

Effet de l'extrait des graines de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sur le développement post-natal des gonades mâles chez le Rat

Amina SEMLALI¹, Nourdin HARICH^{1*}, Omar ASSOBEI², Elmostafa KABIL³ et Mohammed RABHI³

¹ *Laboratoire des Sciences Anthropogénétiques et Physiopathologiques, Département de Biologie, Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc*

² *Laboratoire de Biotechnologies Marines et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc*

³ *Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc..*

* Correspondance, courriel : harichnourdin@yahoo.fr

Résumé

L'extrait éthanolique de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) a été testé par voie orale pour ses effets antifertilisants en étudiant le développement postnatal des gonades mâles chez le Rat. Les gonades étudiées sont celles des rats mâles jeunes issus d'individus mâles et femelles, traités par des concentrations croissantes d'extrait de *Melia azedarach*, 45, 450, 900 et 1800mg/kg de poids d'animal. Les gonades mâles sont prélevées à 10 j, 20 j, 30 j et 40 jours durant la période postnatale. La consommation de l'extrait de *Melia azedarach* montre une diminution du poids des gonades avec un retard dans le développement des spermatogonies marqué par l'absence de spermatozoïdes dans les testicules des rats descendants des animaux traités par les concentrations 450, 900 et 1800 mg/kg de poids corporel. Les gonades mâles des animaux issus de ceux traités par 45 mg/kg ne montrent aucune différence dans l'évolution des spermatogonies par rapport aux témoins. L'utilisation de raticides toxiques et persistants pour contrôler les populations de rongeurs pose de sérieux problèmes tels que la résistance au traitement et la contamination de l'environnement. Cependant, il devient plus que jamais nécessaire d'utiliser des produits écologiques et des substances botaniques actives qui sont rapidement dégradées, ne passant pas ainsi dans les niveaux trophiques supérieurs en agissant sur le potentiel reproductif, et particulièrement sur la croissance et la différenciation des testicules. Ceci permettra ainsi d'améliorer le statut socio-économique d'une population. Le présent travail permet une exploration des effets de l'extrait de *Melia Azedarach* sur la reproduction.

Mots-clés : *développement, gonades mâles, rat, Melia azedarach, reproduction.*

Abstract

Effect of *Melia azedarach* extract on postnatal development of the male gonads in Rat

Ethalonc extract of *Melia azedarach* was investigated for antifertility effects, by studying the testis development, on male rats by oral doses of 45, 450, 900 and 1800 mg/kg body weight. The male gonads were prelevated at 10, 20, 30 and 40 days after birth. The oral feeding treatment of rats with *Melia azedarach* showed a decrease of gonad's weight and a dramatic decrease of spermatozoa cells in testis of rats treated

by 450, 900 and 1800 mg/kg concentrations. The use of toxic and persistent rodenticides to control rodent populations has created serious problems such as resistance and environmental contamination. Therefore, it becomes necessary to use ecologically safe and biologically active botanical substances that are easy metabolized and do not pass on to the next trophic level, by acting on the reproductive potential and particularly on the growth and differentiation of testis. This may help to ameliorate the socio-economic status of the population. The present study was undertaken to investigate the *Melia azedarach* extract on reproduction of rat.

Keywords : *development, rat, male gonads, Melia azedarach, reproduction.*

1. Introduction

Les rongeurs entraînent chaque année des dommages à la production agricole [1]. Le problème des rongeurs est dû à leurs taux élevés de reproduction, leur comportement complexe et leur capacité à s'adapter à diverses conditions écologiques. L'utilisation non sélective de raticides persistants et toxiques avait créé de sérieux problèmes telle que la résistance au traitement et la contamination de l'environnement. Il est donc devenu nécessaire d'utiliser des substances botaniques biologiquement actives ou des agents régulateurs de la fertilité issus de plantes écologiquement compatibles et qui interfèrent seulement avec les voies naturelles de la reproduction des espèces [2] telles que par exemple la croissance et la différenciation des follicules [3]. Des extraits de plusieurs plantes sont connus par leurs effets abortifs chez des femelles de gerbilles, rats, souris et lapins [2, 4,5].

Les pesticides botaniques ont longtemps été considérés comme une alternative attractive pour substituer les pesticides chimiques synthétiques. Ces substances botaniques occasionnent moins de contamination de l'environnement sans nuisance pour la santé humaine. *Melia Azedarach* L. (Ma) appelée également Lilas des indes, est utilisée en médecine traditionnelle pour son effet anti-eczémateux ainsi que pour soulager les crises asthmatiques [6]. L'extrait de *Melia Azedarach* présente des actions antiappétantes, insecticides et peut perturber le développement de plusieurs insectes tels que *Lymantria dispar* (*Lymantriidae*) [7], *Epilachna paenulata* (*Coleoptera, Coccinellidae*) [8], *Trypanosoma crusi* [9]. Cet extrait peut agir comme un bactéricide contre *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* [10], *Staphylococcus microplus* [11,12]. D'autres travaux ont montré également l'effet antihelminthique, ovicide et larvicide de cet extrait contre un parasite intestinal du bétail, *Haemonchus contortus* [13]. Par ailleurs, l'ingestion de l'extrait de *Melia Azedarach* chez le rat femelle provoque une diminution du nombre d'implantation d'embryons dans l'utérus [14]. Il induit également une réduction du nombre de follicules chez le Rat [3]. L'extrait des feuilles de *Melia Azedarach* peut également influencer la fertilité chez le rat mâle en affectant sérieusement la libido [15].

La persistance durant plusieurs années dans l'environnement des résidus de pesticides toxiques, après les traitements pour contrôler les populations de rongeurs, pose des problèmes d'ordre écologiques et sanitaires. La recherche de substances écologiquement propres devient indispensable.

L'action de l'extrait de *Melia Azedarach* sur le développement post-natal des gonades mâles n'ayant fait l'objet d'aucune étude antérieure. Le but de ce travail consiste à rechercher les effets de l'extrait des graines de *Melia azedarach*, cultivée au Maroc, sur l'évolution des spermatogonies chez le 'rat Wistar' de sexe mâle.

2. Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les graines mûres de *Melia azedarach* sont broyées dans un mortier. L'extraction est réalisée ensuite à l'éthanol 95° à l'aide d'un appareil d'extraction, le Sosclet. Après une extraction de 4 heures, le solvant est évaporé sous vide partiel à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Animaux

Les rats mâles et femelles (parents) des expériences ont été élevés dans une animalerie du Laboratoire sous des conditions normales d'éclairage, de température et d'humidité. Les animaux sont nourris avec une alimentation équilibrée, constituée de granules composés de céréales, fibres et des éléments minéraux. Ils sont placés dans des cages par lots de cinq individus.

Méthodes

Les tests de l'extrait de *Melia Azedarach* consistent à administrer aux animaux des concentrations de 45mg/kg d'animal/j ; 450mg/kg/j ; 900mg/kg/j et 1800mg/kg/j, par voie orale. Les mâles et les femelles ainsi traités sont croisés ; les femelles gestantes sont ensuite placées dans des cages individuelles où elles continuent à être traitées aussi bien durant la période de gestation que pendant la période de lactation après la mise bas.

Les jeunes rats mâles issus des animaux traités sont anesthésiés à l'éther et sacrifiés aux stades de développement : 10, 20, 30 et 40 jours. Les gonades mâles sont rapidement prélevés, pesés et ensuite fixés par immersion dans le liquide de Bouin pendant 48 heures. Après rinçage à l'eau distillée, les organes sont placés dans l'alcool 70° pendant 24 heures, puis déshydratés dans des bains d'alcool (deux de 90° et deux de 100°). Avant leur inclusion dans la paraffine, les organes sont passés dans deux bains de toluène. Des coupes histologiques de 7 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, puis colorées à l'hématoxyline de Groat et la fuschineponceau. L'observation est faite au microscope optique.

Statistiques

L'analyse statistique de l'effet de M.a. sur le développement des gonades mâles traités par rapport aux témoins a été effectuée par comparaison des moyennes du poids des gonades (P.G.) et du poids des gonades par rapport au poids du corps (P.G. /P.C.) en utilisant le test de t-Student réalisé grâce au logiciel SPSS 10.0.

3. Résultats

3-1. Résultats pondéraux

3-1-1. Poids des gonades

L'application du test « t » de Student pour la comparaison des moyennes au sein de chaque lot d'animaux (C0, C1, C2, C3 et C4), il existe une évolution significative du poids des gonades en fonction du temps (10j et 20j, 20j et 30j, 30j et 40j). On constate, les gonades des animaux issus de parents traités par C₁ = 45mg/kg/j montrent la même évolution du poids que le témoin, alors que les gonades des animaux issus de parents traités par C₂= 450, C₃= 900 et C₄= 1800 mg/kg/j diminuent en fonction de la concentration (**Tableau 1**) aux 10^{ème}, 20^{ème}, 30^{ème} et 40^{ème} jours post-natal.

Tableau 1 : poids moyens des gonades \pm Ecart type en fonction des concentrations de l'extrait de *Melia azedarach*

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
10 j	$3,86 \cdot 10^{-2} \pm 3,59 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-2} \pm 6,15 \cdot 10^{-3}$	$3,38 \cdot 10^{-2} \pm 1,98 \cdot 10^{-3}$	$3,14 \cdot 10^{-2} \pm 2,68 \cdot 10^{-3}$	$2,82 \cdot 10^{-2} \pm 4,89 \cdot 10^{-3}$
20 j	$0,11 \pm 2,26 \cdot 10^{-2}$	$0,11 \pm 1,69 \cdot 10^{-2}$	$9,43 \cdot 10^{-2} \pm 3,87 \cdot 10^{-3}$	$8,92 \cdot 10^{-2} \pm 2,26 \cdot 10^{-3}$	$8,41 \cdot 10^{-2} \pm 4,78 \cdot 10^{-3}$
30 j	$0,29 \pm 1,18 \cdot 10^{-2}$	$0,29 \pm 2,12 \cdot 10^{-2}$	$0,26 \pm 2,64 \cdot 10^{-2}$	$0,23 \pm 3,06 \cdot 10^{-2}$	$0,19 \pm 1,13 \cdot 10^{-2}$
40 j	$0,43 \pm 3,30 \cdot 10^{-2}$	$0,42 \pm 3,45 \cdot 10^{-2}$	$0,39 \pm 1,28 \cdot 10^{-2}$	$0,34 \pm 2,81 \cdot 10^{-2}$	$0,28 \pm 2,34 \cdot 10^{-2}$

L'analyse du **Tableau 2**, permet de montrer que la différence moyenne du poids des gonades augmente en fonction de la concentration (C₂, C₃ et C₄), ce qui met en évidence une chute du paramètre poids des gonades. Par ailleurs, la comparaison des poids des gonades des animaux issus de parents traités entre eux, montre des différences significatives pour les concentrations (C₁ et C₃), (C₁ et C₄) et (C₂ et C₄). Cependant, ces différences restent non significatives entre (C₁ et C₂), (C₂ et C₃) et (C₃ et C₄) ; on peut donc dire que vers le 10^{ème} jours post-natal, on a la même évolution du poids des gonades entre les paires de la diagonale.

Tableau 2 : Valeurs de la différence moyenne du poids des gonades et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 10 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	$1,09 \cdot 10^{-3}$ NS	$4,79 \cdot 10^{-3}$ +++	$7,23 \cdot 10^{-3}$ +++	$1,04 \cdot 10^{-2}$ +++
C ₁		$3,70 \cdot 10^{-3}$ NS	$6,14 \cdot 10^{-3}$ ++	$9,30 \cdot 10^{-3}$ +++
C ₂			$2,44 \cdot 10^{-3}$ NS	$5,60 \cdot 10^{-3}$ ++
C ₃				$3,16 \cdot 10^{-3}$ NS

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%, ++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1%

A l'âge de 20 jours (**Tableau 3**), 30 jours (**Tableau 4**) et 40 jours (**Tableau 5**), la différence moyenne du poids des gonades est statistiquement non significative entre le témoin et C₁, alors qu'elle présente une augmentation significative à partir de C₂. D'autre part, on démontre qu'à partir du 20^{ème} jour post-natal, l'effet des hautes concentrations (C₃ et C₄) est significativement plus important sur le poids gonadique lorsqu'on compare l'effet des différentes concentrations deux à deux.

Tableau 3 : Valeurs de la différence moyenne du poids des gonades et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 20 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	$3,81 \cdot 10^{-3}$ NS	$1,75 \cdot 10^{-2}$ +	$2,25 \cdot 10^{-2}$ ++	$2,76 \cdot 10^{-2}$ +++
C ₁		$1,36 \cdot 10^{-2}$ +	$1,87 \cdot 10^{-2}$ +++	$2,38 \cdot 10^{-2}$ +++
C ₂			$5,07 \cdot 10^{-3}$ +++	$1,02 \cdot 10^{-2}$ +++
C ₃				$5,09 \cdot 10^{-3}$ ++

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%, ++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1%

Tableau 4 : Valeurs de la différence moyenne du poids des gonades et signification des différences du *t*-Student des animaux âgés de 30 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	7,05 10 ⁻³ NS	3,46 10 ⁻² +++	6,95 10 ⁻² +++	0,10 +++
C ₁		2,76 10 ⁻² ++	6,24 10 ⁻² +++	9,43 10 ⁻² +++
C ₂			3,49 10 ⁻² ++	6,68 10 ⁻² ++
C ₃				3,19 10 ⁻² ++

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%, ++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1‰

Tableau 5 : Valeurs de la différence moyenne du poids des gonades et signification des différences du *t*-Student des animaux âgés de 40 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	8,62 10 ⁻³ NS	4,74 10 ⁻² +++	9,75 10 ⁻² +++	0,15 +++
C ₁		3,88 10 ⁻² ++	8,88 10 ⁻² +++	0,15 +++
C ₂			5,01 10 ⁻² +++	0,11 +++
C ₃				5,66 10 ⁻² +++

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%, ++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1‰

3-1-2. Rapport R = poids des gonades / poids du corps

Le **Tableau 6** regroupe les résultats du rapport R aux âges de 10, 20, 30 et 40 jours chez les témoins (C0) et les animaux issus de parents traités par différentes concentrations (C1, C2, C3 et C4). D'après les valeurs observées, on constate une diminution du rapport en fonction de concentration, qui met en évidence une asynchronisation de la croissance des gonades par rapport à la croissance corporelle.

La différence moyenne des rapports (PG/PC) **Tableaux 7, 8, 9 et 10**, est significativement importante dans la majorité des cas lorsqu'on compare les traitements par les différentes concentrations deux à deux. D'après ces différents résultats, on conclut que l'extrait de *Melia azedarach* affecte davantage la croissance des gonades que celle du corps et que cette action augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les analyses statistiques (**Tableaux 7, 8, 9 et 10**) ne montrent pas de différences significatives entre les rapports (PG/PC) des animaux témoins et des animaux issus de parents traités par C1 à tous les âges (10, 20, 30 et 40 jours). Cependant, à partir de la concentration C2, la diminution du poids des gonades devient plus importante par rapport à la diminution du poids corporel.

Tableau 6 : Rapport R (PG/PC) ± Ecart type des différents lots en fonction de l'âge

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
10 jours	2,52 10 ⁻³ ± 1,76 10 ⁻⁴	2,49 10 ⁻³ ± 3,16 10 ⁻⁴	2,23 10 ⁻³ ± 1,10 10 ⁻⁴	2,08 10 ⁻³ ± 1,28 10 ⁻⁴	1,85 10 ⁻³ ± 2,81 10 ⁻⁴
20 jours	4,42 10 ⁻³ ± 6,71 10 ⁻⁴	4,28 10 ⁻³ ± 4,47 10 ⁻⁴	3,89 10 ⁻³ ± 1,34 10 ⁻⁴	3,80 10 ⁻³ ± 8,68 10 ⁻⁴	3,63 10 ⁻³ ± 1,11 10 ⁻⁴
30 jours	8,14 10 ⁻³ ± 4,21 10 ⁻⁴	8,09 10 ⁻³ ± 4,35 10 ⁻⁴	7,46 10 ⁻³ ± 5,05 10 ⁻⁴	6,74 10 ⁻³ ± 5,12 10 ⁻⁴	6,36 10 ⁻³ ± 2,45 10 ⁻⁴
40 jours	8,51 10 ⁻³ ± 5,07 10 ⁻⁴	8,42 10 ⁻³ ± 5,44 10 ⁻⁴	7,75 10 ⁻³ ± 3,68 10 ⁻⁴	7,47 10 ⁻³ ± 4,41 10 ⁻⁴	6,51 10 ⁻³ ± 3,31 10 ⁻⁴

Tableau 7 : Valeurs de la différence moyenne du rapport R et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 10 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	3,32 10 ⁻⁵ NS	2,90 10 ⁻⁴ +++	4,39 10 ⁻⁴ +++	6,67 10 ⁻⁴ +++
C ₁		2,57 10 ⁻⁴ NS	4,05 10 ⁻⁴ +++	6,36 10 ⁻⁴ +++
C ₂			1,48 10 ⁻⁴ ++	3,79 10 ⁻⁴ +++
C ₃				2,31 10 ⁻⁴ NS

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%,
+++différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1 ‰

Tableau 8 : Valeurs de la différence moyenne du rapport R et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 20 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	1,43 10 ⁻⁴ NS	5,31 10 ⁻⁴ +	6,20 10 ⁻⁴ ++	7,91 10 ⁻⁴ +++
C ₁		3,88 10 ⁻⁴ ++	4,77 10 ⁻⁴ ++	6,48 10 ⁻⁴ +++
C ₂			8,92 10 ⁻⁵ NS	2,60 10 ⁻⁴ +++
C ₃				1,71 10 ⁻⁴ +++

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%,
++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1 ‰

Tableau 9 : Valeurs de la différence moyenne du rapport R et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 30 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	4,45 10 ⁻⁵ NS	6,80 10 ⁻⁴ ++	1,40 10 ⁻³ +++	1,78 10 ⁻³ +++
C ₁		6,36 10 ⁻⁴ ++	1,36 10 ⁻³ +++	1,73 10 ⁻³ +++
C ₂			7,23 10 ⁻⁴ ++	1,10 10 ⁻³ +++
C ₃				3,76 10 ⁻⁴ NS

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%,
++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1 ‰

Tableau 10 : Valeurs de la différence moyenne du rapport R et signification des différences du t-Student des animaux âgés de 40 jours.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C ₀	7,77 10 ⁻⁵ NS	7,45 10 ⁻⁴ +++	1,03 10 ⁻³ +++	1,99 10 ⁻³ +++
C ₁		6,68 10 ⁻⁴ ++	9,50 10 ⁻⁴ +++	1,91 10 ⁻³ +++
C ₂			2,82 10 ⁻⁴ NS	1,25 10 ⁻³ +++
C ₃				9,69 10 ⁻⁴ +++

Signification : NS : différences non significatives, + : différences significatives au seuil 5%,
++ : différences significatives au seuil 1%, +++ : différences significatives au seuil 1 ‰

3-2. Résultats histologiques

Gonades de 10 jours

La gonade mâle des animaux témoins est entourée de l'albuginée. Elle comporte plusieurs tubes séminifères. Chaque tube séminifère est formé de quelques cellules de Sertoli et les cellules germinales qui sont de deux types : les spermatogonies à noyaux très foncés avec une chromatine très condensée ; et les spermatoctes de 1^{er} ordre (I) qui sont nombreux, de grande taille et occupent presque la totalité de la lumière du tube séminifère (**Photo 1**).

Les gonades mâles provenant des animaux traités par 45, 450 et 900 mg d'extrait/kg présentent des structures histologiques similaires à celles observées chez les animaux témoins, mais la taille des gonades traités par 450, 900 mg/Kg/j est plus petite que le témoin (résultats confirmés par les analyses statistiques). Les gonades mâles issues des animaux traités par la concentration de 1800 mg d'extrait/kg sont également plus petites que celles observées chez les témoins ; de même, les spermatogonies et les spermatoctes I qu'elles renferment sont moins nombreux que ceux des témoins (**Photo 2**).

Gonades de 20 jours

Les tubes séminifères des gonades mâles des animaux témoins contiennent des cellules de Sertoli, des spermatogonies et des spermatoctes I. Certains spermatoctes I présentent un noyau contenant une chromatine en petites mottes orientée vers la lumière du tube séminifère ; d'autres spermatoctes I sont plus volumineux avec un gros noyau : ce sont les spermatoctes I en fin de croissance qui vont se transformer plus tard en spermatoctes de 2^{ème} ordre (II) (**Photo 3**).

Les coupes histologiques des gonades provenant des animaux traités par la concentration de 45mg d'extrait/kg montrent des structures cytologiques et une distribution histologique similaire à celles observées chez les animaux témoins. En revanche, dans les tubes séminifères des gonades issues des animaux traités par les concentrations de 450, 900 et 1800 mg/kg/j d'extrait de *Melia azedarach* (**Photo 4**), les spermatogonies et les spermatoctes I sont moins nombreux sur les coupes histologiques. On constate également que les spermatoctes I en fin de croissance sont absents au niveau des coupes histologiques des tubes séminifères.

Gonades de 30 jours

Les coupes histologiques des tubes séminifères des animaux témoins montrent, en allant de la périphérie vers la lumière du tube, des spermatogonies et de nombreux spermatoctes I. On constate l'apparition de quelques spermatides caractérisées par un noyau clair et volumineux (**Photo 5**).

Après traitement des animaux par la concentration de 45 mg/kg, les distributions cytologique et histologique au niveau des gonades sont similaires à celles décrites chez les témoins. Par contre, les gonades provenant des animaux traités par 450, 900 et 1800 mg/kg montrent des spermatogonies et des spermatoctes I mais surtout on note l'absence de spermatides (**Photo 6**).

Gonades de 40 jours

L'observation des coupes histologiques au niveau des tubes séminifères des testicules des animaux témoins, a montré la présence de spermatogonies, de spermatoctes I et de nombreuses spermatides (**Photo 7**). Les tubes séminifères des animaux traités par 45mg/kg ont montré des structures cytologiques et histologiques similaires à celles observées chez les animaux témoins. Au niveau des gonades issues des animaux traités par 450, 900mg/kg (**Photo 8**) et 1800mg/kg, l'observation des coupes histologiques a montré une distribution cellulaire similaire. Cette distribution reste semblable à celle observée chez les

animaux traités âgés de 30 jours. En effet, on peut noter la présence de spermatogonies, de spermatocytes I avec une absence totale de spermatozoïdes.

4. Discussion et conclusion

Le traitement par l'extrait de *Melia azedarach* provoqué des effets significatifs sur le développement chez le rat mâle. En effet, une réduction de la taille des testicules après traitement par 450, 900 et 1800 mg/Kg/j par rapport au contrôle et une absence de spermatozoïdes chez les rats mâles âgés de 30 et 40 jours. Ces résultats suggèrent que cet extrait retarde l'apparition de spermatozoïdes et affecte donc la spermatogenèse d'une manière générale.

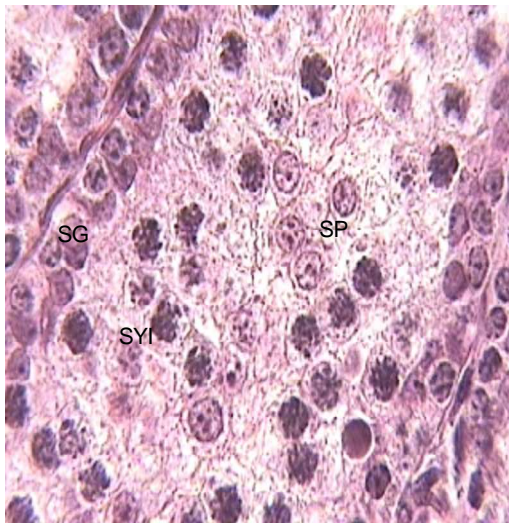


Photo 5: Coupe transversale au niveau d'une gonade d'un rat mâle témoin âgé de 30 jours. Présence de spermatogonies (SG), spermatocyte I (SYI), apparition de spermatozoïdes (SP). (Gx1000).

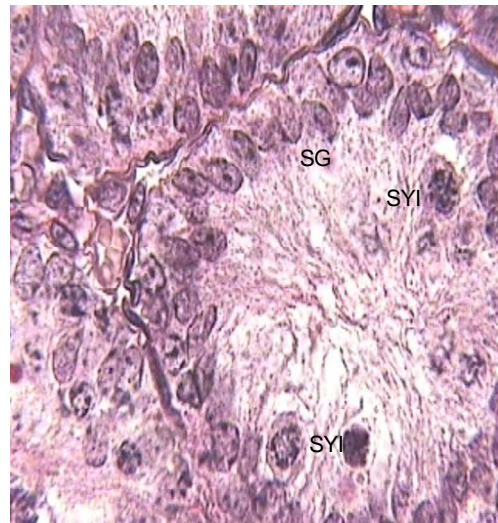


Photo 6: Coupe transversale au niveau d'une gonade d'un rat mâle âgé de 30 jours, traité par 1800 mg/Kg. Présence de spermatogonies (SG), spermatocyte I (SYI), absence de spermatozoïdes (SP). (Gx1000).

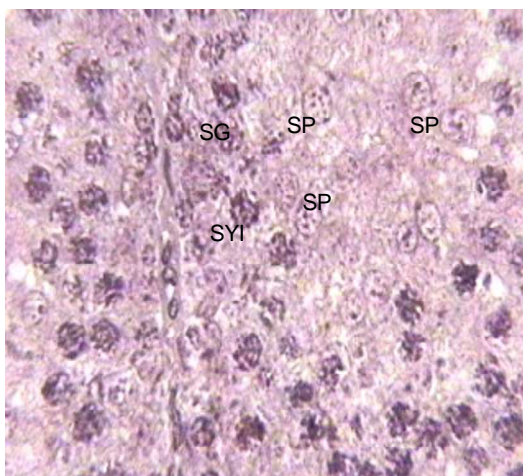


Photo 7: Coupe transversale d'une gonade d'un rat mâle témoin âgé de 40 jours. Présence de plusieurs spermatozoïdes (SP). (Gx1000)

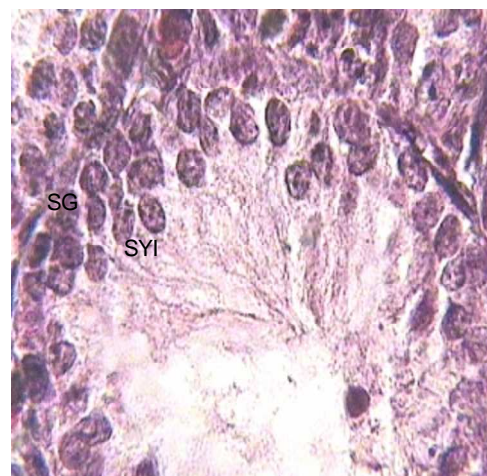


Photo 8: Coupe transversale d'une gonade d'un rat mâle âgé de 40 jours, traité par 900 mg/Kg. Absence de spermatozoïdes. (Gx1000).

Dans des travaux antérieurs, l'effet spermicide a été étudié sur des spermatozoïdes humains en utilisant l'extrait des feuilles de *Azedarachta indica* de la famille des méliacées, c'est une plante voisine de *Melia azedarach* et qui contient des principes actifs similaires. En effet, la mobilité des spermatozoïdes diminue en fonction de la concentration [16]. En plus de son action sur la mobilité, cet extrait provoquerait des altérations au niveau de la tête des spermatozoïdes humains [17]. Par ailleurs, le mélange de trois plantes, *Azadirachta indica*, *Sapindus mukerossi* et *Mentha citrata*, présente un effet spermicide sur des spermatozoïdes chez l'homme et chez le lapin [18]. Des effets antifertilisants du mélange d'extraits de plusieurs plantes, dont *Melia azedarach*, sur le rat mâle ont été recherchés. Des doses orales d'une concentration de 100mg /kg pendant 21 jours ont montré une diminution de la fertilité par une baisse de la libido chez le rat mâle [15].

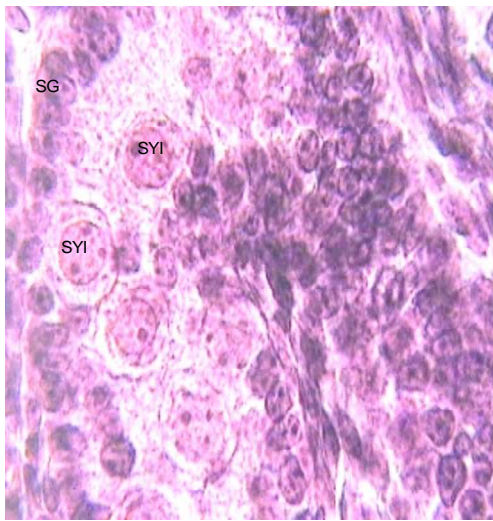


Photo1: Coupe transversale d'une gonade mâle témoin âgé de 10 jours. Présence de spermatogonies(SG), de nombreux spermatocytes I (SYI). (Gx1000).

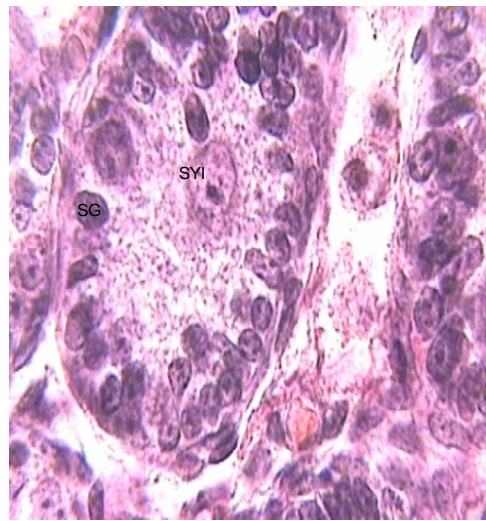


Photo 2: coupe transversale d'une gonade d'un rat mâle après traitement par 1800 mg/Kg de l'extrait de Ma. Les spermatocytes I (SYI) sont peu nombreux (Gx1000)

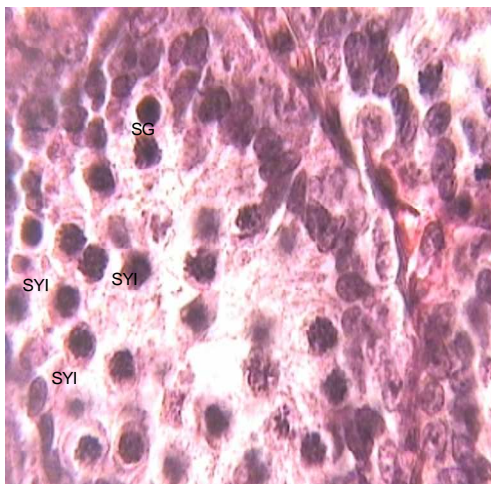


Photo 3: coupe transversale d'une gonade mâle d'un rat témoin âgé de 20 jours. Présence de spermatogonies(SG) et de nombreux spermatocytes I. (Gx1000)

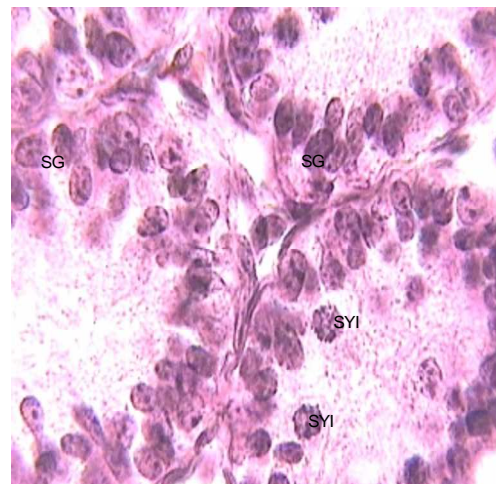


Photo 4: coupe transversale d'une gonade mâle âgé de 20 jours d'un rat traité par 1800 mg/kg. Les spermatocytes I (SYI) sont peu nombreux (Gx1000)

Dans nos expériences, les animaux traités montrent une baisse du nombre d'individus par portée (observation), suggérant ainsi que l'extrait de *Melia azedarach* a affecté sérieusement la fertilité sans pour autant induire une stérilité des animaux. Une étude poussée devrait être entreprise dans ce sens afin de confirmer ces observations.

Chez les rats mâles provenant des animaux traités par 45mg/kg, l'observation des testicules a montré une évolution histologique et une distribution cytologique similaires à celles observées chez les animaux témoins. Par contre, les testicules issus des animaux traités par les concentrations 450, 900 et 1800mg/kg ont montré, par rapport aux témoins, une diminution du nombre de spermatogonies et de spermatocytes I, provoquant ainsi un retard dans le déroulement de la spermatogenèse qui est très marqué par l'absence des spermatides surtout aux 30^{ème} et 40^{ème} jour du développement post-natal. La concentration de 450 mg/kg paraît donc suffisante pour provoquer les effets induits par les autres concentrations supérieures. D'autre part, le traitement des animaux pendant les périodes de gestation et de lactation pourrait donc influencer le développement des gonades.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont montrés que des composés chimiques dont certains sont des médicaments ou des polluants de l'environnements, mais aussi des composés naturels présents dans les plantes, avaient la capacité de mimer les effets des hormones en particulier les hormones stéroïdes, principalement les oestrogènes. Etant donné les effets connus de ces hormones, en particulier sur le système reproducteur et la multiplication cellulaire, l'attention des chercheurs s'est focalisée sur les conséquences de ces composés sur la croissance et la maturation des gonades et sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Parallèlement, une série d'études épidémiologiques semble suggérer une altération des fonctions de reproduction masculine au cours des cinquante dernières années, en particulier une diminution du nombre de spermatozoïdes et la qualité spermatique, une augmentation des malformations de l'appareil reproducteur ainsi qu'une augmentation de la fréquence des cancers [19].

Ces anomalies ont été décelées dans un premier temps chez les oiseaux [20], les alligators, les chiens et les poissons [21], orientant vers une origine liée à l'environnement. Les facteurs génétiques ne sont probablement pas responsables de ces altérations parce que les phénomènes observés ont évolués rapidement (1 à 2% de variation par an). Les facteurs liés à l'environnement semblent donc être plus plausibles, en particulier parce que le testicule est l'un des organes les plus vulnérables aux rayonnements, à la chaleur et aux xéno biotiques. Les malformations de l'appareil génital mâle ont vu aussi leur fréquence augmenter ces dernières décennies. En particulier, les cas de cryptorchidie (migration incomplète du testicule au cours du développement) ont doublé en vingt ans dans certains pays occidentaux [22]. De même une augmentation des cas d'hypospadias (malformation de l'ouverture de l'urètre) a été signalée dans certains pays [23]. Enfin, on note une augmentation de l'incidence de cancers du testicule, de 2 à 4% par an pour les hommes âgés de moins de 50 ans [24]. La multiplication de ces observations a été considérée comme suffisamment préoccupante pour explorer les causes possibles de ces phénomènes. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets des pesticides sur la reproduction et l'apparition des cancers. Le mode d'action le plus fréquemment proposé est la capacité de certains composés de mimer les effets hormonaux telle l'activité xéno-oestrogénique où certains composés miment les effets de l'oestradiol [25].

La découverte des effets secondaires du traitement par le DES (diéthylstilbestrol) constitue la première mise en cause d'un xéno biotique pour ses effets de type hormonal, en l'occurrence oestrogénique. Ce composé, utilisé il y a quelques années pour prévenir les risques d'avortement, s'est révélé toxique pour le fœtus, puisqu'il induisait l'apparition de cancers génitaux et des malformations génitales chez les filles des mères ayant reçu ce traitement. Des altérations de la qualité du sperme ont été également rapportées chez des hommes exposés pendant leur vie fœtale [26]. Plusieurs expériences ont été réalisées sur les effets de

l'exposition prénatale au DES chez la souris [27]. L'analyse des embryons de souris gestantes traitées par le DES a révélé une régression incomplète des canaux de Müller chez les fœtus mâles. Des expériences *in vitro* de culture d'organes ont montré l'effet inhibiteur du DES sur la régression des canaux de Müller [28, 29]. Or, lors de la régression, le récepteur de l'oestradiol est retrouvé dans les canaux de Müller ainsi que dans les cellules de Sertoli qui secrètent l'hormone antimüllérienne (AMH) [30]. Ainsi, des oestrogénomimétiques peuvent affecter directement les canaux de Müller ou l'expression du gène de l'AMH en altérant la multiplication des cellules de Sertoli, provoquant ainsi un retard de la disparition du canal de Müller chez le mâle.

La LH (hormone lutéinisante), la FSH (hormone folliculo-stimulante) et la testostérone sont les principales hormones réglant la spermatogenèse. Leur action s'opère suivant deux axes principaux : l'axe LH-cellules de Leydig et l'axe FSH-cellules de Sertoli. Les cellules de Leydig possèdent à leur surface membranaire des récepteurs de la LH et sécrètent la testostérone en réponse à la LH. La testostérone chez l'homme, comme l'oestradiol chez la femme, inhibe la sécrétion hypophysaire de LH par un système de rétrocontrôle négatif. Diverses observations chez l'animal suggèrent que l'oestradiol peut freiner la sécrétion de gonadotrophines hypophysaires chez le mâle. On a ainsi montré, chez un homme présentant une mutation dans le gène du récepteur de l'oestradiol, un taux de gonadotrophines élevé, ce qui est en accord avec un rôle des oestrogènes sur le contrôle de ces hormones hypophysaires [31].

Les composés mimant les effets de l'oestradiol pourraient aussi inhiber la sécrétion de LH suivant un mécanisme semblable. Les effets inhibiteurs rapportés dans ce travail de l'extrait de *Melia azedarach* sur le développement du testicule chez le rat, pourraient donc suggérer que cet extrait peut contenir des composés mimant les effets de l'oestradiol et inhiber ainsi la sécrétion de LH suivant un mécanisme semblable. Ainsi l'axe LH-cellules de Leydig-sécrétion de testostérone serait freiné. Cette perturbation dans la production de la testostérone peut créer une altération du compte spermatique comme il a été observé chez l'homme adulte dans certains pays tropicaux chez des cultivateurs de bananiers utilisant des pesticides [32]. Les cellules de Sertoli sont les cellules nourricières qui constituent un support physique pour le développement et la maturation des cellules germinales et synthétisent des protéines nécessaires à cette différenciation [33]. La capacité de production de spermatozoïdes est donc dépendante du nombre de cellules de Sertoli. Ces cellules se multiplient rapidement chez le rat entre le 19^{ème} jour de la vie embryonnaire et le 15 jour après la naissance. Leur multiplication est stimulée par la FSH [34]. Une exposition prolongée lors de la période de gestation, de l'enfance ou de la puberté, à des doses élevées de composés mimant l'effet de l'oestradiol, pourrait inhiber la sécrétion de la FSH et ainsi induire une mauvaise prolifération des cellules de Sertoli. Cela engendrera à l'âge adulte une oligospermie ou une azoospermie irréversibles [35].

L'exposition à des composés toxiques comme les xénohormones lors des périodes du développement pendant lesquelles les hormones ne sont pas sécrétées peut provoquer des malformations. De même, l'inhibition de l'effet hormonal pendant le développement peut retarder l'apparition des caractères sexuels mâles ou femelles.

Par ailleurs, le retard enregistré dans le développement de la lignée germinale chez le rat mâle après administration de l'extrait de *Melia azedarach*, pourrait augmenter indirectement l'élimination des androgènes. En effet, lors de son accumulation dans l'organisme, cet extrait provoquerait la mise en jeu des enzymes hépatiques comme l'UDP-glucoronyltransférase et les mono-oxydases. Ces enzymes jouent un rôle-clé dans la détoxification des xéno-biotiques de l'organisme. Cependant, elles éliminent aussi la testostérone, et donc en diminuent la concentration circulante. Des travaux antérieurs effectués chez l'Homme, ont montré, outre de leurs effets toxiques, des pesticides induiraient chez le garçon pré pubère,

un retard de l'apparition des caractères masculins et, chez l'adulte, une diminution du compte spermatique [36].

Enfin, l'utilisation des pesticides de synthèse toxiques et persistants pour contrôler les populations de rongeurs pose de sérieux problèmes telles que la résistance au traitement et la contamination de l'environnement. L'accumulation de ces composés dans l'environnement a des répercussions néfastes sur la santé animale et plus particulièrement sur celle de l'Homme. Il devient donc urgent de substituer ces composés de synthèse par des produits écologiques et des substances botaniques actives telles que les phytohormones. Le fait que ces substances sont rapidement métabolisées et éliminées de l'organisme, constitue un avantage, évitant ainsi des répercussions pathologiques dues à l'accumulation dans l'organisme. En outre, ces substances botaniques ne passent pas dans les niveaux trophiques supérieurs de la chaîne alimentaire et n'interfèrent pas ainsi avec le potentiel reproductif, et particulièrement avec la croissance et la différenciation des testicules. Les résultats anatomiques et histologiques obtenus dans ce travail pourraient servir de base pour l'utilisation de l'extrait de *Melia azedarach* à cet effet.

Références

- [1] - V. R. PARSHARD and N. AHMED. *Journal of Research of Punjab Agricultural University*, 33 (1996) 266-281.
- [2] - V. P. DIXIT, in "Rodents in Indian Agriculture, Vol.1, Scientific Publishers, Jodhpur, India (1992) 595-604.
- [3] - J. K. ROOP, P. K. DHALIWAL and S. S. GURAYA, *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, 38 (2005) 943-947.
- [4] - P. K. DHALIWAL, J. K. ROOP and S. S. GURAYA, *Indian Journal of Ecology*, 26 (1999) 162-166
- [5] - F. J. AL-TAHAN, *Fitoterapia*, 65 (1994) 34-37
- [6] - P. B. OELRICHS, M. W. HILL, P. J. VALLERY, J. K. Mc LOED and T. F. MOLINSKY, "Phytochemistry", 22 (1983) 531-534.
- [7] - Z. ATTAY-KADIRI, A. SEMLALI, N. BAIHSAIN et C. VILLEMANT, *Integrated protection in Oak forest. OILB/WPRS. Bull.*, 25 (5) (2002) 139-146.
- [8] - M. C. CARPENILLA, M. T. De FAGO, G. VALLODORES and S. M. PALACIOT, *J.Agric.Food chem.*, 51 (2) (2003) 369-374.
- [9] - A. F. YANES and M. J. HASEGAWA, *Submicrosc Cytol. Pathol.*, 36 (2) (2004) 149-154.
- [10] - M. R. KHAN, M. KIHARA and A. D. OMOLSO, "Fitoterapia", 72 (2001) 423-427.
- [11] - R. SALEEM, S. I. AHMED, S. M. SHAMIM, S. FAIZIS and B. S. SIDDIQUI, *Phytother Res.*, 16 (8) (2002) 762-764.
- [12] - L. M. BORGES, P. H. FERRI, W. J. SILVA, W. C. SILVA and J. G. SILVA, *Med. Vet. et. Entomol.*, 17 (2) (2003) 228-231.
- [13] - M. V. MACIEL, M. S. M. KIHARA, C. M. L. BEVILOQUA, A. L. F. CAMURCA VASCONCELOS, C. T. C. COSTA and C. M. S. CASTRO, *Veterinary Parasitology*, 31 (2006) 98-104.
- [14] - G. KESHRI, U. LAKSHMI and M. M. SINGH, "Contraception", 68 (4) (2003) 303-306.
- [15] - D. N. CHOUDHARY, J. N. SINGH, S. K. VERMA and B. P. SINGH, *Indian J. Exp. Biol.*, 28 (8) (1990) 714-716.
- [16] - B. KHILLARE and T. G. SHRIVASTAV, "Contraception" 68 (3) (2001) 225-229.
- [17] - S. K. SHAMARA, M. SAIRAM, G. ILAVAZHAGAN, K. DEVENDRA, S. S. SHIVAJI and Y. W. SELVAMURT, "Contraception" 54 (6) (1996) 373-378.

- [18] - P. RAGHUVANSHI, R. BAGGA, D. MALHOTRA, S. GOPALAN and G. P. TAWAR, *Indian J. Med. Res.*, 41 (2001) 113-135.
- [19] - J. AUGER, J. M. KUNSTMANN, F. CZYGLIK and P. JOUANNET, *N. Engl. J. Med.*, 332 (1995) 281-285.
- [20] - D. M. FERY and C. K. TOONE, *Sciences*, 213 (1981) 922-924.
- [21] - K. R. MUNKITTRICH, P. A. MILLER, D. R. BARTON and D. G. DIXON, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 21 (1991) 318-326.
- [22] - C. CHLIVERS, M. C. PIKE, D. FORMAN, K. FOGELMAN and M. E. WADSWORTH, *Lancel*, 2 (1984) 330-332.
- [23] - B. KALLEN, R. BERTOLLINI and E. CASTILLA, *Acta Paediatr. Scand.*, 324(suppl) (1986) 1-52.
- [24] - H. O. ADAMI, R. BERGSTROM and M. MOHNER, *Int. J. Cancer*, 59 (1994) 33-38.
- [25] - C. MASSAAD, et R. BAROUKI, *Médecine/Sciences* 15 (1999) 1362-1369.
- [26] - J. TOPPARI, J. C. LARSEN and P. CHRISTIANSEN, *Environ. Health Perspect.*, 104 (suppl 4) (1996) 714-803.
- [27] - R. R. NEWBOLD, B. C. BULLOCK and J. A. MCLACHLAN, *Am. J. Pathol.* 125 (1986) 625-628.
- [28] - J. MACLACHLAN, New York : *Thieme-Stratton*, (1981) 148-157.
- [29] - J. A. VISSER, A. MACLUSKEY, M. VERHOEF-POST, P. KRAMER, J. A. GROOTEGOED and A. P. THERMMEN, "Endocrinology", 139 (1998) 4244-4251.
- [30] - T. L. GRECO, T. M. DUELLO and J. GORSKI, *Endocrinol. Rev.*, 14 (1993) 59-71.
- [31] - E. P. SMITH, J. BOYD and G. R. FRANK, *N. Engl. J. Med.*, 331 (1994) 1056-1061.
- [32] - C. WESSELING, A. AHLBOM, D. ANTICH, A. C. RODRIGUEZ and R. CASTRO, *Int. J. Epidemiol.*, 25 (1996) 1125-1131.
- [33] - B. JEGOU, *Med. Sci.*, 11 (1995) 519-527.
- [34] - R. M. SHARPE, J. S. FISHER, M. M. MILLAR, S. JOBLING and J. P. SUMPTER, *Environ. Health Perspect.*, 103 (1995) 1136-1143.
- [35] - R. M. SHARPE, *J. Endocrinol.*, 136 (1993) 357-360.
- [36] - D. J. WAXMAN, J. J. MORRISSEY and G. A. LEBLANC, *Mol. Pharmacol.*, 35 (1989) 512-525.