

## SUMMARY

Soy milk is a dietary product, rich in phytoestrogens which the Harmlessness is not totally proved. These compounds may modify the normal physiological process of reproduction and perturb this function.

The objective of this study is to estimate the consequences of the consumption of soy milk consumption on the hematological, the serum biochemical parameters of mice Swiss and histological settings, on the male fertility of mice Swiss used as experimental model.

We have used 40 male mice aged 4 weeks, weighing an average of  $(22.47 \pm 0.93)$  g. These animals were divided into 4 groups 10 mice per each. The mice of first group are the ones whose the mother fed only with soy milk from calving to weaning. After the weaning, mice of this group start to get fed with soy milk during 30 days. The second group contains animals coming from a mother that was fed only with soy milk during lactation, then after the weaning they start to receive a standard food and water during 30 days. The third group contains mice coming from a mother that consumed a standard food during the lactation period, and these mice will receive soy milk after the weaning for 30 days. Animals of the fourth group are as witnesses. These mice come from a mother who consumed a standard food, and receive the same diet after the weaning.

At the end of 08 weeks, and during a week, Mice are subjected has a test of fertility Just before their sacrifice by cervical dislocation, males undergo a blood test for the dosage of the testosterone, hematological, the serum biochemical parameters, Then, testicles, épididyme seminal vesicles and liver and kidneys are taken and weighed. Sperm cells are counted, their morphology and their mobility are studied then a histological study is made on testicles and seminal vesicles. On mice stemming from the test of fertility are determined the weight and the size of reaches in the 7th, 14th and 28th day after their birth.

### Obtained results indicate the following:

- The weight physical undergoes no significant modification to ail the groups having ingested soy milk.
- the mice treated with the soy milk have a hyperalbuminemy, a hypocholesterolemia, a hyperuremia associated with a hypercreatininemia and a rate raised in uric acid as well as a normal rate of transaminases
- Treated mice with soy milk represent significant reduction GB, GR, PLT, for experimenting animals get an aplastic anemia. Noticed lesions at the level of liver: dystrophy of hepatocytes and inflammatory infiltrate of spaces are implanting a subacute hepatitis. At the level of kidneys some glomerulus of atrophic Malpighi and collapses, Bowman space is reduced as well.
- The relative weight of the male genital organs remains also unchanged.
- The mobility of sperm cells decreases very significantly ( $p < 0,01$ ) to the animals of all the groups having consumed soy milk.
- The number of sperm cells testiculaires and épididymaires is decreased very significantly respectively at the mice of the groups 2 and 3 and at the mice of the groups 1, 2 and 3 ( $p < 0,01$ ).
- The indication of fertility of females coupled with males fed soy milk is only 67 % compared with that of the witnesses which is 100 %.
- The weight, and the size of youngs obtained by the test of fertility are very significantly decreased ( $p < 0,01$ ).
- The sérique rate of the testosterone decreases very significantly ( $p < 0,01$ ) to the group 2 ( $1,08 \pm 0,41$  ng / ml) with regard to witnesses ( $6,21 \pm 1,54$  ng / ml).

The histological study reveals an important modification of the tissular architecture at the level of testicles and seminal vesicles liver and kidneys to animals having ingested soy milk with regard to witnesses.

### In conclusion,

Obtained results indicate that ingestion of soy milk cause some alterations in certain hematological certain serum biochemical parameters, a renal dysfunction of mice Swiss having ingested soy milk. And histological settings of Swiss mice that were subject to this kind of milk.

---

**Key words:** Soybean - Sperm-Fertility - Endocrine Disruptors - Reproductive male - hematological parameters Toxicity-Swiss mice.

## Liste des abréviations

<b>ARNP</b>	: Augmentation de Rapport Nucléoplasmatique.
<b>ATC</b>	: Atrophie du Tissu Conjonctif.
<b>AESA</b>	: Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
<b>CSAH</b>	: Comite Scientifique de l'Alimentation Humaine
<b>DJA</b>	: Dose journalière admissible
<b>SD</b>	: Spermatoocyte Diplotène.
<b>DC</b>	: Débris Cellulaires.
<b>DEEG</b>	: Diminution de l'Épaisseur de l'Épithélium Germinale.
<b>DEG</b>	: Dystrophie de l'épithélium Glandulaire.
<b>EG</b>	: Épithélium Glandulaire.
<b>EGCS</b>	: Épithélium Glandulaire Cylindrique Simple.
<b>ELFA</b>	: Enzyme Linker Fluorescent Assay.
<b>EPG</b>	: Épithélium Germinal.
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration.
<b>FSH</b>	: Hormone folliculo-stimulante.
<b>AFSSA</b>	: Autorité Européenne de Sécurité des Aliments.
<b>GR</b>	: Globules rouges.
<b>GB</b>	: Globules blancs
<b>Gn-RH</b>	: Gonadotrophine sécrétée par l'hypothalamus.
<b>HCL</b>	: Hyperplasie des Cellules de LEYDIG.
<b>HEG</b>	: Hyperplasie d'épithélium Glandulaire.
<b>In</b>	: Spermatozonies de type Intermédiaire.
<b>IPA</b>	: Institut Pasteur d'Alger.
<b>J</b>	: Jour.
<b>jpp</b>	: Jours Post-Partum.

<b>SL</b>	: Spermatoocyte Leptotène.
<b>LH</b>	: Hormone Lutéinisante.
<b>LHRH</b>	: Gonadolibérine.
<b>SM</b>	: Spermatoocyte en Métaphase.
<b>OCDE</b>	: Organisation de Coopération et de Développement Economique.
<b>PLT</b>	: Plaquettes
<b>P</b>	: Spermatoocyte Pachytène.
<b>PE</b>	: Perturbateur Endocrinien.
<b>PPS</b>	: Les préparations à base de protéines de soja.
<b>PR</b>	: Spermatoocyte Préleptotène.
<b>PR</b>	: Produit de sécrétion.
<b>PSA</b>	: Prostate Specific Antigen.
<b>SHBG</b>	: Sex Hormone Binding Globulin.
<b>SPCI</b>	: Spermatoocyte I.
<b>SPCII</b>	: Spermatoocyte II.
<b>SPG</b>	: Spermatogonie.
<b>SPT</b>	: Spermatoide.
<b>SPZ</b>	: Spermatozoïdes.
<b>St</b>	: Spermatoide allongé.
<b>Svs</b>	: Seminal vesicle secretion.
<b>T</b>	: Témoin.
<b>T C</b>	: Tissu Conjonctif.
<b>TeBG</b>	: Testosterone Binding Globulin.
<b>TES</b>	: Testostérone.
<b>TS</b>	: Tube Séminifère.
<b>TGO</b>	: Transaminase-glutamate-oxaloacetate-trans-aminase
<b>TGP</b>	: Transaminase-glutamate-purivat-trans-aminase

**VS** : Vaisseau Sanguin.

**VCL** : Veine Centro Lobulaire

**Z** : Spermatocyte Zygotène

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : A. Représentation schématique de l'anatomie microscopique d'un espace porte et section dans un lobule hépatique. D'après Sobatta et al., 2004. B. Détail de l'organisation des sinusoides. D'après Crispe, 2003 .....	10
<b>Figure 2</b> : A. Schema d'un néphron. D'après Brun et al., 2004. B. Représentation schématique d'un glomérule rénale. D'après Sobotta et al., 2004 .....	15
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'appareil reproducteur mâle de la souris adulte (Roscoe et al., 1941) .....	18
<b>Figure 4</b> : Observation de la cavité abdominale d'une souris mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital (Vernet, 2006).....	19
<b>Figure 5</b> : Testicule et épидидyme de souris (Vernet, 2006).....	19
<b>Figure 6</b> : Testicule de souris en coupe transversale colorée à l'hématoxyline-éosine (Vernet, 2006) .....	20
<b>Figure 7</b> : Coupe transversale d'un tube séminifère de testicule de souris adulte (10x20) (Hôte, 2009) .....	22
<b>Figure 8</b> : Phases de la spermatogenèse chez la souris et types de cellules germinales concernés.( Jégou, 1995).....	26
<b>Figure 9</b> : Renouvellement et multiplication des spermatogonies. (de Rooij, 2001).....	27
<b>Figure 10</b> : Stades de l'épithélium séminifère chez la souris (Russell et al., 1990).....	28
<b>Figure 11</b> : Coupes semi fines colorées au bleu de toluidine montrant des tubes séminifères au stade X (A) et au stade XII (B) du cycle de l'épithélium séminifère (Vernet, 2006) .....	30
<b>Figure 12</b> : Evolution chronologique de la première vague de la spermatogenèse (de Rooij, 2001).....	32
<b>Figure 13</b> : Coupe transversale de tube séminifère humain adulte. Trois associations cellulaires sont présentes dans cette section de tube (stades I, II et V) (Russell et al., 1990).....	35
<b>Figure 14</b> : Dessins d'un spermatozoïde de souris (Toshimori et Ito, 2003) .....	36

<b>Figure 15 :</b> Structure chimique de la testostérone (Chatenet, 2008).....	40
<b>Figure 16 :</b> Structure spatiale de la testostérone (Chatenet, 2008).....	40
<b>Figure 17 :</b> Axe hypothalamo-hypophyse- testicule et régulation de la fonction testiculaire (Christiansen et al., 2002) .....	42
<b>Figure 18 :</b> Boîte du lait de soja BIOMIL <sup>®</sup> SOY .....	44
<b>Figure 19:</b> Schéma représentant le déroulement du protocole expérimental de la toxicité de lait de soja .....	49
<b>Figure 20 :</b> Hématimètre de Malassez.....	52
<b>Figure 21 :</b> Mode opératoire.....	52
<b>Figure 22.</b> Appareil reproducteur mâle des souris Swiss .....	64
<b>Figure 23 :</b> Comptage cellulaire des spermatozoïdes à l'aide d'une cellule de Malassez .....	66
<b>Figure 24 :</b> Croissance pondérale des souris mâles recevant du lait de soja et du groupe témoin (n=10 souris / groupe).....	71
<b>Figure 25 :</b> Nombre de globules rouges ( $10^6/\text{mm}^3$ ) des souris traités pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=10 pour chaque groupe) .....	76
<b>Figure 26 :</b> Nombre de globules Blancs ( $10^3 /\text{mm}^3$ ) des souris traités pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=10 pour chaque groupe) .....	76
<b>Figure 27 :</b> Nombre de plaquettes ( $10^5 /\text{mm}^3$ ) des souris traités pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=10 pour chaque groupe) .....	77
<b>Figure 28 :</b> Teneur en albumine (g/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à lait de soja pendant 30 jours (n=10) .....	78
<b>Figure 29:</b> Teneur en cholestérol (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja pendant 30 jours (n=10) .....	80
<b>Figure 30 :</b> Teneur en urée sérique (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à lait de soja pendant 30 jours .....	81

<b>Figure 31:</b> Teneur en créatinine ( $\mu\text{mol/l}$ ) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à lait de soja pendant 30 jours (n=10).....	82
<b>Figure 32:</b> Teneur en acide urique (mg/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja pendant 30 jours (n=10).....	83
<b>Figure 33:</b> Teneur en TGO (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja pendant 30 jours (n=10) .....	84
<b>Figure 34:</b> Teneur en TGP (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja pendant 30 jours (n=10).....	86
<b>Figure 35:</b> Evolution du poids corporel des petits issus des mâles des différents groupes ayant consommé du lait de soja .....	88
<b>Figure 36:</b> Evolution de la taille des petits issus des mâles des différents groupes ayant consommé du lait de soja.....	89
<b>Figure 37:</b> Pourcentage des spermatozoïdes épидидymaires mobiles des souris expérimentales ayant ingéré du lait de soja comparé à celui des témoins .....	91
<b>Figure 38 :</b> Nombre des spermatozoïdes ( $10^6/\text{ml}$ ) testiculaires des souris témoins mâles et des souris expérimentales ayant ingéré du lait de soja (n= 10 souris/ groupe) .....	92
<b>Figure 39:</b> Nombre des spermatozoïdes épидидymaires ( $10^6/\text{ml}$ ) des souris ayant ingéré du lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=6 souris/ groupe).....	93
<b>Figure 40:</b> Nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule ( $10^6/\text{g}$ ) chez les souris témoins comparé à celui des souris ayant ingéré du lait de soja (n=6 souris/ groupe) .....	95
<b>Figure 41:</b> Nombre de spermatozoïdes par gramme d'épididyme ( $10^6/\text{g}$ ) chez les souris témoins comparé à celui des souris ayant ingéré du lait de soja (n=6 souris/ groupe) .....	96
<b>Figure 42 :</b> Pourcentage des spermatozoïdes anormaux chez les animaux des différents groupes (n=6 souris/ groupe) .....	97
<b>Figure 43:</b> Observation au microscope optique des différentes anomalies de la tête des spermatozoïdes colorée au Violet de Gentiane au G (10x40).....	98

<b>Figure 44:</b> Observation au microscope optique des anomalies de la pièce intermédiaire (angulée) des spermatozoïdes colorée au Violet de Gentiane au G (10x40) .	99
<b>Figure 45:</b> Observation au microscope optique des différentes anomalies du flagelle des spermatozoïdes coloré au Violet de Gentiane au G (10x40) .....	99
<b>Figure 46 :</b> Concentration de la testostérone plasmatique (ng /ml) chez les souris témoins et les souris ayant ingéré du lait de soja (n=6 souris/ groupe).....	101
<b>Figure 47:</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x10).....	102
<b>Figure 48 :</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	102
<b>Figure 49:</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x10).....	103
<b>Figure 50 :</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	104
<b>Figure 51:</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	104
<b>Figure 52 :</b> Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	105
<b>Figure 53 :</b> Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40) .....	105
<b>Figure 54 :</b> Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x10) .....	106
<b>Figure 55 :</b> Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40) .....	106
<b>Figure 56:</b> Micrographie de coupe histologique des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	108
<b>Figure 57 :</b> Micrographie de coupe histologique des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).....	108

**Figure 58 :** Micrographie de coupe histologique montrant l'hyperplasie glandulaire des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalum-éosine G (10x40)..... 109

**Figure 59 :** Micrographie de coupe histologique montrant l'hyperplasie glandulaire des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja G (10x40)..... 109

**Figure 60:** Observation au microscope optique des coupes histologiques du foie des souris Swiss ..... 110

**Figure 61 :** Observation au microscope optique des coupes histologiques du rein des souris Swiss ..... 111

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Durées du cycle de l'épithélium séminifère et de la spermatogenèse calculées par autoradiographie après incorporation de thymidine tritiée .....	33
<b>Tableau 2 :</b> Comparaison de taille moyenne des spermatozoïdes chez le taureau, le chien, et l'homme .....	37
<b>Tableau 3 :</b> Evolution des critères de classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes utilisés dans la classification de David et la classification de David modifiée .....	39
<b>Tableau 4 :</b> Composition de l'aliment pour rongeurs dit bouchons .....	45
<b>Tableau 5 :</b> Tableau d'alimentation (BIOMIL <sup>®</sup> SOY).....	46
<b>Tableau 6 :</b> Composition du lait de soja BIOMIL <sup>®</sup> SOY.....	47
<b>Tableau 7 :</b> Composition du liquide Mercano .....	54
<b>Tableau 8 :</b> Composition du liquide de lazarus .....	55
<b>Tableau 9 :</b> Composition du colorant à l'hématoxyline de Harris d'après (Hould, 1984). .....	62
<b>Tableau 10 :</b> Composition du colorant violet de gentiane.....	68
<b>Tableau 11 :</b> Effet du lait de soja sur les poids absolu des organes chez les souris .....	72
<b>Tableau 12 :</b> Effet du lait de soja sur le poids relatif des organes sexuels chez les souris mâles .....	74
<b>Tableau 13 :</b> Test de fertilité .....	87

## Sommaire

<b>I. Introduction</b> .....	1
<b><u>Rappels bibliographiques</u></b>	
<b>1. L'allergie alimentaire</b> .....	2
<b>1.1. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)</b> .....	2
<b>1.2. Traitement de l'allergie aux protéines du lait de vache</b> .....	2
1.2.1. Lait de soja .....	3
<b>2. Soja</b> .....	3
<b>2.1. Définition</b> .....	3
<b>2.2. Phyto-estrogènes</b> .....	3
2.2.1. Définition .....	3
2.2.2. Consommation, biodisponibilité et métabolisme .....	4
<b>3. Soja et utilisation dans la pratique courante</b> .....	4
<b>3.1. Soja et ostéoporose</b> .....	4
<b>3.2. Soja et ménopause</b> .....	5
<b>3.3. Soja et le risque de cancer</b> .....	5
3.3.1. Cancer du sein .....	5
3.3.2. Cancer de l'intestin .....	5
3.3.3. Cancer de la prostate.....	5
<b>3.4. Soja et système nerveux central</b> .....	6
<b>3.5. Soja et système cardiovasculaire</b> .....	6
<b>3.6. Soja et système neuroendocrinien et immunitaire</b> .....	6
<b>4. Toxicité alimentaire</b> .....	6
<b>4.1. Etudes toxicocinétiques</b> .....	7
<b>4.2. Toxicité aiguë</b> .....	7
<b>4.3 Toxicité a court terme</b> .....	7
<b>4.4 Toxicité à long terme</b> .....	7
<b>4.5. Etudes de l'activité sexuelle et fertilité</b> .....	8
<b>4.6. Etude tératogénique</b> .....	8
<b>5. Organes cibles</b> .....	8

<b>5.1. Le foie</b> .....	<b>9</b>
<b>5.1.1. Hépatites aiguës</b> .....	<b>11</b>
5.1.1.1. Hépatites cytolytiques .....	11
5.1.1.2. Hépatites cholestasiques.....	<b>11</b>
<b>5.1.2. Hépatites chroniques (cirrhoses)</b> .....	<b>12</b>
5.2.1. Stéatose .....	12
5.2.2. Atteinte toxique des canaux biliaires .....	13
5.2.3. Toxicité vasculaire hépatique .....	13
5.2.4. Tumeurs hépatiques.....	<b>13</b>
<b>6. Le rein</b> .....	<b>13</b>
<b>6.1. Vulnérabilité du rein aux toxiques</b> .....	<b>14</b>
<b>6.2. Manifestation de l'action des toxiques sur le rein</b> .....	<b>14</b>
6.2.1. Atteintes glomérulaires .....	16
6.2.2. Atteintes tubulaires .....	16
<b>7. La fertilité chez la souris mâle</b> .....	<b>17</b>
<b>7.1. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle</b> .....	17
<b>7.1.1. Appareil uro-génital</b> .....	<b>17</b>
7.1.1.1. Testicule.....	17
7.1.1.1.1. Les tubes séminifères.....	21
7.1.1.2. Epididyme .....	21
7.1.1.3. Vésicules séminales.....	23
<b>7.2. La Spermatogenèse chez la souris</b> .....	<b>24</b>
<b>7.2.1. Définition</b> .....	<b>24</b>
<b>7.2.2. Phases de la spermatogenèse</b> .....	<b>24</b>
<b>7.2.3. Stades de l'épithélium séminifère</b> .....	<b>24</b>
7.2.3.1. Cellules germinales associées à la phase proliférative .....	25
7.2.3.2. Cellules germinales associées à la phase méiotique .....	25
7.2.3.3. Cellules germinales associées à la spermiogenèse .....	29
<b>7.2.4. Initiation de la spermatogenèse</b> .....	<b>31</b>

7.2.5. Spermatogenèse chez les autres espèces .....	31
7.3. Spermatozoïde .....	34
7.3.1. Structure .....	34
7.3.2. Morphologie des spermatozoïdes.....	34
7.4. Testostérone .....	38
7.5. Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.....	41

### Matériels et méthodes

1. Animaux et conditions d'élevage.....	43
2. Produits et réactifs.....	43
2.1. Lait utilisé .....	43
2.2. Préparation du lait de soja .....	43
2.3. Etude de la toxicité du lait de soja .....	48
2.3.1 Test de toxicité par le lait de soja .....	48
3. Protocole expérimental .....	48
3.1. Suivi et observations des animaux .....	50
3.2. Test de fertilité .....	50
3.3. Obtention des échantillons .....	50
3.3.1. Prélèvement du sang .....	50
3.3.2. Prélèvement des organes .....	50
3.4. Analyses biologiques .....	51
3.4.1 Examen hématologique .....	51
3.4.1.1. Cellule de Malassez .....	51
3.4.1.2. Mise en hématimètre .....	51
3.4.1.3. Principe de comptage .....	51
a. Numération des leucocytes (globules blanc).....	53
b. Numération des érythrocytes (globules rouges).....	56
3.4.2. Dosages biochimiques sériques .....	57
3.4.2.1. Dosage de l'albumine.....	57
3.4.2.2. Dosage du cholestérol total .....	57

3.4.2.3. Dosage de l'urée .....	57
3.4.2.4. Dosage de la créatinine .....	58
3.4.2.5. Dosage de l'acide urique.....	58
3.4.3. Analyses enzymatiques.....	59
3.4.3.1. Dosage des transaminases .....	59
a. Dosage de la glutamate-oxaloacetate transaminase TGP .59	
b. Dosage de la glutamate-pyruvate transaminase TGO .....	59
<b>3.5. Etude histologique .....</b>	<b>60</b>
<b>3.5.1. Traitement des fragments de tissus .....</b>	<b>60</b>
3.5.1.1. Fixation .....	60
3.5.1.2. Déshydratation .....	60
3.5.1.3. Clarification .....	60
3.5.1.4. Inclusion.....	60
<b>3.5.2. Traitement des lames.....</b>	<b>60</b>
3.5.2.1. Etalement des lames .....	61
3.5.2.2. Déparaffinage .....	61
3.5.2.3. Réhydratation .....	61
3.5.2.4. Coloration .....	61
<b>3.6. Etude de la fonction de reproduction .....</b>	<b>63</b>
3.6.1. Test de fertilité .....	63
3.6.2. Prélèvements des organes .....	63
3.6.3. Numération des spermatozoïdes .....	65
3.6.3.1. Comptage des spermatozoïdes dans le testicule.....	65
3.6.3.2. Comptage des spermatozoïdes dans l'épididyme .....	65
3.6.4. Mobilité des spermatozoïdes .....	65
3.6.5. Détermination des anomalies .....	67

3.6.6. Dosage de la testostérone .....	67
<b>4. Analyses statistiques .....</b>	<b>69</b>

### Résultats

<b>1. Croissance pondérale .....</b>	<b>70</b>
1.1. Effet du lait de soja sur la croissance pondérale.....	70
1.2. Taux de mortalité et les transformations morphologiques et comportementales.....	70
<b>2. Effet de la consommation de lait de soja sur le poids des organes .....</b>	<b>70</b>
2.1 Poids absolu du foie et du rein .....	70
2.2. Poids relatif des organes sexuels .....	73
<b>3. Effet de lait de soja sur les paramètres hématologiques .....</b>	<b>73</b>
3.1. Nombre des globules rouges (GR).....	73
3.2. Nombre de globules blancs (GB) .....	73
3.3. Nombre de plaquettes .....	73
<b>4. Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques sériques.....</b>	<b>73</b>
4.1. Teneur en albumine.....	73
4.2. Teneur en cholestérol total .....	79
4.3. Teneur en urée.....	79
4.4. Teneur en créatinine.....	79
4.5. Teneur en acide urique.....	79
4.6. Teneur en transaminases TGO.....	79
4.7. Teneur en transaminases TGP.....	85
<b>5. Effet de la consommation de lait de soja sur la fonction de reproduction .....</b>	<b>85</b>
5.1. Test de fertilité .....	85
5.2. Effet du lait de soja sur les paramètres sexuels chez les souris mâles (spermocytogramme)	
.....	90
5.2.1. Mobilité des spermatozoïdes.....	90
5.2.2. Comptage des spermatozoïdes dans le testicule et l'épididyme .....	90
5.2.3. Comptage des spermatozoïdes par gramme de testicule et d'épididyme .....	94

5.2.4..Morphologie des spermatozoïdes.....	94
5.2.5 Dosage hormonal .....	100
<b>6. Effet de la consommation du lait de soja sur la structure histologique .....</b>	<b>100</b>
6.1.Effet du lait de soja sur la structure des testicules .....	100
6.2. Effet du lait de soja sur la structure des vésicules séminales .....	100
6.3. Effet de lait de soja sur la structure histologique du foie .....	107
6.4. Effet de lait de soja sur la structure histologique des reins .....	107
<b>Discussion. ....</b>	<b>112</b>
<b>Conclusion. ....</b>	<b>124</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>126</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>146</b>

L'alimentation non maternelle à base des protéines de soja (PPS) ne peut être recommandée qu'en prévention d'une allergie ou intolérance alimentaire chez les nourrissons à haut risque.

Le lait industriel à base de protéines de soja constitue la principale source de phytoestrogènes chez l'homme. Il est donc important d'évaluer les niveaux d'apports en phytoestrogènes contenus dans les aliments à base de soja que peuvent consommer les nourrissons et les jeunes enfants. Ces composés chimiques naturels sont susceptibles d'avoir une toxicité sur la fonction de reproduction, car ils sont capables de stimuler, favoriser ou inhiber l'action des hormones. De ce fait, ils peuvent, en théorie, modifier le processus physiologique soumis à une régulation endocrinienne.

L'effet de ces produits peut se traduire, selon de nombreuses études, par une diminution du nombre et de la qualité des cellules sexuelles mâles humaines au cours de ces dernières années (Jegou, 1996).

De nombreux auteurs ont signalé l'effet nocif sur la fonction sexuelle, de facteurs toxiques présents dans notre environnement et notre alimentation. On peut citer le gaz d'échappement d'origine automobile (El Feki et al., 1998), les pesticides, les xénohormones (Toppari, 1996).

Toutefois, les travaux concernant l'impact du lait de soja sur la fonction hormonale sexuelle de l'homme et sur la fertilité sont très rares et non déductifs.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de la consommation du lait de soja chez la souris mâle Swiss sur :

- ❖ Le développement et la maturation des organes sexuels.
- ❖ La fertilité masculine.
- ❖ La fonction hormonale.
- ❖ Les paramètres hématologiques
- ❖ Les paramètres biochimiques sériques

### **1. L'allergie alimentaire**

L'analyse, selon les catégories d'âge à montrer que l'expression clinique de l'allergie alimentaire varie au cours du temps chez un même individu parallèlement à l'acquisition de nouvelles sensibilisations, à l'installation d'une tolérance à d'autres allergènes, notamment aux protéines alimentaires animales (lait de vache) et au gré de la maturation progressive du système immunitaire (Lack, 2008).

De manière générale, l'allergie correspond à un mécanisme physiopathologique d'ordre immunologique développé vis-à-vis d'allergènes alimentaires ou respiratoires. Sa fréquence et sa sévérité augmentent avec le temps (Chouraqui et al., 2008).

#### **1.1. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)**

Comme toute allergie, il s'agit d'une réaction exagérée du système immunitaire face à des protéines qu'il considère comme dangereuses. Ici, il s'agit des protéines du lait de vache que l'on peut retrouver dans le lait premier âge, mais aussi dans le lait maternel, lorsque la maman qui allaite consomme des laitages (Dupont, 2008).

L'allergie au lait de vache est la cause la plus fréquente d'allergie alimentaire du nourrisson. Elle représente entre 3 et 7% des observations pédiatriques. Dans près de la moitié des cas, il existe une composante familiale appelée terrain atopique : 49 % des bébés allergiques au lait de vache ont un parent allergique (Dupont, 2008).

Chez l'enfant, elle représente 12,6% des allergies et occupe la troisième position après l'allergie à l'arachide et à l'œuf (Moneret-Vautrin, 2007).

#### **1.2. Traitement de l'allergie aux protéines du lait de vache**

Le traitement de l'APLV repose sur la suppression des protéines du lait de vache (Boissieu et Dupont, 2007).

Les préparations à base de soja ont été proposées au début des années 1900 aux États-Unis comme substituts du lait pour les nourrissons atteints d'intolérance au lait de vache. Au cours du temps, les techniques de fabrication et la composition de ces préparations ont beaucoup évolué. Actuellement, seuls les produits contenant 90 à 95 % de protéines de soja (isolats) sont autorisés dans la fabrication des préparations pour nourrissons à base de protéines de soja (PPS) (Rieu et Tenailleau, 2005).

### 1.2.1. Lait de soja

Le lait de soja est un produit diététique dans lactose, sans saccharose, sans gluten et sans protéines du lait de vache. Il est enrichi en méthionine, en carnithine, en fer et en zinc (Rieu, 2006). Les préparations à base de protéines de soja (PPS) sont les seules dont la composition est adaptée aux besoins des nourrissons et des enfants de moins de trois ans. Pendant longtemps les PPS en était les seules aliments diététiques utilisables chez les nourrissons qui ne toléraient pas le lait de vache, soit par une intolérance au lactose après une diarrhée aiguë, soit par APLV (Bocquet et al., 2001).

## 2. Le soja

### 2.1. Définition

Le soja est une plante particulièrement intéressante, son attrait hors des frontières asiatiques ne fait que croître. En effet, elle recèle de nombreux atouts agronomiques, environnementaux et nutritionnels. Les produits alimentaires dérivés du soja sont facilement transposables aux produits laitiers. Ceci en fait un aliment de choix de plus en plus consommé en occident. Une autre particularité de cette plante est qu'elle contient des micro constituants végétaux originaux : les phytoestrogènes (Chatenet, 2007).

### 2.2. Phyto-estrogènes

#### 2.2.1. Définition

Les phytoestrogènes, molécules issues du monde végétal, font partie du vaste ensemble des polyphénols (AFSSA, 2005). Ces composés présentent une similarité structurale et fonctionnelle avec le  $17\beta$ -estradiol. De ce fait, ils exercent une action estrogénique ou anti-estrogénique (Bringer et Lefebvre, 2002). En effet, on les retrouve en grande quantité dans tous les aliments à base de soja traditionnels et industriels. On en retrouve notamment dans les laits infantiles à base de soja destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge allergiques aux protéines de lait de vache (Chatenet, 2007). Les principaux phytoestrogènes apportés par alimentation humaine sont les isoflavones : génistéine et daidzéine.

La génistéine et la daidzéine peuvent activer les récepteurs des estrogènes, et ainsi induire des effets agonistes ou antagonistes en fonction du tissu considéré et du gène régulé (AFSSA, 2006).

### 2.2.2. Consommation, biodisponibilité et métabolisme

Dans un régime occidental traditionnel, les isoflavones sont essentiellement présentes dans les légumineuses et l'apport moyen journalier est inférieur à 1mg. Lors de l'introduction d'aliments à base de soja dans un régime, ces apports sont de l'ordre 15mg/j en moyenne (Gerber et Berta-Vanrullen, 2006).

Les phytoestrogènes sont considérés comme des xénobiotiques, perturbateurs endocriniens. Ingerés sous forme glycosylée (daidzéine et génistéine), ils sont déglycolysés pour être absorbés dans l'organisme et passent dans le foie où ils subissent des étapes de détoxification par des enzymes spécifiques. Ils peuvent revenir dans le côlon selon un cycle entérohépatique similaire à celui des estrogènes. Ils sont ensuite éliminés par les urines et les fèces où ils se trouvent majoritairement sous forme de glucuronides. De l'ingestion à l'apparition dans la circulation sanguine, il s'écoule de 6 à 8 heures.

Dans l'intestin, les isoflavones peuvent être transformées en d'autres métabolites dont certains seraient plus actifs, tel l'équol. Cette transformation est liée à la présence d'une flore intestinale et d'enzymes colocalitaires particulières. Elle va donc varier largement d'un individu à l'autre et, chez les personnes capables de synthétiser de l'équol, l'apport de daidzéine, précurseur de l'équol, serait capable d'effets plus importants que chez les non producteurs (Gerber et Berta-Vanrullen, 2006).

## 3. Soja et utilisation dans la pratique courante

### 3.1. Soja et ostéoporose

L'ostéoporose est un problème de santé publique majeur. Des études écologiques ont montré que l'incidence des fractures du col du fémur était moindre dans les populations asiatiques. Parmi les aliments candidats, le soja est apparu comme susceptible de jouer un rôle grâce à sa teneur en isoflavones. Les études in vitro et les études in vivo chez l'animal et chez l'homme ont mis en évidence des effets doubles, inhibant la résorption osseuse et stimulant la formation osseuse. Aujourd'hui, les phytoestrogènes ne peuvent donc pas être considérés comme un traitement antiostéoporotique. Il n'est cependant pas exclu que le soja et/ou les isoflavones puissent faire partie de l'arsenal nutritionnel recommandé dans la prévention de la perte osseuse (Lecerf, 2007).

### 3.2. Soja et ménopause

La postménopause est principalement caractérisée par une réduction des hormones ovariennes, qui est accompagnée d'une incidence majeure des troubles physiques et les sautes d'humeur. Les preuves cliniques et expérimentales suggèrent que les phytoestrogènes pourraient être utilisés pour améliorer ces changements associés à la ménopause (Rodríguez-Landa et al., 2009).

### 3.3. Soja et risque de cancer

#### 3.3.1. Cancer du sein

L'ensemble des études épidémiologiques sur le cancer du sein montre une absence de risque de cancer du sein lié à l'apport alimentaire de phytoestrogènes. Parmi elles :

- La consommation d'isoflavones semble diminuer le risque spontané : 142875 Japonaises non ménopausées ont été suivies dans une étude pendant 17 ans. Le risque de cancer du sein était inversement proportionnel à leur consommation de miso (soupe à base de pâte de haricot de soja) (Lee, 1991). Le risque de cancer du sein des femmes 'consommatrices importantes' de soja était diminué de 29%.

Des études au laboratoire ont confirmé les propriétés anticancéreuses des phytoestrogènes (Murphy et al., 1999 ; Committee on toxicity, 2003).

#### 3.3.2. Cancer de l'intestin

L'œstradiol (le principal estrogène humain) ajouté dans une culture in vitro de cellules cancéreuses de colon humain est capable d'inhiber leur prolifération de 15 à 30% (Lointier, 1992).

D'autres études vont dans le même sens et semblent indiquer un effet protecteur du cancer du rectum induit par la consommation des dérivés du soja (Imhof et Molzer, 2008).

#### 3.3.3. Cancer de la prostate

Les études épidémiologiques suggèrent dans leur ensemble que les Asiatiques ont une faible incidence de cancer de la prostate. Au laboratoire dans les modèles animaux, le soja et la génistéine ont démontré une action inhibitrice sur ce type de cancer (Kolonel et al., 2000).

### **3.4. Soja et système nerveux central**

Les récepteurs aux œstrogènes sont présents dans le système nerveux central (Kuiper et al., 1998). Les estrogènes sont connus pour agir sur de nombreuses aires du cerveau et pour influencer le comportement, le mouvement, la réflexion, la sensibilité à la douleur. Ils ont également un effet protecteur vis-à-vis du développement de maladies neurodégénératives (McEwen, 1999).

Les phytoestrogènes pourraient donc exercer des effets similaires. Chez les rats, les phytoestrogènes passent la barrière hémato-méningée, mais les concentrations retrouvées dans le cerveau sont plusieurs centaines de fois inférieures à celles mesurées dans le plasma (Chang et al., 2006). Néanmoins, chez l'homme, la barrière hémato-méningée n'est pas complètement développée à la naissance ce qui laisse penser que le système nerveux central pourrait être plus accessible aux phytoestrogènes in utero ou à la naissance.

### **3.5. Soja et système cardiovasculaire**

Des études épidémiologiques ont montré que les régimes riches en soja ou en protéines de soja avaient un effet hypocholestérolémiant chez l'Homme (Ho et al., 2000 ; Ridges et al., 2001). Néanmoins, les phytoestrogènes ne seraient pas les seuls responsables pressentis, les fibres ou les phytostérols du soja, structurellement similaires au cholestérol, ont montré des effets hypocholestérolémiants (Ling et Jones, 1995 ; Committee on toxicity, 2003).

### **3.6. Soja et système neuroendocrinien et immunitaire**

De nombreux travaux expérimentaux montrent que les phytoestrogènes ont des effets sur le développement et le fonctionnement neuroendocrinien et immunitaire dans différentes espèces animales (FSA, 2003; AFSSA, 2005).

## **4. Toxicité alimentaire**

Les effets toxiques d'une substance ne résultent pas uniquement de l'absorption, en un court espace de temps, ou de doses relativement fortes, mais également de l'absorption de doses mêmes minimales, pour entraîner les effets aigus, mais dont la répétition finit par provoquer des troubles.

L'évaluation étendue de la toxicité d'une molécule fait appel à différentes études (Lu, 1992 ; Fan et al., 1995) dont les modalités ont été réglementées par la Food and Drug Administration (FDA) américaines en 1987 puis par l'Organisation de Coopération et de

Développement Economique (OCDE) en 1989 dans « les bonnes pratiques de laboratoires », afin d'améliorer la validité des données recueillies.

### **4.1. Etudes toxicocinétique**

Ces études visent à explorer le métabolisme de la molécule toxique. Elles reposent souvent sur l'utilisation de molécules marquées par des isotopes radioactifs, et sont effectuées en général sur plusieurs espèces animales.

Même si les résultats concluent à un risque négligeable chez l'animal, une série d'études doit tout de même être effectuée chez l'homme.

Les mécanismes possibles de toxicité sont multiples. Il peut s'agir d'une toxicité directe sur les protéines de l'organisme.

La toxicité indirecte peut être le fait soit d'une destruction de principes alimentaires essentiels, soit de la formation de produits toxiques à partir de certains composants de l'aliment.

### **4.2. Toxicité aiguë**

L'intérêt de l'épreuve de toxicité aiguë est d'écarter les substances trop toxiques et de servir ensuite de guide aux expériences ultérieures en fournissant des indications sur les principaux signes d'intoxication et sur les éventuelles différences relatives aux espèces. Sur le plan expérimental, elle s'effectue en administrant la substance toxique en une seule fois, ou en plusieurs fois très rapprochées, à deux, mieux à trois espèces animales (Adrian et al., 1995).

### **4.3. Toxicité à court terme**

L'objectif des études de toxicité à court terme est d'évaluer la nature biologique et le site des effets toxique.

Ces études également est de déterminer la dose à laquelle se produisent ces effets et d'en déduire la dose sans effet observé (DSE), exprimée en milligrammes par kilogramme de poids et par jour (mg/kg de poids/j) chez l'animal en expérience (Chambolle, 2002).

### **4.4. Toxicité à long terme**

Les études à long terme mesurent les effets cumulatifs du toxique en répétant son administration pendant une période s'étendant sur la plus grande partie de la vie de l'animal et sur au moins deux générations. En pratique, cette toxicité à long terme est le fait, essentiellement, des additifs dont l'intérêt est le plus discutable. Lorsque le produit est destiné

à un usage pédiatrique, une expérimentation complémentaire sur animaux jeunes, peut être utile pour déceler une éventuelle toxicité particulière chez l'enfant (Potus et al., 1996). Les signes cliniques de toxicité sont recherchés :

**-Sur le plan clinique :** l'aspect, le poids, la prise de nourriture, la prise de boissons, la croissance et le taux de mortalité.

**-Sur le plan biologique :** les paramètres biochimiques sériques par le prélèvement sanguin.

#### 4.5. Etudes de l'activité sexuelle et de la fertilité

Après administration du produit testé sur les mâles, les modifications de l'activité sexuelle peuvent être décelées en étudiant le déroulement et la fréquence d'accouplement et la modification de la fertilité en comptant la fréquence des gestations. Une étude des spermatozoïdes peut également être entreprise (Allain, 2005).

#### 4.6. Etude tératogène

Une substance peut avoir des effets toxiques sur la descendance quelque soit le moment de la gestation où elle est administrée à la mère mais plus particulièrement durant la phase d'embryogenèse.

L'activité tératogène d'un produit est mise en évidence par l'apparition d'anomalies morphologiques ou fonctionnelles dans la descendance de femelles traitées pendant la gestation. L'expérimentation de chaque produit étudié se fait sur deux ou trois espèces animales (Chavéron, 1999)

### 5. Organes Cibles

La plupart des organes peuvent être la cible des substances peut avoir des effets toxiques mais certains organes comme le foie et le rein peuvent être plus vulnérables aux substances toxiques.

Deux facteurs majeurs prédisposent ces deux organes ; leur position et leur fonction.

La vascularisation du foie et sa situation privilégiée de relation entre l'appareil digestif et l'appareil circulatoire permet de réguler la distribution de nombreux métabolites issus de la nutrition.

Le rein aussi possède des fonctions métaboliques et excrétoires importantes et bénéficie d'une large irrigation sanguine est particulièrement exposés aux toxiques (Lacarelle et Viala, 2005; Timbrell, 2009).

### 5.1. Le foie

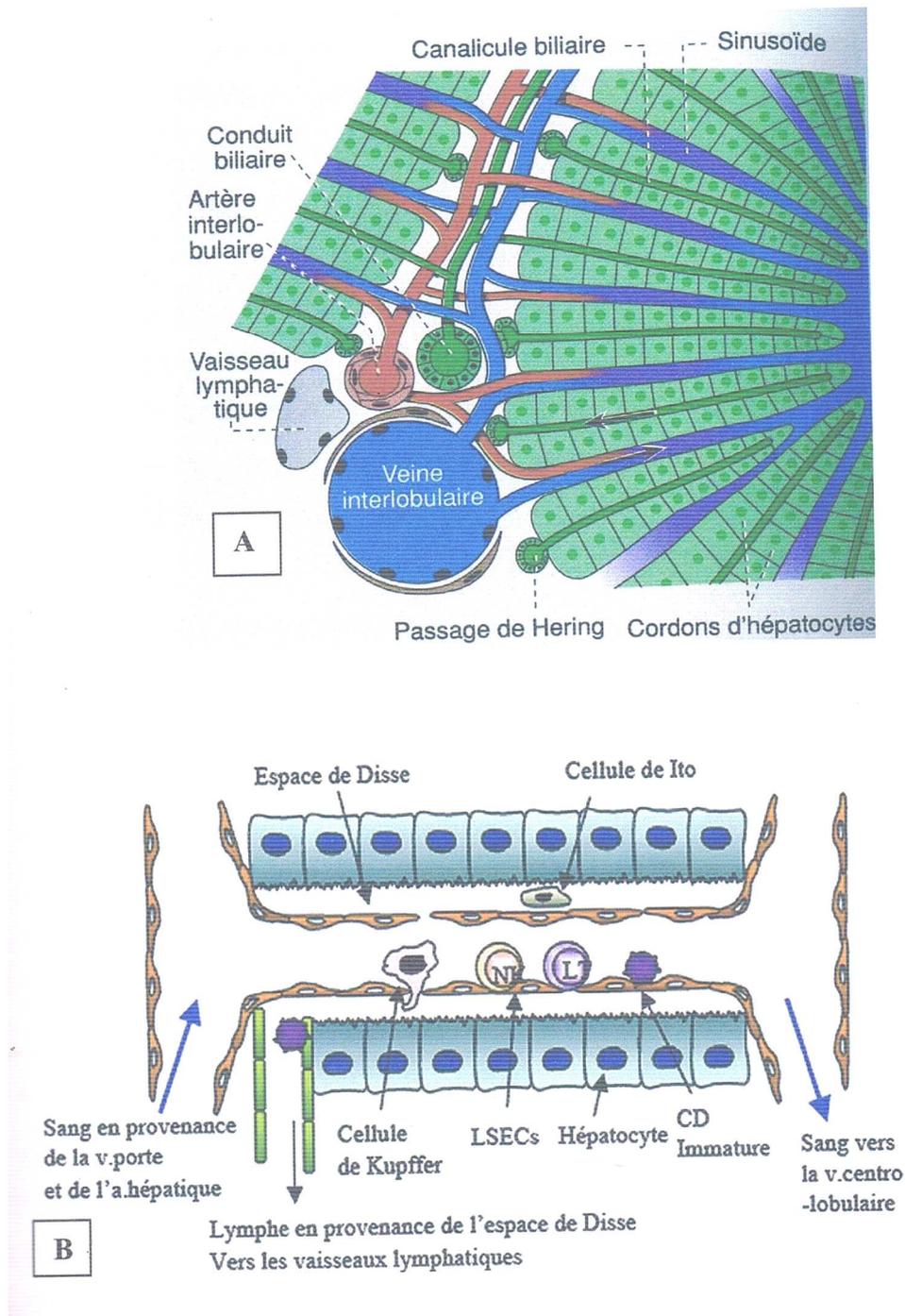
Le foie joue un rôle important dans les métabolismes glucidiques, protidiques et lipidiques de l'organisme. Il assure également un rôle majeur dans l'élimination des déchets endogènes (élimination de la bilirubine produite par le catabolisme des protéines etc.).

Le foie est un organe très richement vascularisé. La vascularisation de chaque lobe hépatique est majoritairement assurée par une branche de la veine porte et minoritairement par une branche de l'artère hépatique, apportant du sang oxygéné. Le flux sanguin se fait de façon unidirectionnelle, de la veine porte aux veines hépatiques daignant ainsi les sinusoides (McCuskey, 2000). Les sinusoides sont des capillaires spécialisés au contact des cellules endothéliales et des cellules de Kupffer (Smedsrod, 2004). Il existe de larges fenestrations (présence de pores) (Fraser et al., 1995) dans les sinusoides qui permettent le passage de grosses molécules à travers l'espace interstitiel et d'être au contact des hépatocytes ultrafiltration (Le Couteur et al., 2005), métabolisme des lipoprotéines (Fraser et al., 1995 ; Le Couteur et al., 2006), circulation des cellules immunitaires (Warren et al., 2007)). Les hépatocytes sont le types cellulaire le plus abondant dans le foie (environ 80%) et sont le site majeur du métabolisme intermédiaire et du métabolisme des xénobiotique, ainsi que de stockage (David , 2000) (figure 1).

Les biotransformations peuvent également parfois être à l'origine de la production de métabolites réactifs toxiques pour les cellules hépatiques. La cible cellulaire principale de la toxicité est l'hépatocyte. Cependant, les cellules endothéliales et les cellules étoilées peuvent aussi être touchées (Gérolami, 2005).

Les métabolites peuvent effectivement se lier aux différents constituants de la cellule hépatique (protéines, lipides membranaires, acides nucléiques, etc.) et induire la mort cellulaire par réaction immunitaire, apoptose ou dysfonctionnement mitochondrial (Pumford et al., 1997 ; Raffray et Cohen, 1997; Wallace et Starkov ,2000).

L'hépatotoxicité est modulée par des modifications d'activités des cytochromes, d'origines génétique, médicamenteuse ou toxique. Ainsi une hyperactivité de certains cytochromes pourra entraîner l'accumulation de métabolites toxiques en intensifiant leur



**Figure 1. A.** Représentation schématique de l'anatomie microscopique d'un espace porte et section dans un lobule hépatique. D'après Sobatta et al., 2004.

**B.** Détail de l'organisation des sinusoides. D'après Crispe, 2003.

production et une inhibition ou une faible activité de ces enzymes diminue la vitesse d'élimination du toxique (Gonzalez, 2005 ; Park et al., 2005)

Des systèmes de protection existent vis à vis des métabolites réactifs. Le plus important est la conjugaison de ces métabolites au glutathion (Power et Lennon, 1999).

Enfin, des déficits dans certaines voies de conjugaison peuvent réorienter le métabolisme de xénobiotique vers la production de métabolites réactifs.

Les atteintes hépatiques toxiques peuvent se présenter sous des formes variées à types de stéatose hépatique, d'hépatites aiguës (cytolytiques, cholestasiques ou mixtes), d'hépatites chroniques pouvant aboutir à une cirrhose, d'atteintes vasculaires biliaires ou tumorales (Sturgill et Lambert, 1997 ; Gérolami, 2005).

### **5.1.1. Hépatites aiguës**

La toxicité se fait par atteinte des hépatocytes. Le xénobiotique ou ses métabolites réactifs peuvent entraîner la mort cellulaire en interférant avec l'homéostasie de la cellule (liaison avec les macromolécules, atteinte de la membrane plasmique, peroxydation lipidique atteinte des mitochondrie, etc.) ou en induisant une réaction immunologique (hépatites immunoallergiques ) (Poli, 1993 ; Roma et Sanchez Pozzi, 2008).

#### **5.1.1.1. Hépatites cytolytiques**

Elles correspondent biologiquement à une élévation des transaminases et histologiquement à une nécrose hépatocytaires du à l'inhibition respiratoire mitochondriale ou à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) des mitochondries (Berson et al., 1996 ;Berson et al., 2001).

L'évolution est en générale favorable à l'arrêt de l'exposition au toxique. De nombreux médicaments (le paracétamol, les antidépresseurs tricycliques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), certaines substances (le bromobenzène, les hydrocarbures aliphatiques halogénés) et composés toxiques (cadmium, cobalt, chrome, mercure, etc.) peuvent être à l'origine d'hépatites cytolytiques (Rikans et Yamano, 2000 ;Tzirogiannis, 2003).

#### **5.1.1.2. Hépatites cholestasiques**

Elles sont caractérisées par une élévation des phosphatases alcalines, des gammaglutamyltranspeptidases et de la bilirubine. Il existe plusieurs interférences avec le système biliaire résultant une stase biliaire ou des lésions des canaux et canicules biliaires.

Parfois les lésions des canicules biliaires peuvent être accompagnées par des lésions des hépatocytes (apoptose) due à l'accumulation de la bile et des sels biliaires (Patel et al., 1998). Des tableaux de cholestase pure sont observés avec les dérivés hormonaux (stéroïdes anabolisants, œstrogènes, androgènes), les médicaments (antidépresseurs tricycliques, les AINS, antibiotiques) (Mottino et al., 2002 ; Crocenzi et al., 2003) et le stress oxydatif généré par les radicaux libres lors de la bioactivation des xénobiotiques (Pérez et al., 2006 ; Roma et Sanchez Pozzi, 2008). La cholestase issue du stress oxydatif est attribuée à l'internalisation des transporteurs (Mpr2 et Bsep (bile salt export pump)) (Pérez et al., 2006 ; Roma et Sanchez Pozzi, 2008) qui jouent un rôle fondamental dans l'excrétion biliaire (Akita et al., 2001 ; Suchy et Ananthanarayanan, 2006).

### **5.2. Hépatites chroniques (cirrhoses)**

L'atteinte hépatique prolongée, quelle qu'en soit l'origine peut entraîner une hépatite chronique et une fibrose. Les médicaments les plus souvent mis en cause l'amiodrane, la méthylidopa, la nitrofurantoïne et la vitamine A. Dans le cas de l'amiodrane, l'aspect histologique ressemble à celui observé dans les hépatopathies alcooliques (infiltrat à polynucléaires, corps de Mallory, stéatose par accumulation de phospholipides) (Caldwell et Hespeneide, 2002; Jaeschke et al., 2002).

#### **5.2.1. Stéatose**

Elle consiste en l'accumulation de lipides (triglycérides) dans le cytoplasme des hépatocytes. La stéatose macrovacuolaire consiste en la présence d'une goutte de graisse unique refoulant le noyau d'hépatocyte en périphérie. Elle est observée dans l'intoxication alcoolique et peut être secondaire à de très nombreux médicaments (corticoïdes par exemple). La stéatose régresse à l'arrêt de l'intoxication.

La stéatose microvacuaires est caractérisée par l'accumulation de multiples gouttelettes lipidiques de petites tailles dans le cytoplasme des hépatocytes due au blocage de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la respiration mitochondriale (Fromenty et Pessayre, 1995). L'inhibition de ces réactions induit la formation des radicaux libres oxygénés qui à leur tour provoquent une peroxydation lipidique et une stéatose hépatique (Pessayre et al., 2001 ; Jaeschke et al., 2002).

L'augmentation de l'expression du CYP2E1 impliquée dans l'oxydation des acides gras est largement incriminée dans les stéatoses hépatiques d'origine non alcoolique (Chalasan et al., 2003 ; Emery et al., 2003).

### 5.2.2. Atteinte toxique des canaux biliaires

Elle se manifeste par un ictère et une cholestase et sur le plan histologique par une atteinte inflammatoire des petits canaux biliaires intra-hépatiques (cholangite). Des médicaments peuvent en être à l'origine, notamment certains neuroleptiques, antidépresseurs tricycliques et antibiotiques (Gérolami, 2005).

### 5.2.3. Toxicité vasculaire hépatique

Les atteintes du sinusoiide hépatique peuvent aller de la simple dilatation sinusoiide jusqu'à la destruction et la disparition des cellules endothéliales sinusoiidales aboutissant à des « lacs » remplis de sang bordés par les hépatocytes (pliose) (Sturgill et Lambert, 1997). Les xénobiotiques les plus fréquemment mis en cause sont les dérivés de stéroïdes, les dérivés de l'arsenic (Robert et al., 2000 ; Gérolami, 2005).

### 5.2.4. Tumeurs hépatiques

Les adénomes hépatiques, tumeurs hépatocytaires bénignes mais pouvant dégénérées, sont fortement associés aux contraceptifs oraux fortement dosés et aux stéroïdes anabolisants (Sturgill et Lambert, 1997). La toxine d'*Aspergillus flavus* (aflatoxine B) semble jouer un rôle de cofacteur dans le développement de carcinomes hépatocellulaire.

## 6. Le rein

Le rein joue un rôle fondamental dans l'élimination des toxiques et leurs métabolites. L'importance du flux sanguin qui irrigue le rein peut amener des quantités abondantes de toxique à son niveau. Ils sont concentrés dans le filtrat, transportés à travers les cellules tubulaires ou quelques-uns sont bioactivés. C'est donc une cible majeure pour de nombreux toxiques. Il intervient également dans le maintien de l'homéostasie (par le maintien de la composition du milieu extracellulaire, de l'équilibre acide-base), dans la régulation de la pression artérielle (par le système rénine-angiotensine), il assure la synthèse d'hormones et de facteurs tissulaires (érythropoïétine (Bachmann et al., 1993 ; Maxwell et al., 1997), angiotensine II, calcitriol et prostaglandines) ; il est impliqué dans le métabolisme (synthèse d'arginine ou de citrulline) et intervient dans l'élimination des produits terminaux du

métabolisme des protéines, de la purine, et de l'azote (urée et acide urique) (Rao et Velkman, 2000 ; Sobotta et al., 2004 ; Lacarelle et Viala, 2004).

Le rein est formé par la réunion d'un nombre variable de structures sécrétrices élémentaires, les néphrons. Chaque néphrons comporte un glomérule et des tubules (Dadoune, 2000 ; Sobotta et al., 2004 ; Brun et al., 2004). Le glomérule possède un système capillaire à pression élevée qui produit un ultra-filtra à partir du plasma. Le filtrat, collecté dans la capsule de Bowman, passe dans le tube contourné proximal, l'anse de Henlé et le tube contourné distal, et s'écoule par un canal collecteur dans le pelvis rénal pour former l'urine (figure 2). La filtration libre ne concerne que les substances avec un rayon moléculaire de 1,6 à 1,8 nm, ce qui correspond à une masse de 6 à 15 KDa. La limite d'exclusion se situe à environ 6 nm (60KDa) (Reichel et al., 2004) les molécules anormalement grandes sont filtrées en partie et en quantité variable (Dadoune, 2000 ; Sobotta et al., 2004).

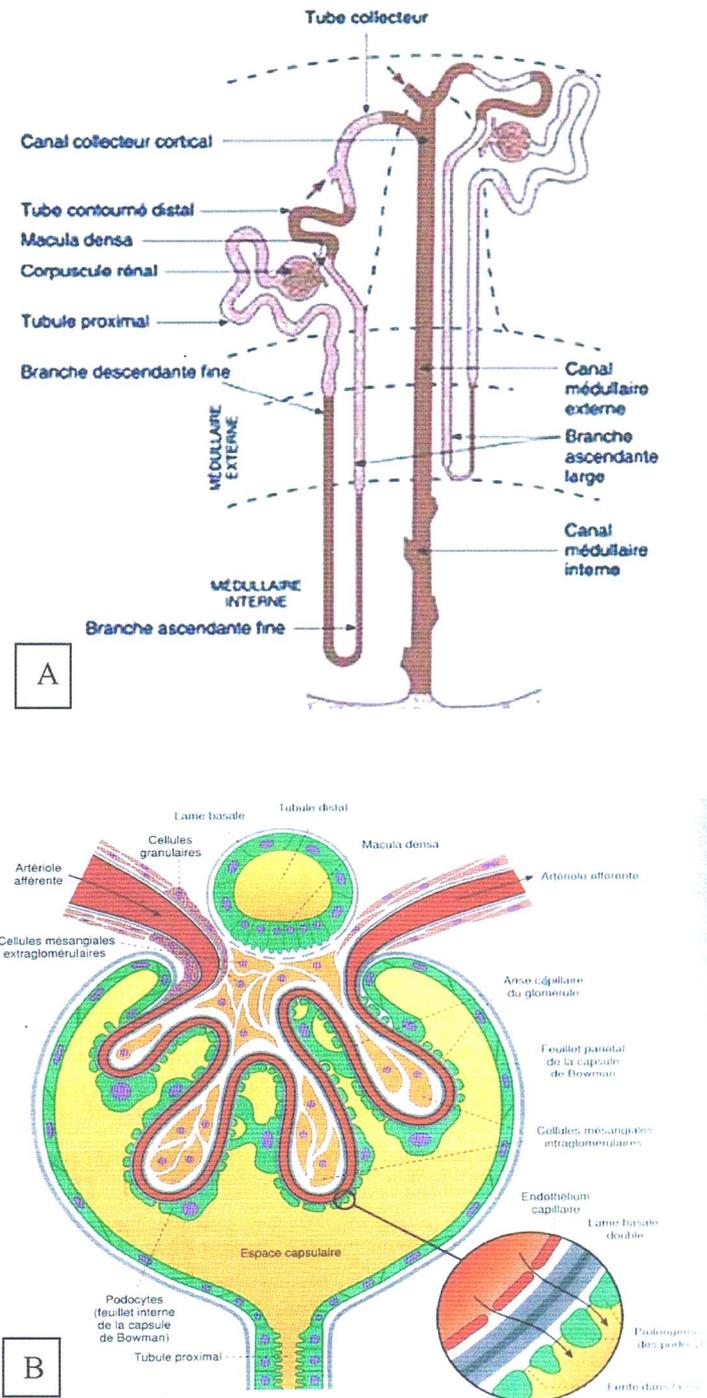
### **6.1. Vulnérabilité du rein aux toxiques**

#### **-Facteurs de vulnérabilité**

- L'importance du flux sanguin qui irrigue le rein pour amener des quantités abondantes de toxiques à son niveau.
- L'eau et les sels étant particulièrement réabsorbés au niveau tubulaire, les toxiques peuvent se concentrer dans les tubules et parfois même y précipiter.
- La concentration d'un xénobiotique peut être non toxique dans le sang et toxique au niveau rénal.
- Les acides organiques, avant d'être sécrétés par les cellules du tube contourné proximal, y atteignent des concentrations importantes. Il en est de même lors de la réabsorption.
- L'insuffisance circulatoire et les déshydratations induites par certains toxiques entraînent au niveau rénal une diminution de la filtration glomérulaire.
- L'importance des capacités de métabolisme et de transport du rein peut aussi en augmenter la vulnérabilité (Pfaller et Gstraunthaler 1998 ; Gérolami, 2005).

### **6.2. Manifestation de l'action des toxiques sur le rein**

Toutes les zones du néphron peuvent être atteintes par les toxiques. Cependant, la région proximale du néphron est la plus sensible car elle est le site de la détoxification des



**Figure 2. A.** Schema d'un néphron. D'après Brun et al., 2004.

**B.** Représentation schématique d'un glomérule rénal. D'après Sobotta et al., 2004.

xénobiotiques ; plusieurs enzymes sont localisées dans cette région comme les cytochromes P450, glucuronyl transférase, sulfotransférases, glutathion S transférases et prostaglandine H synthétase (Pfaller et Gstraunthaler 1998 ; Middendorf et Williams, 2000 ; Lonnydes, 2001 ; Coughtrie, 2002).

Les manifestations induites peuvent aller de légères altérations biochimiques se traduisent par des dysfonctionnements mineurs de la fonction rénal jusqu'à la mort cellulaire conduisant à l'insuffisance rénal. Le rein, cependant, peut développer des mécanismes d'adaptation aux phénomènes toxiques.

### **6.2.1. Atteintes glomérulaires**

Certains antibiotiques et d'une façon générales les néphrotoxines comme les aminosides modifient la charge électrostatique de l'endothélium et diminuent la filtration glomérulaire, en modifiant la composition des phospholipides membranaires et l'activité des systèmes de transport comme la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP ase, l'adénylate cyclase,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$ . En plus de leur action sur les tubules (Timbrell, 2009).

### **6.2.2. Atteintes tubulaires**

Des métaux lourds comme le mercure, le chrome, le cadmium, le plomb peuvent altérer les fonctions tubulaires, ralentissant leur propre élimination et provoquant glycosurie et aminoacidurie. La mort cellulaire, une azotémie importante et l'anurie peuvent survenir pour des doses élevées. Les aminosides, les céphalosporines, l'amphotéricine-B, les hydrocarbures halogènes et les mycotoxines affectent les fonctions des tubules proximaux (Pfaller et Gstraunthaler 1998 ; Géromi ,2005, Timbrell, 2009). Les aminosides comme la gentamycine s'accumulent dans les lysosomes des cellules du tube proximal provoquant leur rupture et la libération des enzymes hydrolytiques provoquant une nécrose cellulaire (Laurent et al., 1990). Par contre, les céphalosporines induisent une nécrose cellulaire par des mécanismes différents pas encore bien établis. L'accumulation de ces composés dans les cellules tubulaires est suite à une diminution de l'efflux (Takeda et al., 2002). Cette accumulation induit soit une activation métabolique via l'activation des CYP P450 et production des métabolites réactifs, soit la formation de produits de peroxydation lipidique et oxydation du glutathion qui a pour conséquence l'augmentation de la toxicité et enfin soit en diminuant la respiration mitochondriale (Kiyomiya et al., 2002 ; Timbrell, 2009).

La réponse du rein à une atteinte néphrotoxique peut se manifester par une simple hypertrophie, mais aussi par l'induction de protéines et par la mise en route de processus de prolifération-régénération. Cependant, la toxicité chronique d'un toxique peut ne pas être détectée à cause de la capacité compensatoire du rein.

### **7. La fertilité chez la souris mâle**

#### **7.1. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle**

L'appareil reproducteur mâle se compose des testicules, des conduits excréteurs (Rete testis, canaux efférents, épидидymes, canaux déférents, et urètre), et des glandes annexes (vésicules séminales, prostate, glandes bulbo-urétrales et préputiales) (figure 3) (Roscoe et al., 1941).

##### **7.1.1. Appareil uro-génital**

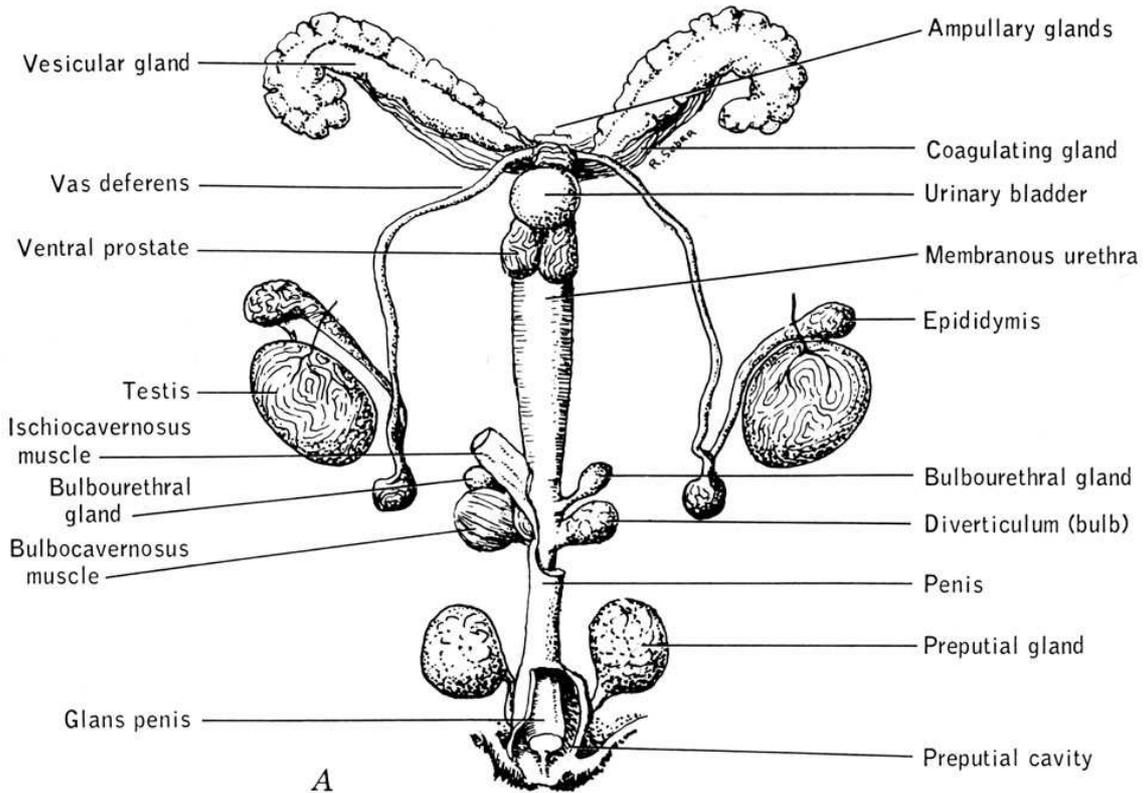
La figure 4 montre une dissection de la cavité abdominale d'une souris mâle (Vernet, 2006).

Le testicule est relié à un épидидyme qui est une structure allongée composée d'une tête, d'un corps et d'une queue (figure 5). La tête se situe au sommet du testicule et le corps longe le bord postérieur du testicule. La queue de l'épididyme se prolonge ensuite par le canal déférent qui débouche dans l'urètre. Ce dernier est destiné à évacuer les urines et le sperme (Vernet, 2006).

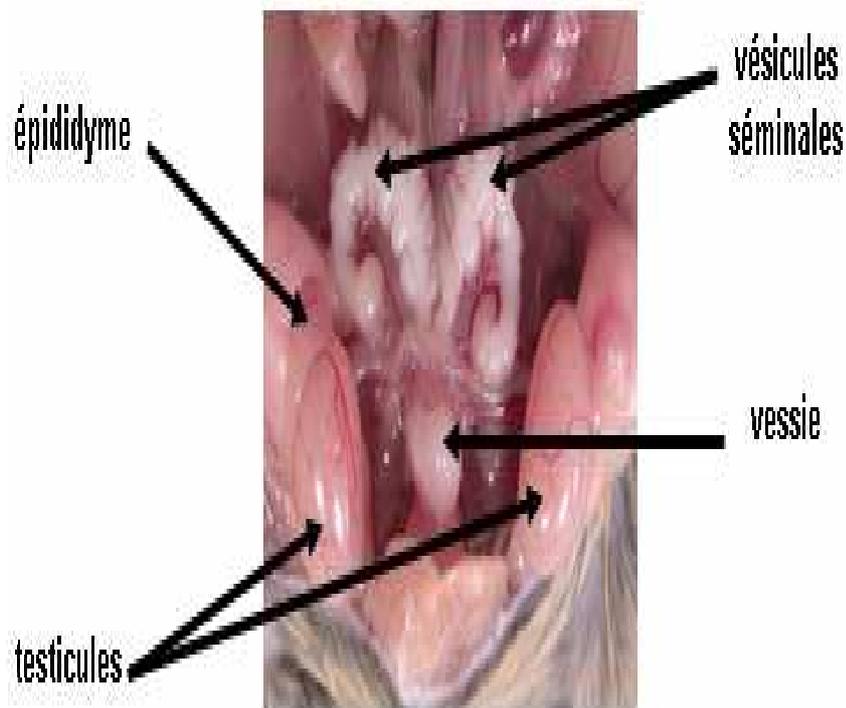
##### **7.1.1.1. Testicule**

Le testicule assure une double fonction exocrine: la production des spermatozoïdes et endocrine : la sécrétion d'hormone sexuelle mâle, la testostérone (Dadoune et Démolin, 1991). C'est un organe pair de forme ovoïde. Il est logé dans la bourse, dont le revêtement cutané est le scrotum. La figure 6 représente une coupe transversale de testicule de souris, il est constitué de tubes séminifères séparés les uns des autres par un espace interstitiel. Il est entouré d'une tunique épaisse formée de tissus conjonctifs fibreux: l'albuginée. Le testicule est irrigué grâce à une grande vascularisation provenant de l'artère testiculaire et dont les branches cheminent dans l'albuginée, puis dans l'espace interstitiel.

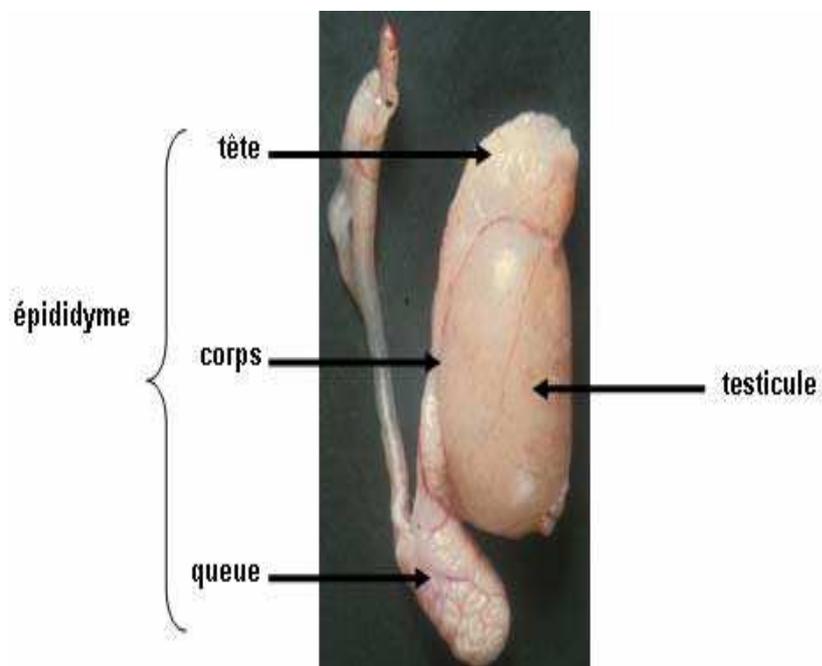
Le Rete testis est un regroupement particulier de tubes où convergent les tubes séminifères. Les spermatozoïdes continuent alors leurs processus de maturation le long de l'épididyme où ils acquièrent leur mobilité et deviennent fécondant (Soler et al., 1994).



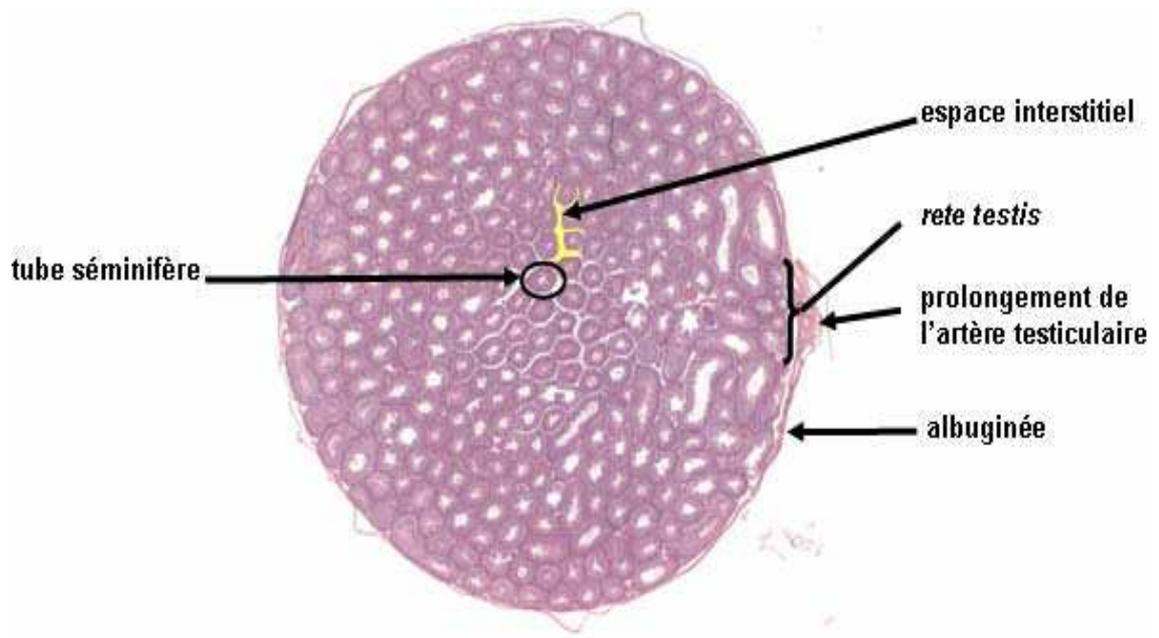
**Figure 3.** Représentation schématique de l'appareil reproducteur mâle de la souris adulte (Roscoe et al., 1941).



**Figure 4.** Observation de la cavité abdominale d'une souris mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital (Vernet, 2006).



**Figure 5.** Testicule et épидидyme de souris (Vernet, 2006).



**Figure 6.** Testicule de souris en coupe transversale colorée à l'hématoxyline-éosine  
(Vernet, 2006).

### 7.1.1.1.1. Les tubes séminifères

Les tubes séminifères contiennent des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules somatiques, les cellules de Sertoli (Dadoune et Démolin, 1991 ; Brennan et al., 2003 ; Jeays-Ward et al., 2003). Cette association de cellules germinales et de cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère (figure 7).

Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère. Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère (vers la lame basale) et les cellules les plus matures sont situées du côté apical du tube séminifère vers la lumière.

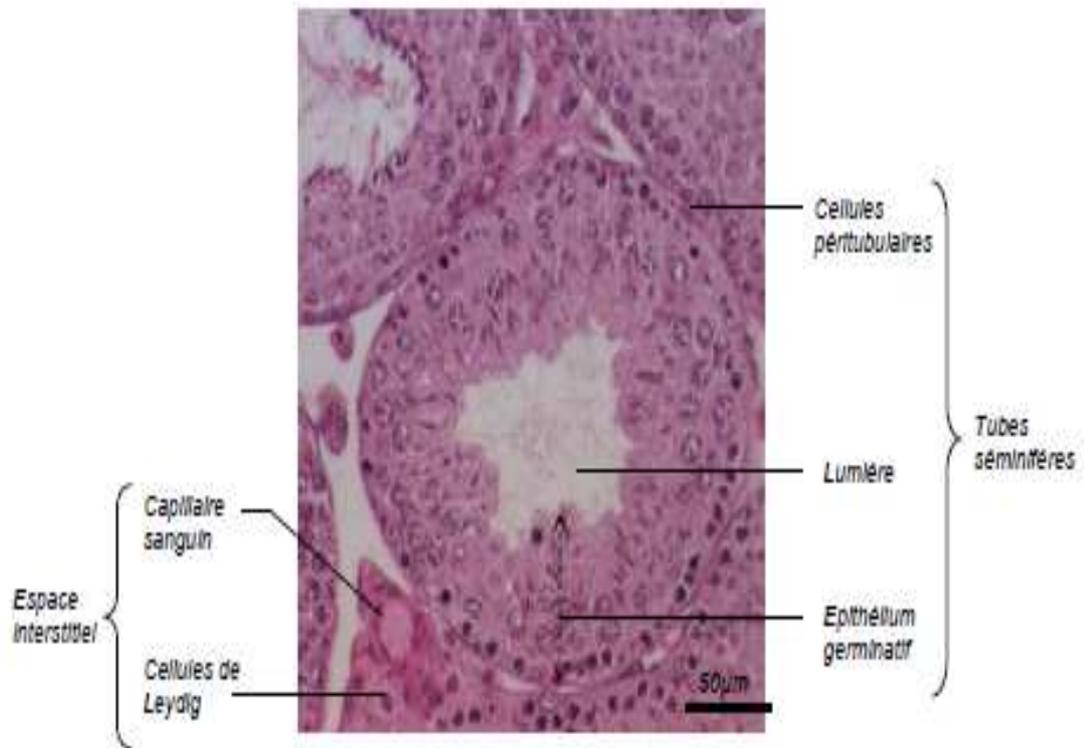
L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules appelées cellules myoïdes périvitubulaires (Maekawa et al., 1996). Ces cellules sont des cellules contractiles qui participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles dans le testicule.

### 7.1.1.2. Epididyme

Dans le testicule, les tubes séminifères se rejoignent pour former un labyrinthe lacunaire, appelé Rete testis. De celui-ci émergent 5 canaux efférents qui se fondent en un unique canal: le canal épидидymaire. L'épididyme est formé de cet unique canal replié sur lui même et empaqueté dans une tunique conjonctive.

Il comporte trois parties identifiables sous la loupe : la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda). Les fonctions de l'épididyme sont multiples :

- Réabsorption du fluide testiculaire émanant de l'excrétion des cellules de Sertoli.
- Maturation fonctionnelle des gamètes (acquisition de la mobilité progressive, modification de la composition membranaire des gamètes) (Hossain et Saunders, 2001).
- Stockage et conditionnement des spermatozoïdes.
- Réabsorption des déchets, comme la gouttelette cytoplasmique (reste cytoplasmique perdu par le spermatozoïde dans l'épididyme) ou les cellules en dégénérescence (Marengo, 2008).
- L'épididyme, par ses sécrétions, participe de façon minoritaire au plasma séminal.



**Figure 7.** Coupe transversale d'un tube séminifère de testicule de souris adulte G (10x20)  
(Hôte, 2009).

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme sont activement excrétés dans le canal déférent. Les glandes annexes qui s'abouchent à la base des canaux déférents (vésicules séminales), et dans l'urètre (prostate et glandes bulbo-urétrales) sécrètent alors le plasma séminal.

### 7.1.1.3. Vésicules séminales

La fonction première des glandes annexes principales (vésicules séminales et prostate) est de produire le liquide séminal accompagnant les spermatozoïdes lors de l'éjaculation. Les vésicules séminales sont deux glandes exocrines s'abouchant sur les canaux déférents. La sécrétion des vésicules séminales représente environ 60 à 70% du volume de l'éjaculat. Cette sécrétion a plusieurs fonctions :

- La coagulation du sperme.
- La formation du bouchon vaginal chez la souris (Cette structure est spécifique des rongeurs, l'absence de sa formation conduit à une infertilité du mâle (Murer et al., 2001) .

Chez l'homme, l'acteur principal de cette coagulation est la protéine Semenogelin I. Cette protéine n'est pas retrouvée chez les rongeurs, mais il existe des analogues fonctionnels : les Svs (Seminal vesicle secretion), sept gènes sont actuellement décrits chez la souris.

- La régulation de la mobilité des gamètes (production de fructose, de protéines agissant sur la mobilité de façon inhibitrice (Peitz, 1988) (Yoshida et al., 2008) ou activatrice (Luo et al., 2001).

La prostate, entourant l'urètre de ses parties latérales et ventrales, produit environ 20% du plasma séminal. La fraction prostatique interviendrait dans la liquéfaction du coagulum et la restauration de la mobilité des spermatozoïdes, notamment grâce à l'action protéolytique du prostate specific antigen (PSA) qui lève l'inhibition par la Semenogelin 1 (Robert et al., 1997 ; Lundwall et al., 1997) ou de (Seminal vesicle secretion) svcs 2 chez la souris (Kawano et Yoshida, 2007) et grâce à un effet du Zinc, présent en forte concentration (Yoshida et al., 2008).

Les glandes bulbo-urétrales, nommées aussi glandes de Cooper, ont pour fonction de sécréter un fluide lubrifiant précédant l'éjaculat, neutralisant les traces d'acide urique présentes dans le tractus urogénital (Chughtai et al., 2005). Enfin, les glandes préputiales, très développées chez les rongeurs, joueraient un rôle dans la régulation des comportements reproducteurs, par émission de phéromones dans les urines (territorialité et agressivité des



mâles, reconnaissance de sous-espèces...) (Zhang et al., 2007). L'ensemble de ces glandes annexes est soumis à une régulation androgénique. Le taux de testostérone circulant régule leur développement à la puberté, ainsi que leur fonctionnement à l'âge adulte. Chez la souris, l'inactivation du gène du récepteur aux androgènes, de façon restreinte, dans la prostate, les vésicules séminales et l'épididyme, conduit à une réduction significative du poids de ces glandes, à des anomalies histologiques de leur épithélium sécrétoire ainsi qu'à la diminution de leur capacité sécrétoire (Simanainen et al., 2008 ). Les glandes annexes constituent donc des marqueurs de la bonne imprégnation hormonale.

## **7.2. La spermatogenèse chez la souris**

### **7.2.1. Définition**

La spermatogenèse est le processus de division et de différenciation cellulaire par lequel les spermatozoïdes sont produits à partir des spermatogonies situées dans les tubes séminifères des testicules. Le cycle de l'épithélium séminal correspond à l'intervalle régulier de temps qui rythme l'entrée en spermatogenèse des cellules souches de renouvellement.

### **7.2.2. Phases de la spermatogenèse**

Sur le plan fonctionnel, la spermatogenèse peut être décomposée en trois phases :

la phase proliférative, la phase méiotique et la spermiogenèse (Bellve et al., 1977; Jégou, 1995). Ces trois phases sont représentées dans la figure 8 avec les différents types de cellules germinales impliqués dans chacune des phases.

- ✓ La première phase de la spermatogenèse est une phase proliférative portant sur les spermatogonies (type A, In ou B) qui se divisent par des mitoses classiques (Clermont et Perey., 1957 ; de Rooij et Russell, 2000 ; Nakatsuji et Chuma., 2001 ; Werner et DeLuca., 2001 ).
- ✓ La seconde phase est une phase méiotique portant sur les spermatocytes primaires et secondaires dans lesquels on assiste à une recombinaison du matériel génétique et à une ségrégation chromosomique.
- ✓ La troisième et dernière phase est une phase de différenciation ou spermiogenèse.

Une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se déroulent pendant la spermiogenèse au niveau des cellules haploïdes que sont les spermatozoïdes

rondes et allongées. Cette différenciation permet alors la formation des cellules germinales les plus matures : les spermatozoïdes.

La phase proliférative met en jeu de nombreux stades intermédiaires de différenciation des spermatogonies de type A (de Rooij, 2001; Dym, 1994). Cette phase est représentée sur la figure 8.

### **7.2. 3. Stades de l'épithélium séminifère**

Tous les types de cellules germinales sont présents dans l'épithélium séminifère, à savoir, les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. Les cellules germinales sont hautement organisées : elles forment une série d'associations cellulaires ou stades de l'épithélium séminifère de telle manière qu'un même stade donné occupe la totalité d'une section transversale d'un tube séminifère (Russell et al., 1990).

La figure 9 représente les douze stades (I à XII) du cycle de l'épithélium séminifère chez la souris.

#### **7.2.3.1. Cellules germinales associées à la phase proliférative**

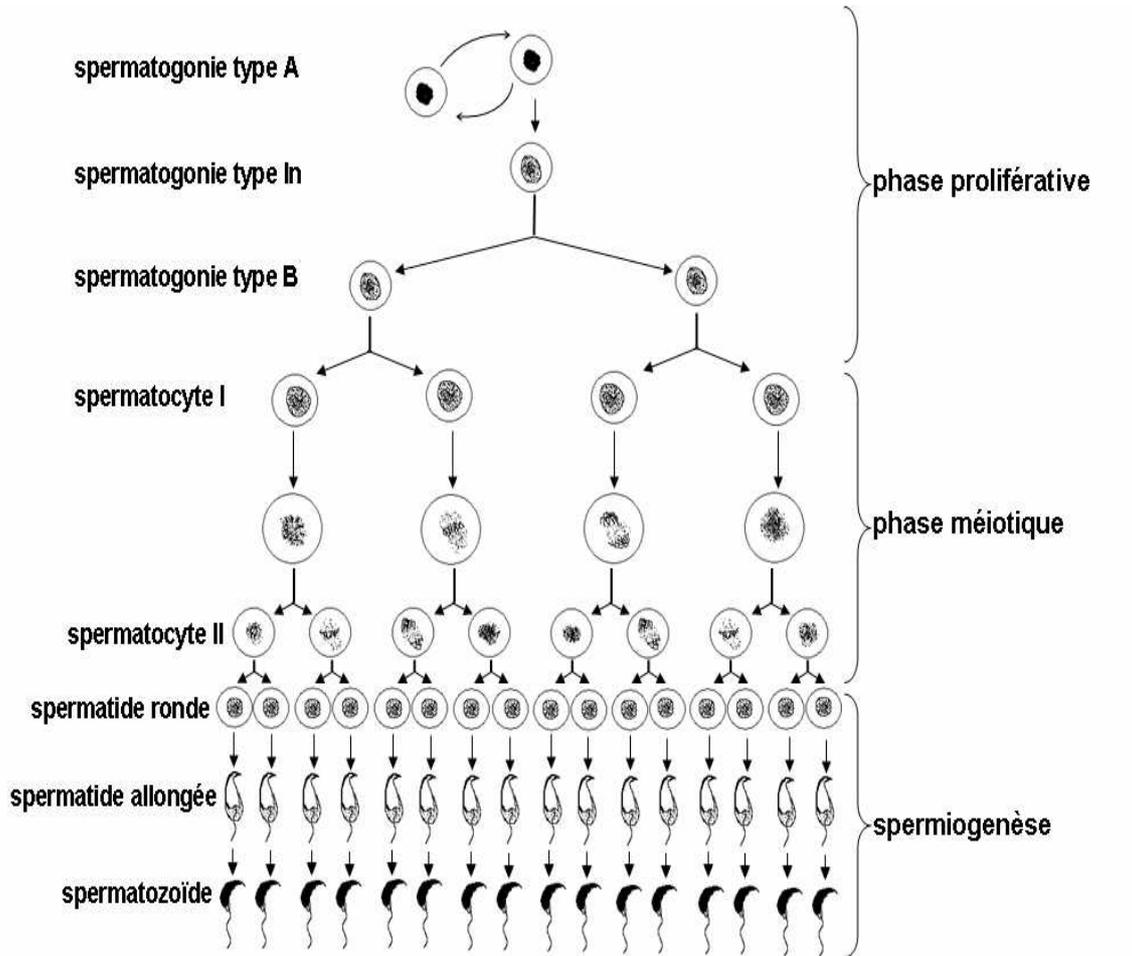
Les spermatogonies de type A ne sont pas représentées sur la figure 10 car elles sont réparties dans la totalité des stades. Les spermatogonies de type intermédiaires (In) sont présentes aux stades II-III et IV. Les spermatogonies de type B sont quant à elles localisées aux stades V et VI.

De plus, toutes les cellules germinales associées à la phase proliférative sont situées du côté basal du tube séminifère. Elles sont en contact étroit avec la lame basale (Nagano et al., 2000).

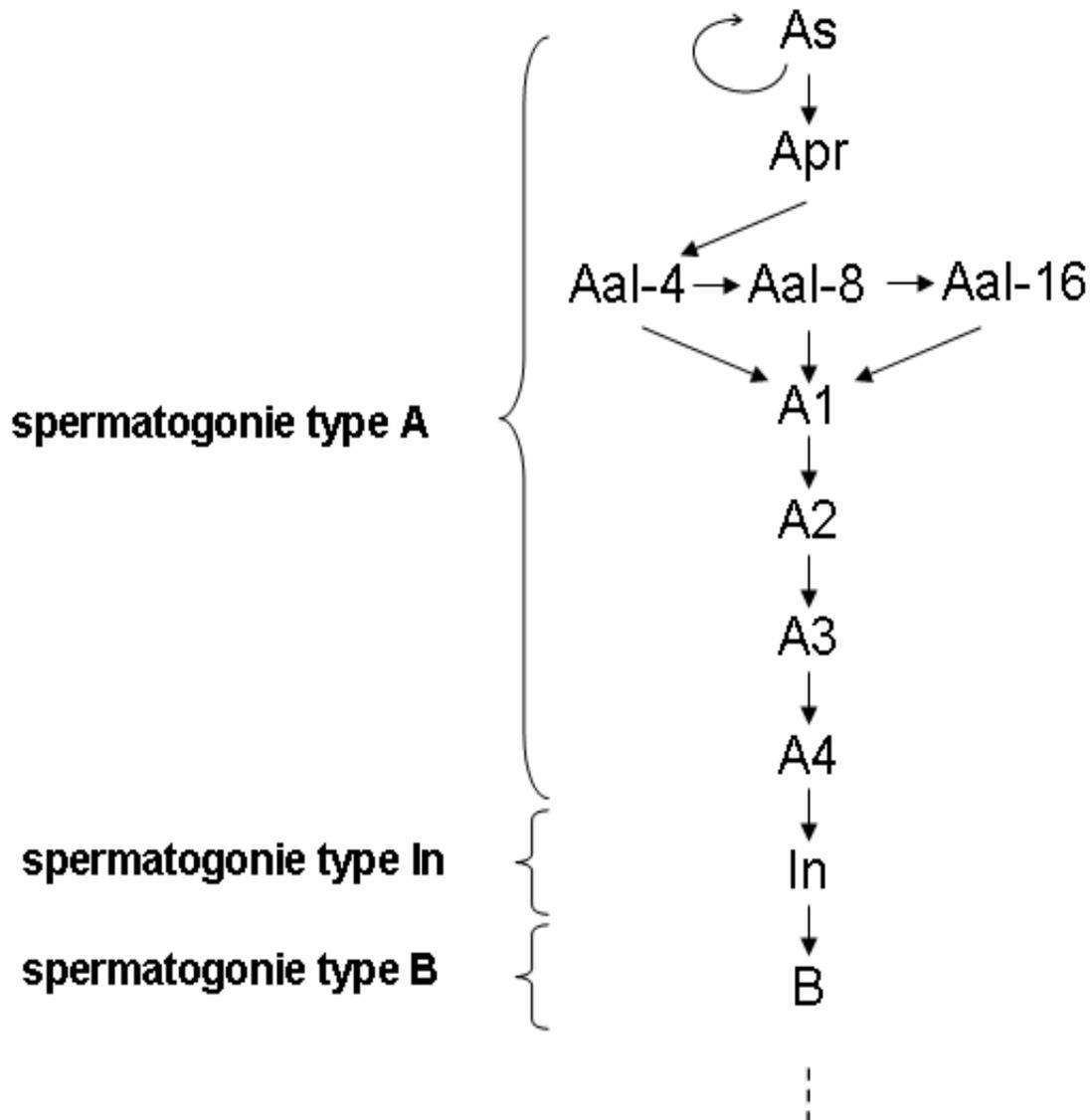
#### **7.2.3.2. Cellules germinales associées à la phase méiotique**

Il existe différents types de spermatocytes primaires. Les spermatocytes préleptotènes (PR) sont présents aux stades VII-VIII, les spermatocytes leptotènes (L) aux stades IX X, les spermatocytes zygotènes (Z) aux stades XI-XII, les spermatocytes pachytènes (P) aux stades I à X et enfin, les spermatocytes diplotènes (D) au stade XI uniquement.

Ensuite, les spermatocytes secondaires sont présents au stade XII et sont facilement reconnaissables car elles enchaînent les deux divisions méiotiques.



**Figure 8.** Phases de la spermatogénèse chez la souris et types de cellules germinales concernés. (Jégou, 1995).



**Figure 9.** Renouveau et multiplication des spermatogonies. (De Rooij, 2001).

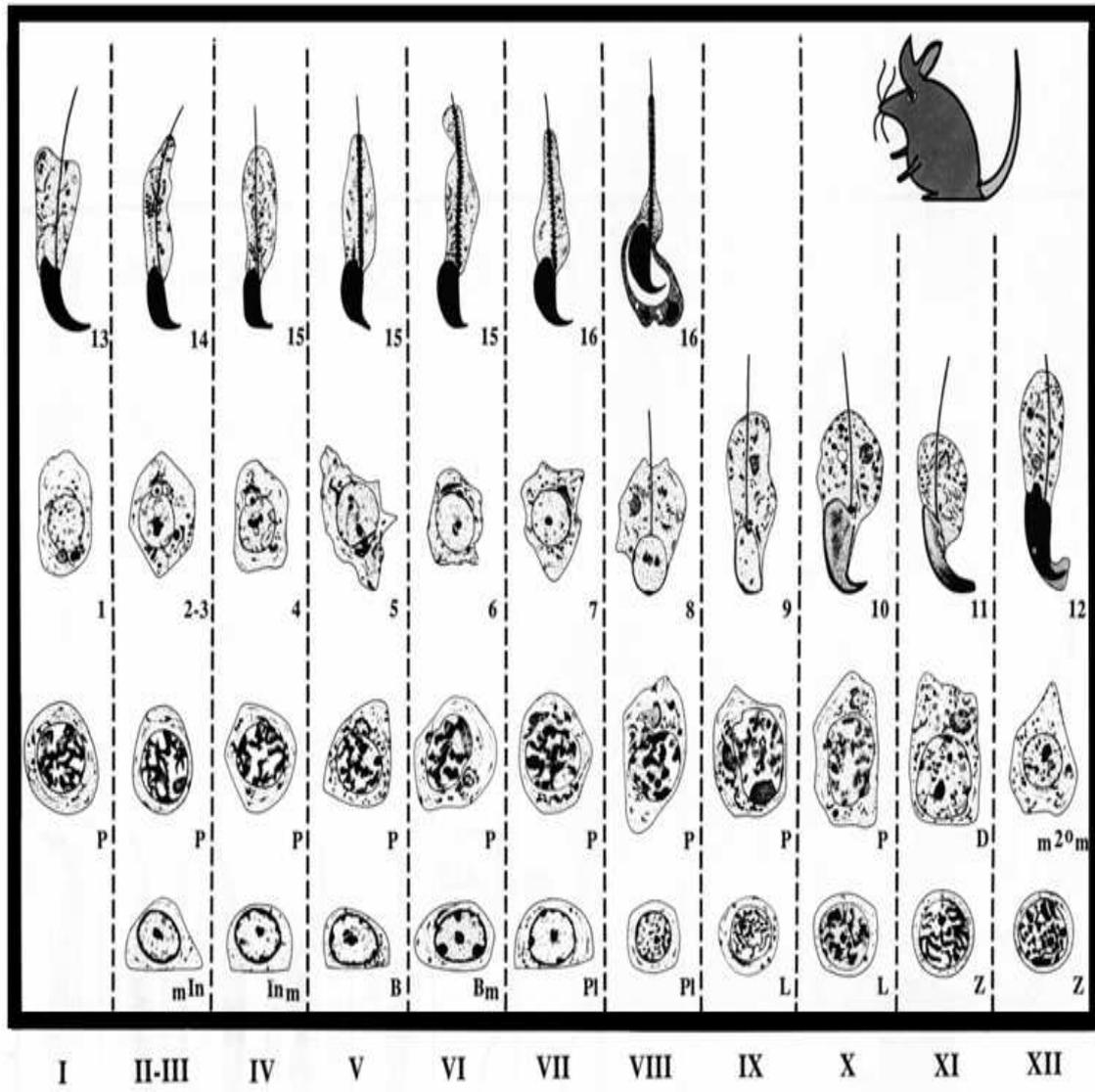


Figure 10. Stades de l'épithélium séminifère chez la souris (Russell et al., 1990).

Les spermatocytes pré leptotènes, leptotènes et zygotènes sont situés du côté basal du tube séminifère. Contrairement aux spermatogonies, ils sont moins excentrés et ne sont pas en contact avec la lame basale. Les autres spermatocytes forment la seconde couche qui se situe plus au centre du tube séminifère.

### 7.2.3.3. Cellules germinales associées à la spermiogenèse

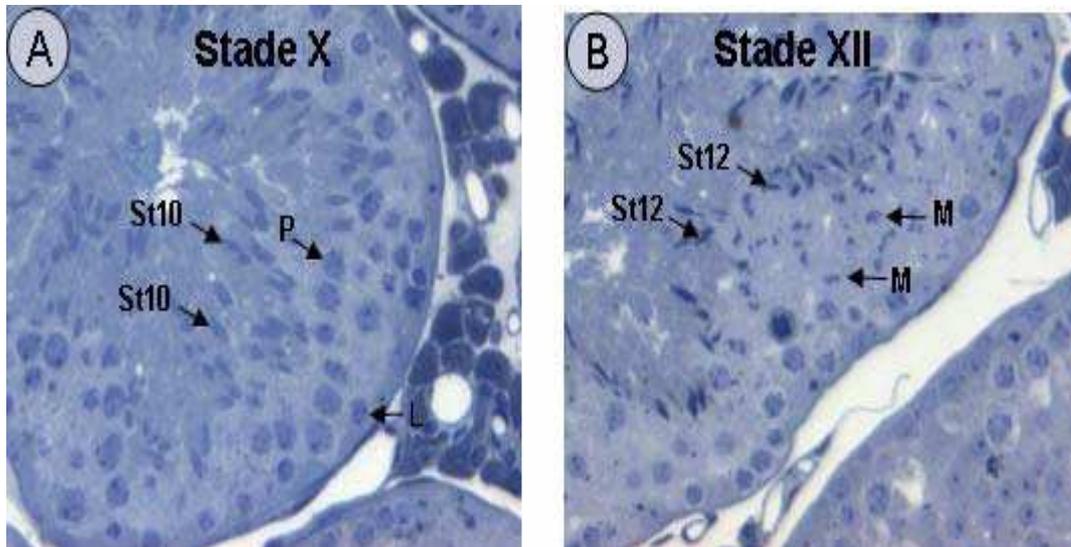
La spermiogenèse est divisée en 16 étapes. Chaque étape est associée à un aspect caractéristique de l'acrosome des spermatides. L'acrosome est une structure qui recouvre l'extrémité antérieure du spermatozoïde et qui produit des enzymes facilitant la pénétration dans l'ovocyte lors de la fécondation. Les spermatides associées aux étapes 1 à 8 sont rondes et toutes les autres spermatides (étapes 9 à 16) sont en voie d'élongation. Les spermatides apparaissent à tous les stades de l'épithélium séminifère.

A la fin de leur différenciation, les spermatides matures (ou spermatozoïdes) sont larguées dans la lumière du tube séminifère : c'est la spermiation.

Dans l'épithélium séminifère, les spermatides des étapes 1 à 12 forment la troisième couche de l'épithélium séminifère alors que les spermatides des étapes 13 à 16 forment la quatrième et dernière couche, à savoir la couche la moins excentrée.

Le même stade de l'épithélium séminifère occupe la totalité d'une section transversale du tube séminifère. Il est alors possible de distinguer les stades en fonction de l'état de différenciation des types cellulaires présents. Les spermatides peuvent être différenciées grâce à des colorations comme la coloration au bleu de toluidine ou la coloration de Schiff utilisant l'acide périodique. Ces méthodes colorent spécifiquement l'acrosome qui coiffe progressivement les spermatides en différenciation. Des exemples de coupes transversales de tubes séminifères sont donnés dans la figure 11.

La spermatogenèse est un processus cyclique (Dadoune et Démolin, 1991). Le temps nécessaire à la maturation des gamètes mâles, c'est-à-dire pour passer d'une spermatogonie de type A à un spermatozoïde (ou spermatide étape 16) correspond à la durée de la spermatogenèse. Elle est de 35 jours chez la souris. La durée d'un cycle de l'épithélium séminifère correspond au temps nécessaire à une cellule germinale pour devenir une cellule plus différenciée du même stade du cycle de l'épithélium séminifère. Cette durée est de 8,8 jours environ chez la souris (Kluin et de Rooij, 1981). Par conséquent, 8,8 jours sont



**Figure 11.** Coupes semi fines colorées au bleu de toluidine montrant des tubes séminifères au stade X (A) et au stade XII (B) du cycle de l'épithélium séminifère (Vernet, 2006).

L : spermatocyte leptotène ;

M : spermatocyte en métaphase ;

P : spermatocyte pachytène ;

St10 et St 12 : spermatides allongés aux étapes 10 et 12 respectivement.

nécessaires pour passer d'un spermatocyte zygotène (Z) du stade XII à un spermatocyte secondaire ou pour passer d'un spermatocyte diplotène (D) à une spermatide étape 11.

### 7.2.4. Initiation de la spermatogenèse

Nous venons de décrire la spermatogenèse telle qu'elle se déroule chez l'adulte. Nous nous intéressons ici à sa mise en place.

Durant la période fœtale, on assiste à une multiplication des cellules germinales primordiales qui se différencient en gonocytes (Vergouwen et al., 1991 ; Nagano et al., 2000).

Les gonocytes se multiplient constamment et sont localisés au centre du cordon séminifère qui est le précurseur du tube séminifère (dépourvu de lumière). A seize jours de vie in utero, la prolifération des gonocytes s'arrête en phase G1 du cycle cellulaire pendant environ quatre jours. A dix huit jours et demi du stade embryonnaire (durée de gestation de la souris : 20 jours), les gonocytes commencent à migrer en périphérie des cordons séminifères.

La figure 12 illustre les étapes essentielles de la première vague de la spermatogenèse. Un jour et demi après la naissance, la prolifération des gonocytes recommence, de plus, leur migration vers la périphérie du cordon séminifère, qui avait commencé à la fin du stade embryonnaire, se poursuit (Nagano et al., 2000).

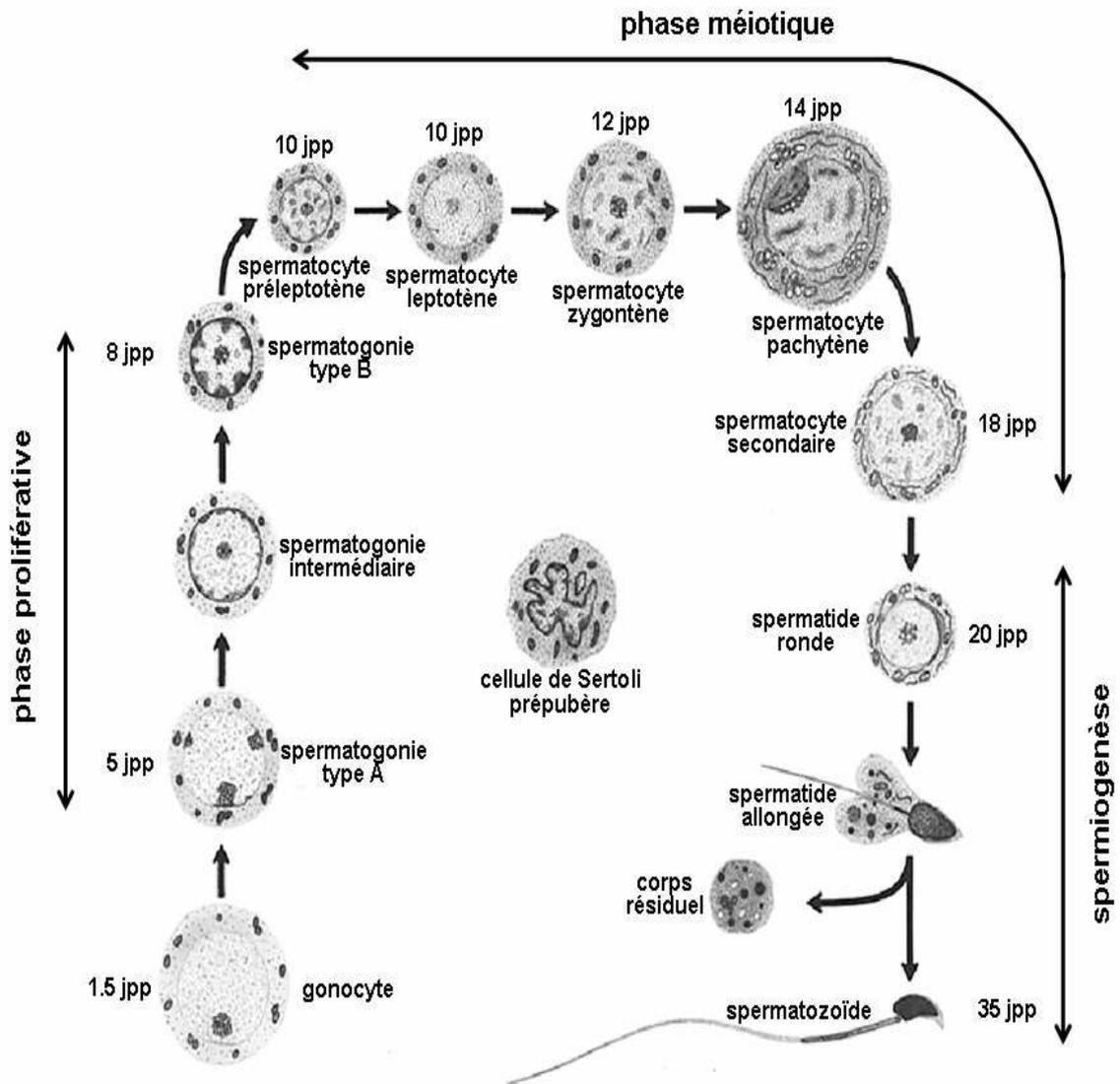
Cinq jours après la naissance, les gonocytes achèvent leur migration vers la membrane basale et commencent à se différencier en spermatogonies de type A. Si les gonocytes n'arrivent pas à se localiser vers la membrane basale vers l'âge de 10-13 jours, ils meurent par apoptose (Werner et Deluca, 2001).

La première vague de la spermatogenèse se déroule suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment pour l'adulte. L'initiation de la méiose s'effectue à l'âge de dix jours (Bellve et al., 1977). Enfin, les spermatozoïdes apparaissent pour la première fois dans la lumière du tube séminifère 35 jours après la naissance. C'est la fin de la première vague de la spermatogenèse, le testicule peut être considéré comme pubère.

### 7.2.5. Spermatogenèse chez les autres espèces

Le cycle de l'épithélium séminifère et les vagues de la spermatogenèse sont des éléments conservés chez les mammifères (Clermont, 1972 ; Thubault et Levasseur, 2001).

Cependant, les durées de ces deux phénomènes varient entre les espèces. Des exemples sont reportés dans le tableau 1.



**Figure 12.** Evolution chronologique de la première vague de la spermatogénèse.

(De Rooij, 2001).

(jpp) :jours post-partum.

**Tableau 1.** Durées du cycle de l'épithélium séminifère et de la spermatogenèse calculées par autoradiographie après incorporation de thymidine tritiée (Clermont, 1972 ;Thubault et Levasseur, 2001).

Espèces	Durée (jours)	
	cycle de l'épithélium séminifère	spermatogenèse
Verrat	8,6	34,1
Hamster	8,7	35
Souris	8,8	35
Bélier	10,4	49
Lapin	10,5	51,8
Rat	13,3	53,2
Taureau	13,5	54
Homme	16	74

Chez certaines espèces comme le rat *Bandicota indica*, la souris *Notomys alexis* ou même chez l'homme, l'organisation de l'épithélium séminifère est moins ordonnée que chez les autres mammifères (Clermont, 1963; Peirce et Breed, 1987; Russell et al., 1990; Worawittayawong et al., 2005). On peut alors observer de 2 à 4 associations cellulaires différentes dans plus de 10 % des sections de tubes séminifères. La figure 13 représente une section de tube séminifère d'un testicule humain avec trois associations cellulaires différentes (stades I, II et V).

### 7.3. Spermatozoïde

#### 7.3.1. Structure

Le spermatozoïde « normal » est difficile à définir (Auger et Eustache, 2000). Les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière du tube séminifère des testicules.

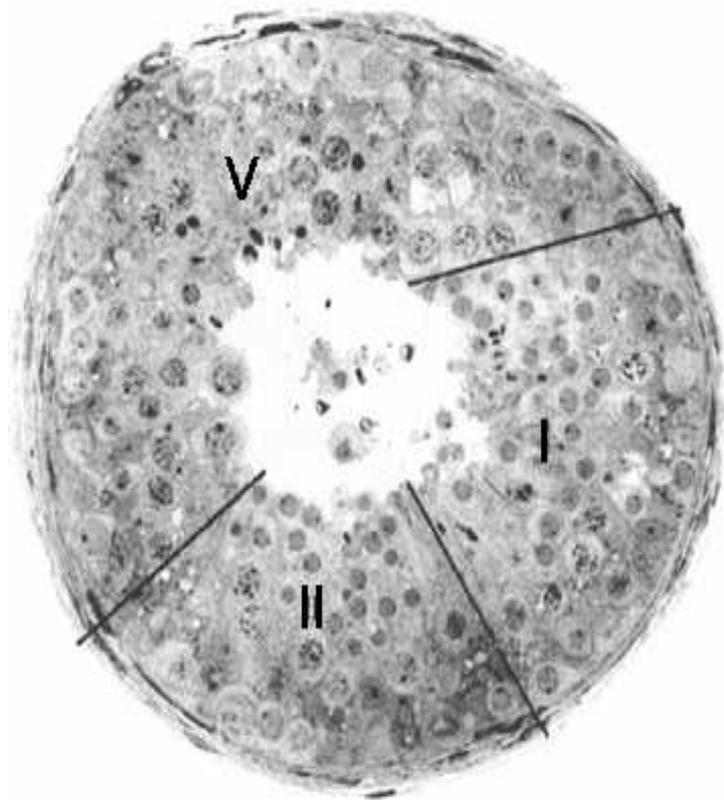
La tête du spermatozoïde normal mesure entre 2,5 et 3,5 $\mu$ m de largeur et 4 à 4,5 $\mu$ m de longueur (Katz et al., 1986). Les spermatozoïdes matures sont spécialisés pour atteindre l'ovocyte et y pénétrer. Ils sont constitués de trois parties (figure 13) :

- **La tête** : La tête du spermatozoïde se compose d'un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire, elle-même entourée d'une matrice protéique, la thèque périnucléaire. Arrimé à cette thèque, l'acrosome surmonte une partie du noyau. On nomme post-acrosome, la partie du noyau non recouverte par l'acrosome. La tête est enveloppée par la membrane plasmique (figure 14). L'acrosome renferme des enzymes (hyaluronidase) qui permettent la pénétration dans l'ovocyte.
- **La pièce intermédiaire** : contient de nombreuses mitochondries enroulées en spirale. C'est la centrale énergétique de spermatozoïde (Clermont et al., 1990 ; Brown et al., 2003).
- **La queue ou le flagelle** : assure la mobilité du spermatozoïde (Wargo et Smith, 2003 ; Turner, 2003).

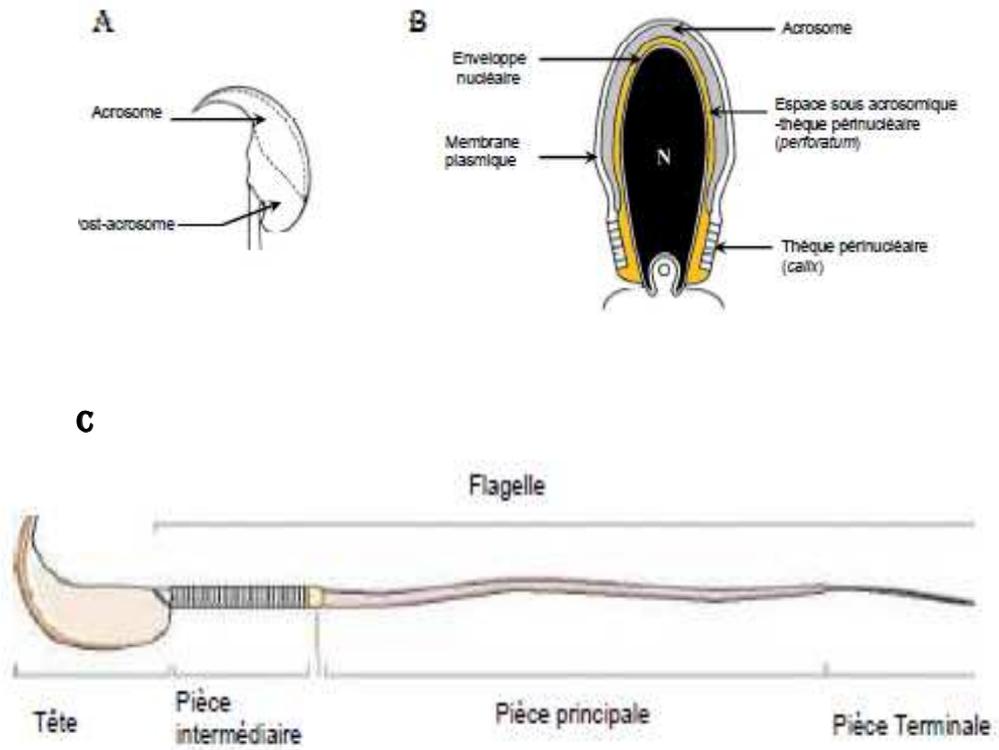
Le tableau 2 résume de façon comparative les tailles moyennes des différentes sections du spermatozoïde chez le taureau, le chien et l'homme.

#### 7.3.2. Morphologie des spermatozoïdes

L'appréciation des caractères morphologiques des spermatozoïdes est complexe du fait de la grande variabilité de la morphologie des spermatozoïdes humains (David et al., 1975).



**Figure 13.** Coupe transversale de tube séminifère humain adulte. Trois associations cellulaires sont présentes dans cette section de tube (stades I, II et V) (Russell et al., 1990).



**Figure 14.** Dessins d'un spermatozoïde de souris (Toshimori et Ito, 2003).

**A :** Dessin en vue externe

**B :** Dessin de coupe longitudinale de la tête

**C :** Dessin d'un spermatozoïde de souris

**Tableau 2.** Comparaison de la taille moyenne des spermatozoïdes chez le taureau, le chien, et l'homme (Marshall, 1990).

<b>Espèces</b>	<b>Longueur de la tête (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Longueur de la pièce intermédiaire (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Longueur totale (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Taureau</b>	<b>6,8</b>	<b>9,8</b>	<b>53,5</b>
<b>Chien</b>	<b>5,6</b>	<b>-</b>	<b>55,3</b>
<b>Homme</b>	<b>6,1</b>	<b>4,7</b>	<b>58,4</b>

Il est maintenant établi que le pourcentage des spermatozoïdes normaux et de certaines anomalies spécifiques des spermatozoïdes ont une bonne valeur pronostique in vivo et in vitro (Auger et Eustache, 2000).

La classification des anomalies utilisée aux laboratoires de spermiologie est la classification de David modifiée (Davis et Katz, 1993 ; Davis et al., 1995 ; Auger et Eustache, 2000).

La classification de David a été proposée en 1972 et publiée en 1975 décrit treize classes d'anomalies de spermatozoïdes (tableau 3).

Les principales anomalies des spermatozoïdes définies selon la classification de David, les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

### **7.4. Testostérone**

La testostérone est une hormone sexuelle mâle sécrétée par les cellules de Leydig ou les cellules interstitielles des testicules chez l'homme et par les thèques du follicule et les cellules interstitielles des ovaires chez la femme (figure 15 et 16).

La sécrétion de la testostérone est régulée par un rétrocontrôle négatif sur l'hormone lutéinisante (LH), synthétisée par l'hypophyse.

La testostérone est en majeure partie liée aux protéines. Chez l'homme, 98% de la testostérone circulante est liée, cette valeur est légèrement plus faible chez la femme. Cette hormone stéroïdienne est en majorité liée à une protéine de liaison spécifique parfois appelée « Sex Hormone Binding Globulin » (SHBG) ou « Testosterone Binding Globulin » (TeBG), ainsi que l'albumine sérique (Dunn et al., 1981).

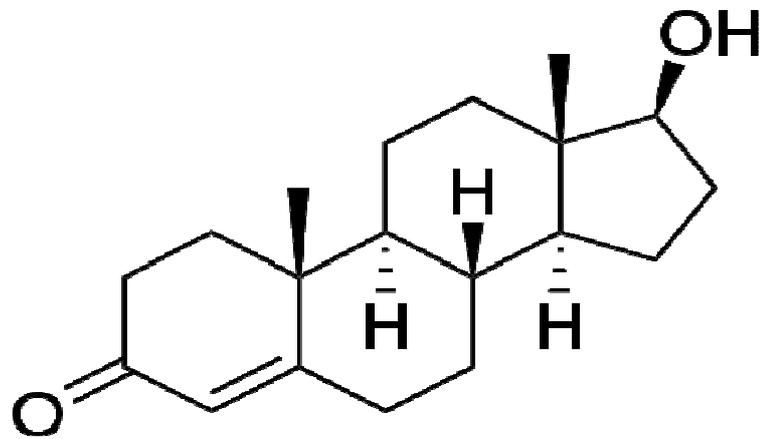
Le dosage des concentrations de la testostérone est utilisé cliniquement pour le diagnostic différentiel des troubles endocriniens.

Chez l'homme, ces troubles comprennent l'hypogonadisme, l'insuffisance testiculaire et l'infertilité...

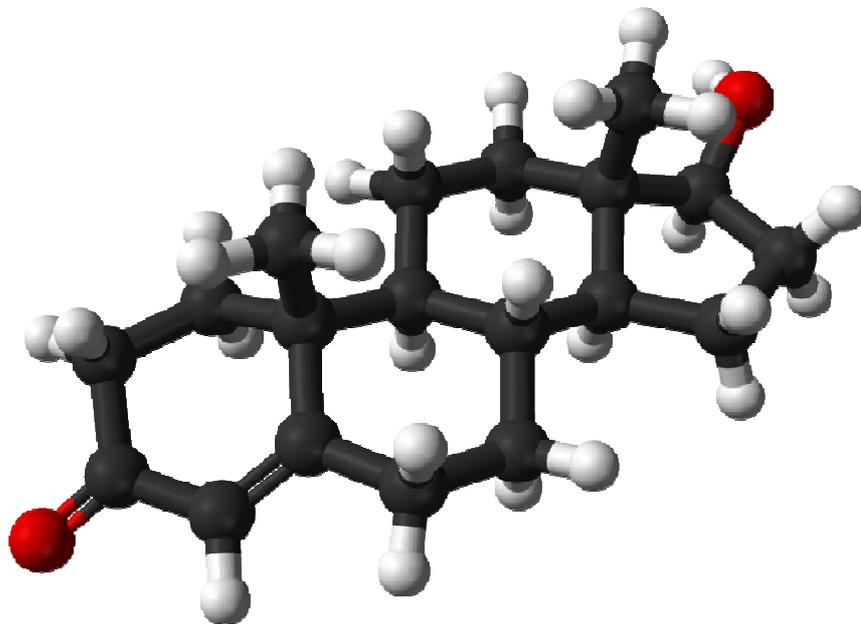
La testostérone agit à différents niveaux. Tout d'abord, elle joue un rôle important dans le développement des organes reproducteur mâles comme les vésicules séminales, la prostate ou le pénis. Ensuite, elle active le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires.

**Tableau 3.** Evolution des critères de classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes utilisés dans la classification de David et la classification de David modifiée (David, 1975).

	<b>Classification de David 1975</b>	<b>Classification de David modifiée 1990</b>
<b>Anomalies de la tête</b>	Allongée Amincie Microcéphale Macrocéphale Irrégulière Dupliquée En lyse	Allongée Amincie Microcéphale Macrocéphale Multiples Acrosome anormal Base anormale
<b>Anomalies de la pièce intermédiaire</b>	Restes cytoplasmiques Angulation	Restes cytoplasmiques Angulée Grêle
<b>Anomalies du flagelle</b>	Absent Court Enroulé Double	Absent Encourté Calibre irrégulier Enroulé Multiple



**Figure 15.** Structure chimique de la testostérone (Chatenet, 2008).



**Figure 16.** Structure spatiale de la testostérone (Chatenet, 2008).

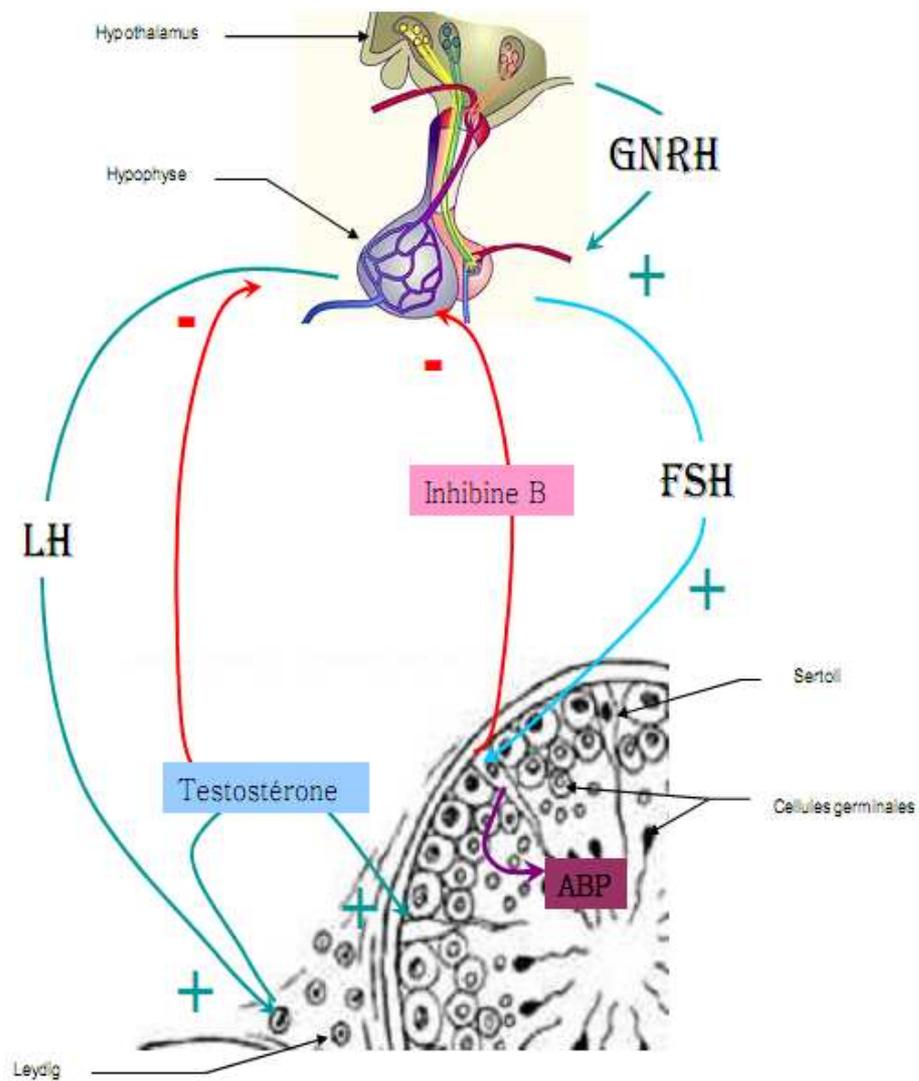
Par exemple, elle stimule la fonction des glandes sébacées et sudoripares et influe sur les comportements sexuels. Enfin, elle agit sur la spermatogenèse au travers de son rôle dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.

### **7.5. Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique**

La sécrétion pulsatile de gonadolibérine (Gn-RH) par l'hypothalamus stimule la production et la sécrétion des gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (LH) et de la folliculostimuline (FSH) par l'hypophyse (Hammoud et al., 1997). Les gonadotrophines circulent dans le sang pour atteindre le testicule. La LH stimule la sécrétion de testostérone et d'œstradiol par les cellules interstitielles de Leydig (Nilsson et al., 1986 ; Zhang et al., 2004).

Les tubes séminifères sont entourés de concentrations très élevées de testostérone nécessaires à la spermatogenèse. La testostérone circulante induit la puberté et la virilisation, et elle exerce un rétrocontrôle inhibiteur de la sécrétion de LHRH et LH (Bridges et al., 1993; Dohle et al., 2003) après aromatisation et 5- $\alpha$  réduction au niveau hypothalamo-hypophysaire (Santen, 1975 ; Winters et Troen., 1986). La FSH se lie aux cellules de Sertoli, stimule la production et la sécrétion d'enzymes et de substances qui assurent le soutien de la spermatogenèse (Verhoeven, 1992 ; Gendt et al., 2004 ; Abel et al., 2009) (figure 17).

Selon l'intensité de la spermatogenèse, les cellules de Sertoli sécrètent l'inhibine B dans le sang (Anderson et Sharpe, 2000), qui exerce un rétrocontrôle inhibiteur de la sécrétion de FSH par l'hypophyse (Ying, 1988 ; Hancock et al., 1992 ; Tilbrook et Clarke, 2001 ; Dohle et al., 2003). Une spermatogenèse optimale dépend du fonctionnement adéquat de tous les aspects de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testiculaire, mais peut être dérégulée par de nombreux facteurs internes et externes (Mahmoud et al., 1998 ; Pierik et al., 2003).



**Figure 17.** Axe hypothalamo-hypophyse- testicule et régulation de la fonction testiculaire (Christiansen et al., 2002).

## 1. Animaux et conditions d'élevage

Dans ce travail, toutes nos expériences sont menées sur la souris Swiss, une souche largement utilisée en toxicologie expérimental. Ces animaux proviennent de souches parentales fournies par l'Institut Pasteur d'Alger. Ils sont mis en reproduction et élevés dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire (LPNSA). Les mâles et les femelles vivent séparément, par groupe de sujets, dans des cages conventionnelles dotées d'une mangeoire et d'un biberon. La température est ajustée à 20°C.

Les souris sont nourries *ad libitum* durant toute la période de gestation et de lactation avec un aliment standard pour rongeurs sous forme de granulés fournis par la SARL La Production Locale de Bouzeréah (tableau 4) et boivent de l'eau. Dès l'âge de trois semaines, les nouveaux nés sont sevrés et triés selon le sexe pour constituer les différents groupes expérimentaux.

## 2. Produits et réactifs

### 2.1. Lait utilisée

Le lait de soja « BIOMIL<sup>®</sup> SOY » en poudre, provient de cher FASSKA (Belgique) (figure18).

BIOMIL<sup>®</sup> SOY est une formule infantile complète à base de protéines de soja enrichie en L-méthionine, L-carnithine et taurine. Elle est recommandée en cas d'allergie aux protéines du lait de vache ou d'intolérance au lactose. C'est un aliment complet, exempt de lait bovin, sans lactose, sans saccharose et exempt du gluten (tableau 5).

### 2.2. Préparation du lait de soja

La préparation du lait de soja à partir de la poudre BIOMIL SOY s'effectue en respectant les mesures indiquées sur la boîte destinée aux nourrissons (tableau 6).

Dans notre expérimentation, on prend 7 mesurette de poudre qui seront diluées dans 210ml d'eau.



**Figure 18.** Boite du lait de soja BIOMIL<sup>®</sup> SOY.

**Tableau 4.** Composition de l'aliment pour rongeurs.

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Mais	45%
Son	37%
Soja	15%
Phosphate dicalcique	0,5%
Carbonate de calcium	2,5%
Concentré minéral vitaminique	0,25%

**Tableau 5.** Tableau d'alimentation (BIOMIL<sup>®</sup> SOY).

<b>Age</b>	<b>Eau en ml</b>	<b>Mesurettes de BIOMIL SOY</b>
Naissance	60	2
1-2 semaines	90	3
3-4 semaines	120	4
2-3 mois	150	5
4 mois	180	6
5 mois	210	7
6 mois	210	7
7 mois et plus	240	8

Tableau 6. Composition du lait de soja BIOMIL SOY.

Composition moyenne	Unité	Par 100g de poudre	Par 100ml (13.5%)
<b><i>ENERGIE</i></b>	<b>Kcal</b>	<b>502</b>	<b>67.8</b>
	<b>KJ</b>	<b>2101</b>	<b>283.6</b>
<b>Protéines</b>	<b>G</b>	<b>15.1</b>	<b>2</b>
<b>Lipides</b>	<b>G</b>	<b>24.1</b>	<b>3.3</b>
<b>Acide linoléique</b>	<b>G</b>	<b>4.6</b>	<b>0.6</b>
<b>Acide <math>\alpha</math>-linoléique</b>	<b>G</b>	<b>0.57</b>	<b>0.08</b>
<b>Glucides</b>	<b>G</b>	<b>55.1</b>	<b>7.4</b>
<b>Humidité</b>	<b>G</b>	<b>2.4</b>	<b>0.4</b>
<b><i>MINERAUX (cendres)</i></b>			
<b>Sodium</b>	<b>Mg</b>	<b>148</b>	<b>20</b>
<b>Potassium</b>	<b>Mg</b>	<b>629</b>	<b>84.9</b>
<b>Calcium</b>	<b>Mg</b>	<b>570</b>	<b>77</b>
<b>Phosphore</b>	<b>Mg</b>	<b>333</b>	<b>45</b>
<b>Chlore</b>	<b>Mg</b>	<b>419</b>	<b>56.6</b>
<b>Magnésium</b>	<b>Mg</b>	<b>58</b>	<b>7.8</b>
<b>Fer</b>	<b>Mg</b>	<b>9.4</b>	<b>1.3</b>
<b>Zinc</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>6.3</b>	<b>0.9</b>
<b>Cuivre</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>393</b>	<b>53</b>
<b>Manganèse</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>296</b>	<b>40</b>
<b>Iode</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>79</b>	<b>10.7</b>
<b>Sélénium</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>12</b>	<b>1.6</b>
<b><i>VITAMINES</i></b>			
<b>A</b>	<b>UI</b>	<b>1572</b>	<b>212.2</b>
<b>D</b>	<b>UI</b>	<b>314</b>	<b>42.3</b>
<b>E</b>	<b>UI</b>	<b>10.5</b>	<b>1.4</b>
<b>K</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>42</b>	<b>5.7</b>
<b>B1</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>419</b>	<b>56.6</b>
<b>B2</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>471</b>	<b>63.6</b>
<b>Niacine</b>	<b>Mg</b>	<b>5.24</b>	<b>0.7</b>
<b>B6</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>314</b>	<b>42.4</b>
<b>Acide folique</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>83.8</b>	<b>11.3</b>
<b>B12</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>1.6</b>	<b>0.2</b>
<b>Biotine</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>15.7</b>	<b>2.1</b>
<b>Acide panthénique</b>	<b><math>\mu</math>g</b>	<b>2.62</b>	<b>0.4</b>
<b>C</b>	<b>Mg</b>	<b>63</b>	<b>8.5</b>
<b>Taurine</b>	<b>Mg</b>	<b>52</b>	<b>7</b>
<b>L-carnitine</b>	<b>Mg</b>	<b>15</b>	<b>2</b>
<b>Choline</b>	<b>Mg</b>	<b>59</b>	<b>8</b>
<b>Inositol</b>	<b>Mg</b>	<b>26</b>	<b>3.5</b>
<b>L-méthionine</b>	<b>Mg</b>	<b>124</b>	<b>16.7</b>

## **2.3. Etude de la toxicité du lait de soja**

### **2.3.1 Test de toxicité par le lait de soja**

Cette expérience permet d'évaluer la toxicité du lait de soja ingéré de façon répétée par voie orale. L'essai est effectué tout en respectant scrupuleusement l'indication et les doses administrées dans la boîte du lait infantile.

Pour les différentes techniques de numération, nous avons utilisé le bleu de méthylène qui est un produit Merck (Allemagne), le bleu de trypan ; un produit Biochem (UK), et violet de gentiane ; un produit Fluka (Allemagne). Pour l'étude histologique, les colorants utilisés sont l'Hématoxyline et l'éosine. Ces produits proviennent de chez Merck (Allemagne).

Les kits utilisés pour les dosages biochimiques de l'albumine et transaminases (TGO, TGP) proviennent de chez ELITHEC (France). Les dosages de l'urée, de l'acide urique, créatinine et cholestérol total sont réalisés à l'aide de kits fournis par Biosystems.

Le chlorure de sodium, l'acide acétique glacial, le phosphate de potassium, le formol, l'acétone, le toluène et l'éthanol sont des produits Prolabo (France). Le carbonate de lithium est le produit BDH (UK) et la paraffine, sous forme de pastille est un produit Merck (Allemagne). Le triton X-100 est un produit Sigma (USA).

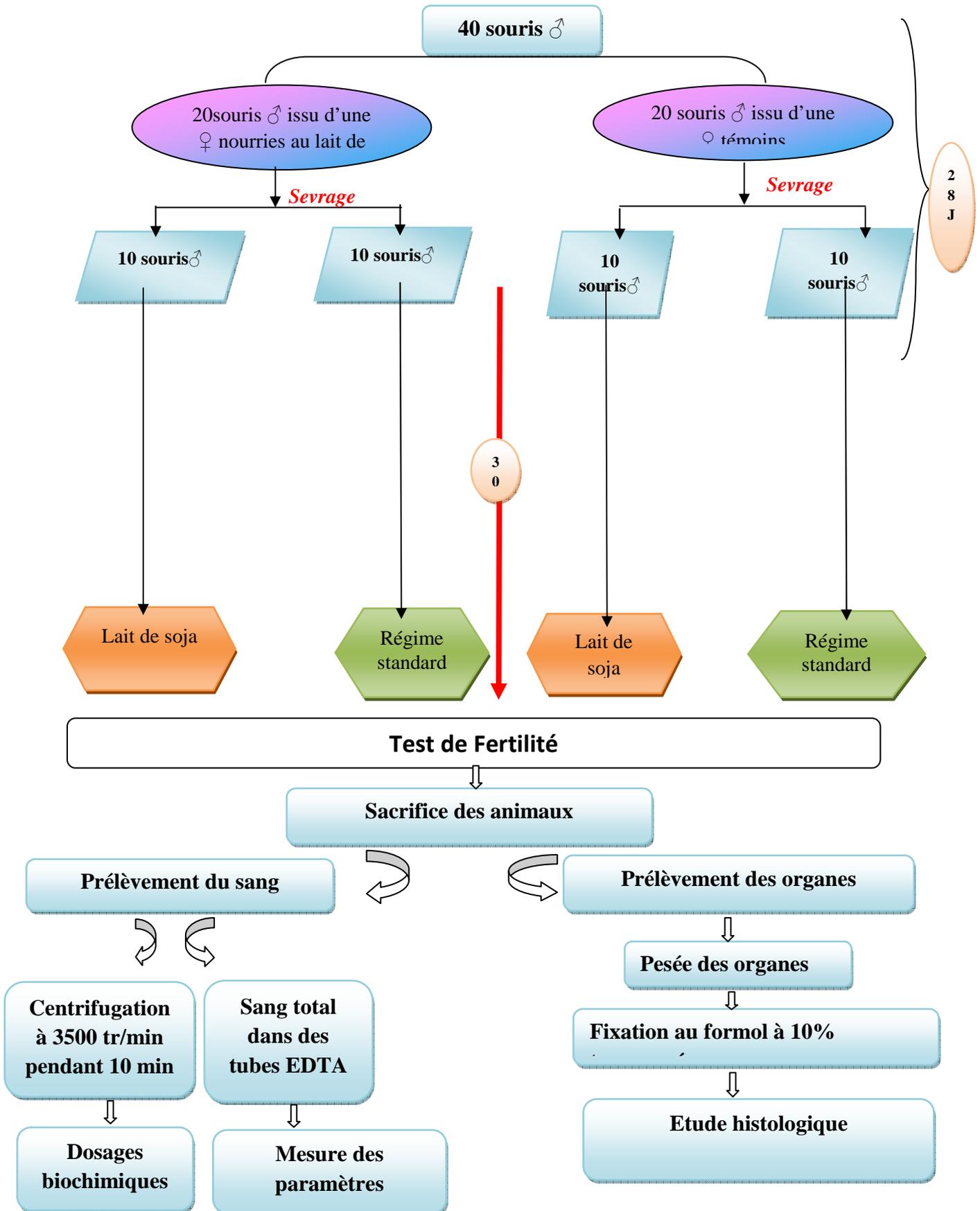
## **3. Protocole expérimental**

Dans notre étude nous avons utilisé 40 souris mâles âgées de 4 semaines et pesant en moyenne ( $13,93 \pm 0,50$ ) g. Ces animaux sont répartis en 4 groupes de 10 souris (figure 19).

Les souris du groupe 1 font partie d'une portée dont la mère reçoit du lait de soja dès la mise bas jusqu'au sevrage. Après le sevrage, les souris de ce groupe reçoivent à leur tour que du lait de soja pendant 30 jours.

Le groupe 2 est constitué d'animaux issus d'une mère nourrie au lait de soja pendant l'allaitement et reçoivent, après le sevrage, un aliment standard et de l'eau pendant 30 jours. Le groupe 3 comprend des souris issues d'une mère qui a consommé un aliment standard durant la période d'allaitement et reçoivent, après le sevrage, du lait de soja pendant 30 jours. Les animaux du groupe 4 constituent les témoins. Ces souris sont issues d'une mère qui a consommé de l'aliment standard et qui reçoivent le même régime après le sevrage.

Après 8 semaines d'expérimentation, les souris mâles sont soumises au test de fertilité.



**Figure 19.** Schéma représentant le déroulement du protocole expérimental de la toxicité de lait de soja.

### 3.1. Suivi et observations des animaux

Le suivi quotidien des animaux durant la période expérimentale consiste à :

- Tenir un état descriptif des transformations morphologiques observées : perte des poils, coloration des urines, aspect et consistance des matières fécales, pigmentation des membres de l'animal et comportementales : stress, anorexie, boulimie, mobilité des animaux.
- Mesurer le volume de lait de soja consommé (ml) et la quantité d'aliment ingéré (g).
- Mesurer une fois par semaine le poids corporel afin de suivre et d'établir la cinétique de l'évolution pondérale des animaux.
- Enregistrer les cas de mortalité.

### 3.2. Test de fertilité

Après 8 semaines d'expérimentations, et pendant une semaine, les animaux sont soumis à un test de fertilité, et sur les souris issues du test de fertilité ont déterminé le poids et la taille des petits au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jour après leur naissance.

### 3.3. Obtention des échantillons

#### 3.3.1. Prélèvement du sang

Après le test de fertilité, les animaux sont mis à jeun la veille de leur sacrifice. Un prélèvement sanguin est effectué par capillarité à l'aide d'une pipette Pasteur au niveau du sinus rétro orbital. Le volume de sang recueilli est divisé en deux parties. Une partie est mise dans des tubes à EDTA pour des analyses hématologiques ; l'autre partie est mise dans des tubes secs qui sont ensuite centrifugés à 3500 tr/min à 4 C° pendant 10 minutes. Le sérum récupéré est congelé à -20 C° jusqu'à utilisation pour les dosages ultérieurs biochimiques.

#### 3.3.2. Prélèvement des organes

Après le prélèvement du sang, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale suivi d'un examen macroscopique de tous les organes après une laparotomie. Puis rapidement et dans l'ordre, pour déterminer le poids absolu et relatif des organes, les reins, le foie, les testicules, les épидидymes et les vésicules séminales sont prélevés et pesés puis fixés au formol à 10% tamponné pour les examens histologiques.

### 3.4. Analyses biologiques

#### 3.4.1 Examen hématologique

L'analyse des paramètres hématologiques permet de vérifier l'existence d'une atteinte de la moelle osseuse suite à la consommation chronique de lait de soja.

La formule de numération sanguine (FNS) est réalisée sur le sang prélevé dans les tubes à EDTA. Elle permet de compter les différents éléments figurés du sang (globules rouges, plaquettes et globules blancs) dont le but de déterminer la valeur de l'hématocrite, la numération des globules rouges et blancs contenus dans  $1\text{mm}^3$  de sang.

Le comptage est réalisé sous microscope en utilisant une cellule de numération dotée carrés.

##### 3.4.1.1. Cellule de Malassez

La cellule de Malassez est une lame de verre spéciale comportant 2 rigoles qui délimitent une surface plane. Au centre de cette surface plane est tracé un quadrillage délimitant 100 carrés ; Elle mesure 2,5 mm sur 2 mm sur 0,2 mm. Elle délimite donc un volume de  $1\text{mm}^3$  (figure 20).

##### 3.4.1.2. Mise en hématimètre

Faire adhérer parfaitement la lamelle sur les plates-formes latérales en les humectant légèrement. Homogénéiser l'unopette. Rejeter les premières gouttes. Appliquer l'extrémité de la micropipette légèrement inclinée sur la plate-forme centrale près de la lamelle ; remplir par capillarité la chambre de l'hématimètre placé sur une surface horizontale. Le remplissage doit être rapide, réalisé en une seule fois, sans débordements dans les rigoles et sans bulles d'air. Laisser l'hématimètre bien horizontal pendant la sédimentation.

Pour réaliser le remplissage de la cellule, il faut :

- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle.
- Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouses".
- Placer l'extrémité de la pipette sur la partie 2 contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles (figure 21).

##### 3.4.1.3. Principe de comptage

La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont longueur = 0,25 mm Largeur = 0,20 mm, profondeur = 0,20 mm, le volume total de la cellule est de  $1\text{mm}^3$  ( $2,5 \times 2 \times 0,20$ ).

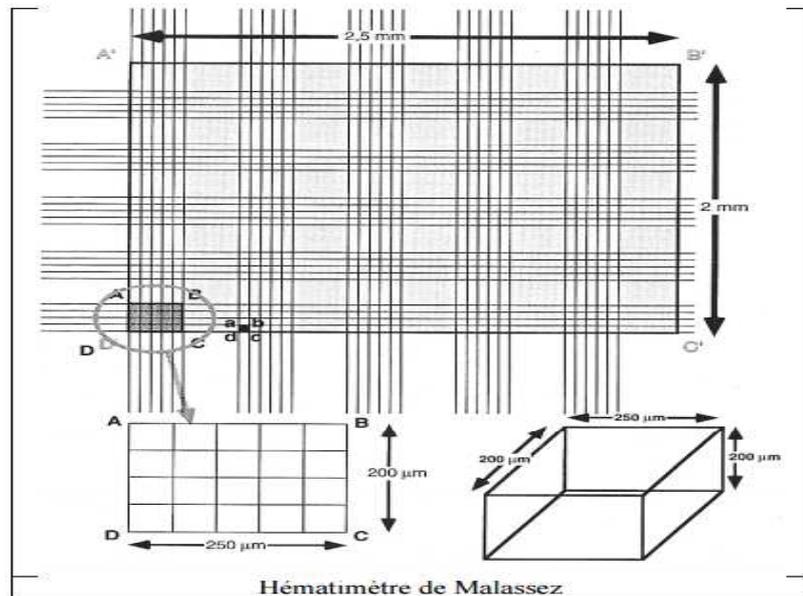


Figure 20 : Hématimètre de Malassez

**Mode opératoire**

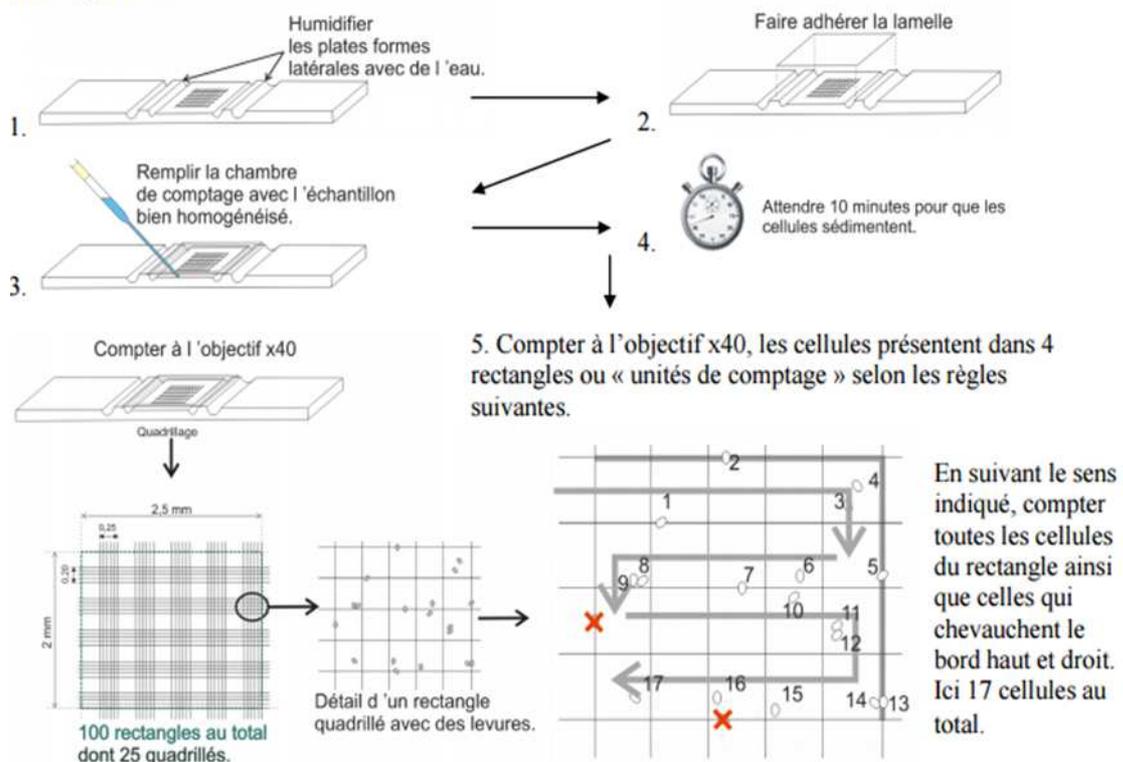


Figure 21 : Mode opératoire

-Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales de 0,25 mm de large et de 10 bandes horizontales de 0,20 mm de large formant ainsi 100 rectangles, on ne comptera les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule.

-On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle, arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les côtés droits et inférieurs.

-On fait ensuite la somme des cellules observées dans chaque rectangle, on divise ce nombre par 10 (nombre de rectangles comptés), on obtient ainsi le nombre de cellules par rectangle, il suffit de multiplier le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par  $\text{mm}^3$ .

On utilise une cellule de Malassez, et pour la numération des hématies, on effectue une dilution au 1/200 dans du liquide de Marcano (tableau 7).

Pour la numération des leucocytes et des plaquettes, on utilise une dilution au 1/20 dans du liquide de Lazarus qui lyse les érythrocytes et laisse les leucocytes (tableau 8).

### a. Numération des leucocytes (globules blanc)

La numération des leucocytes est effectuée au microscope optique après une dilution du sang dans le liquide de Lazarus qui lyse les érythrocytes et laisse les leucocytes intacts ( tableau 8). Le bleu de méthylène est censé colorer les noyaux des leucocytes. En fait la coloration de la solution à l'avantage de la différencier du liquide de marcano. la méthode est réalisée comme suit :

- Bien agiter le flacon de sang.
- La dilution se fait dans la pipette qui est au 1/20 (380 $\mu\text{l}$  de Lazarus +20 $\mu\text{l}$  de sang).
- Homogénéiser le contenu de la pipette de la même manière que pour les GR.
- Laisser reposer 2 à 3 minutes pour permettre aux globules de se déposer.
- Compter le nombre de GB présent dans 4 bandes (l'écart ne doit pas dépasser 10 éléments).
- Le nombre de leucocytes par millimètre cube est calculé selon la relation :

$$\text{GB}/\text{mm}^3 = N/4 \times 20 \times 10$$

N : le nombre compté dans les 4 bandes.

20 : le coefficient de dilution.

10 : le nombre de bandes dans l'hématimètre.

**Tableau 7.** Composition du liquide Mercano.

<b>Produit</b>	<b>Quantité</b>
sulfate de Na cristallisé	5g
Formol	1ml
Eau distillée	100ml
-Ou le soluté physiologique	0,85g /dl

**Tableau 8.** Composition du liquide de lazarus.

<b>Produit</b>	<b>Quantité</b>
Bleu de méthylène	0,25g
Acide acétique	5 ml
Eau distillé	100 ml

**b. Numération des érythrocytes (globules rouges)**

La numération des érythrocytes est effectuée au microscope optique après avoir dilué le sang dans le liquide de Mercano (tableau 7). La méthode est réalisée comme suit :

-Bien agiter le flacon de sang.

-Aspirer le sang jusqu'au repère 2 de la pipette de Potain.

-Essuyer l'extérieur de la pipette avec un papier buvard en faisant bien attention à ne pas absorber le volume sanguin à l'intérieur de la pipette avec le buvard.

-Aspirer le liquide de dilution jusqu'au repère 101, en position verticale (pour éviter la formation de bulles d'air et de ne pas passer le repère 101), on obtient une dilution au 1/200.

- Enlever le tubule de caoutchouc et bloquer la pipette entre le pouce et l'index.

-Homogénéiser, en agitant fortement en position horizontale.

-Appliquer la lamelle sur l'hématimètre.

-Rejeter les 3 à 5 premières gouttes (ne contenant que le diluant), appliquer légèrement la pipette entre l'hématimètre et la lamelle, puis soulever légèrement l'index qui bouche l'extrémité supérieure de la pipette de manière à laisser couler le mélange lentement sous la lamelle qui se remplit par capillarité.

-Laisser reposer 2à3 mn pour permettre aux globules de se déposer.

-Vérifier au faible grossissement (10x) la répartition homogène des globules, sinon recommencer.

-A l'objectif 40x, faire la numération des GR dans 4 rectangles quadrillés (l'écart entre eux ne doit pas dépasser 20 éléments). Pour le calcul du nombre des érythrocytes par millimètres cube selon la relation suivante :

$$\text{GR par mm}^3 = N/4 \times 200 \times 100$$

N=le nombre d'éléments compté dans les 4 rectangles.

100=Le nombre de rectangles de l'hématimètre.

200=Le coefficient de dilution.

Exemple : Rectangle 1 :198 Rectangle 2 :202 Rectangle3 :216 Rectangle 4 :196 N=812

$$N/4 = 203 \times 200 \times 100 = 4.060.000/\text{mm}^3$$

### 3.4.2. Dosages biochimiques sériques

Les dosages biochimiques permettent d'explorer la fonction hépatique et rénale, ils sont effectués sur du sérum préalablement congelé à  $-20\text{ C}^\circ$ .

#### 3.4.2.1. Dosage de l'albumine

Le dosage de l'albumine est réalisé par la méthode colorimétrique enzymatique (KIT-ELITECH-CE) (Tietz, 1995). Le vert de bromocrésol (BCG) se fixe sélectivement sur l'albumine en donnant une coloration bleue.

L'absorption de ce complexe est proportionnelle à la concentration de l'albumine de l'échantillon.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda=628\text{ nm}$ .

La concentration de l'albumine dans le sérum est calculée par la formule suivante :

$$\text{Albumine} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 50 \text{ (mg/dl)}$$

#### 3.4.2.2 Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total est réalisé par la méthode colorimétrique enzymatique (Kit - biosystems) (Tietz, 1995). La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda, = 500\text{ nm}$ . La concentration du cholestérol total dans le sérum est calculée par la formule suivante :

$$\text{Cholestérol Total} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 5,18 \text{ (mmol/l)}$$

#### 3.4.2.3. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée est effectué selon la méthode de Bertholot Enzymatique colorimétrique modifiée (Kit - biosystems). Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm.

La concentration de l'urée dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\text{Urée} = 0,50 \times \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \quad (\text{g/l})$$

#### **3.4.2.4. Dosage de la créatinine**

Le dosage de la créatinine est effectué par une méthode cinétique colorimétrique enzymatique sans déprotéinisation (Kit - Biosystems) (Henry, 1984). La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda = 500$  nm. La concentration de la créatinine dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\text{Créatinine} = 177 \times \frac{\Delta \text{DO échantillon}}{\Delta \text{DO étalon}} \quad (\mu\text{mol/l})$$

#### **3.4.2.5. Dosage de l'acide urique**

Le dosage de l'acide urique est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique Uricase-PAP (Kit - Biosystems) (Barham et Trinder, 1972).

L'acide urique est converti par l'uricase en allantoiné et peroxyde d'hydrogène qui oxyde l'acide 3,5-dichloro-2-hydrobenzènesulfonique et la 4-aminophénazone sous l'action catalytique de la peroxydase, pour former un composé rouge-violacé de la quinone.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda = 520$  nm.

La concentration de l'acide urique dans le sérum est calculée à l'aide de la formule suivante :

**DO échantillon**

$$\text{Acide urique} = 357 \times \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} (\mu\text{mol /l})$$

**DO étalon**

**3.4.3. Analyses enzymatiques**

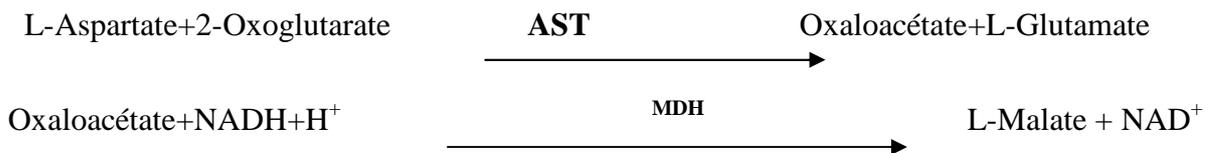
Les dosages enzymatiques permettent de vérifier l'existence d'une atteinte hépatique, leur augmentation dans le sérum est un signe d'hépatotoxicité.

**3.4.3.1. Dosage des transaminases**

**a. Dosage de la glutamate-oxaloacetate-transaminase (TGO)**

Le dosage de la TGO est effectué par une méthode de Kit (BIOLABO) basée sur le principe suivant :

Détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)



**MDH** : Malate déshydrogénase

La lecture de la densité optique DO se fait à une longueur d'onde  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .

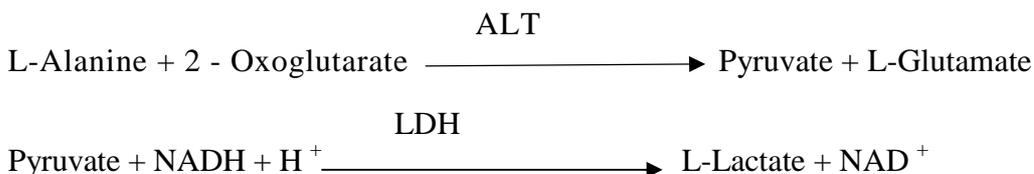
La concentration de la TGO dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\text{TGO} = 1746 \times \Delta \text{DO échantillon} / \text{Minute} \quad (\text{U/L})$$

**b. Dosage de la glutamate-pyruvate-transaminase (TGP)**

Le dosage de la TGP est également effectué par une méthode de Kit (ELITECCH-CE Diagnostics) selon le principe suivant. :

Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT):



**LDH** : Lactate déshydrogénase.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde  $\lambda = 340$  nm.

La concentration de la TGP dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\text{TGP} = 1746 \times \Delta \text{DO échantillon} / \text{Minute} \quad (\text{U/L})$$

### **3.5. Etude histologique**

Cette étude a pour but de vérifier l'existence de modification dans la structure histologique des organes des souris.

Les coupes histologiques sont effectuées sur le foie et les reins chez les males des animaux expérimentaux et témoins.

#### **3.5.1. Traitement des fragments de tissus**

##### **3.5.1.1. Fixation**

Toutes les tissus sont fixés dans du formol tamponné à 10% ensuite dans du formol dilué au 1/10<sup>ème</sup> pendant 30 minutes.

##### **3.5.1.2. Déshydratation**

Après fixation, les tissus sont déshydratés dans 3 bains successifs d'acétone à température ambiante. Chaque bain dure 45 minutes.

##### **3.5.1.3. Clarification**

Cette opération s'effectue après la déshydratation. Les pièces sont placées dans deux bains successifs de toluène à 45 minutes.

##### **3.5.1.4. Inclusion**

L'inclusion est effectuée avec la paraffine, les échantillons sont placés dans deux bains successifs de paraffine pendant une heure chacun dans l'étuve à 56°C puis coulés dans des moules en plastique à température ambiante.

#### **3.5.2. Traitement des lames**

Après inclusion à la paraffine, les blocs contenant le fragment sont coupés à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 4  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.2.1. Etalement des lames

Une fois les coupes terminées, elles sont mises sur une lame de verre recouvertes de colle (2 g d'albumine + 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée) puis placées sur une plaque chauffante réglée à une température convenable, inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. A l'aide d'une pince, les plis de la paraffine sont tirés légèrement de chaque côté. Ensuite, l'ensemble coupe-lame est retiré de la plaque et égoutté, essoré au papier Joseph et mis à sécher.

Avant de procéder à la coloration des lames, il faut les déparaffiner et les réhydrater.

### 3.5.2.2. Déparaffinage

Pour déparaffiner les lames, il suffit de les placer dans deux bains successifs de toluène. Chaque bain dure 2 minutes.

### 3.5.2.3. Réhydratation

L'hydratation se fait dans 3 bains successifs d'alcool éthylique de degrés décroissants (100°, 95°, 90°, 70°). Chaque bain dure 2 minutes. Le dernier est suivi d'un rinçage à l'eau courante.

### 3.5.2.4. Coloration

Les lames sont colorées à l'hémalum-éosine, qui représente la plus simple des colorations combinées. La coloration du noyau est bleu-noir et le cytoplasme rose à rouge.

La préparation du colorant hématoxyline de Harris (Tableau 9).

La coloration des lames est effectuée comme suit :

- Mettre les lames dans l'hématoxyline de Harris durant 2 à 3 minutes.
- Laver les lames à l'eau ordinaire.
- En cas de sur coloration, les lames sont trempées dans de l'alcool chlorhydrique pendant quelques secondes (100 ml d'alcool à 95° + 5 gouttes de HCL à 1%).
- Bleuir dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (rinçage).
- Laver les lames à l'eau ordinaire.
- Mettre les lames dans un bain d'alcool éthylique 1 à 2 minutes.
- Colorer les lames à l'éosine alcoolisée (2g d'éosine dans 100 ml d'alcool éthylique) pendant 5 minutes.

**Tableau 9** .Composition du colorant à l'hématoxyline de Harris d'après (Hould, 1984).

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Hématoxyline	5 g
Ethanol	50 ml
Alun de potassium	100 ml
Oxyde mercurique	2 ,5 g
Eau distillée	1000 ml

- Rinçage des lames dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 95°.
- Mettre les lames dans du toluène pendant une minute.
- Mettre entre lame et lamelle une goutte de baume de Canada ou d'Eukitt.
- Laisser sécher puis observer au microscope.

### 3.6. Etude de la fonction de reproduction

Pour vérifier les conséquences de la consommation de lait de soja sur la fertilité des souris mâles, un test de fertilité est réalisé. Par la suite, Le dosage sérique de l'hormone de la testostérone, la mobilité, la morphologie ainsi que le comptage des spermatozoïdes sont étudiés dans le testicule et l'épididyme et enfin un examen histologique des testicules et des vésicules séminales est effectué les groupes expérimentaux comparées aux groupe témoin.

#### 3.6.1. Test de fertilité

Au bout de 8 semaines d'expérimentations, et pendant une semaine, les animaux sont soumis à un test de fertilité, après une période d'accouplement d'une semaine, les mâles sont séparés des femelles. Le pouvoir fertilisant de chaque mâle testé est évalué en fonction de la portée qu'il a engendrée, et sur les souris issues du test de fertilité ont déterminé le poids et la taille des petits au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jour après leur naissance.

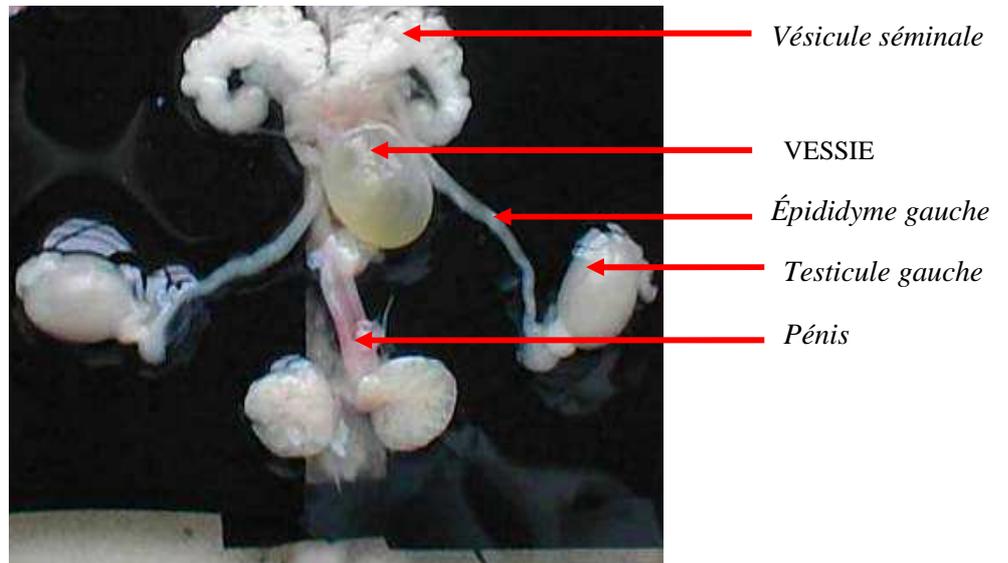
#### 3.6.2. Prélèvements des organes

Après le test de fertilité, les souris expérimentales testées sont sacrifiées par dislocation cervicale. Après l'ouverture les testicules apparaissent sous forme de deux glandes ovoïdes de couleur blanchâtres, recouvertes d'une membrane mince d'albuginée. Les testicules sont retenus au fond du scrotum par un ligament qui est aussi fixé sur la queue de l'épididyme. Les vésicules séminales sont aussi prélevées (figure 22).

Les organes prélevés sont ensuite pesés pour la détermination du poids relatif.

Le testicule gauche et la vésicule séminale sont fixés dans une solution de formol à 10%.

Ces échantillons sont destinés à l'étude histologique. Le testicule droit et l'épididyme droit sont conservés pour le comptage des spermatozoïdes.



**Figure 22.** Appareil reproducteur mâle des souris Swiss.

### 3.6.3. Numération des spermatozoïdes

Pour vérifier l'effet du lait de soja sur la fertilité masculine, le comptage des spermatozoïdes est effectué sur les souris mâles adultes (figure 23).

#### 3.6.3.1. Comptage des spermatozoïdes dans le testicule

Le testicule est prélevé, pesé et finement coupé avec des ciseaux, puis homogénéisé pendant 1 minute dans 10ml de NaCl 9 ‰ contenant 5µl de triton X-100 (Merck, Allemagne). Le nombre de spermatozoïdes est déterminé en utilisant une cellule de Mallassez sur 5 grands carreaux, observés au microscope optique au grossissement 40 (Farang et al. ; 2007).

#### 3.6.3.2. Comptage des spermatozoïdes dans l'épididyme

L'épididyme est prélevé, pesé, coupé, puis homogénéisé pendant 1 minute dans un pilulier contenant 10 ml de sérum physiologique ajoutant 5µl de triton X-100 (Merck, Allemagne). Le comptage s'effectue sur 5 grands carreaux de la cellule de Mallassez, observé au microscope optique au grossissement 40 (Farang et al., 2007).

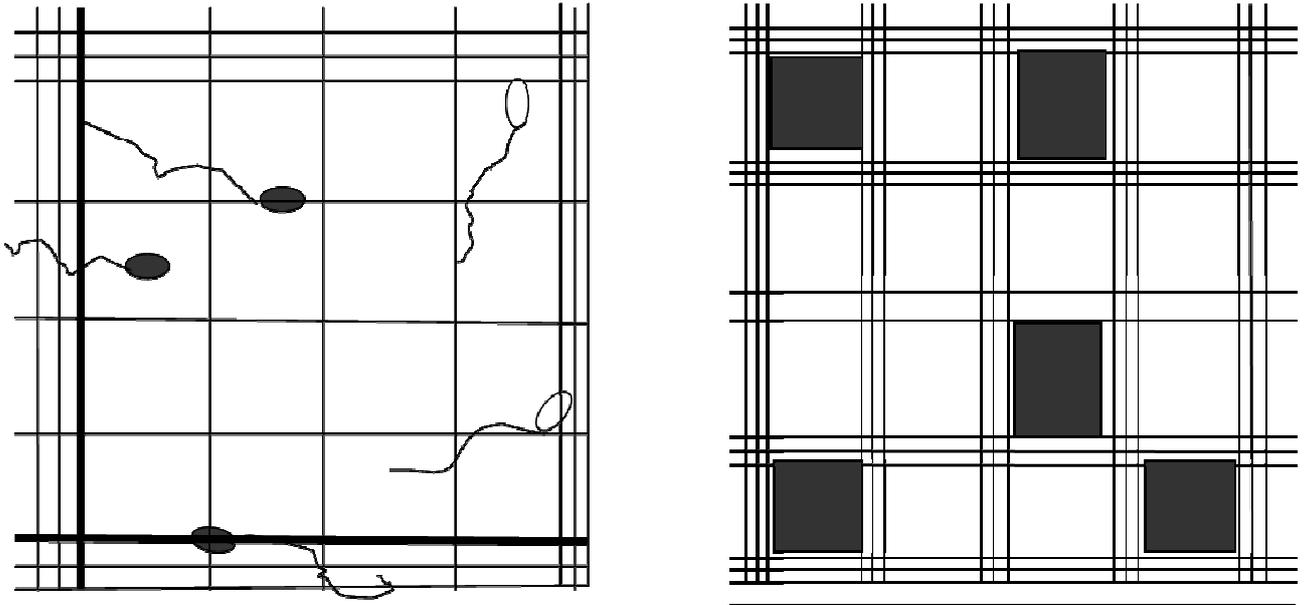
### 3.6.4. Mobilité des spermatozoïdes

Après prélèvement des organes, l'épididyme placé dans une boîte de Pétri contenant 4 ml de sérum physiologique (0,9% de chlorure de sodium) est haché avec un scalpel puis incubé dans l'étuve à 37°C pendant 15 min. 20µl d'échantillon prélevé sont déposés sur la cellule de Mallassez (Yang et al., 2007).

La mobilité des spermatozoïdes est déterminée après 10 observations microscopiques au grossissement 40. Nous avons évalué le pourcentage de mobilité en comptant les spermatozoïdes immobiles sur le fond de la lame par rapport aux spermatozoïdes mobiles évoluant à côté.

Le pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes est définie par :

$$\text{Mobilité des spermatozoïdes (\%)} = \frac{\text{nombre des spermatozoïdes mobile}}{\text{nombre total}} \times 100$$



**Figure 23.** Comptage cellulaire des spermatozoïdes à l'aide d'une cellule de Malassez.

### 3.6.5. Détermination des anomalies

Afin d'évaluer la morphologie des spermatozoïdes 20µl de la suspension précédente sont déposés sur une lame. Une fois séché à l'air, les spermatozoïdes sont fixés à l'éthanol 95° pendant 5min, colorés au Violet de Gentiane pendant 3min, puis rincés à l'eau distillée. Un minimum de 500 spermatozoïdes est examiné au microscope optique (Yang et al., 2007)(Tableau 10).

Nous les avons classés selon les catégories suivantes : Les spermatozoïdes anormaux sont classés selon des :

- Anomalies au niveau de la tête.
- Anomalies au niveau de la pièce intermédiaire.
- Anomalies au niveau du flagelle.
  
- Spermatozoïdes normaux.
- Anomalies de la tête (malposition, tête piriforme ou ronde, allongée ou étroite, microcéphalique ou macrocéphalique, tête double, acrosome anormal, décapité).
- Anomalies de la pièce intermédiaire (coudée, double, inexistante).
- Anomalies du flagelle (enroulé, double, court, inexistant).
- Présence de cellules autres (cristaux de spermine, cellules épithéliales, leucocytes, érythrocytes).

### 3.6.6. Dosage de la testostérone

Le dosage de l'hormone de testostérone est effectué par la technique immunoenzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (ELFA) au niveau de l'hôpital Benzardjab à Ain Témouchent .

Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la cartouche.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement dans l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel.

L'échantillon est prélevé, puis transféré dans le puits contenant le conjugué qui est un dérivé de la testostérone marqué à la phosphatase alcaline. Il se produit une compétition entre la testostérone présente dans l'échantillon et le dérivé testostérone du conjugué vis-à-vis des sites de l'anticorps spécifique anti-testostérone fixé sur le cône. Des étapes de lavage éliminent les composés non fixés.

**Tableau 10.** Composition du colorant violet de gentiane.

<b>Produits</b>	<b>Quantité</b>
Violet de Gentiane	1 g
Phénol	2 g
Alcool 95°	10 ml
Eau distillée	100 ml

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliferone) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon.

A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une courbe de calibration mémorisée, puis imprimés.

#### **4. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard ( $X \pm ES$ ). L'analyse de la variance est effectuée avec le test ANOVA (version 0,98).

## **1. Croissance pondérale**

### **1.1. Effet du lait de soja sur la croissance pondérale**

Dans cette partie de notre travail, nous avons évalué les conséquences de la consommation du lait de soja par les souris sur l'évolution de leur poids corporel (figure 24).

Juste après le sevrage, le poids des souris des différents groupes est comparable sans différence significative. Ensuite l'évolution de ce poids corporel s'effectue normalement chez tous les animaux durant la période d'expérimentation, il n'ya toujours pas différence significative entre les poids atteints par les souris.

Lorsqu'on compare également le gain de poids, c'est-à-dire la différence du poids entre le temps  $t_0$  et  $t_{30}$ , on n'observe également aucune différence significative.

Ces résultats indiquent donc clairement que le lait de soja n'influe pas sur la croissance pondérale des souris ayant reçu ce produit.

### **1.2. Taux de mortalité et les transformations morphologiques et comportementales**

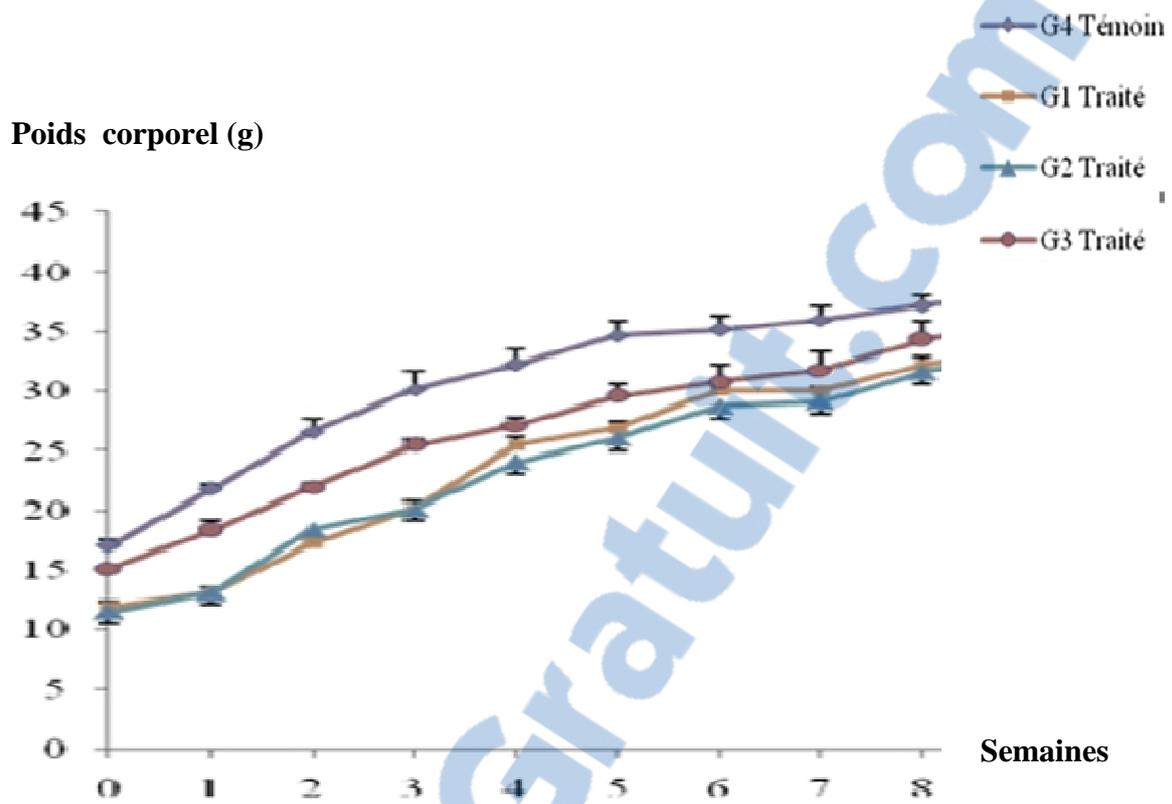
Au cours de l'expérimentation, nous n'avons enregistré aucun taux de mortalité. Une agitation et une agressivité ont été observées chez les souris mâles traitées au lait de soja ainsi qu'une légère perte de poils est également constaté.

## **2. Effet de la consommation de lait de soja sur le poids des organes**

### **2.1 Poids absolu du foie et du rein**

Le poids absolu du foie et du rein renseigne sur l'évolution de l'organe suite à la consommation du lait de soja (tableau 11).

Une différence significative du poids absolu du foie au niveau du groupe 3 ( $2.12 \pm 0.07$  vs  $1.89 \pm 0.07$ ) est observée comparé au groupe témoin. De même on note une augmentation significative du poids absolu des reins chez les souris du groupe 1 ( $0.35 \pm 0.03$  Vs  $0.28 \pm 0.01$ ) ( $p < 0.05$ ) par rapport au groupe témoin.



**Figure 24.** Croissance pondérale des souris mâles recevant du lait de soja et du groupe témoin (n=10 souris / groupe)

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

**Tableau 11.** Effet du lait de soja sur les poids absolu des organes chez les souris.

<b>Groupes</b>	<b>Foie</b>	<b>Rein1</b>	<b>Rein2</b>
Témoin	1.89±0.07	0.29±0.01	0.28±0.01
Groupe 1	1.97±0.07	0.35±0.03*	0.33±0.02*
Groupe 2	1.93±0.04	0.29±0.01	0.31±0.01
Groupe 3	2.12±0.07*	0.29±0.01	0.28±0.01

## 2.2. Poids relatif des organes sexuels

Le poids relatif des organes sexuels est déterminé selon la relation suivante :

Poids relatif d'un organe = (poids de l'organe/poids de souris) x100.

Cette méthode de calcul nous renseigne sur l'évolution du poids de l'organe par rapport à celle du poids de l'organisme entier.

Nos résultats montrent que les poids relatifs du testicule, de l'épididyme, et des vésicules séminales chez les mâles, ne changent pas chez les groupes ayant ingéré du lait de soja par rapport aux témoins (tableau 12).

## 3. Effet de lait de soja sur les paramètres hématologiques

### 3.1. Nombre des globules rouges (GR)

Le nombre de globule rouge est représenté dans la figure 25. Les résultats montrent une diminution hautement significative du taux des globules rouges chez les souris mâles traité au lait de soja du 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> groupe (P<0.0001) cependant une diminution significativement réduit chez le groupe 3 (P<0.05) comparé au témoin.

Les valeurs sont  $3.875 \pm 0.06$  ;  $3.892 \pm 0.1$  et  $4.314 \pm 0.2$  vs  $4.904 \pm 0.09$   $10^6/\text{mm}^3$ .

### 3.2. Nombre de globules blancs (GB)

Le taux des globules blancs est représenté dans la figure 26. Les résultats indiquent une diminution très significative du nombre de globules blancs du groupes 1 et 2 ayant ingéré du lait de soja comparés aux témoins les valeurs sont respectivement de  $4.6 \pm 0.31$  ;  $4.61 \pm 0.5$  vs  $6.62 \pm 0.35$   $10^3/\text{mm}^3$  (p<0.01).

### 3.3. Nombre de plaquettes

Le taux des plaquettes est représenté dans la figure 27.

Les résultats révèlent une chute très significative chez les 3 groupes expérimentaux comparés au témoin  $0.228 \pm 0.02$  ;  $0.212 \pm 0.01$  ;  $0.225 \pm 0.02$  vs  $0.343 \pm 0.04$   $10^5/\text{mm}^3$  (p<0.01).

## 4. Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques sériques

### 4.1. Teneur en albumine

Les concentrations en albumine sont présentées dans la figure 28. Les résultats montrent que les teneurs en albumine sont très significativement augmentées de 34%, 60% et 72% chez les souris traités au lait de soja, comparés aux témoins (p<0,001).

**Tableau 12.** Effet du lait de soja sur le poids relatif des organes sexuels chez les souris mâles

	<b>Testicules</b>	<b>Vésicules séminales</b>	<b>Epididymes</b>
<b>Témoin</b>	0,62±0,03	0,72±0,10	0,24±0,03
<b>Groupe 1</b>	0,55±0,04	0,7 ±0,12	0,28±0,01
<b>Groupe 2</b>	0,57±0,04	0,57±0,11	0,3 ±0,01
<b>Groupe 3</b>	0,56±0,02	0,53±0,07	0,24±0,01

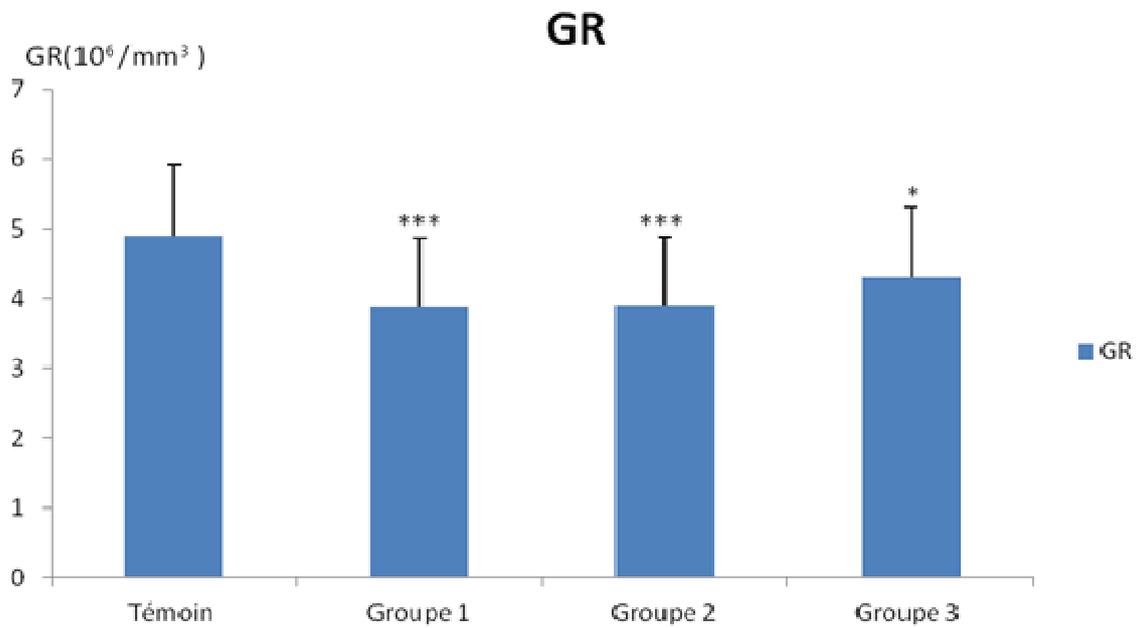
Les valeurs représentent des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ), ( $n = 10$  souris) pour chaque groupe.

**Groupe 1** : font partie d'une portée dont la mère reçoit du lait de soja dès la mise bas jusqu'au sevrage. Après le sevrage, les souris de ce groupe reçoivent à leur tour le lait de soja.

**Groupe 2** : est constitué d'animaux issus d'une mère nourrie au lait de soja pendant la période d'allaitement et reçoivent, après le sevrage, un aliment standard et de l'eau.

**Groupe 3** : comprend des souris issues d'une mère qui a consommé un aliment standard durant la période d'allaitement et reçoivent, après le sevrage, le lait de soja.

**Groupe 4** : constituent les souris témoins. Ces souris sont issues d'une mère qui a consommé de l'aliment standard et qui reçoivent le même régime après le sevrage.

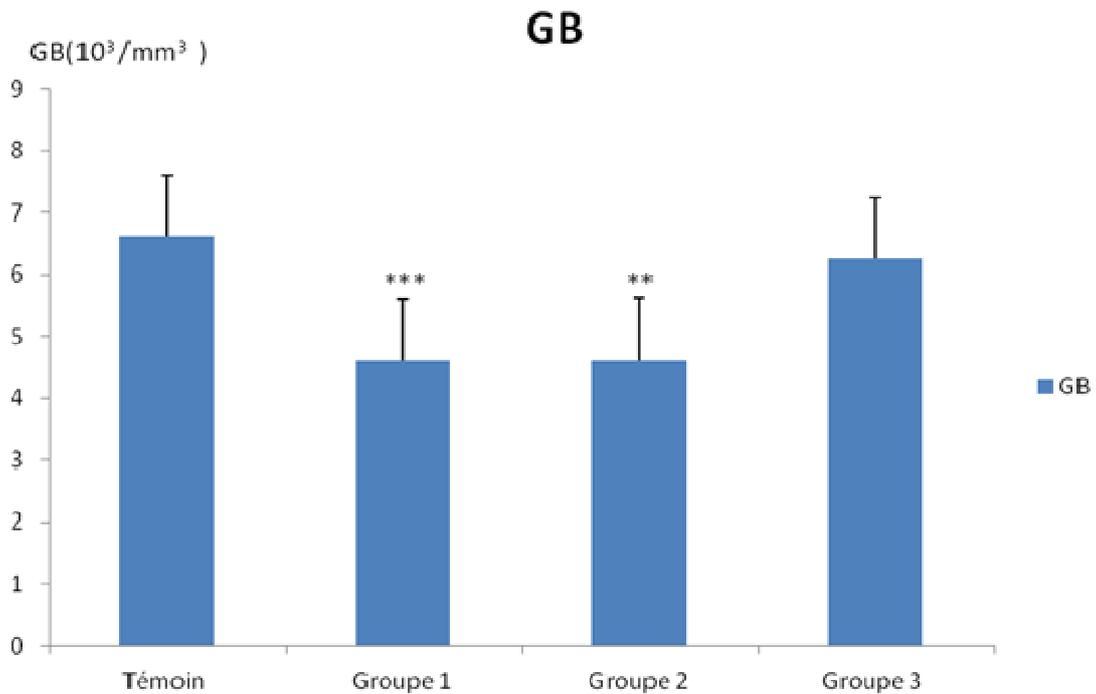


**Figure 25.** Nombre de globules rouges ( $10^6/\text{mm}^3$ ) des souris traités pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins ( $n=10$  pour chaque groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.

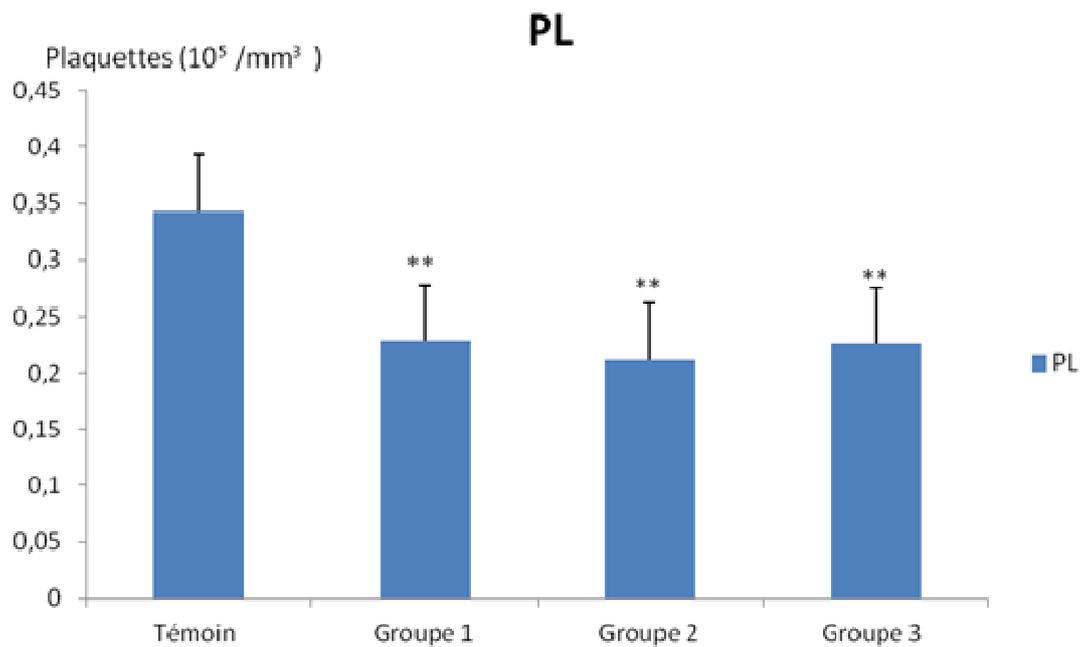
\* $p < 0.05$  ; \*\*\* $p < 0.01$ .



**Figure 26.** Nombre de globules blanc ( $10^3 /\text{mm}^3$ ) des souris traités pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins ( $n=10$  pour chaque groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

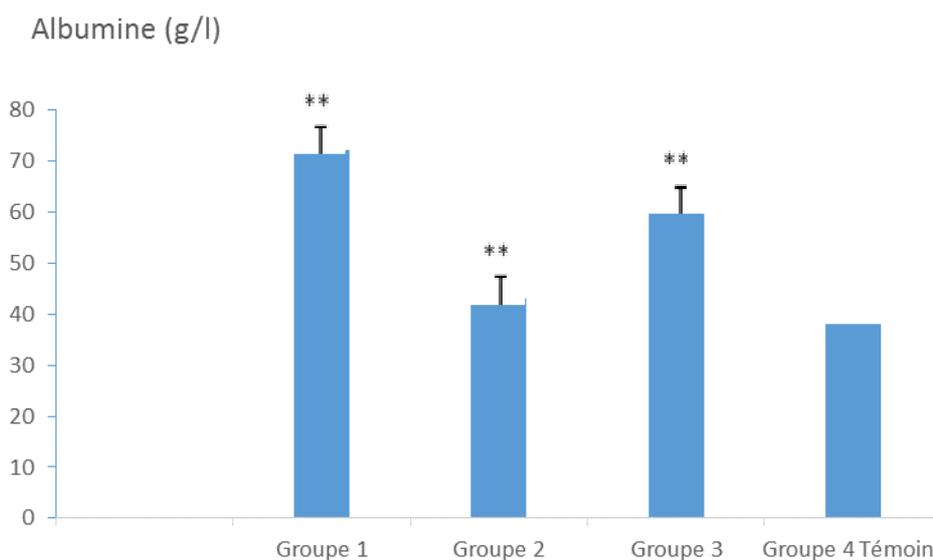
\* : Témoin vs les groupes expérimentaux  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ .



**Figure 27.** Nombre de plaquettes ( $10^5 / \text{mm}^3$ ) des souris traitées pendant 8 semaines par le lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=10 pour chaque groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux. \*\*p<0.01.



**Figure 28.** Teneur en albumine (g/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à lait de soja (n=10).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

On note une augmentation très significative chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2. Teneur en cholestérol total

Les teneurs en cholestérol total sont représentées dans la figure 29. Les concentrations en cholestérol total sont similaires chez les groupes traités au lait de soja comparés aux témoins.

En revanche, celles des souris du groupe traité au lait de soja sont significativement diminuée par rapport aux témoins et les valeurs sont respectivement ( $3,44 \pm 0,17$ ), ( $4,03 \pm 0,2$ ) et ( $4,24 \pm 0,53$ ) vs ( $5,35 \pm 0,37$  mmol/l) chez les groupes expérimentaux comparés aux témoins. ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Teneur en urée

Les teneurs en urée sont représentées dans la figure 30. Les concentrations en urée sont significativement augmentées chez les souris traitées au lait de soja par rapport aux témoins.

Les valeurs de l'urée chez les souris sont respectivement ( $11,77 \pm 1,13$ ) vs ( $4,71 \pm 0,64$  mmol/l). ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4. Teneur en créatinine

Les teneurs en créatinine sont représentées dans la figure 31. Nos résultats indiquent une augmentation significative des valeurs en créatinine chez les souris ayant ingéré de lait de soja comparés aux témoins. Les valeurs sont ( $19,54 \pm 3,45$ ) et ( $15,88 \pm 2,1$ ) vs ( $6,75 \pm 1,04$   $\mu\text{mol/l}$ ) ( $p < 0,001$ ) respectivement.

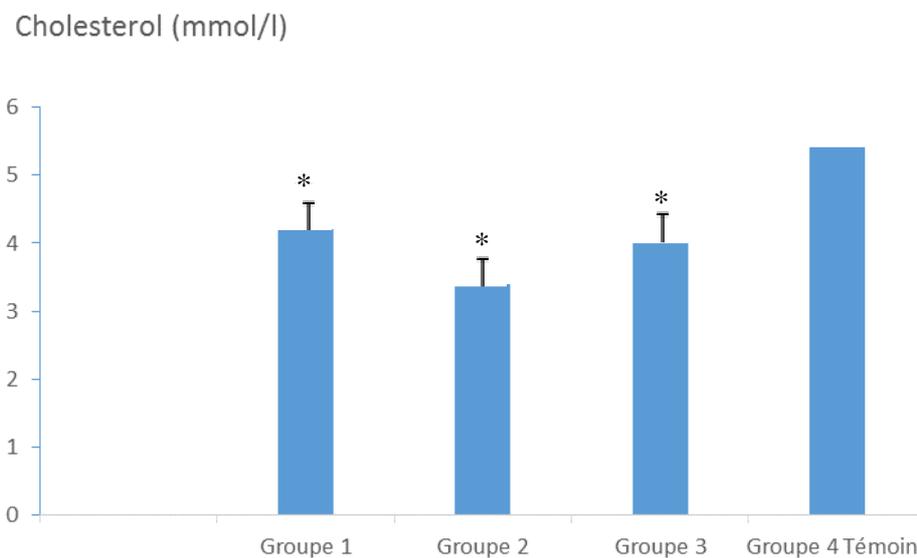
#### 4.5. Teneur en acide urique

Les teneurs en acide urique sont représentées dans la figure 32. Les concentrations en acide urique sont augmentées chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Cette augmentation est très marquée, comparée aux témoins ( $p < 0,01$ ) ( $49,01 \pm 1,59$ ) vs ( $45,15 \pm 1,34$ ) mg/l respectivement.

#### 4.6. Teneur en transaminases TGO

Les teneurs en TGO sont représentées dans la figure 33. Les souris traitées au lait de soja présentent des valeurs faibles en TGO par rapport aux témoins.

Les valeurs en TGO chez les souris traitées au lait de soja sont respectivement ( $316,35 \pm 14,19$ ) U/l vs ( $474,82 \pm 16,72$ ) comparés aux témoins ( $p < 0,05$ ).

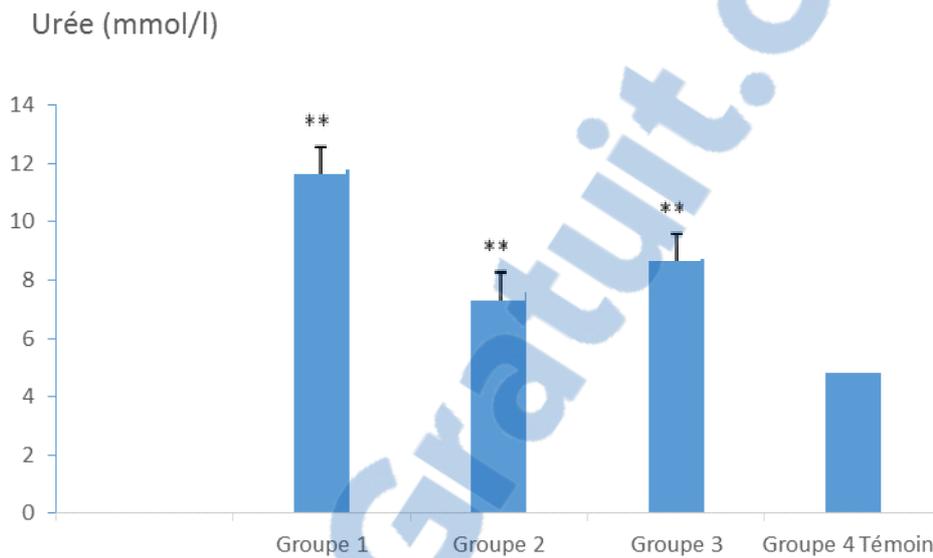


**Figure 29.** Teneur en cholestérol (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja (n=10).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.\*  $p < 0,05$

On note une diminution significative chez les groupes traité au lait de soja comparé aux témoins.



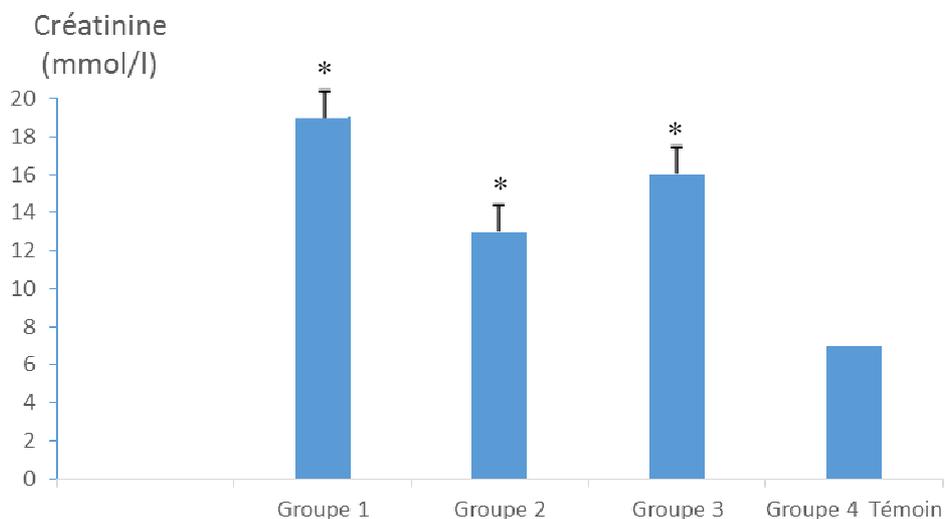
**Figure 30.** Teneur en urée sérique (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\*\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.

\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

On note une augmentation très significative chez les groupes traités au lait de soja comparés aux témoins. ( $p < 0,001$ ).



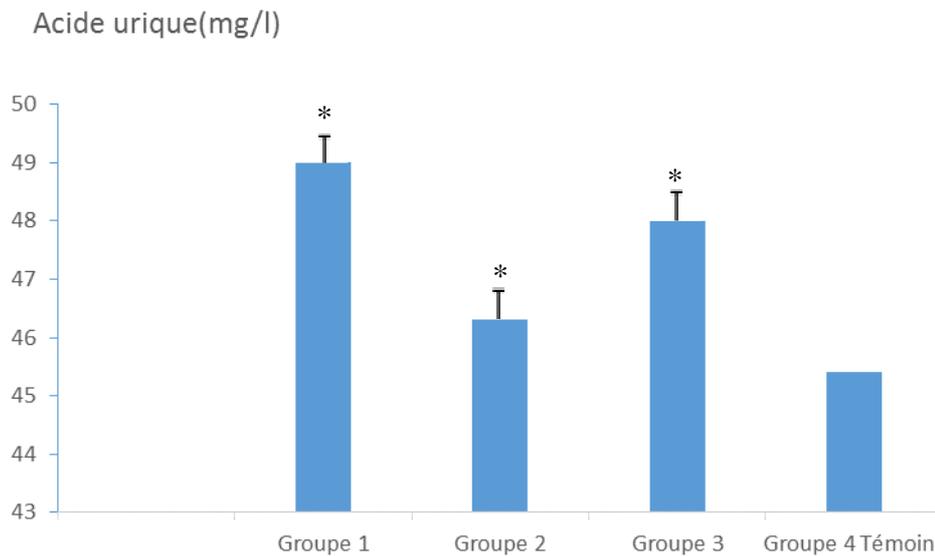
**Figure 31.** Teneur en créatinine ( $\mu\text{mol/l}$ ) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à lait de soja ( $n=10$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.

\*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

On note une augmentation significative chez les souris traitées au lait de soja comparé aux témoins. ( $p<0,001$ ).

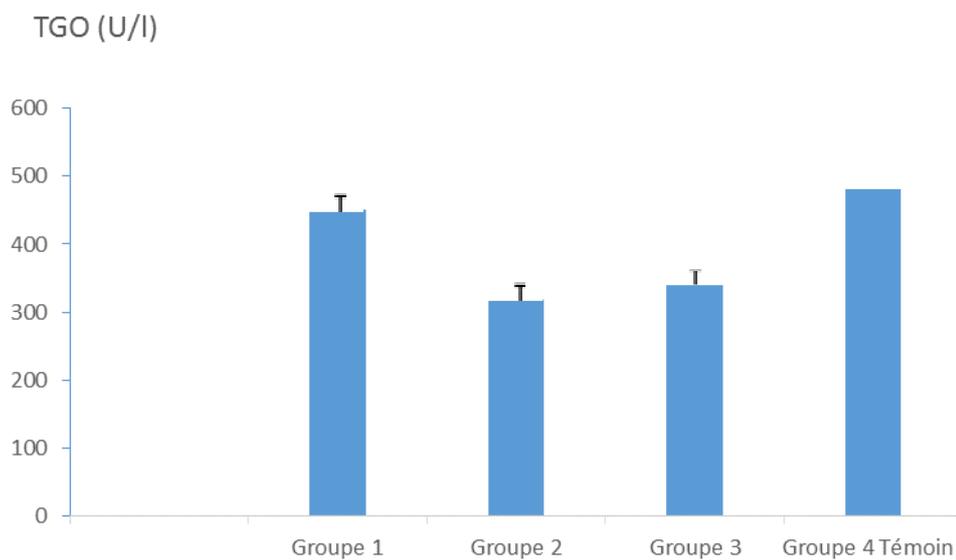


**Figure 32.** Teneur en acide urique (mg/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja (n=10).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

On note une augmentation significative chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. ( $p < 0,01$ ).



**Figure 33.** Teneur en TGO (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja (n=10).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.

\*  $p < 0,05$

On note une diminution chez les groupes traités au lait de soja comparé aux témoins.

#### 4.7. Teneur en transaminases TGP

Les teneurs en TGP sont représentées dans la figure 34. Elles présentent des valeurs diminuées chez les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Les valeurs représentent respectivement chez les souris traitées au lait de soja ( $316,18 \pm 20,46$ ) vs ( $571,18 \pm 16,08$ ) U/l comparés aux témoins.

### 5. Effet de la consommation de lait de soja sur la fonction de reproduction

L'intérêt dans cette partie du travail est d'évaluer l'effet de la consommation de lait de soja sur le potentiel reproducteur chez les souris mâles. A cet effet, différents paramètres sensibles ont été évalués (test de fertilité, mobilité, morphologie, comptage des spermatozoïdes et dosage de l'hormone testostérone).

#### 5.1. Test de fertilité

Le test de fertilité réalisé permet de mettre en évidence l'impact de lait soja sur la fertilité des souris mâles. Les résultats du tableau (13) montrent l'effet de la consommation du lait de soja sur la descendance. L'étude a été faite sur 18 petits mâles et femelles.

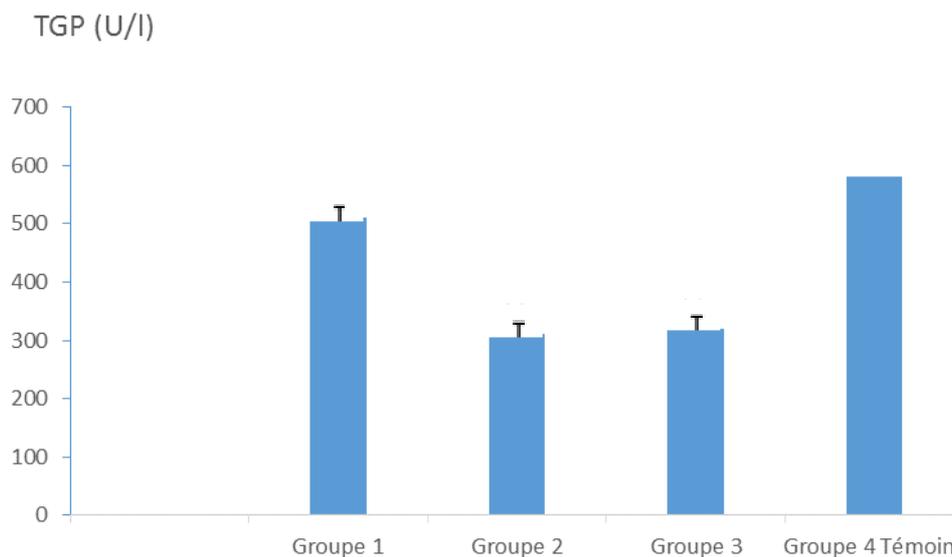
En revanche, le croisement des quatre groupes de souris mâles avec des femelles témoins conduit à l'observation de la fertilité des souris expérimentales ayant ingéré du lait de soja en comparaison aux souris témoins.

Les résultats de ce même tableau montrent que les femelles accouplées avec les mâles ayant ingéré du lait de soja présentent un taux de gestation (index de fertilité) réduit par rapport aux femelles accouplées avec des souris témoins. Le taux est de 100% chez les femelles accouplées avec des souris mâles témoins et à 67% chez les femelles accouplées avec des mâles ayant ingéré du lait de soja.

Nous avons constaté que le poids et la taille des petits des souris du groupe 3 dès la naissance au sevrage de J7, J14 à J28 a diminué très significativement par rapport au témoin (figures 35 et 36).

En revanche, le poids et la taille des portées des souris des groupes 1 diminue très significativement à J7 et J14 comparées aux souris témoins ( $p < 0,01$ ).

Le poids à J28 diminue d'une façon très significatif chez les petits des souris de groupes 2, cependant leur taille à J7 et J28 est réduite de façon très significative par rapport aux témoins ( $p < 0,01$ ).



**Figure 34.** Teneur en TGP (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées au lait de soja (n=10).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

\*  $p < 0,05$

\* : Témoin vs les groupes expérimentaux.

On note une diminution chez les groupes traités au lait de soja comparés aux témoins.

**Tableau 13.** Test de fertilité

Paramètres	Témoin (%)	Groupe1 (%)	Groupe 2 (%)	Groupe3(%)
Index de fertilité <sup>α</sup>	6/6 (100%)	4 /6 (67%)	4 /6 (67%)	5/6 (83%)
Nombre total de nouveau-nés par groupes	56	39	18	32
Nombre moyen de nouveau-nés par groupe	9,33±0,56	6,5±2,11	3±1,13	5,33±1,28
<b>Poids (g) <sup>β</sup></b>				
J7	3,73±0,06	3,26±0,17**	3,51±0,23	3,08±0,07**
J14	7,41±0,21	6,27±0,29**	6,61±0,54	5,30±0,12**
J28	18,93±1,02	17,76±0,52	10,96±1,01**	13,93±0,56**
<b>Taille (cm) <sup>β</sup></b>				
J7	6,94±0,07	6,11±0,13**	6,33±0,19**	6,27±0,11**
J14	10,42±0,1	9,68±0,24**	9,78±0,34	9,32±0,16**
J28	15,01±0,17	14,61±0,15	12,14±0,68**	12,4±0,42**

α : Nombre des mâles fertiles / nombre total de souris qui se sont accouplées.

β : la moyenne est établie sur n=18 souris.

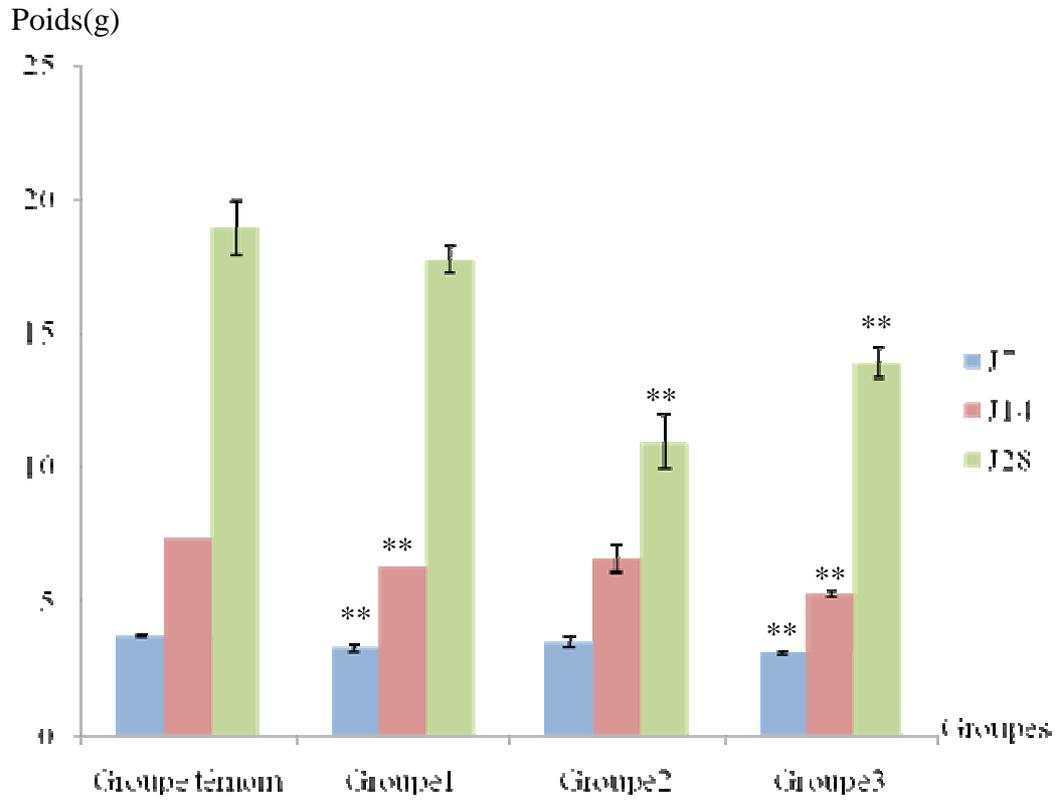
J7 : 7<sup>ème</sup> jour.

J14: 14<sup>ème</sup> jour.

J28: 28<sup>ème</sup> jour.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X±ES).

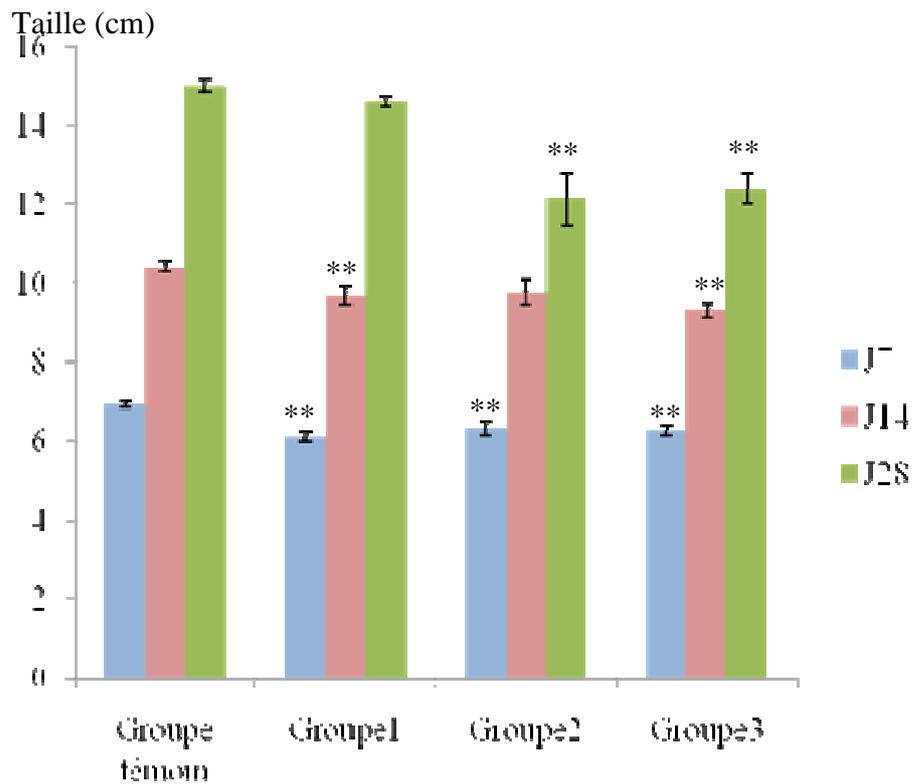
\*\* p<0,01.



**Figure 35.** Evolution du poids corporel des petits issus des mâles des différents groupes ayant consommé du lait de soja.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ )  $n=18$  souris pour chaque groupe.

\*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 36.** Evolution de la taille des petits issus des mâles des différents groupes ayant consommé du lait de soja.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ )  $n=18$  souris pour chaque groupe.

\*\*  $p < 0,01$ .

## 5.2. Effet du lait de soja sur les paramètres sexuels chez les souris mâles (spermocytogramme)

L'objectif de cette partie de travail, est d'évaluer l'effet de la consommation du lait de soja sur les paramètres sexuels de la souris mâle Swiss.

### 5.2.1. Mobilité des spermatozoïdes

Nos résultats montrent une diminution très significative du pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires chez les souris ayant ingéré du lait de soja.

Ces valeurs sont respectivement  $37,89 \pm 3,27$  % pour le groupe 1,  $44,25 \pm 1,32$  % le groupe 2 et  $49,82 \pm 4,48$  % pour le groupe 3 contre  $74,34 \pm 2,13$  % pour groupe témoin ( $p < 0,01$ ).

Ces données indiquent très clairement que la mobilité des spermatozoïdes est très significativement diminuée chez les mâles ayant ingéré du lait de soja traduiront une nécrospermie (figure 37).

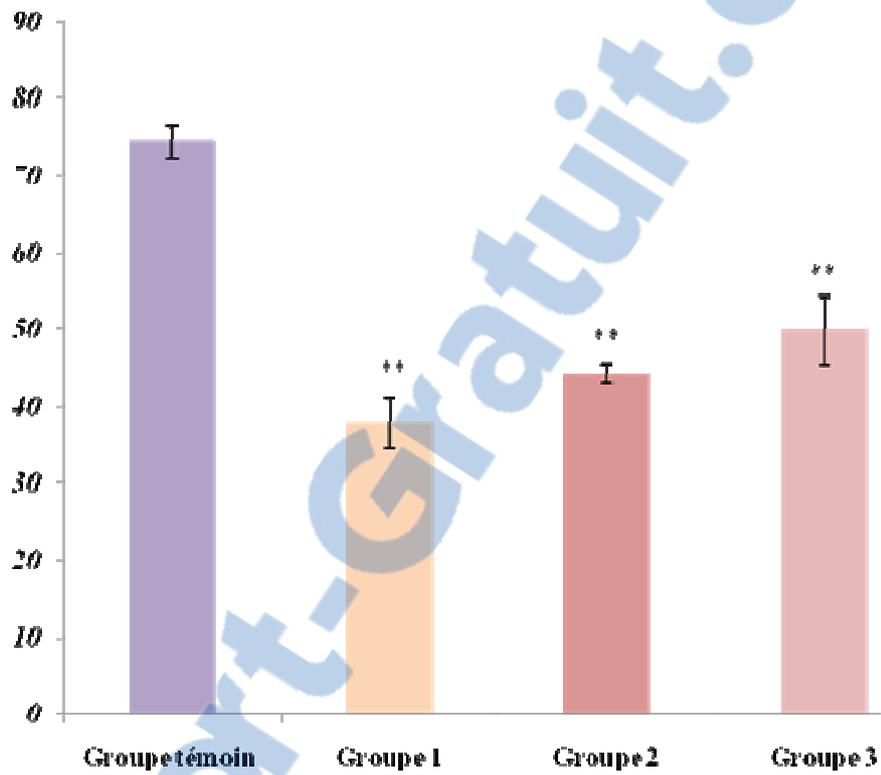
### 5.2.2. Comptage des spermatozoïdes dans le testicule et l'épididyme

Les résultats obtenus révèlent une diminution importante et très significative du nombre des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires chez les souris des groupes ayant ingéré du lait de soja.

Nos résultats indiquent que les souris ayant ingéré du lait de soja des groupes 2 et 3 présentent une oligospermie (présence de spermatozoïdes en quantité anormalement faible) par rapport aux souris témoins. Le nombre des spermatozoïdes testiculaire passe de  $(8,9 \pm 1,72) \times 10^6$  spz/ml chez les témoins à  $(3,17 \pm 0,30) \times 10^6$  spz/ml et  $(3,63 \pm 0,36) \times 10^6$  spz/ml chez les souris des groupes 2 et 3, respectivement (figure 38) ( $p < 0,01$ ).

De même, les résultats de la figure 39 montrent que le nombre des spermatozoïdes épидидymaires a diminué très significativement chez les groupes 1, 2 et 3 ayant ingéré du lait de soja dont les valeurs sont respectivement  $(7,43 \pm 0,53) \times 10^6$  spz/ml,  $(6,5 \pm 0,41) \times 10^6$  spz/ml et  $(5,27 \pm 0,59) \times 10^6$  spz/ml spermatozoïdes comparé à la valeur des souris du groupe témoin  $(14,53 \pm 1,43) \times 10^6$  spz/ml ( $p < 0,01$ ).

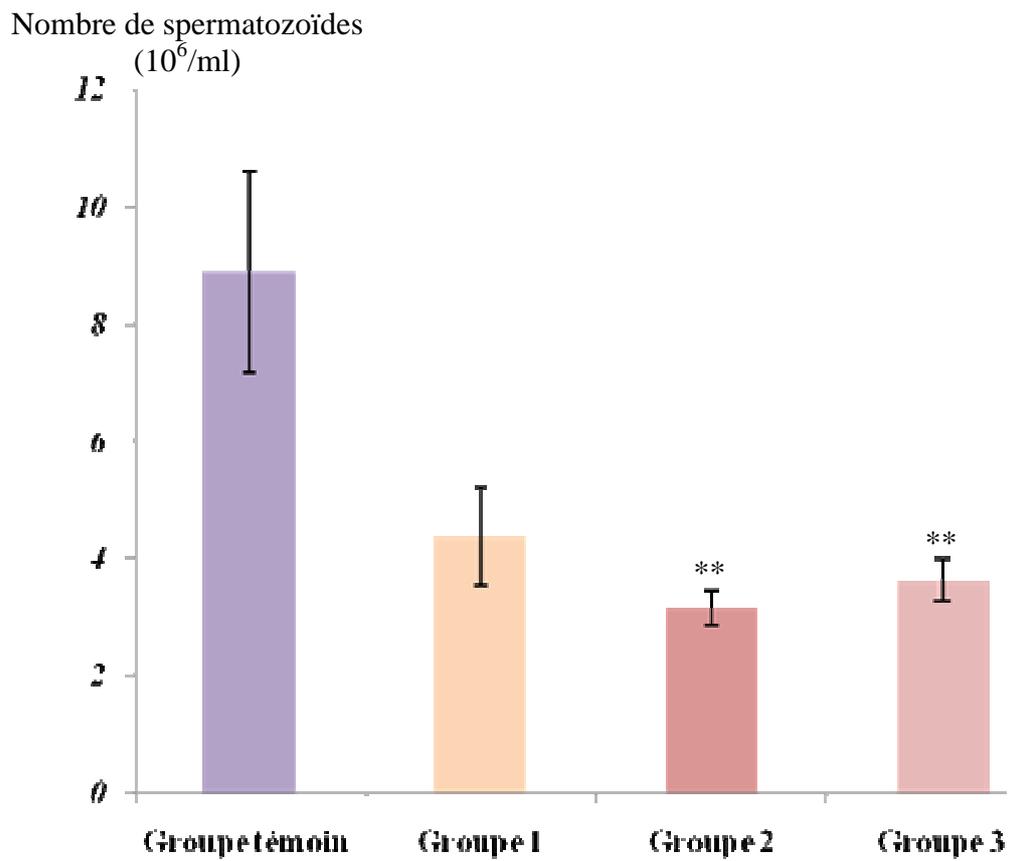
Mobilité des spermatozoïdes (%)



**Figure 37.** Pourcentage des spermatozoïdes épидидymaires mobiles des souris expérimentales ayant ingéré du lait de soja comparé à celui des témoins.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ).

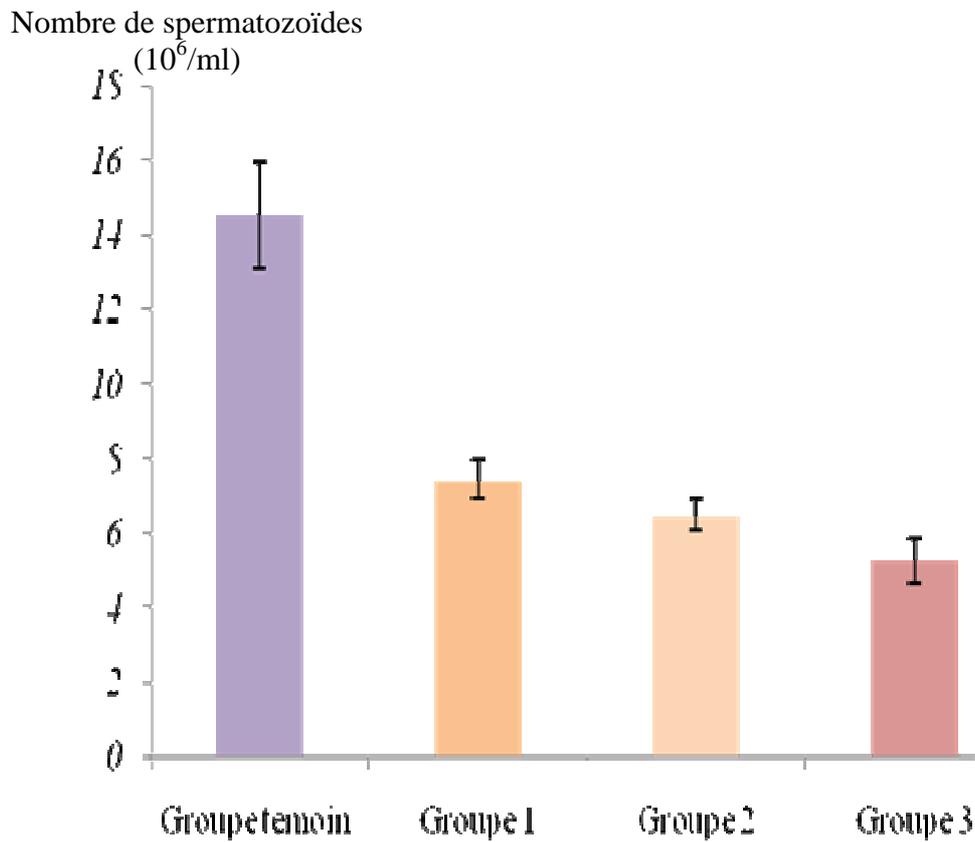
\*\*  $p < 0,01$



**Figure 38.** Nombre des spermatozoïdes (10<sup>6</sup>/ml) testiculaires des souris témoins mâles et des souris expérimentales ayant ingéré du lait de soja (n= 10 souris/ groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X±ES).

\*\*p<0,01



**Figure 39.** Nombre des spermatozoïdes épидидymaires (10<sup>6</sup>/ml) des souris ayant ingéré du lait de soja comparé à celui des souris témoins (n=10 souris/ groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X±ES) \*\* p<0,01.

### 5.2.3. Comptage des spermatozoïdes par gramme de testicule et d'épididyme

La figure 40 présente une baisse très significative du nombre des spermatozoïdes testiculaire chez les souris des groupes expérimentaux 2 et 3 dont les valeurs sont respectivement  $(31,04 \pm 3,62) \times 10^6$  spz/g et  $(35,37 \pm 3,89) \times 10^6$  spz /g comparé au groupe témoin dont la valeur est de  $(79,68 \pm 14,84) \times 10^6$  spz /g ( $p < 0,01$ ).

Cependant, on a observé une réduction très significative du nombre de spermatozoïdes épидидymaire (figure 41). Les souris témoins présentant une valeur de  $(385,35 \pm 89,08) \times 10^6$  spz /g comparé au groupe 2 et 3 dont les valeurs sont respectivement de  $(119,20 \pm 7,36) \times 10^6$  spz /g et  $(118,93 \pm 13,10) \times 10^6$  spz /g.

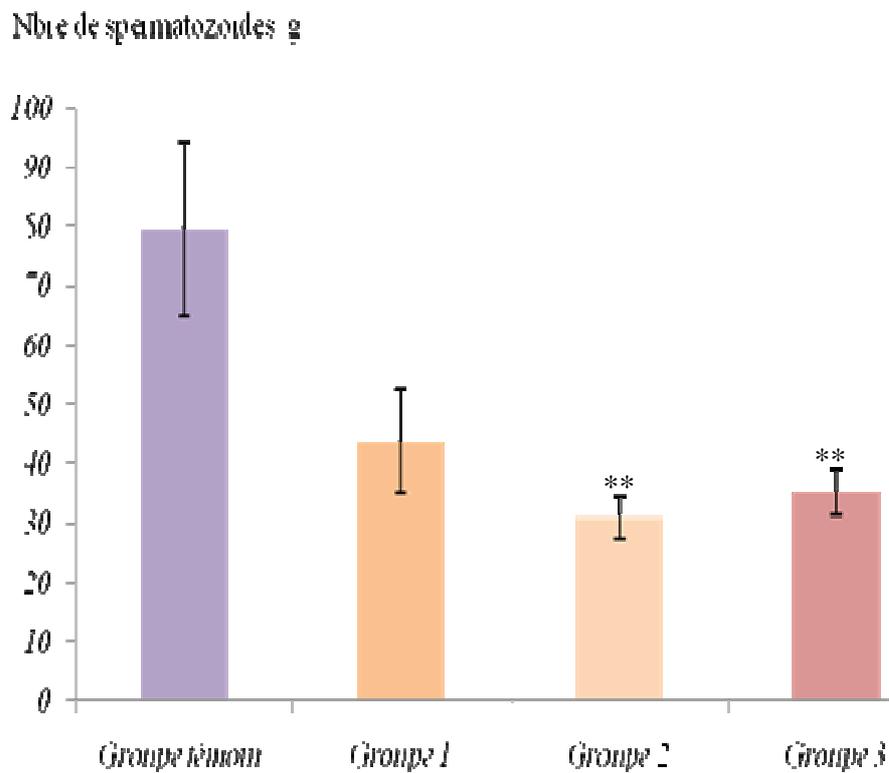
### 5.2.4. Morphologie des spermatozoïdes

La morphologie, dernier paramètre analysé du spermogramme ne semble pas échapper aux effets néfastes du lait de soja.

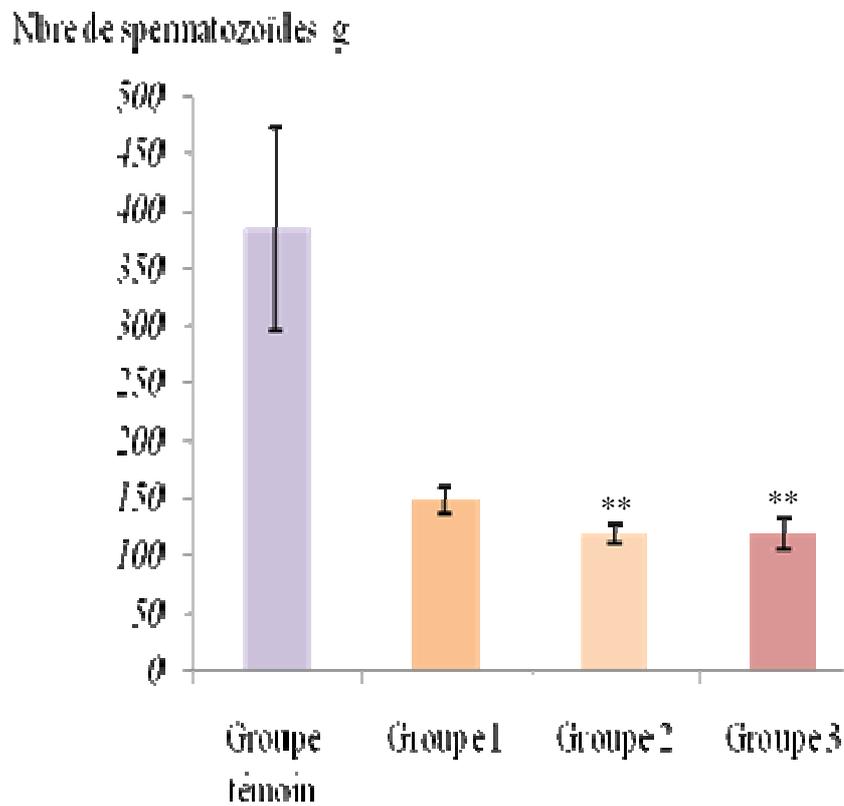
Les résultats de la figure 42 montrent que le pourcentage de la tératozoospermie (anomalie morphologique des spermatozoïdes) est plus important chez les souris ayant ingéré du lait de soja comparé au lot témoin. Le pourcentage des anomalies morphologiques des spermatozoïdes anormaux est plus fréquent chez les souris ayant ingéré du lait de soja des groupes 1 et 2 qui ont respectivement des valeurs allant de  $(16,3 \pm 2,41)\%$  et de  $(19 \pm 2,57)\%$  comparé à la valeur du lot témoin qui est de  $(7,67 \pm 0,60)\%$ .

Ces résultats sont confirmés par l'étude morphologique des spermatozoïdes, qui indique l'existence de plusieurs anomalies morphologiques au niveau de la tête et du flagelle.

La morphologie des spermatozoïdes est analysée selon les différentes formes anormales observées en microscope optique au niveau de la tête (microcéphale, macrocéphale, acéphale et tête irrégulière), de la pièce intermédiaire et du flagelle (enroulé, court, avec anse, double) (figures 43,44 et 45).



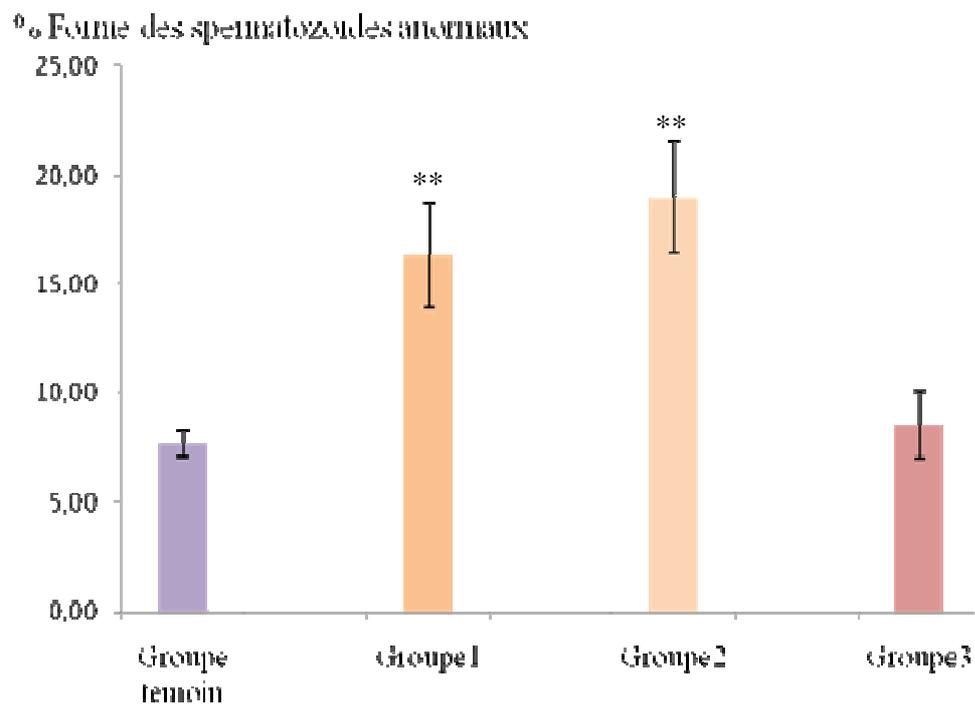
**Figure 40.** Nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule ( $10^6/g$ ) chez les souris témoins comparé à celui des souris ayant ingéré du lait de soja (n=10 souris/ groupe). Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ) \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 41.** Nombre de spermatozoïdes par gramme d'épididyme ( $10^6/g$ ) chez les souris témoins comparé à celui des souris ayant ingéré du lait de soja (n=10 souris/ groupe).

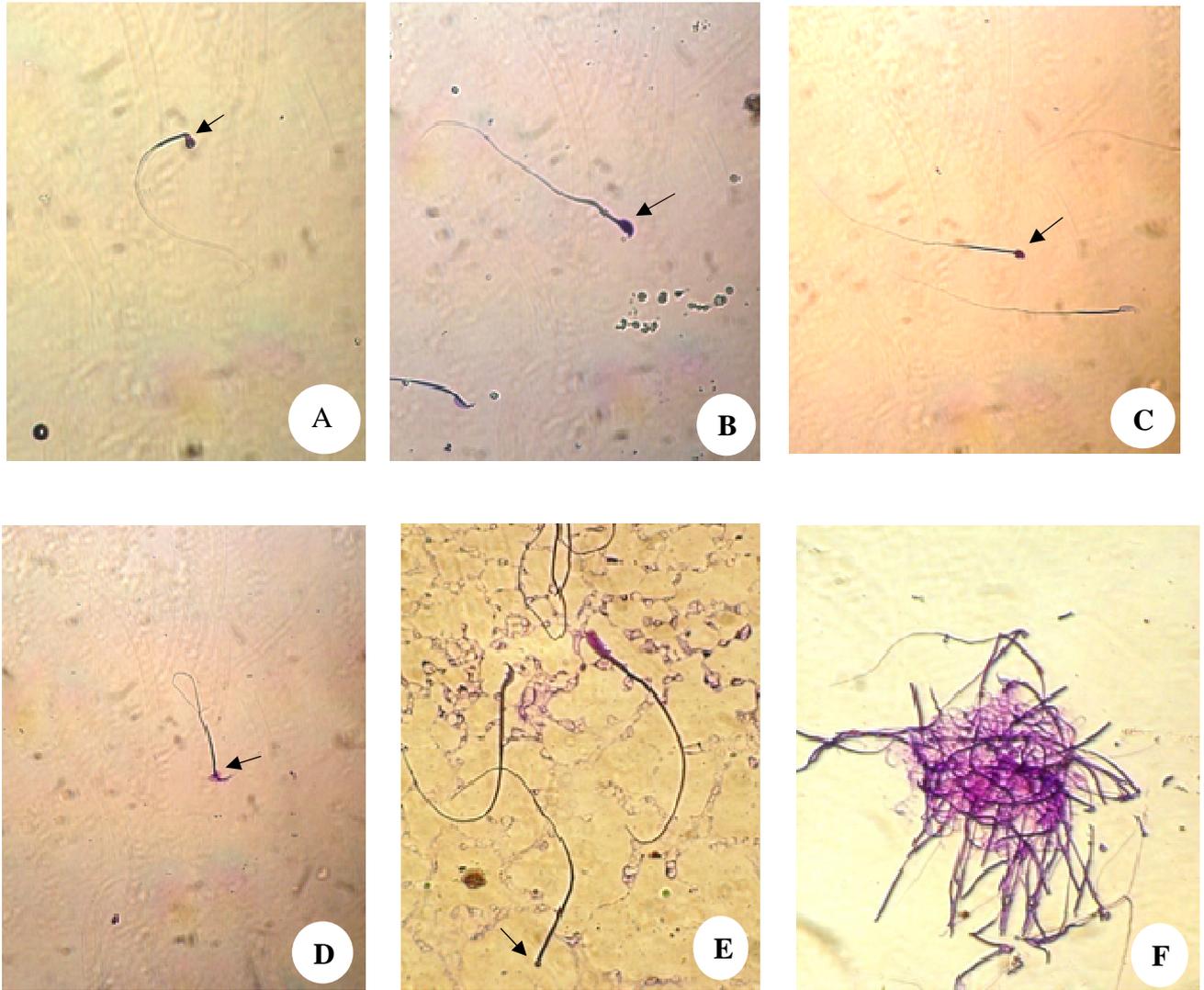
Nbre : Nombre des spermatozoïdes /gramme dans l'épididyme.

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ) \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 42.** Pourcentage des spermatozoïdes anormaux chez les animaux des différents groupes (n=6 souris/ groupe).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ( $X \pm ES$ ) \*\*  $p < 0,01$ .



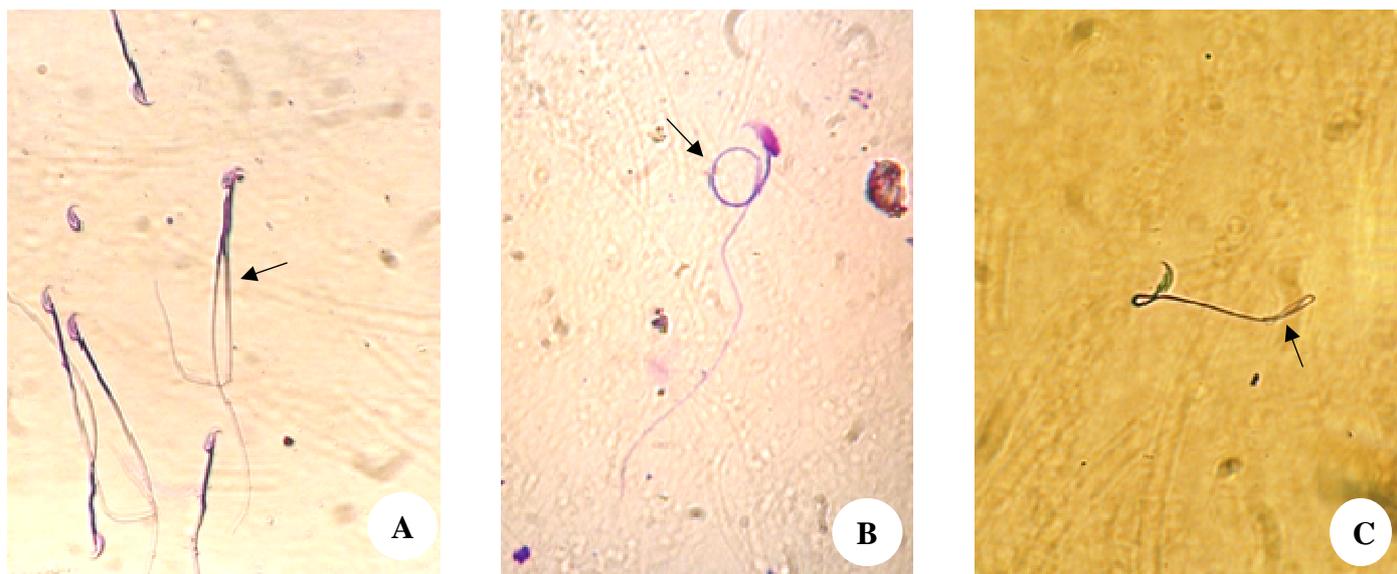
**Figure 43.** Observation au microscope optique des différentes anomalies de la tête des spermatozoïdes colorée au Violet de Gentiane au G (10x40).

**A** : Amorphe, **B** : Macrocéphale, **C** : Microcéphale, **D** : Tête irrégulière,

**E** : Acéphale, **F** : Regroupement en amas



**Figure 44.** Observation au microscope optique des anomalies de la pièce intermédiaire (angulée) des spermatozoïdes colorée au Violet de Gentiane au G (10x40).



**Figure 45.** Observation au microscope optique des différentes anomalies du flagelle des spermatozoïdes coloré au Violet de Gentiane au G (10x40).

**A :** Double flagelle, **B:** Enroulé au G (10x100), **C :** Enroulé.

### 5.2.5. Dosage hormonal

Les résultats de la figure 46 montrent une réduction très significative de la concentration de la testostérone plasmatique chez les souris de groupe 2 ayant ingéré du lait de soja par le biais de l'allaitement. La concentration sérique de la testostérone passe de la valeur de  $6,21 \pm 1,54$  ng/ml chez les souris contrôle à  $1,08 \pm 0,41$  ng/ml chez les souris du groupe 2 ( $p < 0,01$ ).

## 6. Effet de la consommation du lait de soja sur la structure histologique

Dans le but de vérifier l'action toxique du lait de soja sur l'architecture des organes, nous avons réalisé des coupes histologiques aux niveaux des testicules, vésicules séminales, le foie et les reins chez les souris témoins et les groupes expérimentaux ayant ingéré du lait de soja.

### 6.1. Effet du lait de soja sur la structure des testicules

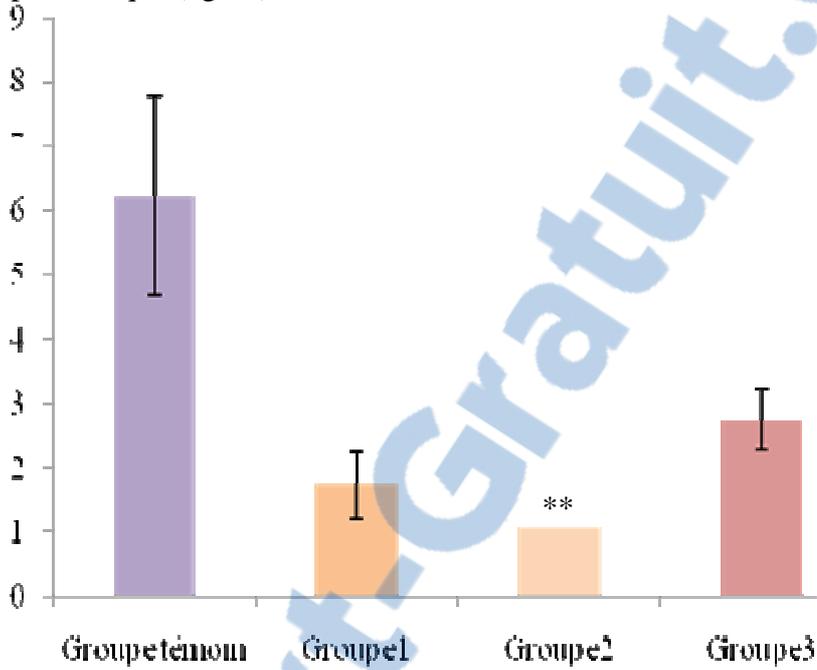
Selon les figures 47 et 48, l'histologie du testicule témoin montre des tubes séminifères serrés avec des espaces interstitiels faibles. On peut observer facilement les différents stades de la spermatogenèse qui se déroulent d'une façon centripète au niveau de la paroi des tubes séminifères. Les spermatogonies de petite taille sont situées à proximité de la membrane basale. Les spermatocytes I et II de plus grande taille sont à noyaux volumineux et parfois en phase de division. Les spermatides plus petites sont situées vers l'intérieur des tubes. Les spermatozoïdes mûrs remplissent presque la totalité de la lumière des tubes par leurs flagelles. Chez les souris ayant ingéré du lait de soja, ces différents stades sont altérés. Ces altérations et modifications sont détectées. Parmi les perturbations, nous avons observé :

- ❖ Une diminution de l'épaisseur de l'épithélium germinale (figures 49).
- ❖ Des spermatides non différenciés qui remplissent les lumières des tubes séminifères, absence de spermatozoïdes (débris cellulaires) (figure 50).
- ❖ Une atrophie du tissu conjonctif (figure 51).
- ❖ Une hyperplasie des cellules de Leydig (figure 52).

### 6.2. Effet du lait de soja sur la structure des vésicules séminales

L'observation microscopique des coupes histologique au niveau des vésicules séminales des souris témoins (figures 53, 54 et 55) montre un épithélium cubique simple formant des

Concentration de la testostérone plasmatique (ng/ml)



**Figure 46.** Concentration de la testostérone plasmatique (ng /ml) chez les souris témoins et les souris ayant ingéré du lait de soja (n=10 souris/ groupe).

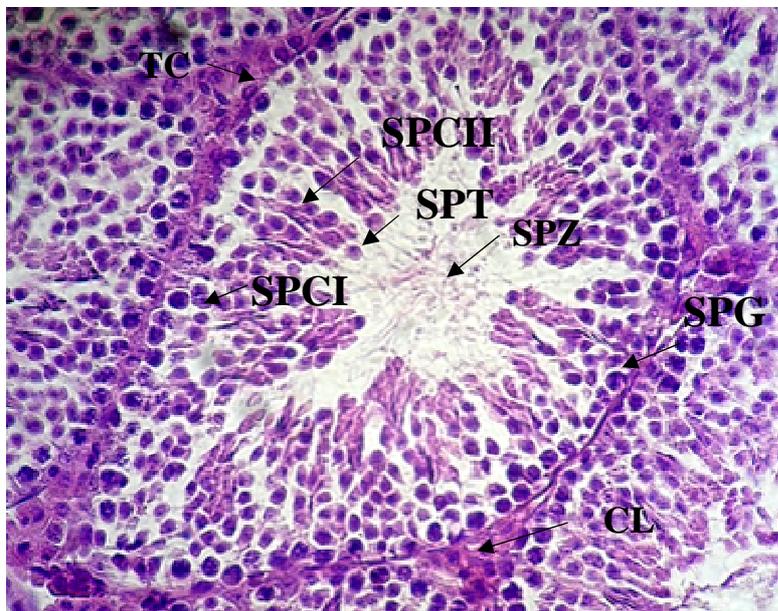
Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X±ES).

\*\* p<0,01



- T C : tissu conjonctif
- SPZ : spermatozoïdes
- EPG : épithélium germinal
- TS : tube séminifère

**Figure 47.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x10)



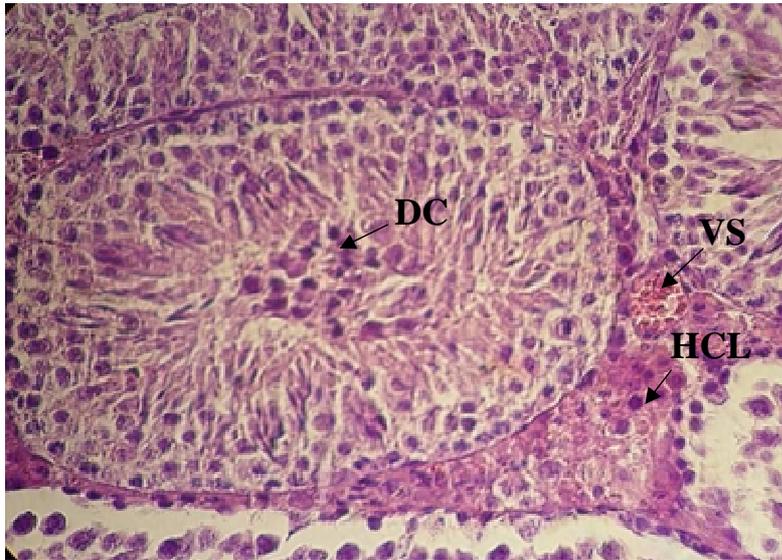
- SPG : spermatogonie
- SPCI : spermatocyte I
- SPCII : spermatocyte II
- SPT : spermatide
- SPZ : spermatozoïde
- TC : tissu conjonctif
- CL : cellule de LEYDIG

**Figure 48.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



- HCL : hyperplasie des cellules de LEYDIG.
- DEEG : diminution de l'épaisseur de l'épithélium germinale d'EPG.

**Figure 49.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x10)



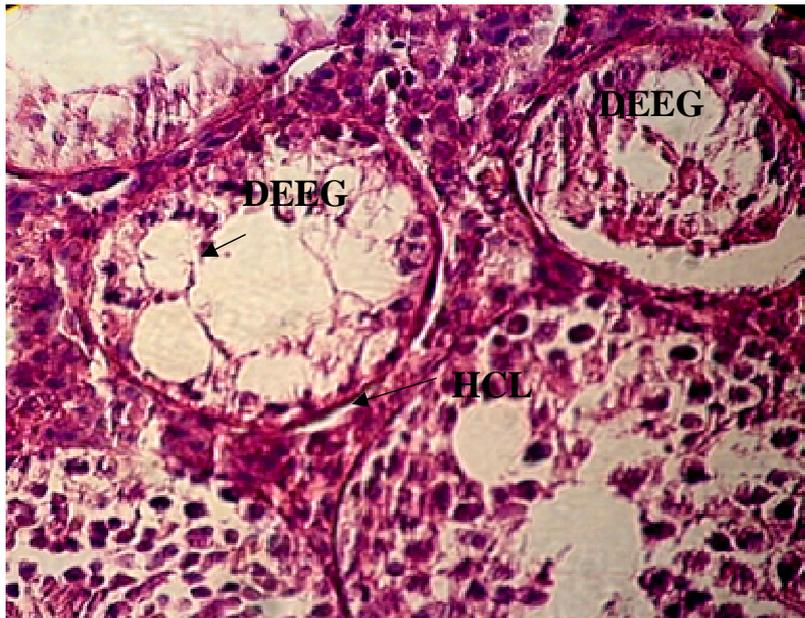
- DC : débris cellulaires.
- HCL : hyperplasie des cellules de LEYDIG.
- VS : Vaisseau sanguin

**Figure 50.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



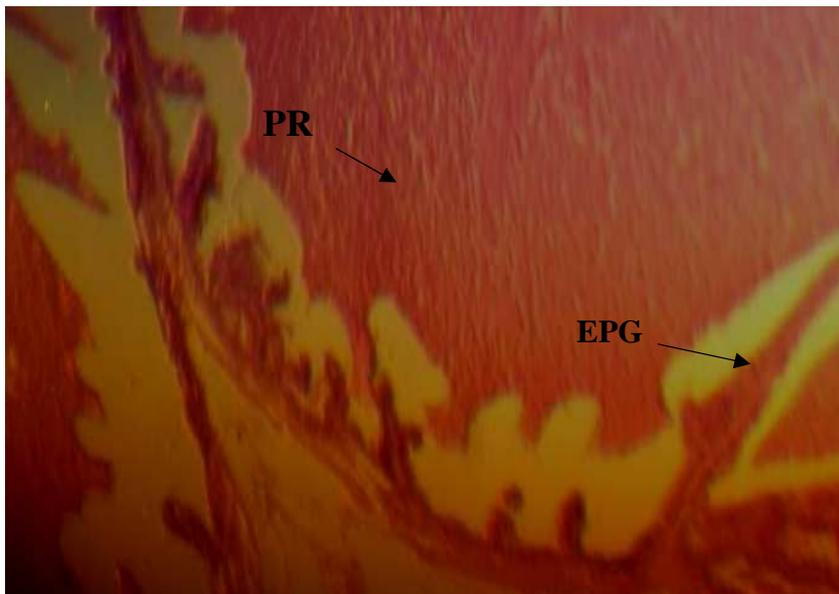
- DC : débris cellulaires.
- ATC : atrophie du tissu conjonctif.

**Figure 51.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



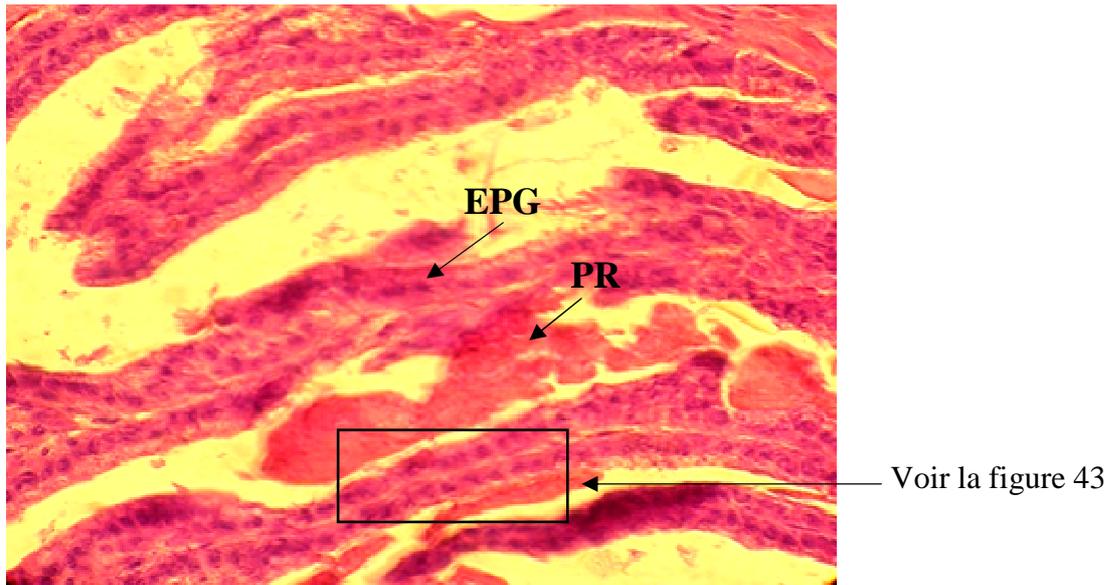
- DEEG : diminution de l'épaisseur de l'épithélium germinale
- HCL : hyperplasie de cellule de LEYDIG

**Figure 52.** Micrographie de coupe histologique au niveau du testicule de souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40).

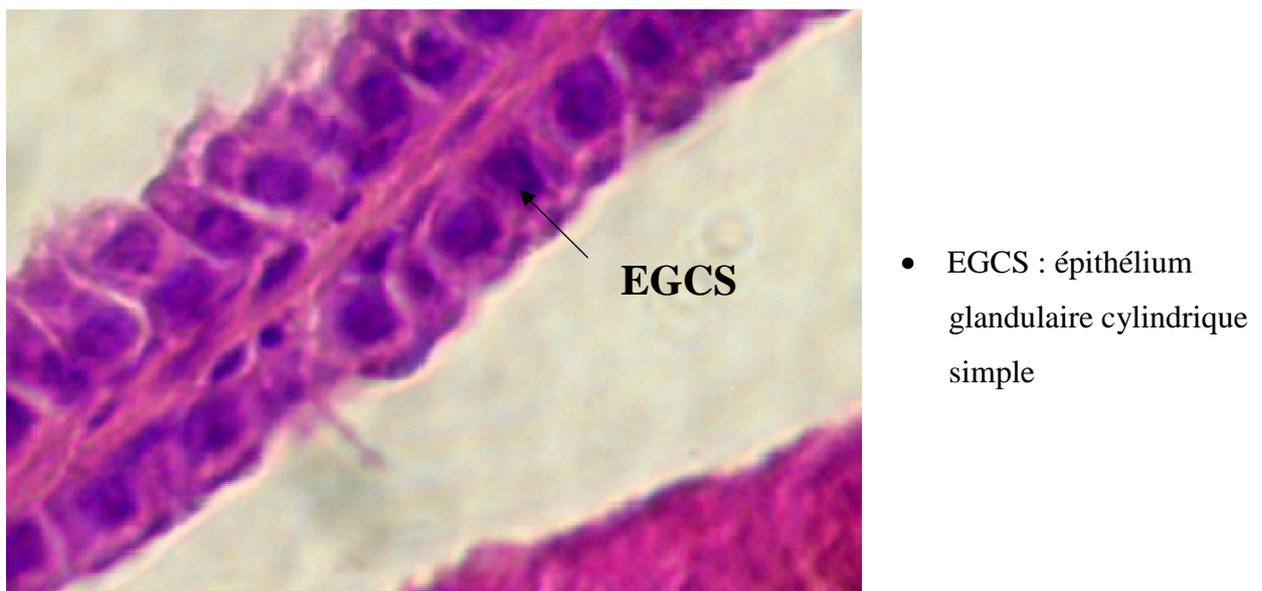


- EPG : épithélium glandulaire.
- PR : produit de sécrétion

**Figure 53.** Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



**Figure 54.** Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x10)



**Figure 55.** Micrographie photonique de coupe histologique de vésicule séminale témoin coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)

vésicules glandulaires exocrine renferment des liquides séminaux soutenus par un tissu conjonctif richement vascularisé.

Les groupes des souris ayant ingéré du lait de soja montre des altérations à différents degrés :

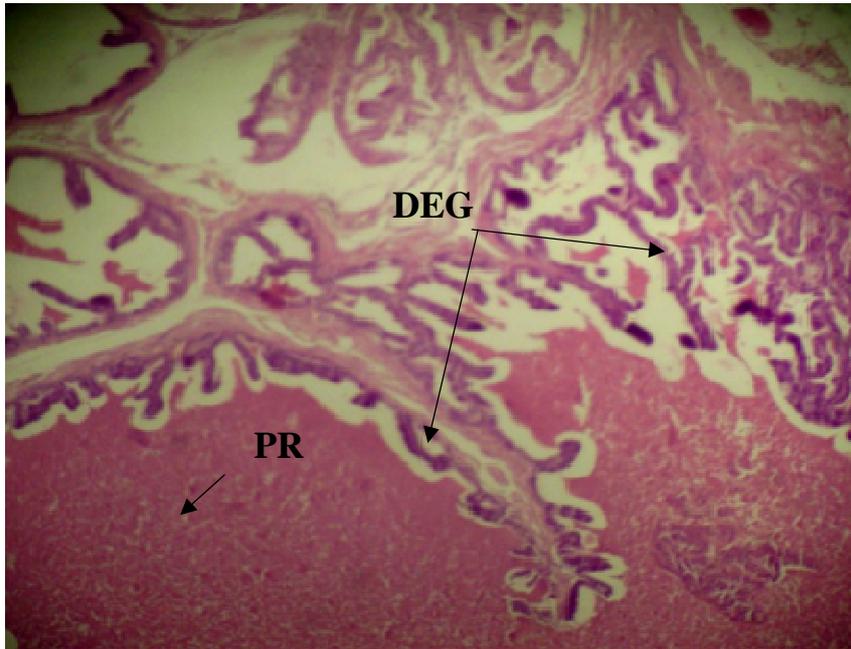
- ❖ Une dystrophie épithélium glandulaire (figure 56).
- ❖ Une atrophie du tissu conjonctif (figure 56).
- ❖ Une accumulation du produit de sécrétion (figure 57).
- ❖ Une hyperplasie glandulaire localisée (figure 58).
- ❖ Une réduction de la taille des cellules glandulaires (modification du rapport nucléoplasmique (figure 59).

### **6.3. Effet de lait de soja sur la structure histologique du foie**

L'observation microscopique réalisée sur coloration topographique des coupes histologiques montre un parenchyme hépatique siège d'une lésion dystrophique diffuse chez tous les groupes expérimentaux. Cependant les hépatocytes sont gonflées comportant des vacuoles intra-cytoplasmiques, les noyaux sont hyper-chromatiques chez les animaux du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> groupe. Ces hépatocytes sont séparés par des sinusoides dont la lumière est réduite ou virtuelle, parfois comblée d'hémorragie au niveau du 2<sup>ème</sup> groupe. On note au niveau des espaces porte un infiltrat inflammatoire nodulaire polymorphe fait de lymphocytes et de plasmocytes mêlées à des polynucléaires au niveau du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> groupe (figure 60).

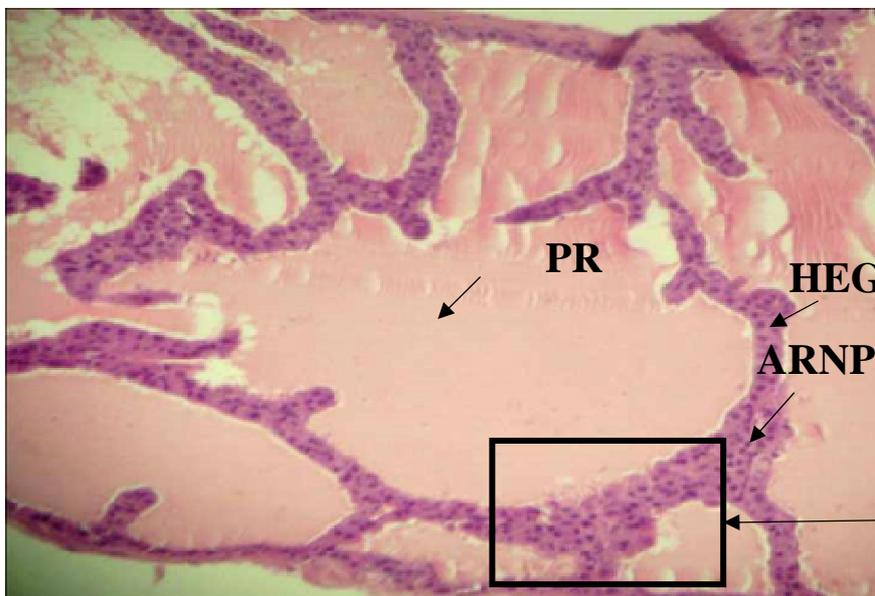
### **6.4. Effet de lait de soja sur la structure histologique des reins**

L'observation microscopique réalisée sur coloration topographique des coupes histologiques révèle que le parenchyme rénal comporte une lésion dystrophique chez tous les groupes expérimentaux ; les tubes proximaux et distaux sont tapissés d'un épithélium cylindrique simple dont le cytoplasme est vacuolaire, et la lumière est parfois réduite. Les glomérules de Malpighi sont atrophiques et collabés, l'espace de Bowman est réduit au niveau du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> groupe. Le tissu conjonctif est discrètement inflammatoire fait de vaisseaux congestifs au niveau du 1<sup>er</sup> groupe (figure 61).



- DEG : dystrophie de l'épithélium glandulaire.
- PR : produit de sécrétion

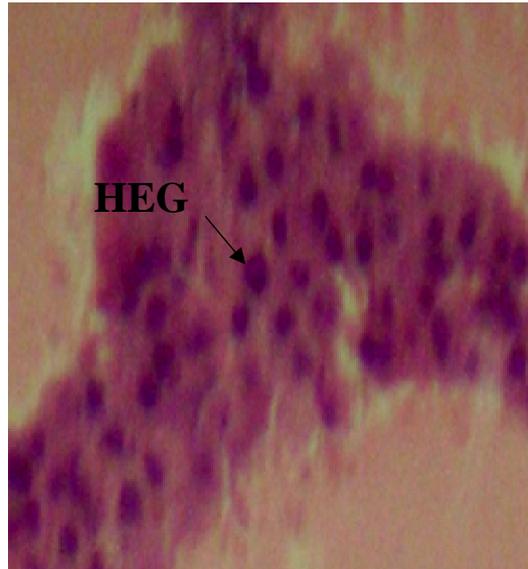
**Figure 56.** Micrographie de coupe histologique des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



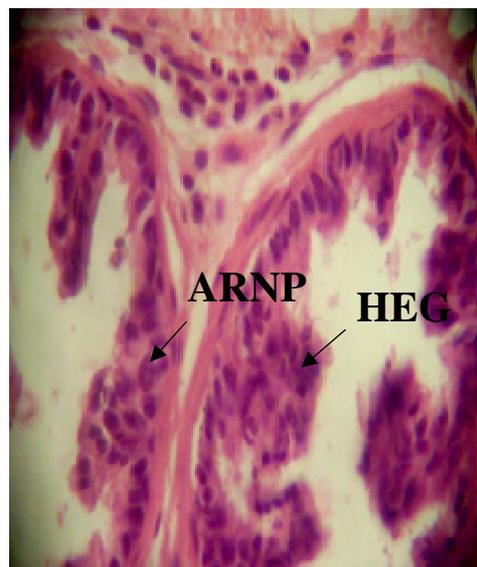
- PR : produit de sécrétion
- HEG : hyperplasie d'épithélium glandulaire
- ARNP : augmentation de rapport nucléoplasmique

Voir figure 46

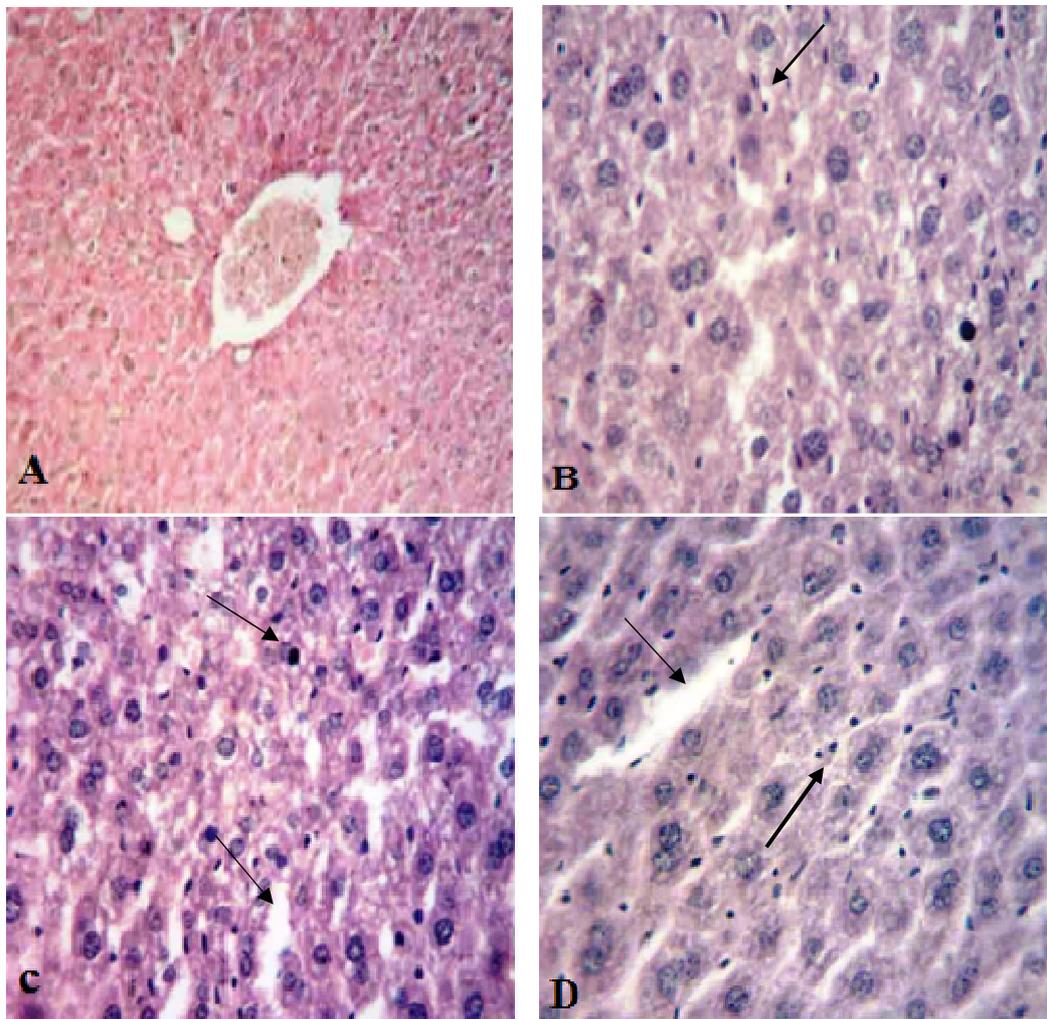
**Figure 57.** Micrographie de coupe histologique des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalun-éosine G (10x40)



**Figure 58.** Micrographie de coupe histologique montrant l'hyperplasie glandulaire des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja coloré à l'hémalum-éosine G (10x40).

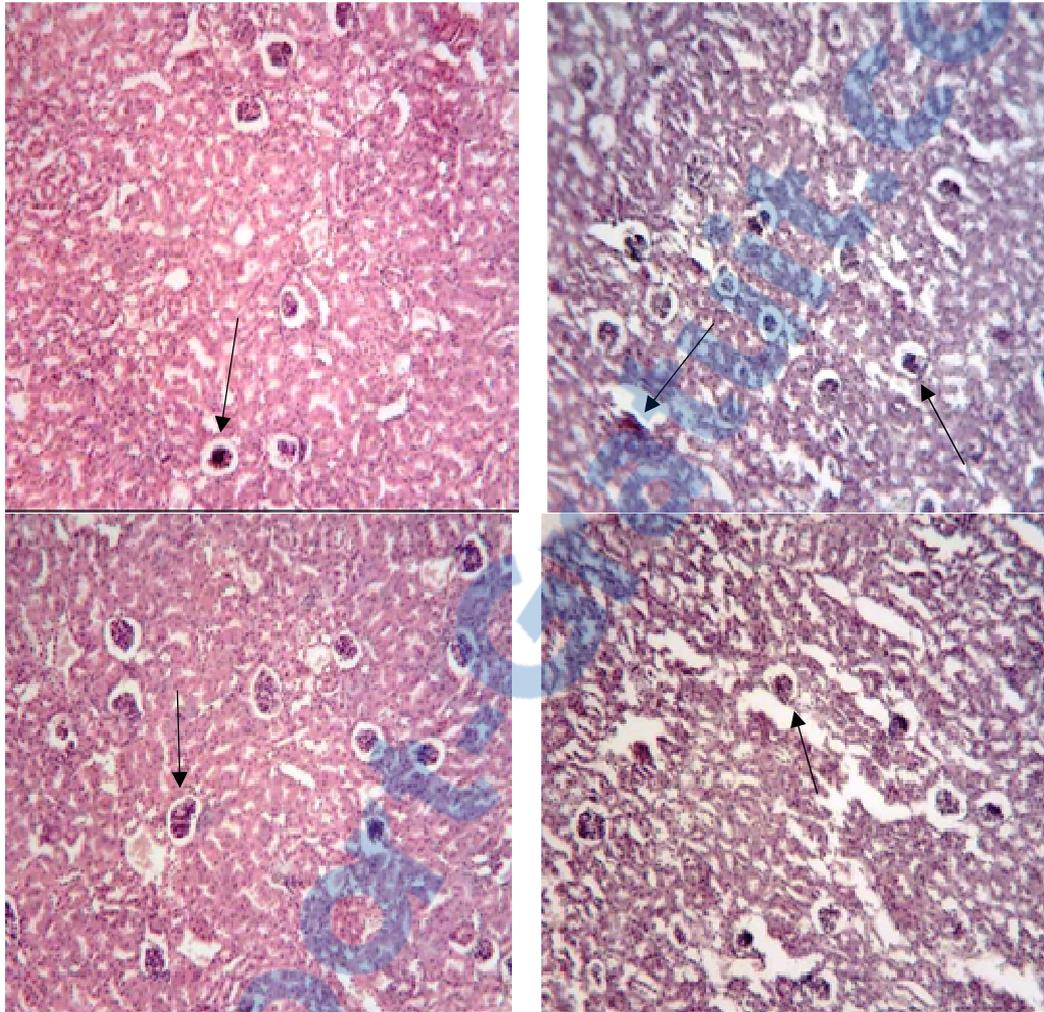


**Figure 59.** Micrographie de coupe histologique montrant l'hyperplasie glandulaire des vésicules séminales des souris ayant ingéré du lait de soja G (10x40).



**Figure 60.** Observation au microscope optique des coupes histologiques du foie des souris Swiss.

**A.** Témoin, veine centrolobulaire (VCL) de taille normal et les sinusoides sont visibles (G×25). **B.** Souris groupe 1, infiltrat inflammatoire et ballonnisation des hépatocytes (G×40). **C.** Groupe 2, Sinusoides dilatées et lésions tissulaires (G×40). **D.** Groupe 3, Sinusoides dilatées et infiltrat inflammatoire (G×40). Coloration à l'hémalun éosine.



**Figure 61.** Observation au microscope optique des coupes histologiques du rein des souris Swiss.

**A.** Témoin, glomérule d'aspect normal (G×25). **B.** Groupe 1, Congestion et l'espace de Bowman est réduit (G×25). **C.** Groupe 2, Les glomérules de Malpighi sont atrophiques et collabés, l'espace de Bowman est réduit (G×25). **D.** Groupe 3, congestion (G×25). Coloration à l'hémalum éosine.

Peu de travaux récents montrent que les phyto-estrogènes peuvent avoir des effets délétères chez l'animal. Les aliments à base de soja constituent la principale source de phyto-estrogènes chez l'homme, il est donc important d'évaluer les niveaux d'apports en phyto-estrogènes contenus dans les aliments à base de soja que peuvent consommer les nourrissons et les jeunes enfants, et de s'interroger sur les risques éventuellement encourus (comité de nutrition, 2006). Les nourrissons alimentés de façon exclusive avec des préparations pour nourrisson à base de protéines de soja constituent aujourd'hui le sous-groupe de la population le plus exposé aux phyto-estrogènes. Il est donc nécessaire que les parents soient informés du fait que ces produits ne conviennent pas au remplacement du lait maternel et des laits infantiles 1er et 2ème âge chez les nourrissons âgés de moins de 1 an et que cette pratique peut être à l'origine d'accidents graves (ANSES, 2013).

Notre travail a pour but d'étudier les propriétés toxicologiques de la consommation du lait de soja sur certaines fonctions et organes chez la souris Swiss mâle. Nous avons analysé l'impact de la consommation de lait de soja sur les différentes périodes de consommation sur les paramètres hématologiques, les paramètres biochimiques sériques, la fertilité et la structure histologique de certains organes.

Dans la première partie de notre travail nous avons déterminé l'effet du lait de soja sur le poids corporel des souris. Aucune modification significative de ce paramètre n'a été observée chez les souris ayant ingéré du lait de soja comparées aux souris témoins.

Nos résultats concordent avec les travaux de McClain et al., (2007) qui ont montré que l'administration chronique et subchronique de la génistéine chez le rat Wistar pendant 4 et 13 semaines n'induisait aucune modification significative du poids corporel.

En revanche selon Mounts et al., (2015) montre que la farine de soja peut jouer un rôle dans la diminution du poids corporel chez les rats Zucker obèses en abaissant l'efficacité énergétique. Une réduction du gain de poids a été observée chez les animaux et les humains nourris avec du soja par rapport à la caséine.

En revanche, chez les lapins et les rats traités aux isoflavones, une diminution significative est rapportée dans l'étude menée par Lephart et al., (2001) et Nagao et al., (2001). Cet effet résulte probablement d'un effet anorexigène des isoflavones de soja. L'association avec la prise alimentaire observée chez le lapin dans la même étude a également été rapporté chez les rats nourris avec des aliments contenant la génistéine (Casanova et al.,

1999), suggérant un effet possible anorexigène du perturbateur endocrinien (PE) sur le système nerveux central, similaire à celle des œstrogènes endogènes (Bonavera et al., 1994).

Cependant cet effet semble être associé à un traitement chronique avec de grandes quantités des isoflavones de soja. Les expositions pré-et postnatales aux isoflavones dans l'étude de Piotrowska et al., (2011) ont montré une diminution du même paramètre.

La deuxième partie de notre étude est consacré sur l'effet de la consommation de lait de soja sur les paramètres hématologiques portés sur les globules blancs, globules rouges et le taux des plaquettes sanguines.

Le système hématopoïétique est une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007). Les changements dans le système hématopoïétique ont une plus grande valeur prédictive pour la toxicité humaine, lorsque les données sont déduite des études réalisées sur des animaux (Olson et al., 2000). A cet égard l'état de l'activité de la moelle osseuse et les effets intravasculaires ont été contrôlés par des examens hématologiques.

La production et la « survie » des globules rouges dépendent du bon fonctionnement de certains organes (moelle osseuse, etc.), mais aussi d'un apport adéquat en vitamines (B12, B9, et C) et en fer. Nos résultats indiquent une diminution très significative GB, GR, PLT, chez les animaux expérimentaux révèlent une anémie aplasique (ou aplastique).

Cette maladie rare survient quand la moelle osseuse ne produit plus assez de globules rouges et blancs. Dans 50 % des cas, l'anémie aplasique est causée par des agents toxiques.

La diminution du taux des plaquettes des souris traités par rapport aux témoins indique que le lait de soja a un effet sur la production des plaquettes ou induit la thrombopénie (réduction du nombre de plaquettes dans le sang). Cet effet est parmi les preuves d'effets toxiques sur l'hématopoïèse. En outre, avec une diminution du nombre de plaquettes, il y a un risque accru de saignements (Slichter, 2004).

Il a été montré en effet que la moelle osseuse peut être une cible pour certains toxiques qui peuvent détruire ses cellules produisant ainsi une diminution du nombre des globules rouges et/ ou des blancs (Robert et Buidinsky, 2000).

La troisième partie de notre étude est consacré sur l'effet de la consommation de lait de soja sur les paramètres biochimiques sériques portés sur l'albumine, le cholestérol, l'urée, la créatinine, l'acide urique, les transaminases (TGO, TGP).

L'albumine représente 55 à 60% d'ensemble des protéines du plasma, c'est le constituant majeur des protéines circulantes. Ses variations pathologiques apprécient les possibilités de biosynthèse hépatique, d'hémoconcentration et de déshydratation (Scherwin, 2003). Elle est entièrement synthétisée dans le foie, son taux physiologique normal varie de 40 à 50 g/l soit 0,5 à 0,7 mmol/l (Valdiguie, 2000).

Elle est le principal agent de la pression oncotique du plasma (elle participe de façon déterminante dans la distribution du liquide extracellulaire entre les compartiments intra et extracellulaire) (Marshall et Bangert, 2005).

Le dosage d'albumine peut nous donner un reflet général sur le fonctionnement hépatique :

Des concentrations abaissées en albumine sont caractéristiques des pathologies hépatiques chroniques.

Les données de notre expérimentation animale démontrent que le lait de soja administré aux groupes 1, 2 et 3 entraîne une élévation de taux d'albumine chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Cette hyperalbuminémie peut être un signe biologique de déshydratation ou d'altération du métabolisme. Dans les cas où l'hyperalbuminémie est survenue, une administration intraveineuse excessive d'albumine ou une déshydratation peut être responsable.

Dans ce contexte les travaux entrepris par Stockmann et al., (2002) cité que leur taux augmente au cours d'une atteinte hépatique etaturent les molécules d'albumine pour conséquence une capacité réduite à détoxifier le foie.

Par ailleurs d'après Marshall et Bangert, (2005) les isoflavones provoquent une diminution du taux de l'albumine circulant dans le sang, cette diminution va entraîner par conséquence une diminution de la pression oncotique plasmatique ce qui perturbe par la suite l'équilibre liquidien entre le plasma et l'espace interstitiel, de sorte qu'il y a une diminution du retour du liquide interstitiel vers le sang au niveau de l'extrémité veineuse des capillaires.

Le cholestérol est à la fois apporté par l'alimentation et synthétisé par le corps humain, principalement dans les cellules hépatiques et intestinales.

Le cholestérol est un constituant fondamental de la membrane cellulaire, un précurseur métabolique des acides biliaires, de vitamines et des hormones stéroïdiennes.

Le cholestérol est éliminé de l'organisme au niveau du foie, après avoir été transformé en acides biliaires. Les acides biliaires entrent alors dans l'iléum pour être excrétés. Les acides biliaires servent à dégrader le cholestérol mais également les oxystérols et les hormones stéroïdes (Lefebvre et al., 2009). Le dosage du cholestérol total permet de dépister une hypocholestérolémie ou l'inverse (Rifai et al., 2003; Ricardo José Rodrigues et al., 2008).

L'analyse du cholestérol sérique montre l'existence d'un profil d'hypocholestérolémie chez les souris traitées au lait de soja.

Les professionnels de la santé conseillent aux personnes souffrant d'hypercholestérolémie de remplacer (au moins partiellement) les protéines animales par des protéines végétales comme celles de soja. En 1999 et en 2002, les autorités médicales américaines et britanniques ont officiellement reconnu l'effet bénéfique du soja sur le cholestérol sanguin. Il a également été prouvé que la consommation de protéines de soja diminue les risques cardio-vasculaires. Le lait de soja compte autant de protides (4 %) que le lait de vache, et le tofu quasiment autant (14 %) qu'un filet de bœuf. Et tout cela, sans les inconvénients de la graisse saturée et du cholestérol ! Ces "laitages" végétaux à base de soja sont donc de grands fournisseurs de protéines sans "mauvaises graisses" associées (Food and Drug Administration) (USA 1999).

Nos résultat concordent avec les travaux de Sedaghat, et al., (2015) qui ont montré que la consommation de soja réduit significativement le cholestérol total chez les patients atteints de diabète de type 2.

De même l'étude Hermansen et al., (2001) a montré que la consommation de soja pourrait réduire le cholestérol total de 8%, lorsque les patients diabétiques de type 2 ont consommé 70 g de soja par jour pendant une période de six semaines. En outre, Jayagopal et al., 2002 ont obtenu une baisse de 4,1% dans le cholestérol total en 32 femmes ménopausées diabétiques consommant 30 grammes de soja (phytoestrogènes) par jour pendant 12 semaines, qui est similaire à nos données. Ainsi ; Chang et al., (2008) ces resultat cohérent avec notre constatation. Liao et al., (2007) ont montré que 45 grammes de soja ajouté au régime alimentaire faible en calories (1200 kcal) pendant huit semaines pourrait abaisser le cholestérol total. Shahbazian et al., (2007) ont montré des effets bénéfiques lorsque nous ingérons 25 grammes de soja (isoflavones) de protéines durant trois mois le niveau des lipides et la concentration du glucose sanguin baissent chez des patients diabétiques de type 2.

En mars 2005 le rapport de l'AFSSA indiquent que les préparations de protéines de soja, a un niveau d'apport au moins égal à 30 g/j, ont une action bénéfique sur le statut du cholestérol plasmatique.

L'urée est le terme ultime et principal du catabolisme protéique chez l'homme. Il se forme dans le foie et il diffuse librement à travers les membranes cellulaires. Son élimination se fait par le rein par filtration glomérulaire et sa réabsorption tubulaire partielle est passive. Le dosage de l'urée sanguin permet, avec celui de la créatinine et l'acide urique, de détecter l'insuffisance rénale (Metais et al., 1990).

Dans notre étude nous avons obtenus une augmentation significative de l'urée des souris traité comparée aux témoins, ces résultats sont également en accord avec ceux de Frank, (1992) qui ont montré qu'un taux élevé de l'urée indique généralement une atteinte glomérulaire, mais la concentration peut être aussi modifiée par une alimentation inadéquate ou une hépatotoxicité, fréquente avec de nombreux toxiques .

Par contre selon Manna et al., (1992) ; la consommation d'un régime qui inclut la protéine de soja réduit l'excrétion urinaire de protéines chez les patients néphrotiques et ceux avec une maladie rénale avancée .

Le dosage de l'urée sanguin permet, avec celui de la créatinine et l'acide urique, de détecter l'insuffisance rénale selon (Metais, 1990).

De même, la créatinine plasmatique est le reflet de la masse musculaire globale de l'individu et son métabolisme propre dont toute variation renseigne directement sur l'état fonctionnel du rein, de plus la créatinine mesure directement la filtration glomérulaire (Siest, 1990).

De même, la créatinine est une molécule azotée produite par l'organisme par l'intermédiaire du catabolisme de la créatine qui est un composé protéique contenu dans le tissu musculaire. La créatinine est une molécule inerte physiologiquement (Andrew et al., 1988). Cela signifie qu'elle n'est ni métabolisée, ni utilisée d'une quelconque manière par l'organisme.

La créatinine est strictement éliminée par les reins. Une faible partie de la créatinine produite par l'organisme est éliminée grâce au phénomène de sécrétion au niveau des tubules proximaux des reins. Son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire (Charriere et al., 2008). Cette estimation s'obtient, en pratique, par le calcul de la clearance de la créatinine.

Nos résultats indiquent une augmentation significative des taux de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique chez les groupes expérimentaux traité au lait de soja vs le groupe témoin.

En effet, cette hyperurémie sanguine associée à une hypercréatinémie et un taux élevé de l'acide urique témoignent et reflètent probablement une insuffisance rénale (De laFarge, 1993).

Nos résultats concordent avec les travaux de (Frank, 1992) qui ont montré qu'une élévation de sa concentration dans le sang est une indication de dysfonctionnement rénal ; des données sur sa concentration sanguine et urinaire peuvent être utilisées pour estimer le taux de filtration glomérulaire.

La diminution des transaminases chez le groupe traité au lait de soja ne signale aucun problème.

Nos résultats révèlent une diminution des transaminases chez le groupe traité au lait de soja et cela ne signale aucun problème. Ces résultats concordent avec l'étude in vivo dans le foie de Brito et al., (1992) qui montre une diminution de transaminase chez le rat recevant le soja. En outre l'étude réalisée par Jean et al., (2001) montre une augmentation de l'activité des transporteurs d'acides aminés dans les hépatocytes et des transaminases chez le rat recevant un régime hyperprotéique contenant de soja.

Cependant, les résultats des coupes histologiques du foie des souris témoins montrent des hépatocytes séparées par des sinusoides étroites.

Nos résultats révèlent des hépatocytes gonflées comportant des vacuoles intracytoplasmiques, les noyaux sont hyper-chromatiques. Les lésions dystrophiques sont beaucoup plus importantes sur le parenchyme hépatique que le parenchyme rénal. Les lésions les plus marquées au niveau du foie sont la dystrophie des hépatocytes et l'infiltrat inflammatoire des espaces porte réalisant une hépatite subaigüe. Ces altérations expliquent souvent l'augmentation du volume du foie et l'amaigrissement de l'animal. Rasheed et al., (2009) ont démontrés des cas semblables chez les rats Albinos après injection de l'extrait de *Eugenia jambolana*. Nos résultats sont similaires à ceux de Mekkawy et al., (1998) qui rapportent une ballonnisation, vacuolisation des hépatocytes.

L'observation microscopique réalisée sur des coupes histologiques du rein révèle que les reins des souris témoins ont des glomérules et des tubules normaux, cependant, les reins des souris expérimentaux démontrent des lésions rénales se traduisant par des glomérules de

Malpighi atrophiques et collabés, la réduction de l'espace de Bowman, d'un tissu conjonctif discrètement inflammé et une lésion dystrophique du parenchyme. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux d'Aboel-Zahab et al., (1997) qui montrent une pigmentation des tubules rénaux. Alors que l'étude de Sasaki et al., (2002) rapporte que des colorants alimentaires azoïques, dont la tartrazine, l'amarante, le rouge Allura et le nouveau Coccine induisent des dommages d'ADN dans le foie et le rein à des doses égales à 500 mg/kg chez la souris.

La cytotoxicité directe est connue pour étant la cause fondamentale des dommages du foie dans certains cas, tandis que dans d'autres, les mécanismes immunologiques ou même un mélange de cytotoxicité et d'immunogénicité peuvent être impliqués (Ingwale et al., 2009). Cette anomalie dans le foie et le tissu rénal pourrait être due à la présence de certains composés toxiques dans le lait de soja. Ces substances toxiques peuvent être les phytoestrogènes dans la toxicité est à démontré suite à une transformation en métabolites réactifs toxiques. Au niveau hépatique les métabolites sont formés non seulement dans les hépatocytes mais aussi dans les cellules endothéliales qui sont particulièrement sensibles. Il en résulte une atteinte vasculaire prédominante, secondairement responsable de la nécrose hépatocytaire.

Aucune étude n'est disponible dans la littérature qui démontre l'effet de lait de soja ou l'un de ces constituants sur la structure histologique du foie et rein.

La quatrième partie de notre travail a été consacrée aux conséquences de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine des souris Swiss par un test de fertilité, le dosage de la testostérone, le poids relatif des organes les testicules, l'épididyme et les vésicules séminales. Le comptage des spermatozoïdes, leur morphologie et leur mobilité puis une étude histologique est effectuée sur les testicules et les vésicules séminales.

La fertilité chez les mammifères est très sensible aux perturbations de l'organisme par les agents exogènes. De nombreuses études indiquent une diminution du nombre et de la qualité des cellules sexuelles mâles humaines au cours de ces dernières années (Jegou, 1996). Il semble que les perturbations de l'appareil sexuel humain mâle se multiplient. Plusieurs composés exogènes incluant les pesticides, les drogues, les solvants organiques, le tabac (Tuormaa, 1995), les xénohormones (Toppari et al., 1996). Bien que les mécanismes biochimiques de leur toxicité ne soient pas encore bien compris, ils sont considérés comme de véritables agents toxiques, touchant la fertilité (Xie, 1995 ; El Feki et al., 2000).

Peu de travaux récents montrent que les phyto-estrogènes peuvent avoir des effets délétères chez l'animal, en particulier sur le développement et la maturation des organes sexuels, et sur la fertilité (Auger, 2008). Les aliments à base de soja constituent la principale source de phyto-estrogènes chez l'homme, il est donc important d'évaluer les niveaux d'apports en phyto-estrogènes contenus dans les aliments à base de soja que peuvent consommer les nourrissons et les jeunes enfants, et de s'interroger sur les risques éventuellement encourus (comité de nutrition, 2006). Les nourrissons alimentés de façon exclusive avec des préparations pour nourrisson à base de protéines de soja constituent aujourd'hui le sous groupe de la population le plus exposé aux phyto-estrogènes. Ce lait industriel à base de protéines de soja constitue la principale source de phyto-estrogènes chez l'homme. Ces composés chimiques naturels sont susceptibles d'avoir une toxicité sur la fonction de reproduction, car ils sont capables de stimuler, favoriser ou inhiber l'action des hormones d'où ils peuvent en théorie modifier le processus physiologique soumis à une régulation endocrinienne (Fujioka et al., 2004, Romero et al., 2008), c'est la raison pour laquelle ce travail a été entrepris.

La cinquième partie de notre travail a été consacrée au test de fertilité. Les résultats de notre expérimentation montrent que les femelles témoins accouplées avec les mâles ayant ingéré du lait de soja présentent un taux de gestation (index de fertilité) significativement réduit par rapport aux femelles accouplées avec des mâles témoins.

La descendance des souris mâles ayant ingéré du lait de soja a vu leur poids et leur taille diminuer dès la naissance (J7) puis à J14 et jusqu'au sevrage (J28).

Ces résultats sont également en accord avec ceux de McClain et al., (2007) qui ont montré que l'administration de la génistéine dosée à 500 mg/ kg/ jour entraîne une réduction marquée du taux de gestation ainsi qu'une réduction significative de la taille et du poids des petits.

Egalement une autre étude faite par Eustache et al., (2003) a montré que l'exposition de la génistéine et la vinclozoline, de la gestation à l'âge adulte chez les rats Wistar mâles, provoque un taux réduit de femelles gestantes qui se sont accouplées avec les mâles exposés.

Les travaux d'Jian et al., (2007) ont montré que l'injection de la zearalenone ou  $\alpha$ -zearalenol conduisait à une réduction de la fertilité et donc du potentiel reproducteur chez les souris mâles adultes. Le taux de gestation est sensiblement réduit chez les souris femelles accouplées avec les mâles traités à la zearalenone et  $\alpha$ -zearalenol. Également, une diminution

du nombre de naissance est probablement due à la mauvaise qualité du sperme des mâles exposés à la zearalenone et  $\alpha$ -zearalenol.

De même, l'étude faite par Weber et al., (2001) ; Wisniewski et al., (2003) ; Opalka et al., (2006) a montré que l'exposition des oiseaux et des mammifères aux phyto-estrogènes, des analogues des œstrogènes, (la génistéine) induit une réduction de la fertilité chez ces animaux.

Par ailleurs, nous avons évalué le poids relatifs des organes sexuels des souris Swiss. Nous n'avons obtenu aucune modification significative des poids relatifs des testicules, des épидидymes et des vésicules séminales des groupes ayant ingéré du lait de soja comparés au groupe témoin.

Ces résultats concordent avec ceux de Ohno et al., (2003); Lee et al., (2004) qui ont démontré que le poids relatif des organes sexuels des rats ne change pas.

Une autre étude faite par Cardoso et Bào, (2007) montre également qu'il n'ya aucune modification du poids des testicules chez les lapins.

Par ailleurs, d'après Vendula, (2004), l'exposition à la génistéine et au diethylstilbestrol, induit une réduction significative des poids relatifs des testicules, des épидидymes et des vésicules séminales.

Les travaux entrepris par Piotrowska et al., (2011) ont montré que l'exposition pré-et postnatales aux isoflavones chez les rats induit une augmentation du poids des testicules par rapport au groupe contrôle. Cependant, aucune modification n'a été observée dans les épидидymes.

Ces résultats concordent avec les résultats de Guan et al., (2008), et de Jiang et al., (2008). Cependant une augmentation de poids des testicules a été observée dans l'exposition périnatale du visons à la génistéine (Ryokkynen et al., 2005) et en pré-et postnatale des souris traitées avec la génistéine (Wisniewski et al., 2005).

En revanche, certains chercheurs ont rapporté que l'administration d'œstrogènes exogènes ou anti androgènes diminue le poids des testicules et de l'épидидyme (Pryor et al., 2000) ; (Atanassova et al., 2005); (Sugawara et al., 2006).

La méthode de routine pour évaluer la fertilité potentielle d'un mâle est la réalisation d'un spermogramme au cours duquel des paramètres séminaux quantitatifs (nombre des spermatozoïdes) et qualitatif (la mobilité et les anomalies morphologiques des spermatozoïdes

(formes anormales) sont analysés. La diminution de la mobilité et du nombre des spermatozoïdes au niveau testiculaire et épидидymaires que nous avons observé chez les souris ayant ingéré du lait de soja est probablement dû à l'effet des phyto-estrogènes de soja sur les différents niveaux de commande de la spermatogénèse.

Nos résultats révèlent une diminution importante et très significative du pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires chez les souris des groupes ayant ingéré du lait de soja par rapport aux témoins.

Dans l'étude de Jian et al., (2007), les pourcentages de la mobilité des spermatozoïdes de tous les animaux exposés à la zéaralénone et ses dérivés-zearalenol, à toutes les doses, ont été nettement inférieurs à ceux des contrôles. Ces résultats concordent avec ceux de Eustache et al., (2003) qui ont montré que l'exposition de la génistéine et à la vinclozoline à faible dose de la gestation à l'âge adulte chez les rats Wistar mâle induit une diminution de la mobilité des spermatozoïdes .

Par contre, Yousef et al., (2003), ont démontré que chez le lapin, la génistéine provoquait l'augmentation de la mobilité des spermatozoïdes.

Nos résultats montrent également une diminution importante et très significative du nombre des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires qui est observée chez les souris des groupes ayant ingéré du soja.

Dans ce contexte, les travaux entrepris par Dalu et al., (2002), n'ont cité aucune modification chez les rats ingérant par voie orale de la génistéine confirmant les résultats de Nagao et al., (2001) et de Shibayama et al., (2001).

Cependant, Piotrowska et al., (2011) ont montré qu'il n'y avait aucun changement significatif dans le nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme chez les rats exposés aux isoflavones. Un effet similaire obtenu à l'exposition à long terme de génistéine chez les visons Ryokkynen et al., (2005), chez le rat après exposition périnatale (Wisniewski et al., 2003), et chez les souris avec différentes doses de génistéine (Wisniewski et al., 2005).

Nos résultats ont aussi révélé, que le pourcentage de la tératozoospermie (anomalie morphologique des spermatozoïdes) est plus important chez les souris ayant ingéré du lait de soja.

Ces résultats concordent avec ceux de Jian et al., (2007), qui montrent que le pourcentage des spermatozoïdes anormaux a augmenté chez les souris mâles exposés la zéaralénone et ses dérivés-zearalenol.

Par ailleurs, aucune différence significative de pourcentage des formes anormales des spermatozoïdes n'a été observée chez les rats exposés à la génistéine pendant 4 semaines Bhandari et al., (2003).

Nos résultats ont aussi révélé une baisse importante du taux de la testostérone sérique chez les souris ayant ingéré du lait de soja lors de l'exposition pendant la période de l'allaitement par rapport aux contrôles.

Nos résultats concordent, avec ceux rapportés par la littérature (Roberts et al., 2000 ; Delclos et al., 2001 et Wisniewski et al., 2003 ), qui ont démontré que des doses élevées de la génistéine chez les rats mâles réduisent les niveaux de testostérone.

En outre, l'étude réalisée par (Svechnikov et al., 2005), a montré que la génistéine administrée chez les rats mâles adultes pendant 3 mois, ainsi que l'étude de Taxvig et al., (2010) faite in vitro ont observé une diminution de la production de testostérone après l'exposition aux isoflavones.

En revanche, l'exposition de la génistéine à long terme chez les rats adultes n'a pas modifié le niveau de testostérone sérique, (Svechnikov et al., 2005). La même observation à été faite dans les études de (Kang et al., 2002; Fielden et al., 2003 ; Masutomi et al., 2003 et Wisniewski et al., 2005).

Dans une autre étude, aucune différence significative de la concentration sérique de la testostérone n'a été observée chez les rats exposés à la génistéine (Piotrowska et al., 2011).

La dernière partie de notre travail nous a permis d'évaluer l'impact du lait de soja sur l'aspect histopathologique des testicules et des vésicules séminales.

L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des testicules des souris ayant ingéré du lait de soja, a montré une diminution du nombre des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères.

Nos résultats montrent également des altérations et des modifications dans les différents stades de la spermatogenèse, diminution de l'épaisseur de l'épithélium germinal, présence des spermatides non différenciés qui remplissent les lumières des tubes séminifères, l'atrophie du tissu conjonctif et l'hyperplasie des cellules de Leydig.

Dans le même contexte, l'exposition chronique au lait de soja peut provoquer des effets délétères sur la structure des vésicules séminales.

Nos résultats ont montré que le lait de soja induit des altérations à différents degrés chez les souris ayant ingéré du lait de soja (dystrophie de l'épithélium glandulaire, hyperplasie glandulaire localisée, réduction de la taille des cellules glandulaires, accumulation du produit de sécrétion et atrophie du tissu conjonctif).

Une étude menée par Piotrowska et al., en 2011, chez les rats exposés aux isoflavones pendant la période prénatale et postnatale jusqu'à la maturité sexuelle a montré des changements au niveau de l'épithélium séminifère des testicules ainsi que la présence des spermatozoïdes non différenciés dans la lumière des tubes séminifères.

Selon certains chercheurs, des anomalies morphologiques dans les testicules sont induites par les produits ayant des propriétés œstrogéniques et administrés dans la vie néonatale (Atanassova et al., 2005). Dans l'épithélium séminifère des souris exposées pré-et néonatale au diéthylstilbestrol, il a été observé une hypoplasie des cellules de Leydig (Warita et al., 2006).

En revanche, l'étude de Cardoso et Bào en (2007), ont montré que l'exposition chronique de la farine de soja chez les lapins mâles n'induit aucun changement histopathologique des organes génitaux masculins (testicules, vésicules séminales, épididymes...)

De même, aucun signe histopathologique n'a été observé dans l'étude de McClain et al., (2007).

Les perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement sont de plus en plus mis en cause pour expliquer les modifications de la fonction de reproduction mâle, y compris chez l'homme. Cependant, leurs mécanismes d'action sur la fonction de reproduction sont peu connus et le lieu de causalité chez homme n'est pas démontré. Parmi les études expérimentales rapportées, les conditions d'exposition sont le plus souvent très éloignées de la situation environnementale (doses élevées, courte période d'exposition ...)

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de la consommation du lait de soja (BIOMIL® SOY) qui est commercialisé en Algérie sur l'appareil reproducteur mâle chez la souris Swiss utilisée comme modèle expérimental.

Le lait de soja est un produit diététique sans lactose, sans saccharose, sans gluten et sans protéines du lait de vache. Il est enrichi en méthionine, en carnithine, en fer et en zinc. Ce lait industriel à base de protéines de soja constitue la principale source de phyto-estrogènes chez l'homme. Ces composés chimiques naturels sont susceptibles d'avoir une toxicité sur la fonction de reproduction, car ils sont capables de stimuler, favoriser ou inhiber l'action des hormones d'où ils peuvent en théorie modifier le processus physiologique soumis à une régulation endocrinienne.

Ce travail a permis d'évaluer de façon expérimentale quelques effets toxiques de la consommation du lait de soja chez les souris Swiss mâles. L'étude a porté sur la croissance pondérale. Les reins, le foie et les testicules, l'épididyme et les vésicules séminales sont prélevés et pesés, la mobilité, le comptage et la morphologie des spermatozoïdes et à faire un test de fertilité (poids et taille des petits à J7, J14 et J28) et enfin; on a procédé une prise de sang pour le dosage de la testostérone, les analyses hématologiques et biochimiques sériques ainsi qu'une étude histologique des testicules, vésicules séminales, les reins et foie.

Nos résultats ont montré que le poids corporel ne subit aucune modification significative chez l'ensemble des groupes expérimentaux ayant ingéré du lait de soja. De même, aucun changement du poids relatif des organes sexuels mâles n'a été observé.

Cependant les souris traitées au lait de soja présentent une hyper albuminémie, une hypocholestérolémie, une hyper urémie associée à une hyper créatinémie et un taux élevé en acide urique, ainsi qu'un taux normal des transaminases.

De même les souris traitées au lait de soja présentent une diminution très significative GB, GR, PLT, chez les animaux expérimentaux révèlent une anémie aplasique.

Par ailleurs, nous avons observé une diminution de la mobilité des spermatozoïdes ainsi que leur nombre aux niveaux testiculaire et épидидymaire, de même une augmentation du pourcentage des formes anormales des spermatozoïdes chez les groupes ayant ingéré du lait de soja a été observée.

De même, l'effet du lait de soja sur la descendance s'est manifesté par une diminution du poids et de la taille des portées ainsi qu'un taux de gestation (index de fertilité) réduit chez les femelles qui se sont accouplées avec des mâles ayant ingéré du lait de soja.

D'autre part, le taux sérique de la testostérone a diminué chez le groupe ayant ingéré du lait de soja pendant la période d'allaitement.

L'examen histopathologique des souris ayant ingéré du lait de soja induit des altérations au niveau des testicules, des vésicules séminales, les reins et le foie

Par ailleurs, les différences morphologiques sont plus marquées chez les animaux ayant ingéré du lait de soja comparés aux témoins.

L'analyse histologique de l'architecture tissulaire révèle une action toxique due à la consommation du lait de soja sur ces organes.

Le lait de soja, de part ses constituants (phytoestrogènes, perturbateurs du système endocrinien), à des effets délétères sur la mise en place du potentiel reproducteur masculin chez la souris Swiss.

Ce que nous pourrions tirer comme conclusion générale de cette étude c'est que l'administration du lait de soja en substitution au lait de vache chez les enfants allergiques au lait bovin n'est pas sans risque. De ce fait, le lait maternel reste le meilleur aliment pour prévenir l'apparition de manifestations allergiques chez un nourrisson allergique.

Ce travail ouvre d'autres perspectives de recherche sur les effets toxiques du lait de soja, particulièrement son impact sur :

- ✓ L'évaluation de la qualité nucléaire, du mouvement et du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

- ✓ L'effet sur la fertilité féminine.

- **Abel MH, Baban D, Lee S, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ.** 2009. Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol*, 42(4):291-303.
- **Adrian J, Potus J, Frangne R.** 1995. Evaluation toxicologique et nutritionnelle des alginates. *Sci Aliments*, 6 : 473-544.
- **AFSSA.** 2005. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation.
- **AFSSA.** 2006. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation-recommandations.
- **ANSES.** 2013. l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Relatif aux risques liés à l'utilisation de boissons autres que le lait maternel et les substituts du lait maternel dans l'alimentation des nourrissons de la naissance à 1 an.
- **Allain P.** 2005. Etude chez l'animal ou étude préclinique. In les médicaments 3<sup>ème</sup> édition. Pharmacorama.
- **Anderson RA, Sharpe RM.** 2000. Regulation of inhibin production in the human male and its clinical applications. *International Journal of Andrology* 23 : 136-144.
- **Andrew S, Levey, Ronald D, Perrone, Nicolaos E.** 1988. Serum creatinine and renal function. *Ann.Rev.Med.*39:465-90.
- **Atanassova NN, McKinnel C, Fisher J, Sharpe RM.** 2005. Neonatal treatment of rats with diethylstilbestrol (DES) induces stromal-epithelial abnormalities of the vas deferens and cauda epididymis in adulthood following delayed basal cell development. *Reproduction*;129:589-601.
- **Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM.** 2005. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol*,184:107-17.
- **Auger J, Eustache F.** 2000. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 10 : 358-373.
- **Auger J.** 2008. service d'histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction /CECOS, Pavillon Cassini , Hôpital Cochin .Programme National De Recherche Sur Les Perturbateurs Endocrininiens –Workshop-PNRPE, P 7 .

- **Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y.**2001. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump . *Biochim Biophys Acta* ; 1511 :7-16.
- **Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU.** 1993. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that Wbroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem*, 41:335-341.
- **Barham D,Trinder P.** 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by oxidase system. *Analyst*,79:142-145.
- **Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP.** 2001. Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Infant formulas and soy pretein based formulas : current data. *Arch Pediatr*, 8:1226-33.
- **Bringer J et Lefebve P.** 2002. Les phytoestrogènes. *Cahiers de nutrition et de diététique*, vol 37, n°3 :166-170.
- **Brun JF, Caillard C, Mercier J, Raynaud E.** 2004. *Physiologie humaine, les fondement de la médecine.* Edition Masson, Paris, 683p.
- **Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, and Dym M.**1977.Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 74, 68-85.
- **Berson A, Renault S, Lette'ron P, Robin M A, Fromenty B, Fau D, Le Bot M A, Riche C, Durand-Schneider AM, Feldmann G, Pessayre D.** 1996. Uncoupling of rat and human mitochondria: A possible explanation for tacrine-induced liver dysfunction *gastroenterology*, 110:1878-1890.
- **Berson A, Fau D, Fornacciari R, Degove-Goddard P, Sutton A, Descatoire V, Haouzi D, Lette'ron P, Moreau A, Feldmann G, Pessayre D.** 2001. Mechnism for experimental buprenorphine hepatotoxicity: Major role of mitochondrial dysfunction versus metabolic activation. *J Hepatol*, 34:261-269.
- **Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP.** 2001.Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Infant formulas and soy protein-based formulas: current data. *Arch Pediatr*,8 : 1226–33.
- **Bonavera JJ, Dube MG, Kalra, PS, Kalra, SP.** 1994. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134 (6):2367–2372.

- **Boissieu D, Dupont C.** Time course of allergy to extensively hydrolyzed cow's milk protein in infants. *J. Pediatr*, 2007; 136: 119-120.
- **Brennan J, Tilmann C, Capel B.** 2003. Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*, 17(6):800-810.
- **Bridges NA, Hindmarsh PC, Pringle PJ, Matthews DR, Brook CG.** 1993. The relationship between endogenous testosterone and gonadotrophin secretion. (edition oxford) *Clin Endocrinol* 38:373– 378.
- **Brito MN, Brito NA, Migliorini RH.** 1992. Thermogenic capacity of brown adipose tissue is reduced in rats fed a high protein diet, carbohydrate free diet. *J. Nutr*;122:2081-2086.
- **Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM.** 2003. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol Reprod*, 68(6):2241-2248.
- **Caldwell SH, Hespeneide EE.** 2002. Subacute liver failure in obese women. *Am J Gastroenterol*, 97:2058-2062.
- **Cardoso JR, Bào SN.** 2007. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 97 : 237–245
- **Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA.** 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague–Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci*, 51 (2), 236–244.
- **Chang HS, Anway MD, Rekow SS and Skinner MK.** 2006. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology*, 147, (12): 5524-5541.
- **Chatenet C.** 2007. Les phytoestrogènes dans les laits infantiles à base de soja (*Glycine max.*). Edition S.N: 238p.
- **Chatenet C.** 2008. Les phytoestrogènes. *Actualités pharmaceutiques* 473: 11-12 .
- **Chavéron H.** 1999. La toxicologie nutritionnelle édition TEC et DOC Londres New York, Paris ,214p.
- **Chambolle M.** 2002. Estimation des consommations d'additifs et auxiliaires et fabrication dans les industries agroalimentaires : Multon. J-L. édition TEC et DOC Londre-Paris-New York, 2<sup>ème</sup> édition, 2 :106-109

- **Christiansen P, Andersson AM, Skakkebaek NE, Juul A.** 2002. Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism. *European Journal Endoc* 147 : 95-101
- **Chouraqui J-P, Dupont C, Bocquet A, Bresson J-L, Briend A, Darmaun D, Frelut M-L, Ghisolfi J, Girardet J-P, Goulet O, Putet G, Rieu D, Rigo J, Turck D, Vidailhet M.** Alimentation des premiers mois de vie et prévention de l'allergie. *Arch Pédiatr*, 2008; 15: 431-442.
- **Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL, Naik RR, Ali Khan S, Pentyala S.** 2005. A neglected gland: a review of Cowper's gland. *Int J Androl*, 28(2):74-77.
- **Clermont Y, Oko R, Hermo L.** 1990. Immunocytochemical localization of proteins utilized in the formation of outer dense fibers and fibrous sheath in rat spermatids: an electron microscope study. *Anat Rec*, 227(4):447-457.
- **Clermont Y, Perey B.** 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat*, 100(2):241-267.
- **Clermont Y.** 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52, 198-236.
- **Clermont, Y.** 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112:35-51.
- **Committee on toxicity.** 2003. Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment .London Phyto-estrogens and health. Food Standard Agency.
- **Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie.** 2006. Préparations pour nourrissons et préparations de suite : pour une commercialisation et une communication basées sur les preuves. *Arch Pédiatr*, 14: 319-321.
- **Crispe IN.** 2003. Hepatic T Cells and Liver Tolerance. *Nat Rev Immunol*, 3(1) :51-62.
- **Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi I, Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG.** 2003. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285 :G449-G459.
- **Coughtrie MWH.** 2002. Sulfation through the looking glass-recent advances in sulfotransferase research for the curious . *The Pharmacogenomics Journal*, 2 :297-308.

- **Chalasan N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW.**2003.Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis.Hepatology, 37 :544-550.
- **Chang JH, Kim M, Kim TW, Lee S.**2008. Effects of Soybean Supplementation on Blood Glucose .Plasma Lipid Levels, and Erythrocyte Antioxidant Enzyme Activity in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. Nutrition Research and Practice, 2, 152-157.
- **Charierre S,Rognant N, Chiche F, Cremer A, Deray G, Priou M.**2008. Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire .Annales de cardiologie et d'angéiologie Volume 58,Pages 40-52.
- **Dadoune JP.** 2000. Histology, 2<sup>ème</sup> edition Flammarion, Paris, 319p.
- **Dadoune JP, Démolin A.**1991.Structure et fonction du testicule. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme", 221-250.
- **Dalu A, Blaydes BS, Bryant CW, Latendresse JR, Weis CC, Delclos BK.** 2002.Estrogen receptor expression in the prostate of rats treated with dietary geinstein. Journal of Chromatography B 777:249–260.
- **David P.** 2000. Transplantation d'hépatocytes isolés: de la disponibilité en cellules humaine à l'application dans un modèle rat *in vivo*. Th : Sciences du vivant : Strasbourg I, 252p.
- **David G.** 1975.Anomalies morphologiques du spermatozoïdes humain. Propositions pour un système de classification. Journal de de gynocologie, obstétrique et biologie de la reproduction 4 : 17-36.
- **Davis RO, Gravance CG, Overstreet JW.** 1995.A standardized test for visual analysis of human sperm morphology. Fertility and sterility,63: 1058-1063.
- **Davis RO, Katz D.** 1993.Operational standards for CASA instruments. Journal of Andrology, 14: 385-394.
- **De Rooij DG, Russell LD.** 2000.All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl, 21(6):776-798.
- **De Rooij DG.**2001.Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction,121, 347-54.
- **Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR.** 2001. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. Reproductive Toxicology 15: 647– 663.

- **Dohle GR, Smit M, Weber RF.** 2003. Androgens and male fertility. *World J Urol*, 21(5):341-345.
- **Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D.** 1981. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53: 58-68.
- **Dupont C.** L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *J Pédiatr Puéricul*, 2008; 21 : 156-157.
- **Dym, M.** 1994. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91,11287-9.
- **Directive technique.** 2005. Réglementation publiée le 21/11/2005 UE.
- **De Lafarge F.**1993 .Exploration fonctionnelle rénale. In *biochimie clinique .Ed Médicale international-Technique et documentation –Lavoisier, France*; 358-371.
- **Ebo DG, Stevens WJ.**2002. IgE-mediated food allergy: extensive review of the literature. *Acta ClinBelg*, 56:234-47.
- **El feki A, Hjaiej L, Kammoun A.** 1998. Incidence de la population atmosphérique (gaz d'échappement) sur un rat. 9es Journées biologiques de la SSNT, Tunis :48.
- **El feki A, Ghorbel F, Smaoui M, Makni-ayadif, Kammoun A.** 2000.Effets du plomb d'origine automobile sur la croissance générale et l'activité sexuelle du rat. *Gynécol. Obstet. Fertil. Paris*, 28: 51-9.
- **Emery M, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, and Thummet KF.**2003.CYP2E1 Activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* , 38 :428-435.
- **Eustache F ,Lesaffre C , Cannivenc MC , Jouannet P,Cravedi JP,Auger J.** 2003.Effets d'une exposition à la Vinclozoline et à la Génistéine de la gestation à l'âge adulte sur la fonction de reproduction du rat Wistar mâle.*Environnement et Spermatogenèse. Andrologie*,13, N° 2 :170-178 .
- **Fan A, Howd R, Davis B.** 1995.Risk assessment of environmental chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,35: 341-368.
- **Frank C.**1992. Toxicologie,Données générales procédures d'évaluation,organs cibles, évaluation du risqué. Paris pp 73-202.
- **Fraser R, Dobbs BR, Rogers GW.**1995.Lipoproteins and the liver sieve: the role of fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis.*Hepatology*, 21:863-874.

- **Farag A, El-Aswad A, Shaaban N.** 2007. Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reprod. Toxicol*, 23: 232-238.
- **Fielden M.R, Samy S.M, Chou K.C, Zacharewski T.R.**2003.Effect of human dietary exposure levels of génistéine during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food. Chem. Toxicol*,41 (4):447–454.
- **Feldman C.**2001. Bilan de la fonction hépatique. *Ed Med. Paris*; 35:225-241.
- **FSA.** 2003. Food Standard Agency. Committee on toxicology of chemical in food, consumer products and the environment. London Phytoestrogens and health
- **Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Susuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y.** 2004.Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr*, 134:2623-2627.
- **Fromenty B, Pessayre D.**1995. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol ther*, 67 :101-54.
- **FDA.** 1987 . Food and Drug Administration .Good laboratory practice regulations.
- **FDA.** 1999 . Food and Drug Administration .Good laboratory practice regulations USA.
- **Gérolami R.** 2005. Mécanismes et manifestations de l’action des toxiques au niveau hépatique. In: *Toxicology*. Edited by Viala A et Botta A, 2 eme edition Lavoisier, Paris, pp:167-177.
- **Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C et al.** 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(5):1327-1332.
- **Gerber M, Berta-Vanrullen I.** 2006. Soja et phytoestrog ene. Edition Sécurité et B enifices des phytoestrogènes apportées par l’alimentation :534-536.
- **Gérolami.**2005.Mécanismes et manifestations de l’action des toxiques au niveau hépatique. In :*Toxicology*. Edited by Viala A et Botta A, 2 eme édition Lavoisier,Paris, PP :167-177.
- **Gonzalez FJ.**2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress : studies with CYP2E1.*Mutat Res*,569 :
- **Guan L, Huang Y, Chen ZY.** 2008. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats. *Biomed Environ Sci* ,21:197–204.

- **Hammoud GL, Koivisto M, Kouvalainen K, Vihko R.**1997. Serum steroids and pituitary hormones in infants with particular reference to testicular activity. *Journal Clin Endocrinol Metab* 49: 40-45.
- **Hancock AD, Robertson DM, de Kretser DM.**1992.Inhibin and inhibin alpha-chain precursors are produced by immature rat Sertoli cells in culture. *Biology Reproduction* 46: 155-161.
- **Henderson A.R, Moss D.W.**2001. Enzymes, Fundamentals of Clinical Chemistry, 5<sup>eme</sup> Ed., Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. Saunders W.B eds. Philadelphia USA, 352-359.
- **Henry JB.** 1984. Clinical diagnosis and management .17<sup>th</sup> edition, Saunders edition,Philadelphia, 149P.
- **Hermansen K, Søndergaard M, Høie L, Carstensen M, Brock B.** 2001. Beneficial Effects of a Soy-Based Dietary Supplement on Lipid Levels and Cardiovascular Risk Markers in Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care*, **24**,228-233.
- **Ho SC, Woo JL, Leung SS, Sham AL, Lam TH, Janus ED.** 2000. Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. *Journal of Nutrition*, 130(10):2590-2593.
- **Hossain A, Saunders GF.** 2001.The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Bio Chem* ,276: 16817-16823.
- **Hôte David.** 2009. Exploitation d'un modèle de souris interspécifiques, recombinantes et congéniques pour la cartographie de QTL de la fertilité mâle et pour l'étude de la régulation génique testiculaire dans le contexte d'un génome mosaïque.
- **Hould R.** 1984. Technique d'histopathologie et de cytologie. Montréal : Décarie, 47 : 156.
- **Imhof M, Molzer S.** 2008. Effects of soy isoflavones on 17 $\beta$ -estradiol-induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*22:1452-1460.
- **Imhof M, Molzer S, Imhof M.** 2008.Effects of soy isoflavones on 17 $\beta$ -estradiol-induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro* 22:1452–1460.
- **Ionnides C.** 2001.Enzyme systems that metabolize drugs and other xenobiotics Chichester : John Wiley and Sons Ltd.,London, 567p.
- **Ingwale, D., Kshirsagar A., Ashok, P., Vyawahare, N.** 2009. Role of atioxidat in the maagnet of hepatic complications. *Pharmacologyonline* 1, 238-253.
- **Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, Jennings PE, Hepburn D.**2002 .Beneficial Effects of Soy Phytoestrogen Intake in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 25, 1709-1714.

- **Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemastres JJ.**2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences*, 65:166-176.
- **Jean C, Rome C, Mathe V, Huneau JF, Attouri N, Fromentin G, Larueachagiotis C,Tome D.** 2001. Metabolic evidence for adaptation to high protein diet in rat.*J.Nutr* Volume 131:91-98.
- **Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A.** 2003.Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, 130(16):3663-3670.
- **Jégou B.** 1995. La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière.*médecine/ sciences 11* :519-27.
- **Jégou B.**1996. Les hommes deviennent-ils moins fertiles ? Moins de spermatozoïdes et de qualité moindre ? L'environnement en question. *La Recherche*, 288 : 60-65.
- **Jian Ying Yang, Guo Xin Wang, Jia Li Liu, Jing Jing Fan, Sheng Cui .** 2007.Toxic effects of zearalenone and its derivatives -zearalenolon male reproductive system in mice *Reproductive Toxicology* 24, 381–387.
- **Jiang CX, Pan LJ, Feng Y, Xia XY, Huang YF.** 2008.High-dose daidzein affects growth and development of reproductive organs in male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*;14:351–5.
- **Kang KS, Che JH, Lee YS.** 2002.Lack of adverse effects in the F1offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level.*Food and Chemical Toxicology* 40:43–51.
- **Katz D, Overstreet J, Samuels S.**1986. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, 7:203-210.
- **Kawano N, Yoshida M.** 2007.Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol Reprod*, 76(3):353-361.
- **Kluin PM, de Rooij DG.**1981. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int J Androl*, 4(4):475-493.
- **kolonel LN, Hankin JH, Whittemoore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, John EM, Howe GR, Dreon DM, West DW, Paffenbarger RS.** 2000. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: A multiethnic case-control study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers and Prev*, 9:795-804.

- **Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Vander Saag PT, Vander Burg B and Gustafsson JA.**1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10):4252-4263.
- **Kiyomiya K, Matsushita N, Kurebe M, Nakagawa H, Matsuo S.** 2002. Mitochondrial cytochrome c oxidase as a target site for cephalosporin antibiotics in renal epithelial cells (LLC-PK1) and renal cortex. *Life Sci*, 72:49-57.
- **Lack G.** Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2008; 121: 1331-1336.
- **Lacarelle B, Viala A.** 2004. Mécanismes et manifestations de l'action des toxiques au niveau renal. In: *Toxicologie*. Edited by Viala A et Botta A, 2<sup>e</sup> éme edition, Lavoisier, Paris, pp:173-177.
- **Lecerf JM.** 2007. Données. *Cahiers de Nutrition et de diététique*, Volume 42, Issue 4 :207-217.
- **Le couteur DG, Fraser R, Hilmer S, Rivory LP, Mclean AJ.**2005. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis: effects on hepatic substrate disposition and drug clearance. *Clin Pharmacokinet*, 44: 187-200.
- **Le couteur DG, Cogger VC, Hilmer SN, Muller M, Harris M, Sullivan D, Mclean AJ, Fraser R.** 2006. Aging, atherosclerosis and the liver sieve. In: *New research in atherosclerosis*. Edited by Clark LV, New York: Nova Science, pp: 19-44.
- **Lee HP.** 1991. Dietary effects on breast cancer risk in Singapore, *Lancet* 331:1197-1200
- **Lee BJ, Kang JK, Jung EY, Yun YW, Baek IJ , Yon JM, Lee YB, Sohn HS , Lee JY, Kim KS, Nam SY.**2004. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. *J. Vet. Sci*, 5 (3), 227–234.
- **Lephart ED, Adlercreutz H, Lund TD.** 2001. Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long–Evans rats. *Neuroreport* 12 (16), 3451–3455.
- **Lefebvre K.A, Tilton S.C, Bammler T.K, Beyer R.P, Srinouanprachan S, Stapleton P, Farin F.**2009. Gene expression profiles in zebrafish brain after acute exposure to domoic acid at symptomatic and asymptomatic doses. *Toxicol. Sci.* 107(1): 65-77.
- **Liao FH, Shieh MJ, Yang SC, Lin SH, Chien YW.**2007. Effectiveness of a Soy-Based Compared with a Traditional Low-Calorie Diet on Weight Loss and Lipid Levels in Overweight Adults. *Nutrition*, 23, 551-556.

- **Ling WH, Jones P J.** 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*,57 (3):195-206.
- **Lointier P.** 1992. Quelles pourrait être l'incidence des phytoestrogènes sur le risque du cancer de l'intestin (colon) ? *Anti cancer Res*,12 :1327-1330.
- **Lu FC.** 1992. Toxicologie : données générales, procédures d'évaluation. Organes cibles, évaluation du risque. Paris, Masson :1992-353.
- **Lundwall A, Peter A, Lovgren J, Lilja H, Malm J.** 1997. Chemical characterization of the predominant proteins secreted by mouse seminal vesicles. *Eur J Biochem*, 249(1):39-44.
- **Luo CW, Lin HJ, Chen YH.** 2001.A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J Biol Chem*, 276(10):6913-6921.
- **Maekawa M, Kamimura K, Nagano T.**1996. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*,59, 1-13.
- **Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE.** 1998.The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reproductive Toxicology* 12: 591-599.
- **Marengo SR.**2008.Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integralproteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2):52-63.
- **Marshall FHA.** 1990.Marshall's physiology of reproduction (4ème edition). Lamming G.E, Volume 2: 996.
- **Marshall W J, Bangert S.**2005. Preparation of Spray-Dried Soy Isoflavone-Loaded Gelatin Microspheres for Enhancement of Dissolution: Formulation, Characterization and in Vitro Evaluation *Clinical Chemistry*, 5th edition, (an imprint of Elsevier), Edinburgh, soft bound 422 p.
- **Marshall W J, Bangert S k.**2005.Biochimie medicale. Traduit par Eric Raynaud.Edition Elsevier, ISBN : 978p.
- **Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Takahashi N,Hirose M.** 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life.*Toxicology* 192: 149–170.
- **Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Johnson MH, Ratclive PJ.** 1997. The interstitial response to renal injury: Wbroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. *Kidney Int*, 52:715-724.

- **Mekkawy HA, Ali MO, El-Zawahry AM.** 1998. Toxic effect of synthetic and natural food dyes on renal and hepatic functions in rats. *Toxicol let*, 95 (1):155.
- **Meyers DG, Maloney PA, Weeks D.** 1996. Safety of antioxidant vitamins. *Arch intern Med*, 156:925-935.
- **Metais P.** 1990. *Biochimie clinique*, tome 1, 2eme edition .Paris .Simep ; 364.
- **Middendorf P et Williams P.** 2000. Nephrotoxicity :Toxic Responses in the Kidney. In :Principales of Toxicology : Environmental and Industrial Applications. Edited by : Williams P, James R, Roberts S, New York, John Wiley& Sons, pp : 129-143.
- **McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Edwards J, Bausch J.** 2007. Reproductive safety studies with genistein in rats. *Food Chem Toxicol*,45:1319-1332.
- **McCuskey RS.** 2000. Morphological mechanisms for regulating blood flow trough hepatic sinusoids. *Liver*. 20:3-7.
- **McEwen BS.** 1999. Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab*,84(6):1790-1797.
- **Moneret-Vautrin D.A, Kanny G.** Axes de recherche en allergologie alimentaire : hypoallergenicite et vaccins. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2007; 47: 305-313.
- **Murer V, Spetz JF, Hengst U, Altrogge LM, de Agostini A, Monard D.** 2001. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6):3029-3033.
- **Mukinda, J.T., Syce, J.A.** 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 138–144.
- **Murphy PA, Song TT, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D, Holden J.** 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of agric. Food. Chem*,4:2697-2704.
- **Mounts L, Sunkara R, Shackelford L, Ogutu S, Lloyd T, Walker, Verghese M.** 2015. Feeding Soy with Probiotic Attenuates Obesity-Related Metabolic Syndrome Traits in Obese Zucker Rats. *Food and Nutrition Sciences*, 2015, 6, 780-789.
- **Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG, Vore M.** 2002. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology*, 35: 1409-1419.
- **Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, and Hayashi Y.** 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec*, 258, 210-220.

- **Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H.** 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.* 15 (4), 399–411.
- **Nakatsuji N, Chuma S.** 2001. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. *Int J Dev Biol*, 45(3):541-548.
- **Nilson B, Rosen SW, Weintraub BD, Zopf DA.** 1986. Differences in the carbohydrate moieties of the common alphasubunits of human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and thyrotropin: preliminary structural inferences from direct methylation analysis. *Endocrinology*, 119: 2737-2743.
- **Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monroe, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Deun, K.V., Smith, P., Berger, B., Heller, A.,** 2000. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 56–67.
- **Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazawa H, Nakajin S.** 2003. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci*, 74 (6): 733–742.
- **Opalka DM, Kaminska B, Piskula MK, Puchajda-Skowronska H, Dusza L.** 2006. Effects of phytoestrogens on testosterone secretion by Leydig cells from Bilgoraj ganders (*Anser anser*). *Br Poult Sci*; 47:237–45.
- **OCDE.** 1989. Good laboratory practice in the testing of chemicals. Organization of economic cooperation and development.
- **Pariza MW.** 1996. Toxic substances in foods. In: Zeigler EE, Filer LJ eds. *Present Knowledge in nutrition*. Washington: ILSI, 563-573.
- **Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams D.** 2005. The role of metabolic activation in drug induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:177-202.
- **Patel T, Roberts L R, Jones BA, Gores GJ.** 1998. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: An overview. *Semin. Liver Dis*, 18: 105-114.
- **Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A.** 2001. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 21:57-69.
- **Peirce EJ, Breed WG.** 1987. Cytological organization of the seminiferous epithelium in the Australian rodents *Pseudomys australis* and *Notomys alexis*. *J Reprod Fertil*, 80, 91-103.

- **Peitz B.** 1988. Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse. *J Reprod Fertil*, 83(1):169-176.
- **Pérez LM, Milkiewicz P, Elias E, Coleman R, Sanchez Pozzi EJ, Roma MG.** 2006. Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplet: a role for protein kinase C and prevention by protein kinase A. *Toxicol Sci*, 91:150-158.
- **Pfaller W, Gstraunthaler G.** 1998. Néphrotoxicity testing in vitro-what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect*, 106 (2): 559-569.
- **Pierik FH, Burdorf A, De Jong FH, Weber RF.** 2003. Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis. *Ann Med* 35: 12-20.
- **Piotrowska K, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M, Gutowska I, Nocen I, Zawislak M, Chlubek D, Wiszniewska B.** 2011. A Change in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity, *Nutrition xxx* 1–8.
- **Power SK, Lennon SL.** 1999. Analysis of cellular responses to free radicals : focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Natl Nutr Soc*, 28 (24) :1025-1033.
- **Potus J, Adrian J, Frangne R.** 1996. La science alimentaire de A à Z 2<sup>ème</sup> édition. Lavoisier, Paris, 100-350.
- **Poli G.** 1993. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull*, 49:604-620.
- **Pryor JL, Hughes C, Foster W, Hales BF, Robaire B.** 2000. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect*, 108:491–503.
- **Pumford NR, Halmes NC, Hinson JA.** 1997. Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver. *Drug Metab Rev*, 29:39-57.
- **Raffray M, Cohen GM.** 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death! *Pharmacol ther*, 75:153-177
- **Rasheed, S., Tahir, M., Sami, W., Munir, B.** 2009. Histological effects of Eugenia Jambolana extract on liver of adult Albino rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 21(1), 148-151.
- **Rao S, Verkman AS.** 2000. Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279:1-18.

- **Ridges L, Sunderland R, Moerman K, Meyers B, Astheimer L, Howe P.** 2001. Cholesterol lowering benefits of soy and linseed enriched foods. *Asia Parc Journal of Clinical Nutrition*,10(3):204-211.
- **Ricardo José Rodrigues, Slama R, Ducot B, Keiding N, Blondel B.**2009. Optimization of low-cholesterol–low-fat mayonnaise formulation: Effect of using soy milk and some stabilizer by a mixture design approach . *Food Hydrocolloids, Volume 28, Issue 2, August 2012, Pages 344-352*
- **Rikans LE. Yamano T.** 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 14 :110-117.
- **Rieu D et Tenailleau S.** Phyto-estrogènes et préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja : recommandations de l’Afssaps *Journal de pédiatrie et de puériculture* 18 ,2005 ; 192–198.
- **Rieu D.** 2006. Soja et alimentation du nourrisson et de l’enfant. *Actualité sur le soja en nutrition pédiatrique/archives de pédiatrie*, 13 :534-538.
- **Reichel FX, Perraud R, Krahé E.** 2004. *Guide pratique de toxicologie*, 1ère édition, De Boeck, Bruxelles, 368p.
- **Robert M, Gibbs BF, Jacobson E, Gagnon C.** 1997.Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I. *Biochemistry*, 36(13):3811-3819.
- **Roberts D ,Veeramachaneni DN , Schlaff WD , Awoniyi CA.** 2000. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine* 13 (3), 281–286.
- **Roberts SM, Roberts CJ, Franklin MR.**2000. Hepatotoxicity: Toxic effects on the liver .In: *Principales of toxicology, environmental and industrial applications*. Edited by Williams PL, James RC, Roberts SM, Second edition, Wiley-Interscience Publication, pp:111-128.
- **Robert A,Buidinsky JR.** 2000. Hematotoxicity : Chemically induced toxicity of the blood. In: *Principales of toxicology, environmental and industrial applications*. Edited by Williams PL, James RC, Robert SM, Second edition, Wiley-interscience Publication, 603p.
- **Rodríguez-Landa JF, Hernandez-Figueroa JD, Hernandez-Calderon BC, Saavedra M.** 2009. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Anxiolytic-

like effects of phytoestrogen genistein in rats with long-term absence of ovarian hormones in the black and white model, Volume 33, Issue 2:367-372.

- **Roma MG, Sanchez Pozzi EJ.**2008. Oxidative stress :a radical way to stop making bile. *Ann Hepatol*, 7:16-33.
- **Romero V, Dela Cruz C, Pereira M .** 2008.Reproductive and toxicological effects of isoflavones on female offspring of rats exposed during pregnancy.Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. *Anim. Reprod*, v.5, n.3/4, p.83-89, Jul./Dec.
- **Roscoe B, Little CC, Snell GD, Dingle JH.** 1941.*Biology of the Laboratory Mouse*: Philadelphia, The Blakiston company.
- **Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, and Clegg ED.**1990. "Histological and histopathological evaluation of the testis." Clearwater, FL: Cache River Press.
- **Ryokkynen A, Nieminen P, Mustonen AM, Pyykonen T, Asikainen J, Hanninen S, et al.** 2005.Phytoestrogens alter the reproductive organ development in the mink (*Mustela vison*). *Toxicol Appl Pharmacol* 202:132–9.
- **Rifai N, Mora S, James D, Robert S.**2003.Lipids,lipoproteins and apolipoproteins .*Fundamentals of Clinical chemistry*,5eme Ed ;Burtis,C .A & Ashwood .Saunders eds .Philadelphia USA ;463.
- **Santen RJ.** 1975.Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men. *Journal Clin Invest* 56: 1555 -1563.
- **Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S.** 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*, 519:103-119.
- **Sedaghat A, Shahbazian H, Haidari F, Peyman Payami S, Jahanshahi A, Latifi S M.** 2015. The Effect of Soy Nuts on Glycemic Control, Lipid Profile and Insulin-Resistance in Type 2 Diabetic Patients. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 5, 1-7
- **Shibayama T, Fukata H, Sakurai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T, Mori C.** 2001.Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocrinol, J.* 48 (6), 655–663.
- **Shahbazian H, Reza A, Javad S, Heshmatollah S, Mahmood L, Ali A. Hosain, HM.**2007. Beneficial Effects of Soy Protein Isoflavones on Lipid and Blood Glucose Concentrations in Type 2 Diabetic Subjects. *Saudi Medical.Journal*, 28, 652-654.

- **Simanainen U, McNamara K, Davey RA, Zajac JD, Handelsman DJ.** 2008. Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology*, 149(7):3330-3338.
- **Slichter, S.J.** 2004. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfusion Medicine Reviews* 18, 153–167.
- **Smedsrod B.** 2004. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol*, 3(1):S22.
- **Sobotta J, Welsch U, Dhem A.** 2004. Précis d'histologie: Cytologie, histologie, anatomie microscopique. Edition française, Lavoisier, 597p.
- **Soler C, Yeung C. H, and Cooper T G.** 1994. Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl*, 17, 271-8.
- **Siest G.** 1990. Références en biologie clinique. Paris. Elsevier:360-372.
- **Sturgill MG, Lambert GH.** 1997. Xénobiotique-induced hepatotoxicity mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical chemistry*, 43:8(B):1512-1526.
- **Suchy EJ, Ananthanarayanan M.** 2006. Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 43(1):S10-S16.
- **Sugawara T, Yue ZP, Tsukahara S, Mutoh K, Hasegawa Y, et al.** 2006. Progression of the dose-related effects of estrogenic endocrine disruptors, an important factor in declining fertility, differs between the hypothalamopituitary axis and reproductive organs of male mice. *J Vet Med Sci* 68:1257–67.
- **Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand ML, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, et al.** 2005. Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary–gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *J Endocrinol* 187:117–24.
- **Scherwin J.E.** 2003. Liver function. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis*, Eds St Louis USA;492.
- **Taxvig C, Elleby A, Sonne-Hansen K, Bonefeld-Jørgensen EC, Vinggaard AM, Lykkesfeldt AE, et al.** 2010. Effects of nutrition relevant mixtures of phytoestrogènes on steroidogenesis, aromatase, estrogen, and androgen activity. *Nutr Cancer* 62:122–31.
- **Takeda M, Babu E, Narikawa S, Endou H.** 2002. Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *European Journal of Pharmacology*, 438:137-142.

- **Timbrell JA.** 2009. Principles of biochemical toxicology. Fourth edition, Informa Healthcare, USA, 453p.
- **Thubault C., Levasseur MC.** 2001.La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, Editions INRA, 928.
- **Tilbrook AJ, Clarke IJ.** 2001.Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. Biol Reprod , 64(3):735-742.
- **Tietz NW.**1995. Clinical guide to laboratory tests, 3 edition, Saunders edition, Philadelphia, USA,266-273.
- **Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Givercman A, Grandjean P, Guillettel LJ.** 1996. Male reproductive health and environmental xeno-oestrogens. Environ Health Perspect.104(suppl.4):741-803.
- **Toshimori K, Ito C.** 2003.Formation and organization of the mammalian sperm head. Arch Histol Cytol, 66(5):383-396.
- **Toppari J,Larsen JC,Christiansen P ,Giwerzman A,Grandjean P,Guillettel LJ.**1996. Male reproductive health and environmental xeno-oestrogens.Environ.Health Perspect.104 (suppl.4):741-803.
- **Tuormaa TE.** 1995.The adverse effects of tobacco smoking on reproduction and health: a review from the literature. Nurth Health, 10 (2) : 105-20.
- **Turner RM.** 2003.Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? J Androl 24(6):790-803.
- **Tzirogiannis KN.** 2003. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver:the role of apoptosis. Arch Toxicol,77:694-701.
- **Valdiguie P.** 2000.Biologie médicale. Biochimie clinique. 1ER édition. Edition lavoisier, Paris, 329 p.
- **Vendula K, Peknicova J, Boubelik M, Buckiova D.** 2004.Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. Theriogenology 61: 1307–1325
- **Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, and de Rooij DG.** 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. J Reprod Fertil, 93, 233-43.
- **Verhoeven G.** 1992.Local control systems within the testis. Baillieres Clin Endocrinol Metab 6:313–333.

- **Vernet N.** 2006. Analyse du rôle de l'acide rétinoïque et de ses récepteurs au cours de la spermatogenèse.
- **Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck N. B, and Mark M.** 2006. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology*, 147, 96-110.
- **Ward M.K., Cockayne S.** 1993. Enzymology. Clinical Chemistry. In Concepts and Application, Anderson S.C., Cockayne S. Saunders eds. Philadelphia USA; 92-107.
- **Wallace KB, Starkov AA.** 2000. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:353-388.
- **Wargo MJ, Smith EF.** 2003. Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1):137-142.
- **Warita K, Sugawara T, Yue ZP, Tsukahara S, Mutoh K, Hasegawa Y, et al.** 2006. Progression of the dose-related effects of estrogenic endocrine disruptors, an important factor in declining fertility, differs between the hypothalamopituitary axis and reproductive organs of male mice. *J Vet Med Sci*; 68:1257-67.
- **Warren A, Bertolino P, Benseler V, Fraser R, McCaughan GW, Le Couteur DG.** 2007. Marked changes of the hepatic sinusoid in a transgenic mouse model of acute immune-mediated hepatitis. *J Hepatol*, 46:239-246.
- **Weber KS, Setchell KDR, Stocco DM, Lephard ED.** 2001. Dietary soy phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 $\alpha$ -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol*. 170:591-9.
- **Werner EA, Deluca HF.** 2001. Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in the vitamin A-deficient rat. *Arch Biochem Biophys*, 393(2):262-270.
- **Winters SJ, Troen P.** 1986. Testosterone and estradiol are cosecreted episodically by the human testis. *Journal Clin Invest*, 78: 870-873.
- **Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP.** 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology* 169, 1582-1586.
- **Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP.** 2005. Exposure to g $\acute{e}$ nistéine during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J Urol*; 169:1582-6.

- **Worawittayawong P, Leigh CM, Cozens G, Peirce EJ, Setchell BP, Sretarugsa P, Dharmarajan A, and Breed WG.** 2005. Unusual germ cell organization in the seminiferous epithelium of a murid rodent from southern Asia, the greater bandicoot rat, *Bandicota Indica*. *Int J Androl*, 28, 180-8.
- **Xie J.** 1995. Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicology*, 103 (3): 147-55.
- **Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S.** 2007. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod. Toxicol.* Elsevier, 382p.
- **Ying SY.** 1988. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology Rev* 9: 267-293.
- **Yoshida K, Kawano N, Yoshiike M, Yoshida M, Iwamoto T, Morisawa M.** 2008. Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. *Mol Hum Reprod* 14(3):151-156.
- **Yousef MI, El-Demerdash, FM, Al-Salhen KS.** 2003. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *J. Environ. Sci, Health B* 38 (4), 463–478.
- **Zhang FP, Pakarainen T, Zhu F, Poutanen M, Huhtaniemi I.** 2004. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 145(3):1453- 1463.
- **Zhang JX, Rao XP, Sun L, Zhao CH, Qin XW.** 2007. Putative chemical signals about sex, individuality, and genetic background in the preputial gland and urine of the house mouse (*Mus musculus*). *Chem Senses* 32(3):293-303.

## 1-Proceeding (publication de résumés)

TITRE	AUTEURS	NOM DE LA REVUE	ANNEE	URL
1/Conséquence d'une consommation à long terme du lait de soja sur la structure histologique du testicule et des vésicules séminales chez la souris	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> , Saidi Djamel, Khéroua Omar	Archives des maladies du cœur et des vaisseaux pratique	2010	www.em-consulte.com
2/ Etude de la consommation du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle de la	<b>Zeriouh Ilhem</b> , Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Cahiers de nutrition et de diététique	2010	www.em-consulte.com/revue/CND
3/ Etude de la consommation du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle de la souris Swiss	<b>Zeriouh Ilhem</b> , Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Nutrition clinique et métabolisme	2010	www.sciencedirect.com
4/Effet du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle	<b>Zeriouh Ilhem</b> , Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Annales de biologie clinique	2011	www.jle.com/print/doi :10/1684/abc.2010.0520
5/ Impact du lait de soja sur les paramètres biochimiques chez les souris mâle	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> , Saidi Djamel, Khéroua Omar	Cahiers de nutrition et de diététique	2013	www.em-consulte.com/revue/CND
6/Impact du lait de soja sur les paramètres biochimiques chez les souris mâle	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> , Saidi Djamel, Khéroua Omar	Nutrition clinique et métabolisme	2013	www.sciencedirect.com
7/Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques (cholestérol et albumine)	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> , Saidi Djamel, Khéroua Omar	Annales de cardiologie et d'angéiologie	2013	www.em-consulte.com
8/Conséquence de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> , Saidi Djamel, Khéroua Omar	Revue Française d'Allergologie Elsevier Masson	2013	http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2013.02.019

<b>9/</b> Impact du lait de soja sur les paramètres biochimiques et la fertilité masculine	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Diabète Métabolism	2014	congres-sfd.com
<b>10/</b> Effet du lait de soja sur les paramètres hématologiques et histologiques du foie et du rein des souris Swiss	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Nutrition Clinique et Métabolisme	2014	www.sciencedirect.com
<b>11/</b> Effect of soymilk on biochemical parameters (cholesterol and albumin)	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> ,Mebara Hasni, Saidi Djamel, Khéroua Omar	International Journal of Community Nutrition	2014	
<b>12/</b> Effect of soy milk on hematological and histological parameters of liver and kidney	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem</b> Fatima,Mebara Hasni,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Annale de Nutrition et métabolisme	2015	Ann Nutr Metab 2015; 67(suppl 1)

## 2-Ouvrages pédagogiques édités

Effet du lait de soja sur la fertilité masculine, lait de soja dans l'alimentation

Auteurs : Addou Samia, **Zeriouh Ilhem Fatima**

Maison d'édition : Editions universitaires européennes

Année d'édition : 19/02/2014

Nombre de pages : 140 pages

## 3-Publications internationales

-Effect of the consumption of milk of soya on the male fertility of Swiss mice.

**Ilhem Fatima Zériouh**, Samia Addou, Youcef Bouferkas, Omar Khéroua, Djamel Saidi.

International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences vol 6, Issue 4,

2014.<http://www.ijppsjournal.com>

#### 4-Communications internationales

<u>TITRE</u>	<u>Auteurs</u>	<u>Nom du congrès et lieu</u>	<u>Date</u>	<u>URL</u>
1/ Effet de la consommation du lait de soja sur la fonction reproductrice mâle de la souris Swiss	<b>Zerioush Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	6ème journée fondamentale et appliquée à Hammamet (Tunisie)	22-24 Octobre 2010	
2/ Effet du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle	<b>Zerioush Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Journées internationales de biologie à Paris (France)	02-05 Novembre 2010	www.jib-sdbio.fr
3/ Etude de la consommation du lait de soja sur l'appareil reproducteur mâle de la souris Swiss	<b>Zerioush Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	8ème journée Francophones de nutrition à Lille (France)	08-10 Décembre 2010	
4/ Conséquence d'une consommation à long terme du lait de soja sur la structure histologique du testicule et des vésicules séminales chez la souris	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem,</b> Saidi Djamel, Khéroua Omar	30èmes journées de l'hypertension artérielle à Paris (France)	16-17 Décembre 2010	www.em-consulte.com
5/ Conséquences de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine des souris Swiss	<b>Zerioush Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Premier séminaire international d'étude agriculture biologique et développement durable à Oran (Algérie)	13-14 Février 2011	
6/ L'effet de l'ingestion subchronique de lait de soja sur la fonction reproducteur mâle des souris Swiss	<b>Zerioush Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Congrès international Gout-Nutrition-Santé à Dijon (France)	22-23 Mars 2011	

7/ Lait de soja et fertilité	<b>Zeriouh Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	3ème séminaire international de biologie animale à Constantine (Algérie)	09-11 Mai 2011	
8/ Conséquence de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine des souris swiss	<b>Zeriouh Ilhem,</b> Addou Samia, Saidi Djamel, Khéroua Omar	Congrès international de nutrition à Oran (Algérie)	22-23 Mai 2011	
9/ Conséquence de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem,</b> Saidi Djamel, Khéroua Omar	8ème congrès francophone d'allergologie à Paris(France)	16-19 Avril 2013	<a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2013.02.019">http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2013.02.019</a>
10/Impact du lait de soja sur les paramètres biochimiques chez la souris Swiss mâle	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem,</b> Saidi Djamel, Khéroua Omar	11ème journées francophone de nutrition à Bordeaux(France)	11-13 Décem bre 2013	
11/Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques (cholestérol et albumine)	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem,</b> Saidi Djamel, Khéroua Omar	33es journées de l'hypertension artérielle 7th international meeting of the french society of hypertension à Paris(France)	19-20 Décem bre 2013	
12/Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques (cholestérol, albumine) chez les souris Swiss mâle	Addou Samia, <b>Zeriouh Ilhem,</b> Saidi Djamel, Khéroua Omar	Le 3ème congrès international sur les molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées du stress oxydant à Hammamet (Tunisie)	21-23 Mars 2014	<a href="http://www.a-stsn.com">http://www.a-stsn.com</a>

<b>13/L'impact du lait de soja sur les paramètres hématologiques du foie et du rein</b>	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Journées Internationales de Biologie à (Paris)	8-10 Octobre 2014	www.jib-sdbio.fr
<b>14/Effect of soymilk on biochemical parameters</b>	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	International journal of community nutrition à Las Palmas Gran Canaria ( Espagne)	09-12 Novembre 2014	
<b>15/Impact du lait de soja sur les paramètres biochimiques et la fertilité masculine</b>	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Société Francophone du diabète congrès annuel à Paris (France)	11-14 Mars 2014	CONGRES-SFD.COM
<b>16/Effet du lait de soja sur les paramètres biochimiques chez les enfants allergiques aux protéines du lait de vache</b>	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem</b> ,Saidi Djamel, Khéroua Omar	Journées Francophones d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive à Paris (France)	20-23 Mars 2014	<a href="http://www.snfge.org/resumes/8391">http://www.snfge.org/resumes/8391</a>
<b>17/Effet du lait de soja sur les paramètres hématologique et histologiques du foie et du rein des souris Swiss</b>	Addou Samia, <b>Zerioush Ilhem</b> , Mebara Hasni, Saidi Djamel, Khéroua Omar	12es Journées Francophone de nutrition JFN à Bruxelles (Belgique)	10-12 Décembre 2014	www.science direct.com
<b>18/Effect of soy milk on hematological and histological parameters of liver and kidney.</b>	<b>Addou Samia</b> , Zerioush Ilhem Fatima, Mébara Hasni, Saidi Djamel, Khéroua Omar	. 12 <sup>th</sup> European Nutrition Conference (FENS) à Berlin, Allemagne	20-23 Octobre 2015	

## EFFECT OF THE CONSUMPTION OF MILK OF SOYA ON THE MALE FERTILITY OF SWISS MICE

ILHEM FATIMA ZERIOUH<sup>1\*</sup>, SAMIA ADDOU<sup>1</sup>, YUCEF BOUFERKAS<sup>1</sup>, OMAR KHEROUA<sup>1</sup>, DJAMEL SAIDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Nutrition Physiology and Food Safety, Department of Biology, Faculty of Science, University of Oran, El Menaouer 31000 Oran, Algeria, <sup>2</sup>Laboratory of Biology of Development and differentiation, Department of Biology, Faculty of Science, University of Oran, El Menaouer 31000 Oran, Algeria. Email: ilhemzeriouh@gmail.com

Received: 08 Sep 2013 Revised and Accepted: 08 Apr 2014

### ABSTRACT

Objective: of this study is to estimate the consequences of the consumption of soy milk on the male fertility of mice Swiss used as experimental model.

Methods: In our study, we have used 24 male mice 4 weeks old and weighing on average (13.93±0.50) g. These animals were divided into 4 groups; mice At the end of the 90th day, and during a week, Mice are subjected has a test of fertility Just before their sacrifice by cervical dislocation, males undergo a blood test for the dosage of the testosterone, Then testicles, epididyme and seminal vesicles are taken and weighed. Sperm cells are counted, their morphology and their mobility are studied.

Results: Our results show that The mobility of sperm cells decreases very significantly ( $p < 0,01$ ) to the animals of all the groups having consumed soy milk.

- The number of sperm cells testiculaires and epididymaires is decreased very significantly respectively at the mice of the groups 2 and 3 and at the mice of the groups 1, 2 and 3 ( $p < 0,01$ ).

- The sérique rate of the testosterone decreases very significantly ( $p < 0,01$ ) to the group 2 ( $1,08 \pm 0,41\text{ng / ml}$ ) with regard to witnesses ( $6,21 \pm 1,54\text{ ng / ml}$ ).

Conclusion: the obtained results indicate that the ingestion of the soy milk is not without consequence on the function of reproduction and provokes significant change of the male fertility of mice.

**Keywords:** Soybean, Sperm-Fertility, Endocrine Disruptors, Toxicity.

### INTRODUCTION

Food-based non-native soya protein (MAP) can be recommended for the prevention of allergy or food intolerance in infants at high risk.

Milk-based industrial soy protein is the main source of phytoestrogens in humans. It is therefore important to assess the levels of intake phytoestrogens contained in soy foods can consume infants and young children. These natural chemicals that may toxicity to reproduction because they are able to stimulate, promote or inhibit hormone action where they can in theory change the physiological process under an endocrine regulation.

Numerous studies indicate a decrease in the number and quality of human male sex cells in recent years [1].

Many authors have reported adverse effects on sexual function, factors toxic substances in our environment and diet. Include gas exhaust from automobiles [2], pesticides, xenohormones [3]. However, work on the impact of soya milk on hormonal sexual function of male and fertility are very rare and not deductive.

Our goal is to study the impact of the consumption of soya milk in Swiss male mice on: the development and maturation of the sexual organs, male fertility and finally, hormonal function.

### MATERIALS AND METHODS

#### Products and reagents

Different products and reagents from Sigma, Pharmingen, Merck and Prolabo ® and its bioMérieux (France).

#### The samples used in this study

##### Soya milk "BIOMIL ® SOYA"

Powder, obtained from FASSKA (Belgium), is complete infant formula based on soya protein enriched in L-methionine, L-carnitine and taurine. It is recommended in case of allergy to cow's milk protein or lactose intolerance.

This is a complete food free milk from birth, lactose free, sucrose and gluten-free.

#### Animals

The animals used in our protocols are Swiss strain mice obtained from the Pasteur Institute in Algiers. These are mice bred and acclimatized before handling in the laboratory animal physiology and nutrition security Food in housing conditions in accordance with regulations. The Experiments are carried out according to the well-being of the animal, avoiding the stress and agitation may interfere with the results.

#### Subchronic test for soya milk

This experiment evaluates the long-term toxicity resulting to soyamilk repeatedly ingested orally. The test is performed while fully respecting indication and dose administered in the box of baby milk. Swiss male mice (4 weeks), (13.93 ± 0.50 g), 2 groups of 6 mice from a nursing mother fed soy for 90 days of receiving a soy, and the other (control), 2 Other groups of 6 mice from a female control one receiving soy milk and the other witness.

#### Measurement of weight gain

Weight gain of the animals in each group is measured weekly throughout the duration of the experiment.

#### Fertility test

At 13 weeks, the mice are mated control females. After parturition, they take the measurement of the body weight and small size (the 7th, 14th and 28th days).

#### Blood samples and organs

A volume of 2 ml of blood per mouse was collected, centrifuged. Serum recovered is used for the determination of testosterone.

After sacrificing the male mice, the testicles, seminal vesicles were removed and weighed to determine the relative weight.

The left testis and seminal vesicle are fixed in a solution of 10% formalin for histological study. The right testis and epididymis was used to count spermatozoa.

**Sperm count**

The sperm count is performed on adult male mice. Testis and epididymis were removed, weighed and finely chopped and homogenized for 1 minute in 10ml NaCl 9 ‰ containing Triton X-100 (Merck, Germany). The number of sperm was measured using a cell Mallassez of 5 large squares, observed under an optical microscope at a magnification of 40 [4].

**Sperm motility and abnormality determining**

The epididymis is placed, cut in 4 ml of saline and then incubated in an oven at 37 ° C for 15 min. 20µl of the cell are deposited Mallassez [5]. La sperm motility is performed after 10 microscopic observations magnification 40. The percentage of sperm motility is defined by [6]. To assess sperm, morphology will be fixed with ethanol 95 ° stained with gentian violet and rinsed with distilled water. A minimum of 500 sperms are examined by light microscopy. Abnormal sperms are classified according to: (Abnormalities of the head, the intermediate part of the flagellum and the presence of cells others).

**Testosterone dosage**

The dosage of the hormone is made by the immunoassay by competition final fluorescence detection (Enzyme Linked Fluorescent Assay). The disposable cone serves both the solid phase and the pipetting device. The other reagents of the immunological reaction are ready and pre-distributed in cartridge.

**Statistical methods**

The results are expressed as mean ± standard error (X ± SE). The averages were compared using a Student t test for paired data and unpaired. Statistical analysis was conducted using a statistical software program named STATISTICA (5.1.2006).

Analysis of variance was performed with the ANOVA test. The significance level used is 5%.

**RESULTS**

**Effect of soya milk on weight gain**

Our results showed a very pronounced increase of body weight depending on the time. However, there was a significant decrease in body weight of mice who ingested soy milk throughout the experimental period. Soy milk induces significant decrease in the growth of mice, p <0.01 with ingesting soya milk.

Their weight has changed to 17.02 ± 0.54 40.71 ± 1.35 g g for controls, 11.97 ± 0.40 37.03 ± 0.91 g for mice of group 1 and 11.55 ± 0.10 37.86 ± 0.94 g in g for animals

However, group 2 mice in group 3 weight changed 15, 17 ± 0.21 39.01 ± 1.41 g (Figure 1). Weight and litter size in mice from group 3 to 7, 14 to J28 has decreased very significantly compared to the control (Figures. 2 and 3). Conversely, the weight and litter size in mice of groups 1 decreases very significantly on day 7 and J14 compared to control mice (p<0.01). A weight ranges J28 mice groups 2 reduces to a very significant and their size D7 and D28 compared to control (P <0.01).

**Fertility test**

The study was conducted on 18 male and female litters. The intersection of the four groups male mice with female controls led to the observation of the fertility of mice experimental ingesting soy milk compared to control mice. The results Table 1 shows the fertility index.

**Effect of soya milk on the relative weight of the sex organs**

The relative weights of testis, epididymis, and seminal vesicles in males only not change among groups who ingested soya milk during 90 days compared to controls (Table 02).

**Effect of soy milk on sexual parameters in male mice**

The objective of this part of work is to evaluate the effect of the consumption of soy milk on parameters sexual Swiss male mice by calculating the following parameters:

**Sperm motility**

Our results show a significant decrease in the percentage of mobility epididymal spermatozoa in groups of mice ingesting soy milk which values are respectively 37.89 ± 3.27, 44.25 ± 1.32 and 49.82 ± 4.48 compared to group witness have a value of 74.34 ± 2.13 (p <0,01). Throughout these data shows that the sperm motility are significantly decreased in males consuming soy milk compared to the control group (p <0, 01) (Figure 4).

These results confirm that the percentage of dead sperm, tend to be higher in animals ingesting soy milk especially those of groups 1 and 2, which have a nécrospemie (many dead sperm).

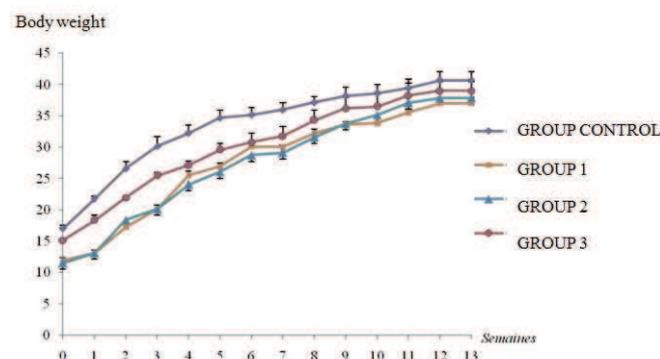


Fig. 1: Growth in weight of male mice receiving soy milk and the control group (n = 6 mice).

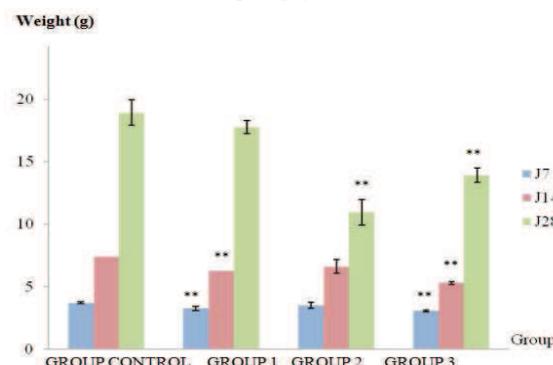


Fig. 2: The weight change of the consumption of soy milk on offspring

The values shown are averages and their standard errors (X ± SE); \*\* P <0.01

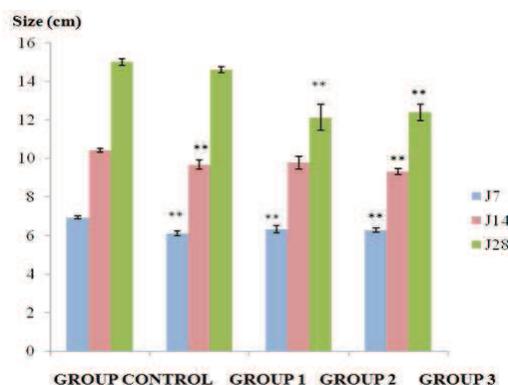


Fig. 3: The effects of soymilk on the evolution of the size of the seed

The values shown are averages and their standard errors (X ± SE); \*\* P <0.01

Table 1: Fertility Test

Control parameters	Control group (%)	Group1 (%)	Group 2 (%)	Group 3 (%)
Fertility index $\alpha$	6/6 (100%)	4 /6 (67%)	4 /6 (67%)	5/6 (83%)
Number of newborns	56	39	18	32
Average newborn	9,33±0,56	6,5±2,11	3±1,13	5,33±1,28
<b>Weight (g)<sup>β</sup></b>				
J7	3,73±0,06	3,26±0,17**	3,51±0,23	3,08±0,07**
J14	7,41±0,21	6,27±0,29**	6,61±0,54	5,30±0,12**
J28	18,93±1,02	17,76±0,52	10,96±1,01**	13,93±0,56**
<b>Size (cm)<sup>β</sup></b>				
J7	6,94±0,07	6,11±0,13**	6,33±0,19**	6,27±0,11**
J14	10,42±0,1	9,68±0,24**	9,78±0,34	9,32±0,16**
J28	15,01±0,17	14,61±0,15	12,14±0,68**	12,4±0,42**

$\alpha$ : Number of fertile males / total number coupled.

$\beta$ : Statistical study was performed on 18 carries for the weight and size.

Value \*\* very significant compared to control (p <0.01).

Table 2: Effect of soy milk on the relative weight of the sex organs in male mice Seminal vesicles testicles epididymis

	Testicles	Seminal Vesicles	Epididymis
Control group	0,62±0,03	0,72±0,10	0,24±0,03
Group 1	0,55±0,04	0,7 ±0,12	0,28±0,01
Group 2	0,57±0,04	0,57±0,11	0,3 ±0,01
Group 3	0,56±0,02	0,53±0,07	0,24±0,01

(n = 6 mice) for each group.

**Group 1:** from a nursing mother fed soy and receiving milk for 90 days soya.

**Group 2:** from a nursing mother fed soy and receiving for 90 days plugs and water.

**Group 3:** from a female witness and receiving for 90 days of soybean

**Control group:** received during the entire experimental period plugs and water.

Sperm motility (%)

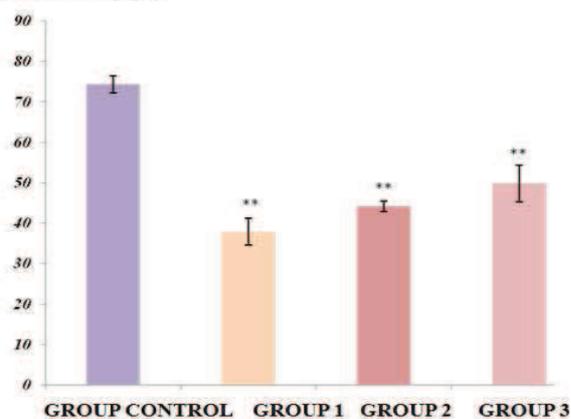


Fig. 4: The percentage of mobile epididymal sperm of mice with experimental ingested soy milk compared to the control.

The values shown are averages and their standard errors (X ± SE).

\*\* P <0.01

Group 1: from a nursing mother fed soy for 90 days and receiving soy milk.

Group 2: from a nursing mother fed soy and receiving for 90 days and plugs water.

Group 3: from a female witness and receiving for 90 days of soybean

Control group: receives throughout the experimental period plugs and water.

Number of sperm (10<sup>6</sup>/ml)

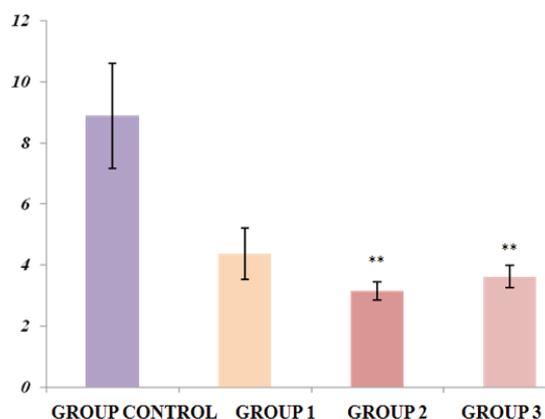


Fig. 5: Number of sperm (10<sup>6</sup>/ml) in the testes in the control mice males and experimental mice ingesting soy milk (n = 6 mice).

The values shown are averages and their standard errors (X ± SE).

\* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001.

Group 1: from a nursing mother fed soy for 90 days and receiving soy milk.

Group 2: from a nursing mother fed soy and receiving for 90 days and plugs water.

Group 3: from a female witness and receiving for 90 days of soybean

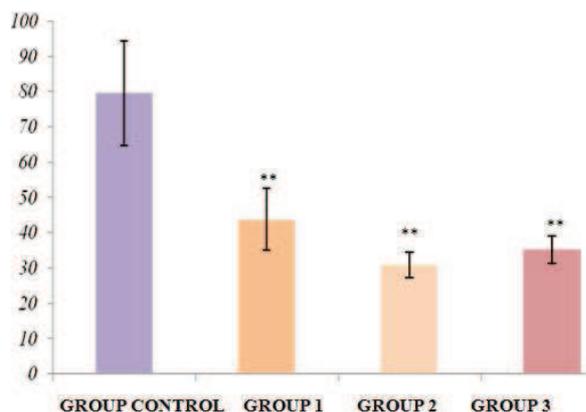
Control group: receives throughout the experimental period plugs and water.



**Counting sperm in the testis and epididymis**

The results show a significant and very significant number of testicular and epididymal sperm in mice groups who ingested milk soybean ( $p < 0.01$ ). Mice ingested soy milk groups 2 and 3 have a oligospermia (the presence of abnormally low sperm quantity) compared to control mice. The number of testicular sperm pass ( $8.9 \pm 1.72$ )  $\times 10^6 / g$  in witnesses to ( $3.17 \pm 0.30$ ) and  $\times 10^6/ml$  ( $3.63 \pm 0.36$ )  $\times 10^6/ml$  mice in groups 2 and 3 respectively (Figure 5). Epididymal sperm count is decreased very significantly in Groups 1, 2 and 3 having ingested soy milk whose values are respectively  $7.43 \pm 0.41$  and  $5.27 \pm 0.53, 6.5 \pm 0.59$  sperm compared to control mice  $14.53 \pm 1.43$  ( $p < 0.01$ ) (Figure 6).

**Number of sperm ( $10^6/ml$ )**



**Fig. 6: Number of sperm ( $10^6/ml$ ) in the epididymal in the control mice males and experimental mice ingesting soy milk ( $n = 6$  mice).**

The values shown are averages and their standard errors ( $X \pm SE$ ).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Group 1: from a nursing mother fed soy for 90 days and receiving soy milk.

Group 2: from a nursing mother fed soy and receiving for 90 days and plugs water.

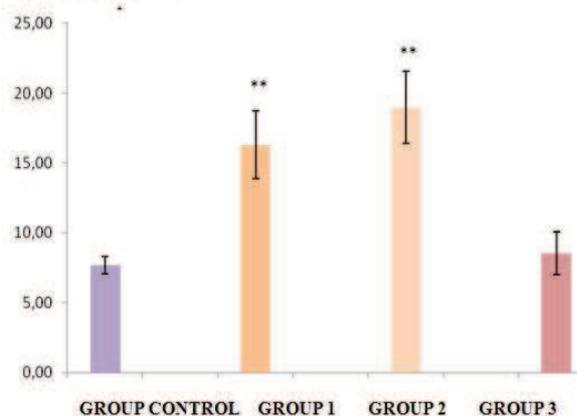
Group 3: from a female witness and receiving for 90 days of soybean

Control group: receives throughout the experimental period plugs and water.

**Sperm morphology**

Morphology, last parameter analyzed the semen does not seem to escape adverse effects of soy milk. The results of the figure (Figure 7) show that the percentage the teratozoospermia (abnormal sperm morphology) is greater in mice ingested soy milk compared to the control group. The percentage of abnormalities abnormal sperm morphology is more common in mice ingested soy milk groups 1 and 2 respectively have values ranging from  $16.3 \pm 2.41\%$  and  $19 \pm 2.57\%$  compared to the value of the control group is  $7.67 \pm 0.60\%$ . Morphology sperm is analyzed according to the different forms abnormal level of the head (Microcephalic, macrocephaly, head headless and irregular), and flagellum piece Intermediar (Coiled, short, with handle, double) observed with an optical microscope at different face (Figure 7.8.and 9).

**Sperm morphology %**



**Fig. 7: Percentage of abnormal sperm in animals of different groups.**

The values shown are averages and their standard errors ( $X \pm SE$ ).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Group 1: from a nursing mother fed soy for 90 days and receiving soy milk.

Group 2: from a nursing mother fed soy and receiving for 90 days and plugs water.

Group 3: from a female witness and receiving for 90 days of soybean  
Control group: receives throughout the experimental period plugs and water.



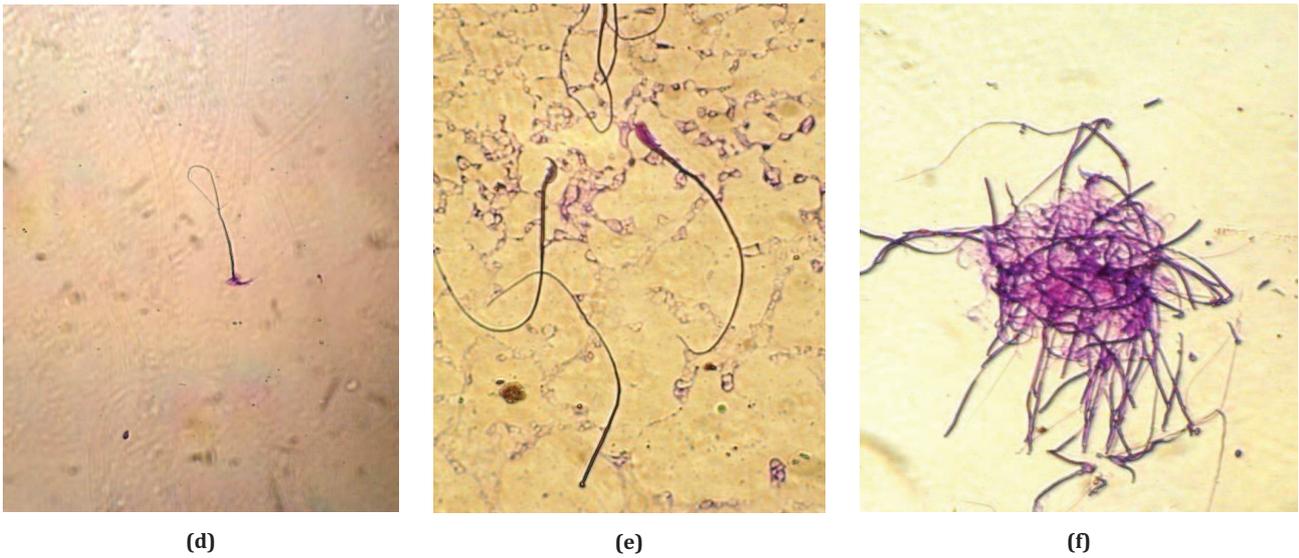
(a)



(b)



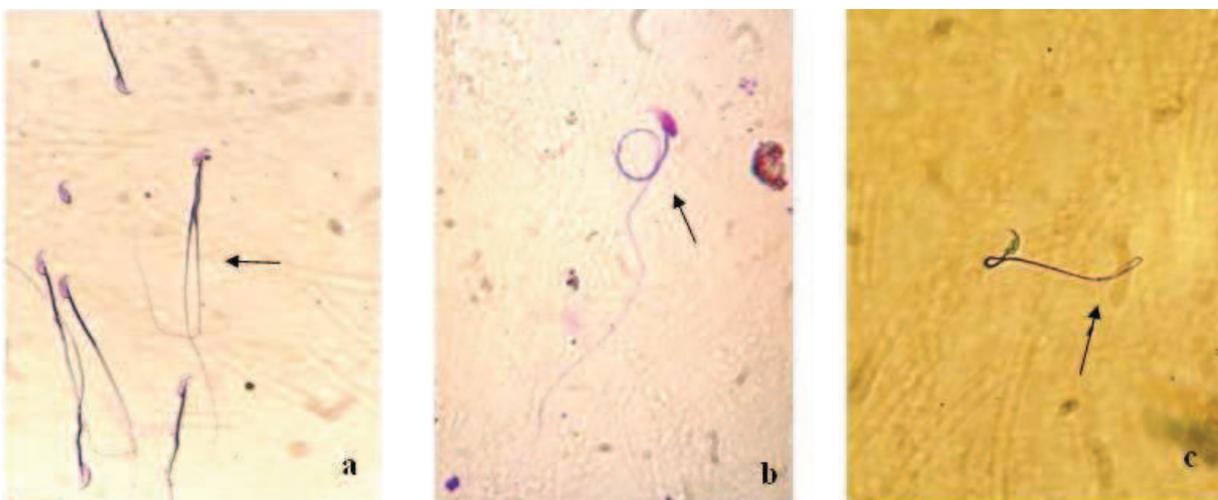
(c)



**Fig. 8: Optical microscope observation of the various abnormalities of sperm head stained with gentian violet in [magnification ×400].**  
[a] Amorphous. [b] macrocephalous. [c] microcephalic. [d] head irregular. [e] Acéphale. [f] Grouping into clusters.



**Fig. 9: Observation under an optical microscope abnormalities of the intermediate (angled) of sperm stained with gentian violet in [magnification ×400].**



**Fig. 10: Optical microscope observation of different anomalies flagellum sperm stained with gentian violet in [magnification ×400].**  
[a] Double. [b] and. [c] Coiled.

### Dosage hormonal

The results in Figure 11 show a significant decrease in the concentration of plasma testosterone in mice from group 2 who ingested soy milk by through breastfeeding ( $p < 0.01$ ). The serum concentration of testosterone from the value  $6.21 \pm 1.54$  ng / ml in the control mice and  $1.08 \pm 0.41$  ng / ml in the mice of group 2.

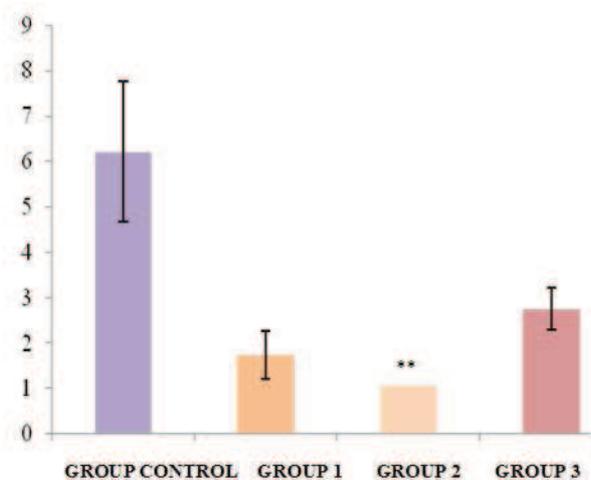


Fig. 11: the concentration of plasma testosterone (ng /ml) in animals of different groups.

### DISCUSSION

Fertility in mammals is very sensitive to disturbances in the body by exogenous agents. Numerous studies indicate a decrease in the number and quality of human male sex cells in recent years [1]. It seems that disturbances of the sexual apparatus multiply human male.

Several exogenous compounds including pesticides, drugs, organic solvents, tobacco [7], xenohormones [3]. Although the biochemical mechanisms of toxicity are not well understood, they are considered true toxic agents affecting fertility [8,9,10]. Few recent studies show that phytoestrogens may have deleterious effects in the animal, in particular on the development and maturation of sex organs, and on the fertility [11]. Food soya are the main source of phytoestrogens humans, it is important to assess the levels of Phyto-estrogen intake contained in soy foods can consume infants and young children, and to consider the possible risks. Fed infants exclusively with infant formula based soya protein.

Today is the subgroup of the population most exposed to Phyto-estrogens. This milk-based industrial soya protein is the main source of phytoestrogens in humans. These natural chemicals are likely to have a toxicity to reproduction because they are able to stimulate, promote or inhibit hormone action where they can in theory change the physiological process under an endocrine regulation [11,12,13], that is why this work was undertaken.

In the first part of our work we determined the effects of soya milk on body weight in mice. A significant decrease in body weight mice ingested soy milk compared to control mice. This decrease is probably due to the anorectic effect of soy isoflavones. The results consistent with those of [14, 15] in rabbits and rats treated with isoflavones.

The association with food intake observed in rabbits in the same study also been reported in rats fed diets containing genistein, suggesting a be anorexigenic of endocrine disruptor (PE) on the central nervous system, similar to that of endogenous estrogens. [17] However, this effect seems to be associated with a chronic treatment with large amounts of soy isoflavones. Exhibitions and pre- postnatal isoflavones in the study [18] have mounted similar declines parameter. For cons, the work by [19] showed that chronic administration and subchronic genistein in Wistar rats for 4 weeks and 13 weeks did not induce any difference in body weight.

The second part of our work has been devoted to the fertility test, the results Our experiments show that the control females mated with males ingested soy milk have a pregnancy rate (index of fertility) reduced compared to females mated with control mice, and reduced weight and size scope of the various experimental groups who ingested soya milk.

Also in another study [20] showed that the exposure of the genistein and vinclozolin gestation to adult male Wistar rats causes a reduced rate of pregnant females mated with males exposed and compared to witness.

Work [21] showed that injection of zearalenone or  $\alpha$ -zearalenol led to a reduction in fertility and reproductive potential in male mice adults. A pregnancy rate is significantly reduced in female mice mated with males treated with Zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol. Also a decrease in the number of birth is probably due to poor sperm quality of males Zearalenone and  $\alpha$  zearalenol. Similarly, it was reported by [24, 23, 22] for the Phyto-estrogen analogues estrogen, genistein did various birds and mammals led to a reduced fertility thereof. In the 3rd part of our work, we evaluated the relative organ weights of sexual Swiss mice, it showed no change in the relative weights of the testis, epididymis and seminal vesicles groups who ingested soya milk compared the control group.

These results agree with those of [25, 26] that the relative weights of sexual organs of rats did not change.

Another study that has been made by [27] did not observe any changes in rabbits testis weight.

Moreover, according to [28] exposure to genistein and diethylstilbestrol induces a significant reduction in the relative weights of these organs.

The work undertaken by [18] showed that pre-and postnatal exposure to isoflavones in rats induces an increase in testicular weight compared to the group control, however, no change was observed in the epididymides. These results are consistent with the results of the reports [30, 29]. However, a increase in testicular weight was observed in perinatal exposure of mink to genistein [31] and pre-and postnatal mice treated with genistein [23]. In contrast, some researchers have reported that the administration of exogenous estrogen or anti androgens reduces the weight of the testis and epididymis [32, 33, 34].

Routine method to assess the potential fertility of a male is the realization

of semen during which quantitative semen parameters (number of sperm) and qualitative (mobility and sperm morphological abnormalities (Abnormal forms) are analyzed. Decreased mobility and number of sperm in testicular and epididymal we observed in mice who ingested soy milk is probably due to the effect of estrogen Soy Phyto-on different control levels of spermatogenesis.

Our results show a significant and very significant percentage of epididymal sperm motility in mice groups having ingested soy milk compared to controls.

In the study [29]. The percentages of sperm motility in all animals exposed to zearalenone and its derivatives-zearalenol at all doses were significantly lower than control. These results are consistent with that of [20] have shown that exposure to genistein and vinclozolin low dose of gestation to adult male Wistar rats induced a decrease in mobility sperm. By cons, [35] have shown that in the rabbit, genistein caused increasing sperm motility.

Our results also show a significant and very significant number of testicular and epididymal sperm that is observed in mice groups who ingested soya. In this context, the work by [36] has cited no change in rats ingesting oral genistein confirming the results of [15, 37] however [18] shows that there was no significant change in the number of epididymal sperm in rats exposed to isoflavones.

Our results also showed that the percentage of teratozoospermia (anomaly sperm morphology) is greater in mice ingested milk soya.

These results agree with those of [29], the percentage of sperm abnormal increased in male mice exposed to zearalenone and its derivatives-zearalenol. Furthermore, no significant differences in percentage of abnormal forms of sperm were observed in rats exposed to genistein for 4 weeks [38].

Our results also revealed a significant decrease of serum testosterone in mice ingesting soya milk during exposure during the breastfeeding compared to controls.

Our results are consistent with those reported in the literature [40, 39, 23], the doses of high genistein males reduced testosterone levels. In addition, the study by [41] showed that genistein was administered to rats of adult males for 3 months, and the study of [42] obtained a *vitro* decreased testosterone production after exposure to isoflavones.

In contrast, exposure to long-term genistein in adult rats did not change the level of serum testosterone [41]. The same observation was made in studies [45, 44, 43, 23]. In another study [18] no significant difference serum testosterone was observed in rats exposed to genistein. The last part of our work has enabled us to assess the impact of soya milk on the histopathology of the testes and seminal vesicles.

Microscopic examination of histological sections made in the testicles mice ingesting soy milk, showed a decrease in sperm light of the seminiferous tubules of mice ingesting soy milk.

## CONCLUSION

Endocrine disruptors in the environment are increasingly challenged to explain changes in male reproductive function, including in humans.

However, their mechanisms of action on reproductive function are poorly understood and place of causality in humans has not been demonstrated. Among the experimental studies reported, the conditions of exposure are often far removed from the environmental conditions (short exposure period).

We are interested in studying the effect of consumption of milk soybeans (SOYA BIOMIL ®) on the male reproductive Swiss mice used as an experimental model.

Soya milk is a dietary product without lactose, sucrose, gluten and cow's milk proteins. It is enriched with methionine, carnitine, iron and zinc. Such milk industrially based on soya protein is the main source of phytoestrogens in humans.

These natural chemicals are likely to have toxicity function in reproduction, because they are able to stimulate, promote or inhibit hormone action where they can theoretically change the physiological process subject to endocrine regulation. This work was used to evaluate experimentally some toxic effects of consumption Subchronic soymilk male Swiss mice.

The study focused on weight gain, on the relative weight of sexual organs (testes, epididymis and seminal vesicles), mobility, count and sperm morphology and to test fertility (litter size and weight at D7, D14 and D28 and finally has to make a determination of serum testosterone hormone.

Our results show that body weight decreased very significantly in all experimental groups who ingested soya milk. However, no change relative weight of the male sex organs was observed.

In addition, we observed a decrease in sperm motility and their testicular and epididymal number, and an increase in the percentage of forms of abnormal sperm groups who ingested soya milk.

On the other hand, the serum testosterone decreased in the group who ingested milk soya beans during the lactation period.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, Algeria).

## REFERENCES

- Jegou B. The men become less fertile? less sperm count and quality less? The environment in question. *Research* 1996; 288: 60-65.
- El Feki A, Hjaiej L, Kammoun A. Impact of air pollution (gasexhaust) on the sexual activity of rat. *Biological Days of SSNT. TUNIS* 1998: 48.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104 (suppl.4) 1996; 741-803.
- Farag A, El-Aswad A, Shaaban N. Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reprod. Toxicol* 2007; 23: 232- 238.
- Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice *Reprod. Toxicol Elsevier*, 2007; 382p.
- Smith CW. *Journal of geophysical. Research*, 1989; A 94:5474-5478.
- Tuorma TE. The adverse effects of tobacco smoking on reproduction and health: a review from the literature. *Nurth Health*, 1995; 10 [2]: 105-20.
- Xie J. Effects of a chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicology*, 1995.
- El Feki A, Hjaiej L, Kammoun A. Effets du plomb d'origine automobile sur la croissance générale et l'activité sexuelle du rat. *Gynécol. Obstet. Fertil. Paris* 2000; 28: 51- 9.
- Auger J. Service d'histologie-Embryologie, Biologie de la reproduction/ CECOS, pavillon Cassini, Hopila Coch. Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens-Workshop-PNRPE 2008; P7.
- Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP. Comité de nutrition de la société française de pédiatrie infant formulas and soy protein-based formulas :current data. *Arch Pediatr* 2001; 8 :1226-33.
- Fujioka M, Uehara M, Wu J, Aslercreutz H, Susuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr* 2004; 134: 2623-2627.
- RomeroV, Dela Cruz C, Pereira M. Reproductive and toxicological effects of isoflavones on female offspring of rats exposed during pregnancy. *Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. Amin. Reprod* 2008, v.5, n3/4. p. 83-89.
- Lephart ED, Adlercreutz H, Lund TD. Dietary soy phytoestrogen effects on brain structure and aromatase in Long-Evans rats. *Neuroreport*, 2001; 12 [16]: 3451-3455.
- Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol* 15(4): 2001; 399-411.
- Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. *Toxicol. Sci*, 1999; 51: [2], 236-244.
- Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1994; 134 [6]: 2367- 2372.
- Piotrowska K, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M, Gutowska I, Nocen I, Zawislak M, Chlube D, Wiszniewska B. A change in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition*, 2011; 1-8.
- McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Edwards J, Bausch J. reproductive safety studies with genestein in rats. *Food Chem Toxicol*, 2007; 45: 1319-1332.
- Eustache F, Lessafre C, Cannivenc MC, Jouannet P, Cravedi JP, Auger J. Effets d'une exposition, à la Vinclozoline et à la Génistéine de la gestation à l'âge adulte sur la fonction de reproduction du rat Wistar mâle. *Environnement et spermatogenèse. Andrologie* 2003; 13, N° 2 : 170-178.

22. Jian Ying Yang, Guo Xin Wang Jia Liu Jing Fan Sheng Cui. Toxic effects of zeralenone and its derivatives –zeralenolon male reproductive sustem in mice reproductgive. *Toxicology* 2007; 24: 382- 387.
23. Opalka DM, Kaminska B, Piskula MK, Puchajda-Skowronska H, Dusza L. Effects of phytoestrogens on testosterone secretion by Leydig celles from Bilgoraj ganders (Anser anser). *Br Poult Sci*, 2006 ; 47:237-45.
24. Wisniewski AB, Klein SL, Lakshamanan Y, Gearhart JP. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology* 169, 2003; 1582- 1586.
25. Weber KS, Setchell KDR, Stocco DM, Lephard ED. Dietary soy phytoestrogens decrease testosterone levels and acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Downey rats. *J Endocrinol* 2001;170:591-9.
26. Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazwa H, Nakajin S. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci*, 2003; 746: 733- 742.
27. Lee BJ, Kang JK, Jung EY, Yun YW, Baek IJ, Yon JM, Lee YB, Sohn HS, Lee JY, Kim KS, Nam SY. Exoposte to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. *J Vet. Sci* 2004 ; 5 (3):227-234.
28. Cardoso JR, Bào SN. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones sipplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal reproduction science* 2007; 97: 237-245.
29. Vendula K, Peknicova J, Boubelik M, Buckiova D. Body and organ weight sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *theiriogenology* 2004; 61: 1307-1325.
30. Jiang CX, Pan LJ, Freng Y, Xia XY, Huang YF. High- dose daidzein affects growth and development of reproductive organs in male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2008;14: 351-5.
31. Guan L, Huang Y, Chen ZY. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats. *Biomed Environ Sci* 2008; 21 :197-204.
32. Ryokkynen A, Nieminen P, Mustonen AM, Pyykonen T, Asikainen J, Hanninen S. et al. Phytoestrogens after the reproductive organ development in the mink (mustela vision). *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202: 132- 9.
33. Pryor JL, Hughes C, Foster W, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ health perspect* 2000; 108: 491-503.
34. Atanassova NN, McKinnel C, Fisher J, Sharpe RM. Neonatal treatment of rats with diethylstilbestrol (DES) induces stromal-epithelial abnormalities of the vas deferens and cauda epididymis in adulthood following delayed basal cell development. *Reproduction* 2005;129 : 589-601.
35. Sugawara T, Yue ZP, Tsukahara S, Mutoh K, Hasegawa Y et al. Progression of the dose related effects of estrogenic endocrine disruptors, an important factor in declining fertility, differs between the hypothalamopituitary axis and reproductive organs of male mice. *J V et Med Sci* 2006; 68: 1257-67.
36. Yousef MI, El-Demerdash FM, Al-Salhen KS. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *J Environ.Sci* 2003; *Health B38* (4): 463- 478.
37. Dalu A, Blaydes BS, Bryant CW, Latendresse JR, Weis CC, Delclos BK. Estrogen receptor expression in the prostate of rats treated with dietary geinstein. *Journal of Chromatography B* 777, 2002; 249-260.
38. Shibayama T, Fukata H, Sakurai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T, Mori C. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocrinol* 2001; J 48: (6) 655-663.
39. Bhandari R K, Komuro H, Nakamura S, Higa M, Nakamura A. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Zoological Science* 2003; 20: 1399-1404.
40. Delclos KB, Bucci TJ, Lomax IG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. *Reproductive Toxicology* 2001; 15: 647-663.
41. Roberts D, Veeramachaneni DN, Schlaff WD, Awoniyi CA. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine* 2000;13( 3): 281-286.
42. Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand ML, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W et al. Influence of long term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen geinstein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *J Endocrinol* 2005;187: 117- 24.
43. Taxvig C, Elleby A, Sonne-Hansen K, Bonefeld-Jorgensen EC, Vinggaard AM, Lykkesfeldt AE et al. Effects of nutrition relevant mixtures of phytoestrogènes on steroidogenesis, aromatase, estrogen, and androgen activity. *Nutr Cancer* 2010; 62:122-31.
44. Masutomi N, Schibutani M, Takagi H, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/ reproductive systems in later life. *Toxicology* 192, 2003;149-170.
45. Fielden MR, Samy SM, Chou KC, Zacharewski TR. Effect of human dietary exposure levels of genisteine during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food.Chem.Toxicol* 2003; 41(4): 447-454.
46. Kang KS, Che JH, Lee YS. Lack of adverse effects in the floffspring maternally exposedto genistein at human intake dose level. *Food and chemical toxicology* 2002; 40: 43-51.