

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Filière : Biologie et Physiologie Animale Comparée
Option : Reproduction et Biotechnologies Animales



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Optimisation de la conservation du sperme
épididymaire des bovins en luttant contre le stress
oxydatif**

Présenté par :

REDJRADJ Lamia

Soutenu le : **11 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M. Ayad. A

M. Iguer-ouada. M

M. Nait-Mouloud. M

MCA

Professeur

MAA

Président

Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I :.....

La Reproduction chez le bovin.....

I. Anatomie de l'appareil genital du taureau :.....2

I. 1. Les testicules.....3

I. 2. Les voies spermatiques :.....3

I. 2.1. Epididyme.....3

I. 2.2. Le canal déférent.....4

I. 2.3. L'urètre.....4

I. 3. Le pénis :.....4

I. 4. Les glandes annexes.....5

I. 4.1. Les deux vésicules séminales.....5

I. 4.2. La prostate:.....5

I. 4.3. Les glandes bulbo-urétrales.....5

II. La spermatogenèse.....6

III. Collecte et analyse du sperme épидидymaire.....6

III. 1. Collecte du sperme épидидymaire.....6

III. 2. Evaluation de la qualité du sperme épидидymaire.....6

III. 2.1. Evaluation macroscopique :.....7

III. 2.2. Examen microscopique:.....7

IV. Le sperme épидидymaire:.....9

IV. 1. Intérêt du sperme épидидymaire.....9

IV. 2. Technique de récolte :.....9

Chapitre II.....

Le stress oxydatif.....

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I. | Le stress oxydatif..... | 10 |
| I. | 2. Espèces réactives de l’oxygène (ROS)..... | 10 |
| I. | 2.1. Principaux radicaux libres..... | 10 |
| I. | 2.2. Les différentes cibles des espèces réactives (ER)..... | 11 |
| I. | 3. Systèmes antioxydants..... | 13 |
| I. | 3.1. Systèmes enzymatiques (Fig. 11)..... | 13 |
| I. | 3.2. Systèmes non enzymatiques..... | 15 |
| II. | stress oxydatif et sperme..... | 16 |

Chapitre III.....

Conservation du sperme.....

| | | |
|-------------|---|-----------|
| III. | 1. Indications..... | 17 |
| III. | 2. Procédés de conservation de la semence..... | 17 |
| III. | 2.1. Dilution..... | 17 |
| III. | 2.2. Conservation du sperme..... | 18 |
| III. | 3. Dommages causés par la conservation..... | 19 |

Etude expérimentale.....

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I. | Matériel et méthodes :..... | 20 |
| a. | Prélèvement du sperme épидидymaire :..... | 20 |
| b. | Analyse du sperme..... | 22 |
| b. | 1. Matériels de l’analyse..... | 23 |
| b. | 2. Analyse du sperme épидидymaire..... | 23 |
| ➤ | Analyse macroscopique..... | 23 |
| ➤ | Analyse microscopique..... | 24 |
| c. | Conservation de la semence de taureau..... | 24 |
| c. | 1. Préparation des complexes..... | 24 |
| c. | 2. Milieux de conservation..... | 26 |
| c. | 3. La conservation du sperme..... | 26 |

Résultats et discussions

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I. | Analyse des résultats de la VSL..... | 29 |
| I. | 1. Chez le bovin..... | 29 |

Conclusion.....34

Bibliographie

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant pour tous ses dons accumulés tout au long de notre vie et de nous avoir permis, aujourd'hui, la réalisation de notre projet de master, encore un rêve qui se réalise grâce au Dieu. Je tiens à présenter mes remerciements à mon promoteur Mr IGUEROUDA M, pour la proposition du thème, pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien et Mr FATMI pour son orientation et son aide précieuse. Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé de Prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements vont à :

Mr AYAD AH, vous me faites l'honneur et le plaisir

d'accepter la présidence du jury.

Mr NAIT MOULOUD M, je vous remercie

d'avoir accepté de juger ce travail ,surtout pour vos conseils et de siéger parmi les

membres de jury.

DEDICACES

A mon papa, Tu m'as appris que le travail est un trésor, tu es toujours là, tu m'encourages et tu me soutiens quelques soient les difficultés. Ce travail est aussi le tien. Merci beaucoup PAPA.

A ma maman, Tu m'as nourri de ton amour, tes prières, tes conseils, ton affection et ta compréhension sont toujours pour moi des piliers fondamentaux. Voici aujourd'hui un fruit de ta patience et des sacrifices consentis. Merci MAMAN chérie.

A mes frères SOUFIEN, KARIM et LAMINE

A ma sœur KARIMA et ma belle sœur SABRINA,

Merci pour vos prières et votre soutien sans faille. Que l'esprit d'amour règne toujours au milieu de nous.

A ma sœur SISSA, son mari ABD GHANIE et leur filles

A mes cousins, cousines et toute la famille REDJRADJ.

A mon cher grand-père AHCENE.

A mes amis : KARIMA, ALAA, HANANE, AMEL, MIASSA et WARDA

A mon futur marie qui a été toujours avec moi à chaque instant de ma vie et toute sa famille.

A tous mes collègues de promotion RBA.

A tous mes enseignants Pour avoir contribué à ma formation.

LAMIA

Liste des abréviations

| Abréviation | Signification |
|-----------------------------|--------------------------------|
| v/v | Volume / volume |
| % | Pourcentage |
| ROS | Radicaux libres oxygénés |
| RNS | Radicaux libre azotés |
| RL | Radicaux libre |
| ER | Espèces réactives |
| ADN | Acide disoxyribonucléique |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| CAT | Catalase |
| ERO | Espèces réactives de l'oxygène |
| SPZ | Spermatozoid |
| CDs | Cyclodextrins |
| CHL | Cholestérol |
| VitE | Vitamine E |
| VitC | Vitamine C |
| NaCl | Chlorur de sodium |
| t | Temps |
| CASA | Computer assiste semen analyse |
| C° | Degré Celsius |
| VSL | Straight-line velocity |
| O ₂ ⁻ | Anion superoxyde |
| OH ⁻ | Radical hydroxyle |

Liste des abréviations

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| ROO^\cdot | Radical peroxyde |
| H_2O_2 | Peroxyde d'hydrogène |
| O_3 | Ozone |
| N_2O_4 | Tetroxyde de diazote |
| GPx | Glutathion |
| H_2O | Eau |
| %Pro rapid | Pourcentage progressive rapid |

Liste des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Appareil génital du taureau (Constantinesca, 2004)..... | 2 |
| Figure 2: Schéma d'une section longitudinale du testicule et de l'épididyme (Dyce et <i>al.</i> , 1987)..... | 3 |
| Figure 3: Représentation schématique de l'organisation cellulaire de l'épithélium épидидymaire en coupe transversale et des différentes voies de régulation des fonctions épидидymaires (Robaire , 2006)..... | 4 |
| Figure 4: Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle (Gayrard, 2007)..... | 6 |
| Figure 5: collecte de semence avec la méthode «retrograde-flushing » :(Stout, M.2012)..... | 9 |
| Figure 6: Etat de déséquilibre oxydatif..... | 10 |
| Figure 7: Les sources des espèces réactives (Poisson, 2013)..... | 11 |
| Figure 8: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Esterbauer H et <i>al.</i> ,1992)..... | 12 |
| Figure 9: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)..... | 12 |
| Figure 10: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Cadet et <i>al.</i> , 2002)..... | 13 |
| Figure 11: Système antioxydant enzymatique (Marfak, 2003)..... | 14 |
| Figure 12: Cycle réactionnels de régénération des antioxydants (Pham-Huy et al., 2008)..... | 15 |
| Figure 13: testicule dépourvu de la tunique vaginale..... | 20 |
| Figure 14: épидидymes juste après leurs dissections et leurs isolations des testicules..... | 21 |
| Figure 15: l'épididyme sans tissus conjonctifs..... | 21 |
| Figure 16: Récolte de la semence par la méthode rétrograde..... | 22 |
| Figure 17: Semence épидидymaire pure et fraîchement collectée..... | 22 |
| Figure 18: photographie du matériel utilisé pour l'analyse du sperme..... | 23 |
| Figure 19: Photo du rotavapeur..... | 25 |
| Figure 20: Photo de l'étuve..... | 25 |
| Figure 21: Photographie du microscope CASA (computer assisted semen analyser)..... | 27 |
| Figure 22: étapes de préparation des échantillons..... | 28 |
| Figure23: Histogramme représentant les vitesses (VSL) des spermatozoïdes des bovins conservés au réfrigérateur (4°C) en fonction du temps dans les 6 traitement utilisés (CD-CHL, CD-CHL-VitE, CD-VitE, complexe, Tris, VitC, contrôle (tris))..... | 32 |
| Figure24: Histogramme représentant les vitesses (VSL) des spermatozoïdes de l'ovin conservés au réfrigérateur (4°C) en fonction du temps dans les 6 traitements utilisés (CD-CHL, CD-CHL-VitE, CD-VitE, complexe, contrôle (Tris), (Tris), VitC)..... | 33 |

Liste des Tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Détermination la note de motilité massale de la semence..... | 7 |
| Tableau 2: échelle d'appréciation de la motilité individuelle du sperme de taureau..... | 8 |
| Tableau 3: composition des milieux de réfrigération..... | 26 |

Introduction

Introduction

Chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît dans l'épididyme, organe formé d'un long tube reliant le testicule à l'urètre. Les spermatozoïdes testiculaires ne sont ni mobiles, ni féconds, ils acquièrent leur fertilité et leur mobilité progressive pendant le transit épидидymaire. De multiples observations ont mis en évidence que le milieu épидидymaire est un excellent milieu de conservation avec de nombreuses protéines présentes dans ce milieu (**Guérin, Y et al., (2003)**). Les qualités tant structurales que fonctionnelles du sperme épидидymaire, le place comme un produit idéal pour le développement et l'optimisation des biotechnologies de la reproduction.

La biotechnologie de la reproduction vise à amplifier la descendance des géniteurs d'élite et a une meilleure diffusion de l'acquis génétique induit par la sélection artificielle, ainsi que la conservation de la biodiversité des races domestiques et des espèces sauvages. Parmi les techniques qui améliorent la transmission de l'information génétique et la conservation de la biodiversité figure la cryoconservation.

Les méthodes de conservation affectent plusieurs fonctions cellulaires. La membrane plasmique est une cible majeure qui subit des modifications chimiques, topographiques et mécaniques. Les spermatozoïdes sont sensibles aux radicaux libres qui sont libérés par les cellules altérées conduisant au phénomène de peroxydation et qui génère à son tour un dysfonctionnement de la mobilité ou dans la réaction acrosomique (**Guerra et al., 2004**).

Pour optimiser la cryoconservation et lutter efficacement contre les effets délétères, plusieurs stratégies sont mises en place. Dans notre cas l'objectif s'articule autour du développement d'un milieu de conservation pour lutter efficacement contre le stress oxydatif tout en renforçant la rigidité de la membrane cytoplasmique.

L'objectif particulier du présent travail est d'utiliser simultanément quatre molécules : le cholestérol pour renforcer la membrane cytoplasmique, la vitamine E comme antioxydant, les cyclodextrines pour mieux solubiliser les deux dernières et la vitamine C comme antioxydant mais aussi pour recycler la vitamine E et permettre une efficacité plus soutenue.

Chapitre I :
La Reproduction chez
le bovin

I. Anatomie de l'appareil génital du taureau :

L'appareil génital mâle (Fig. 1) est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle où se réalise la fécondation (**Barone, 1978**). Il est composé de trois grandes parties :

- les testicules
- les voies spermatiques, incluant l'épididyme et le canal déférent
- les voies uro-génitales, incluant l'urètre, les glandes annexes et le pénis

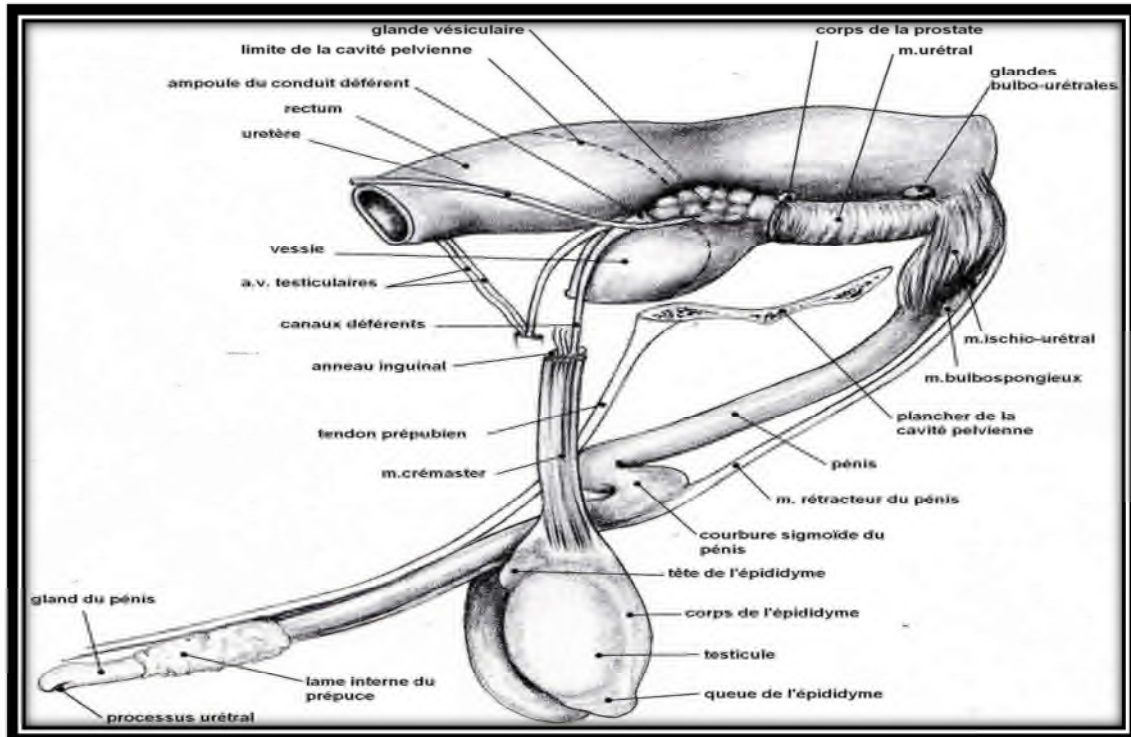


Figure 1: Appareil génital du taureau (Constantinesca, 2004).

I. 1. Les testicules

Sont des organes pairs logés dans les bourses dont le revêtement cutané est le scrotum. A l'extérieur de l'abdomen, cette localisation permet le déroulement de la spermatogénèse. Selon **Chenoweth (1997)**, la descente des testicules chez le taureau s'effectue avant la naissance. Le testicule est pendulaire, à axe vertical et dont le poids varie en fonction de la race (chez le taureau, 500 grammes à l'âge de deux ans). Il mesure alors en moyenne 11 à 15 cm de hauteur sur 7 à 9 cm de largeur et 7 à 9 cm d'épaisseur (**Setchell., 1991**). Les testicules ont une double fonction, une fonction exocrine (spermatogénèse) et une fonction endocrine (production des hormones mâles).

I. 2. Les voies spermatiques :

I. 2.1. Epididyme

Situé sur la face postérieure du testicule (Fig. 2), l'épididyme est un long tube rétréci, une fois déroulé, il peut mesurer entre 40 et 50 mètres chez le bovin et l'étalon (**Sullivan, 2004**). D'après **Johnston et al (2005)**, l'épididyme est une structure différenciée, cindée en trois compartiments anatomiquement distincts :

1. **Tête** : région proximale dont la longueur est de 36 cm reliée au testicule par le canal efférent qui comporte 13 à 20 conduits.
2. **Corps** : partie médiane.
3. **Queue** : partie distale en continuité avec le canal efférent

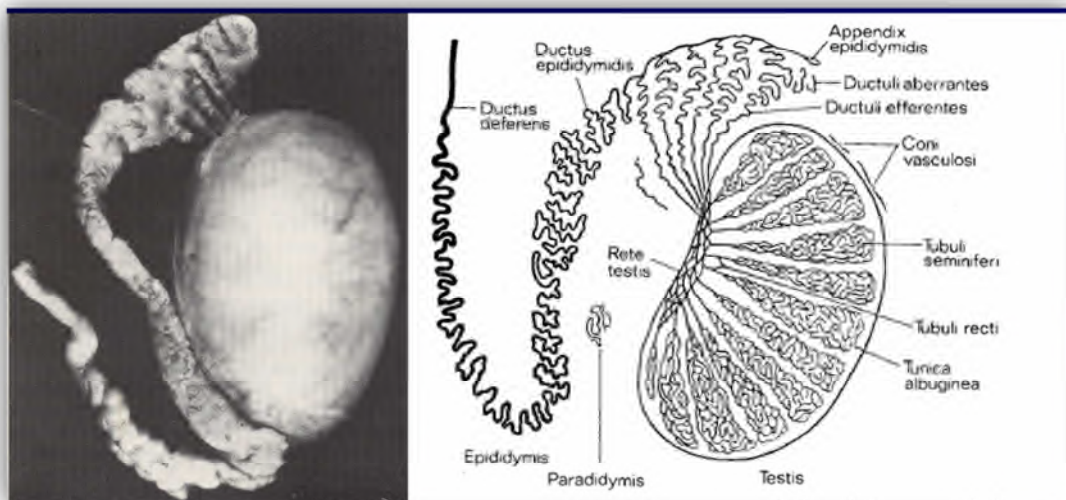


Figure 2: Schéma d'une section longitudinale du testicule et de l'épididyme (Dyce et al., 1987).

A leur tour, ces régions sont subdivisées en plusieurs segments. Cette subdivision repose sur des analyses ultra-structurales ainsi que sur l'étude des activités enzymatiques et fonctionnelles.

La structure histologique étudiée par certains auteurs comme **Reid (1959)** sur les animaux de laboratoire (taureau, bélier, rat...) a montré que la paroi du canal épididymaire est constituée de trois couches cellulaires différentes (Fig. 3) qui sont la couche discontinue de cellules basales, la couche de hautes cellules cylindriques et la couche des fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (**Britan, 2006**).

L'épididyme phagocyte les spermatozoïdes dégénérés, réabsorbe le liquide testiculaire, sécrète des substances jouant un rôle dans la maturation des spermatozoïdes et permet leur évacuation dans le conduit déférent. (Orgebinchrist, 1961).

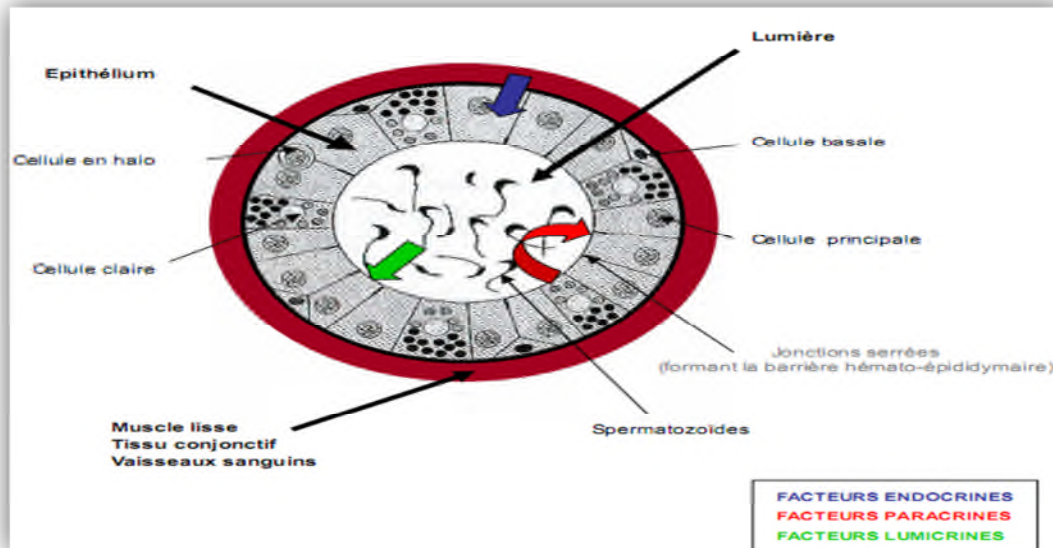


Figure 3: Représentation schématique de l'organisation cellulaire de l'épithélium épididymaire en coupe transversale et des différentes voies de régulation des fonctions épididymaires (Robaire , 2006).

I. 2.2. Le canal déférent

Fait suite au canal épididymaire, ce canal s'engage dans le trajet inguinal où il contribue à former le cordon testiculaire. Il pénètre dans la cavité abdominale et atteint la face dorsale de la vessie formant un très léger renflement pelvien avant de se jeter dans l'urètre. (Barone, 1978, Bonnes et al., 2005).

I. 2.3. L'urètre

Est un conduit uro-génital (il transporte les urines et spermatozoïdes), l'urètre constitue la partie terminale des voies conduisant le sperme lors de l'éjaculation. C'est un tube long de 100 à 120 cm, qui comprend une partie pelvienne et une partie pénienne (Rigal, 2008).

I. 3. Le pénis :

Chez le taureau, il est de type fibro-élastique, les corps caverneux sont pauvres en tissus érectiles et pourvus d'une albuginée très épaisse (Rigal, 2008). Pendant l'accouplement, le pénis sort du taureau à la suite du déploiement de l'inflexion sigmoïde du pénis en forme de S

et les spermatozoïdes sont transportés des testicules jusqu'à l'urètre par le canal déférent puis ils sont expulsés par le pénis (**Kabera, 2008**).

I. 4. Les glandes annexes

Il existe trois glandes: les glandes vésiculaires ou vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales.

4.1. Les deux vésicules séminales

Structure lobulaire de 8 à 15 centimètres de long, 3 à 5 centimètres de large pour 1 à 2 centimètres d'épaisseur. Les vésicules sont uniformes en taille, lobulées, mobiles et turgescents (**Rigal, 2008**). Elles secrètent un produit lubrifiant, coagulant, protégeant et nourrissant la semence dans l'urètre. Ce sont les principales glandes annexes à l'origine de la sécrétion de fructose, principal substrat énergétique des spermatozoïdes. Les glandes vésiculaires produisent également de l'inositol et de l'acide citrique en quantité importante. Chez le taureau, des concentrations élevées en sodium, potassium, calcium et magnésium sont observées. Le PH alcalin des sécrétions des glandes vésiculaires est dû à une concentration importante en bicarbonates (**Knobil et al, 1988**).

4.2. La prostate:

La prostate est une glande à pH acide, elle sécrète un liquide riche en éléments minéraux, zinc principalement puis calcium, magnésium et potassium. Les sécrétions prostatiques contiennent de nombreuses protéines dont la plupart présentent une activité protéasique. La prostate est une source de vésicules lipidiques qui peuvent transférer des lipides par fusion membranaire avec les spermatozoïdes (**Dacheux, 2001**).

I. 4.3. Les glandes bulbo-urétrales

Produisent une sécrétion qui donne une consistance au sperme et nettoie l'urètre avant l'éjaculation. Le principal composant de la sécrétion des glandes bulbo-urétrales est la sialomucine qui est responsable de la gélification de la semence après son émission. Elles contiennent aussi des phéromones jouant un rôle dans l'attraction des femelles (**Knobil et al., 1988**).

II. La spermatogenèse

La spermatogenèse (Fig. 4) est le processus de production des spermatozoïdes par lequel les cellules germinales diploïdes indifférenciées sont progressivement transformées en cellules haploïdes hautement spécialisées nommées spermatozoïdes (Thibault et Levasseur, 2001). La durée de la spermatogenèse est d'environ 54 jours chez le taureau ; La durée moyenne de transit dans l'épididyme est de 8 jours (Hochereau *et al.*, 1964). L'entrée des spermatogonies souches dans le processus de spermatogenèse ou cycle séminal se fait à intervalles réguliers de 13,5 jours. La spermatogenèse se déroule en trois phases : la phase proliférative, la phase méiotique et la phase de différenciation (Eddy., 1998).

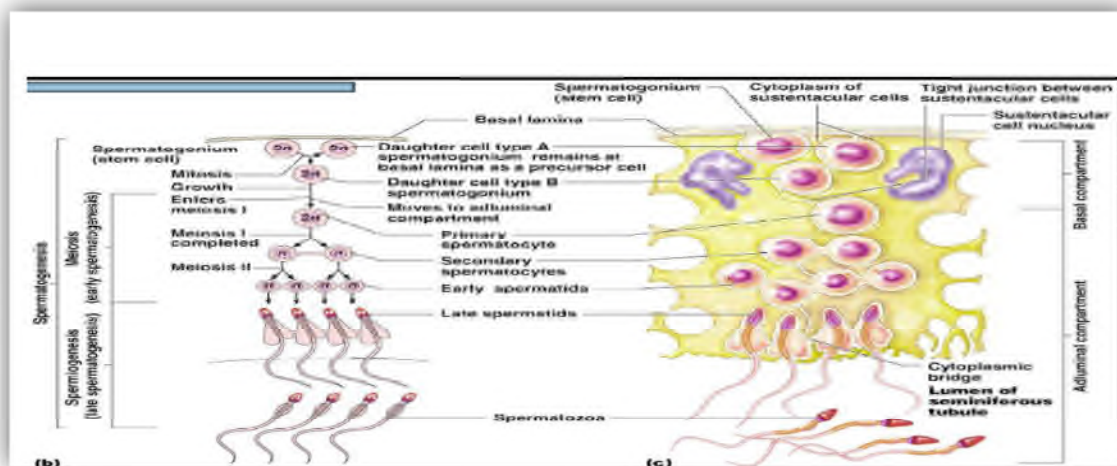


Figure 4: Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle. (Gayrard, 2007).

III. Collecte et analyse du sperme épидидymaire

III. 1. Collecte du sperme épидидymaire

La collecte de sperme épидидymaire permet le recueil des spermatozoïdes qui sont stockés dans l'organisme depuis un certain temps. Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent en lui introduisant un petit tube (canule) pour la collection du sperme (Deutscher *et al.* 2007).

III. 2. Evaluation de la qualité du sperme épидидymaire

L'évaluation de la qualité spermatique est indispensable à réaliser avant toute utilisation de la semence pour détecter d'éventuelles anomalies de spermatozoïdes (Posiere, 2002). Les différentes méthodes d'évaluation permettent de connaître la qualité de la

semence au niveau macroscopique et microscopique ce qui permet de se prononcer sur sa fécondance.

III. 2.1. Evaluation macroscopique :

III. 2.1.1. Volume

Selon **Kabera (2008)**, le volume du sperme varie de 0,5 à 14 ml en fonction de l'âge, la race, l'alimentation, l'état de santé et les conditions de récolte ainsi que la fréquence de récolte. Le volume moyen est de 6ml chez un taureau adulte et 2ml chez un jeune.

III. 2.1.2. Couleur du sperme

La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant (**Ezekwe, 1988**) et son aspect est généralement homogène et crémeux (**Djabakou et al., 1984**). Chez le taureau, la couleur normale du sperme est dans la plupart des cas ivoire-crème ou blanc-laiteux, blanc-jaunâtre (en fonction de la concentration de spermatozoïdes).

III. 2.1.3. Viscosité du sperme:

Elle est traduite par la consistance du sperme et sa concentration en spermatozoïdes. Une bonne viscosité est probablement synonyme d'une bonne concentration en spermatozoïdes. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse » (**Cabannes, 2008**).

III. 2.2. Examen microscopique:

Réalisés pour évaluer la qualité de la semence en étudiant les paramètres suivants :

III. 2.2.1. Motilité :

C'est un élément d'appréciation de la fonction du spermatozoïde et qui comporte:

➤ **Motilité massale :**

C'est un mouvement des spermatozoïdes qui s'observe sur une goutte du sperme au microscope à faible grossissement (x10) (**Najjar et Ben Mrad, 2013**). Une note de 0 à 5 (Tableau 1) est attribuée en fonction de l'intensité des vagues observables (**Chemineau et al., 1993**).

Tableau 1: Détermination la note de motilité massale de la semence

| Note | Aspects du mouvement |
|----------|---------------------------------|
| 0 | Immobilité totale |
| 1 | Mouvement individualisés |
| 2 | Mouvements très lents |

| | |
|---|---|
| 3 | Motilité massale générale de faible amplitude |
| 4 | Motilité massale rapide, sans tourbillons |
| 5 | Motilité massale rapide avec tourbillons |

Source : (Chemineau et al., 1993)

➤ **Motilité individuelle :**

C'est un mouvement de chaque spermatozoïde qui s'apprécie au microscope au grossissement x40 pour une dilution de 1:5 avec de la solution tris-buffer. Une échelle de 0 à 5 (tableau 2) est notée (Kabera, 2008).

Tableau 2: échelle d'appréciation de la motilité individuelle du sperme de taureau

| Critères | Notes |
|--|-------|
| Absence de spermatozoïdes : azoospermie | 0 |
| Absence de spermatozoïdes vivants : spermatozoïdes morts (absence de mobilité) | 1 |
| 25% de spermatozoïdes mobiles | 2 |
| 60% de spermatozoïdes mobiles | 3 |
| 80% de spermatozoïdes mobiles | 4 |
| 100% de spermatozoïdes mobiles | 5 |

Source: (Kabera, 2008)

III. 2.2.2. Concentration du sperme

C'est le nombre de spermatozoïdes dans un ml de la semence. La dilution se fait par une solution de fixation contenant 10 ml de formol à 35% v/v dans 1 litre de NaCl à 0,9% (Ariola et al., 2001). La concentration varie entre 300 et 700x10⁶ spz/ml. (Boussit, 1989), selon Kabera (2008), un sperme de bonne qualité a une concentration supérieure à 0,5.10⁹ spz/ml.

III. 2.2.3. La morphologie des spermatozoïdes

L'examen morphologique permet de différencier les spermatozoïdes normaux des anormaux et vivants des non vivants. C'est une méthode qui se réalise sur des frottis du sperme coloré (encre de Chine, Giemsa, Eosine-aniline). D'après Johnston S.D et al.,(2001) le sperme est admissible s'il contient moins de 25% de spermatozoïdes anormaux et plus de 60 % de spermatozoïdes vivants.

IV. Le sperme épидидymaire:

IV. 1. Intérêt du sperme épидидymaire

Après la mort d'un animal, les spermatozoïdes restent vivants pendant une période déterminée. Si ces gamètes sont récupérés et employés pour produire des embryons par des techniques de reproduction assistée, il reste tout à fait possible d'avoir des progénitures (Songsasen *et al*, 1998). Dans ce contexte, la collecte des spermatozoïdes épидидymaires des animaux morts, la cryoconservation et l'utilisation de la fécondation in-vitro sont des outils utiles pour sauver le matériel à haute valeur génétique des animaux fortement productifs et à intérêt économique ou des espèces qui présentent un risque d'extinction (Martins *et al*, 2007). Aussi, le sperme épидидymaire reste une solution pratique dans le contexte de recherche scientifique avec un accès plus facile à la semence à partir de testicules collectés de l'abattoir sans passer par la collecte à partir d'animaux vivants.

IV. 2. Technique de récolte :

La méthode «retrograde-flushing » :

La méthode de rinçage est décrite par (Martinez-pasteur *et al*., 2006). Les parties caudales et les canaux déférents sont isolés du reste de l'épididyme en faisant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corps et de la partie proximale (fig. 5). Ensuite, une aiguille est introduite dans la lumière du canal déférent, le fluide spermatique est alors rincé avec une seringue chargée avec 4 ml d'une solution isotonique (chauffée à 37°C dans une direction rétrograde en allant du canal déférent vers la partie caudale (Martinez-pasteur *et al.*, 2006).

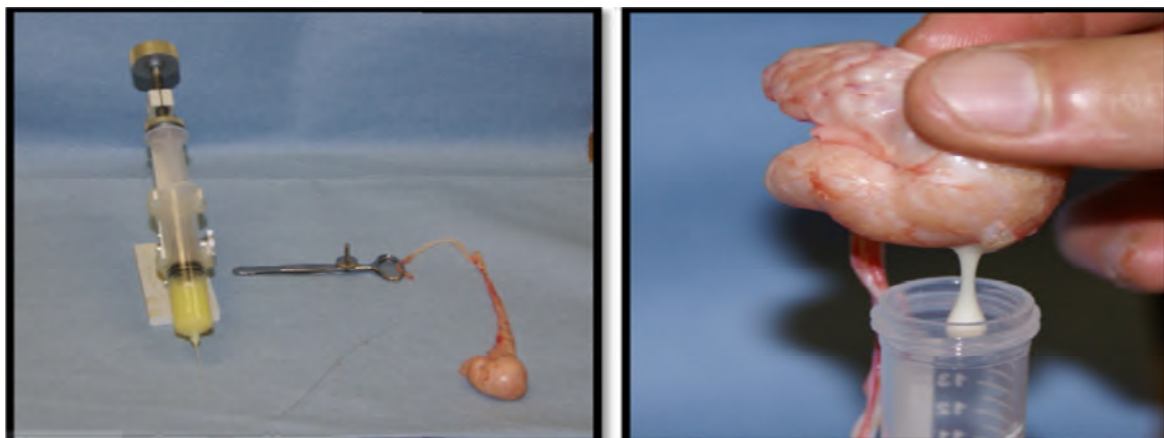


Figure 5: collecte de semence avec la méthode «retrograde-flushing » :(Stout, M.2012).

Chapitre II
Le stress oxydatif

I. Le stress oxydatif

I. 1. Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre en faveur des oxydants (Fig. 6) contre les antioxydants (**Bertiridige, 2000**). Le stress oxydant est aujourd'hui décrit comme une des causes majeures de l'infertilité masculine. Il induit des altérations membranaires et nucléaires, entraînant une perte de mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (**Pons et al ., 2009**).

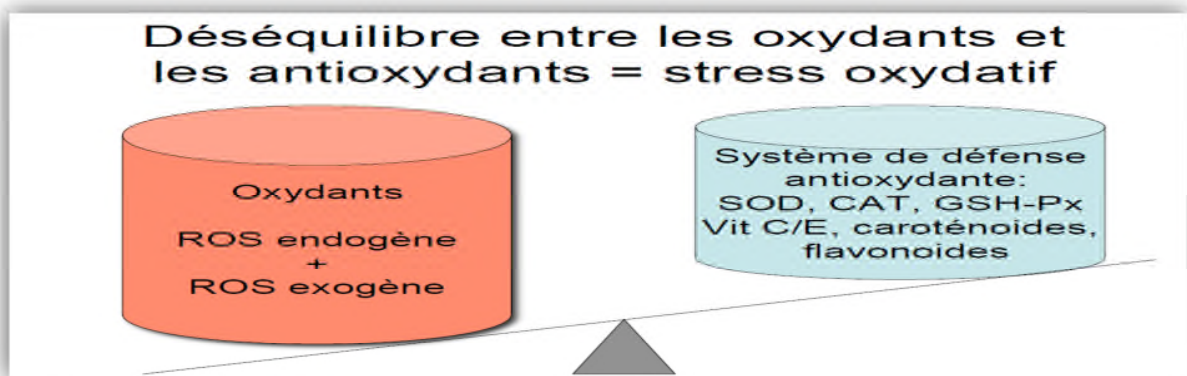


Figure 6: Etat de déséquilibre oxydatif

I. 2. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Sont des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés formés lors du métabolisme de l'oxygène. Très instables, ils réagissent avec les molécules voisines en leur arrachant un électron, les transformant à leur tour en espèces radicalaires (**Pons et al ., 2009**) capables d'endommager les structures cellulaires. L'oxygène est la substance la plus oxydante de notre organisme. Ces espèces ont une demi-vie très courte (**Toussaint, 2007**).

I. 2.1. Principaux radicaux libres

Les ROS et les RNS sont les termes décrivant collectivement les radicaux libres (**Pham-Huy et al., 2008**) avec les principales espèces radicalaires (Anion superoxyde O_2^- , Radical hydroxyle OH^\cdot , Radical peroxyde ROO^\cdot) et non radicalaires (Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , Ozone O_3 , Tetroxyde de diazote N_2O_4) (**Hadjigogos, 2003**). Les espèces oxygénées et azotées non

Chapitre II

radicalaires exhibent également une action oxydante et peuvent être facilement converties en espèces radicalaires. (Hadjigogos, 2003).

I. 2.1.1. Origine des radicaux libres (RL)

La production de radicaux libres peut être d'origine endogène ou exogène (Fig. 7) et résulte d'activités enzymatiques ou non enzymatiques (Pham-Huy *et al.*, 2008).

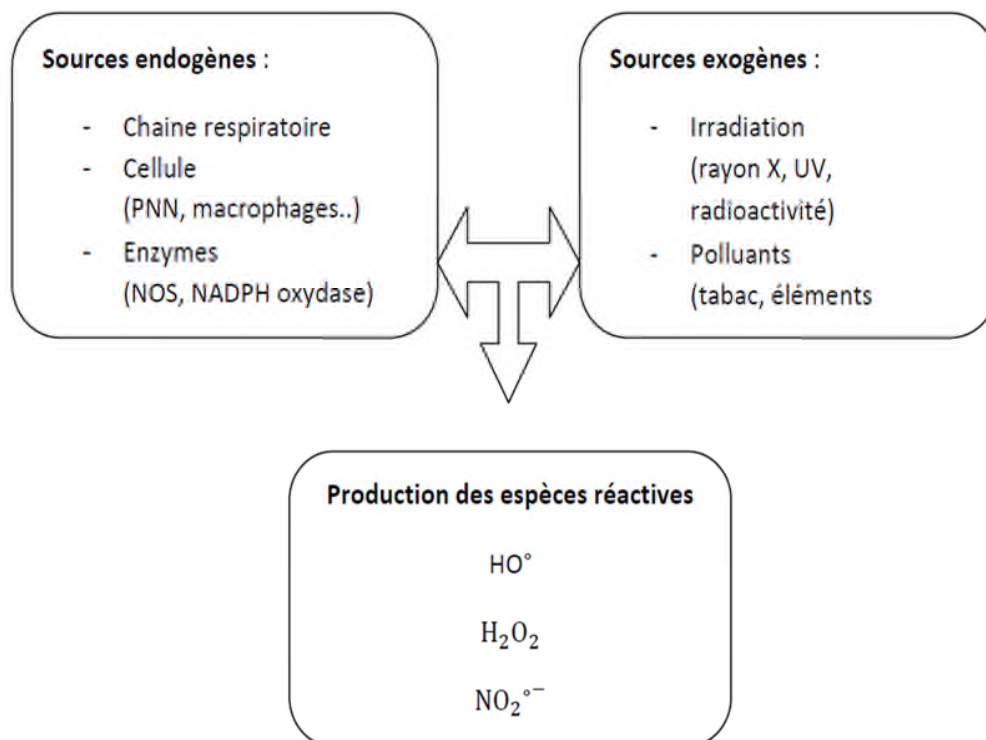


Figure 7 : Les sources des espèces réactives (Poisson, 2013).

I. 2.2. Les différentes cibles des espèces réactives (ER)

I. 2.2.1. Lipides

Les lipides membranaires sont la première cible des ERO lors du processus de la peroxydation lipidique (Fig. 8). L'attaque se fait sur les acides gras polyinsaturés (Flouie *et al.*, 2006). D'après Re *et al.*, (2005), cette peroxydation est généralement initiée par le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et le peroxy-nitrique.

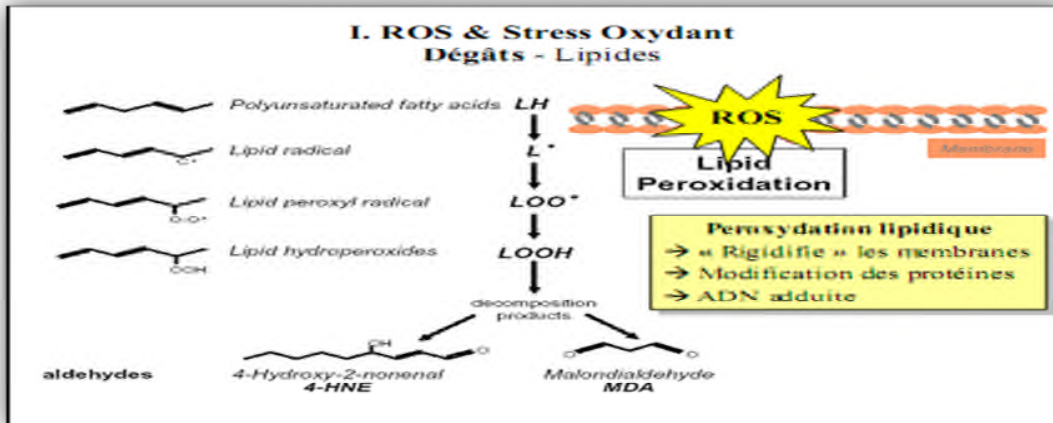


Figure 8 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Esterbauer H et al.,1992).

I. 2.2.2. Protéines

Les protéines comportant un groupement sulfhydryle (SH) sont les plus sensibles aux attaques radicalaires (Fig. 9) (Beckman et Ames, 1998). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Selon Gardès-Albert et al., (2003), lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif.

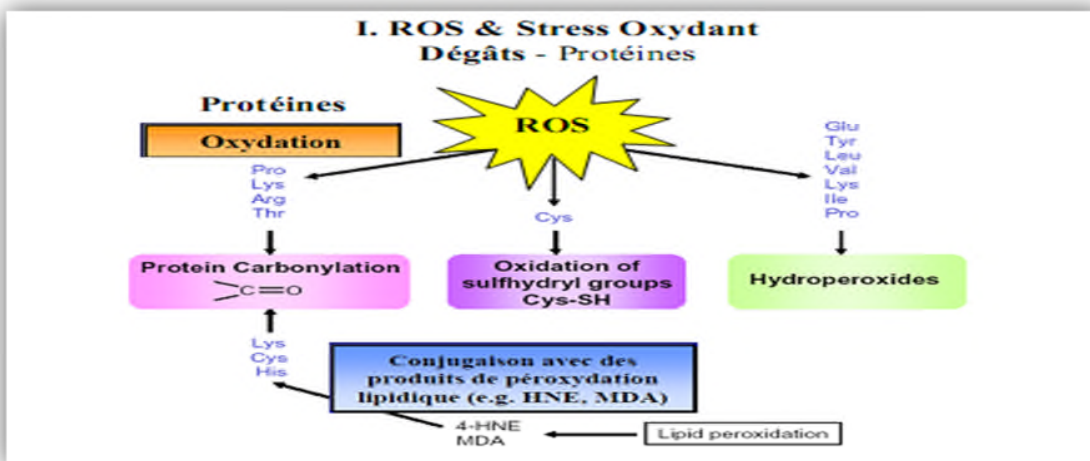


Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier,2003).

Chapitre II

I. 2.2.3. ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA (Fig. 10). La guanine par exemple peut réagir avec $\cdot\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-deoxyguano-sine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique (Cadet *et al.*, 2002).

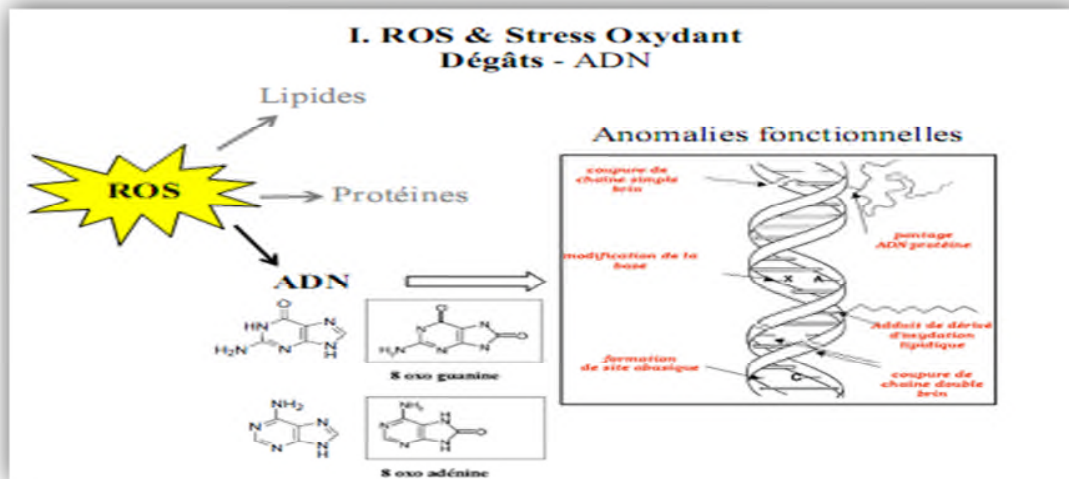


Figure 10 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Cadet *et al.*, 2002).

I. 2.2.4. Glucides

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de traces métalliques, il libère des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $\text{OH}\cdot$, lesquels entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE (Ogino *et Wang*, 2007).

I. 3. Systèmes antioxydants

C'est un système de défense de l'organisme qui est représenté par des molécules variées, elles sont produites soit par l'organisme ou apportées par l'alimentation (Béguel *et al.*, 2013).

I. 3.1. Systèmes enzymatiques (Fig. 11)

I. 3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) transforme le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Trois isoformes différents de la SOD ont été identifiées : la SOD mitochondriale à manganèse (MnSOD, SOD2), la SOD cytosolique à cuivre/zinc (Cu/ZnSOD,

Chapitre II

SOD1) et la SOD extracellulaire (ecSOD, SOD3), qui est également une enzyme à cuivre/zinc (Young et Woodside, 2001; Wassmann *et al.*, 2004; Menvielle-Bourg, 2005; Valko *et al.*, 2006; Afonso *et al.*, 2007).

I. 3.1.2 .Glutathion peroxydase

Le rôle de la glutathion –peroxydase est de réduire le peroxyde d’hydrogène ainsi que les peroxydes lipidiques. Deux molécules de glutathion cèdent deux protons (H⁺) au peroxyde d’hydrogène, les deux glutathions forment une liaison disulfure alors que le peroxyde d’hydrogène devient deux molécules d’eau (H₂O) (Young et Woodside, 2001; Wassmann *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006).

I. 3.1.3. Catalase

Le rôle de la catalase (CAT) est de transformer le H₂O₂ en H₂O et O₂ en passant par deux étapes, en éliminant le H₂O₂, cette enzyme élimine indirectement l’O₂⁻ qui est à l’origine du H₂O₂ par l’action de la SOD (Young et Woodside, 2001; Wassmann *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006).

I. 3.1.4. Glutathion réductase

Le rôle de la **glutathion-réductase** est de **régénérer la glutathion-peroxydase**. Dans le cadre de cette réaction, la glutathion-réductase utilise un cofacteur le **NADPH**. La glutathion-réductase se retrouve dans le cytosol et dans les mitochondries, où se trouve du glutathion-peroxydase (Garait, 2006).

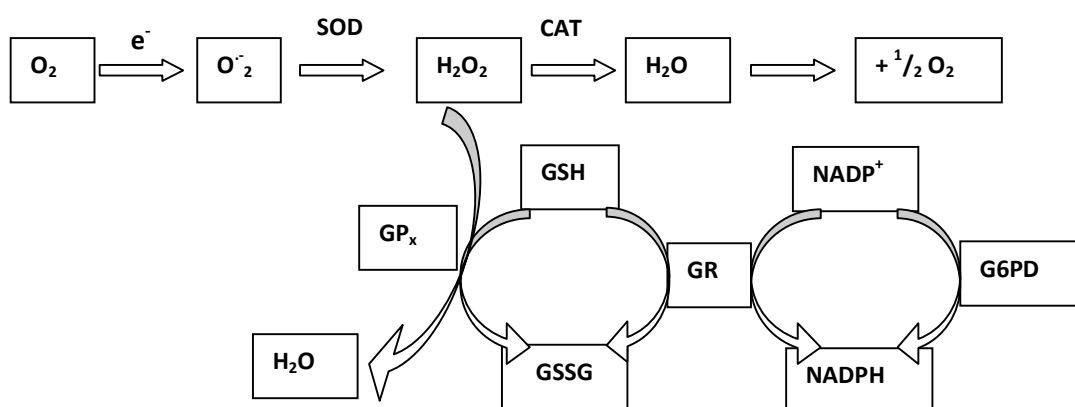


Figure 11 : Système antioxydant enzymatique (Marfak, 2003).

Chapitre II

I. 3.2. Systèmes non enzymatiques

I. 3.2.1. Antioxydants liposolubles

❖ La vitamine E

La vitamine E est caractérisée par un fort potentiel antioxydant (**Ivanov, 2008**). C'est un composé chiral avec huit stéréoisomères : α , β , γ , δ tocophérol et α , β , γ , δ tocotriénol. α -tocophérol. Cette et vitamine est la molécule la plus active, son caractère hydrophobe lui permet de s'insérer dans les acides gras des biomembranes et des lipoprotéines et de les protéger des radicaux libres. Sa fonction antioxydante réside essentiellement dans la protection contre la peroxydation lipidique (**Pham-Huy et al., 2008**).

❖ Les caroténoïdes

Les pigments caroténoïdes sont largement présents dans la nature, ils jouent un rôle important dans la protection cellulaire de l'organisme. Les caroténoïdes tels que le lycopène et le β -carotène sont d'importants composés biologiques pouvant désactiver les molécules excitées électroniquement tel que l'oxygène singulet avec un processus désigné sous le terme quenching (**Mascio et al., 1991**).

I. 3.2.2. Antioxydants hydrosolubles

❖ La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique agit en synergie avec la vitamine E pour piéger les radicaux libres (**Pham-Huy et al., 2008**). Cette dernière régénère la vitamine E et devient le radical ascorbyle très stable.

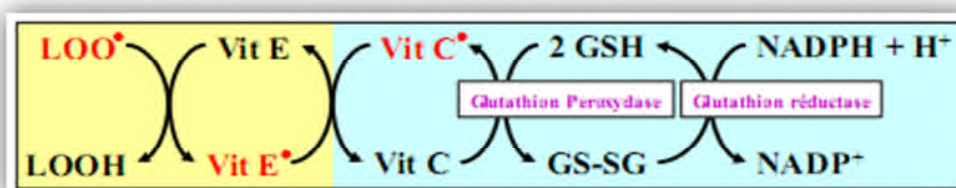


Figure 12 : Cycle réactionnels de régénération des antioxydants (**Pham-Huy et al., 2008**).

Chapitre II

II. Stress oxydatif et sperme

Les molécules réactives oxydantes (ERO) contribuent au fonctionnement spermatique comme la maturation post-testiculaire, la compaction de l'ADN et le phénomène de la capacitation. Cependant, l'excès de ces molécules permet d'engendrer le stress oxydatif. Les spermatozoïdes eux mêmes et l'environnement épидидymaire sont à l'origine de ces ERO (Chabory, 2009). Selon Partyka et al., (2012). Le stress oxydatif dans le sperme est un phénomène lié à l'augmentation du taux d'oxydation des composants cellulaires et la production excessive de ERO.

Le stress oxydatif a été reconnu comme l'une des causes les plus importantes de l'infertilité masculine (Lanzafame, 2009), et qui reste la conséquence de la peroxydation lipidique qui entraîne la rigidité de la membrane spermatique et une perte de la mobilité avec l'oxydation de l'ADN ce qui conduit à des fractures simples du double brin (Godeas, 1997).

➤ Système de défense de la semence

Les spermatozoïdes ont une capacité réduite à lutter contre les attaques radicalaires mais ils possèdent des composants antioxydants comme le glutathion (GPx₁ et GPx₄), l'acide ascorbique (vitamine C) et l'alpha tocophérol (la vitamine E).

Au niveau de l'épididyme et certaines glandes comme la prostate, on trouve le Cu, le Zn, la SOD qui sont capables de se lier à des spermatozoïdes, et aussi la catalase mais qui est peu présente et parfois totalement absente (Chabory, 2009).

Chapitre III
Conservation du sperme

III. 1. Indications

La conservation de la semence permet de préserver le potentiel génétique d'un animal pendant une durée qui varie en général de quelques heures à plusieurs jours, voir une période plus longue. Elle permet ainsi la possibilité de transmettre ce potentiel à la descendance lorsque l'animal ne pourra plus se reproduire, suite à des affections pathologiques, à la vieillesse ou après sa mort (**Fuertes, 2008**). La conservation permet en outre le transport de la semence sur de longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle, ce qui facilite l'échange et la diffusion de la génétique ou la vente internationale de la semence (**Fuertes, 2008**).

III. 2. Procédés de conservation de la semence

La conservation de la semence peut se résumer en quelques étapes :

III. 2.1. Dilution

Les dilueurs assurent un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes *in vitro* et augmentent le nombre de doses à inséminer (**England, 1993**). De plus, ils protègent les spermatozoïdes de l'effet négatif de la baisse des températures (**Pena, 2000; Stanescu et Alin, 2010**).

III. 2.1.1. Caractéristiques et rôles des dilueurs

D'après **ENGLAND (1993)**, un dilueur doit être comme suit :

- être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation,
- posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes
- avoir un pouvoir antioxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes contre les chocs thermiques et mécaniques,
- être dépourvu d'agents infectieux.

III. 2.1.2. Composition des dilueurs

Les dilueurs sont des substances qui ont un rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau (**Fuertes, 2008**). Seuls le glucose, le fructose et le mannose sont métabolisés par la glycolyse au sein des spermatozoïdes (**RigauI et al., 2001**).

D'autres sucres (lactose, sucrose, raffinose tréhalose) agissent comme cryoprotecteurs extracellulaires en créant une pression osmotique à l'extérieur de la cellule, ce qui diminue la formation de glace intracellulaire (**Purdy, 2006b**).

Les substances tampons sont aussi une composante majeure des dilueurs, leur présence est plus importante pour le sperme de taureau étant donné la concentration élevée en spermatozoïdes et où la glycolyse élevée engendre une diminution rapide du pH (**Hanzen Ch, 2010**).

Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane ou TRIS est le plus communément employé. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible et qui assure aussi la pression osmotique nécessaire (**Fuertes, 2008**). Le jaune d'œuf et le lait possèdent également un pouvoir tampon, mais qui reste limité, ils sont surtout utilisés pour leur apport en cholestérol et en phospholipides (**Hanzen, 2010**).

III. 2.2. Conservation du sperme

Les techniques de conservation consistent en la congélation et la réfrigération du sperme.

III. 2.2.1. Conservation à long terme : congélation

La congélation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures souvent dans l'azote liquide à -196°C . A cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (**Bakhach et al., 2007**).

III. 2.2.2. Conservation à court terme : Réfrigération

La conservation du sperme par réfrigération consiste à maintenir les spermatozoïdes dans des températures permettant de réduire leur mobilité et leur métabolisme sans atteindre le seuil de températures négatives (**Decuadro, 2004**). La réfrigération du sperme de taureau se fait à une température voisine de 5°C , pour éviter les chocs thermiques, elle doit être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de $0.5^{\circ}\text{C} / \text{minute}$ entre 37 et 22°C et de $1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ entre 22 et 5°C . La semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours (**Hanzen, 2010**).

III. 3. Dommages causés par la conservation

Les spermatozoïdes sont soumis à de nombreuses agressions au cours de la conservation et qui peuvent être :

- choc thermique lors de leur réfrigération, de leur conservation et de leur réchauffement (**Ponglowhapan et al., 2004a**).
- acidification du milieu extra-cellulaire (**Bue, 1992**).
- choc osmotique lors de la dilution (**Hermansson U. et Linde-Forsberg C., 2006**).

La conservation est ainsi susceptible d'altérer la structure et la fonction des spermatozoïdes. Dans ce contexte, **Hermansson et Linde-Forsberg (2006)** ont montré que la mobilité des spermatozoïdes après réfrigération est réduite, **Rota et al. (1999)** ont également prouvé que le pourcentage de spermatozoïdes capables de la semence réfrigérée est plus élevé que celui de la semence fraîche. Enfin, **England et Ponzio. (1996)** ont démontré que plus le temps de réfrigération augmente, plus la qualité de la semence se dégrade. Cependant, les effets de la réfrigération sont moins néfastes pour les spermatozoïdes que ceux de la congélation.

Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes :

Notre étude a été réalisée sur des testicules de taureau récupérés au niveau de l'abattoir de Bejaia le matin tôt juste après l'abattage.

a. Prélèvement du sperme épидидymaire :

La semence a été prélevée par la méthode de rinçage rétrograde «rétrograde-flushing». (Stout,. 2012), effectuée comme suite :

Dissection de l'épididyme

- Les enveloppes tissulaires du testicule et de l'épididyme ont été enlevées avec un bistouri (figure 13)



Figure 13: testicule dépourvu de la tunique vaginale

- Isolement du canal déférent et de l'épididyme avec un bistouri puis rinçage avec l'eau et séchage avec du papier absorbant. (Figure 14).



Figure 14 : épидидymes juste après leurs dissections et leurs isolations des testicules

- Nettoyage des tissus conjonctifs et isolement des vaisseaux sanguins pour éviter toute contamination avec le sang.



Figure 15 : l'épididyme sans tissus conjonctifs.

Récolte de la semence

- une seringue remplie d'air est introduite dans la lumière du canal déférent(3).
- Une incision est réalisée au niveau de la queue de l'épididyme (1).
- l'éppendorf est placé juste en dessous afin de récolter la semence (4).
- l'écoulement de la semence est effectuée sous la pression de la seringue vidée d'air dans la lumière du canal (2).

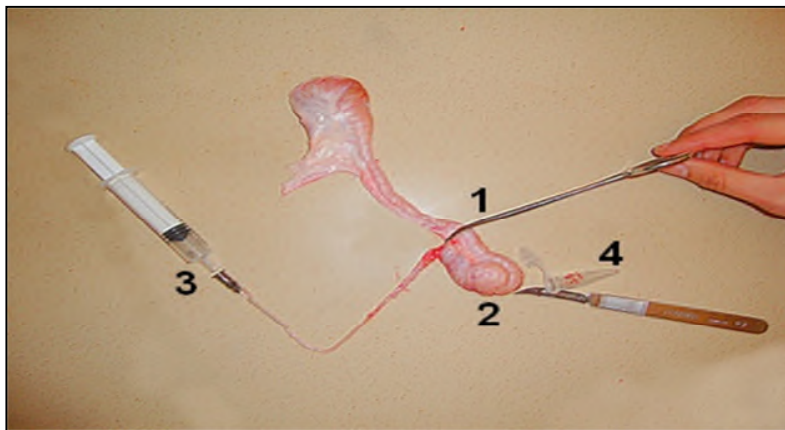


Figure 16 : Récolte de la semence par la méthode rétrograde.

- La totalité du sperme épididymaire est collectée dans un eppendorf.



Figure 17: Semence épididymaire pure et fraîchement collectée.

b. Analyse du sperme

b.1. Matériels de l'analyse

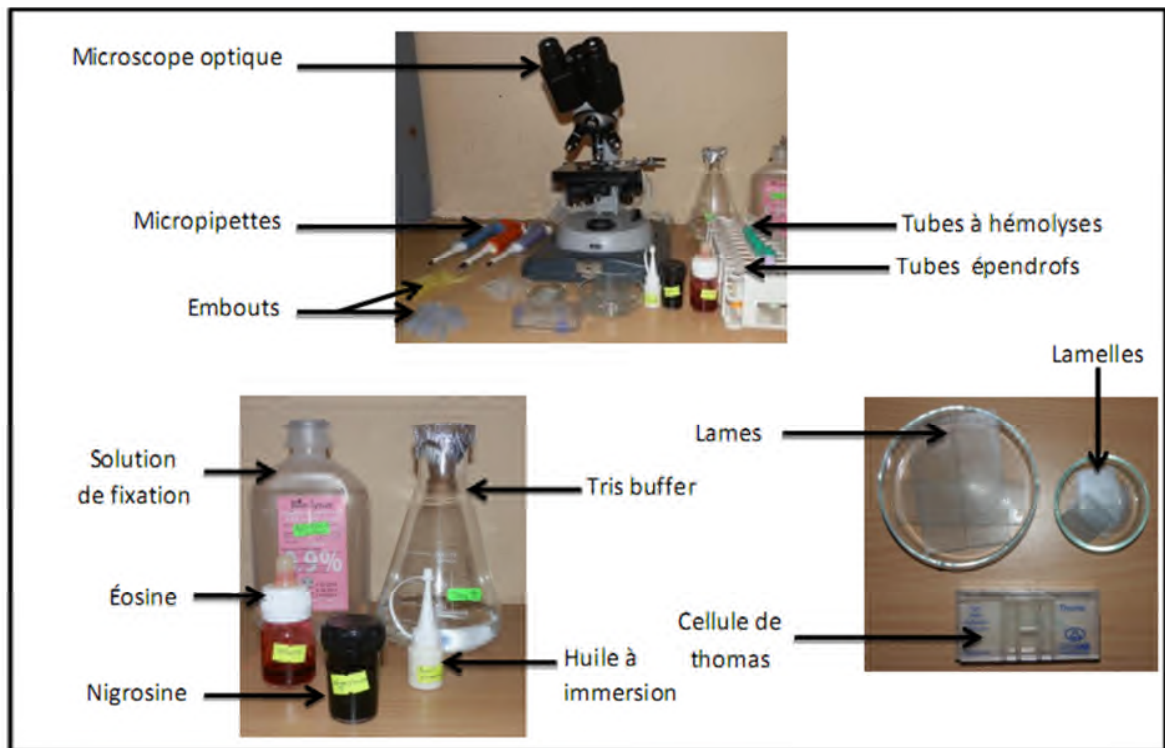


Figure 18 : photographie du matériel utilisé pour l'analyse du sperme.

b.2. Analyse du sperme épидидymaire

L'analyse macroscopique et microscopique de la semence récoltée est évaluée en fonction des paramètres suivants : (volume, couleur, mobilité massale, mobilité individuelle, concentration, morphologie et viabilité).

➤ **Analyse macroscopique**

A l'œil nu, elle se réalise pour mesurer le volume et noter la couleur de la semence.

1. Volume

L'instrument utilisé est un ependorf gradué qui donne la lecture du volume de la semence.

2. Couleur

La couleur est déduite par une simple observation

➤ Analyse microscopique

1. Mobilité massale

La semence est déposée sur la lame puis observée au microscopique optique avec un Gx10 pour évaluer la mobilité massale qui est classée entre 0 et 5 (**Chemineau et al ., 1993**).

2. Mobilité individuelle

La dilution du sperme par le tampon tris est de (1 :10). A l'aide d'une pipette de 10ul, on a prélevé une goutte de la solution qui est déposée entre lame et lamelle puis on passe à l'observation au microscope optique avec le Gx40 avec un classement de la qualité de 0 à 5 (**Chemineau et al ., 1993**).

3. La concentration

La concentration des spermatozoïdes est mesurée automatiquement par l'analyseur informatique (CASA) en utilisant une cellule de Makler.

c. Conservation de la semence de taureau

c. 1. Préparation des complexes

➤ Cyclodextrine/Vitamine E

On a combiné les deux molécules : cyclodextrine et la vitamine E par rapport au ratio de complexation (1 :1). Une quantité de 120,23mg de cyclodextrine est ajoutée à 100mg de la vitamine E, un volume de 75ml d'éthanol est ajouté, puis l'ensemble est porté sur l'agitateur mécanique pendant 48h. Pour le séchage, on a utilisé rotavapeur à 150 bars, 50° C pendant deux heures et étuve à 75°C pendant 2 heures.

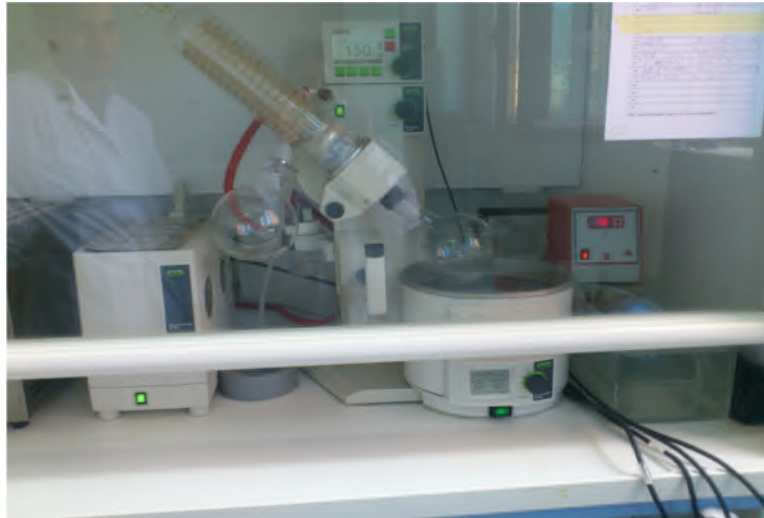


Figure 19: Photo du rotavapeur.



Figure 20: Photo de l'étuve.

➤ Cyclodextrine/Cholestérol

Pour le complexe cyclodextrine et le cholestérol, on a utilisé la même méthode sauf que le ratio de complexation est de (2 :1) avec des quantités de cyclodextrine et cholestérol de 293,54 mg et 100 mg, respectivement.

Une fois l'évaporation a atteint sa fin le grattage est réalisé à l'aide d'une spatule en métal. L'extrait obtenu est une poudre dont la texture diffère en fonction du complexe :

- Cyclodextrine et vitamine E : sous forme de pâte.
- Cyclodextrine et cholestérol : sous forme de poudre

Les deux complexes sont conservés dans le dessiccateur pour garder leur stabilité et le taux d'humidité.

c. 2. Milieux de conservation**Tableau 3: composition des milieux de réfrigération**

| Contrôle | CD-CHL | CD-Vit E | Vit C | CD-Vit E-CHL | CD-Vit E-CHL-Vit C |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 900µl + 100µl de sperme | 900µl + 100µl de sperme | 900µl + 100µl de sperme | 900µl + 100µl de sperme | 900µl + 100µl de sperme | 900µl + 100µl de sperme |

c. 3. Conservation à température ambiante et réfrigération**a. Matériel utilisé**

1. Réfrigérateur ;
2. les tubes eppendorfs ;
3. les tubes à hémolyses ;
4. les micropipettes ;
5. les étiquettes ;
6. les traitements ;
7. sperme ;
8. portoir.

b. Méthodes

1. Immédiatement après la récolte, on calcule le volume du sperme puis on dilue avec du tampon tris (1 :10).

| Tampon Tris |
|---|
| Tris (hydroxyméthylminométhane) : 2,42g |
| -Acide citrique : 1,38g |
| -Fructose : 1g |
| Eau distillé : 100ml |

2. Préparation d'une série pour la conservation au réfrigérateur qui contient 6 tubes dont l'un représente le contrôle et les autres les traitements.
3. Ajouter 1 volume de sperme dilué à 1 volume de chaque traitement.
4. Analyse de la mobilité spermatique à T_0 à l'aide d'un logiciel informatique (SCA : Sperm Class Analyzer, Fig. 21).



Figure 21: Photographie du microscope CASA (computer assisted semen analyser).

5. Mettre la série dans le réfrigérateur à 5°C.
6. Analyse de la mobilité à intervalles réguliers.

Pour comparer la conservation du sperme bovin, nous avons utilisé le même protocole sur le sperme ovin.

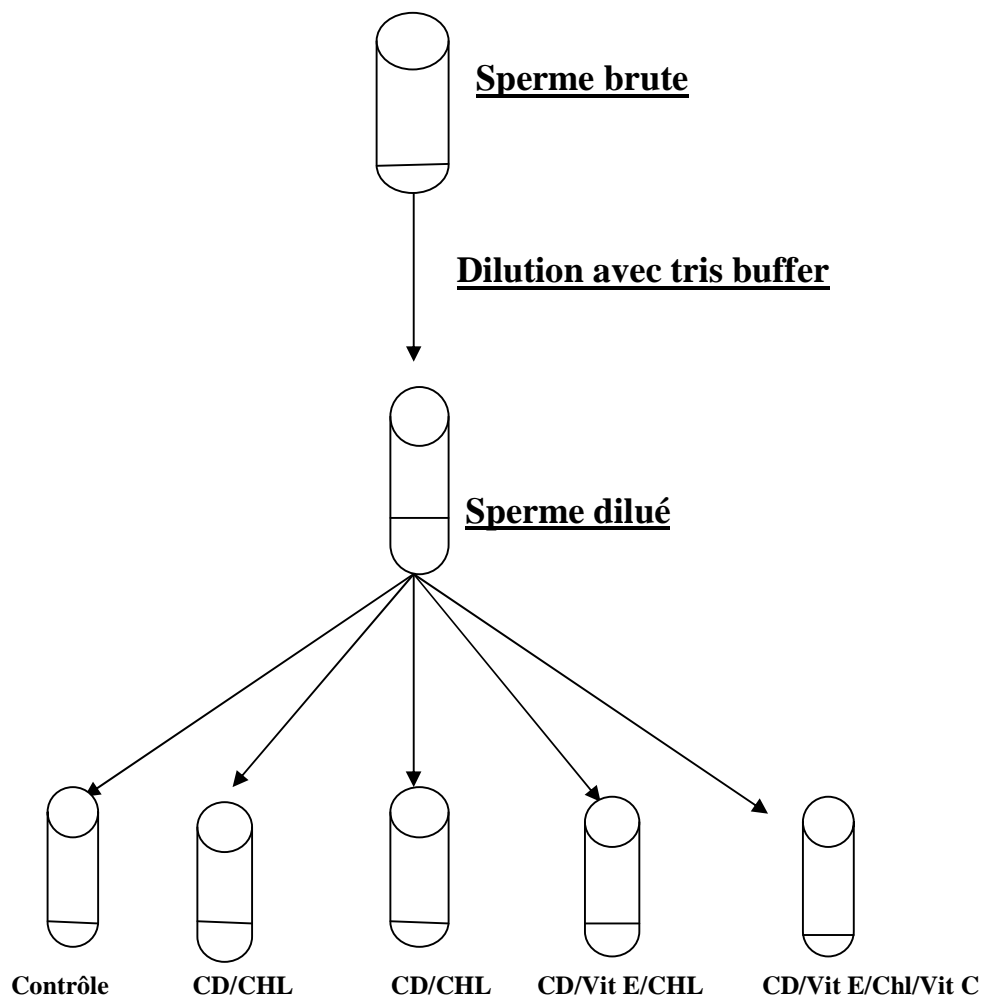


Figure 22: étapes de préparation des échantillons.

Résultats et discussions

L'objectif du présent travail est d'améliorer la conservation du sperme bovin en luttant contre le stress oxydatif survenant aussi bien dans la réfrigération que dans la congélation. Notre approche a consisté à utiliser simultanément quatre molécules : la cyclodextrine, le cholestérol, la vitamine E et la vitamine C. L'objectif premier est surtout d'améliorer la conservation du sperme bovin, cependant nous avons aussi utilisé le sperme ovin à titre comparatif. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous.

I. Analyse des résultats de la VSL

I. 1. Chez le bovin

Après la réfrigération de la série des échantillons, à l'aide d'une analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA), les mesures des VSL des spermatozoïdes conservées sont obtenues. Nous pouvons voir sur la figure 23 les valeurs de VSL dans les différents traitements utilisés au cours du temps. La VSL dans l'échantillon contrôle présente une évolution décroissante à partir de T0 pour atteindre les valeurs les plus basses après 24h de conservation pour augmenter ensuite à 48 heures. Cette augmentation à 48 heures concerne tous les échantillons à l'exception du CD-CHL. Les raisons de cette augmentation restent inexplicables. Les résultats révèlent aussi que les valeurs les plus élevées pour la VSL sont obtenues pour les trois milieux CD-CHL, CD-CHL-VitE, et CD-VitE, notamment pendant les premières heures de conservation. A 4h, il apparaît clairement que le milieu CD-CHL-VitE permet de maintenir les valeurs les plus élevées de vitesse des spermatozoïdes. Cette augmentation est certainement liée à un renforcement de la membrane cytoplasmique par le cholestérol et à la lutte contre le stress oxydatif par la vitamine E, mais aussi au fait d'augmenter la solubilité de ces deux molécules par les cyclodextrines accroissant ainsi leur action au niveau de la membrane cytoplasmique.

Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires animales qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides (**Koronkiewicz and Kalinowski, 2004**). De ce fait, le traitement du sperme avec le cholestérol avant la conservation pourrait réduire la sensibilité des membranes des spermatozoïdes aux dommages du refroidissement (**Moore et al., 2005**). Dans ce sens, **Purdy et Graham (2004)** ont rapporté que le traitement du sperme de taureau avec 1,5 à 2 mg de Cyclodextrine-Cholestérol / 120×10^6 spz avant la congélation a augmenté le pourcentage de

spermatozoïdes mobiles et viables après décongélation. Les cyclodextrines ont la particularité d'avoir une surface externe très hydrophile et une cavité interne qui est hydrophobe (**Connors, 1997**), cela leur permet d'inclure dans leur cavité des molécules hydrophobes et former des complexes d'inclusion solubles (**Schofield et Badya., 2011**), ce qui est le cas dans notre cas avec le cholestérol et la vitamine E.

L'échantillon vitamine C est celui qui a présenté les valeurs les plus basses, ceci est certainement lié à son statut de pro-oxydant (**Martínez-Páramoa et al., 2012, Qinghua et al., 2015, Castellini et al., 2000**).

Il apparait ainsi que la vitamine C seule, ne serait pas indiquée dans l'amélioration de la conservation du sperme bovin. Par contre il est intéressant de voir que quand la vitamine C est associée à CD-CHL-VitE (pour constituer un complexe), de meilleurs résultats sont obtenus. En effet dans le complexe, la VSL a présenté des valeurs constantes le long de la période d'analyse. Après 24 heures le complexe est en deuxième position et à 48 heures il est en première position. Ces résultats semblent encourageants car ils constituent une voie prometteuse dans l'optimisation de la conservation du sperme bovin mais aussi du sperme en général. En effet, des résultats similaires sont obtenus sur le sperme ovin (Fig. 24). Chez cette espèce, après 48 heures le complexe est aussi positionné en première place avec le CD-CHL. La supériorité du complexe aussi bien chez le bovin que l'ovin, est liée en plus de l'effet des cyclodextrines, du cholestérol et de la vitamine E, au pouvoir de la vitamine C de recycler la vitamine E avec comme conséquence, une potentialisation de l'effet antioxydant du milieu de conservation.

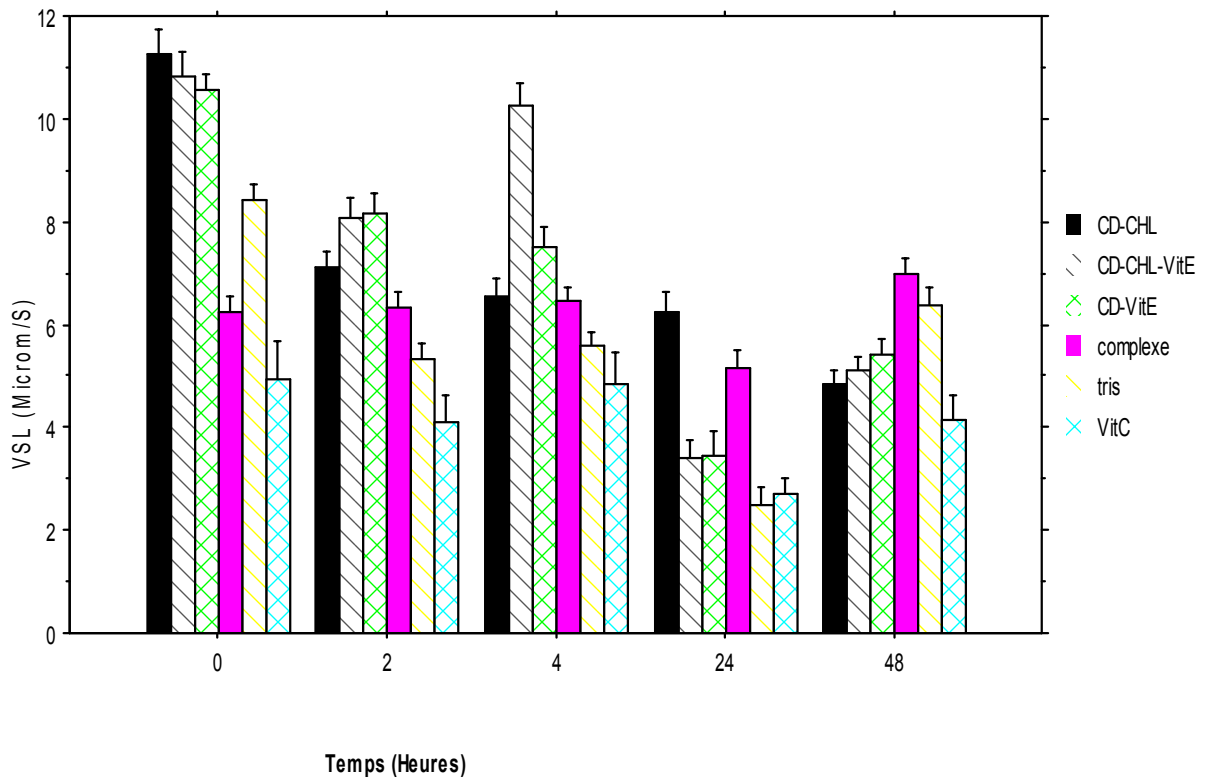


Figure23: Histogramme représentant les vitesses (VSL) des spermatozoïdes des bovins conservés au réfrigérateur (4°C) en fonction du temps dans les 6 traitement utilisés (CD-CHL, CD-CHL-VitE, CD-VitE, complexe, Tris, VitC, contrôle (tris)).

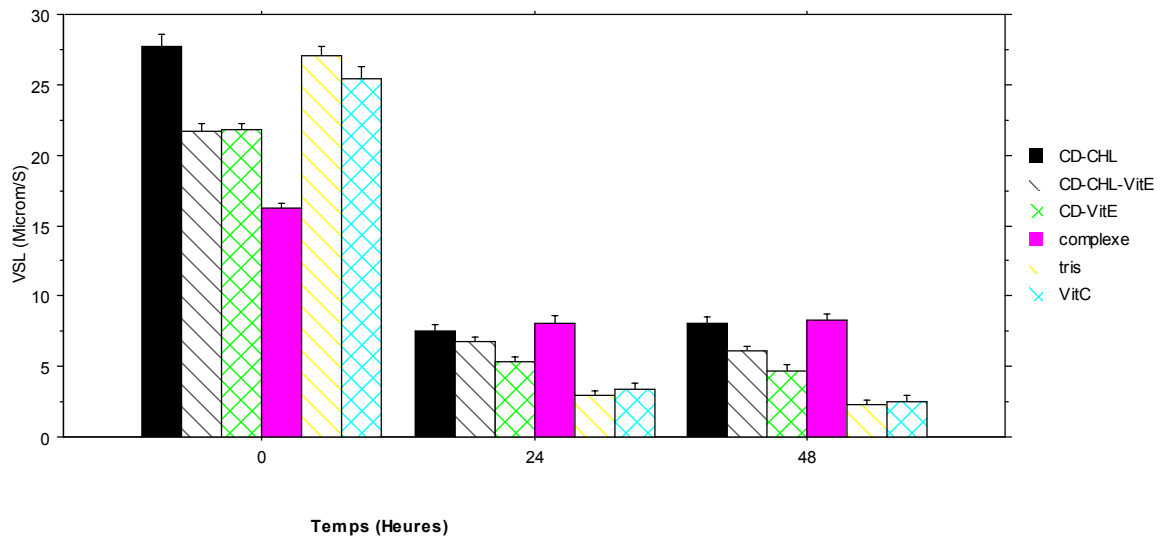


Figure24: Histogramme représentant les vitesses (VSL) des spermatozoïdes de l'ovin conservés au réfrigérateur (4°C) en fonction du temps dans les 6 traitements utilisés (CD-CHL, CD-CHL-VitE, CD-VitE, complexe, contrôle (Tris), (Tris), VitC).

Conclusion

Conclusion générale

L'objectif que nous nous sommes fixés au début du présent travail est d'améliorer la conservation du sperme bovin en luttant particulièrement contre le stress oxydatif. Nous avons misé sur la réfrigération comme moyen de conservation à court terme. Pour y parvenir nous avons développé un milieu de conservation contenant simultanément quatre molécules, Le cholestérol est utilisé pour renforcer la membrane cytoplasmique, la vitamine E pour lutter contre le stress oxydatif et les cyclodextrines pour les solubiliser. Comme le cholestérol et la vitamine E sont des molécules lipophiles, elles présentent une solubilité limitée dans les dilueurs de conservation de nature hydrophile. Le cholestérol avec les cyclodextrines a montré une efficacité de préservation des vitesses des spermatozoïdes déjà à T0, cependant à T 2h et 4h, c'est surtout la vitamine E qui a exprimé le meilleur effet protecteur, cet effet est encore plus prononcé quand la vitamine E est associée avec le cholestérol. Le résultat attendu et qui consiste en l'originalité du présent travail est le pouvoir protecteur de la vitamine C. L'utilisation seule de cette dernière révèle un pouvoir inhibiteur qui est observé en raison du potentiel pro-oxydant et qui est rapporté dans la littérature. Contrairement à sa combinaison avec la vitamine E, la vitamine C exprime son intérêt potentiel. En effet après 48 heures de conservation, les valeurs élevées de la vitesse sont liées à la composition des milieux de conservation (complexe à quatre molécules). Ceci indique que la vitamine C est un recycleur efficace de la vitamine E.

Bibliographie



Bakhach, J., Casoli, V et Guimberteau, JC. (2007). La cryopréservation des tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547.

Beckman, K.B., Ames B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.

Béguel, J.P., Huvet, A., Quillien, V., Christophe, L., Fabioux, C. (2013). Study of the antioxidant capacity in gills of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157, 63-71.

Bertiridige, D.J. (2000). What's oxidative stress? *Métabolisme*, 49(2supp.&):3-8.. Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC.

Britan, A. S. (2006). Développement, optimisation et utilisation d'un système cellulaire de l'épithélium épидидymaire murin : approches moléculaires (Doctoral dissertation, université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

Bue P. (1992). Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 81 p.



Cabannes, C. (2008). Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine (Doctoral dissertation université Toulouse 3).

Cadet J., Bellon, Berger ,S M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., FrelonS., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, 383(6), p. 93.

Castellini, C., Lattaioli, P., M. Bernardini, A. Dal Bosco, (2000). EFFECT OF DIETARY α -TOCOPHERYL ACETATE AND ASCORBIC ACID ON RABBIT SEMEN STORED AT 5C°. Department of Animal Science, Borgo 20 Giugno, 74 - 06100 Perugia, Italy.

Chabory. E. (2009). Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine. Thèse : Présentée a l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de Doctorat.

Chemineau, P., Baril, G., Cognie, Y., Guerin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., et Vallet, J. C. (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovin et les caprins. Chapitre 4. Collecte et conservation la semence .FAO.



Dacheux, F. et J-L. L'épididyme et les glandes annexes. In : Thibault, C et Levasseur, M-C. (2001). La Reproduction chez les mammifères et l'homme – nouvelle édition. Paris : INRA Editions ellipses, 2001, 290-315.

Dacuadro-Hansen, G. (2004). La refrigeration et la congelation du sperme : expérience chez l'animal chilledand frozen semen : the animal experience, Gynécologie Obstétrique et fertilité 32 (2004) 887-893.

Deutscheur, G.H., Wells, M.E., et BATTAGLIA, R.A. (2007). Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and effects of invivo storage I Angus bulls. Journal of animal science, 39 (36), 1136-1143.

Djabakou, K., Fimmen, H.O., Bottger, M. (1984). Examination of bull semen at CREAT, Trypanotolerance and animal production, Avetonou (Togo), 3, 40–44.



Eddy EM. (1998). Regulation of gene expression during spermatogenesis Semin Cell Dev Biol 9(4):451-457.

England, G. (1993). Cryopreservation of dog semen : a review , journal of reproduction and fertility supplements 4, 243-255.

Esterbauer, H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol. Med.*, 13, p. 341.

Ezekwe, A.G. (1988). Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls - N'dama and Muturu, Joint seminar on animal reproduction for African countries.-Addis-Abeba: CIPEA.

F

Favier, A. (2003), Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble.

Fuertes, P.V. (2008). Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale, thèse de doctorat. École nationale vétérinaire d'Alfort. Faculté de médecine de Créteil, P113.

G

Gayrard, V. (2007). Physiologie de la reproduction des mammifères. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.

Godeas, C., F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G sandri et E. Panfili. (1997). Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 57(6): 152-8.

H

Hadjigogos, K. (2003). The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med.*; 45:7-13.

Hanzen, Ch. (2010). Facteurs d'infertilité et d'infécondité en reproduction bovine. orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/70544/1/R0_8_Facteurs_generaux_2012.pdf. Consulté le 22 septembre 2011.

Hermansson, U. et Linde-forsberg C. (2006). Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65, 584-593.

Hochereau, M. T. et al. (1964). Durée de la spermatogénèse chez le taureau: étude par autoradiographie testiculaire. 5th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 3 :541.

J

Johnston, S. D., Root Kustriz, M. V., Et Olson, P. N. S. 2001a . Semen collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S. D. (eds). *Canine and feline theriogenology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 287-306.

Johnston, S.D., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., D icaneloro, P., Wilson, et., Kopf, G. S., et Turner, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome : transcriptional profiling of segmental gene expression in the epidymis. *Biology of reproduction*, 73(3), 404-413.

H

kabera, f. (2008). appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (cnag) de dahra au senegal, (mémoire de diplôme d'études approfondies de productions animales).

Knobil ,E., Neill J. (1988). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, 793-814.

L

Lanzafame, F. (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility ,Vol 19. No 5. 638-659 *Reproductive BioMedicine Online*; www.rbmonline.com /Article/4182 on web **30 September 2009**.

M

Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D. P.; Calliste, C. A. ;CookMoreau, J.; Duroux, J. L. (2003). Transformation mechanism of the antioxydant kaempferol In to deposite. g-Radiolysis study in methanol and in ethanol . Radiat Res . c, 160:355-365.

Martínez-Páramoa, S, P. Diogo, M.T. Dinis, M.P. Herráezb, C. Sarasquetec, E. Cabritac, (2012). Incorporation of ascorbic acid and -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. Theriogenology 77 1129–1136

Martinez-pasteur, F., Garcia-macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P ., PAZ, P.D ., et Anel, L. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. Theriogenologie, 65 (3), 471-485.

Martins, C. f., Rumpf.R., Perier.D.C.,Dode.M.N (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses embryo production. Animal reproduction science, 101,326-331.

N

Najjar, A. et Ben Mrad M. (2013). Facteurs de variations de la la qualité du spermogramme du lapin reproducteur, Livestock Research for Rural Développement 25 (8).

O

Ogino, A., Orito H., Shimada K., Hirooka., H. (2007). Evaluating environmental impacts of the Japanese beef cow-calf system by the life cycle assessment method. Anim Sci J. 2007;78:424–432.

Ogino, A., Orito H., Shimada K., Hirooka., H. (2007). Evaluating environmental impacts of the Japanese beef cow-calf system by the life cycle assessment method. Anim Sci J. 2007;78:424–432.

Orgebin-Crist Marie-Claire. (1961). Recherche Expérimentalesur la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme du taureau: Thèse. Station de recherche de physiologie animale, centre national de recherches zootechniques, JOUY-EN-JOSAS (SEINE-ET-OISE)



Partyka, A., Ewa LuKaszewicz et Wojciech Niz an ski. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, *Theriogenology* 77.1497-1504.

Pena, A. et Linde-Forsberg C. (2000). Effects of aquex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survivalof dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 859-875.

Pham-Huy LA., He H, & Pham-Huy C. (2008). Free Radicals,Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Medecine*, 4:89-96.

Poisson C. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. ; innovation thérapeutique : du fondamental a l'appliqué.

Ponglowhapan, S., Essen-gustavsson. B. et Linde-forsberg c. (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62, 1498-1517.

Pons, H. et al., (2009). Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO)sur les les spermatozoïdes humains et infertilité masculine .Quarantième journée thématique de la SFEF .37-529-535.

Posiere, S. (2002). Récolte de la semence de chats (*feliscatus*) par électro-éjaculation et par dissection de l'épididyme ; comparaison des méthodes, essai de cryoconservation avec un diluer canin (Doctoral dissertation).

Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.

Q

Qinghua Liu, Xueying Wang , Wenqi Wang, Xuelei Zhang , Shihong Xu, Daoyuan Ma, Zhizhong Xiao, Yongshuang Xiao, Jun Li, (2015). Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol Biochem* 413–422.

R

Reid, B. L. (1959). The structure and function of the epididymis. 2. The histogenesis of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.*, 7, 22-38.

Rigal, F. (2008). Comparaison de la qualité de la semence de Taureau collectés à l'électro-éjaculateur ou vagin artificiel: Thèse. Université Paul- Sabastier de Toulouse.

Robaire, B., Hinton, B. T., Eorgebin- Crist, M. C. (2006). The epididymis . *Physiology of reproduction*, 1, 1071-1148.

Rota, A., Pena A., Linde-forsberg C. et Rodriguez-martinez H. (1999b). In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*, 57, 199-215.

S

Stout, M.A. (2012). Comparison of Epididymal and ejaculated Sperm Collected from the same Holstein Bulls, (Doctoral dissertation, Louisiana state University).

Sullivan, R. (2004). Maie fertility markers, myth or reslity. *AnimReprodsci* 82-83,341-347.

T

Thibault, C., Levasseur, M-C. (2001). La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouv. éd. ent. ref. ed. Paris: INRA : Ellipses, 2001.

Toussaint, B, 2007, 2008. Oxygène et stress and male infertilité –a clinical perspective .H um
Reprod Update :14,p243-58 .

Résumé

Ce présent travail consiste à l'optimisation de la conservation de la semence à 4°C chez l'espèce bovine en luttant contre le stress oxydatif qui est l'un des principales causes de l'altération des paramètres spermatiques. Pour cela, on a préparé des milieux de conservation à base de CD/CHL/Vit E et Vit C. Le CHL qui sont connus pour leur pouvoir protecteur vis-à-vis de la membrane des spermatozoïdes, VitE et VitC pour leur puissance activité anti-oxydante et la CD qui présente une forme conique dont la cavité est lipophile et la périphérie est hydrophile afin de piéger les molécules lipophiles (vit E et CHL) et de favoriser la solubilisation de ces dernières dans la cellule. L'analyse de la semence a été faite de t_0 à t_{48} de conservation par le biais d'un traitement informatique (CASA) qui exprime les valeurs de la mobilité données par la VSL et le pourcentage progressif rapide révèle que le meilleur résultat réside dans le complexe (CD/CHL/VitE/VitC) après 24 h de conservation et cela peut être expliqué par la synergie établie entre les différentes molécules du complexe. L'activité chez l'ovine témoigne une meilleure VSL et pourcentage de progressive et rapidité dans tous les milieux contrairement au bovin, la VSL est meilleure et le pourcentage de progressive et rapidité est faible dans tous les milieux.

Mots clés : conservation, sperme épидидymaire, bovin, stress oxydatif.

Abstract

The purpose of the present study is to optimize the conservation of bovine sperm fighting against oxidative stress which is the main causes of the deterioration of sperm parameters. For that, were prepared based storage media CD/CHL/Vit E and Vit C. the CLH is known for its protective power of the sperm membrane, Vit E and Vit C for their power antioxidant capacity and the CD which has a conical shape whose cavity lipophilic and periphery is hydrophilic to entrap lipophilic molecules (vitamin E and CHL) and promote solubilization of the latter in the cell. The semen analysis was made of t_0 to t_{48} of conservation through computer processing (CASA), which expresses the values of the mobility provided by the VSL and rapid progressive percentage shows that the best result resided in the complex (CD / CHL / VitE / VitC) after 24 h of conservation and this can be explained by the synergy established between the different molecules of the complex. The activity in ovine reflects a better VSL and % PR in all environments unlike bovine, VSL is better and the percentage of progressive in all environments.

Key words: conservation, épидидymaire sperme, bovine, oxidative stress