

Effets de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *pausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction chez le rat mâle wistar

^{1*}Akassa H. *, ¹Makemba Nkounkou G.S., ²Nkoua Badzi C., ¹Etou Ossibi A.W., ³Tamboura H.H., ¹Abena A.A.

¹Laboratoire de Biochimie et Pharmacologie, Faculté des Sciences de la Santé Université Marien Nguabi B P.69, Brazzaville-Congo.

²Laboratoire National de Santé Publique (LNSP), BP 120 Brazzaville, République du Congo.

³Laboratoire de Biologie & Santé Animales (LaBioSA), INERA/CNRST BP 476 Ouagadougou, Burkina Faso.

Received 04 Sept 2019, Accepted 06 Nov 2019, Available online 11 Nov 2019, Vol.7 (Nov/Dec 2019 issue)

Abstract

La présente étude avait pour objectif principal d'évaluer les effets biologiques de l'extrait aqueux de l'écorce du tronc de *Pausinystalia yohimbe* (Rubiaceae) la qualité de la semence et les performances de reproduction chez le rat wistar. Deux doses (100 et 250 mg/kg pc) de cet extrait ont été administrées par voie orale à des rats mâles pendant 30 jours. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* à ces doses provoque une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration des spermatozoïdes au niveau de la queue de l'épididyme ainsi que la mobilité massale des spermatozoïdes. Par ailleurs, la morphologie des spermatozoïdes n'a connu pas de variation significative. Les résultats obtenus sur les performances de reproduction montrent que ces extraits provoquent une augmentation des taux de fertilité (50 % respectivement), de fécondité (350 et 300% respectivement) et de prolificité (700 et 600 % respectivement) par rapport au lot témoin (+33 % de taux de fertilité, +166 % de taux de fécondité et +500 % de taux de prolificité). La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait par la méthode qualitative a révélé que *Pausinystalia yohimbe* réduit le radical DPPH. L'amélioration des caractéristiques de la semence et des performances de reproduction observée dans le présent travail justifie son utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de l'infertilité masculine.

Mots clés : semence, performances de reproduction et antioxydant.

Introduction

L'infertilité est conventionnellement définie par l'Organisation Mondiale de la Santé, comme étant l'incapacité à concevoir naturellement après une année d'accouplements fréquents non protégés (Schlosser *et al.*, 2007). Elle constitue un des problèmes majeurs en santé humaine et animale affectant la vie socio - culturelle de nombreux individus. D'un point de vue de la responsabilité, dans la plupart des cas, la femelle est systématiquement incriminée. Ainsi, les recherches sur la reproduction masculine sont restées longtemps balbutiantes et notoirement en retrait par rapport à celles entreprises chez la femelle. Il en résulte que la stérilité masculine demeure très faiblement investiguée et son approche thérapeutique généralement empirique. Or, dans la réalité biologique, les deux sexes sont concernés par la problématique (Tamboura, 2006). Plusieurs études récentes ont montré que les cellules germinales masculines sont très sensibles aux facteurs

environnementaux (pesticides et métaux lourds) (Marzec-Wróblewska *et al.*, 2012 ; Mirandas-Contreras *et al.*, 2013 ; Ngoula *et al.* 2014 ; Ngoula *et al.*, 2017 et Nkenfack *et al.*, 2018) ayant des effets néfastes sur la santé animale et humaine avec comme conséquence la production en grande quantité de radicaux libres à l'origine du stress oxydatif. Les travaux menés par Abarikwu *et al.* (2010) et Ngoula *et al.* (2017) ont montré que ce déséquilibre entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des pro oxydants provoque une baisse significative des paramètres de reproduction (oligospermie, asthénospermie, tératospermie), pouvant aboutir à une infertilité ou stérilité masculine (Huyghe *et al.*, 2013).

Le traitement de l'infertilité masculine par les plantes médicinales constitue de nos jours une alternative de plus en plus usitée du fait de sa diversité, sa souplesse d'utilisation, sa disponibilité géographique dans de nombreuses parties du monde, son faible coût, son faible niveau de participation technologique et son impact économique (OMS, 2002 ; Gurib-Fakim, 2006). *Pausinystalia yohimbe* est une plante utilisée en médecine traditionnelle congolaise pour le traitement de

*Corresponding author's ORCID ID: 0000-0002-5651-679X

DOI: <https://doi.org/10.14741/ijmcr/v.7.6.5>

la dysfonction sexuelle mâle. Les études réalisées par Ikebuaso et al. (2012) et Ogwo et al. (2016) ont montré les effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia macrocéras* et de l'extrait éthanolique de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité des spermatozoïdes chez le rat. Cependant aucune étude des effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction n'a été réalisée. C'est pourquoi, la présente étude a été initiée avec pour objectif principal d'évaluer les effets biologiques de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction chez le rat mâle wistar.

Matériels et Méthodes

Matériel Végétal

Les écorces de tronc de *Pausinystalia yohimbe* en provenance du Mayombe dans le département du Niari (République du Congo) ont été fournies par les vendeurs du marché Total de Brazzaville. L'identification de *Pausinystalia yohimbe* a été faite à l'Institut National de Recherche en Sciences Exactes et Naturelles (I.R.S.E.N.) et comparée à l'échantillon de référence de l'Herbier central immatriculé sous le numéro 15694-2009.

Matériel Animal

Les rats albinos Wistar mâles âgés de trois (3) mois et de poids compris entre 100 et 150 g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université Marien Ngouabi et nourris avec une alimentation standard avec accès libre à l'eau et un rythme d'éclairage nocturne-diurne (12/12).

Méthodes

Préparation de l'extrait aqueux

Les écorces de *Pausinystalia yohimbe* ont été débitées en petits morceaux puis séchées au sur une paillasse propre du laboratoire à l'air libre sous température ambiante (28-30 °C) pendant 15 jours. Elles ont été ensuite pilées et broyées dans un mortier de manière à obtenir une poudre homogène. Cinquante (50) grammes de cette poudre sont ensuite dissouts dans 500 ml d'eau distillée. La solution obtenue est ensuite remuée à l'aide d'un agitateur magnétique (model L-73) pendant 48 heures. Le macéré obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre (papier Whatman n°3) et du coton hydrophile. Le filtrat obtenu a été concentré sur bain marie thermostaté à 55°C pendant 4 jours, ce qui a permis d'obtenir 3,5 g d'extrait sec de couleur marron qui a été conservé à +20° C en vue des tests pharmacologiques ultérieurs.

Effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur quelques caractéristiques microscopiques de la semence

L'étude des effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur quelques caractéristiques microscopiques de la semence a été réalisée afin d'évaluer les effets de l'extrait sur la fonction spermatique (mobilité, concentration et morphologie des spermatozoïdes). Pour cela, après sacrifice des animaux par overdose à l'éther éthylique et prélèvement des organes, la queue de l'épididyme droit de chaque rat a été excisée, pesée et dilacérée dans une boîte de pétri contenant 10 ml de solution de NaCl à 0,9%, puis incubé au bain marie à 36 °C (Ngoula, 2008).

a- Effet de l'extrait sur la mobilité des spermatozoïdes

La mobilité (ou encore motilité) constitue un important indice de la vitalité des spermatozoïdes. Dans les éjaculats de mauvaise qualité, les spermatozoïdes se déplacent lentement et présentent des mouvements non rectilignes (Derivaux et Ectors, 1986). Notre étude visait comme objectif d'évaluer l'effet de l'extrait sur la mobilité des spermatozoïdes. En effet, un sperme de bonne qualité doit posséder au moins 60 à 70% de spermatozoïdes mobiles avec un degré de mobilité ou de coefficient de 4 ou 5 (Derivaux et Ectors, 1986). Ainsi, la mobilité des spermatozoïdes a été appréciée par l'examen direct de la solution. 20µl de cette solution était placé entre lame et lamelle au grossissement x40. Les spermatozoïdes mobiles et immobiles ont été décomptés sur 12 champs microscopiques choisis au hasard et le pourcentage des formes mobiles a été déterminé à partir de la formule proposée par Ngoula, (2008) :

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

b- Effet de l'extrait sur la concentration des spermatozoïdes

La production suffisante des spermatozoïdes dans l'éjaculat constitue également un critère important pour apprécier la qualité de la semence car une production insuffisante pourrait être cause soit de subfertilité, soit d'infertilité chez le sujet (Oyedéji et al., 2013a et Oyedéji et al., 2013b). La numération des spermatozoïdes a été faite à l'aide de la cellule de Thoma. A cet effet, le sperme était dilué 100 fois à l'aide d'une solution formolée (35 %) en vue de fixer les spermatozoïdes pour les rendre immobiles pendant le comptage. 10µl de cette semence diluée était placé dans la chambre de la cellule de Thoma (surface = 0,2 mm² et profondeur = 0,1 mm), et couvert par une lame couvre-objet. Le comptage s'est fait au microscope (Leica DM 750) au grossissement X40. Les spermatozoïdes ont été comptés dans cinq grands carrés. L'opération est répétée 2 fois et la moyenne ainsi calculée

a permis de déterminer le nombre de spermatozoïdes par/queue d'épididyme, par la formule suivante :

Nombre de spermatozoïdes / queue = nombre de spermatozoïdes / mm³ x 1000 x 10.

Où 10 est le volume de la solution en ml et 1000 le facteur de conversion des mm³ en ml (Ngoula, 2008).

c- Effet de l'extrait sur la morphologie des spermatozoïdes

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration du sperme d'un homme infertile (Saïdi et al., 2008). La technique dite d'éosine-nigrosine à base d'un colorant d'éosine (colorant physiologique) et de nigrosine (substance de fond) a été utilisée. Le colorant a été préparé au début de l'étude selon le protocole proposé par Bjorndahl et al. (2003) et conservé à 4 °C à un pH (6,8) contrôlé régulièrement. Avant l'utilisation, la température est ramenée à 37 °C dans un bain-marie. Une goutte de semence est mélangée à 4 gouttes de colorant et après 1 minute, 10 µl de mélange sont étalés sur une lame préchauffée à 37 °C, conservé à l'étuve à 30 °C jusqu'à l'analyse. L'identification des anomalies est faite au microscope (Leica DM 750) à l'objectif Gx 100 en s'inspirant des modèles proposés par Dumont, (1997).

Les types d'anomalies morphologiques du spermatozoïde chez les mâles ont été classés en deux grandes catégories (Abdel-El-Azim et El-Kamash, 2011):

- Les anomalies primaires (spermatozoïdes macrocéphales, microcéphales, à tête allongée et amincie, à tête irrégulière,)
- et les anomalies secondaires (spermatozoïdes sans queue, à flagelle angulé ou à flagelle enroulé, à flagelle court,...). Les spermatozoïdes anormaux et normaux ont été comptés sur un total de 200 cellules et les pourcentages des formes anormales et normales ont été déterminés à partir de la formule proposée par Ngoula, (2008).

$$= \frac{\% \text{ des spermatozoïdes anormaux}}{\text{Nombre de spermatozoïdes anormaux}} \times 100$$

$$= \frac{\% \text{ des spermatozoïdes normaux}}{\text{Nombre de spermatozoïdes normaux}} \times 100$$

Effets de l'extrait aqueux de *Pausynstalia yohimbe* sur les performances de reproduction

Cette séquence expérimentale a consisté à évaluer les performances de reproduction des mâles traités par l'extrait aqueux de la plante et accouplés aux femelles. Elle a été réalisée sur trente-six rats adultes dont 12 mâles et 24 femelles ayant un poids vif moyen compris

entre 100 - 150 g. Les animaux ont été répartis en quatre lots de 3. Les rats ont été mis à jeun 12 heures avant la première administration des produits. Au terme du traitement, chaque mâle a été accouplé à deux femelles. Les femelles ont été mises ensuite dans des cages individuelles et suivies jusqu'à la mise basse. L'évaluation du taux de fertilité a nécessité un diagnostic de gestation.

a- Diagnostic de gestation

Il n'est pas aisé de diagnostiquer une gestation chez une ratte car elle ne grossit qu'au cours de la dernière semaine et cette prise de poids n'est significative que si la portée est nombreuse. Cependant, il existe des signes sur lesquels l'on peut se baser pour poser un diagnostic de gestation chez la ratte (Deriveaux et Ectors, 1986) : les tétines deviennent très apparentes : ceci n'est valable que si l'on a le coup d'œil et si la ratte n'a pas déjà allaité une portée ; l'abdomen est ballonné à la troisième semaine pour une gestation qui dure 22 à 23 jours. On doit pouvoir sentir de petites boules par palpation abdominale. Ainsi, les taux de fertilité, de fécondité et de prolificité des rattes ont été déterminés entre deux intervalles de temps : du 22^e au 30^e et du 31^e au 60^e jour post accouplement. Normalement, lorsque les rattes et les mâles sont mis en accouplement, il y a des mises-bas en moins de 30 jours, car la durée de gestation chez la ratte est de 21 à 22 jours (Kenmogne, 2007). Ces taux ont été calculés à l'aide des formules ci-dessous (Boly et al., 2000).

b- Taux de fertilité vrai

La fertilité est l'aptitude de la femelle à être fécondée lors d'un œstrus. A l'échelle du troupeau ou groupe d'animaux, on calcule le taux de fertilité suivant la formule ci-après :

$$= \frac{\text{Taux de fertilité vrai}}{\text{Nombre de femelles gestantes}} \times 100$$

c- Taux de fécondité

La fécondité est l'aptitude d'une femelle à donner un produit vivant. Elle peut aussi s'évaluer par le nombre d'animaux vivants auxquels une femelle a donné naissance au cours de sa vie. Au niveau d'un troupeau ou groupe d'animaux, on détermine le taux de fécondité par la formule suivante :

$$= \frac{\text{Taux de fécondité}}{\text{Nombre de petits vivants}} \times 100$$

d- Taux de prolificité

La prolificité est l'aptitude d'une femelle à donner naissance à un ou plusieurs nouveau-nés vivants au cours

d'une même mise basse. A l'échelle du troupeau ou groupe d'animaux, le taux de prolificité est défini par :

$$\text{Taux de prolificité} = \frac{\text{Nombre de petits nés vivants}}{\text{Nombre de mises bas}} \times 100$$

Effet anti-oxydant de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe*

Ce test a été réalisé selon la méthode de réduction du radical DPPH telle que décrite par Brand William et al. (1995). Cette méthode a été également utilisée par Huang et al. (2005). Elle consiste à réduire le DPPH par les substances antioxydantes contenues dans l'extrait aqueux de *pausinystalia yohimbe*.

Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des données collectées a été réalisée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA), le test « t » de Student et de Mann-Whitney pour comparer les groupes « essais » aux groupes « contrôles » avec $p < 0,05$ comme seuil de significativité.

Introduction

L'infertilité est conventionnellement définie par l'Organisation Mondiale de la Santé, comme étant l'incapacité à concevoir naturellement après une année d'accouplements fréquents non protégés (Schlosser et al., 2007). Elle constitue un des problèmes majeurs en santé humaine et animale affectant la vie socio - culturelle de nombreux individus. D'un point de vue de la responsabilité, dans la plupart des cas, la femelle est systématiquement incriminée. Ainsi, les recherches sur la reproduction masculine sont restées longtemps balbutiantes et notoirement en retrait par rapport à celles entreprises chez la femelle. Il en résulte que la stérilité masculine demeure très faiblement investiguée et son approche thérapeutique généralement empirique. Or, dans la réalité biologique, les deux sexes sont concernés par la problématique (Tamboura, 2006). Plusieurs études récentes ont montré que les cellules germinales masculines sont très sensibles aux facteurs environnementaux (pesticides et métaux lourds) (Marzec-Wróblewska et al., 2012 ; Mirandas-Contreras et al., 2013 ; Ngoula et al 2014 ; Ngoula et al., 2017 et Nkenfack et al., 2018) ayant des effets néfastes sur la santé animale et humaine avec comme conséquence la production en grande quantité de radicaux libres à l'origine du stress oxydatif. Les travaux menés par Abarikwu et al. (2010) et Ngoula et al. (2017) ont montré que ce déséquilibre entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des pro oxydants provoque une baisse significative des paramètres de reproduction (oligospermie, asthénospermie, tératospermie), pouvant aboutir à une infertilité ou stérilité masculine (Huyghe et al., 2013).

Le traitement de l'infertilité masculine par les plantes médicinales constitue de nos jours une alternative de plus en plus usitée du fait de sa diversité, sa souplesse d'utilisation, sa disponibilité géographique dans de nombreuses parties du monde, son faible coût, son faible niveau de participation technologique et son impact économique (OMS, 2002 ; Gurib-Fakim, 2006). *Pausinystalia yohimbe* est une plante utilisée en médecine traditionnelle congolaise pour le traitement de la dysfonction sexuelle mâle. Les études réalisées par Ikebuaso et al. (2012) et Ogwo et al. (2016) ont montré les effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia macroceras* et de l'extrait éthanolique de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité des spermatozoïdes chez le rat. Cependant aucune étude des effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction n'a été réalisée. C'est pourquoi, la présente étude a été initiée avec pour objectif principal d'évaluer les effets biologiques de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Pausinystalia yohimbe* sur la qualité de la semence et les performances de reproduction chez le rat mâle wistar.

Matériels et Methodes

Matériel Végétal

Les écorces de tronc de *Pausinystalia yohimbe* en provenance du Mayombe dans le département du Niari (République du Congo) ont été fournies par les vendeurs du marché Total de Brazzaville. L'identification de *Pausinystalia yohimbe* a été faite à l'Institut National de Recherche en Sciences Exactes et Naturelles (I.R.S.E.N.) et comparée à l'échantillon de référence de l'Herbier central immatriculé sous le numéro 15694-2009.

Matériel Animal

Les rats albinos Wistar mâles âgés de trois (3) mois et de poids compris entre 100 et 150 g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université Marien Nguabi et nourris avec une alimentation standard avec un accès libre à l'eau et un rythme d'éclairage nocturne-diurne (12/12) sous température ambiante (28-30 °C).

Méthodes

Préparation de l'extrait aqueux

Les écorces de *Pausinystalia yohimbe* ont été débitées en petits morceaux puis séchées au sur une paille propre du laboratoire à l'air libre sous température ambiante (28-30 °C) pendant 15 jours. Elles ont été ensuite pilées et broyées dans un mortier de manière à obtenir une poudre homogène. Cinquante (50) grammes de cette poudre sont ensuite dissouts dans 500 ml d'eau distillée. La solution obtenue est ensuite remuée à l'aide d'un

agitateur magnétique (model L-73) pendant 48 heures. Le macéré obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre (papier Whatman n°3) et du coton hydrophile. Le filtrat obtenu a été concentré sur bain marie thermostaté à 55°C pendant 4 jours, ce qui a permis d'obtenir 3,5 g d'extrait sec de couleur marron qui a été conservé à +20° C en vue des tests pharmacologiques ultérieurs.

Effets de l'extrait aqueux de *Pausinytalia yohimbe* sur quelques caractéristiques microscopiques de la semence

L'étude des effets de l'extrait aqueux de *Pausinytalia yohimbe* sur quelques caractéristiques microscopiques de la semence a été réalisée afin d'évaluer les effets de l'extrait sur la fonction spermatique (mobilité, concentration et morphologie des spermatozoïdes). Pour cela, après sacrifice des animaux par overdose à l'éther éthylique et prélèvement des organes, la queue de l'épididyme droit de chaque rat a été excisée, pesée et dilacérée dans une boîte de pétri contenant 10 ml de solution de NaCl à 0,9%, puis incubé au bain marie à 36 °C (Ngoula, 2008).

d- Effet de l'extrait sur la mobilité des spermatozoïdes

La mobilité (ou encore motilité) constitue un important indice de la vitalité des spermatozoïdes. Dans les éjaculats de mauvaise qualité, les spermatozoïdes se déplacent lentement et présentent des mouvements non rectilignes (Derivaux et Ectors, 1986). Notre étude visait comme objectif d'évaluer l'effet de l'extrait sur la mobilité des spermatozoïdes. En effet, un sperme de bonne qualité doit posséder au moins 60 à 70% de spermatozoïdes mobiles avec un degré de mobilité ou de coefficient de 4 ou 5 (Derivaux et Ectors, 1986). Ainsi, la mobilité des spermatozoïdes a été appréciée par l'examen direct de la solution. 20µl de cette solution était placé entre lame et lamelle au grossissement x40. Les spermatozoïdes mobiles et immobiles ont été décomptés sur 12 champs microscopiques choisis au hasard et le pourcentage des formes mobiles a été déterminé à partir de la formule proposée par Ngoula, (2008) :

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

e- Effet de l'extrait sur la concentration des spermatozoïdes

La production suffisante des spermatozoïdes dans l'éjaculat constitue également un critère important pour apprécier la qualité de la semence car une production insuffisante pourrait être cause soit de subfertilité, soit d'infertilité chez le sujet (Oyedeji et al., 2013a et Oyedeji et al., 2013b). La numération des spermatozoïdes a été faite à l'aide de la cellule de Thoma. A cet effet, le sperme était dilué 100 fois à l'aide d'une solution formolée (35 %

en vue de fixer les spermatozoïdes pour les rendre immobiles pendant le comptage. 10µl de cette semence diluée était placé dans la chambre de la cellule de Thoma (surface = 0,2 mm² et profondeur = 0,1 mm), et couvert par une lame couvre-objet. Le comptage s'est fait au microscope (Leica DM 750) au grossissement X40. Les spermatozoïdes ont été comptés dans cinq grands carrés. L'opération est répétée 2 fois et la moyenne ainsi calculée a permis de déterminer le nombre de spermatozoïdes par/queue d'épididyme, par la formule suivante :
Nombre de spermatozoïdes / queue = nombre de spermatozoïdes / mm³ x 1000 x 10.

Où 10 est le volume de la solution en ml et 1000 le facteur de conversion des mm³ en ml (Ngoula, 2008).

f- Effet de l'extrait sur la morphologie des spermatozoïdes

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration du sperme d'un homme infertile (Saïdi et al., 2008). La technique dite d'éosine-nigrosine à base d'un colorant d'éosine (colorant physiologique) et de nigrosine (substance de fond) a été utilisée. Le colorant a été préparé au début de l'étude selon le protocole proposé par Bjorndahl et al. (2003) et conservé à 4 °C à un pH (6,8) contrôlé régulièrement . Avant l'utilisation, la température est ramenée à 37 °C dans un bain-marie. Une goutte de semence est mélangée à 4 gouttes de colorant et après 1 minute, 10 µl de mélange sont étalés sur une lame préchauffée à 37 °C, conservé à l'étuve à 30 °C jusqu'à l'analyse. L'identification des anomalies est faite au microscope (Leica DM 750) à l'objectif Gx 100 en s'inspirant des modèles proposés par Dumont, (1997).

Les types d'anomalies morphologiques du spermatozoïde chez les mâles ont été classés en deux grandes catégories (Abdel-El-Azim et El-Kamash, 2011) :

- Les anomalies primaires (spermatozoïdes macrocéphales, microcéphales, à tête allongée et amincie, à tête irrégulière,)
- et les anomalies secondaires (spermatozoïdes sans queue, à flagelle angulé ou à flagelle enroulé, à flagelle court,...). Les spermatozoïdes anormaux et normaux ont été comptés sur un total de 200 cellules et les pourcentages des formes anormales et normales ont été déterminés à partir de la formule proposée par Ngoula, (2008).

$$\% \text{ des spermatozoïdes anormaux} = \frac{\text{Nombre de spermatozoïdes anormaux}}{\text{nombre total de spermatozoïdes comptés}} \times 100$$

$$= \frac{\% \text{ des spermatozoïdes normaux}}{\text{Nombre total de spermatozoïdes comptés}} \times 100$$

Effets de l'extrait aqueux de *Pausinyntalia yohimbe* sur les performances de reproduction

Cette séquence expérimentale a consisté à évaluer les performances de reproduction des mâles traités par l'extrait aqueux de la plante et accouplés aux femelles. Elle a été réalisée sur trente-six rats adultes dont 12 mâles et 24 femelles ayant un poids vif moyen compris entre 100 - 150 g. Les animaux ont été répartis en quatre lots de 3. Les rats ont été mis à jeun 12 heures avant la première administration des produits. Au terme du traitement, chaque mâle a été accouplé à deux femelles. Les femelles ont été mises ensuite dans des cages individuelles et suivies jusqu'à la mise basse. L'évaluation du taux de fertilité a nécessité un diagnostic de gestation.

e- Diagnostic de gestation

Il n'est pas aisé de diagnostiquer une gestation chez une ratte car elle ne grossit qu'au cours de la dernière semaine et cette prise de poids n'est significative que si la portée est nombreuse. Cependant, il existe des signes sur lesquels l'on peut se baser pour poser un diagnostic de gestation chez la ratte (Deriveaux et Ectors, 1986) : les tétines deviennent très apparentes : ceci n'est valable que si l'on a le coup d'œil et si la ratte n'a pas déjà allaité une portée ; l'abdomen est ballonné à la troisième semaine pour une gestation qui dure 22 à 23 jours. On doit pouvoir sentir de petites boules par palpation abdominale. Ainsi, les taux de fertilité, de fécondité et de prolificité des rattes ont été déterminés entre deux intervalles de temps : du 22^e au 30^e et du 31^e au 60^e jour post accouplement. Normalement, lorsque les rattes et les mâles sont mis en accouplement, il y a des mises-bas en moins de 30 jours, car la durée de gestation chez la ratte est de 21 à 22 jours (Kenmogne, 2007). Ces taux ont été calculés à l'aide des formules ci-dessous (Boly et al., 2000).

f- Taux de fertilité vrai

La fertilité est l'aptitude de la femelle à être fécondée lors d'un œstrus. A l'échelle du troupeau ou groupe d'animaux, on calcule le taux de fertilité suivant la formule ci-après :

$$= \frac{\text{Taux de fertilité vrai}}{\text{Nombre de femelles gestantes}} \times 100$$

$$= \frac{\text{Nombre de femelles mises en reproduction}}{\text{Nombre de femelles mises en reproduction}} \times 100$$

g- Taux de fécondité

La fécondité est l'aptitude d'une femelle à donner un produit vivant. Elle peut aussi s'évaluer par le nombre

d'animaux vivants auxquels une femelle a donné naissance au cours de sa vie. Au niveau d'un troupeau ou groupe d'animaux, on détermine le taux de fécondité par la formule suivante :

$$= \frac{\text{Taux de fécondité}}{\text{Nombre de petits vivants}} \times 100$$

$$= \frac{\text{Nombre de petits vivants}}{\text{Nombre de femelles mises en reproduction}} \times 100$$

h- Taux de prolificité

La prolificité est l'aptitude d'une femelle à donner naissance à un ou plusieurs nouveau-nés vivants au cours d'une même mise basse. A l'échelle du troupeau ou groupe d'animaux, le taux de prolificité est défini par :

$$\text{Taux de prolificité} = \frac{\text{Nombre de petits nés vivants}}{\text{Nombre de mises bas}} \times 100$$

Effet anti-oxydant de l'extrait aqueux de *Pausinyntalia yohimbe*

Ce test a été réalisé selon la méthode de réduction du radical DPPH telle que décrite par Brand William et al. (1995). Cette méthode a été également utilisée par Huang et al. (2005). Elle consiste à réduire le DPPH par les substances antioxydantes contenues dans l'extrait aqueux de *pausinyntalia yohimbe*.

Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des données collectées a été réalisée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA), le test « t » de Student et de Mann-Whitney pour comparer les groupes « essais » aux groupes « contrôles » avec $p < 0,05$ comme seuil de significativité.

RESULTATS

Effet de l'extrait aqueux de *Pausinyntalia yohimbe* sur quelques caractéristiques microscopiques de la semence

Les effets de l'extrait aqueux de *Pausinyntalia yohimbe* sur les caractéristiques des spermatozoïdes sont résumés dans le tableau I. Il en ressort que, la concentration par / queue d'épididyme et le taux de la mobilité massale des spermatozoïdes ont augmenté significativement ($p < 0,05$) chez les rats traités à l'extrait aqueux de *Pausinyntalia yohimbe* (100 et 250 mg /kg/po) par rapport aux rats du lot témoin traités à l'eau distillée. En outre, les taux des spermatozoïdes normaux et anormaux n'ont pas été affectés de façon significative ($p > 0,05$) par les doses de l'extrait aqueux *Pausinyntalia yohimbe* utilisées. De même aucune variation ($p > 0,05$) de la concentration et des taux de mobilité de spermatozoïdes normaux et anormaux n'a été observée chez les animaux traités à l'éthanolate de testostérone.

Tableau I : Effet de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur quelques caractéristiques de la semence

Caractéristiques des spermatozoïdes	Traitements			
	Eau distillée (0,5ml/100g)	Enanthate de testostérone (3,6 mg/kg)	<i>Pausinystalia yohimbe</i> (100 mg/kg)	<i>Pausinystalia yohimbe</i> (250 mg/kg)
Concentration en spermatozoïdes/queue d'épididyme ($\times 10^6$ /ml)	1,17 \pm 0,06	4,06 \pm 0,22***	2,40 \pm 0,28 **	2,55 \pm 0,36**
Mobilité massale des spermatozoïdes (%)	28,08 \pm 0,48	30,62 \pm 0,47 ^{ns}	43,5 \pm 0,51**	42,80 \pm 0,59 **
Spermatozoïdes anormaux (%)	38,25 \pm 1,88	38,50 \pm 1,70 ^{ns}	37,00 \pm 5,68 ^{ns}	37,50 \pm 5,70 ^{ns}
Spermatozoïdes normaux (%)	61,75 \pm 1,88	61,5 \pm 1,70 ^{ns}	63,00 \pm 5,68 ^{ns}	62,50 \pm 5,70 ^{ns}

Les valeurs sont des moyennes \pm ESM, avec n = 5. * : p < 0,05, ** : p < 0,01 et *** : p < 0,001 différence significative par rapport aux témoins (eau distillée) , ns : P > 0,05 différence non significative par rapport au témoins (eau distillée).

Tableau II : Effet de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur les performances de reproduction

Paramètres de reproduction	Traitements			
	Eau distillée (0,5ml /100 g)	Enanthate de testostérone (3,6 mg/kg)	<i>Pausinystalia yohimbe</i> (100 mg/kg)	<i>Pausinystalia yohimbe</i> (250 mg/kg)
Taux de fertilité vrai	33 %	50 %	50 %	50 %
Taux de fécondité	166 %	200 %	350 %	300 %
Taux de prolificité	500 %	400 %	700 %	600 %

Effets de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Pausinystalia yohimbe* sur les performances de reproduction

Les effets de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur les paramètres de reproduction des rats mâles accouplés aux femelles sont présentés dans le tableau II. Les résultats de ce tableau montrent que l'extrait aqueux aux doses de 100 et 250 mg/kg administré par voie orale provoque une augmentation des taux de fertilité (50 % et 50 % respectivement) et de fécondité (350 et 300% respectivement) et de prolificité (700 et 600 % respectivement) par rapport au lot témoin (+33 % de taux de fertilité, +166 % de taux de fécondité et +500 % de taux de prolificité).

Effet antioxydant de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe*

La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait par la méthode qualitative a révélé que *Pausinystalia yohimbe* réduit le radical DPPH (Figure 1).

La présence des fluorescences jaunes à l'air libre sur un fond violet indique la présence des composés antioxydants.



Figure 1 : Mise en évidence de l'activité antioxydante sur CCM de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* à partir du radical DPPH

Discussion

L'étude des caractéristiques des spermatozoïdes et des performances de reproduction est considérée comme un indicateur utile pour évaluer les effets des extraits des plantes sur la fonction testiculaire. La présente étude avait pour objectif principal d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* sur quelques caractéristiques de la semence et les performances de reproduction chez le rat mâle. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* (100 et 250 mg/kg) provoque une augmentation significative de la concentration par/queue d'épididyme et du taux de la mobilité massale des spermatozoïdes. Par ailleurs, la morphologie des spermatozoïdes n'a pas été affectée quelle que soit la dose d'extraits administrée. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ikebuaso et al., (2012) et Ogwo et al. (2016) qui ont observé une augmentation significative de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes chez les rats traités respectivement à l'extrait aqueux de *Pausinystalia macroceras* et à l'extrait éthanolique de *Pausinystalia yohimbe*. Ces résultats vont également dans le même sens que ceux d'Akinola et al. (2007) et de Uboh et al. (2010), qui ont montré une augmentation de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes chez les rats traités aux extraits des feuilles de *Psidium guajava*. De même une augmentation significative dose dépendante de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes a été observée par Massoma et al. (2013) et Ngandjui et al. (2017), chez les rats traités respectivement aux extraits aqueux de *Rauvolfia vomitoria* et de *Zanthoxylum macrophylla*. L'amélioration des caractéristiques de la semence observée serait attribuée à l'augmentation significative des taux de protéines totales sériques et testiculaires observée chez les rats traités à l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* (100 et 250 mg/kg, po) (Akassa et al., 2019). Il est connu que les protéines sont des macromolécules faisant partie des constituants qui assurent la nutrition et la maturation des spermatozoïdes (Gayrard., 2007). L'amélioration des caractéristiques de la semence constatée pourrait être aussi liée aux propriétés antioxydantes de l'extrait. En effet, la membrane des spermatozoïdes est particulièrement riche en acides gras polyinsaturés, qui les rend spécialement sensibles aux espèces oxygénées réactives (EOR) dérivées du métabolisme de l'oxygène. En plus d'une action sur les lipides, les EOR peuvent aussi endommager les protéines et l'ADN. Ces molécules peuvent entraîner une peroxydation lipidique de la membrane plasmique spermatique, des problèmes dans le déroulement de la capacitation ou de la réaction acrosomique, une perte de motilité, pouvant aboutir à une infertilité (Guan, 2009). L'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* contient un certain nombre de composés phénoliques (flavonoïdes, tanins ...) révélés lors du screening chimique (Okonkwo, 2012 ; Akassa et al., 2019) qui lui confèreraient des propriétés antioxydantes et agiraient comme des éboueurs de radicaux libres (Knasmüller, 2008) limitant

ainsi les conséquences négatives de ces derniers sur les spermatozoïdes. Les travaux antérieurs menés par Akassa et al. (2019) ont montré une augmentation significative des taux de testostérone totales sérique et testiculaire et de la masse de certains organes sexuels chez les rats mâles traités à l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe*. L'élévation des taux des hormones stéroïdes testiculaire et sérique par l'administration de l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* pourrait justifier également les effets observés sur la fonction spermatique. En effet, il ressort de nos résultats une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes par queue d'épididyme chez les animaux qui ont reçu 100 et 250 mg/kg de *Pausinystalia yohimbe*. L'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* semble ainsi avoir des effets bénéfiques sur la physiologie spermatogénique. La testostérone est la principale hormone gonadique mâle produite par les cellules de Leydig dans les testicules en réponse à la LH et sous le contrôle de l'axe hypothalamo – hypophysaire (Gayrard, 2007). Une certaine concentration de cette hormone est nécessaire pour l'initiation, le maintien de la spermatogenèse et pour la stimulation de la croissance, du fonctionnement de la prostate et des vésicules séminales (Gonzales, 2003). Par ailleurs, il a été rapporté que l'augmentation aussi bien du nombre de spermatozoïdes que du poids des organes sexuels est un indicateur de l'amélioration de la fertilité mâle (Woode et al., 2011). Les résultats du tableau II montrent respectivement une augmentation des taux de fertilité, de fécondité et de prolificité chez les rats mâles traités à l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* (100 et 250 mg/kg, po) et accouplés aux femelles par rapport au lot témoin. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Dangar, (2008) ; Ishimwe, (2008) et Djiguibet, (2009) qui ont observé une augmentation des taux de fertilité, de fécondité et de prolificité chez les rats mâles traités aux extraits lipidiques des racines entières de *Nauclea latifolia* et à l'extrait de l'infusé des racines entières de *Nauclea latifolia*. L'amélioration des performances de reproduction chez les rats mâles traités à l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* et accouplés aux femelles pourrait être due aux potentialités androgénique et antioxydante de la plante mises en évidence par Akassa et al. (2019). Ainsi, l'amélioration de quelques caractéristiques des semences au cours de cette étude justifie bien les bonnes performances de reproduction observées. Ces résultats laissent penser que l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* a une action spermatogénique au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire laquelle pourrait stimuler la synthèse des spermatozoïdes par les cellules de Sertoli via les cellules de Leydig.

Conclusion

Cette étude a montré que l'extrait aqueux de *Pausinystalia yohimbe* (100 et 250 mg/kg, po) provoque une augmentation significative de la concentration/queue d'épididyme et de la mobilité massale des

spermatozoïdes. Cet extrait n'entraîne aucune variation significative sur la morphologie des spermatozoïdes. Les résultats obtenus ont également montré que l'extrait aqueux de *Pausynstalia yohimbe* (100 et 250mg/kg, po) provoque une amélioration des taux de fertilité, de fécondité et de prolificité chez les rats traités à cet extrait et accouplés aux femelles. La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait par la méthode qualitative a révélé que *Pausynstalia yohimbe* réduit le radical DPPH. L'amélioration de la qualité de la semence et des performances de reproduction observée dans cette étude justifie son utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de l'infertilité masculine.

References

- [1]. Abarikwu S. O., Adesiyun A. C., Oyeloja T. O., Oyeyemi M. O and Farombi E. O., (2010). Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 874-882.
- [2]. Abdel-Azim A., El-Kamash E. M. (2011). Evaluation of semen quality and its relation to mating system for some breeds of rabbits under environmental conditions in the middle of Egypte. *Egypte poultry Science* 31(2): 467-480.
- [3]. Abshenas J., homayoon B., Zare M. H., Asie A., et Faradi S. (2011). The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. *Veterinary Research Forum* 2 (4): 242-247.
- [4]. Akassa H, Ondélé R, Peneme B.M.L, Etou Ossibi A.W, Morabandza C.J, Tamboura H.H., Abena A.A. (2019). Activité aphrodisiaque et étude du mécanisme d'action de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Pausynstalia yohimbe* kschum (Rubiaceae) chez le rat wistar. *Journal of animal and plant Sciences.* ; 39 (1) : 6372-6383.
- [5]. Akassa H., Peneme B.M.L, Ondélé R, Etou Ossebi A.W., Tamboura H.H., Abena A.A. (2019). Androgenic activity of the aqueous extract of the stem barks of *Pausynstalia yohimbe* kschum (Rubiaceae) in wistar rats. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*; 7 (4): 83-87.
- [6]. Akinola O. B., Oladosu O. S., Dosumu O. (2007). Spermatoprotective activity of the leaf extract of *Psidium guajava* Linn. *Nigerian Postgraduate Medical Journal* ;14 (4) : 273-276.
- [7]. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology* ; 28 : 25-30.
- [8]. Dangar M. (2008). Contribution à l'étude de l'activité androgénique des extraits lipidiques de racines entières de *Nauclea latifolia* Sm. Thèse : Méd. Vét. : Dakar-Senegal, n°57.
- [9]. Djiguibet S. (2009). Contribution à l'étude des effets lipidiques de racines entières de *nauclea latifolia* sm. sur les performances de reproduction: étude expérimentale chez le rat. Thèse : Méd. Vét. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, République Sénégalaise, 118p.
- [10]. Dumont P. (1997). Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le point vétérinaire* ; 28 : 19-32.
- [11]. Guan X. Y., Zhang W. J., Zhang X. W., Li Y. X., Wang J. F., Lin H. Z., Tang X.X., Qin S. (2009). A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant alpha-phycoyanin of *Spirulina*. *Journal of Applied Microbiology*; 106: 1093-1100.
- [12]. Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27 (1):1-93.
- [13]. Huang D.B., Prior R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 53 : 1841-1856.
- [14]. Huyghe H., Bonal M., Daudin M., Droupy S., (2013). Dysfonctions sexuelles et infertilité. *Progres en Urologie Elsevier Masson* ; 23 : 745- 751.
- [15]. Ikebuaso A. D., Yama O.E., Duru F. I. O., Oyebadejo S.A. (2012). Experimental Testicular Torsion in a Rat Model: Effects of Treatment with *Pausynstalia Macroceras* on Testis Functions. *J. Reprod. Infertil.* 13 (4): 218-224.
- [16]. Ishimwe E. (2008). Effets de l'infusé des racines entières de *Nauclea latifolia* Sm. Sur les performances de reproduction : étude expérimentale chez le rat. Thèse : Méd. Vét. : Dakar-Senegal, n°35.
- [17]. Kenfack A., Akono N.E., Ngoula F., Nounamo J.G.A., Kamtchouing P., Tchoumboue J. (2018): Post Exposure Effects of Propoxur (Agricultural Pesticide) on Male Fertility in Wistar Rat. *Iranian Journal of Toxicology*; 12 (3): 21-27.
- [18]. Knasmüller S., Nersesyan A., Misik M., Gerner C., Mikulits W., Ehrlich V., Hoelzl C., Szakmary A., Wagner K.H., (2008). Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *Br. J. Nutr*; 99: 3-52.
- [19]. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P. (2012). Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)* 58:7-15.
- [20]. Massoma L.D., Koloko B.L, Bend E.M., Domkam J., Oundoum Oundoum P.D., Ngaha N.M. (2013). Fertility enhancing effects of aqueous extract of *Rauvolfia vomitoria* on reproductive functions of male rats. *JExp Integr Med.* 4(1): 43- 49.
- [21]. Miranda-Contreras L, Gómez-Pérez R, Rojas G, Cruz I, Berruet L, Salmen S. (2013). Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *JOccup Health*; 55(3):195-203.
- [22]. Ngandjui A., Ngaha N. M., Kenmogne H., Koloko B.L., Massoma L.D., (2017). Evaluation of the fertility activity of the aqueous leaves extract of *Zanthoxylum macrophylla* (Rutaceae) on male rats. *J Phytopharmacol*, 6(5): 277-281
- [23]. Ngoula F. (2008). Effets des pesticides organophosphorés et carbamates sur quelques paramètres de reproduction chez le rat mâle adulte. Thèse PhD. Université de Yaoundé I. Cameroun, 163p.
- [24]. Ogwo, E.U., Osim E.E., Nwankwo A.A., Ijioma S.N. (2016). Semen Quality in Male Albino Rats Fed with Various Concentrations of *Pausynstalia Yohimbe* Bark Powder (Burantashi). *Journal of Medical and Dental Science Research*; 3:16-24.
- [25]. Okonkwo I.L. (2012). Phytochemical analysis in Preliminary Investigation on Effects of Burantashi Extract on Liver Enzymes of Albino male and female Wistar rats, 90 p.
- [26]. OMS : (2002). Stratégies de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. 65p.
- [27]. Schlosser, J., Nakib, I., Carré-Pigeon, F., and Staerman, F. (2007). Infertilité masculine : définition et physiopathologie. *Annales d'Urologie* ; 41 (3) : 127–133.
- [28]. Tamboura H. H., Bayala B., Pellicer M. T., Zongo D., Traoré A., Ouédraogo L., Malpoux B., Sawadogo L., (2006). Effets oestrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur & Schinz chez la rate ovariectomisée. 10 (3) : 173-180. (Disponible sur le site: <http://popups.ulg.ac.be>).
- [29]. Tsala E.D., (2009). Activités antibactérienne, cicatrisante et antioxydante des extraits d'*Alafia multiflora* Stapf (Apocynaceae), D.E.A en Physiologie Animale 72p.
- [30]. Uboh F. E., Edet E. E., Eteng M. U., Eyong E. U. (2010). Comparative effect of aqueous extract of *Psidium guajava* and ascorbic acid on serum sex hormones levels in male and female rats. *Journal of Applied Science and Research* ; 6 (4) : 275-279.