour lutter contre l'obésité. De même, nos résultats ont montré une réduction très significative du poids corporel ce qui indique que l'utilisation de la FAE pourrait être plus efficace.

Par ailleurs, les animaux traités par la FAE et les ATT de manière combinée ont montré une réduction de l'altération de la fonction reproductrice masculine à savoir une amélioration de la structure histologique testiculaire, de la qualité du sperme épидидymaire, et une correction des taux sériques des hormones sexuelles. Ces résultats sont plus impressionnants chez les rats traités par la FAE combinée aux ATT à faible dose. Des résultats comparables à ceux des témoins ont été constatés ce qui indique que la FAE est très efficace pour lutter contre la reprotoxicité des ATT à faible dose.

Cependant, à forte dose, l'amélioration des paramètres spermatiques, histologiques, biochimiques et hormonaux était significative chez les rats traités par la FAE et des ATT par rapport à ceux traités par les ATT seuls à la même dose, où nous avons constaté des répercussions très sévères qui pouvaient être irréversibles à cause de la rupture de l'intégrité de la BHT et l'hypotrophie sévère du tissu interstitiel. La FAE n'a pas pu conserver une fertilité normale comparable à celle des témoins, comme c'était le cas pour la faible dose, mais elle a augmenté la chance pour que les altérations soient réversibles.

De plus, nous avons remarqué que l'utilisation de la FAE dotée d'une forte activité antioxydante a diminué considérablement la présence des indicateurs du stress oxydatif. Cet effet protecteur de la FAE contre le stress oxydatif associé à une amélioration de la fonction reproductrice sur les différents plans étudiés, renforce le lien entre la

reprotoxicité du tabac et le stress oxydatif que nous avons supposé dès le début qu'il soit le principal mécanisme majeur de l'induction de cette reprotoxicité par le tabac.

Du fait de l'absence d'un effet direct des ATT sur la FSH qui n'a pas été constaté chez les différents groupes expérimentaux, et que la variation de la LH peut être consécutive à une perturbation de la sécrétion de la testostérone qui a été, à son tour, liée à une diminution du nombre des cellules de Leydig suite aux altérations histologiques stress-oxydatif dépendante, la perturbation de la régulation endocrinienne ne peut être considérée par contre qu'autant qu'un mécanisme mineur qui peut amplifier les répercussions du stress oxydatif lors de l'exposition aux ATT.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Notre étude a été réalisée pour évaluer les effets des ATT sur la fonction reproductrice masculine, et pour la recherche et le développement d'une approche préventive. La présente étude multiparamétrique nous a permis de déterminer les répercussions possibles et l'efficacité du traitement préventif par l'extrait de thé vert sur un large spectre incluant la qualité du sperme, la structure histologique des gonades, le taux des hormones sexuelles ainsi que des paramètres biochimiques en relation avec le stress oxydatif.

Nos résultats ont montré que les ATT ont induit une considérable reprotoxicité sur les différents plans étudiés. Nous avons constaté une diminution de la qualité du sperme épидидymaire, une altération de la structure histologique testiculaire associée à des taux élevés de TBARS, et une diminution de l'activité antioxydante plasmatique et tissulaire des testicules et des épидидymes chez les rats intoxiqués par les ATT. Ces effets ont été proportionnels à la dose administrée, où nous avons constaté des effets plus prononcés chez les animaux traités par la forte dose par rapport à ceux traités par la faible dose.

L'intensité de l'atteinte du sperme et de la structure histologique était dépendante de la diminution des défenses antioxydantes et du taux de la peroxydation lipidique tant au niveau tissulaire qu'au niveau plasmatique où nous n'avons pas constaté une grande différence par rapport aux témoins. Ceci vient confirmer l'incrimination du stress oxydatif dans l'induction de la reprotoxicité du tabac, ce qui peut être considéré comme un mécanisme majeur de l'induction de cette dernière.

De plus, nous avons constaté une perturbation de la régulation hormonale qui s'en résulte dans une diminution très sévère du taux de la testostérone chez les rats traités par les ATT quelle que soit la dose, au moment où l'augmentation du taux de la LH était dose dépendante. En prenant en considération l'absence d'un effet remarquable des ATT sur la FSH, la perturbation de la sécrétion de la LH est attribuable à l'atténuation de la stéroïdogénèse au niveau testiculaire.

Par ailleurs, la FAE utilisée dans la deuxième partie de l'étude a montré un effet préventif considérable vis-à-vis des effets reprotoxiques des ATT. L'efficacité du traitement par la FAE était dépendante de la dose des ATT. Une conservation quasi-complète des différents compartiments et fonctions de la reproduction a été constatée chez les rats traités par la FAE en combinaison aux ATT à faible dose. Cependant, à forte dose des ATT, l'amélioration très importante de ces paramètres cités ci-dessus n'a pu

atteindre un niveau comparable aux témoins. Néanmoins, la diminution de la sévérité des effets induits par les ATT à forte dose peut donner chance pour que ces effets soient réversibles.

Du fait de l'absence de tous effets toxiques liés à l'utilisation de la FAE, ceci peut justifier l'importance de son utilisation, qui peut même franchir la barrière de la reprotoxicité du tabac vers un large spectre de problèmes de l'infertilité masculine comme féminine liés à un stress oxydatif, tel que l'exposition à d'autres substances toxiques notamment les métaux lourds, ou encore plus à l'obésité en prenant en considération son effet anti obésité que nous avons constaté lors de cette étude.

Les obstacles que nous avons rencontrés tout au long de la réalisation de ce travail nous ont empêchés d'achever la démarche que nous avons envisagée. D'autres tests supplémentaires essentiellement la mise en évidence des cellules apoptotiques au niveau des gonades, l'étude de l'intégrité des barrières hémato-tissulaires, et d'autres analyses hormonales pour bien éclaircir l'effet du tabac sur le système endocrinien pourront être donc ultérieurement envisagés.

Bien que la proportion de femmes qui consomment les produits du tabac à travers le monde soit en augmentation, une étude préclinique sur des ratte femelles comparable à celle que nous avons présentée peut construire également un nouvel axe de recherche qui semble être plus important du fait de la complexité de la vulnérabilité du système reproducteur féminin, ainsi que de la possibilité de transmission des répercussions aux descendants si l'exposition se produira pendant la gestation. Dans ce contexte, une étude multiparamétrique pourrait être réalisée pour tester à la fois, la reprotoxicité et l'effet tératogène des alcaloïdes du tabac.

Une caractérisation quantitative de la FAE et une modélisation de son extraction associée à une étude toxicologique et pharmacologique de cette dernière peuvent mener à accroître l'intérêt de son utilisation dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire, pouvant même atteindre une industrialisation d'un nouveau produit qui peut remplacer les antioxydants parapharmaceutiques comestibles ou même synthétiques utilisés pour la conservation des aliments.

Cependant, l'utilisation des animaux de laboratoire pour accomplir ce qui peut constituer une perspective pour notre recherche est désormais l'objet de débat essentiellement de la part des défenseurs du bien-être des animaux. D'autres techniques alternatives de l'utilisation des animaux portées notamment sur les cultures cellulaires et

qui sont d'un niveau supérieur de précision peuvent être utilisées selon leur faisabilité et selon le développement des connaissances à ce propos, suivant la loi des 3R (Remplacer. Réduire. Raffiner) dont le but est de diminuer les effets ou la gravité des procédures infligées aux animaux.

Références bibliographiques

A

Abid, S., Maitra, A., Meherji, P., Patel, Z., Kadam, S., Shah, J., Shah, R., Kulkarni, V., Baburao, V. et Gokral, J., Clinical and Laboratory Evaluation of Idiopathic Male Infertility in a Secondary Referral Center in India. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* , 2008; 22, pp.29-38.

Abrous, N.e.a., Tabac Comprendre la dépendance pour agir. Paris: Inserm. 2004. pp.1-20.

Académie de Rouen, Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire. Support de cours. 2010. pp.1-12.

Adamo, C., Antignac, J.P., Auger, J. Et Al, E., Reproduction Et Environnement. Paris: Inserm. 2011. Pp.43-44.

Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J. et Vazquez-Levin, M., Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2014; 29, pp.32-58.

Agarwal, A., Saleh , R.A. et Bedaiwy, M.A., Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril*, 2003; 79, pp.29-43.

Ahmed, M.A., Hassan, K.H., Hassanein, K.A. et Waly, H., Role of vitamin C and selenium in attenuation of nicotine induced oxidative stress, P53 and Bcl2 expression in adult rat spleen. *Pathophysiology* , 2014; 21, pp.211-17.

Akintunde, J.K., Oboh, G. et Akindahunsi, A.A., Sub-chronic exposure to EOMABRS leachate induces germinal epithelial cell lesions, sperm abnormalities and oxidative damage in rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction* , 2015; 4(4), pp.288–97.

Alvarez , J.G. et Storey , B.T., Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1995; 42, pp.334-46.

Alvarez, S. et Devouche, E., Premie` re enque^te nationale franc,aise sur les modes de vie et les facteurs toxiques. *Gyne´ cologie Obste´ trique & Fertilité*, 2012; 40 , pp.765–71.

Anjum, M.R., Sainath, S.B., Suneetha , Y. et Reddy, B.S., Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011; 74, pp.793–99.

ARIB , O., Etude électrophysiologique des effets du tabac, de sa fumée et de la nicotine sur des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale *in vivo* chez le rat, la souris sauvage et la souris $\beta 2$ KO. Thèse de Doctorat. Paris: Université PARIS XII 2009. pp.9-12.

ASH, Tobacco additives, cigarette engineering and nicotine addiction. united kingdom: Action on Smoking and health 1999.

B

Baccetti , B., Collodel , G. et Piomboni , P., Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). J Submicrosc Cytol Pathol, 1996; 28(4), pp.587–96.

Bagchi, M., Bagchi, D., Hassoun, E.A. et Stohs, S.J., Subchronic effects of smokeless tobacco extract (STE) on hepatic lipid peroxidation, DNA damage and excretion of urinary metabolites in rats. Toxicology, 1998; 127, pp.29-38.

Barriounevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M.M., Englert, C. et Scherer, G., Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. Biol Reprod, 2006; 74(1), pp.195-201.

Bearden, H.J., Fuquay, J. et Willard, S., eds., Applied animal reproduction. 6th ed. New Jersey: Pearson Education. 2004. p.427.

Becker, E.M., Ntouma, G. et Skibsted, L.H., Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. Food Chem, 2007; 103, pp.1288-96.

Béguel, j.p., Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne occidentale 2013. P.19.

Benalia, A., Bendahmane, M. et Aithamadouche, N., Green Tea Protective Effect against Total Alkaloids of Tobacco Inducing Reprotoxic Effects in Male Albino WISTAR Rats. J. Appl. Environ. Biol. Sci., 5(12)1-1, 2015 , 2015; 5(12), pp.8-18.

BENGUERBA, A., Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece *Inula crithmoides* L. Mémoire de Magister. Constantine: Université Mentouri 2008. Pp.5-6.

Benhammou, N., Bekkara , F.A. et Panovska, T.K., Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. C. R. Chimie, 2009; 12, pp.1259-66.

Benzie, I.F. et Strain, J.J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry , 1996; 239, pp.70–76.

Berger, M.M., Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme , 2006; 20, pp.48–53.

Bishop, C., Parker, G.C. et Coscina, D.V., Systemic nicotine alters whole-body fat utilization in female rats. *PhysiolBehav*, 2004; 80, pp.563–67.

Blanco-Muñoz, J., Lacasaña, M. et Aguilar-Garduño, C., Effect of current tobacco consumption on the male reproductive hormone profile. *Science of the Total Environment*, 2012; 426, pp.100–05.

Bohring, C. et Krause, W., The role of antisperm antibodies during fertilization and for immunological infertility. *Chem Immunol Allergy*, 2005; 88, pp.15-26.

Boissonnas, C.C., Jouannet, P. et Jammes, H., Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil. Steril*, 2013; 99, pp.624–31.

Boswell, C., Curvall, M., Elswick, R.K. et Leyden, D., Modelling nicotine intake in smokers and snuff users using biological fluid nicotine metabolites. *Biomarkers*, 2000; 5, pp.341-54.

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J. et Trakatellis, A.G., Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feed-stuff samples. *J. Agric. Food Chem.*, 42: , 1994; 42, pp.1937-31.

Boubekri, C., Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat. Biskra : Université de Biskra 2014. pp.24-25.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. et Gontier, E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 2001; 161, pp.839–51.

Bozhedomov, V.A., Nikolaeva, M.A., Ushakova, I.V., Lipatova, N.A., Bozhedomova, G.E. et Sukhikh, G.T., Functional deficit of sperm and fertility impairment in men with antisperm antibodies. *Journal of Reproductive Immunology*, 2015; 112, pp. 95–101.

Breton, S. et Da Silva, N., 2012. Role of the epididymis in the control of male fertility. *Médecine Sciences Amérique*, pp.14-33.

Brugnon, F., Apoptose du spermatozoïde et fertilité masculine. thèse de Doctorat. Université d'Auvergne 2009.

Buege, A.L. et Aust, D.S., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In S. Fleisher & L. Parker, eds. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. pp.306-10.

C

Carmaux, S., caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioreacteur. Thèse de Doctorat. Nancy: Université Henri Poincaré 2008. pp.20-24.

Carpenter, C., Connolly, G., Ayo-Yusuf, O. et Wayne, G., Developing smokeless tobacco products for smokers: an examination of tobacco industry documents. *Tob. Control*, 2009; 18, pp.54-59.

Cavallini, G., Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; 8 (2): 143–157, 2006; 8(2), pp.143–57.

Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ma, H.M., Fung, K.P. et Wang, J., Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 1996; 73, pp. 375-380.

Cheng, C.Y. et Mruk, D.D., DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00012-0> Biochemistry of Sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport, and spermiation in the seminiferous epithelium. Elsevier 2015.

Chen, H., Vlahos, R., Bozinovski, S., Jones, J., Anderson, G.P. et Morris, M.J., Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30, pp.713-19.

Chow, H.H., Cai, Y., Alberts, D.S., Hakim, I., Dorr, R., Shahi, F., Crowell, J.A., Yang, C.S. et Hara, Y., Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechingallate and Polyphenol E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011; 10(1), pp.53-8.

Chow, H.H., Hakim, I.A., Vining, D.R., Hakim, I.A., Vining, D.R. et Crowell, J.A.e.a., Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(12), pp.4627–33.

Chughtai, B., Sawas, A., O'Malley, R.L., Naik, R.R., Ali khan, S. et Pentyala, S., A neglected gland: a review of Cowper's gland. *Int J Androl*, 2005; 28(2), pp.74-77.

Cohen-Bacrie, P., Hazout, A. et Hamamah, S., 2007. Place des marqueurs séminaux dans l'évaluation de la fertilité. In *Les XXIIIe Journées de techniques avancées en gynécologie, obstétrique, PMA et pédiatrie.*, 2007.

Commenges-Ducos, M., Clinical assessment of toxics deleterious to fertility. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2006; 34, pp.985–89.

Cooper, R., Morré, D.J. Et Morré, D.M., Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. *The journal of alternative and complementary medicine*, 2005; 11(3), pp.521–28.

Courtois, E., Le parfum de la défense des plantes en forêt amazonienne. Thèse de Doctorat. Toulouse: l'Université Toulouse III – Paul Sabatier 2010. pp.15-16.

Cuvelier, M.E., Maillard, M.N. et Berset, C., Effect in pure phenolic antioxidant mixtures and in plant extracts. Synergistic and antagonistic. In the 1st Congress of the European Section of AOCS, 1996; pp.15–18.

D

Dacheux, J.L., Gatti, J.L. et Dacheux, F., Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Techniques* , 2003; 61, pp.7-17.

Delage , C., Le sevrage tabagique en 2008. Thèse pour l'obtention de diplôme de Docteur en Pharmacie. Nancy : Université henri poincare 2008. pp.20-22.

Doumerc, G.S., Elevage et reproduction des rongeurs. Thèse de Doctorat. France: Ecole nationale veterinaire d'alfort 2004. p.58.

Duan, P., Hu, C., Quan, C., Yu, T., Zhou, W., Yuan, M., Shi, Y. et Yang, K., 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways. *Toxicology* , 2016; 341, pp. 28–40.

Dubé, E. Et Cyr, D.G., Étude du rôle de la barrière hémato-épididymaire dans le maintien de la fertilité. *Bull. Soc. zool. Fr*, 2007; 132(1), pp.31-36.

Dunet , J., Reactions de michael et de mannich appliquees a des arylcyclohexa-2,5-dienes en vue de la synthese d'alcaloides de type aspidosperma et morphinanes. Thèse de doctorat. bordeaux: L'université bordeaux i 2009. pp.8-9.

Dussault, J., 2009. Le spermogramme. *Sommaire scientifique*, Février. pp.1-8.

E

El-gohary, M., Awara, W., Nassar, S. et Hawas, S., Deltarmethrin-induced testicular apoptosis in rats : the protective effect of nitricoxide synthase inhibitor. *Toxicology*, 1999; 132, pp.1-8.

El-Taieb, M.A., Ali, M.A. et Nada, E.A., Oxidative stress and acrosomal morphology: A cause of infertility in patients with normal semen parameters. *Middle East Fertility Society Journal* , 2015; 20, pp.79–85.

Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, T. et Folts, J.E.a., Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. *The Journal of Nutrition*, 2007; 137, pp.718–37.

F

Faure, S., Babin, M., Velé, H., Dubé, G., Samson, M. Et Loubrieu, V., 2014. Le tabagisme aujourd'hui en France. *Actualités pharmaceutiques*, avril. pp.20-26.

Fernández, P.L., Martín, M.J., González, A.G. et Pablos, F., HPLC determination of catechins and caffeine in tea: Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*, 2000; 125, pp.421-25.

Frédéric , L., Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Thèse de Doctorat. Campus Veterinaire De Lyon 2011. p.34.

G

Garg, H. et Kumar, R., Empirical Drug Therapy for Idiopathic Male Infertility: What is the New Evidence? *Urology* 86 , 2015; 6, p.1065e1075.

Gawish, A.M., Issa, A.M., Bassily, N.S. et Manaa, S.M., Role of green tea on nicotine toxicity on liver and lung of mice: Histological and morphometrical studies. *African Journal of Biotechnology*, 2012; 11, pp.2013-25.

Gorbel, F., Boujelbene, M., Makni-Ayad, F., Guermazi, F., Groute, F., Soleilhavoup, J.P. et EL-FEki, A., Exploration des effets cytotoxique du plomb sur la fonction sexuelle endocrine et exocrine chez le rat pubère mâle et femelle. Mise en évidence d'une action apophatique. *Comptes rendus biologie*, 2002; 325, pp. 927-940.

Gramzaa, A., Khokharb, S., Yokob, S., Gliszczynska-Swigloc, A., Hesa , M. et Korczaka, J., Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 2006; 108, pp.351–62.

Grignard, E., Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires, et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères; *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Arvicola terrestris* Scherman. Thèse de Doctorat. Auvergne: Université Blaise Pascal 2005. pp.14-26.

H

Halmenschlager , G., Rossetto , S., Lara , G.M. et Rhoden , E.L., Evaluation of the effects of cigarette smoking on testosterone levels in adult men. *J Sex Med* , 2009; 6, pp.1763-72.

Hamelin, G., Caractérisation de la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat en vue d'une meilleure analyse de risque toxicologique des perturbateurs endocriniens. Université de Montréal. 2009. p.23.

Harbone, J.b., ed., *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall. 1998. p.302.

Harkati, B., Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera Undulata*. Thèse de Doctorat. Constantine: niversité Mentouri 2011. pp.14-22.

Hassan, M. et Killick, S., Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* , 2004; 81(2), pp.384–92.

Hazout , A., Menezo, Y., Madelenat, P., Yazbeck, C., Selva, J. et Cohen-Bacrie, P., Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoids. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2008; 36, pp.1109-17.

Hekmatdoost, A., Lakpour, N. et Sadeghi, M.R., Sperm Chromatin Integrity: Etiologies and Mechanisms of Abnormality, Assays, Clinical Importance, Preventing and Repairing Damage. *Avicenna J Med Biotech*, 2009; 1, pp.147-60.

Helen , A., Krishnakumar , K., Vijayammal , P.L. et Augusti, K.T., A comparative study of antioxidants S-allyl cysteine sulfoxide and vitamin E on the damages induced by nicotine in rats. *Pharmacology*, 2003; 67, pp.113-17.

Hermo, L., Adamali, H.I. et Andonian, S., Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J. Androl*, 2000; 21, pp.376-91.

Hermo, L. et Robaire, B., 2002. Epididymal cell types and their functions. In *The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press. pp.81-102.

Hess, R.A. et de Franca, L.R., Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* , 2008; 636, pp.1-15.

Hidalgo, M., Sánchez-Moreno , H.C. et De Pascual-Teresa, S., Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2010; 121, pp.691–96.

Hinton, B.T. et Robaire, B., 2015. The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Elsevier Inc. pp.691-771.

Human, D., Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ*, 2002; 37, p.14.

Hunt, P.A. et Hassold, T.J., Sex matters in meiosis. *Science*, 2002; 296(5576), pp.2181-3.

Ignat, I., Volfand , I. et Popa, V.I., 2013. nalytical Methods of Phenolic Compounds.. In K.G. Ramawat & G.M. Merillon, eds. *Natural Products*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 2061-2092.

I

Ijomone, O.M., Olaibia, O.K. et Nwoha, P.U., Effects of chronic nicotine administration on body weight, food intake and nitric oxide concentration in female and male rats. *Pathophysiology*, 2014; 21, pp.185–90.

J

Jana , K., Samanta , P.K. et Kumar De , D., Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant Status. *Toxicol Sci* , 2010; 116(2), pp.647–59.

Jana, K. et Sen, P.C., 2012. Environmental Toxicants Induced Male Reproductive Disorders: Identification and Mechanism of Action. In B. Acree, ed. *Toxicity and Drug Testing*. Rijeka: InTech. pp.474-518.

Jeun, J.M., Annie, F. et Chrystian. , J.L., les composés phénoliques des végétaux. laussane: Presses polytechniques et universitaires romandes. 2005. pp.203-06.

Jerzy, Z.N., Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacological Reports*, 2013; 65, pp.288-304.

Johnson, M.H. et Everitt, B.J., eds., *Reproduction*. 1st ed. Translated by F. Leroy. Paris, université de Bruxelles: De Boeck. 2002. pp.11-13. traduction de la 5ème édition anglaise.

Johnson, M.H. et Everitt, B.J., *Essential reproduction*. sixth edition ed. Massachusetts: Blackwell Publishing. 2007.

Jouannet, P., Wang, C. et Eustache, F., Semen quality and male reproductive health: the controversy about, human sperm concentration decline. *APMIS*, 2001; 109, pp.333-34.

K

Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. et He, X., Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* , 2014; 2, pp.377-392.

Kaci-Ouchfoun, N., Izemrane, D., Boudrissa, A., Gernigon, T., Khammara, F. et Exbrayat, J.M., Transgelin: An androgen-dependent protein identified in the seminal vesicles of three Saharan rodents. *Theriogenology* , 2013; 80, pp.748–57.

Kalpana, C. et Menon, V.P., Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during peroxidation and antioxidant status. *Pol J Pharmacol*, 2004; 56, pp.581-86.

Kao, S.H., Chao, H.T., Chen, H.W., Hwang, T.I., Liao, T.L. et Wei, Y.H., Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil. Steril*, 2008; 89, pp.83-90.

Kebieche, M., Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat. Constantine: Université Mentouri 2009. p.26.

Khalaf, A.A., Moselhy, W.A. et Abdel-Hamed, M.I., The protective effect of green tea extract on lead induced oxidative and DNA damage on rat brain. *NeuroToxicology*, 2012; 33, pp.280–89.

Khallouk, D., Tazi, M.F., EL Fass, M.J. et Farih, M.H., L'infertilité masculine : physiopathologie, bilan et prise en charge. *Espérance Médicale*, 2010; 17(170), pp.421-29.

Koechlin-Ramonatxo, C., Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006; 20, pp.165–77.

Koksal, I.T., Usta, M., Orhan, I., Abbasoglu, S. et Kadioglu, A., Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J. Androl*, 2003; 5, pp.95-99.

Koppenol, W.H., The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*, 2001; 6, pp.229–34.

Kourouma, A., Duan, P., Keita, H., Osamuyimen, A., Qi, S., Quan, C., Yu, T. et Yang, K., *In vitro* assessment of ROS on motility of epididymal sperm of male rat exposed to intraperitoneal administration of nonylphenol. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2015; 4(3), pp.169–78.

Kovacic, P. et Cooksy, A., Iminium metabolism for nicotine toxicity and addiction, oxidative stress and electron transfer. *Med. Hypotheses*, 2005; 64, pp.104-11.

Krüll, M., Bornstein, M.M., Saxer, U., Walter, C. et Ramseier, C.A., 2008. Effets généraux du tabagisme sur la santé – connaissances importantes pour la pratique de la médecine dentaire (I). *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, Mai. pp.414-20.

Krüll, M., Bornstein, M.M., Saxer, U., Walter, C. et Ramseier, C.A., 2008. Effets généraux du tabagisme sur la santé – connaissances importantes pour la pratique de la médecine dentaire (II). *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, Juin. pp.534-40.

L

L'Hôte, D., Exploitation d'un modèle de souris interspécifiques, recombinantes et congéniques pour la cartographie de QTL de la fertilité mâle et pour l'étude de la régulation génique testiculaire dans le contexte d'un génome mosaïque. THèse de doctorat. Université De Limoges 2009.

Le Moigne, A. et Foucrier, J., Biologie du développement. 7th ed. Paris: Dunod. 2009. p.162.

Lee, K.H., Chen, H.P., Leung, C.M., Chen, H.L., Tsai, S.S. et Hsu, P.C., Effects of indium chloride exposure on sperm morphology and DNA integrity in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015; 23, pp.152-60.

Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L. et Wolf, J.P., Leucospermie, stress oxydatif et fertilité masculine : certitudes et hypothèses. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2005; 33, pp.2–10.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandiniand, L. et Dondero, F., Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 1996; 2(3), pp.246–56.

Li, Z.H., Li, P., Dzyuba, B. et Randak, T., Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. *Chemico-Biological Interactions*, 2010; 188, pp.473–77.

Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L. et Kendall, P., Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT-Food Sci. Technol*, 2007; 40, pp.552–57.

Lohmiller, J.J. et Swing, S.P., *The laboratory rat*. 2nd ed. California: Elsevier. 2006.

M

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne : presses polytechnologiques et universitaires romandes. 2005. pp.4-5.

Mahaneem, M., Sulaiman, S.A., Jaafar, H., Salam, K.N., Sirajudeen, S. et Mohd Ismail, Z.I., Effect of Honey on Testicular Functions in Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2011; 3(1), pp.12 - 17.

Mansour, A., Investigation phytochimique de l'extrait n-butanol de l'espèce *Centaurea africana*. Mémoire de Magister. Constantine: Université Mentouri 2009. pp.8-14.

Marchetti, C. et Marchetti, P., Place des marqueurs de l'apoptose dans l'exploration de l'infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* , 2005; 33, pp.669–77.

Marengo, S.R., Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science* , 2008; 105 , pp. 52–63.

Marieb, E.N., Anatomie et physiologie humaine. 4th ed. Québec: De Boeck. 1999. pp.1041-43.

Marie, N.G., Freeman, M.K., Fleming, T.D., Robinson, M., Lindgren, L.D. et Thomson, B.e.a., Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. *JAMA*, 2014; 311(2), pp.183-92.

Marinucci, L., Bodo, M., Balloni, S., Locci, P. Et Baroni, T., Sub-Toxic Nicotine Concentrations Affect Extracellular Matrix and Growth Factor Signaling Gene Expressions in Human Osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* , 2014; 229, pp.2038-48.

Mauduit, C., Florin, A., Amara, S., Bozec, A., Siddeek, B., Cunha, S., Meunier, L., Selva, J., Albert, M., Vialard, F., Bailly, M. et Benahmed, M., Effets à long terme des perturbateurs endocriniens environnementaux sur la fertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* , 2006; 34, pp.978-84.

Mekkiou, R., Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat. Constantine : Université Mentouri 2005. pp.1-2.

Mello, N.K., Hormones, nicotine, and cocaine: Clinical studies. *Hormones and Behavior* , 2010; 58, pp.57–71.

Menvielle-Bourg, F.J., La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie* , 2005; 3, pp.118-21.

Miyagawa, I. Et Sofikitis, N., Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia*, 2004; 36, pp.57-68.

Mosbah, R., Yousef, M.I. et Mantovani, A., Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green tea extract. *Experimental and Toxicologic Pathology* , 2015 ; 67, pp.253–59.

Mossion, A., Étude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau. Thèse de Doctorat. Toulouse: L'université de toulouse 2007. pp.1-10.

Muthukumaran, S.H., Sudheer, A.R., Menon, V.P. et Nalini, N., Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology* , 2008; 243 , pp.207-15.

N

Nakagawa, K., Okudaand, S. et Miyazawa, T., Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-),epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 1997; 61, pp.1981-85.

Namita, P., Mukesh, R. et Vijay , K.J., *Camellia Sinensis* (Green Tea): A Review. *Global Journal of Pharmacology* , 2012; 6(2), pp.52-59.

Néron, R., 2005. Fumée de tabac et cancer: il n'y a pas de fumée sans feu ! *LeMédecin du Québec*, Octobre. pp.27-34.

Nkhili , E., Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Marrakech: Université Cadi Ayyad 2009. pp.7-8.

Noakes, D.E., Parkin-on, T.J. et England, G.W., eds., *Arthur's Vcrcnnarv Rep rod uc tion and O bsrctrctcs*. 8th ed. China. 2001.

Noblanc, A., Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique. Thèse de Doctorat. Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal 2013. pp.27-28.

Nudell, D.M., Monoski, M.M. et Lipshultz, L.I., Common medications and drugs: how they affect male fertility. *Urol Clin N Am*, 2002; 29, pp.965–73.

O

Omamuyovwi, M.I., Olayemi, K.O. et Polycarp, U.N., Effects of chronic nicotine administration on body weight, food intake andnitric oxide concentration in female and male rats. *Pathophysiology*, 2014; 21, pp.185–90.

OMS, Le tabac : mortel sous toutes ses formes. catalogue. Montpellier: Bibliothèque de l'OMS 2006. pp.24-26.

OMS, Warning, the tobacco industry is targeting women. *World no tobacco*. WHO 2010.

OMS, *World health statistics*. OMS 2010.

Oyeyemi, M.O., Oluwatoyin, O., Ajal Leigh, O.O. et Adesiji, T.F., The spermogram of male wistar rats treated with aqueous leaf extract of *venrcniaa ntygdalina. foliav eterinaria*, 2008; 52(2), pp.98-101.

Oyeyipo, I.P., Raji, Y., Emikpe, B.O. et Bolarinwa, A.F., Effects of Nicotine on Sperm Characteristics and Fertility Profile in Adult Male Rats: A Possible Role of Cessation. *J Reprod Infertil*, 2011; 12(3), pp.201-07.

P

Palafox-Carlos, H., Ayala Zavala, J.F. et González Aguilar, G.A., The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *J. Food Sci*, 2011; 76, pp.6–15.

Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R.R., Namiesnik, J., Gorinstein, S. et González-Aguilar, G.A., Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in ‘Ataulfo’ Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules*, 2012; 17, pp.12657-64.

Peltola, V., Mantyla, I. et Huhtaniemi, V.e.a., lipid peroxidation and antioxidant enzyme-activities in the rat testis after cigarette-smoke inhalation or administration of polychlorinated-biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J. Androl*, 1994; 15, pp.353-61.

Perkins, K.A., Epstein, L.H., Stiller, R.L., Fernstrom, M.H., Sexton, J.E. et Jacob, R.G., Acute effects of nicotine on hunger and caloric intake in smokers and nonsmokers. *Psychopharmacology*, 1991; 103, pp.103–9.

Phillips, K.P. et Tanphaichitr, N., Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2008; 11, pp.188-220.

Pillière, F., Perturbateurs endocriniens et risques professionnels. *EMC-Toxicologie Pathologie*, 2005; 2, pp.43-53.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. et Defraigne, J.O., Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2002; 16, pp.233–39.

Pineau, C., Le Magueresse, B., Courtens, J. et Jegou, B., Study *in vitro* of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell Tissue Res*, 1991; 264, pp.589-98.

Poncelet, C. et Sifer, C., eds., *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l’humain*. Paris: Springer-Verlag. 2011. p.160.

Potenza, M.A., Marasciulo, F.L., Tarquinio, M., Tiravanti, E., Colantuono, G., Federici, A., Kim, J.A., Quon, M.J. et Montagnani, M., EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 292, pp.1378–87.

R

Rajpurkar, A., Jiang, Y., Dhabuwala, C.B., Dunbar, J.C. et LI, H., Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J Environ Pathol Toxicol Onco*, 2003; 21, pp.243-48.

Rechner, A.R., Spencer, J.P., Kuhine, G. et Rice-Evans, C., Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid and derivatives *in vivo*. *Free Radic Biol Med*, 2000; 30, pp.1213-1222.

Rejraji, H., Vernet, P. et Drevet, J.R., GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol. Reprod. Dev*, 2002; 63, pp.96–103.

Rezgoone, D., Analyse cétogénétique des anomalies chromosomiques des hommes infertiles. Mémoire de Magister. Constantine: Université mentouri 2007. p.14.

Riah, O., Mécanisme d'Action de la Cotinine : Interactions Nicotiques, Étude Pharmacocinétique et Pharmacodynamique, Identification et Purification de son Récepteur. Toulouse: L'institut national polytechnique 1996. pp.17-26.

Robaire, B., Hinton, B.T. et Orgebin-Crist, M., 2006. The Epididymis. In J.D. Neill, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. Quebec: Elsevier. pp.1071-148.

Robert, M., Gibbs, B.F., Jacobson, E. et Gagnon, C., Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/ semenogelin I. *Biochemistry*, 1997; 36, pp.3811–9.

Roberts, K.P., Ensrud, K.M. et Hamilton, D.W., A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biol reprod*, 2002; 67, pp.525-33.

Rodgman, A., Smith, C.J. et Perfetti, T.A., The composition of cigarette smoke: A retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol*, 2000; 19, pp.573-95.

Ronis, M.J., Badger, T.M., Shema, S.J., Roberson, P.K. et Shaikh, F., Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *toxicol appl pharmacol*, 1996; 136, pp.361-37.

Rosenwaks, Z. et Wassarman, P.M., eds., *Human Fertility, Methods and Protocols*. New York: Humana press. 2014. p.7.

Rouiller-Fabre, V., Carmona, S., Abou Merhi, R., Cate, R., Habert, R. Et Vigier, R., Effect of Anti-Müllerian Hormone on Sertoli and Leydig Cell Functions in Fetal and Immature Rats. *Endocrinology*, 1998; 139(3), pp.1213-20.

S

Saleh , R.A. et Agarwal, A., Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *Journal of Andrology*, 2002; 23(6), pp.737-52.

Sánchez, E.P., Vargas, M.E. et Gutiérrez, J.R., 2013. Hepatotoxicity due to green tea consumption (*Camellia Sinensis*): A review. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*, pp.43-49.

Sepaniak, S., Forges, T. et Monnier-Barbarino, P., Conséquences du tabac sur la fertilité masculine. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 2005 ; 34(1), pp.102–11.

Sépaniak, S., Forges, T. et Monnier-Barbarino, P., Cigarette smoking and fertility in women and men. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* , 2006; 34, pp.945–49.

Serafini, M., Ghiselli , A. et Ferro-Luzzo, A., *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1996; 50(1), pp.28-32.

Sévenet , T. et Tortora , C., *Plantes, molécules et médicaments*. Paris: nathan, CNRS edition. 1994.

Sharangi, A.B., Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International* , 2009; 42, pp.529–35.

sherwood, L., *Fundamentals of human physiology*. 4th ed. canada: Brooks/Cole. 2010. pp.551-55.

Shi, Q., Ko, E., Barclay, L., Hoang, T. et Rademaker, A., Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev*, 2001; 59, pp.417-21.

Simon, C. et Pellicer, A., eds., *Stem Cells in Human Reproduction, Basic Science and Therapeutic Potential*. 2nd ed. London: iforma healthcre. 2009. p.29.

Singleton, C.P. et Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, 1965; 16, pp.144-58.

Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani , S. et Moulin, A., Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 2004; 86, pp.919-25.

Strauss, J.F. et Barbieri, R.L., Yen and jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. 6th ed. China: Elsevier. 2009. pp.293-98.

Styne, D.M., Physiology of puberty. *Horm Res* , 1994; 2, pp. 3-6.

Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. et Franklin, C.L., eds., *The laboratory rat*. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press. 2006.

Sun , D., Zhang, Y., Wang, F., Wu, K., Chen, J. et Zhou, Y., Electrochemical sensor for simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and xanthine based on the surface enhancement effect of mesoporous silica. *Sens. Actuators B*, 2009; 41, pp.641-45.

Svartberg, J. et Jorde, R., Endogenous testosterone levels and smoking in men. The fifth Tromso study. *Int. J. Androl*, 2007; 30, pp.137–43.

T

Tabart , J., Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Thèse de Doctorat. Liège: université de Liège 2011. pp.13-14.

Tang, L., Meng, T., Xu, L., Luo, H., Huang, T., Yu, J., Zhang, L., Gao, W., Cox, S.B. et Wang, J.S., Modulation of aflatoxin biomarkers in human, blood and urine by green tea polyphenols intervention. *Carcinogenesis*, 2008; 29, pp.411–17.

Taşer, P. Et Çiftci, M., Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 2012; 36(5), pp.546-553.

Taymour, M., Cigarette smoking and male infertility. *Journal of Advanced Research*, 2010; 1, pp.179–86.

Terao, J. et Mukai, R., Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 2014; 559, pp.12–16.

Tikhomiroff, C., Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de *catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Mémoire présenté en vue de l'obtention de diplôme de Magister. montréal: université de montréal 2001. pp.25-28.

Timothy, d.g. et Christopher, l.r.b., male fertility and infertility. 1st ed. New York: Cambridge. 2003.

Tremellen, K., Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 2008; 14, pp.243–58.

Tricker, A.R., Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* , 2003; 183, p.1516173.

Tsepelidis, S., Demeestere, I. et Delbaere, A., Le rôle de l'hormone anti-müllérienne dans la régulation du fonctionnement de l'ovaire. *Revue de la littérature. Rev Med Brux* , 2007; pp.165-71.

Tulsiani, D.R., Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc Res Tech* , 2003; 61, pp.18-27.

Turner, T.T. Et Lysiak, J.J., Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. *Journal of Andrology*, 2008; 29, pp.488-98.

Tweed, J.O., Hsia, S.H., Lutfy, K. et Friedman, T.C., The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012; 23(7), pp.334-42.

V

Valdes-socin, H., Vroonen, L., Latta, A.L., Betea, D., Peterossians, P., Greenen, V. et Beckers, A., Le tabac et ses effetssur le système endocrinien. *Rev Med Liège* , 2010; 65, pp.1-4.

VonGadow, A., Joubert , E. et Hansmann , C.F., Comparison of the antioxidant activity of rooibos (*Aspalathuslinearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem*, 1997; 60, pp.73–77.

W

Wolfram , S., Raederstorff , D., Preller , M., Wang , Y., Teixeira , S.R., Riegger , C. et Weber , P., Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr*, 2006; 36, pp.2512–8.

Wong, E.W., Mruk, D.D. et Cheng, Y., Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2008; 1778 , pp.692-708.

Wong, E.W. et Yan Cheng, C., Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011; 32(5), pp.290-99.

Wright, C., Milne, S. et Leeson, H., Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive Bio. Medicine Online*, 2014; 28, pp.684–703.

Y

Yan, H.N., Mruk, D.D., Lee, W.M. et Cheng, C.Y., Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? *BioEssays*, 2007; 29, pp.36-48.

Yardimci, S., Atan, A., Delibasi, T. Et Sunguroglu, K., Long-term effects of cigarette-smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. *British Journal of Urology*, 1997; 79, pp.66-9.

Yildiz, D., Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* , 2004; 43, pp.6Khalaf19–32.

Z

Zhang , J; Jiang , S; Watson, R R;, Antioxidant supplementation prevents oxidation and inflammatory responses induced by sidestream cigarette smoke in old mice. *Environ Health Perspect*, 2001; 109, pp.1007-9.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. et Friedman, J.M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* , 1994 ; 372 , pp.425-32.

Zhishen, J., Mengcheng, T. et Jianming, W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 1999; 64, pp.555-59.

Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. et Chen, Z.Y., Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem*, 1997; 45, pp.4624-4628.

Zini, A., Phillips, S., Lefebvre, J., Baazeem, A., Bissonnette, F., Kadoch, I.J. et San Gabriel, M., Anti-sperm antibodies are not associated with sperm DNA damage: a prospective study of infertile men. *Journal of Reproductive Immunology* , 2010; 85, pp.205–08.

Annexes

Annexe A : Fiche technique des cellules Thoma
--

Annexes

Annexe B : Courbes d'étalonnages

Annexes

Annexe C :Article numéro I

*“TOBACCO TOTAL ALKALOIDS INDUCE REDUCED SPERM QUALITY, SEXUAL HORMONE
DECREASE AND TESTICULAR DAMAGES IN MALE ALBINO WISTAR RATS”*

Annexes

Annexe D : Article numéro II

*“Green Tea Protective Effect against Total Alkaloids of Tobacco
Inducing Reprotoxic Effects in Male Albino WISTAR Rats”.*

Annexes

Annexe E : Résultats numériques
--

Résumé

Le tabac est l'un des agents les plus incriminés dans les infertilités masculines. Toutefois, ses répercussions sur la reproduction, en dehors de la grossesse et du développement embryonnaire et fœtal, sont peu évaluées. L'objectif principal de notre étude est d'évaluer les effets des alcaloïdes totaux du tabac (ATT) sur la structure histologique des testicules, les paramètres du sperme et le taux des hormones sexuelles, et de mettre en évidence le lien entre ces effets et le stress oxydatif supposé d'être un mécanisme majeur d'induction de ces derniers. Une deuxième partie de la recherche est désignée à examiner l'effet protecteur des polyphénols de thé vert in vivo, après avoir réalisé une étude phytochimique in vitro en vue d'une optimisation de l'utilisation de thé vert en tant qu'une source d'antioxydants. Pour la première partie, deux groupes de rats mâles de souche WISTAR (n=5) d'un âge moyen de deux mois ont été utilisés. Les rats ont reçus par gavage pendant 30 jours, les ATT à raison de 2,5 mg/kg et 5mg/kg de poids corporel (G1 et G2 respectivement). Quant à la deuxième partie, trois autres groupes ont reçu la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait de thé vert (FAE) à raison de 50mg/kg combinée aux ATT à faible dose (G3) et à forte dose (G4), alors que les animaux du (G5) ont été traités par la FAE seule pour déterminer la sécurité de ce traitement. Le sixième groupe (G6) est considéré comme témoin pour les deux parties de l'étude. Les animaux de ce groupe ont été traités par le véhicule des différents extraits (ATT et FAE). Les résultats de l'étude phytochimique ont montré que la FAE possède l'activité antioxydante la plus puissante par rapport à l'extrait total de thé vert et à ces autres fractions. Nos résultats ont montré un effet reprotoxique dose dépendant considérable des ATT à différents niveaux. La diminution de la qualité du sperme à savoir une réduction du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes a été constatée. Des atteintes histologiques notamment une hypotrophie du tissu interstitiel, une réduction du nombre des cellules de la lignée germinale ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères ont été également notées. Ces effets semblent être plus prononcés à forte dose des ATT atteignant la rupture de la barrière hémato-testiculaire et une diminution du nombre des cellules de Sertoli. Sur le plan hormonal, une diminution sévère du taux de la testostérone quelle que soit la dose administrée des ATT et une diminution moins importante de la FSH associée à une augmentation du taux de la LH ont été enregistrées. Ces effets reprotoxiques ont été liés à une diminution de l'activité antioxydante d'autant plus au niveau testiculaire et épидидymaire qu'au niveau du plasma sanguin, et à une augmentation des taux de TBARS qui témoigne d'une forte peroxydation lipidique. En outre, la FAE a significativement réduit ces effets avec une conservation quasi-complète des différents compartiments et fonctions de la reproduction quand elle est combinée à la faible dose des ATT, alors qu'avec la forte dose, elle a pu significativement minimisée les effets des ATT. Cependant, aucun effet toxique n'a été enregistré chez le groupe traité par la FAE seule. En conclusion, les ATT sont capable d'induire une forte reprotoxicité stress oxydatif dépendante qui peut être réduit par l'utilisation des polyphénols de thé vert.

Mots clés : tabac, thé vert, rats mâles, reprotoxicité, stress oxydatif, antioxydants.
