



Available online at <http://www.ifg-dg.org>

Int. J. Biol. Chem. Sci. 9(4): 1910-1917, August 2015

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal
of Biological and
Chemical Sciences

Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs> <http://indexmedicus.afro.who.int>

Effets d'éthanol sur la fertilité du lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus*

Asma SAIHIA*, Kamel KHELILI et Mohamed Salah BOULAKOUD

Laboratoire de Recherche d'Ecophysiologie Animale, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences,
Université Badji Mokhtar. Annaba 23000, Algérie.

* Auteur correspondant ; E-mail: asma_bio23@hotmail.fr ; Tel : 0664846854

RESUME

La consommation chronique d'éthanol est associée à des troubles de la reproduction chez l'homme. Pour cela, l'objectif de ce travail est d'évaluer chez le lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus* l'effet de la consommation chronique d'éthanol sur la reproduction. L'alcool concentré à 20%, 25% et 30% a été administré au lapin mâle par gavage pendant six semaines successives. Après sacrifice des animaux, les testicules et l'épididyme ont été prélevés afin d'évaluer certains paramètres de la reproduction, alors que le sang a été recueilli pour le dosage de la testostérone. Les résultats obtenus montrent une diminution de la mobilité, la vitesse, la vitalité et la concentration des spermatozoïdes, accompagnée d'une augmentation de leur nombre malformés chez les trois lots d'animaux traités par rapport au lot témoin. Par ailleurs, le traitement à l'alcool a entraîné une diminution du poids des testicules et de l'épididyme, ainsi qu'une diminution du taux de la testostérone chez les animaux des groupes traités comparés au groupe témoin. Les résultats montrent clairement que l'éthanol exerce un effet toxique sur la fertilité du lapin mâle.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Alcool, épидидyme, spermatozoïde, testicule, testostérone.

Effects of Ethanol on the fertility of adult male rabbit *Oryctolagus cuniculus*

ABSTRACT

Chronic ethanol consumption is associated with reproductive disorders in humans. Therefore, the objective of this study was to evaluate in adult male rabbit *Oryctolagus cuniculus* the effect of chronic ethanol consumption on reproduction. The concentrated alcohol 20%, 25% and 30% was administered to male rabbits by gavage for six successive weeks. After sacrificing the animals, testis and epididymis were collected to assess certain parameters of the reproduction, while the blood was collected for the determination of testosterone. The results show a decrease in mobility, speed, vitality and spermatozoa concentration, accompanied by an increase in the number of malformed spermatozoa in three batches of treated animals compared to the control group. Moreover, the treatment with alcohol resulted in a decreased weight of the testes and epididymis, and decreased testosterone levels in animals treated groups compared to the control group. The results clearly show that ethanol exerts a toxic effect on the fertility of male rabbit.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Alcohol, epididymis, spermatozoa, testis, testosterone.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i4.16>

INTRODUCTION

Environ 40% des problèmes de fertilité des couples sont causés par des dysfonctionnements de l'appareil reproducteur masculin (Lotti et Maggi, 2014). La consommation abusive des boissons alcoolisées est l'une des causes associées à ces problèmes. L'éthanol contenu dans ces boissons provoque une altération de la fertilité masculine, puisqu'il a été noté une diminution de la libido et du taux de testostérone (Lee et al., 2010). L'exposition aiguë et chronique à l'éthanol a également été associée à une diminution des taux de GnRH et de LH, ce qui a pour conséquence la diminution de la testostéronémie. Ces changements peuvent entraîner une hypofertilité masculine, une réduction de l'expression des caractères sexuels secondaires, et une atrophie des testicules (Emanuele M et Emanuele N, 2001). A court terme, l'éthanol provoque la diminution du diamètre des tubes séminifères (Fakoya et Ezekiel, 2004). Il faut noter que la cellule de Sertoli est également une cible importante de l'effet de l'éthanol. Plusieurs travaux ont montré que chez les personnes qui consomment l'alcool de façon chronique, les taux des spermatozoïdes malformés sont considérablement élevés (Ali et al., 2011). Les mécanismes de l'effet direct de l'éthanol sur la cellule de Sertoli ne sont pas encore bien élucidés. Par contre, il semble que l'alcool peut endommager certaines protéines nécessaires dans la spermatogénèse. L'alcool est aussi connu pour être une toxine des cellules de Leydig, il a un effet négatif sur la synthèse et la sécrétion de testostérone car il inhibe la stéroïdogénèse testiculaire (Maneesh et al., 2006).

Dans ce travail, les effets de l'éthanol sur la fertilité des lapins mâles adultes *Oryctolagus cuniculus*, à travers l'appréciation des paramètres biologiques des spermatozoïdes (concentration, mobilité, vitesse, vitalité et anomalie), du poids des organes reproducteurs (testicules et épидидyme) et du taux de la testostérone ont été évalués.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Vingt-huit lapins mâles adultes domestiques *Oryctolagus cuniculus* âgés de 9 à 10 mois et pesant à leur arrivée 2400 g à 2600 g ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été placés dans des cages (50 x 60 x 53 cm³), pendant une période d'acclimatation de deux semaines suivie d'une période de traitement de six semaines successives. L'élevage a été réalisé en laboratoire sous des conditions naturelles de température (21°-22°) et d'humidité (30% - 70%). Les lapins sont nourris trois fois par jour avec un mélange composé de salade, de carottes, de pain dur concassé. L'eau de robinet a été fournie *ad libitum* dans des abreuvoirs et renouvelée chaque jour.

Protocole expérimental

Les lapins ont été répartis en 4 lots de 7 animaux qui ont reçu l'éthanol aux doses respectives de 20% (groupe I), 25% (groupe II) et 30% (groupe III), obtenues à partir de la dilution de l'éthanol à 96% selon le tableau de dilution de l'alcool de Gay Lussac. Les lapins du groupe témoin ont reçu de l'eau distillée pendant toute la période d'expérimentation. Dix millilitres d'éthanol est administrée par gavage à chaque animal une fois par jour pendant six semaines successives à l'aide d'une sonde gastrique.

Prélèvement du sang et des organes

Après sacrifice, Les organes reproducteurs (testicules et épидидyme) ont été prélevés et pesés à l'aide d'une balance de précision, d'une capacité variant entre 10 et 320 g. le sang est prélevé pour mesurer le taux la testostérone sérique.

Spermogramme

Afin d'étudier l'effet de l'éthanol sur la fertilité des lapins, nous avons procédé au test du sperme selon la méthode de l'OMS (1993). Le sperme a été prélevé à partir d'une petite ouverture faite au niveau de la queue de l'épididyme. Le sperme est ensuite dilué dans

de l'eau physiologique (NaCl 0.9%). Les paramètres de reproduction étudiés sont:

- La vitesse des spermatozoïdes a été mesurée en utilisant une lame de Nageotte. On calcule la vitesse de 10 spermatozoïdes puis la vitesse moyenne.
- La mobilité des spermatozoïdes est mesurée en prenant une goutte du sperme dilué sur une lame recouverte par une lamelle. La préparation est examinée sous microscope optique à un grossissement final x40. Le champ d'observation est divisé en 03 sous champs pour classer 100 spermatozoïdes, après on calcule le pourcentage des spermatozoïdes mobiles.
- La concentration des spermatozoïdes a été mesurée en utilisant un hématimètre (cellule de malassez). Le nombre des spermatozoïdes (morts et vivants) est calculé.
- La vitalité des spermatozoïdes
- La coloration vitale par utilisation de l'éosine à 1%. Cent spermatozoïdes ont été comptés, en calculant les spermatozoïdes vivants (non colorés) et morts (colorés).
- Test de gonflement hypo-osmotique (HOS-TEST): ce test est basé sur le fait que la membrane de spermatozoïde intacte est semi perméable, ce qui entraîne une augmentation de volume de spermatozoïde (spermatozoïde gonflé) s'il est placé en milieu hypo-osmotique. Le HOS-TEST apporte des informations supplémentaires sur l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane plasmique au niveau du flagelle. On calcule le pourcentage des spermatozoïdes présentant des modifications du flagelle sur un total de 100 spermatozoïdes comptés.
- Anomalies des spermatozoïdes : une recherche des anomalies morphologiques de la pièce intermédiaire, la tête et le flagelle a été effectuée en utilisant la coloration de Papanicolaou.

Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone a été effectué selon la méthode ELISA. Ce test est basé sur le principe de compétition. La quantité inconnue d'antigènes présents dans l'échantillon et une quantité fixe d'antigènes conjugués à une enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps coatés dans les puits. Après incubation, les puits sont lavés pour arrêter la réaction de compétition. L'intensité de la couleur développée suivant le substrat est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. Les résultats des échantillons sont déterminés directement à partir de la courbe étalon.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. La comparaison des moyennes a été effectuée après une analyse de la variance (ANOVA). Les moyennes sont comparées par le test-t de Student. L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 16).

RESULTATS

Poids des testicules et de l'épididyme

Les résultats obtenus montrent que l'éthanol a provoqué une diminution significative et dose dépendante du poids des testicules et de l'épididyme chez les lots traités comparativement au lot témoin. (Tableau 1).

Paramètres spermatiques

On constate une diminution significative dans la vitesse, de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes chez les groupes traités à l'éthanol 20%, une diminution hautement significative chez les groupes traités à 25% et 30% d'éthanol (Tableau 2).

La vitalité des spermatozoïdes a diminué chez les groupes traités par rapport au groupe témoin (Tableaux 3 et 4). Par ailleurs, les résultats révèlent qu'il existe une augmentation hautement significative des taux de spermatozoïdes avec anomalies de la tête et de la pièce intermédiaire et du flagelle chez

les lots traités comparés au lot témoin (Tableau 5).

Testostérone

Les résultats du taux de testostérone révèlent qu'il existe une diminution significative chez tous les lots traités comparés au lot témoin. (Tableau 3).

Tableau 1 : Effets de l'éthanol sur le poids des testicules et de l'épididyme des lapins de différents lots.

Organes reproducteurs	groupe témoin	groupe (DI)	groupe (DII)	groupe (DIII)
	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7
Poids des testicules (g)	2,465 ± 0,165	1,856 ± 0,137*	1,721 ± 0,19**	1,436 ± 0,114**
Poids d'épididyme (g)	1,003 ± 0,112	0,747 ± 0,113	0,514 ± 0,114*	0,314 ± 0,127**

Groupe témoin (non traité), groupes DI, DII et DIII sont traités avec de l'éthanol aux doses : 20%, 25% et 30% (n=7). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard. *P ≤ 0,05 ; ** P ≤ 0,01 ; *** P ≤ 0,001.

Tableau 2: Effets d'éthanol sur la concentration, la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes des lapins de différents lots.

Groupes	concentration de spermatozoïdes (× 10 ⁶ /ml)	mobilité de spermatozoïdes (%)	vitesse de spermatozoïdes (µm/sec)
Groupe témoin (n=7)	473,7 ± 38,7	63,04 ± 4,09	43,11 ± 3,51
Groupe dose I (n=7)	342 ± 39,1*	53,27 ± 2,86*	31,15 ± 5,52*
Groupe dose II (n=7)	300,3 ± 36,2**	40,99 ± 3,09**	22,64 ± 6,66**
Groupe dose III (n=7)	252,7 ± 38,6**	35,4 ± 3,67**	18,49 ± 5,55**

Groupe témoin (non traité), groupes DI, DII et DIII sont traités avec de l'éthanol aux doses : 20%, 25% et 30% (n=7). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard. *P ≤ 0,05 ; ** P ≤ 0,01 ; *** P ≤ 0,001.

Tableau 3: Effets de l'éthanol sur le taux des spermatozoïdes vivants et le taux de testostérone des lapins de différents lots.

Groupes	groupe témoin	groupe (DI)	groupe (DII)	groupe (DIII)
	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7
Taux des spermatozoïdes vivants (%)	67,9 ± 11,1	31,2 ± 9,32***	24,92 ± 11,19***	15,6 ± 10***
Taux de testostérone (ng /ml)	6,3 ± 0,27	5,18 ± 0,25*	4,55 ± 0,39*	3,17 ± 0,29**

Groupe témoin (non traité), groupes Dose I, Dose II et Dose III sont traités avec de l'éthanol aux doses: 20%, 25% et 30% (n=7). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard. *P ≤ 0,05 ; **P ≤ 0,01 ; ***P ≤ 0,001.

Tableau 4: Taux des modifications du flagelle des spermatozoïdes exposés au stress hypo-osmotique (HOS) chez les lapins des différents lots.

Groupes (n= 7)	Groupe témoin	Groupe (DI)	Groupe (DII)	Groupe (DIII)
Taux des Modifications du flagelle des spermatozoïdes exposés au HOS (%)				
Modification faible du flagelle	28,7±4,2	24,71± 3,6	19,3± 3,5 *	16,4 ±4,5*
Modification importante du flagelle	27,8 ±3,13	8,52±2,56**	4,4± 3,25 **	6,56±3,65**
Modification très importante du flagelle	20,9±1,96	3,6±2,58 **	3,48± 1.99**	1,11±3,02**
Pas de modification	22,6 ±4,02	63, 16±3,56***	72,8±2,78***	75,9±3,98***

Groupe témoin (non traité), groupes Dose I, Dose II et Dose III sont traités avec de l'éthanol aux doses : 20%, 25% et 30% (n=7). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard. * P ≤ 0,05 ; ** P ≤ 0,01 ; *** P ≤ 0,001.

Tableau 5: Taux des anomalies des spermatozoïdes chez les lapins des différents lots.

Groupes (n= 7)	Groupe témoin	Groupe (DI)	Groupe (DII)	Groupe (DIII)
Taux des anomalies des spermatozoïdes (%)				
Anomalie au niveau de la tête	14,7±6,2	19,2± 7,6	17,67± 3,9	16,5 ±8,5
Anomalie de la pièce intermédiaire	3,5 ±3,73	14,5±5,51 **	13,17± 6,25**	21,5±4,55**
Anomalie au niveau du flagelle	22,5±6,96	38,5±6,98*	52,8± 8.19**	58,8±7,82**
Spermatozoïde sans anomalie	59,6 ±4,52	27, 8±5,76**	16,36±6,88***	3,19±6,98***

Groupe témoin (non traité), groupes Dose I, Dose II et Dose III sont traité avec de l'éthanol aux doses : 20%, 25% et 30% (n=7). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard. * P ≤ 0,05 ; ** P ≤ 0,01 ; *** P ≤ 0,001.

DISCUSSION

L'éthanol est connu pour son effet toxique sur la fonction de la reproduction masculine. Grâce à sa propriété amphiphile, il diffuse dans tous les tissus et affecte leurs fonctions vitales (Lieber, 2005). Dans cette étude, la consommation chronique de l'éthanol a provoqué une diminution du poids des testicules et de l'épididyme. Ces données sont conformes avec celles obtenues chez l'homme lors de l'ingestion chronique d'alcool éthylique (Emanuele et Emanuele, 2001). La diminution observée est due principalement à l'effet des métabolites de ce produit sur la structure des tubes séminifères, car ils provoquent des changements dans leurs

diamètres (Martinez et al., 2009), ainsi que l'apoptose des cellules germinales qui contribue à l'atrophie testiculaire et l'infertilité masculine (Maneesh et al., 2005). La consommation d'alcool peut d'une part altérer la production de la testostérone, et d'autre part dans l'atrophie des gonades par la réduction de l'activité des testicules, ce qui affecte le passage normal du fluide testiculaire vers l'épididyme.

Ces résultats montrent aussi que l'éthanol provoque une diminution de la concentration des spermatozoïdes. Ces résultats corroborent les études de Maneesh (2006) qui ont montré que l'alcool provoque une diminution du nombre de spermatozoïdes.

Ces changements sont le résultat du déclin du nombre des spermatogonies ainsi que leur activité proliférative (Martinez et al., 2009). Il est connu que l'IGF-I joue un rôle important dans le déroulement de la spermatogenèse par l'intermédiaire de son récepteur IGF-IR. L'éthanol induit un abaissement du nombre de récepteurs aux IGF (Yagci et al., 2009), ce qui affecte les mécanismes de régulation de l'IGF-I de la cellule de Sertoli entraînant une perturbation de la spermatogenèse.

Oliva et al. (2006) ont aussi observé qu'après l'exposition chronique à l'éthanol, la spermatogénèse est perturbée, cette perturbation peut être due soit à la réduction de la concentration de testostérone, soit à l'effet direct de l'éthanol sur les gonades.

Dans cette étude, l'éthanol a provoqué une diminution de la mobilité et de la vitesse des spermatozoïdes. Ces données sont cohérentes avec celles issues de plusieurs études qui ont indiqué que la mobilité des spermatozoïdes diminue en présence d'alcool éthylique (Martinez et al., 2009). Ces résultats pourraient résulter de l'effet toxique direct de ce produit sur l'épididyme. En effet, lorsque les spermatozoïdes quittent le testicule dans un état immature, ils terminent leur maturation et acquièrent une mobilité progressive au cours de leur transit à travers l'épididyme. La diminution de la mobilité indique que ce produit a un effet spermato-toxique, car il augmente le nombre de spermatozoïdes avec anomalie du flagelle (Muthusami et Chinnaswamy, 2005).

Concernant la vitalité des spermatozoïdes, les résultats montrent une diminution du nombre des spermatozoïdes vivants, avec une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux chez les groupes traités par rapport au lot témoin. Ces résultats peuvent être la conséquence de la diminution de la concentration sanguine de FSH. Cette

hormone est impliquée dans l'activation des cellules de Sertoli qui soutiennent le développement et la maturation des cellules spermatiques. L'augmentation du nombre des spermatozoïdes malformés est une conséquence observée chez les hommes qui consomment l'alcool d'une façon modérée. Comme l'éthanol altère les sécrétions épидидymaires, alors l'effet est direct sur la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes (Martini et al., 2004). Le stress oxydant peut aussi jouer un rôle critique dans l'augmentation du nombre de spermatozoïdes malformés (Agarwal et Saleh, 2002). L'oxydation des lipides polyinsaturés des membranes des cellules spermatiques affecte leur fluidité ainsi que leur perméabilité membranaire, ce qui entraîne l'altération des cellules germinales et spermatiques.

La concentration de testostérone a diminué chez les lapins traités à l'éthanol. Il est connu que les conséquences de l'exposition chronique de ce produit est la diminution de la testostérone, il provoque le déclin de la synthèse de LH par l'hypophyse (Srinivasan et al., 2003). L'alcool éthylique affecte l'axe hypothalamus-hypophyse-gonadique chez l'homme et le rat par diminution de la sécrétion de GnRH. Cela peut montrer que les actions de l'éthanol sur le système reproducteur masculin commencent au plus haut niveau, c'est-à-dire hypothalamique. De plus, le déclin de la concentration de testostérone peut être le résultat de l'effet de l'éthanol sur les enzymes de la stéroïdogénèse qui se fait dans la cellule de Leydig. STAR est une protéine qui joue un rôle très important dans la régulation de la synthèse des hormones stéroïdiennes au niveau des cellules de Leydig et la glande surrénale. Kim et al. (2003) indiquent que l'administration chronique de l'éthanol inhibe l'expression du gène de STAR dans la cellule

de Leydig. Par conséquent, le taux de testostérone diminue avec la diminution de l'ARNm de STAR.

Conclusion

En conclusion, les résultats montrent que l'exposition chronique à l'éthanol affecte la reproduction chez les lapins mâles adultes *Oryctolagus cuniculus* par la diminution du poids des organes reproducteurs (testicules et épидидyme), du taux de testostérone, de la vitalité, la vitesse, la mobilité et la concentration des spermatozoïdes, avec l'augmentation du nombre des spermatozoïdes malformés, ces résultats indiquent clairement que l'éthanol est un produit toxique pour la reproduction.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Dr. lechekheb yousria pour son aide tout au long de mes années de travail.

REFERENCES

- Agarwal A, Saleh RA. 2002. Role of oxidants in male infertility. *Urol. Clin. North Am.*, **29**(4): 817–827.
- Ali Reza T, Abolghasem A, Mohammad Ali K, Nasim T. 2011. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol*, **45**(4): 403–409.
- Emanuele MA, Emanuele N. 2001. Alcohol and male reproductive system. *Alcohol Res. Health*, **25**(4): 282–287.
- Fakoya A, Ezekiel A. 2004. Morphological alterations in the seminiferous tubules of adult Wistar rats: the effects of prenatal ethanol exposure. *Folia Morphologica*, **63**(2): 195–202.
- Kim JH, Kim HJ, Noh HS, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Park SK, Lee BJ, Choi WS. 2003. Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain. Res.*, **989**(1): 91–98.
- Lee YH, Naseer MI, Lee SH, Kim MO. 2010. Time-dependent effect of ethanol on GnRH and GnRH receptor mRNA expression in hypothalamus and testis of adult and pubertal rats. *Neurosci. Lett.*, **471**(1): 25–29.
- Lieber CS. 2005. Metabolism of alcohol. *Clin. Liver Dis.*, **9**(1): 673–702.
- Lotti F, Maggi M. 2014. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Human Reproduction Update*, **21**(1): 56–83.
- Martini AC, Molina RI, Estofán D. 2004. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil. Steril.*, **82**(2): 374–377.
- Martinez M, Macera S, Assis GF, Pinheiro PF, Almeida CC, Tirapelli LF. 2009. Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of *Calomys callosus*. *Tissue Cell*, **41**(3): 199–205.
- Maneesh M, Jayalekshmi H, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. 2005. Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis. *Indian J. Clin. Biochem.*, **20**(2): 62–67.
- Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. 2006. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **50**(3): 291–296.
- Muthusami KR, Chinnaswamy P. 2005. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil. Steril.*, **84**(4): 919–924.
- OMS. 1993. *Analyse du Sperme Humain et de l'Interaction des Spermatozoïdes avec le*

- Mucus Cervical* (3rd edn). INSERM : Paris.
- Oliva SU, Messias AG, Silva DA, Pereira OC, Gerardin DC, Kempinas WG. 2006. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod. Toxicol.*, **22**(4): 599–605.
- Srinivasan R, Thayman M, Ramdoss S, Pera G, Karundevi B. 2003. Effects of ethanol intoxication on LH receptors and glucose oxidation in Leydig cells of adult albino rats. *Brain Research*, **17**(6): 641-648.
- Yagci A, Yakisik M, Altunbas K, Zik B. 2009. Investigation on the effect of chronic ethanol consumption on IGF-I receptors in rat testes during puberty period by immunohistochemical method. *Revue Méd. Vét.*, **160**(3): 127-132.