

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Spécialité Biologie Animale



Réf :

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

**L'effet de l'extrait phénolique de la laitue sauvage
(*Lactuca virosa*) et la quercétine sur le sperme des
petits ruminants lors de la conservation**

Présenté par :

BOUROUINA Chainez & BENHADDAD Kamilia

Soutenu le : **02 Juillet 2024**

Devant le jury composé de :

Mme SAD-EDDINE ZENNOUCHE Ourdia	MCA	Présidente
M. KHELLOUF Allaeddine	MAB	Encadreur
M. IGUER-OUADA Mokrane	Professeur	Examineur

Année universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENT

Tout d'abord, on tient à remercier notre encadreur de mémoire **M. KHELLOUF** pour sa patience, ses précieux conseils et ses orientations qui nous ont clarifié le chemin, son dévouement, et son encouragement toute la période du travail.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont prêté à notre travail.

Mme SAD-EDDINE ZENNOUCHE d'avoir accepté de présider et de juger notre travail.

M. IGUER-OUADA d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de personnels du laboratoire de biologie et physiologie animale du Bloc 12.

On tient dans cette occasion à présenter nos vifs remerciements à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail : l'ingénieur du laboratoire Mme INOURI Ahlam, Mlle BENABDELHAK Amira Chahrazed et LEZREG Ahlam Hayet...

Dédicaces

Je remercie le bon Dieu de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

J'exprime ma gratitude à ceux qui m'ont bien marqué l'esprit et qui ont toujours cru en mes capacités, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert : A mon père et à ma mère. Un grand merci à vous. Que Dieu vous préserve toujours en bonne santé.

A mes très chers frères : Bilal, Akram et Saif Eddine.

A mes amies chacune à son nom qui m'ont appuyé chacun de leur manière (Leticia, Lilia, Anies).

A toute personne qui m'a aidé de proche ou de loin.

Chainez

Dédicace

Hommage à mon grand-père.

Il m'est difficile de trouver les mots pour exprimer combien tu nous manques cher grand père. Ton départ a laissé un vide immense. Cependant tes leçons de vie continueront de nous guider.

Je garderai précieusement les souvenirs des jours passés ensemble, car chaque moment passé avec toi est un trésor. Tu as été un modèle de force et de générosité. Ta sagesse et ton amour ont laissé une empreinte indélébile dans nos cœurs.

Pour moi, tu as été bien plus qu'un simple grand-père. Je ne saurai jamais comment te remercier pour tout ce dont tu as fait pour moi. C'est grâce à toi que j'ai pu grandir et arrivée là où je suis aujourd'hui. Merci du fond du cœur papa d'amour comme je t'appelais toujours. Je t'aimerai à jamais.

Repose en paix mon ange, j'espère qu'on se retrouvera au paradis inchallah.

Que dieu t'accorde sa miséricorde

Et t'accueille dans son vaste paradis inchallah.

Kamilia

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCF : Fréquence croisée du battement (*beat cross frequency*)

CASA : Analyseur de sperme assisté par ordinateur (*computer assisted sperm analyzer*)

CAT : Catalase

DPPH : Radical 2,2 - Diphenyl - 1 - Picrylhydrazyl.

FSH : Hormone folliculo-stimulante

GPx : Glutathion réductase

GR : Glutathion réduit

GSH : Glutathion oxydé

HCl : Acides hydrochlorique

LH : Hormone lutéinisante

LPO : Peroxydation lipidique (*Lipid Peroxidation*)

MDA : Malondialdéhyde

NO : Oxyde nitrique

PUFA : Acides gras polyinsaturés (*Polyunsaturated Fatty Acids*)

RNS : Espèces réactives de l'azote (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

SOD : Superoxyde dismutase

Spz : Spermatozoïdes

TBA : Acide Thiobarbiturique

TCA : Acide Trichloracétique

TBARS : Substance réagissant avec l'acide thiobarbiturique

VAP : Vitesse moyenne de trajet (*Average of Path Velocity*)

VCL : Vitesse curviligne (*Average of Curvilinear Velocity*)

VSL : Vitesse de ligne droite (*Straight Line Velocity*)

Liste des figures :

Figure 01 : les métabolites primaires.

Figure 02 : Classification et structure chimique des composés phénoliques.

Figure 03 : Structure de base d'un flavonoïde.

Figure 04 : La structure chimique de la molécule de la quercétine.

Figure 05 : La texture de la quercétine en poudre.

Figure 06 : La laitue sauvage (*Lactuca virosa*).

Figure 07 : une image qui montre les différentes parties de (*Lactuca virosa*).

Figure 08 : Mécanismes d'extraction assistée par micro-ondes.

Figure 09 : Systèmes d'extraction assistée par ultrasons.

Figure 10 : Appareil génital du caprin et de l'ovin.

Figure 11 : Schéma du testicule vue latéro-postérieure.

Figure 12 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermatogenèse.

Figure 13 : Coupe verticale d'un testicule.

Figure 14 : Schéma de la morphologie du spermatozoïde d'un mammifère.

Figure 15 : Schéma des dommages causés aux spermatozoïdes par le stress oxydatif.

Figure 16 : Schéma explicatif des conséquences du stress oxydatif sur le sperme.

Figure 17 : Effet du stress oxydatif sur la cellule.

Figure 18 : les dommages causés par les ROS sur la structure et la fonction des spermatozoïdes.

Figure 19 : Diverses voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur transformation.

Figure 20 : Le mécanisme d'action des antioxydants pour neutraliser les radicaux libres.

Figure 21 : la récolte de la plante (*Lactuca virosa*).

Figure 22 : Le séchage de la plante à l'air libre.

Figure 23 : Moulin à café.

Figure 24 : Un tamis fin.

Figure 25 : Le matériel utilisé pour l'extraction de l'extrait phénolique.

Figure 26 : La poudre de (*Lactuca virosa*) après le broyage.

Figure 27 : La technique de filtration.

Figure 28 : Utilisation du rota-vapeur pour séparer le solvant éthanolique.

Figure 29 : protocole de dilution des différents milieux.

Figure 30 : Etape de prélèvement du sperme épидидymaire d'un caprin par la technique de *retrograde-flushing*.

Figure 31 : Une image du système d'analyse CASA.

Figure 32 : Les différents paramètres du cinétique trajectoires des spermatozoïdes.

Figure 33 : la préparation du frotti.

Figure 34 : Une image des spermatozoïdes observés sous un microscope optique au (Grossissement 10×100).

Figure 35 : Une centrifugeuse utilisée pour le lavage des spermatozoïdes.

Figure 36 : Un sonicateur utilisé pour la destruction des spermatozoïdes.

Figure 37 : Une image qui montre la coloration rosâtre du surnageant des différents milieux traités par le test du TBARS.

Figure 38 : Un spectrophotomètre.

Figure 39 : Histogramme montrant les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de la quercétine (5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 40 : Histogramme représentant les paramètres de mobilité pendant 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations de l'acide gallique (5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 41 : Histogramme qui montre les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations de l'extrait phénolique (50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 42 : Histogramme qui présente les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5 $\mu\text{g/ml}$, acide gallique 5 $\mu\text{g/ml}$ et l'extrait phénolique 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 43 : Histogramme montrant les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme de caprin dans différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5 $\mu\text{g/ml}$, acide gallique 5 $\mu\text{g/ml}$ et l'extrait phénolique 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 44 : Histogramme montrant le pourcentage des spermatozoïdes mobile et la motilité progressive du sperme de caprin conservé dans différents traitements (Tris, quercétine 5 $\mu\text{g/ml}$, acide gallique 5 $\mu\text{g/ml}$ et l'extrait phénolique 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 45 : Histogramme qui montre le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de la quercétine (5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 46 : Histogramme qui montre le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de l'acide gallique (5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$).

Figure 47 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de l'extrait phénolique (50, 100 et 200 µg/ml).

Figure 48 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Figure 49 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme du caprin dans les différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Figure 50 : Histogramme présentant le taux de la peroxydation des lipides membranaires (MDA) après la décongélation du sperme ovin dans les différents traitements (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Figure 51 : Histogramme présentant le taux de la peroxydation des lipides membranaires (MDA) après la décongélation du sperme de caprin dans les différents traitements (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Figure 52 : Histogramme présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH dans les différents milieux (Cntrl : témoin positif (vitamine C), quercétine, acide gallique et l'extrait phénolique).

Figure 53 : Des images de résultat des cellules sanguines traitées par les différents milieux de conservations étudié (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Liste des tableaux :

Tableau I : La classification des métabolites primaires et secondaires de *Lactuca virosa*.

Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des figures

Listes des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Les propriétés de <i>Lactuca virosa</i>	
1. Les plantes médicinales	2
1.1. Utilités thérapeutiques ou pharmacologiques des plantes médicinales	2
1.3. Les molécules bioactives des plantes médicinales	3
2. La laitue sauvage (<i>Lactuca virosa</i>)	6
2.1. Les usages médicinaux de la laitue sauvage	8
3. Méthode d'extraction des composés bioactive à partir des plantes	9
3.1. Macération	9
3.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)	10
3.3. Extraction assistée par ultrasons (UAE)	10
Chapitre II : La conservation du sperme	
1. L'anatomie de l'appareil génitale des petits ruminants	12
1.1. Les testicules	12
1.2. Les voies spermatiques	15
1.3. Les voies urogénitales	16
2. La cellule spermatique	17
2.1. Morphologie du spermatozoïde	17
2.2. La composition membranaire du spermatozoïde	19
3. La conservation du sperme	19
3.1. La cryoconservation à -196°C	19
3.2. La réfrigération à 04°C	20
Chapitre III : Le stress oxydatif	
1. Généralité sur le stress oxydatif	21
1.1. Effet du stress oxydatif sur les spermatozoïdes	21
1.2. Les cibles du stress oxydatif	23
1.3. Les avantages du stress oxydatif	24
2. Les radicaux libres	24
2.1. La définition des radicaux libres	24
2.2. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	25
2.3. Espèces réactives de l'azote (RNS)	25
3. Les Antioxydants	26

3.1. Les Antioxydants Enzymatiques	27
3.2. Les Antioxydants non Enzymatiques	27
Matériel et méthodes	29
1. Matériel végétale	29
1.1. La récolte de la plante	29
1.2. Séchage	29
1.3. Broyage	30
1.4. Tamisage	30
2. Extraction des composés phénoliques	31
2.1. Le matériel et les réactifs à utiliser	31
2.2. Extraction par macération	31
3. La préparation des milieux de conservation du sperme	32
3.1. Préparation du milieu de base (tris)	32
3.2. Préparation des milieux de traitement	33
4. La collecte épидидymaire du sperme	33
4.1. La dilution de la semence	34
4.2. Analyse du sperme collecté	35
5. Test de viabilité	36
6. La peroxydation lipidique (TBARS)	37
6.1. Le lavage	37
6.2. La sonication	38
6.3. La préparation de la solution TTH	38
6.4. Le dosage des malondialdéhydes	38
7. Le test sanguin : (la toxicité des milieux sur les globules rouges)	39
8. Test antioxydant DPPH : (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	40
9. Etude statistique	40
Résultats	41
1. Analyse de la motilité spermatique	41
1.1. La motilité du sperme ovin	41
1.2. La motilité du sperme du caprin	44
2. Analyse de la viabilité du spermatique	46
2.1. La viabilité du sperme ovin	46
2.2. La viabilité du sperme caprin	48
3. Test de peroxydation lipidique (TBARS)	48
3.1. Test de peroxydation lipidique chez l'ovine	49
3.2. Test de peroxydation lipidique chez le caprin	49
4. Test de DPPH	50

5. Le test sanguin (la toxicité des milieux sur les globules rouges)	50
Discussion	52
Conclusion	54
Références bibliographiques	56
Résumé	71

Introduction

Introduction

Les petits ruminants sont reconnus pour leur intérêt économique. En effet, d'après les rapports du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural d'Algérie la consommation nationale de viande ovine et caprine en Algérie est estimée entre 150 000 et 200 000 tonnes par an. L'optimisation de leurs performances reproductives reste un défi majeur pour les chercheurs et la conservation du sperme est parmi les techniques essentielles pour la gestion de la reproduction et d'étudier les différents paramètres du sperme (**Holtz, 2005**).

La réfrigération du sperme à 04°C est une technique de conservation à court terme fréquemment utilisée de manière locale dans les élevages. C'est une technique qui permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes, préserver leur énergie et de prolonger leur durée de vie par rapport à la température ambiante pendant quelques jours (**Christensen et al., 1996 ; Karunakaran et al., 2007**). Elle offre également la possibilité d'étudier les changements physiologiques des spermatozoïdes au fil du temps, contribuant à la compréhension de leur biologie (**Peña et al., 2009**). Malgré que ses avantages le processus de conservation du sperme peut entraîner une diminution de la qualité des spermatozoïdes, principalement due au stress oxydatif. Ce phénomène limite l'efficacité des caractéristiques des spermatozoïdes tels que la motilité et la viabilité et peut altérer leurs propriétés spermatiques au fil du temps et réduire leur capacité fécondante en affectant leur fonction et leur intégrité (**Santiani et al., 2014**). Dans ce contexte, la recherche de solutions naturelles pour améliorer la qualité du sperme conservé est essentiel.

La laitue sauvage (*Lactuca virosa*), est une plante médicinale appartenant à la famille des Asteraceae (**Edwards et al., 2018**). Elle est réputée pour ses propriétés médicinales et ses composés bioactifs, tels que les flavonoïdes (**Abidet et al., 2020**). Les flavonoïdes sont riches en molécules antioxydantes, ce qui permet aux plantes de faire face à différents stress biotiques et abiotiques (**Singh et al., 2021**). La quercétine fait partie de ces molécules qui possèdent un pouvoir antioxydant très puissant (**Lakhanpal et Rai, 2007**). Ses effets sur les propriétés du sperme congelé-décongelé est rapporté chez diverses espèces animales, tels que les taureaux, les caprins, les béliers, et les daims (**A.EL-Khawagah et al., 2020**).

Cependant, jusqu'à présent aucune étude scientifique spécifique n'a été réalisée sur l'effet de la laitue sauvage (*Lactuca virosa*) sur le sperme animal. Bien que ses propriétés médicinales aient été démontrés dans d'autres domaines, cette plante n'a pas encore été étudiée sous cet angle particulier.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'analyser l'impact de l'extrait phénolique de la *Lactuca virosa* sur le sperme épидидymaire des espèces caprines et ovines après conservation à une température de 04°C. On a analysé la mobilité, la viabilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes pour évaluer leurs utilités potentielles en tant qu'agents spermatiques ou pas dans le domaine de la biologie de reproduction.

CHAPITRE I
Les propriétés de *Lactuca*
virosa

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

1. Les plantes médicinales

L'utilisation des plantes médicinales est aussi ancienne que la civilisation humaine afin de soulager et de guérir les maladies. Effectivement, la pharmacopée traditionnelle utilise des remèdes à base de plantes pour le traitement des maladies depuis un temps très ancien, la plupart des populations rurales se soignent exclusivement à l'aide de plantes médicinales.

De nos jours, l'intérêt pour les vertus thérapeutiques des plantes est renforcé par l'amélioration des techniques d'extraction et les avancées des méthodes d'analyse structurale pour la découverte de nouveaux principes actifs. Selon les estimations, environ deux tiers des médicaments actuels proviennent d'une source naturelle ou sont modifiés à partir d'un produit naturel (Newman *et al.*, 2007). C'est pourquoi les plantes médicinales et leurs molécules bioactives sont toujours recherchées et constituent un point central de la recherche (Ramawat *et al.*, 2008).

Une plante est dite médicinale (ou officinale) lorsque au moins un de ses organes possède des activités pharmacologiques pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Seule la partie la plus riche en principe actif de la plante est utilisée : la racine, la feuille, la fleur, la graine...

Selon les estimations, environ 60 000 à 70 000 espèces végétales sont utilisées à des fins thérapeutiques à l'échelle mondiale (Chen *et al.*, 2016). L'Algérie est l'un des pays les plus riches en ressources phylogénétiques à usage médicinal et aromatique, On dénombre plus de 300 espèces à usage aromatique et médicinal (Tetenyl, 1985).

1.1. Utilités thérapeutiques ou pharmacologiques des plantes médicinales

La phytothérapie traditionnelle est riche et variée, et connue par ses effets secondaires moins agressifs que les médicaments chimiques (Derridj *et al.*, 2010). La sensibilisation croissante aux plantes médicinales et leur utilisation accrue ont permis aux scientifiques de mieux répondre aux nouveaux enjeux liés à l'expansion des services professionnels visant à améliorer la qualité de vie. Mais étant donné qu'à l'époque, il n'y avait pas suffisamment d'informations sur les causes des maladies, il n'était pas possible de les identifier, ni rien savoir sur la plante et la manière dont elle pouvait être utilisée comme remède, tout était basé sur l'expérience (Petrovska *et al.*, 2012).

Les plantes constituent la principale source de molécules bioactives, telles que les composés phénoliques, capables de remédier à diverses maladies. La caractérisation du profil phytochimique (alcaloïdes, flavonoïdes, saponosides, tanins, ...) d'un remède à base de plantes est une étape essentielle pour expliquer les effets afférents (Choho *et al.*, 2022).

De nombreuses plantes ont été signalées comme présentant des propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes, antioxydantes, antidiarrhéiques, analgésiques et cicatrisantes etc. Cela, grâce à leurs contenances des différents composants bioactifs, dont les plus importants sont les métabolites secondaires. De diverses technologies biologiques et chimiques ont été développées pour obtenir les métabolites secondaires. L'extraction est la première étape utilisée dans le processus de recherche de médicaments sur les plantes pour récupérer les composants chimiques du matériel végétal. Ces extraits obtenus présentent divers

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

types de combinaisons de composants phytochimiques et bioactifs avec différentes polarités (Ozaslan *et al.*, 2018).

1.3. Les molécules bioactives des plantes médicinales

Les produits naturels présentent une grande diversité de structures chimiques multidimensionnelles. Leur efficacité est liée à la complexité de leurs propriétés chimiques et stériques bien organisées (Yuan *et al.*, 2016). Les métabolites secondaires dérivés de plantes ont fourni de nombreux nouveaux prototypes de molécules bioactives, dont certains ont donné naissance à des médicaments importants (Ramawat *et al.*, 2008).

1.3.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont directement impliqués dans la croissance et le métabolisme, à savoir les hydrates de carbone, les lipides et les protéines. Les métabolites primaires sont produits à la suite de la photosynthèse et sont également impliqués dans la synthèse des composants cellulaires. La plupart des produits naturels sont des composés dérivés de métabolites primaires tels que les acides aminés, les glucides et les acides gras, et sont généralement considérés comme des métabolites secondaires (Ramawat *et al.*, 2009).

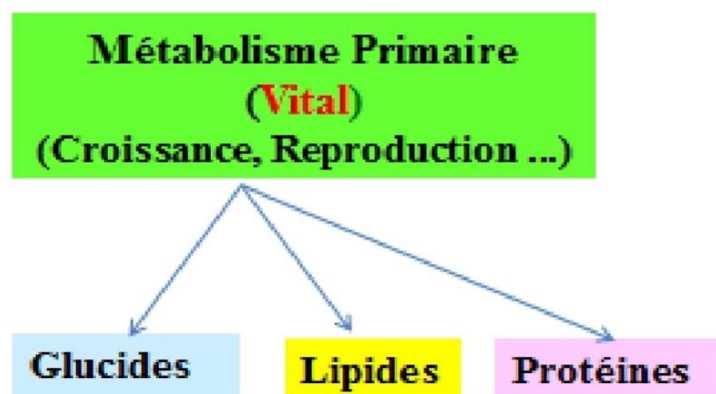


Figure 01 : les métabolites primaires.

([https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/becol/2022/Pr-LABBANI M%C3%A9tabolisme%20Secondaire.pdf](https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/becol/2022/Pr-LABBANI%20M%C3%A9tabolisme%20Secondaire.pdf)).

1.3.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont considérés comme des produits du métabolisme primaire et ne sont généralement pas impliqués dans l'activité métabolique : alcaloïdes, polyphénols, huiles essentielles et terpènes, stérols, flavonoïdes, lignines, tanins, etc. Ces métabolites secondaires sont la principale source de produits pharmaceutiques, d'additifs alimentaires, de parfums et de pesticides (Ramawat *et al.*, 2009).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

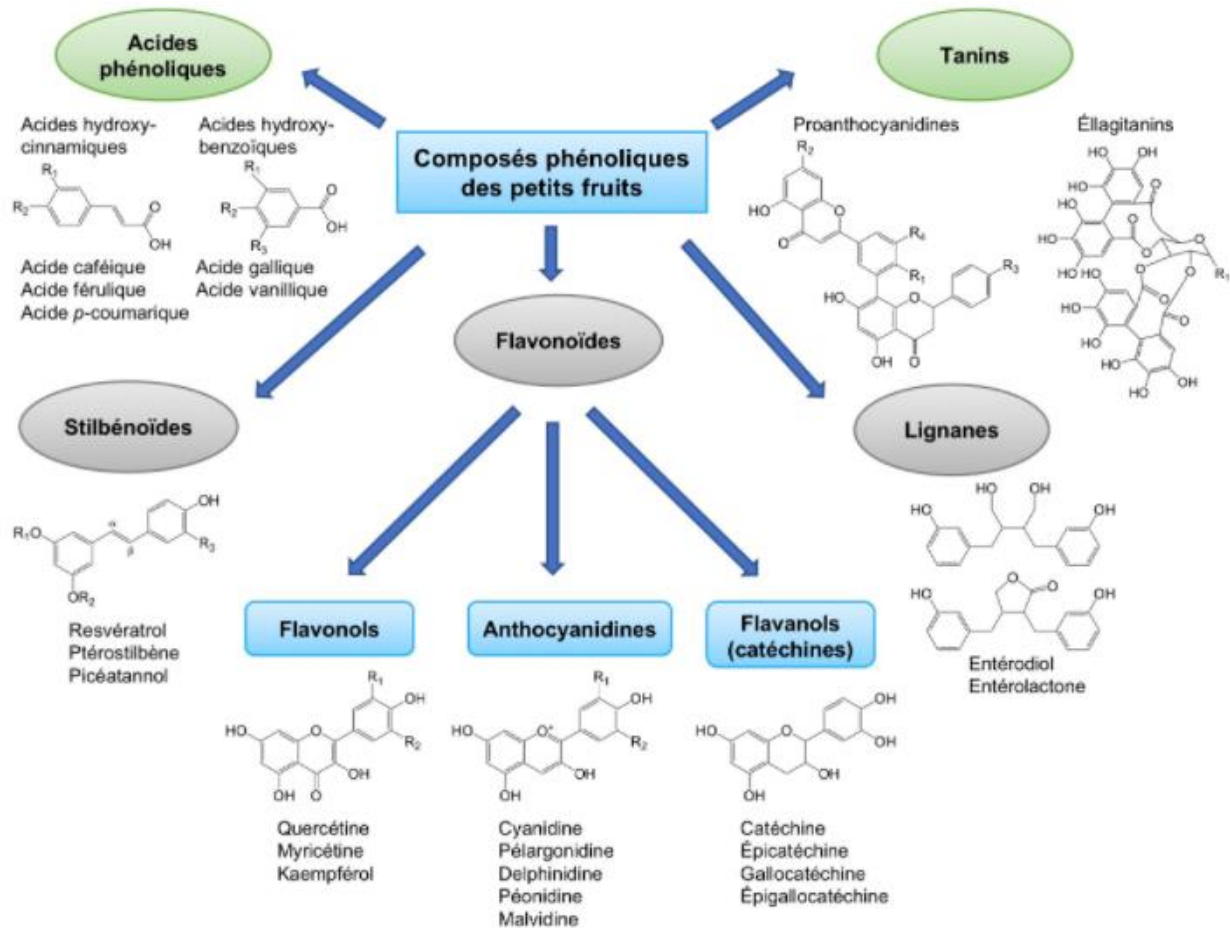


Figure 02 : Classification et structure chimique des composés phénoliques (Nile et Park, 2014).

1.3.2.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites végétaux secondaires qui se trouvent dans toutes les parties supérieures des plantes (feuilles, fleurs, tiges, racines, pollen, fruits, graines et bois) (Beta *et al.*, 2005). Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Bidie *et al.*, 2011). Les composés phénoliques sont regroupés en une dizaine de classes chimiques partageant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique possédant de multiples fonctions hydroxyles libres ou apparentées aux glucides (Guignard, 1979).

1.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, également appelés composés polyphénoliques, sont largement répandus dans le règne végétal. De plus, ils rentrent dans la composition de divers remèdes à base de plantes utilisés en médecine traditionnelle (Di Carlo *et al.*, 1999). Les flavonoïdes ont de nombreuses propriétés biologiques, notamment des effets antioxydants, vasculoprotecteurs, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et même antitumoraux (Ghedira *et al.*, 2005). Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols. Ces derniers se subdivisent en 10 classes dont les flavonoïdes sont la classe la plus abondante. À eux seuls, ils représentent 60% des composés polyphénoliques (Ramos, 2007).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

De même, les flavonoïdes sont importants pour la défense des plantes contre les herbivores et les insectes nuisibles (Alseekh *et al.*, 2020). Dans certains cas, ils peuvent se comporter comme des substances hautement toxiques (Mierziak, Kostyn et Kulma, 2014), et dans d'autres, ils peuvent retarder le développement de pathogènes (Alseekh *et al.*, 2020). Ils jouent un rôle important dans les interactions symbiotiques des micro-organismes.

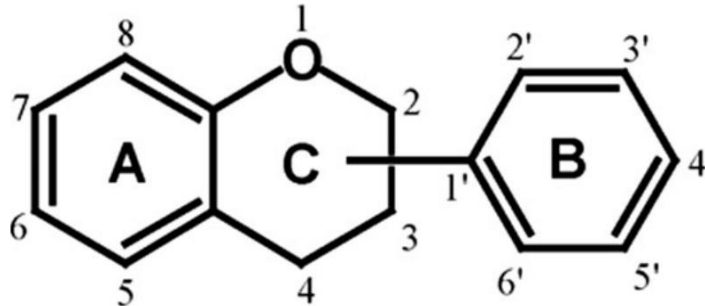


Figure 03 : Structure de base d'un flavonoïde (Cutrim *et al.*, 2018).

1.3.2.2.1. Les mécanismes d'action antioxydante des flavonoïdes

Les mécanismes d'action antioxydante des flavonoïdes peuvent être le piégeage direct des ROS, l'inhibition de la formation des ROS par la chélation des oligo-éléments (par exemple, la quercétine a des propriétés chélatrices et stabilisatrices du fer), ou l'inhibition des enzymes qui participent à la génération des radicaux libres (par exemple, glutathion S transférase, monooxygénase microsomale, succinoxydase mitochondriale, NADH oxydase et xanthine oxydase), et l'activation des défenses antioxydantes (par exemple, la régulation à la hausse des enzymes antioxydantes ayant une capacité de piégeage des radicaux). (Dias *et al.*, 2021).

1.3.2.3. Les flavonols

Les flavonols en constituent une catégorie très importante des flavonoïdes, ils sont bien adaptés pour modifier le transport et la signalisation de l'auxine, possédant le pouvoir de modifier l'activité d'un grand nombre de protéines (Santelia *et al.*, 2008) et fonctionnent comme de puissants piégeurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Cheng et Murphy, 2013). Les flavonols qui comprennent, par exemple, la quercétine, le kaempférol, la fisétine, l'isorhamnétine et la myricétine sont abondants dans les feuilles vertes, les fruits et les céréales. Par exemple, la laitue, la canneberge, la pomme, la pêche et le poivron rouge sont riches en quercétine et en kaempférol (Dias *et al.*, 2021).

1.3.2.4. La quercétine

La quercétine est le flavonoïde le plus répandu de la sous-classe des flavonols (Dwyer et Peterson, 2002). C'est une substance solide insoluble et cristalline de couleur jaune au goût amer. Malgré son insolubilité générale, elle est légèrement soluble dans l'alcool, les solutions aqueuses alcalines et l'acide acétique glacial (Singh *et al.*, 2021).

Elle est considérée comme un antioxydant très puissant qui permet aux plantes de tolérer plusieurs stress biotiques et abiotiques (Singh *et al.*, 2021). Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des enzymes antioxydantes, à savoir la glutathion réductase (GR), la glutathion peroxydase (GP), la glutathion-S-transférase (GST), l'ascorbate peroxydase (APX), la superoxyde dismutase (SOD) et les enzymes de la peroxydase (POX). C'est une molécule bioactive qui agit en fonction de la dose, et la dose optimale s'avère bénéfique pour la plante en question (Mahajan et Yadav, 2013).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

La quercétine possède également des propriétés médicales, notamment des effets antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, de protection cardiovasculaire, antitumoraux, antiviraux, antidiabétiques, immunomodulateurs, antihypertenseurs et gastroprotecteurs (Lakhanpal *et Rai*, 2007).

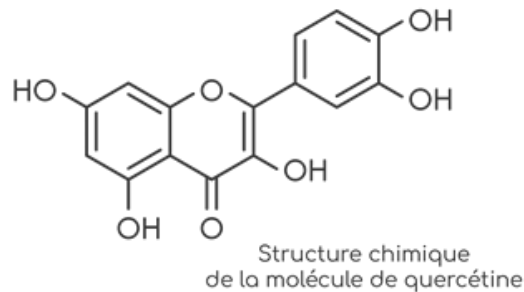


Figure 04 : La structure chimique de la molécule de la quercétine (Derbel *et Ghedira*, 2005).



Figure 05 : La texture de la quercétine en poudre. (<https://french.ceresherb.com/sale-12703173-yellow-herbal-extract-powder-sophora-japonica-extract-quercetin-98-cas-no-117-39-5.html>).

1.3.2.5. L'acide gallique

L'acide gallique (ou acide trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique présent dans de nombreuses plantes. Il se trouve soit sous forme libre, soit comme composant des gallotanins. Il est connu pour ses propriétés antioxydantes puissantes et il agit comme un piègeur de radicaux libres, neutralisant les espèces réactives de l'oxygène et protégeant ainsi les cellules contre le stress oxydatif (Badhani *et al.*, 2019).

Il présente une solubilité modérée dans l'eau. À température ambiante, sa solubilité est d'environ 11,5 g/L dans l'eau pure. Cette solubilité augmente significativement avec la température. Cependant, l'acide gallique est beaucoup plus soluble dans les solvants organiques polaires tels que l'éthanol, le méthanol et l'acétone. Sa solubilité est également influencée par le pH du milieu (Daneshfar *et al.*, 2008).

2. La laitue sauvage (*Lactuca virosa*)

Lactuca virosa, également connue sous le nom laitue vireuse ou sauvage, est une plante herbacée de la famille des Asteraceae. Cette plante est connue pour ses propriétés

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

médicinales et ses effets sédatifs et analgésiques. Elle contient des composés actifs tels que les lactones sesquiterpéniques, notamment le lactucin et le lactucopictine, qui sont responsables de ses effets pharmacologiques (**Gromek et al., 1992**).

Ses feuilles et/ou son latex sont utilisées pour le traitement de diverses affections, ses activités pharmacologiques liées à leur utilisation ont été documentées et mentionnées dans différentes pharmacopées comme remèdes antitussifs et sédatifs (**Abidet et al., 2020 ; Stojakowska et al., 2011**).

Elle est originaire de plusieurs régions du monde, dont l'Amérique du Nord, l'Europe et le Moyen-Orient. Elle pousse dans des endroits ensoleillés, et au bord de l'eau, en la retrouve également dans les villes aux bordures des trottoirs.

Atteignant jusqu'à 1,8 mètre de haut, *Lactuca virosa*, ou « grande laitue », possède des feuilles vertes et brillantes qui poussent sur une tige verte sporadiquement tachetée de violet (figure 06) (**Abidet et al., 2020**). Elle présente de nombreuses variations phénotypiques en fonction des écotypes : les feuilles peuvent être lobées ou non, certaines ont des épines, d'autres non, mais toutes ont des feuilles larges et présente un système racinaire robuste avec une faible chute des feuilles (**Lindqvist, 1960 ; Mikel, 2007**).

La plante entière est riche d'un jus laiteux qui coule librement lorsqu'on la gratte. Ce jus a un goût amer et une odeur nauséabonde. Lorsqu'il est séché, il durcit et devient brun connu sous le nom de lactucarium (**Besharat et al., 2009**). L'espèce contient des composés biologiquement actifs, tels que des flavonoïdes, glycosides de phényléthanoïdes et de néolignanes, des saponines, des iridoïdes et des glycosides monoterpéniques (**Abidet et al., 2020**).

En raison de sa résistance multiple aux virus, elle a été utilisée dans les programmes de sélection génétique pour introduire les gènes de résistance dans les variétés commerciales de laitue de jardin (**Stojakowska et al., 2011**).



Figure 06 : La laitue sauvage (*Lactuca virosa*).

(<https://www.visoflora.com/photos-nature/photo-laitue-vireuse-lactuca-virosa.html>).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*



Figure 07 : une image qui montre les différentes parties de (*Lactuca virosa*).

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Laitue_vireuse).

Tableau I : La classification des métabolites primaires et secondaires de *Lactuca virosa*.

Métabolites primaires	Glucides	Ex : Glucose, Fructose...
	Acides aminés	Ex : Alanine, Cystéine...
	Protéines	Ex : La Rubisco, Catalase...
Métabolites secondaires	Acides phénoliques	Ex : Acide caféique, Acide férulique...
	Flavonols	Ex : Myricétine, Quercétine...
	Alcaloïdes	Ex : Lactucine...
	Glucosides	Ex : Glucoside de phényléthanoïdes...
	Saponines	Ex : Saponine titrepéniques...
	Iridoïdes	Ex : Lactucopicrine...
	Caroténoïdes	Ex : Bêta-carotène...

2.1. Les usages médicaux de la laitue sauvage

Il existe de nombreux produits à base de laitue sauvage, contenant des extraits de graines, de feuilles et de sève laiteuse. Ces teintures, poudres, huiles et pilules sont commercialisé pour traiter une panoplie de conditions, y compris l'anxiété, problèmes respiratoires, mauvais sommeil, douleurs articulaires, asthme, problèmes de voies urinaires,

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

toux, agitation, douleurs des regels, et même comme un traitement pour les affections telles que la coqueluche (**Abidet et al., 2020**).

L'extraction joue un rôle important dans plusieurs domaines, dont la production pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Le processus d'extraction est connu depuis longtemps, mais jusqu'à présent, de nouvelles méthodes continuent d'apparaître. Les chercheurs continuent d'optimiser la méthode d'extraction afin d'obtenir des résultats optimaux en peu de temps, offrant ainsi une panoplie de choix pour l'application de l'extraction (**Tambun et al., 2021**).

3. Méthode d'extraction des composés bioactive à partir des plantes

On trouve deux principales techniques d'extraction, conventionnelles et non conventionnelles :

Les techniques d'extraction conventionnelles sont des techniques d'extraction dites classiques qui existées depuis longtemps tel que la macération (**Tambun et al., 2021**). Cependant, elles présentent plusieurs inconvénients, notamment l'utilisation de grandes quantités de solvants, des temps d'extraction longs et une consommation d'énergie élevée (**Dias et al., 2021**).

Contrairement aux techniques conventionnelles, Les techniques non conventionnelles sont plus récentes et offrent un temps d'extraction plus court tels que l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction assistée par ultrasons (UAE).

Les méthodes conventionnelles, bien que moins écologiques, sont encore utilisées jusqu'à ce jour, car elles font appel à des équipements peu coûteux.

3.1. Macération

La macération est une technique conventionnelle, fréquemment utilisée pour l'isolement des flavonoïdes. La macération assistée par agitation et l'extraction Soxhlet sont parmi les types de macérations les plus utilisées (**Cacique et al., 2020**).

L'extraction par macération est basée sur la séparation solide-liquide, avec un solvant organique ou de l'eau comme phase liquide. Les principaux solvants utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont le méthanol, l'éthanol, l'eau ou un mélange de ces solvants (**Cacique et al., 2020**).

Il convient de préciser que, à ce jour, aucun consensus n'a été atteint sur un solvant standard pour l'extraction des composés phénoliques des plantes. L'efficacité de l'extraction par macération pourrait être améliorée en analysant l'homogénéisation, le temps, et les températures (**Tambun et al., 2021**). Cependant, l'extraction par macération présente également certaines limites, telles qu'une longue période d'extraction et l'exigence de grandes masses végétales et, par conséquent, de grandes quantités de solvants (**Cacique et al., 2020**). Cependant, la macération reste l'une des méthodes d'extraction conventionnelles les plus simples et les moins chères, malgré qu'elle nécessite un long temps pour le processus d'extraction (**Naviglio et al., 2019**).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

3.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Parmi les méthodes modernes et qu'implique l'utilisation de l'énergie du rayonnement micro-ondes (figure 08) pour chauffer le mélange soluté-solvant. La chaleur facilite la diffusion des solvants dans l'échantillon afin d'améliorer la diffusion des substances phytochimiques cibles hors de l'échantillon (**Alara et al., 2021**).

La diffusion du solvant à travers l'échantillon augmente la rupture des liaisons hydrogène qui retiennent l'échantillon ainsi aux composés cibles de se dissoudre dans le liquide d'extraction (**Alara et al., 2021**).

Un four à micro-ondes fonctionne par des ondes électromagnétiques permettant d'accélérer le temps d'extraction, qui n'est que de quelques minutes. En effet, toutes les ondes électromagnétiques générées sont directement converties en chaleur. La comparaison de la quantité de matière première, du choix du solvant, de la puissance des micro-ondes et du temps d'extraction a une grande influence sur cette méthode d'extraction (**Tambun et al., 2021**). L'extraction assistée par micro-ondes est rapide et économique en termes de solvant (**Alara et al., 2021**).

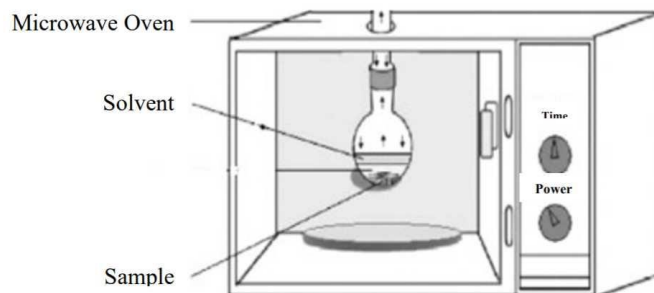


Figure 08 : Mécanismes d'extraction assistée par micro-ondes (**Tambun et al., 2021**).

3.3. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'application des ultrasons en tant que technique de laboratoire pour faciliter l'extraction du matériel végétal a fait l'objet de nombreuses publications.

Cette technique d'extraction utilise l'influence mécanique induite par l'explosion des microbulles pour désorganiser rapidement les tissus, ce qui facilite la libération des substances phytochimiques dans le solvant, augmentant ainsi le taux de solubilité des composés dans le solvant d'extraction et réduisant le volume de solvant nécessaire pour obtenir une récupération complète de composés phytochimiques (**Alara et al., 2021**).

Chapitre I : Les propriétés de *Lactuca virosa*

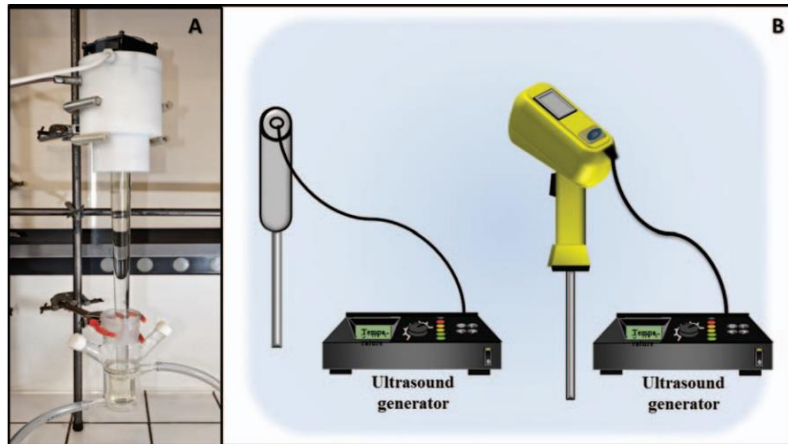


Figure 09 : Systèmes d'extraction assistée par ultrasons (Esclapez *et al.*, 2011).

Chapitre II

La conservation du sperme

Chapitre II : La conservation du sperme

Chapitre II : La conservation du sperme

1. L'anatomie de l'appareil génitale des petits ruminants

L'appareil reproducteur de ces deux espèces (figure 10) comprend les testicules, les glandes sexuelles accessoires et les voies spermatiques responsables du transport du sperme et de sa déposition dans le tractus génital femelle (**Boukhliq et al., 2018**).

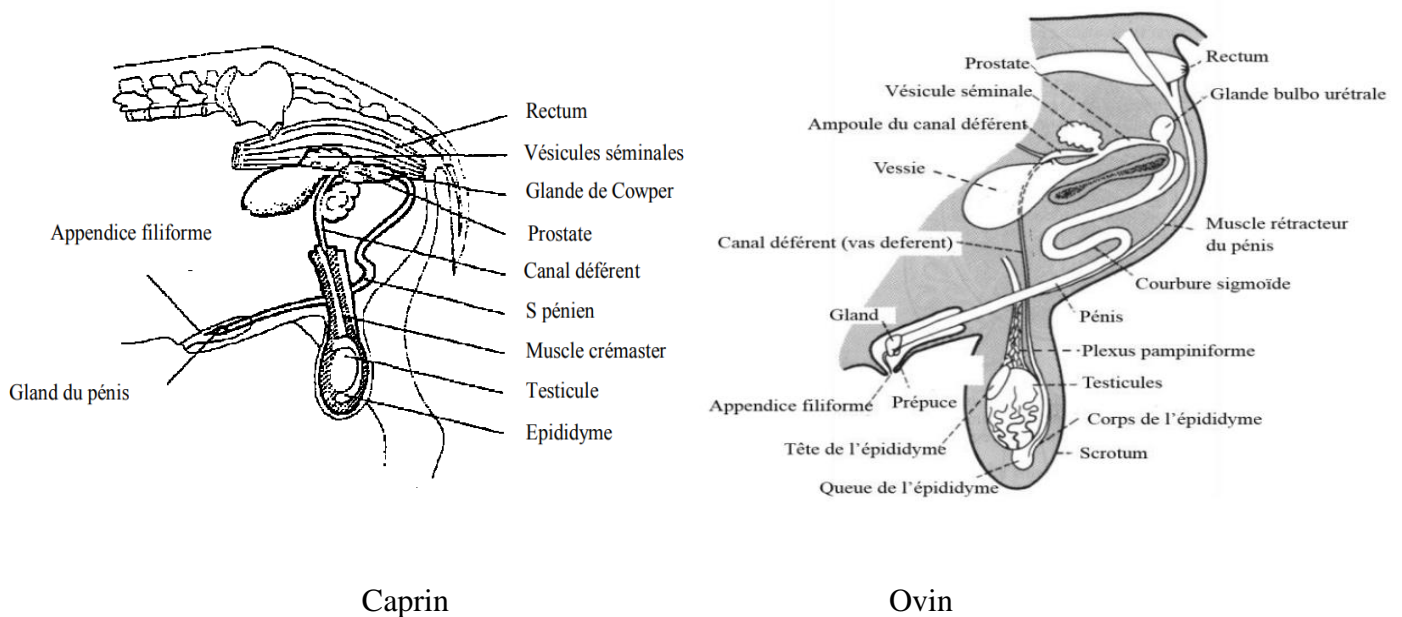


Figure 10 : Appareil génital du caprin (**Corcy, 1991**), et de l'ovin (**Evans et Maxwell, 1987**).

1.1. Les testicules

1.1.1. La morphologie et la position des testicules

Chez le petits ruminant, les testicules sont logés dans leur bourse, à l'extérieur de la cavité abdominale, afin d'être maintenus à une température inférieure de 3 à 5°C à la température corporelle. Cette légère hypothermie est indispensable à la spermatogenèse, le maintien de cette température est assuré par la rétraction du testicule par le muscle crémaster et la protection des bourses qui comprend 7 enveloppes dont la couche superficielle est appelée scrotum. Les testicules sont ovales et allongés situés dans la région inguinale. Ils sont reliés au corps par le cordon spermatique, qui comprend des vaisseaux sanguins et des nerfs. Le cordon spermatique pénètre dans la cavité abdominale par le canal inguinal. Le grand axe du testicule est vertical ; (l'extremitas capitata) est dorsal tandis que le bord épидидymaire est en position médiane (**Boukhliq et al., 2018**).

Le poids du testicule mature varie en fonction de facteurs génétiques et environnementaux. La saison affecte le poids des testicules ainsi que la quantité et la qualité des spermatozoïdes (**Ortavant et al., 1988 ; Tibary et al., 1988**). En général, le poids des testicules varie entre 130 g et 160 g chez le caprin et de 170 g à 250 g chez l'ovin (**Barone, 1978**). Les testicules assurent la production des spermatozoïdes (spermatogenèse) et synthétisent la testostérone, principale hormone de reproduction chez le mâle (**Boukhliq et al., 2018**).

Chapitre II : La conservation du sperme

1.1.2. Structure testiculaire

La structure testiculaire est formée de couches fibreuses, en particulier l'albuginée et le tissu testiculaire principal qui est le parenchyme. L'albuginée émet des radiations Septula testis qui forment des lobules contenant les tubules séminifères. Chaque tubule possède une membrane basale, tapissée par des spermatogonies et des cellules de Sertoli. L'extérieur des tubules est constitué d'espaces de tissu conjonctif avec des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des cellules de Leydig (Seevagan *et al.*, 2019). Les radiations de la septula testis convergent dans la partie centrale du testicule vers un tissu conjonctif qui s'étend du haut vers le bas de chaque testicule, constituant le médiastin du testicule. À ce niveau, les tubules séminifères convolutés débouchent sur les canaux collecteurs constituant le rete testis au niveau du hile, où environ 12 se croisent pour former l'épididyme (Seevagan *et al.*, 2019 ; Boukhliq *et al.*, 2018).

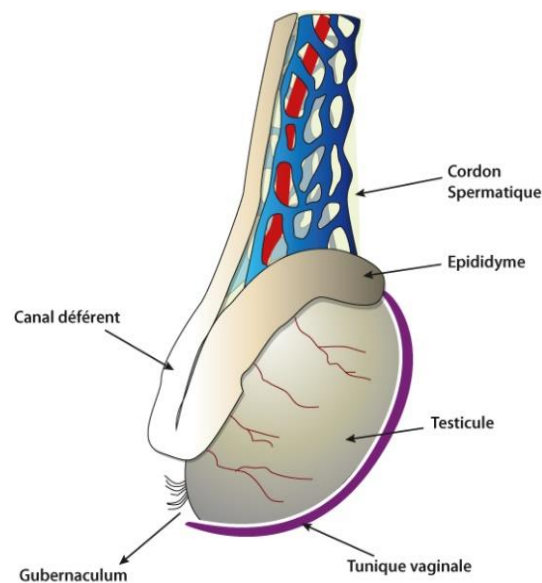


Figure 11 : Schéma du testicule vue latéro-postérieure.

(<https://palli-science.com/content/testicule-et-epidimyme-vue-latero-posterieure>).

1.1.3. Les principales fonctions des testicules

Les testicules assurent la production des spermatozoïdes (spermatogenèse) et synthétisent les hormones sexuelles mâles (androgènes) dont principalement la testostérone (Weinbauer *et al.*, 2010 ; Boukhliq *et al.*, 2018).

1.1.3.1. La spermatogenèse et la stéroïdogénèse

Le terme spermatogenèse décrit et inclut tous les processus impliqués dans la production des gamètes mâles, tandis que la stéroïdogénèse fait référence aux réactions enzymatiques conduisant à la production des hormones stéroïdes mâles. Les deux phénomènes se déroulent dans deux compartiments morphologiquement et fonctionnellement distincts, les tubules séminifères pour la spermatogenèse et le compartiment interstitiel situé entre les tubules séminifères pour la stéroïdogénèse (Weinbauer *et al.*, 2010).

Bien qu'anatomiquement séparés, ces deux compartiments sont étroitement liés l'un à l'autre. L'intégrité de ces deux compartiments est nécessaire à la production normale de spermatozoïdes, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. La fonction du testicule et, par

Chapitre II : La conservation du sperme

conséquent, la fonction de ses compartiments sont régies par l'hypothalamus et l'hypophyse (régulation endocrinienne). Ces effets endocriniens sont médiés et modulés au niveau du testicule par des mécanismes de contrôle locaux (facteurs paracrines et autocrines). (Weinbauer *et al.*, 2010).

1.1.3.2. Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont situées dans le tissu conjonctif de soutien entre les tubules séminifères, leur principale fonction est de sécréter l'hormone endogène masculine, qui est la testostérone, essentielle au développement des caractéristiques sexuelles masculines et à la production de spermatozoïdes (Seevagan *et al.*, 2019).

1.1.3.3. Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont situées dans les tubules séminifères testiculaires, qui représentent 80 % du testicule (Seevagan *et al.*, 2019).

Elles sont des cellules épithéliales de soutien, elles soutiennent les cellules germinales en leur fournissant les nutriments nécessaires à l'achèvement de la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli assument également toute une série d'autres rôles, tels que la contribution à la formation de la barrière sang-testicule, la phagocytose des spermatocytes apoptotiques et la sécrétion de signaux endocrinologiques (Barrionuevo *et al.*, 2011).

La FSH se lie aux récepteurs des cellules de Sertoli, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse des protéines. Plusieurs protéines sont synthétisées (Seevagan *et al.*, 2019).

1.1.3.4. La FSH et La LH

L'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) sont les facteurs endocriniens essentiels qui contrôlent les fonctions testiculaires. L'importance relative de chacune de ces hormones diffère quelque peu entre les espèces. Cependant, la LH et la FSH sont toutes les deux nécessaires à une spermatogenèse quantitativement normale (Ramaswamy *et al.*, 2019). La FSH régule la prolifération et la maturation des cellules germinales indépendamment et en combinaison avec la LH (Oduwole *et al.*, 2021).

1.1.3.4.1. La FSH

Elle agit sur les cellules de Sertoli dans les tubes séminifères pour favoriser la spermatogenèse et initier la production des facteurs de croissance et des protéines de liaison aux androgènes, qui sont nécessaires à la maturation des spermatozoïdes (Sambroni *et al.*, 2013).

1.1.3.4.2. La LH

Dans le testicule, elle stimule les cellules de Leydig pour produire de la testostérone qui est essentielle pour le développement des caractères sexuels secondaires et la spermatogenèse (Sambroni *et al.*, 2013).

Chapitre II : La conservation du sperme

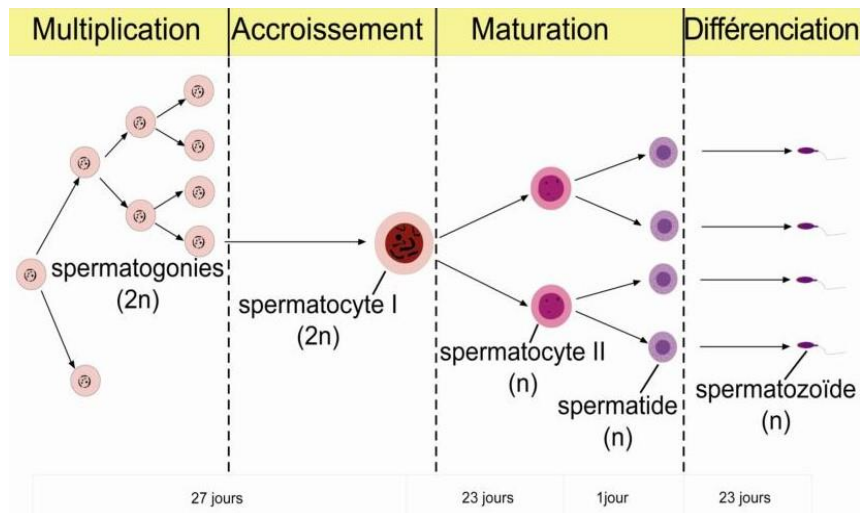


Figure 12 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermatogenèse.

(https://www.slideserve.com/Mia_John/physiologie-de-la-reproduction-chez-l-homme).

1.2. Les voies spermatisques

Les voies spermatisques comprennent les tubules séminifères, l'épididyme, le canal déférent et l'urètre (**Boukhliq et al., 2018**).

1.2.1. Les tubules séminifères

Les tubules séminifères débouchent sur les canaux collecteurs constituant le rete testis. Ce dernier conduit les spermatozoïdes jusqu'à la tête de l'épididyme. Les tubules séminifères sont divisés en deux types : les tubules contournés, qui sont nombreux et constituent la principale localisation des spermatozoïdes, et les tubules droits, qui se terminent dans le rete testis. Les tubules séminifères sont constitués de cellules spermatogènes et de cellules sustentaculaires appelées cellules de Sertoli. Les spermatozoïdes se forment au cours d'un long processus de division cellulaire et de maturation (**Boukhliq et al., 2018**).

1.2.2. L'épididyme

L'épididyme est situé en position caudale par rapport au testicule. Son rôle principal est d'assurer le stockage et la maturation des spermatozoïdes. Sa tête reçoit les canalicules efférents du rete testis et se poursuit par le canal déférent (**Boukhliq et al., 2018**). L'épididyme est tapissé intérieurement par un épithélium cylindrique et une membrane basale, suivis d'une sous-muqueuse contenant un interstitium, entouré sur le côté extérieur d'une épaisse bande de muscles circulaires et de faibles muscles longitudinaux, ainsi que d'une couche externe de séreuse (**Yadav et al., 2014**).

1.2.3. Le canal déférent

Le canal déférent du caprin mesure environ 6 à 7 cm de long et 6 à 7 mm de large, une structure droite, tubulaire et musclée. Il s'étend de la queue de l'épididyme à l'urètre pelvien (**Barone, 1978 ; Mahmud et al., 2015**). Le canal déférent est très enroulé au départ, mais il se redresse à mesure qu'il descend pour former l'ampoule (**Mahmud et al., 2015**).

Chapitre II : La conservation du sperme

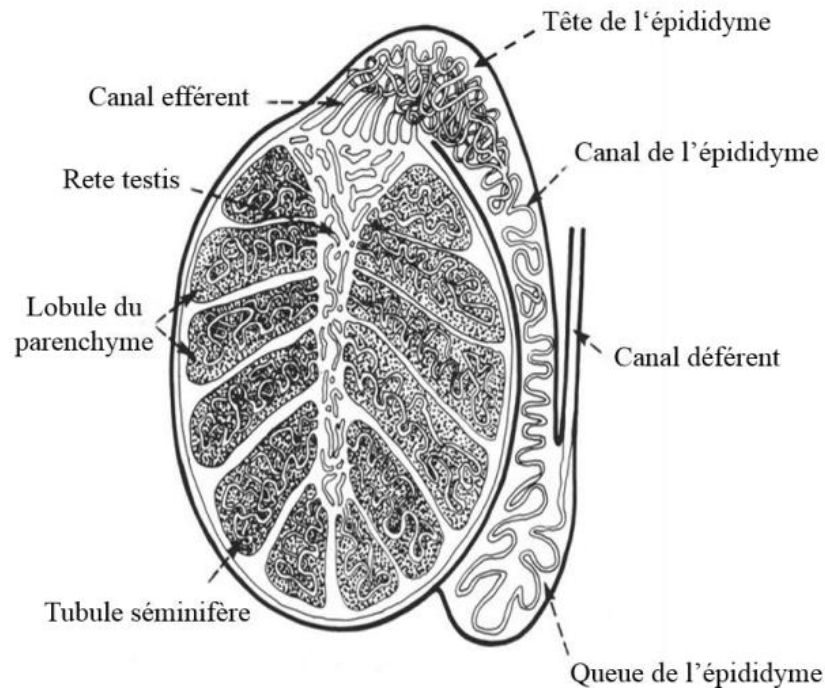


Figure 13 : Coupe verticale d'un testicule (Brice *et al.*, 1955).

1.3. Les voies urogénitales

1.3.1. L'urètre pelvien

L'urètre pelvien reçoit l'ouverture de l'ostium éjaculatoire et les canaux excréteurs des glandes accessoires, tandis que la partie extrapelvienne est incorporée au pénis (Boukhliq *et al.*, 2018).

1.3.2. Les glandes génitales accessoires

Accompagnent la partie pelvienne de l'urètre. Le nombre et la structure des glandes génitales accessoires diffèrent selon les espèces de mammifères. Les principaux représentants de ces glandes sont la glande vésiculaire (glandula vesicularis), la prostate (prostata) et la glande bulbo-urétrale (Skonieczna *et al.*, 2019).

1.3.2.1. Les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont une paire de glandes lobulaires compactes facilement identifiables grâce à leur aspect noueux chez le caprin (Gofur, 2015). Elles mesurent 3 à 4 cm de long et environ 2 cm de large (Barone, 1978). Les vésicules séminales sont situées de chaque côté de l'urètre, près de l'extrémité du canal déférent. Elles produisent la plus grande partie du liquide séminal : environ 60 % (Boukhliq *et al.*, 2018).

1.3.4.2. La prostate

La prostate est une glande de l'appareil reproducteur masculin qui se situe sous la vessie et entoure l'urètre. Elle a pour fonction de sécréter un liquide qui fait partie du sperme et qui aide à nourrir et à protéger les spermatozoïdes (Suril *et al.*, 2009). La prostate ne s'étend pas jusqu'à la face ventrale de l'urètre et elle est caractérisée par l'absence de sa partie conglomérée chez le caprin. Chez cette espèce elle entoure la face ventrale de l'urètre (Boukhliq *et al.*, 2018 ; Barone, 1978).

Chapitre II : La conservation du sperme

1.3.3. Le canal éjaculateur

Le canal des vésicules séminales et le canal déférent partagent un canal éjaculateur commun qui débouche dans l'urètre (**Boukhliq et al., 2018**). Les fonctions principales du canal éjaculateur sont de transporter le sperme des vésicules séminales à l'urètre prostatique, où il est mélangé au liquide prostatique pour former le liquide éjaculatoire, et de contracter rythmiquement lors de l'éjaculation, propulsant le sperme dans l'urètre prostatique et hors du corps (**Avila et al., 2016**).

2. La cellule spermatique

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui assure la transmission du génome haploïde mâle (**Thibault, 1975**). Le spermatozoïde est une cellule accessible qui peut être facilement purifiée et qui se prête donc particulièrement bien à l'analyse cellulaire. Il s'agit également d'une cellule extrêmement différenciée qui présente des changements génétiques, cellulaires, fonctionnels et chromatiniques très marqués par rapport aux autres cellules, ce qui a de profondes implications pour la fertilité, le développement de l'embryon et l'hérédité. La cellule spermatique se distingue des autres cellules dans de nombreux aspects, son rôle est de transmettre le génome paternel à l'ovocyte et elle est produite au cours de la spermatogenèse (**Oliva et al., 2009**).

Les spermatogonies se répliquent et se différencient en spermatocytes primaires qui subissent une recombinaison génétique pour donner naissance à des spermatides rondes haploïdes. Lors de la différenciation, les nucléosomes sont désassemblés et les histones sont éliminées et remplacées par des protamines hautement chargées positivement (**Balhorn et al., 2007**).

Au niveau cellulaire, la majeure partie du cytoplasme est éliminée et un flagelle ainsi que la vésicule acrosomique sont assemblés. Enfin, le spermatozoïde subit un processus de maturation lors de son passage dans l'épididyme, où la chromatine est encore compactée par la formation de liaisons disulfures entre les protamines et l'acquisition de différentes fonctionnalités membranaires et cellulaires (**Oliva et al., 2009**).

2.1. Morphologie du spermatozoïde

La capacité des spermatozoïdes à féconder un ovocyte dépend de la structure morphologique appropriée (**Chlopik et al., 2020**).

2.1.1. Tête du spermatozoïde

Chez le caprin, elle est massive, de 8 µm de long et de 4,5 à 5 µm de large. Alors que chez l'ovin elle est de 8 à 10 µm de long et 4 à 5 µm de large. Elle est principalement composée d'un noyau à chromatine dense. Les deux tiers antérieurs de la tête sont recouverts par l'acrosome (**Thibault, 1975**). La « Hyaluronidase » est présente dans le segment antérieur, qui digère le matériel qui unit les cellules du cumulus oophorus, tandis que l'acrosine est présente dans le segment postérieur, qui a pour fonction de perforer la zone pellucide de l'œuf (**Drion et al., 1993**).

2.1.1.1. Le noyau

La tête du spermatozoïde contient un noyau, qui est la structure la plus importante de la cellule et est considéré comme le meilleur indicateur de la qualité du sperme. Le noyau du spermatozoïde a une forme de chromatine condensée. La chromatine nucléaire est une forme

Chapitre II : La conservation du sperme

dispersée des chromosomes mitotiques et elle est porteuse d'informations génétiques (Nunez-Martinez, Moran et Pena, 2005).

2.1.1.2. Acrosome

L'acrosome est une structure en forme de capuchon qui contient et sécrète des enzymes, l'acrosome des mammifères est un appareil de Golgi modifié (l'acrosome émerge de l'appareil de Golgi de la spermatide) et un élément essentiel au déroulement de la réaction acrosomique (Chlopik *et al.*, 2020).

2.1.2. Le flagelle

Le flagelle joue un rôle essentiel dans le mouvement du spermatozoïde, car les mitochondries sont responsables des phosphorylations oxydatives du fructose présent dans le liquide séminal, ce qui permet d'obtenir l'énergie nécessaire aux mouvements de la queue, tandis que les structures de l'axonème ont des caractéristiques contractiles. De cette manière, les microtubules périphériques sont riches en ATPase (Albert et Jean, 2001). Chez les mammifères, l'axonème est un élément de base qui construit les flagelles des spermatozoïdes et il est situé dans la zone centrale des flagelles. Ainsi, l'axonème fonctionne comme le noyau de la queue du spermatozoïde (Chlopik *et al.*, 2020).

Le flagelle du spermatozoïde comprend trois parties successives :

2.1.2.1 La pièce intermédiaire

Débuté au niveau du centriole distal et se termine par un épaississement de la membrane cytoplasmique en partie caudale : c'est l'annulus, elle renferme les éléments fibrillaires situés au niveau du col et des mitochondries disposées en forme de gaine spiralée (Barone, 1978).

2.1.2.2. La pièce principale

C'est la partie la plus longue de la queue. À son niveau, une gaine fibreuse remplace la gaine mitochondriale Selon Belhamiti (2007).

2.1.2.3. La pièce terminale

Ne renferme que le filament axial, avec une membrane mince qui remplace la gaine fibreuse (Barone, 1978).

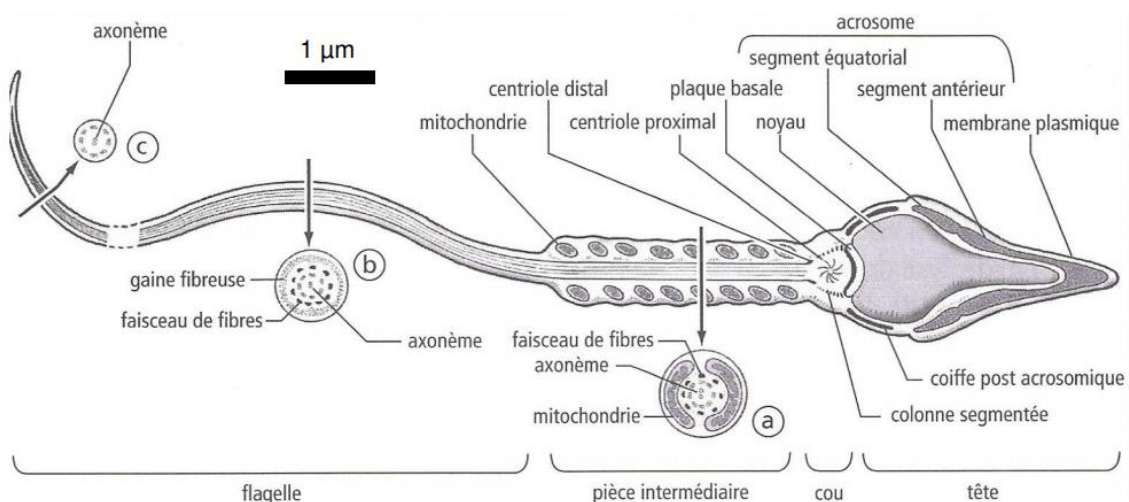


Figure 14 : Schéma de la morphologie du spermatozoïde d'un mammifère (Salgueiro et Reys 2002).

Chapitre II : La conservation du sperme

2.2. La composition membranaire du spermatozoïde

Comme toute cellule animale, les spermatozoïdes sont entourés par la membrane plasmique. La membrane plasmique des spermatozoïdes contient de grandes quantités de phospholipides, du cholestérol et des glycoprotéines. Sa consistance liquide dépend du nombre de doubles liaisons et de la teneur en cholestérol qui sont essentiels pour la mobilité du spermatozoïde et lui permettront de pénétrer l'ovocyte, et le protéger des dommages. Ainsi que le cholestérol rigidifie la membrane plasmique des spermatozoïdes et la rend plus perméable à différentes molécules et composés. Malheureusement, la présence de doubles liaisons augmente la réactivité chimique, ce qui peut entraîner une perte de mobilité et endommager la membrane (**Lucio et al., 2017**).

La membrane plasmique des spermatozoïdes est une structure très importante qui a pour fonction de protéger les spermatozoïdes contre les lésions extracellulaires et de répondre aux défis physiologiques. Elle joue un rôle crucial pendant la capacitation des spermatozoïdes, dans l'interaction spermatozoïde-œuf et, enfin, dans la fécondation (**Tapia et al., 2012**).

3. La conservation du sperme

Le principe de la conservation des spermatozoïdes consiste à arrêter ou ralentir le métabolisme cellulaire des spermatozoïdes pour un allonger la durée de leur stockage, puis à restaurer le métabolisme et rétablir leur fonctionnalité. L'ensemble de la procédure nécessite un niveau élevé d'adaptation à plusieurs stades, notamment la dilution, l'incubation, ainsi que le refroidissement/réchauffement pour la réfrigération, et le processus de congélation/décongélation pour la conservation à des températures négatifs (**Bailey et al., 2000**).

3.1. La cryoconservation à -196°C

La cryoconservation est une technique qui permet de maintenir les spermatozoïdes en vie indéfiniment. Elle consiste à refroidir les échantillons de sperme et à les stocker à -196°C dans de l'azote liquide. À cette température, tous les processus métaboliques sont arrêtés (**Paoli et al., 2014**).

3.1.1. Les avantages de la cryoconservation

La cryoconservation des cellules est devenue un outil indispensable en biologie. Les matériaux biologiques peuvent être conservés et utilisés en toute sécurité pendant une très longue période. Dans le cas particulier des spermatozoïdes, la cryoconservation est utilisée dans la gestion du bétail et dans la conservation des espèces sauvages et domestiques, en tant qu'outil complémentaire pour la gestion des animaux vivants et la préservation de leur diversité génétique (**Ramón et al., 2013**).

La cryoconservation des spermatozoïdes est une méthode qui permet de conserver les spermatozoïdes du meilleur donneur pendant des périodes illimitées, ce qui permet de préserver le patrimoine génétique et d'utiliser au mieux les doses de spermatozoïdes (**Saha et al., 2022**).

3.1.2. Les inconvénients de la cryoconservation

La cryoconservation implique des changements majeurs dans l'environnement des spermatozoïdes, et leur succès de survie à ce processus dépendra largement de leur capacité à répondre à ces changements (**Ramón et al., 2013**).

Chapitre II : La conservation du sperme

Les spermatozoïdes subissent des degrés divers de dommage ultra structuraux, biochimiques et fonctionnels, ce qui entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, de l'intégrité de leur membrane et de leur capacité de fécondation (**Saha et al., 2022**).

La cryoconservation des spermatozoïdes, est l'une des technologies de reproduction les plus agressives pour l'intégrité de la membrane spermatique (**Moce et al. 2010 ; Peña et al. 2011**). Les facteurs les plus importants causant ces dommages sont initiés par le stress osmotique généré par la déshydratation des cellules pendant la congélation/décongélation. La cristallisation de la glace extracellulaire entraîne de très fortes augmentations de tous les autres solutés dans le liquide restant et le mouvement de l'eau vers l'extérieur en réponse à des concentrations élevées (**Ramón et al., 2013**). Ces changements sont rapidement dérivés vers les membranes du plasma et des organelles qui expérimentent progressivement la perte de l'architecture membranaire du fait d'un choc thermique expliqué par le changement brutal de la température, ceci peut également provoquer une production d'espèces réactives de l'oxygène et une peroxydation lipidique accrue (**Peña et al., 2004**).

3.2. La réfrigération à 04°C

À cette température de conservation, des ingrédients protecteurs (tels que le Tris) doivent être ajoutés en tant que diluants pour éviter les dommages causés par le froid. De plus, le refroidissement doit être effectué progressivement jusqu'à atteindre 04°C afin d'éviter un choc thermique (**Mocé et al., 2020**). L'utilisation de cette technique de conservation vise à diminuer le métabolisme et à préserver les spermatozoïdes à court terme (**Christensen et al., 1996 ; Karunakaran et al., 2007**).

3.2.1. Les avantages de réfrigération

La réfrigération à 04°C est une méthode pratique pour stocker le sperme à court terme sans nécessiter des équipements complexes de congélation (**Karunakaran et al., 2007**). Le processus de refroidissement favorise le ralentissement du métabolisme des spermatozoïdes, ce qui prolonge leur viabilité et leur capacité de fécondation (**Lima et al., 2016**). Également la réfrigération à 04°C est une méthode pratique et largement utilisée pour le transport et la conservation du sperme (**Dias et al., 2018**).

3.2.2. Les inconvénients de réfrigération

Les processus de stockage du sperme à 04°C, induit un stress physique et chimique dans la membrane des spermatozoïdes, ce qui entraîne une réduction de la survie des spermatozoïdes (**Ahmad et al., 2021**), la réfrigération peut diminuer la qualité des spermatozoïdes et sa capacité de fertilisation par la libération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Lima et al., 2016 ; Bansal et Bilaspuri, 2011**).

Chapitre III

Le stress oxydatif

Chapitre III : Le stress oxydatif

1. Génialité sur le stress oxydatif

Sies et ses collègues ont décrit avec perspicacité le phénomène universel selon lequel la génération d'espèces réactives de l'oxygène pouvait modifier les macromolécules dans les organismes vivants, entraînant un large éventail de dommages mesurables. Ils ont utilisé le terme "stress oxydatif" pour définir la perte de l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers. Après des décennies de recherche, il est devenu de plus en plus évident que les cellules ne sont pas simplement des récepteurs passifs de modifications oxydatives, mais qu'elles peuvent agir de manière dynamique pour résister et s'adapter aux oxydants. En outre, de nombreuses voies sensibles à l'oxydoréduction ont été identifiées, dans lesquelles certains oxydants (principalement le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique) sont utilisés comme molécules messagères pour transmettre les signaux nécessaires à ces adaptations (**Ji LL et al., 2021**).

La définition du stress oxydatif est postulée pour définir un état dans lequel les processus pro-oxydants dépassent la défense antioxydante cellulaire, veut dire que lorsque cet équilibre est rompu, le stress oxydatif peut entraîner des dommages cellulaires (**Ji LL et al., 2021**). Et lorsque l'équilibre n'est pas perturbé, les agents oxydants jouent un rôle dans les adaptations physiologiques et la transduction des signaux. Cependant, une quantité excessive de ces agents, principalement les espèces d'oxygène (ROS) et d'azote (RNS), hautement réactives, entraîne l'oxydation de molécules biologiques telles que les lipides, les protéines, l'ADN et les organites cellulaires (**Daenen et al., 2019**).

1.1. Effet du stress oxydatif sur les spermatozoïdes

Le stress oxydatif est un état associé à un taux accru de dommages cellulaires induits par l'oxygène et les oxydants dérivés de l'oxygène (ROS). Il est l'un des facteurs les plus importants contribuant à la mauvaise qualité du sperme (**Bansal et al., 2011**).

Les spermatozoïdes, comme toute cellule vivante dans des conditions aérobies, sont confrontés au paradoxe de l'oxygène. Tandis que l'O₂ est nécessaire à leur fonctionnement, ses produits métaboliques quant à eux, peuvent modifier les fonctions des spermatozoïdes et mettre en danger leur survie. Ils comprennent les ions d'oxygène, les radicaux libres et les peroxydes. Dans la plus part des cas, les ROS sont générés par les spermatozoïdes et les leucocytes séminaux dans le sperme et provoquent l'infertilité par deux mécanismes clés : le premier étant les dommages que la membrane des spermatozoïdes subit, réduisant leur mobilité et leur capacité à fusionner avec l'ovocyte ; le second, c'est qu'ils peuvent altérer l'ADN des spermatozoïdes, infectant ainsi le processus de fécondation en entraînant le passage d'un ADN paternel défectueux au conceptus (**Chandra et al., 2012**).

Certaines de ces espèces réactives de l'oxygène sont constamment produites à de faibles niveaux en tant que sous-produits des réactions métaboliques normales, et sont maintenues sous contrôle par les enzymes antioxydantes qui maintiennent l'équilibre redox intracellulaire (**Bansal et al., 2011**). Lorsque l'équilibre redox est rompu, ces espèces modérément réactives peuvent interagir avec les métaux de transition ou d'autres composants du cycle redox pour produire des espèces d'oxygène hautement réactives qui peuvent causer des dommages importants cellulaires très importants (**Bansal et al., 2011 ; Sies et al., 2017**).

Chapitre III : Le stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être détecté par trois stratégies : la mesure directe des ROS, la détection des niveaux d'antioxydants, et la mesure des dommages aux biomolécules qui en résultent (Hameister *et al.*, 2020).

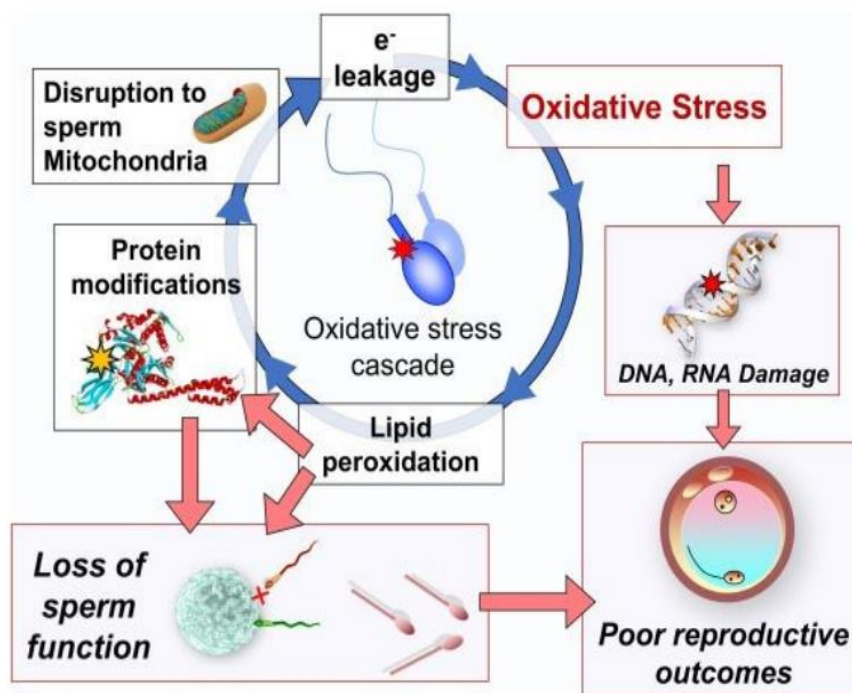


Figure 15 : Schéma des dommages causés aux spermatozoïdes par le stress oxydatif (Gibb *et al.*, 2020).

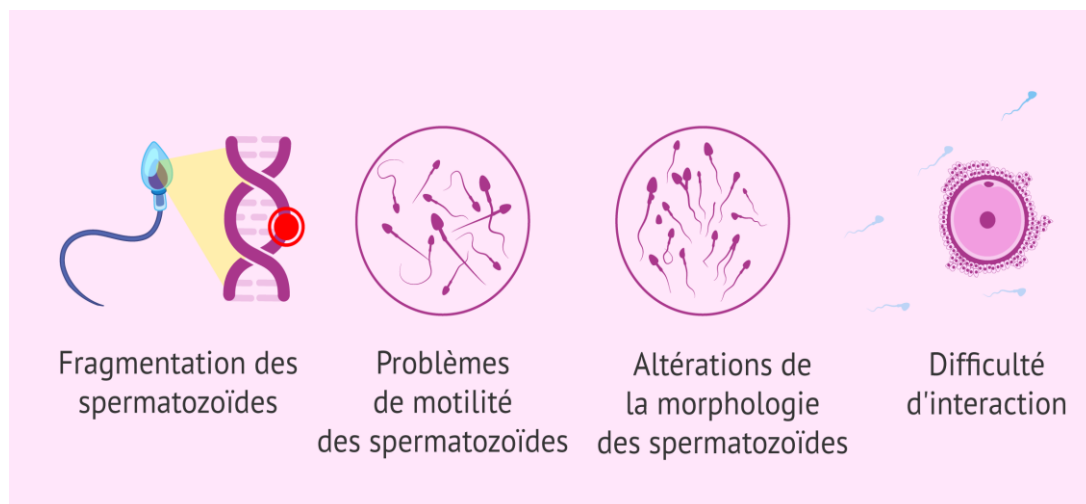


Figure 16 : Schéma explicatif des conséquences du stress oxydatif sur le sperme.

(<https://www.invitra.fr/spermatozoides-et-antioxydants/consequences-stress-oxxydatif-hommes/>).

1.1.1. L'origine du stress oxydatif

L'inflammation, la respiration et l'hypoxie sont les principales conditions à l'origine du stress oxydatif, principalement par le biais du burst oxydatif des cellules phagocytaires du tissu synovial, telles que les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, qui produisent de grandes quantités d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Hameister *et*

al., 2020). Les mitochondries sont la source la plus vitale de production de ROS (Ifeanyi *et al.*, 2018).

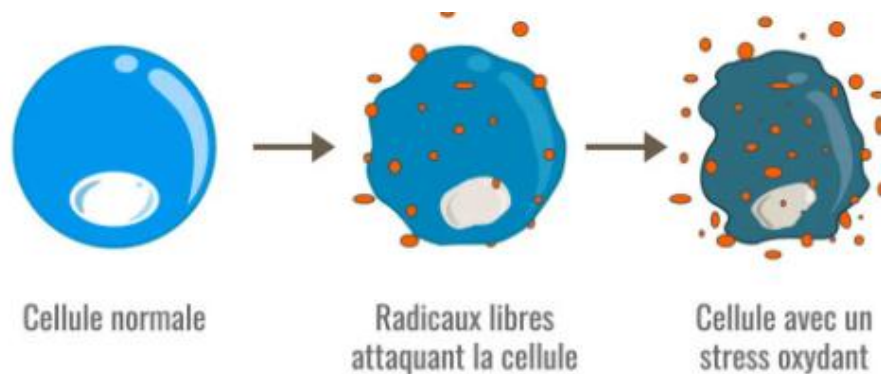


Figure 17 : Effet du stress oxydatif sur la cellule.

(<https://www.colispharma.be/fr/blog/qu-est-ce-que-le-stress-oxydatif-n29>).

1.2. Les cibles du stress oxydatif

La production incontrôlée de ROS qui dépasse la capacité antioxydante du plasma séminal entraîne un stress oxydatif qui est nocif pour les spermatozoïdes. Tous les composants cellulaires, y compris les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres, sont des cibles potentielles du stress oxydatif (Bansal *et al.*, 2011). Ce qui peut entraîner la mort des cellules (Rashki Ghaleno *et al.*, 2021).

1.2.1. Effet du stress oxydatif sur l'ADN

Les lésions oxydatives provoquées par les ROS peuvent entraîner des modifications de l'ADN, notamment des altérations de bases, des ruptures de simples et doubles brins, des échanges de chromatides sœurs et des liaisons transversales ADN-protéines. Le radical hydroxyle joue un rôle majeur dans l'oxydation de l'ADN (Moreira *et al.*, 2008).

Les dommages aux bases sont principalement indirects et causés par les espèces réactives de l'oxygène, par exemple : $O_2^{\bullet-}$ (radical superoxyde), OH (radical hydroxyle) et H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène). Certaines espèces oxydantes réactives agissent comme des messagers cellulaires dans la signalisation redox. Le stress oxydatif peut donc perturber les mécanismes normaux de signalisation cellulaire (Ozougwu *et al.*, 2016).

1.2.2. La peroxydation lipidique

Le mécanisme des attaques radicalaires sur les lipides de la membrane spermatique, conduisent à l'initiation de la cascade de peroxydation lipidique (LPO). Les spermatozoïdes de mammifères, en particulier chez les ruminants, sont connus pour être susceptibles du stress oxydatif. Cela est dû à l'abondance des PUFA (acides gras polyinsaturés) dans la membrane plasmique. Les PUFA confèrent aux membranes fluidité et flexibilité, ce qui aide les spermatozoïdes à s'engager dans les événements de fusion membranaire associés à la fécondation. Cependant, la présence de doubles liaisons dans ces molécules (PUFA) les rend vulnérables à l'attaque des radicaux libres et au déclenchement de la cascade LPO. C'est une réaction autocatalytique qui se propage d'elle-même et qui peut donner lieu à un dysfonctionnement cellulaire associé à la perte des fonctions et de l'intégrité de la membrane, une altération des fonctions cellulaires, ainsi qu'une dégradation de la mobilité des spermatozoïdes et l'induction de leur apoptose (Bansal *et al.*, 2011).

Chapitre III : Le stress oxydatif

1.2.3. L'oxydation des protéines et des acides aminés

Les acides aminés libres et les résidus d'acides aminés dans les protéines sont très sensibles à l'oxydation par une ou plusieurs espèces réactives (ROS) (Stadtman, *et al.*, 2003).

L'oxydation des protéines peut entraîner l'hydroxylation des groupes aromatiques et des chaînes latérales d'acides aminés aliphatiques... ce qui signifie que l'oxydation des protéines peut entraîner des modifications post-traductionnelles qui affectent leur activité, leur structure et leur rôle dans les processus cellulaires (Stadtman, *et al.*, 2003).

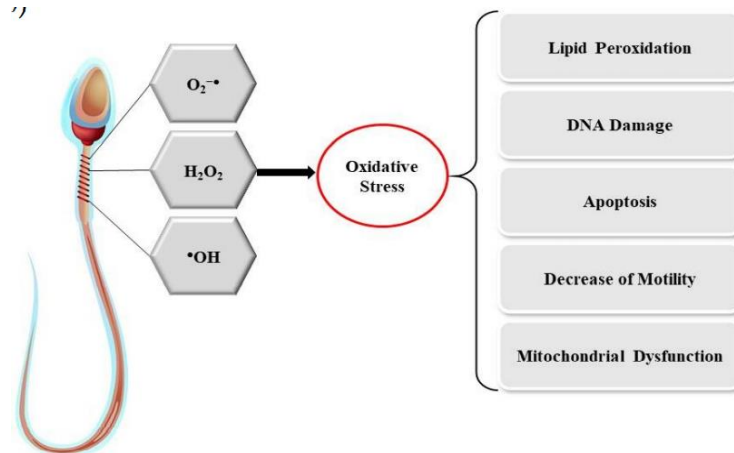


Figure 18 : les dommages causés par les ROS sur la structure et la fonction des spermatozoïdes (Rashki Ghaleno *et al.*, 2021).

1.3. Les avantages du stress oxydatif

Il est important de souligner que les espèces réactives de l'oxygène (comme l'anion peroxyde) jouent un rôle essentiel dans les processus physiologiques normaux des spermatozoïdes tels que la capacitation, la réaction acrosomique, le maintien de la capacité de fécondation (Gibb *et al.*, 2020 ; Bansal *et al.*, 2011).

La génération contrôlée de ROS peut également fonctionner comme des molécules de signalisation (seconds messagers) dans de nombreux types cellulaires différents ; ce sont des médiateurs importants des fonctions spermatiques. Le maintien d'un niveau adéquat de ROS est donc essentiel pour une bonne fonctionnalité des spermatozoïdes (Bansal *et al.*, 2011).

À des concentrations modérées, l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important en tant que médiateurs régulateurs dans les processus de signalisation. De nombreuses réponses médiées par les ROS protègent en fait les cellules contre le stress oxydatif et rétablissent "l'homéostasie redox" (Dröge *et al.*, 2002).

2. Les radicaux libres

2.1. La définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules/fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend généralement très réactifs (Poprac *et al.*, 2017). On pensait initialement que les radicaux libres étaient des radicaux centrés sur l'oxygène appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais ils comprennent également un sous-groupe d'espèces réactives de l'azote (RNS) et sont tous un produit du métabolisme cellulaire normal (Ifeanyi *et al.*, 2018).

2.2. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui renferment l'élément oxygène, présentent une grande activité chimique en raison de la présence d'un électron qui n'a qu'une seule liaison. Dans cet état, les électrons ont une forte tendance à essayer de former des liaisons plus solides, ce qui entraîne des réactions chimiques qui peuvent être à la fois néfaste et bénéfique. Les espèces réactives de l'oxygène comprennent des radicaux libres ainsi que les oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène qui est la principale espèce réactive de l'oxygène toxique pour les spermatozoïdes du fait de sa grande perméabilité à la membrane plasmique (Gibb *et al.*, 2020). À des concentrations faibles à modérées, elles participent aux processus cellulaires physiologiques, mais à des concentrations élevées, elles entraînent des modifications néfastes aux composants cellulaires (Ozougwu *et al.*, 2016).

Les ROS pourraient induire une perte rapide d'ATP intracellulaire, entraînant des lésions axonémales avec une diminution de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes et une augmentation des défauts structuraux de la pièce intermédiaire, avec des effets délétères sur la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomique (Alahmar *et al.*, 2019).

2.2.1. Origine d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La plupart des ROS sont générés en tant que sous-produits au cours des réactions de transport d'électrons ou d'oxydation des mitochondries. Les ROS résultent de la réduction séquentielle de l'oxygène par l'ajout d'électrons. Par exemple, la réduction de l'oxygène par un électron conduit à la formation du radical libre superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ; tandis que la réduction par deux électrons conduit au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui n'est pas un radical libre puisque tous ses électrons sont appariés. Ces deux produits sont des ROS très courants dans les environnements cellulaires (Serras *et al.*, 2016).

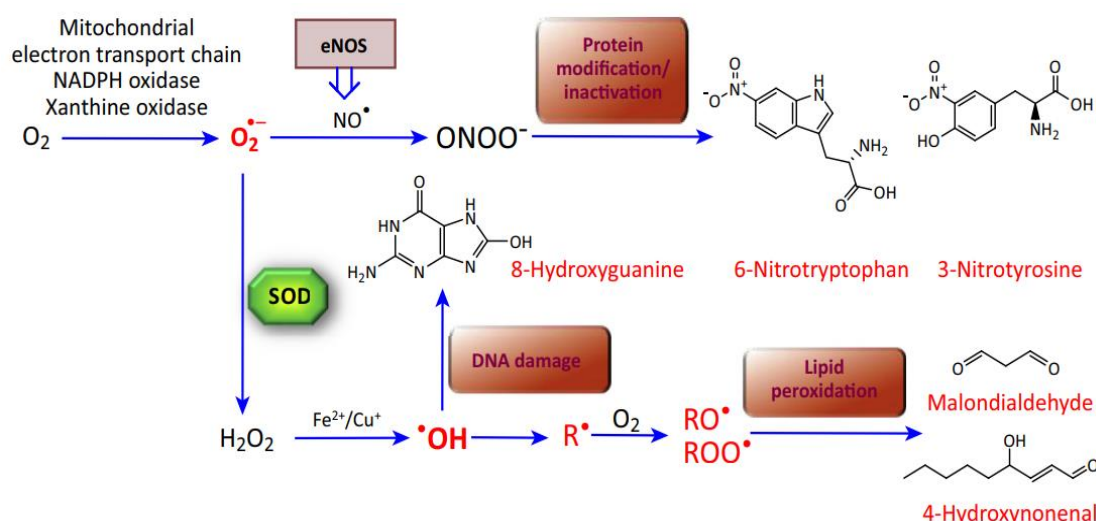


Figure 19 : Diverses voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur transformation (Poprac *et al.*, 2017).

2.3. Espèces réactives de l'azote (RNS)

Les espèces réactives de l'azote (RNS) sont des radicaux libres contenant de l'azote qui ont une capacité d'oxydation élevée et sont donc impliqués dans la promotion du stress oxydatif (Ifeanyi *et al.*, 2018). Les principales RNS sont l'oxyde nitrique (NO) et le dioxyde d'azote

Chapitre III : Le stress oxydatif

(.NO₂), ainsi que les espèces non radicalaires telles que le peroxy-nitrite (ONOO⁻). (Blaise *et al.*, 2005).

3. Les Antioxydants

Contre les attaques des ROS, les spermatozoïdes sont bien équipés d'un puissant système de défense composé d'antioxydants. Les antioxydants sont les principaux facteurs de défense contre le stress oxydatif induit par les radicaux libres (Bansal *et al.*, 2011).

L'oxygène est essentiel à la vie cellulaire car il permet la production efficace d'énergie (ATP) grâce à son fort potentiel d'oxydoréduction. Cependant, cette même propriété chimique le rend potentiellement dangereux, car il peut générer des espèces réactives de l'oxygène qui endommagent les cellules. Cet effet contradictoire de l'oxygène dans les organismes vivants a nécessité l'évolution du système antioxydant pour protéger contre l'oxydation excessive et combattre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). (Ifeanyi *et al.*, 2018).

Tout comme les radicaux libres, les antioxydants peuvent être produits de manière endogène et peuvent également être introduits dans le système biologique de manière exogène, généralement par le biais de l'alimentation (par exemple la vitamine C, les caraténoides et la vitamine E) (Amber *et al.*, 2013). Les antioxydants ont pour fonction principale d'équilibrer les radicaux libres générés au cours des processus métaboliques (Rahman, 2007 ; Poljsa *et al.*, 2011). On peut dire que les antioxydants mettent en œuvre leur système de défense de trois manières principales : en séquestrant les métaux de transition dans les protéines, empêchant leur réaction avec les radicaux libres et inhibant ainsi leurs effets délétères. En mettant à disposition de petites molécules capables de piéger les radicaux libres. Stimuler les défenses antioxydantes et optimiser les processus cellulaires de réparation des dommages oxydatifs sur l'ADN (Foyer, 2005).

Les antioxydants sont représentés par deux groupes : d'une part les antioxydants enzymatiques, qui comprennent la superoxyde dismutase, la catalase et le système de glutathion, et de l'autre part les antioxydants non enzymatiques, par exemple la vitamine E, la vitamine A, la vitamine C et l'acide urique (Del Prete *et al.*, 2018 ; Ifeanyi *et al.*, 2018).

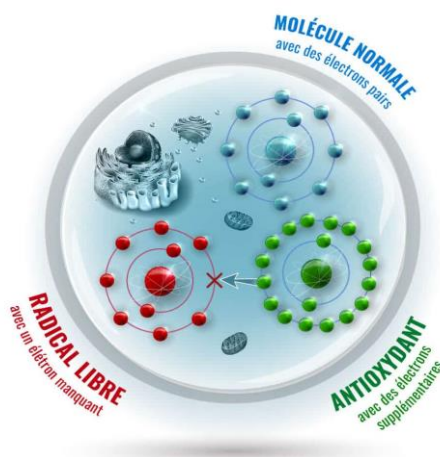


Figure 20 : Le mécanisme d'action des antioxydants pour neutraliser les radicaux libres

(<https://www.istockphoto.com/fr/vectoriel/fonctionnement-des-antioxydants-contre-les-radicaux-libres-gm976967168-265661300>).

Chapitre III : Le stress oxydatif

3.1. Les Antioxydants Enzymatiques

Les enzymes antioxydantes ont pour fonction de maintenir l'équilibre redox stable (Daenen *et al.*, 2019). La superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion (GSH) peroxydase constituent le principal système antioxydant dans le sperme. Ces métalloenzymes sont présentes à la fois dans l'espace intracellulaire et extracellulaire (Alahmar *et al.*, 2019).

3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le SOD est une classe d'enzymes qui catalyse la décomposition de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , présent dans presque toutes les cellules aérobies et dans les fluides extracellulaires (Rahman, 2007), Le SOD catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène à partir de l'anion superoxyde (Makarova *et al.*, 2018).

Cette enzyme joue également un rôle dans l'inhibition de l'inactivation oxydative du NO. Les tissus des mammifères contiennent trois types de SOD : la SOD contenant du cuivre et du zinc, la SOD contenant du manganèse et la SOD extracellulaire, qui sont exprimées respectivement dans le cytosol, la matrice mitochondriale et l'espace extracellulaire (Daenen *et al.*, 2019).

3.1.2. La catalase (CAT)

Elle est prédominante dans les cellules exposées à l'oxygène et est fréquemment utilisée pour catalyser le H_2O_2 (produit d'une série de processus métaboliques normaux) en oxygène et en eau (Schwentker *et al.*, 2002). La catalase a l'un des taux de renouvellement les plus élevés de toutes les enzymes, une molécule de catalase étant capable de convertir environ 6 millions de molécules de H_2O_2 en eau et en oxygène chaque minute. On la trouve dans tous les organes, mais surtout dans le foie, ce qui permet de neutraliser les substances toxiques. La catalase est utilisée afin de préserver l'organisme des conséquences néfastes des radicaux libres (Droge, 2002 ; Valko *et al.*, 2007).

3.1.3. La glutathion peroxydase (GPx)

Les glutathion peroxydases catalysent la réduction des hydroperoxydes en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme réducteur. Leur rôle principal est de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs (O'Flaherty *et al.*, 2014).

Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement le H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier *et al.*, 2003).

3.1.4. La glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase est responsable du maintien de l'approvisionnement en glutathion réduit, l'un des thiols réducteurs les plus abondants dans la majorité des cellules. Sous sa forme réduite, le glutathion joue un rôle clé dans le contrôle cellulaire des espèces réactives de l'oxygène, et les enzymes antioxydantes telles que la glutathion réductase déterminent les conditions les plus appropriées pour le contrôle redox au sein d'une cellule ou pour l'activation de la mort cellulaire programmée (Couto *et al.*, 2016).

3.2. Les Antioxydants non Enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques, ou antioxydants de faible poids moléculaire, se trouvent dans le plasma, les fluides extracellulaires, les fluides intracellulaires, les lipoprotéines et les membranes. Ce groupe comprend plusieurs antioxydants alimentaires ainsi que des

Chapitre III : Le stress oxydatif

composés synthétisés dans l'organisme, qui peuvent être divisés en deux sous-groupes : les antioxydants hydrosolubles et les antioxydants liposolubles (**Daenen *et al.*, 2019**).

3.2.1. L'effet antioxydant des extraits phénoliques

3.2.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles synthétisées dans plusieurs parties des plantes qui présentent une capacité antioxydante élevée. Ils ont la capacité de contrôler l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le biais de piègeurs des ROS lorsqu'ils sont formés. Par conséquent, ces composés antioxydants jouent un rôle important dans la tolérance au stress des plantes, principalement en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes qui veut dire que ces composés antioxydants aident à protéger les plantes contre le stress oxydatif (**Dias *et al.*, 2021**).

Les flavonoïdes peuvent supprimer la production de ROS en raison de l'inhibition des enzymes redox (monooxygénase, cyclooxygénase, lipoxygénase, xanthine oxydase, NADH oxydase) et lient également les ions de métaux de valence variable qui sont impliqués dans la génération de radicaux d'oxygène par la réaction de Fenton. Les flavonols ; quercétine et rutine ont un effet antioxydant prononcé dans des conditions de peroxydation lipidique (LPO) in vitro (**Potapovich *et Kostyuk*, 2003**).

3.2.1.2. La quercétine

La présence et l'emplacement des substitutions hydroxyle (-OH) et l'anneau B de type catéchol font de la quercétine un antioxydant efficace, qui possède une activité de piégeage des ROS plus intense que celle de la vitamine E ou C (**A.EL-Khawagah *et al.*, 2020**).

Les propriétés antioxydantes bénéfiques de la quercétine sur les caractéristiques du sperme congelé-décongelé ont été rapporté grâce à son incorporation dans les milieux de conservation de sperme. Des publications antérieures ont révélé les effets bénéfiques de la quercétine sur les paramètres de la qualité du sperme (motilité progressive et intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes, de l'acrosome et de l'ADN) chez diverses espèces animales (**A.EL-Khawagah *et al.*, 2020**).

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel végétale

Notre travail consiste à définir l'effet de l'extrait phénolique de la plante « *Lactuca virosa* » sur le sperme dans le but de conserver les caractéristiques de la semence de l'ovin puis celle du caprin lors de la réfrigération.

Le choix de la plante (*Lactuca virosa*) était basé sur sa disponibilité, sa large utilisation en médecine traditionnelle, et la richesse de ses extraits en molécules bioactives.

1.1. La récolte de la plante

L'endroit de la récolte été soigneusement sélectionné, en évitant les zones polluées ou traitées avec des produits chimiques. La partie aérienne de la plante composée de feuilles été récoltée.



Figure 21 : la récolte de la plante (*Lactuca virosa*).

1.2. Séchage

- D'abord, on a bien lavé les feuilles avec de l'eau.
- Ensuite, on a laissé les feuilles pour se sécher à l'air libre pendant quelques jours (04 jours).



Figure 22 : Le séchage de la plante à l'air libre.

1.3. Broyage

-Après que les feuilles sont séchées on a passé au broyage à l'aide d'un moulin à café.

-Le broyage été fait au fur et à mesure à des petites quantités.



Figure 23 : Moulin à café.

1.4. Tamisage

Une fois les feuilles sont broyées, on a utilisé un tamis fin pour tamiser la poudre et la conserver dans des flacons en verre à l'abri de la lumière.



Figure 24 : Un tamis fin.

2. Extraction des composés phénoliques

2.1. Le matériel et les réactifs à utiliser

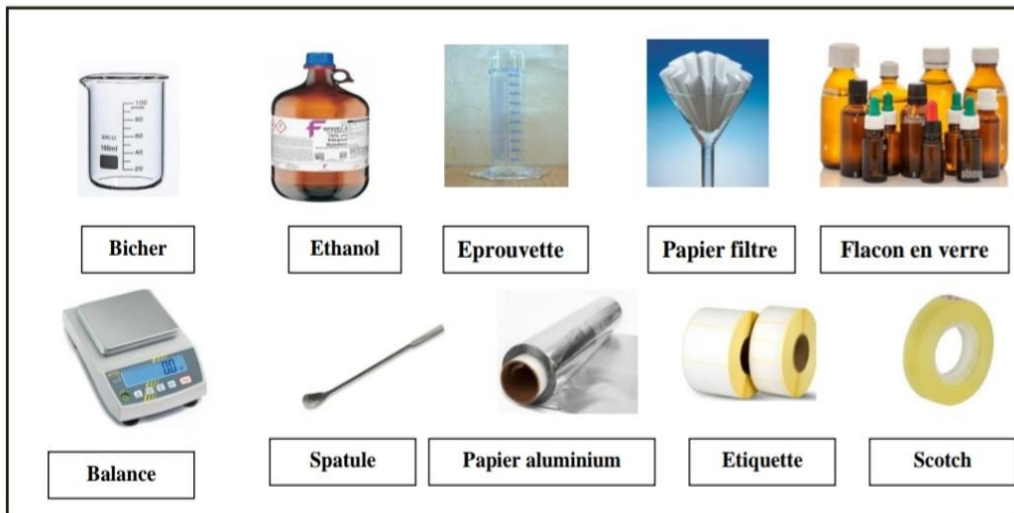


Figure 25 : Le matériel utilisé pour l'extraction de l'extrait phénolique.

2.2. Extraction par macération

La macération est l'une des méthodes d'extraction conventionnelles les plus simples et les moins chères, car elle ne nécessite qu'un simple récipient comme lieu d'extraction et un solvant. Mais cette méthode nécessite une longue période pour le processus d'extraction. Le processus d'extraction par la méthode de macération se fait en immergeant l'échantillon dans le solvant d'extraction, qui est l'éthanol dans notre cas (**Tambun *et al.*, 2021**).

On a commencé d'abord par mettre la balance à zéro, puis placer le bécher sur la balance et l'ajuster à zéro. Peser **8g** de poudre de plante broyer à l'aide d'une spatule, puis on a rempli l'éprouvette graduée jusqu'à **400ml** de l'éthanol et le verser sur la poudre contenue dans le bécher. Ensuite mélanger bien le tout par une agitation manuelle et après ça on a conservé le bécher avec un papier aluminium et lui placer une étiquette sur ce dernier en mentionnant la nature de l'échantillon et la date.



Figure 26 : La poudre de (*Lactuca virosa*) après broyage.

Après 24h, on a procédé à la filtration en plaçant un papier filtre sur un entonnoir pour récupérer le filtrat dans un erlenmeyer. Le filtrat été par la suite stocké dans des flacons en verre, ambrés et étiquetés ; préparés préalablement.



Figure 27 : La technique de filtration.

Afin de récupérer l'extrait phénolique il est nécessaire de le séparer du solvant (éthanol), en utilisant un rota-vapeur, le filtrat été placé dans un ballon fixé au rota-vapeur et plongé dans un bain marie à **45°C**, après quelques minutes on a observé que l'éthanol s'évapore et on a obtenu l'extrait phénolique sous forme d'une pate qui reste collé à l'intérieure du ballon. Ensuite on a récupéré l'extrait phénolique qui sera conserver dans un réfrigérateur.



Figure 28 : Utilisation du rota-vapeur pour séparer le solvant éthanolique.

3. La préparation des milieux de conservation du sperme

3.1. Préparation du milieu de base (Tris)

Dans une fiole de 100ml, on a mis 2.42g de tris (hydroxyméthyl)aminométhane, 1g de fructose et 1.38 de l'acide citrique, remplir avec 60 ml de l'eau distillée puis passer à l'agitation

en mettant un barreau magnétique dans la fiole puis la placer sur l'agitateur, une fois terminer on a enlevé le barreau magnétique, et on a complété le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, puis la conserver au réfrigérateur.

3.2. Préparation des milieux de traitement

3.2.1. La quercétine

On a pris 1mg de la quercétine en poudre et on lui a rajouté 50 ml de la solution Tris préparé déjà pour obtenir une concentration finale de 20 μ g/ml. De cette solution mère, on a préparé des solutions filles avec différentes concentrations :

- Quercétine 10 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 1ml de la solution Tris
- Quercétine 5 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 3ml de la solution Tris

3.2.2. Acide gallique

On a pris 1mg de l'acide gallique en poudre puis on a lui rajouté 50 ml de la solution Tris pour obtenir une concentration finale de 20 μ g/ml. De cette solution mère on a préparé des solutions filles avec différentes concentrations :

- Acide gallique 10 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 1ml de la solution Tris
- Acide gallique 5 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 3ml de la solution Tris

3.2.3. Extraits phénoliques

On a pris 10 mg de l'extrait phénolique récupéré sous forme de patte et ensuite le diluer dans 50 ml de la solution Tris déjà préparé, puis on obtient alors une solution mère d'une concentration de 200 μ g/ml.

Les solutions filles sont préparées à partir de la solution mère de la manière suivante:

- Extrait phénolique 100 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 1ml de la solution Tris
- Extrait phénolique 50 μ g/ml : on a pris 1ml de la solution mère + 3ml de la solution Tris
- Extrait phénolique 10 μ g/ml : on a pris 0.5ml de la solution mère + 9.5ml de la solution Tris

4. La collecte épидидymaire du sperme

Le sperme épидидymaire est récupéré par une technique de *retrograde-flushing* décrite par **Martinez-Pastor *et al.*, (2006)**. Cette technique de prélèvement permet de collecter les spermatozoïdes contenus dans la queue épидидymaire d'animaux abattues avec une quantité suffisante pour réaliser une série d'étude. Les étapes à suivre sont comme suivant :

- Enlever la gaine externe du testicule (albuginée) à l'aide d'un bistouri.
- Isoler soigneusement l'épididyme et le canal déférent du testicule toujours à l'aide du bistouri.
- Se débarrasser de la tunique qui enrobe le canal déférent.
- Nettoyer et rincer le canal déférent et l'épididyme avec la solution du Tris.

Matériel et Méthodes

- A l'aide d'une seringue, réalisant une série des ponctions des vaisseaux sanguins qui irriguent la queue épидидymaire, pour éviter toute contamination possible de la semence.
- Réaliser une incision profonde au niveau de la queue épидидymaire à l'aide du bistouri pour qu'on puisse récupérer le sperme.
- Introduire une seringue remplie de 0.5ml de tris dans la lumière du canal déférent.
- Appuyer sur le piston de la seringue afin de vider le Tris puis continuer avec de l'air pour créer une pression, résultant à l'écoulement du sperme dans le tube Eppendorf.



Figure 29 : la collecte du sperme épидидymaire d'un caprin par la technique de *rétrograde-flushing*.

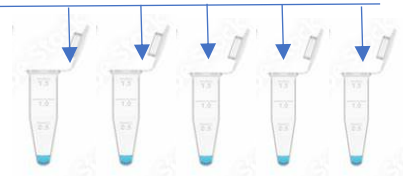
4.1. La dilution de la semence

Dans cette étude nous avons utilisé la semence de 05 individus de chaque espèce, ovine et caprine. Pour diluer le sperme on a pris de chaque milieu préparé 990ul +10ul du sperme pur. Soit un taux de dilution de 10:1000 (volume/volume).

► La préparation des séries

Pour un testicule, on a préparé 3 séries de 5 tubes.

10 μ l du sperme pur



l'ajout 990 μ l de chaque milieu

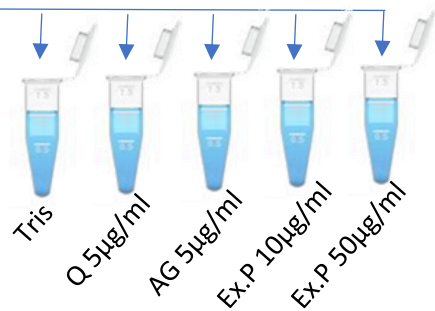


Figure 30 : protocole de dilution des différents milieux.

4.2. Analyse du sperme collecté

4.2.1. Analyse macroscopique

- La couleur : l'observation se fait à l'œil nu, le sperme doit être de couleur blanchâtre. Un sperme qui ne respecte pas une couleur conforme sera écarté.
- Le volume : la lecture se fait direct sur le tube Eppendorf.

4.2.3. Analyse assistée par ordinateur (CASA)

La mobilité est l'un des paramètres les plus importants à utilisés pour l'évaluation in vitro de la qualité et de la fonction des spermatozoïdes (**Van De Hoek et al., 2022**).

La technologie de l'analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA) est développée pour la première fois à la fin des années 1980, fait référence à un système informatique automatisé utilisé pour l'analyse des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes (**Van De Hoek et al., 2022**).

Le CASA est conçue pour fournir des informations précises et objectives sur la motilité des spermatozoïdes en utilisant des images continues des spermatozoïdes, le traitement numériques et l'analyse de l'information (**Lu et al., 2014**).

D'abord on a placé une goutte de 10 μ l de chaque milieu au centre de la cellule de Makler, puis on a mis la lamelle de couverture. On a placé ensuite la cellule de Makler sur la platine du microscope, et lancer l'analyse en capturant 04 champs de chaque milieu. L'analyse est faite en cinétique à plusieurs temps différents à T0 (juste après la dilution), puis 2 heures (T2), 4heures (T4) et 24heures (T24) de réfrigération. Le pourcentage de la mobilité totale des spermatozoïdes progressifs et les paramètres de la mobilité (VCL, VSL, VAP, BCF) sont enregistrés.

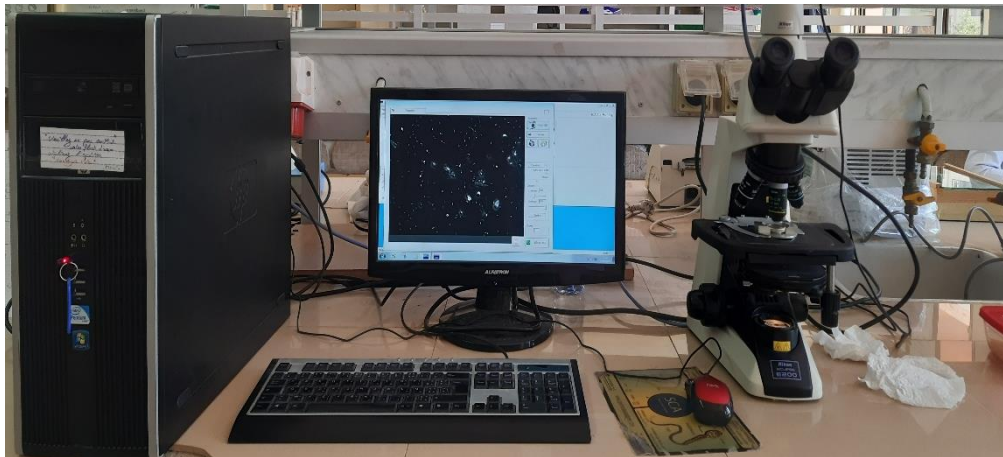


Figure 31 : Une image du système d'analyse CASA.

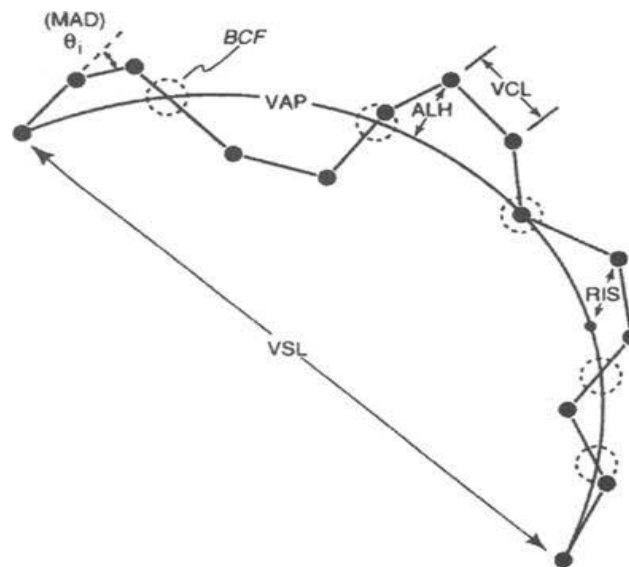


Figure 32 : Les différents paramètres du cinétique trajectoires des spermatozoïdes.

5. Test de viabilité

Les tests de viabilité des spermatozoïdes sont utilisés pour déterminer le pourcentage des spermatozoïdes vivants. Le test se fait par l'utilisation des colorant éosine-négrosine décrit par (Morrier *et al*, 2002). Les tests d'exclusion de colorants reposent sur la capacité de la membrane des spermatozoïdes vivants à résister à l'absorption de certains colorants, alors que ces colorants pénètrent et colorent les spermatozoïdes non viables (Vasan *et al.*, 2011). Dans cette étude, la viabilité des spermatozoïdes est évaluée par coloration à l'éosine (à cause de la non disponibilité de la négrosine).

Après 24 heures de conservation de la semence dans les différents milieux, on a préparé les frottis. Une goutte de 10 μ l du sperme traité été mise sur une lame et mélanger avec 2 μ l de l'éosine dilué à 2%. Les frottis sont réalisés grâce à une autre lame et ensuite on a laissé sécher. La lame été placée sous microscope optique après l'addition d'une goutte de l'huile à immersion, l'observation été faite au grossissement (10 \times 100).

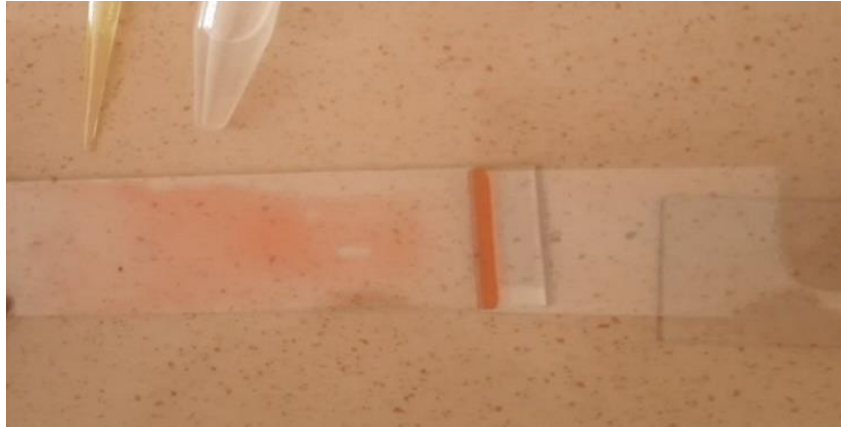


Figure 33 : la préparation du frotti.

On a compté au moins 100 spermatozoïdes par lame au microscope optique afin d'obtenir le pourcentage des spermatozoïdes vivants et celui des morts. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose (leur membrane est perméable), et ceux qui restent non colorés sont vivants (leur membrane est imperméable) (Peris *et al.*, 2004).

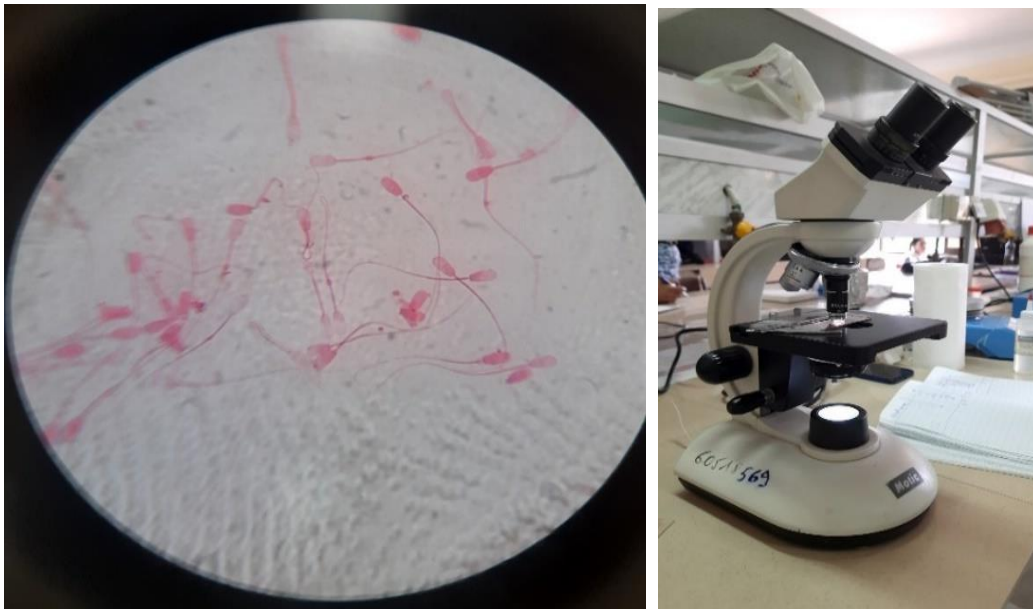


Figure 34 : Une image des spermatozoïdes observés sous un microscope optique au (Grossissement 10 x 100).

6. La peroxydation lipidique (TBARS)

L'objectif de ce test est de calculer la concentration des malondialdéhydes (MDA) qui se trouvent dans la membrane et le cytoplasme de la cellule spermatique et ceci après lavage, sonication et centrifugation de chaque échantillon après congélation-décongélation.

6.1. Le lavage

Après décongélation, les spermatozoïdes de chaque traitement ont été centrifugés à **1500xg** pendant **5 min.** on a obtenu alors un surnageant (le milieu de conservation) et un culot (les spermatozoïdes). Le surnageant été éliminé et remplacé par 01 ml d'eau distillé, répéter deux fois la procédure, la dernière suspension des spermatozoïdes se fait dans 500µl d'eau distillé.

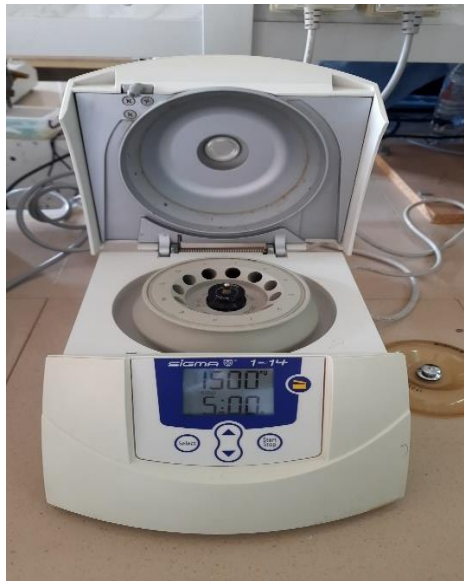


Figure 35 : Une centrifugeuse utilisée pour le lavage des spermatozoïdes.

6.2. La sonication

Après le lavage, on a passé directement à la sonication pour lyser les cellules. On a plongé la sonde de sonication dans l'échantillon avec une amplitude de 20 KHz. La sonication a été répétée trois fois dans un récipient de glace durant 30 secondes à chaque fois avec un intervalle de 30 secondes.



Figure 36 : Un sonicateur utilisé pour la destruction des spermatozoïdes.

6.3. La préparation de la solution TTH

Une solution HCl (N=0.25) a été préparée en mélangeant 4.41ml de HCl (37%) à 95.59ml d'eau distillé dans une éprouvette de 100ml.

Dans un bécher on a mis 0.375g de TBA et 15g TCA avec 100ml de la solution HCl (N=0.25), la préparation a été ensuite mise en agitation pendant 5 minutes. La solution TTH a été conservée à -20°C dans des tubes de 10ml.

6.4. Le dosage des malondialdéhydes

Pour le dosage des malondialdéhydes (MDA), la procédure rapportée par **Buege et Aust (1978)** a été utilisée. 0.1ml de la solution TTH préparée préalablement (acide

Matériel et Méthodes

trichloracétique 15%, poids / volume, acide thiobarbiturique 0.375%, poids / volume, dans de l'acide chlorhydrique 0.25N) été mélangée avec 500 µl du sperme (après lavage et sonication). Le mélange réactionnel été ensuite incubé à 95°C pendant 60 minutes pour induire la libération des MDA. Une couleur rose proportionnelle à la teneur en MDA été observée. Après l'arrêt de la réaction dans de l'eau glacée, les échantillons étaient centrifugés à 18000xg pendant 10 min et le surnageant est récupéré.

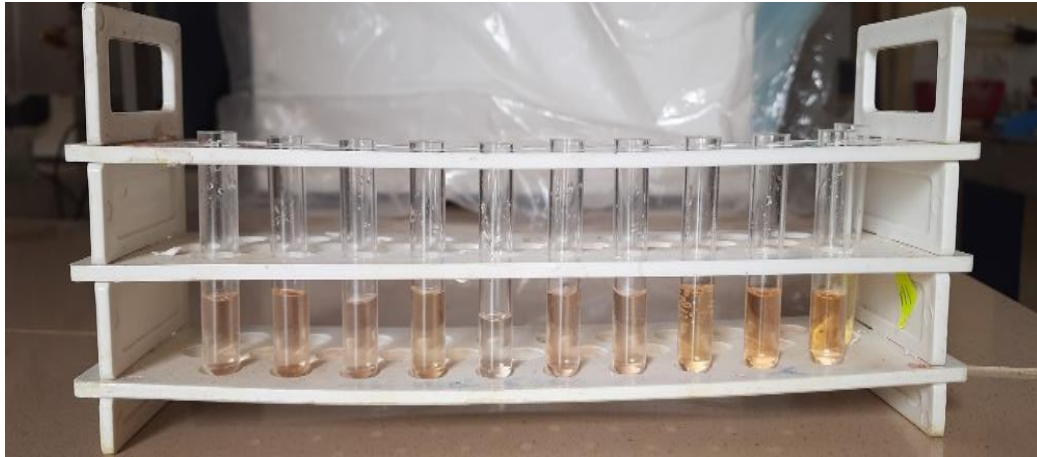


Figure 37 : Une image qui montre la coloration rosâtre du surnageant des différents milieux traités par le test du TBARS.

La teneur des malondialdéhydes (MDA) été mesurée par spectrophotométrie à 532 nm et l'absorption de chaque échantillon été traduite en nmol/ml par l'équation suivante :

$$[] \text{ MDA nm} = \frac{Abs}{1.56} \times 10 \text{ nmol / ml} \quad \text{ou} \quad 10^8 \text{ spz}$$



Figure 38 : Un spectrophotomètre pour la lecture des taux de MDA.

7. Le test sanguin : (la toxicité des milieux sur les globules rouges)

Dans le but de déterminer la toxicité de nos milieux utilisés pour la conservation de notre semence. On a pris la cellule sanguine (globules rouges) comme échantillon.

On a préparé une série de nos milieux : Tris (control), la quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et les extraits phénoliques 10 et 50µg/ml. Pour 900 µl de chaque milieu on a

Matériel et Méthodes

administré un volume de 100 µl de sang, puis on a réalisé des frottis. Ensuite on a passé à l'observation des globules rouges sous microscope optique au grossissement (10 × 40).

8. Test antioxidant DPPH : (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

La méthode DPPH est un test rapide, simple, précis et peu coûteux. Il est largement utilisé pour mesurer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres autrement dit pour le dépistage de l'activité de piégeage des radicaux libres dans de nombreux échantillons où bien être comme donneurs d'hydrogène (Marinova *et al.*, 2011).

Afin d'effectuer le test DPPH, une solution méthanolique de DPPH été préparé (0.3 Mm), une gamme de concentrations croissantes de notre extrait ainsi que de notre témoin positif (acide ascorbique) été préparé dans du méthanol.

Après solubilisation de notre extrait ainsi que la solution l'acide ascorbique tous les deux dans le méthanol. 2,5 ml de notre extrait été ajouté à 1ml de la solution DPPH dans des tubes a essais, mise à l'abri de la lumière pendant 30 minutes, à la fin les mesures de l'absorbance sont faites à 517 nm Le % de radical piégé été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\%RSA(\%) = (Abs\ of\ control - Abs\ of\ sample) / Abs\ of\ control * 100$$

Où, absorbance control : l'absorbance de la solution methanolique de DDPH qui ne doit pas dépasser 0.7, à 0,8 grand max

Absorbance of sample : c'est l'absorbance de notre extrait ou du contrôle positif

NB : si l'absorbance de DDPH est très concentrée ce qui va être le cas procéder à une dilution par exemple (prendre 5ml de solution DPPH dans 10 ml méthanol et mesurer l'absorbance.

L'absorbance été mesuré avec un spectrophotomètre. Commençant par la solution pur de DPPH et calibrer, puis chercher la dilution du control dont l'absorption ne doit pas dépasser 0.7, à 0.8. Après les 30 minutes on a passé les milieux avec les différentes concentrations dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance afin de calculer l'activité de piégeage des radicaux libres des antioxydants de chaque milieu et chaque concentration. Seule l'absorbance la plus élevée de chaque milieu été prise en compte.

9. Etude statistique

Pour faire les tableaux statistiques, nous avons utilisé le logiciel tableur excel et pour étudier les différences significatives on a utilisé le test ANOVA avec le test F schelle à un niveau d'erreur 5%, réaliser les barres d'erreur. La version de stat-view utilisé est de « 5.0. Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA, USA ». L'Histogramme du test DPPH a été réalisé par logiciel excel.

Résultats et Discussion

Résultats

Cette partie sera consacré à la présentation et la discussion de l'ensemble des résultats obtenus lors des différentes expérimentations.

En premier lieu, nous présenteront les résultats de l'optimisation des concentrations de chaque substance utilisée. Par la suite, les résultats relatifs à l'effet des différents milieux de conservation sur le sperme réfrigéré à 04°C seront présenté.

La mobilité de la cellule spermatique est considérée comme une indication de son état physiologique. Il est reconnu que l'analyse informatique CASA offre des données essentielles pour évaluer la qualité du sperme étudié et permet de donner la possibilité de produire des résultats quantitatifs, objectifs, permettant de mesurer l'effet des divers traitements sur la qualité du sperme. L'analyse de la viabilité et du stress oxydatif par le test TBARS offrent également la possibilité d'approfondir l'analyse de la qualité des spermatozoïdes et de rendre compte des divers niveaux d'altération, notamment les attaques radicalaires. Et en termine par le test de DPPH qui démontre le pouvoir de piégeage des ROS de chaque milieu et le test sanguin pour définir le taux de toxicité.

L'analyse du sperme chez les ruminants a été l'objet de cette étude, en particulier chez les caprins et les ovins. Ces deux espèces partagent des caractéristiques communes, mais présentent également des différences spécifiques.

1. Analyse de la motilité spermatique

1.1. La motilité du sperme ovin

▪ La cinétique de mouvement des spermatozoïdes

La vitesse linéaire des spermatozoïdes (VSL) est déterminée en considérant la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite des gamètes. La vitesse moyenne de trajet (VAP) quant à elle considère la distance parcourue par les spermatozoïdes sur un trajet moyen pendant la durée d'observation, alors que la vitesse curviligne (VCL) tient compte de la distance réelle parcourue tout au long du trajectoire, et la fréquence de battement (BCF) représente le nombre de battements de flagelle par unité (Hz).

▪ Tris (control)

L'extenseur tris (à base d'hydroxyméthyl aminométhane) a été utilisé avec succès dans la cryoconservation de sperme et sert de modèle pour l'étude de nouveaux extenseurs, la solution tris a donné de meilleurs résultats que d'autres diluants de sperme (**Silva et al., 2002**).

Résultats et Discussion

1.1.1 Les différentes concentrations de la quercétine

La **figure 39** nous montre que la valeur de la concentration de quercétine 5µg/ml à T0 est plus élevée par rapport aux autres concentrations et au control. On remarque aussi dans les autres temps une disparité de valeurs entre les concentrations des différents milieux.

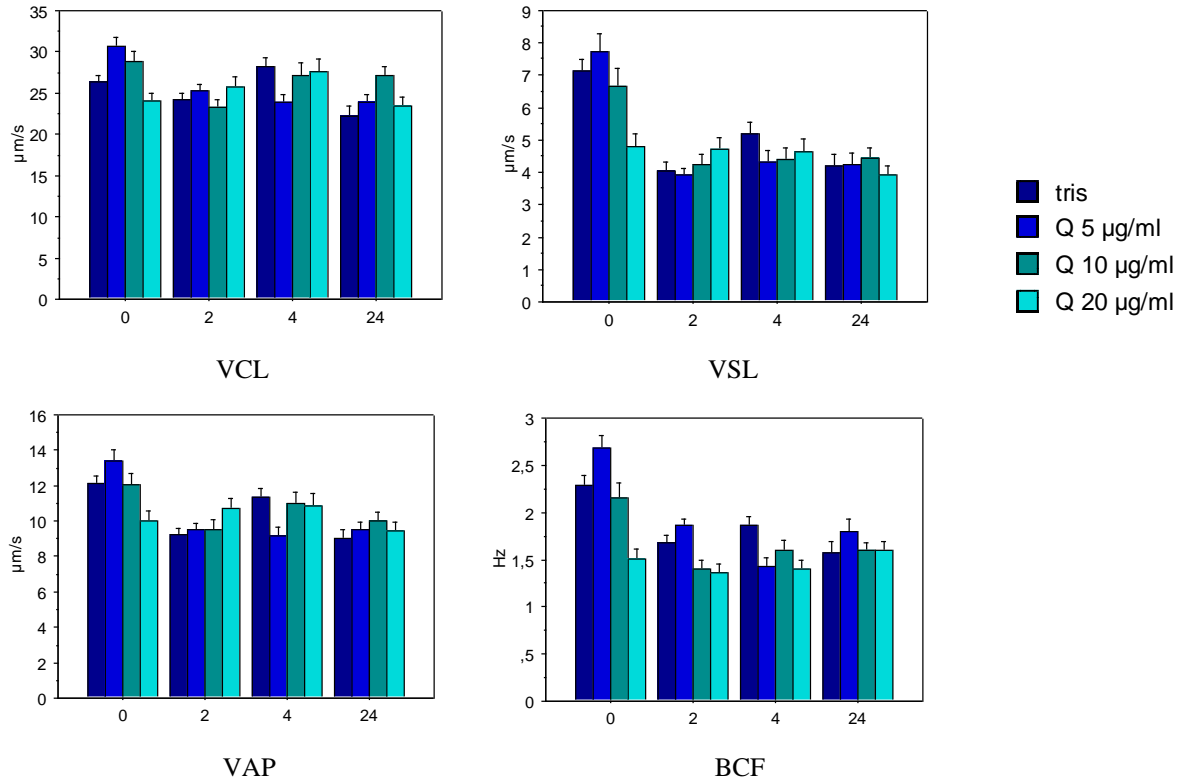
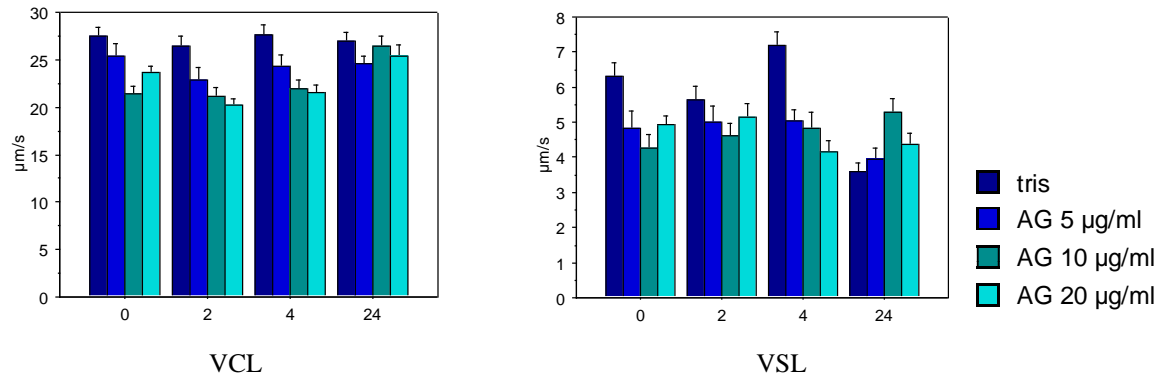


Figure 39 : Histogramme montrant les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de la quercétine à 5, 10 et 20 µg/ml.

1.1.2. Les différentes concentrations de l'acide gallique

La **figure 40** montre que la concentration de 5µg/ml présente la meilleure valeur comparée aux autres concentrations d'acide gallique. Cependant, toutes les concentrations testées ont des valeurs inférieures au contrôle dans les divers temps.



Résultats et Discussion

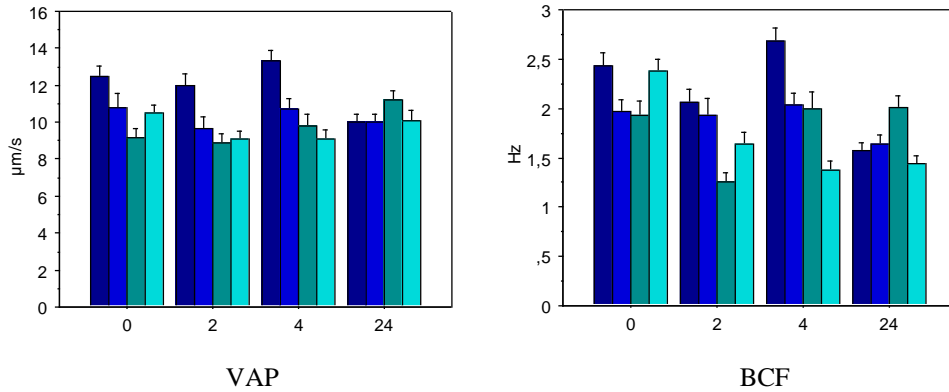


Figure 40 : Histogramme représentant les paramètres de mobilité pendant 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations de l'acide gallique à 5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$.

1.1.3. Les différentes concentrations de l'extrait phénolique

La **figure 41** montre qu'à T0 la valeur de concentration de l'extrait phénolique 50 $\mu\text{g/ml}$ est légèrement élevée comparé aux autres concentrations 100 $\mu\text{g/ml}$ et 200 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, les paramètres de mobilité les plus élevés sont celles du contrôle (Tris). Après 2h de conservation on remarque que les valeurs de chaque concentration se rapproche entre elles et au contrôle.

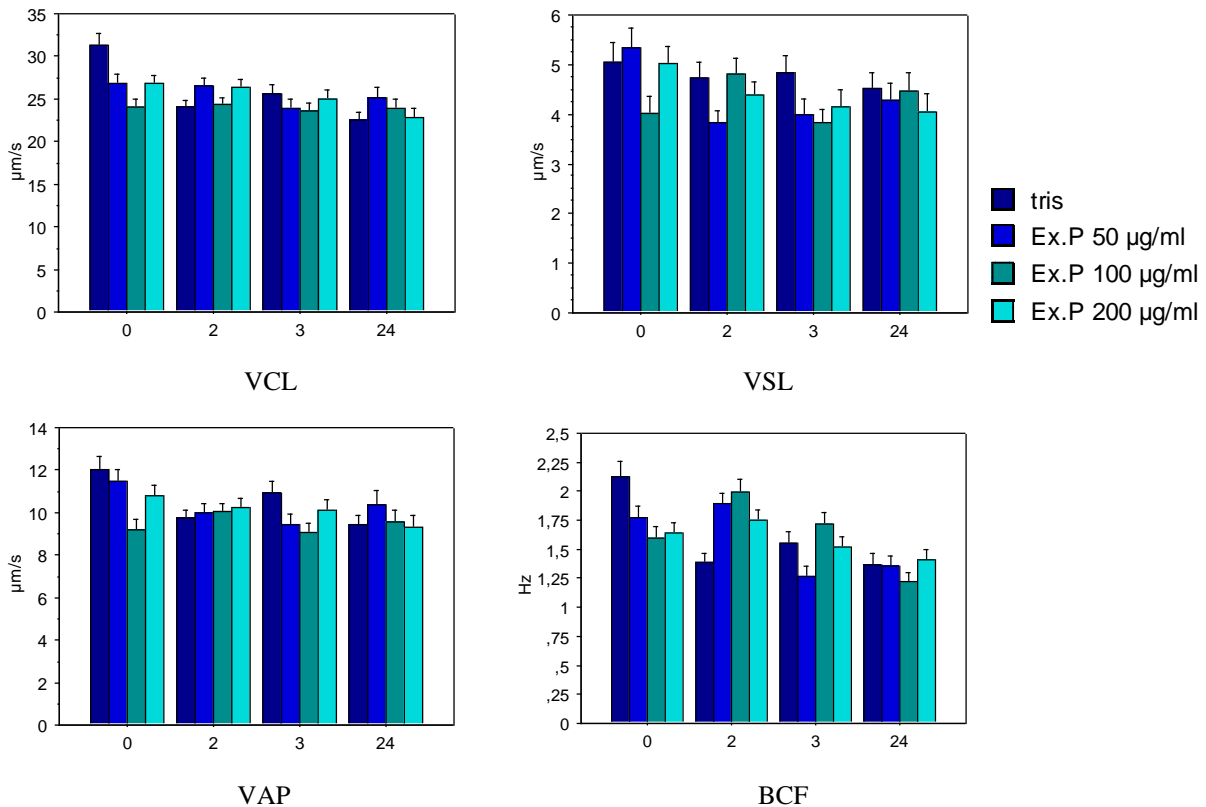


Figure 41 : Histogramme qui montre les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations de l'extrait phénolique à 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

1.1.4. La comparaison entre les différents milieux de conservation

Sur la **figure 42** on peut observer que les valeurs élevées sont celles du contrôle (Tris) à T0, les valeurs de mobilité dans le contrôle exhibent une diminution en fonction du temps comme celle de l'extrait phénolique à 10 μ g/ml. La concentration de 50 μ g/ml de l'extrait phénolique présente la meilleure valeur d'environ 8 μ m/s suivie par la quercétine d'environ 6,2 μ m/s après 2h de conservation. Par ailleurs, l'acide gallique présente la valeur la plus faible par rapport aux autres milieux tout au long de l'analyse.

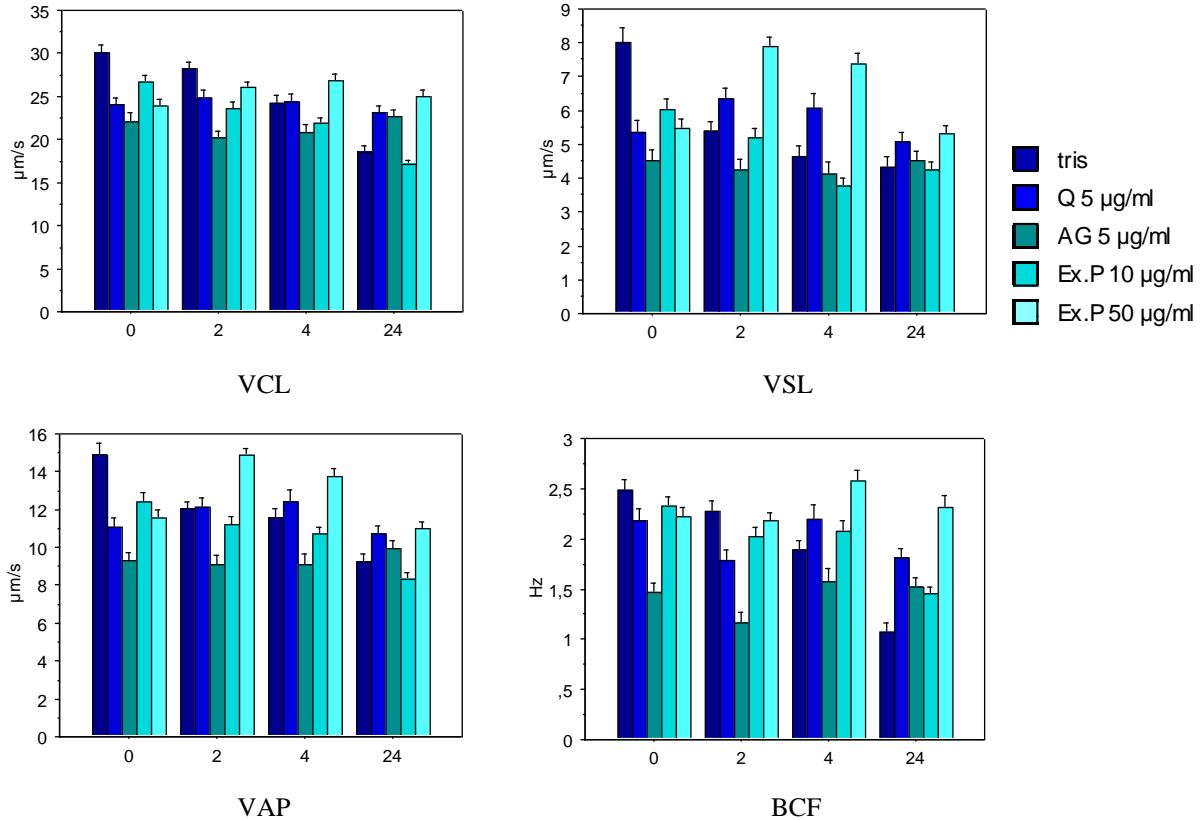


Figure 42 : Histogramme qui présente les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5 μ g/ml, acide gallique 5 μ g/ml et l'extrait phénolique 10 et 50 μ g/ml).

1.2. La motilité du sperme du caprin

1.2.1. La comparaison entre les différents milieux de conservation

Dans la **figure 43** on observe une large différence dans les paramètres de motilité qui ont des valeurs très élevées chez le caprin comparant à celles de l'ovin. Après, c'est surtout dans le contrôle (Tris) et l'extrait phénolique 10 μ g/ml qui maintiennent le plus de mobilité à T0. Une diminution importante de la motilité est observée après 2h de conservation à l'exception de l'extrait phénolique à 50 μ g/ml qui garde une certaine stabilité. L'acide gallique et la quercétine montrent des valeurs faibles de mobilité tout au long de la conservation.

Résultats et Discussion

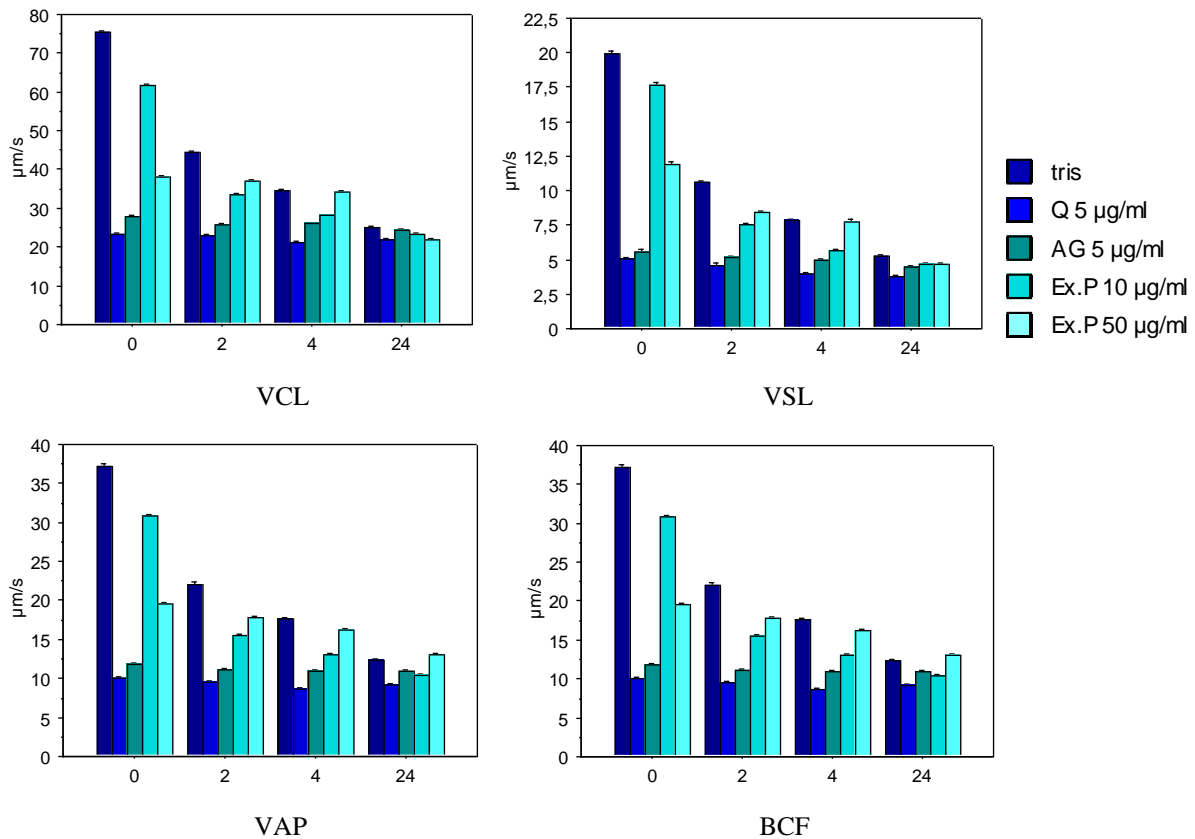


Figure 43 : Histogramme montrant les paramètres de mobilité à 0, 2, 4 et 24h de réfrigération à 04°C du sperme de caprin dans différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5μg/ml, acide gallique 5μg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50μg/ml).

1.2.2. Le pourcentage de mobilité massale et progressive

Les valeurs du pourcentage des spermatozoïdes mobile et la motilité progressive des spermatozoïdes sont présentées dans la **figure 44**. Les résultats de la mobilité progressive montrent qu'à T0 le Tris présente le meilleur pourcentage, suivi de l'extrait phénolique à 10μg/ml puis l'extrait phénolique à 50μg/ml, la quercétine montre un très faible pourcentage dans tous les temps. Après 2h de réfrigération, on observe une diminution remarquable dans tous les milieux et presque inexistante après 24h, à l'exception de l'acide gallique qui montre une augmentation progressive à T2 et T4.

Concernant le pourcentage des spermatozoïdes mobile, on observe que le Tris présente un pourcentage très élevé qui est de 75% à T0, puis ça diminue au fil du temps. Juste après le control, les meilleures valeurs sont celles de l'extrait phénolique 10μg/ml qui diminue à son tour après 2h de conservation. A T2 et T4 l'extrait phénolique à 50 μg/ml exhibe le meilleur pourcentage après le Tris. La quercétine est le plus faible pourcentage dépassé légèrement par l'acide gallique, ce dernier présente une augmentation de la mobilité totale au fil du temps, pour devenir le meilleur pourcentage à 24h de conservation.

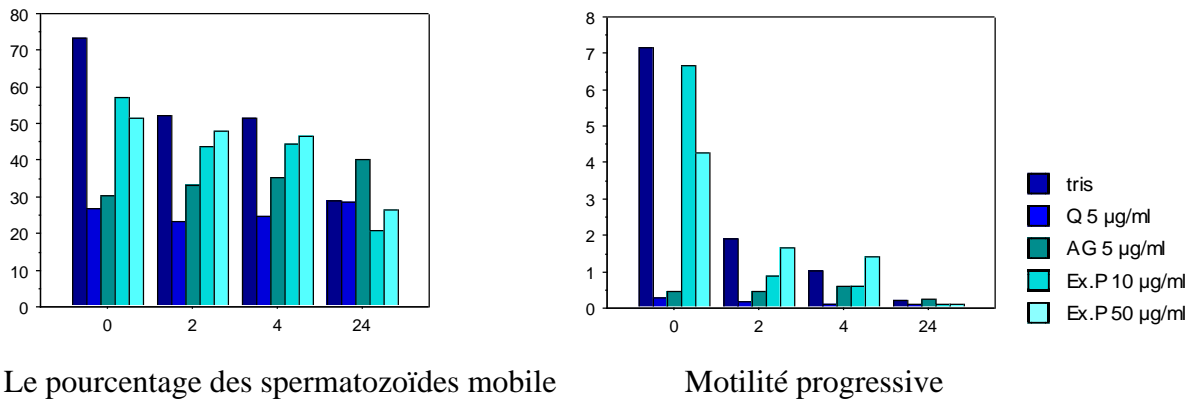


Figure 44 : Histogramme montrant le pourcentage des spermatozoïdes mobile et la motilité progressive du sperme de caprin conservé dans différents traitements (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

2. Analyse de la viabilité du spermatique

Dans cette étude, on a réalisé une analyse de la viabilité des spermatozoïdes après une période de conservation de 24 heures, pour déterminer si les spermatozoïdes sont vivants ou morts en fonction de leur coloration.

2.1. La viabilité du sperme ovin

2.1.1. Les différentes concentrations de la quercétine

La **figure 45** nous montre une disparité très notable de viabilité entre les différents milieux, on remarque qu'il y a plus de viabilité dans la quercétine 5µg/ml avec un pourcentage d'environ 34% et presque inexistante à la concentration 20µg/ml. La concentration de 10 µg/ml est presque similaire au Tris qui est d'environ 10%.

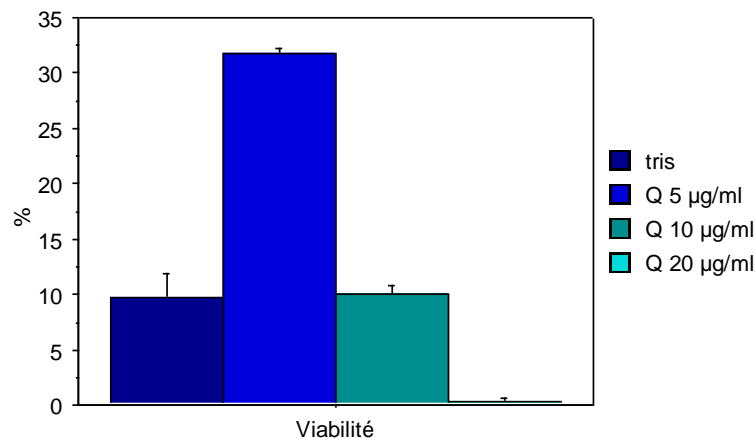


Figure 45 : Histogramme qui montre le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de la quercétine (5, 10 et 20 µg/ml).

2.1.2. Les différentes concentrations de l'acide gallique

Ce que nous pouvons le constater sur la **figure 46**, le pourcentage des spermatozoïdes vivant est élevé au contrôle (Tris) avec un pourcentage d'environ 9% par rapport aux autres milieux de l'acide gallique, la concentration 20µg/ml est spermicide avec 0% de viabilité.

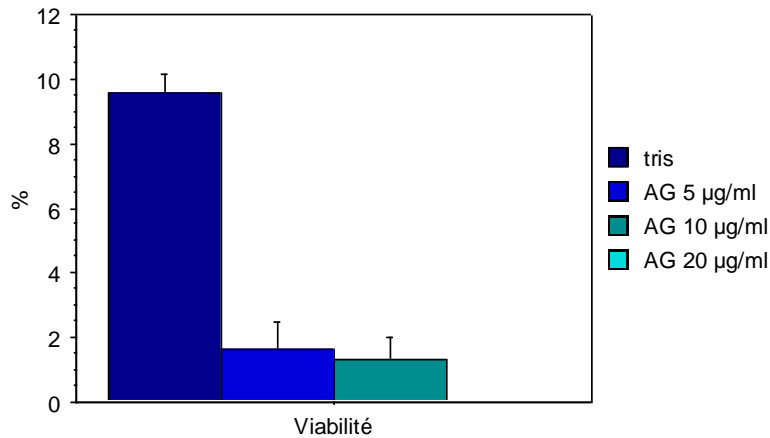


Figure 46 : Histogramme qui montre le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de l'acide gallique (5, 10 et 20 µg/ml).

2.1.3. Les différentes concentrations de l'extrait phénolique

On peut remarquer dans la **figure 47** que le pourcentage de viabilité est très bas dans tous les milieux à l'exception de la concentration 50µg/ml qui révèle une légère augmentation environ 11%, plus élevé que celle du Tris.

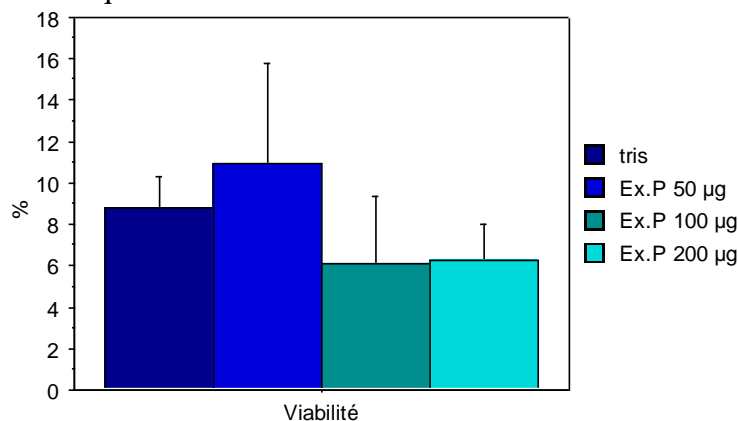


Figure 47 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations de l'extrait phénolique (50, 100 et 200 µg/ml).

2.1.4. La comparaison de viabilité entre les différents milieux de conservation

On voit dans la **figure 48** que le pourcentage des vivants est toujours très bas et presque inexistant dans tous les milieux utilisés, sauf pour l'extrait phénolique 50µg/ml qui présente une mince augmentation, avec un pourcentage d'environ 11%.

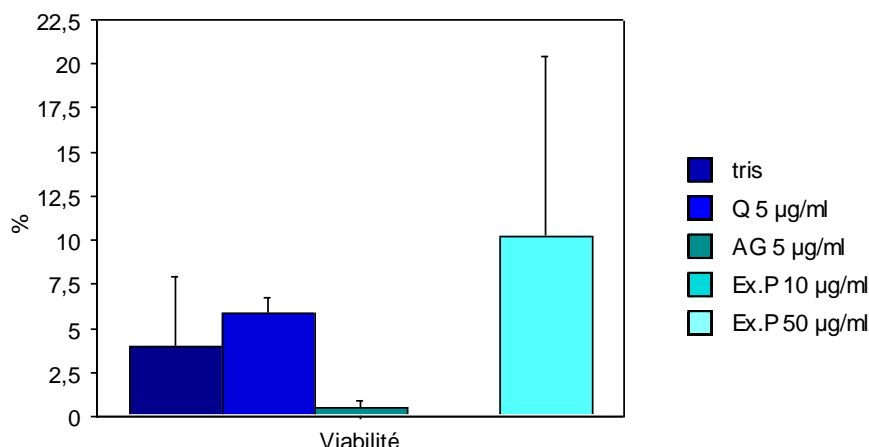


Figure 48 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme ovin dans les différentes concentrations des milieux de conservation (tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

2.2. La viabilité du sperme caprin

2.2.1. La comparaison de viabilité entre les différents milieux de conservation

Dans la **figure 49** on remarque une certaine augmentation en pourcentage de viabilité chez le caprin par rapport à l'ovin, et la valeur maximale est celle de la quercétine 5µg/ml avec un pourcentage d'environ 43%. Ce qui veut dire qu'il y a une viabilité très abondante chez les spermatozoïdes du caprin que chez l'ovin.

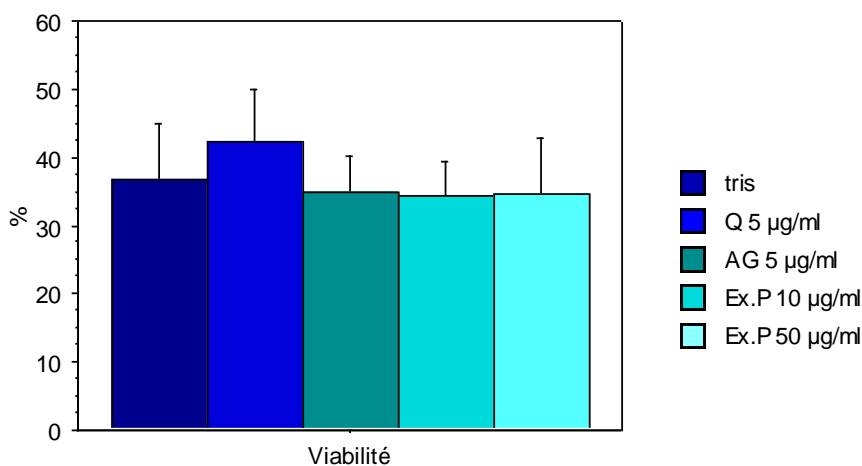


Figure 49 : Histogramme présentant le pourcentage de viabilité après 24h de réfrigération à 04°C du sperme du caprin dans les différentes concentrations des milieux de conservation (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

3. Test de peroxydation lipidique (TBARS)

▪ Détermination de la peroxydation lipidique (LPO)

Le test TBARS mesure principalement le malondialdéhyde (MDA), un produit final de la peroxydation lipidique. Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un composé coloré mesurable par spectrophotométrie. La concentration du complexe MDA+TBA a été mesurée à 532 nm. La quantité d'absorption de lumière du mélange réactionnel se fait mesurée après centrifugation (**Jumintono et al., 2021**).

3.1. Test de peroxydation lipidique chez l'ovine

La **figure 50** présente un décalage de distribution du MDA dans les différents milieux de conservation qui peut indiquer des valeurs élevées surtout dans la quercétine 5µg/ml avec une valeur (d'environ 1,4 nmol/ml) et les deux milieux de l'extrait phénolique 10 et 50 µg/ml avec des valeurs d'environ 1,12 nmol/ml et 0,9 nmol/ml ce qui désigne un taux élevé du stress oxydatif, mais comparativement au contrôle, le taux du MDA sont significativement plus élevés. L'acide gallique donne les mêmes valeurs comparées au contrôle (Tris).

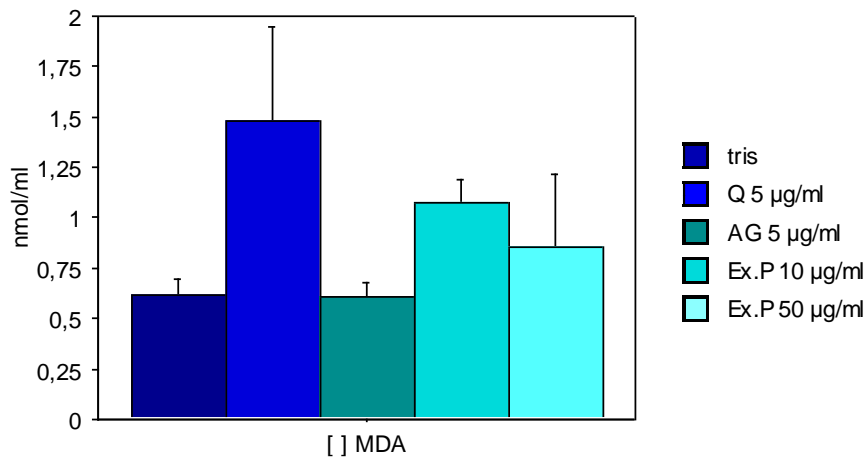


Figure 50 : Histogramme présentant le taux de la peroxydation des lipides membranaires (MDA) après la décongélation du sperme ovine dans les différents traitements (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

3.2. Test de peroxydation lipidique chez le caprin

La **figure 51** montre une convergence de distribution des taux de MDA dans les différents milieux de conservation avec des valeurs entre 0,9 jusqu'à 1 nmol/ml dans tous les milieux ce qui indique également un faible stress oxydatif.

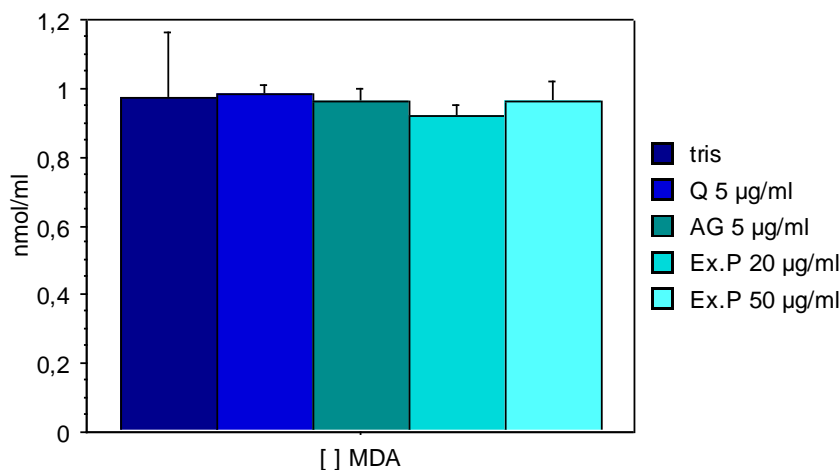


Figure 51 : Histogramme présentant le taux de la peroxydation des lipides membranaires (MDA) après la décongélation du sperme de caprin dans les différents traitements (tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

4. Test de DPPH

▪ Le DPPH- (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH est l'un des rares radicaux azotés organiques stables. Une solution de DPPH• dans le méthanol a une couleur violette. Lorsqu'il réagit avec un antioxydant, le radical DPPH• est converti en DPPH, et sa couleur passe du violet au jaune. L'effet antioxydant peut être facilement évalué en mesurant sa capacité à réduire l'absorption de la lumière à une longueur d'onde de 517 nm (Martysiak-Żurowska et al., 2012).

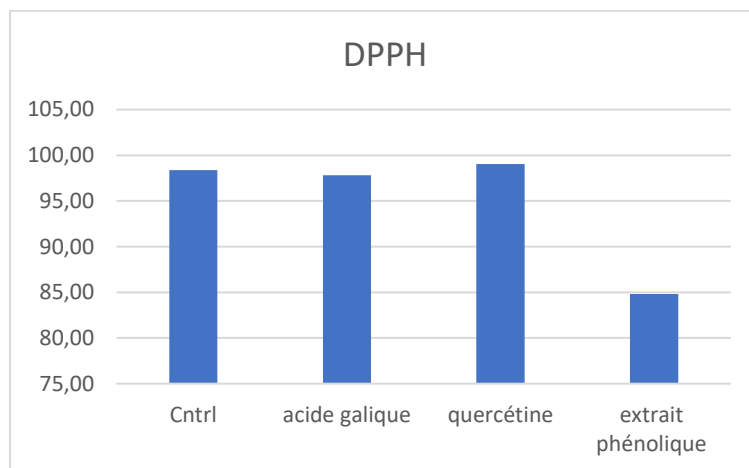


Figure 52 : Histogramme présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH dans les différents milieux ((Cntrl : témoin positif (vitamine C), quercétine, acide gallique et l'extrait phénolique).

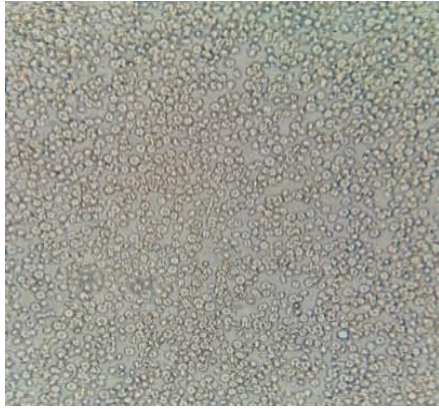
La **figure 52** montre que la quercétine a eu un taux élevé de piégeage des radicaux libres par rapport aux autres milieux avec un pourcentage de 99,04% ce qui indique une activité antioxydante plus élevée que celle du contrôle positif (Vitamine C) qui donne une valeur de 98,36%. L'acide gallique montre également une valeur élevée de 97,81. Même si la valeur de 84,82 de l'extrait phénolique est élevée mais reste moins importante par rapport aux autres milieux.

5. Le test sanguin (la toxicité des milieux sur les globules rouges)

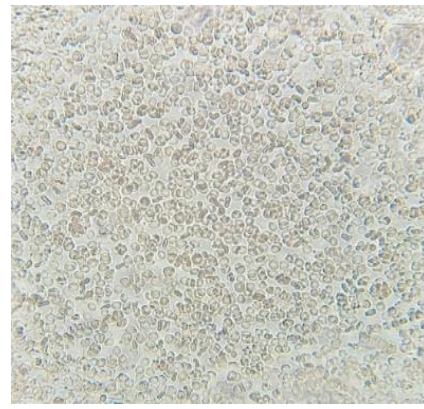
▪ Les tests sanguins de toxicité

Les tests sanguins de toxicité évaluent les effets potentiellement nocifs de substances ou de milieux sur les cellules du sang. Ils permettent de : mesurer la viabilité cellulaire, détecter des dommages à l'ADN, évaluer les changements morphologiques et analyser les marqueurs de stress oxydatif (Dinardo et al., 2019).

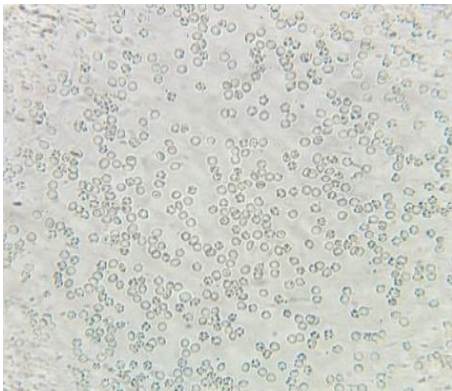
Résultats et Discussion



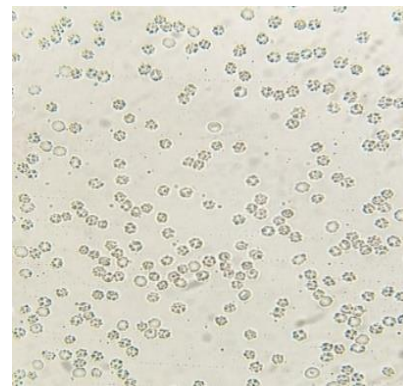
Tris



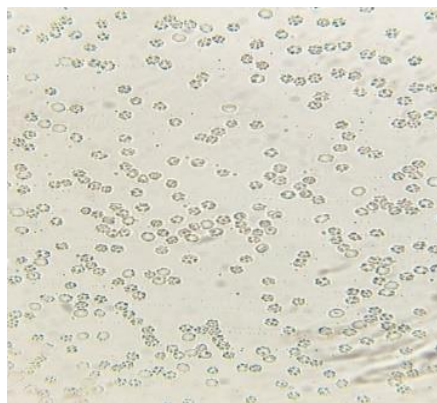
Quercétine 5µg/ml



Acide gallique 5µg/ml



Ex Phénolique 10µg/ml



Ex Phénolique 50µg/ml

Figure 53 : Des images des cellules sanguines traitées par les différents milieux de conservations étudié (Tris, quercétine 5µg/ml, acide gallique 5µg/ml et l'extrait phénolique 10 et 50µg/ml).

Dans les différentes figures si dessus on peut observer que le Tris a détruit presque toutes les membranes des cellules sanguines ce qui veut dire que le Tris est toxique pour les cellules sanguines. Par contre, la quercétine à garder presque toutes les cellules sanguines saines ce qui indique que la quercétine est bénéfique pour eux. En revanche pour l'acide gallique, on observe que la moitié des cellules sanguines sont restées telles qu'elles sont, tandis que l'autre moitié des cellules sanguines sont détruites. L'extrait phénolique pour les deux concentrations

Résultats et Discussion

10 et 50µg/ml on trouve que presque toutes les cellules sont détruites, concluant que ces concentration l'extrait phénolique est néfaste pour les cellules sanguines.

Discussion

La conservation des spermatozoïdes entraîne différents dégâts sur les cellules spermatique en particulier par le stress oxydatif. Il est donc essentiel d'améliorer des milieux de conservation dont l'objectif sera de maintenir la qualité des divers paramètres des spermatozoïdes tels que la motilité et la viabilité du sperme des petits ruminants et de garantir leur protection contre le stress oxydatif pendant la réfrigération à 04°C. Dans ce mémoire l'extrait phénolique de la laitue sauvage (*Lactuca virosa*) et la quercétine ainsi que l'acide gallique ont été étudiés pour démontrer leur impact sur le sperme après conservation à 04°C.

Le control Tris montre les meilleurs résultats initiaux pour la motilité progressive et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Cela est cohérent avec les études de **Salamon et al., (2000)** qui ont souligné l'efficacité du Tris comme diluant standard pour la conservation du sperme de bélier, notant sa capacité à maintenir la motilité et la viabilité des spermatozoïdes pendant le stockage.

Une faible performance de la quercétine 5µg/ml en ce qui concerne la motilité des spermatozoïdes chez le caprin, contrairement aux spermatozoïdes de l'ovin qui montrent une mobilité élevée comparé au contrôle. Cela peut être expliqué par les concentrations utilisé, et la spécificité de l'espèce.

En outre, nos résultats ont montré que la quercétine a préservé le taux de viabilité des spermatozoïdes le plus élevé et a eu l'effet antioxydant le plus élevé par rapport aux autres milieux dans le test DPPH avec une valeur de 99,04%. Mais malgré cela, la quercétine montre des taux de MDA supérieures comparé aux autres milieux, supposant qu'un stress oxydatif est instauré en intracellulaire. Ceci nous mène à conclure que la quercétine n'a pas pu jouer son effet antioxydant à l'intérieur de la cellule spermatique à cause de sa faible solubilité dans le milieu de conservation, donc une faible perméabilité cellulaire, et son effet antioxydant est limité en extracellulaire.

L'acide gallique, connu pour ses propriétés antioxydantes (**Yilmaz et Toledo, 2004**), a montré un effet modéré dans cette étude contrairement à l'effet observé dans l'étude de **Bucak et al., (2015)**. Il a montré également des effets moyennes sur la viabilité et la motilité des spermatozoïdes. Cette différence pourrait s'expliquer par les mécanismes d'action spécifiques de chaque antioxydant et leur interaction avec les membranes des spermatozoïdes de chaque espèce. De plus, dans cette étude, une concentration de 10µg/ml a montré un effet spermicide. Cela affirme les conclusions d'**Agarwal et al., (2014)**, qui ont montré que des concentrations excessives d'antioxydants peuvent parfois avoir des effets différents sur les fonctions spermatiques, soulignant l'importance de trouver une concentration optimale.

L'extrait phénolique à 10µg/ml et celui à 50µg/ml montrent des résultats similaires au control (Tris) dans les différents tests, à l'exception de mobilité où la concentration de 50µg/ml a eu un impact plus élevé par rapport à tous les autres milieux, notamment chez l'ovin. L'extrait phénolique de *Lactuca virosa*, particulièrement à 50 µg/ml, possède de puissantes propriétés antioxydantes. Ses composés phénoliques peuvent neutraliser les radicaux libres et réduisant ainsi le stress oxydatif cellulaire.

Résultats et Discussion

Cette étude ouvre des perspectives intéressantes pour l'amélioration des techniques de conservation du sperme en utilisant des substances naturelles. Cependant, il est essentiel de mener des études supplémentaires afin de confirmer ces résultats et explorer leur application pratique dans différents contextes.

L'utilisation de molécules cages, permet d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité de la quercétine. Cette méthode consiste à encapsuler la quercétine dans des complexes d'inclusion, augmentant ainsi sa solubilité dans l'eau et la protégeant contre la dégradation. L'optimisation des concentrations et le développement de nouvelles structures de cages moléculaires sont des axes de recherche prometteurs pour améliorer l'efficacité de cette approche dans les applications pharmaceutiques et nutraceutiques.

Conclusion

Conclusion

Le présent mémoire avait pour objectif d'évaluer et examiner l'effet et l'efficacité des extraits phénoliques de la plante « *Lactuca virosa* » sur le maintien de la qualité des différentes caractéristiques du sperme des petits ruminants et s'ils peuvent améliorer la motilité, la viabilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes après conservation à 04°C.

Les résultats ont montré que les meilleurs paramètres de la cinétique de mobilité des spermatozoïdes et les pourcentages des spermatozoïdes progressifs les plus élevés sont recueillis dans le milieu de base (Tris), et ce qui fait du control un bon milieu de conservation.

Les données collectées ont révélé également que la quercétine 5µg/ml à donner un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes. Tandis qu'elle à présenter un effet positif sur la viabilité et un taux élevé de piégeage des radicaux libres via le test DPPH se qui fait d'elle un mécanisme de protection pour les spermatozoïdes contre les dommages lors de la réfrigération.

Les observations réalisées ont montré aussi que l'acide gallique 5µg/ml déminue la mobilité des spermatozoïdes car il rend ces derniers inactifs. Et à des concentrations de 20µg/ml il présente un taux de mortalité à 100% après 24h de conservation, ce qui fait de ce composé un spermicide.

Dans l'évaluation de l'effet des extraits phénoliques. Des variations d'efficacité ont été notées et que ces composés bioactifs doivent être utilisés avec des concentrations adéquates et convenable, car les concentrations de l'extrait phénolique ont montré que celle de 50µg /ml et un peu meilleure que la concentration 10µg/ml dans les différents tests étudiés. Donc supposant que si on optimise encore la concentration de l'extrait on peut obtenir des résultats meilleurs que celles qui sont déjà faites.

Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour l'amélioration des techniques de conservation du sperme, et il serait intéressant d'approfondir notre étude afin de :

- Poursuivre les optimisations afin de trouver la concentration adéquates des différents composés bioactive pour un meilleur résultat sur les paramètres spermatiques.
- Etudier l'effet de ces milieux sur le sperme de différentes espèces *in vitro* et *in vivo*.
- L'utilisation des dispositives pour l'amélioration de la solubilité de ces composés bioactives dans les milieux de conservation.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Abidet, A., Gherraf, N., Kalla, A., Zellagui, A., & Fellah, O. (2020). Assessment of total phenolics and flavonoids, and evaluation of scavenging activity of the aerial parts of *Verbascum thapsus* L. and *Lactuca virosa* L. grown in Algeria. *Int J. Chem Biochem Sci*, 17, 86-92.

A.EL-Khawagah. M.kandiel. H.samir.2020.Effect of Quercetin Supplementation in Extender on Sperm Kinematics, Extracellular Enzymes Release, and Oxidative Stress of Egyptian Buffalo Bulls Frozen-Thawed Semen.

Afonso, V.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P, and Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène est superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. Reactive oxygen species and superoxide dismutases : role in joint diseases. *Revue de Rhumatisme*, 74 : 636-643.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1-17.

Ahmad, E., Naseer, Z., & Aksoy, M. (2021). Glutathione supplementation in semen extender improves rabbit sperm attributes during refrigeration. *World Rabbit Science*, 29(2), 81-86.

Alahmar, A. T. (2019). Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. *Journal of human reproductive sciences*, 12(1), 4-18.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200-214.

Albert et Jean., 2001. « Biologie du développement » .5^{ème} édition de l'abrégé.

Alseekh, S., Ofner, I., Liu, Z., Osorio, S., Vallarino, J., Last, R. L., . . . Fernie, A. R. (2020). Quantitative trait loci analysis of seed-specialized metabolites reveals seed-specific flavonols and differential regulation of glycoalkaloid content in tomato. *Plant Journal*, 103 (6), 2007-2024.

Amann RP, Katz DF. (2004). Reflections of CASA after 25 years. *J Androl*. 25:317–25.

Références Bibliographiques

Amber, K., Shiman, M. and Badiavas, E. (2013) 'The Use of Antioxidants in Radiotherapy Induced Skin Toxicity', *Integrative Cancer Therapies*, 13(1):38-45.

Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N. and Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112 (2): 303-309.

Avila, F. W., Sánchez-López, J. A., McGlaughon, J. L., Raman, S., Wolfner, M. F., & Heifetz, Y. (2016). Nature and functions of glands and ducts in the *Drosophila* reproductive tract. *Extracellular composite matrices in arthropods*, 411-444.

Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*, 5(35), 27540-27557.

Badri, D. V., Loyola-Vargas, V. M., Broeckling, C. D., De-la-Pena, C., Jasinski, M., Santelia, D., . . . Vivanco, J. M. (2008). Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology*, 146 (2), 762-771.

Balhorn, R., The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007, 8, 227.

Bansal A.K., Bilaspuri G.S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet. Med. Intl.*, Article ID 686137.

Barone R. (1978). Anatomie comparée des mam-mifères domestiques. Tome 3: Splanchnologie, fœtus et ses annexes. Fascicule III. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes. Péritoine et topographie abdominale. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 945 pages.

Barouki, R ; Morel, Y. (2004). Oxidative stress and gene expression. *J Soc Biol.* 195: 82-377.

Barrionuevo F, Burgos M, Jiménez R. Origin and function of embryonic Sertoli cells. *Biomol Concepts.* 2011 Dec 01;2(6):537-47.

Barth AD, Oko RG. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.* Ames, IA: Iowa State University Press; 1989.

Références Bibliographiques

BELHAMITI, T. B. (2007). Variations de la production spermatique, insémination artificielle et diagnostic de la gestation par échographie chez les caprins de la race locale dans la région de tiaret (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun-Tiaret).

Belkheiri, N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de doctorat. Université Toulouse III – Paul Sabatier, France.

Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, 82(4), 390-393.

Bidie, A. P., N'guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1-12.

Blaise, G., Gauvin, D., Gangal, M. and Authier, S. (2005) 'Nitric oxide, cell signaling and cell death', *Toxicology*, 208(2):177-192.

Boukhliq, R., Allali, K. E., & Tibary, A. (2018). Gross anatomy and ultrasonographic examination of the reproductive organs in rams and bucks. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*.

Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., ... & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545-552.

Cacique, A. P., Barbosa, É. S., De Pinho, G. P., & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência E Agrotecnologia*, 44.

Câmara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F., & Guerra, M. M. P. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), 342-350.

Chandra, G., Aggarwal, A., Singh, A., Singh, A. K., Kumar, M., Kushwaha, R., & Singh, Y. K. (2012). Oxidative stress in sperm biology-a review. *Agricultural Reviews*, 33(1), 54-61.

Références Bibliographiques

Chłopik, A., & Wysokińska, A. (2020). Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in domestic animals*, 55(2), 113-126.

Choho, M. F., Kporou, K. E., Ouattara, S., Gbogbo, M., Kroa, E., Kouakou, G. S., & Djaman, A. J. (2022). Caractérisation phytochimique et activité antioxydante d'un médicament à base de plantes «Daoutra Epigastro» utilisé en tradithérapie des gastrites en Côte d'Ivoire. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 21(1), 40-49.

Christensen, J. M., & Tiersch, T. R. (1996). Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(3), 340-346.

Corcy J-C 1991. «La chèvre». La maison rustique ed paris p256 p143, 144.

Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free radical biology & medicine*, 95, 27-42.

Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(6), 975-991.

Del Prete, C., Ciani, F., Tafuri, S., Pasolini, M. P., Della Valle, G., Palumbo, V., ... Cocchia, N. (2018). Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. *Journal of Veterinary Science*, 19(5), 667-675.

Derbel, S., & Ghedira, K. (2005). Phytonutriments and their impact on health. *Phytothérapie*, 3, 28-34.

Derridj, A., Ghemouri, G., Meddour, R., & Meddour-Sahar, O. (2010). APPROCHE ETHNOBOTANIQUE DES PLANTES MEDICINALES EN KABYLIE (WILIYA DE TIZI OUZOU, ALGERIE). *Acta horticulture*, (853). 425.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 18 juin 1999;65(4):337-53.

Références Bibliographiques

Dias, E. A. R., Campanholi, S. P., Rossi, G. F., Dell'Aqua, C. D. P. F., Junior, J. A. D. A., Papa, F. O., ... & Monteiro, F. M. (2018). Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Animal reproduction science*, 195, 102-111.

Dias, M. C., Pinto, D., & Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 26(17), 5377.

Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae). PhD. of the University Bamako, Mali, 38-47.

Dinardo, C. L., dos Santos, N. C., Annichino-Bizzacchi, J. M., & Costa, F. F. (2019). Laboratory hematology in the diagnosis and monitoring of hematologic diseases: approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Donnet, É. (2023). Affections des taureaux de centres d'insémination artificielle et répercussion sur la production de semence: étude rétrospective dans le cadre de l'unité de sélection auriva (Doctoral dissertation).

Dorado, J., Rodríguez, I., & Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68(2), 168-177.

Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993. « Physiologie de la reproduction ». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire.

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47–95.

Dwyer, J. T., & Peterson, J. J. (2002). Measuring flavonoid intake: need for advanced tools. *Public health nutrition*, 5(6a), 925-930.

Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3, 108-120.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.

Références Bibliographiques

Fertet, A., Graindorge, S., Koechler, S., De Boer, G., Guilloteau-Fonteny, E., & Gualberto, J. (2021). Sequence of the Mitochondrial Genome of *Lactuca virosa* Suggests an Unexpected Role in *Lactuca sativa*'s Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Foyer, C. (2005) 'Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses', *THE PLANT CELL ONLINE*, 17(7): 1866-1875.

Gardès-Albert, A. M.; Bonnefont, D. R.; Abedinzadeh, Z, and Jore. D. (2003). Espèce réactive de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique*, 91-95.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Iuliis GN (2020). Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Animal Reproduction Science*, volume 220.

Gofur, M. R. (2015). Anatomy and histomorphometry of accessory reproductive glands of the Black Bengal buck. *Eur. J. Anat*, 19(2), 171-178.

Goudable, J, and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11: 115-120.

Gromek, D., Kisiel, W., Klodzińska, A., & Chojnacka-Wójcik, E. (1992). Biologically active preparations from *Lactuca virosa* L. *Phytotherapy Research*, 6(5), 285-287.

Guérin, Y., Locatelli, Y., Comizolli, P., Mauget, R., Mermillod, P., Legendre, X., ... & Dacheux, J. L. (2003). Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. *Les actes du BRG*, 4, 173-183.

Guignard, M., & Spielberg, K. (1979). A direct dual method for the mixed plant location problem with some side constraints. *Mathematical programming*, 17, 198-228.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141: 312-322.

Références Bibliographiques

Halliwell, B.; Clement, M.V, and Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxid in the human body. Federation of European Biochemical Societies, 486 : 10-13.

Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S. T., Lohmann, C. H., & Singh, G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2073-2087.

Ifeanyi, O. E. (2018). A review on free radicals and antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci*, 4(2), 123-133.

Ji LL, Yeo D. Oxidative stress: an evolving definition. *Fac Rev*. 2021 Feb 9;10:13.

Jumintono J, Alkubaisy S, Yánez Silva D, Singh K, Turki Jalil A, Mutia Syarifah S, Fakri Mustafa Y, Mikolaychik I, Morozova L, Derkho. Effect of Cystamine on Sperm and Antioxidant Parameters of Ram Semen Stored at 4 °C for 50 Hours. *Arch Razi Inst*. 2021 Oct 31;76(4):1115-1123.

Justine, P.; Odile, P, and Carole P. (2005). Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat Université Paul-Sabatier de Toulouse. P : 14.

Karunakaran, M., Dhali, A., Mech, A., Khate, K., Rajkhowa, C., & Mishra, D. P. (2007). Preservation of mithun (*Bos frontalis*) semen at refrigeration temperature. *Animal reproduction science*, 101(3-4), 257-264.

Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34.

Koehler-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 20 : 165-177.

Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: A versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2 (2), 20-35.

Références Bibliographiques

Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.* 2003, 1, 91–99.

Lima, D. B. C., Silva, T. F. P., Cortez, A. A., Pinto, J. N., Magalhães, F. F., Caldini, B. N., & Silva, L. D. M. (2016). Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 873-881.

Lindqvist, K. (1960). On the origin of cultivated lettuce. *Hereditas* 46, 319-350.

Lu, J.C.; Huang, Y.F.; Lu, N.Q. Computer-aided sperm analysis: Past, present and future. *Andrologia* 2014, 46, 329–338.

Lucio, C. F., Brito, M. M., Angrimani, D. S. R., Belaz, K. R. A., Morais, D., Zampieri, D., ... Vannucchi, C. I. (2017). Lipid composition of canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(Suppl 2), 208–213.

Mahajan, M., & Yadav, S. K. (2013). Effect of quercetin and epicatechin on the transcript expression and activity of antioxidant enzymes in tobacco seedlings. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3 (1), 81-90.

Mahmud, M. A., Onu, J., Shehu, S. A., Umaru, A., Danmaigoro, A., & Atabo, M. S. (2015). Morphological studies on epididymis and vas deferens of one-humped camel bull (*Camelus dromedarius*), Uda ram and Red Sokoto buck. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 3(5), 65-71.

Makarova, N. P., Romanov, Y. A., Dolgushina, N. V., Parker, M. M., & Krasnyi, A. M. (2018). Comparative analysis of the expression of glutathione peroxidase and glutathione reductase genes in human sperm after cryopreservation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165, 166-170.

Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11-24.

Références Bibliographiques

Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 11(1), 83-89.

Massanyi, P., Chrenek, P., Lukáč, N., Makarevich, A., Ostro, A., Živčák, J., & Bulla, J. (2008). Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak Journal of Animal Science*, 41(2), 60-66.

Massion, P., Preiser, J. C., & Balligand, J. L. (2002). Les espèces réactives de l'azote: bénéfiques ou délétères?. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 248-252.

Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19 (10).

Mikel, M. A. (2007). Genealogy of contemporary north american lettuce. *HortScience* 42, 489–493.

Moce E, Blanch E, Tomas C, Graham JK, 2010: Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim* 45(Suppl 2), 57–66.

Mocé, E., Lozano-Palazón, S. A., del Mar Martínez-Granell, M., Mocé, M. L., & Gómez, E. A. (2020). Effect of the refrigeration system on in vitro quality and in vivo fertility of goat buck sperm. *Animals*, 10(12), 2399.

Moreira, P. I., Nunomura, A., Nakamura, M., Takeda, A., Shenk, J. C., Aliev, G., ... & Perry, G. (2008). Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(8), 1493-1505.

Morrier A, Castonguay F, Bailey JL. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can J Anim Sci.* 2002; 82:347–356.

Naviglio D, Scarano P, Ciaravolo M and Gallo M 2019 Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques *foods* 8 1–22.

Références Bibliographiques

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.

Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.

Nunez-Martinez, I., Moran, J. M., & Pena, F. J. (2005). Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 537–543.

Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12735.

O'Flaherty C. (2014). The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. *Advances in Andrology*, 1–15.

Oliva, R., de Mateo, S., & Estanyol, J. M. (2009). Sperm cell proteomics. *Proteomics*, 9(4), 1004–1017.

Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J. P., Thimonier, J., & Volland-Nail, P. (1988). Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian journal of biological sciences*, 41(1), 69-86.

Ozaslan, M., & Oguzkan, S. B. (2018). Use of plant extracts in alternative medicine. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 21(1), 1-7.

Ozougwu, J. C. (2016). The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research*, 1(8), 1-8.

Pacher, P. ; Joseph, S. ; Beckman, Y. et Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87: 315-424.

Paoli, D.; Gallo, M.; Rizzo, F.; Baldi, E.; Francavilla, S.; Lenzi, A.; Lombardo, F.; Gandini, L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil. Steril.* 2011, 95, 2315–2319.

Références Bibliographiques

Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2014). Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Advances in experimental medicine and biology*, 791, 137–150.

Peer, W. A., Cheng, Y., & Murphy, A. S. (2013). Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of Experimental Botany*, 64 (9), 2629-2639.

Penã FJ, Garcia BM, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO, 2011: Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177–1186.

Penã FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H (2004) Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote* 12: 117–124.

Peris, S. I., Morrier, A., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, 25(2), 224-233.

Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1.

Poljsak, et al (ed.) (2011) *Skin Cancer, Free Radicals and Antioxidants*.

Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592–607.

Potapovich, A. I., & Kostyuk, V. A. (2003). Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Moscow)*, 68, 514-519.

Raccah, D. (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*, 1(1) : 29-42.

Rahman, K. (2007) 'Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors.', *Clinical interventions in aging*, 2 (2), pp. 219-36.

Références Bibliographiques

Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (2008). Bioactive molecules and medicinal plants (pp. 22-18). Berlin: Springer.

Ramawat, K. G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*, 7-32.

Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2014). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2).

Ramón, M., Pérez-Guzmán, M. D., Jiménez-Rabadán, P., Estesó, M. C., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., ... & Garde, J. J. (2013). Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PloS one*, 8(3), e59189.

Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*. juill 2007;18(7):427-42.

Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A., & Valojerdi, M. R. (2021). Oxidation of sperm DNA and male infertility. *Antioxidants*, 10(1), 97.

Rodríguez-García, C.; Sánchez-Quesada, C.; Gaforio, J.J. Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. *Antioxidants* 2019, 8, 137.

Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary medicine international*, 2022.

Salgueiro, E., & Reyss, A. (2002). *Biologie de la reproduction sexuée*. Éditions Belin.

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.

Sambroni, E. (2013). Contribution à l'étude du rôle et du mode d'action de Fsh et de Lh dans le testicule de truite (Doctoral dissertation, Rennes 1).

Références Bibliographiques

- Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R., & Billiar, T. (2002). Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*, 7(1), 1-10.
- Seevagan, T., Hulligan, S., Phull, J., & Aboumarzouk, O. M. (2019). Testes structure and function. *Blandy's Urology*, 729-739.
- Serras, F. (2016). The benefits of oxidative stress for tissue repair and regeneration. *Fly*, 10(3), 128-133.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Silva, A. R.; Cardoso, R. C. S.; Uchoa, D. C.; Silva, L. D. M. (2002). Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet. J.*, v.164, p.244-246.
- Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10–19.
- Skonieczna, J., Madej, J. P., & Będziński, R. (2019). Accessory Genital Glands in the New Zealand White Rabbit: A Morphometrical and Histological Study. *Journal of veterinary research*, 63(2), 251–257.
- Solihati, N., Rasad, S. D., Setiawan, R., & Alvionita, C. (2016). Quality and viability of Javanese local ram semen at different age. In *International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology* (pp. 265-270).
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, 25, 207-218.
- Stojakowska, A., Malarz, J., Szewczyk, A., & Kisiel, W. (2011). Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa*. *Acta Physiologiae Plantarum/Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 291–298.
- Suril, S., Sudhakar, L. S., & Bhardwaj, R. L. (2009). Anatomical studies of the prostate gland of Gaddi goat and sheep. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79(3), 294.

Références Bibliographiques

Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1122, No. 1, p. 012095). IOP Publishing.

Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in domestic animals*, 47, 65-75.

Tetenyl, I. (1985). Disponibilité et l'utilisation des plantes médicinales dans la production pharmaceutique. Rapport technique établi pour le gouvernement d'Algérie, 32.

Thibault C (1975). « La fécondation ». 1 vol. Masson (1995), 20.

Tibary, A., Manar, S., Boukliq, R., & Adnani, M. (1988). Factors affecting estrus synchronization in two Moroccan breeds of sheep (Timahdite and D'man).

Vaissaire J-P. (1977). « Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires ». MALOINE S.A. EDITEUR. 457p, p81-276.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

Van De Hoek, M., Rickard, J., & De Graaf, S. (2022). Motility assessment of RAM spermatozoa. *Biology*, 11(12), 1715.

Vasan, S. S. (2011). Semen analysis and sperm function tests: How much to test?. *Indian journal of urology*, 27(1), 41-48.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. (2002). Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149–79.

Références Bibliographiques

Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of testicular function. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*, 11-59.

Yadav, V., Sharma, R. K., & Goyal, A. K. (2014). Histological studies on epididymis region of goat (*Capra hircus*) reproductive system. *Int. J. of Pure and Applied Zoology*, 2(3), 224-227.

Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 255-260.

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559.

Résumé

L'objectif du présent travail a été d'examiner l'impact de l'extrait de laitue sauvage (*Lactuca virosa*) et de deux composés naturels, à savoir : la quercétine et l'acide gallique, sur le sperme épидидymaire des petits ruminants (ovin et caprin) après conservation à 04°C. Trois paramètres indicateurs de la qualité spermatique : la mobilité, la viabilité et le statut oxydatif sont mesurés ainsi que deux autres tests ont été étudiés dont, le DPPH et le test de toxicité sanguine. L'analyse est effectuée à des temps d'intervalles spécifiques de 0, 2, 4 et 24 heures. Les résultats ont montré que la quercétine à 5µg/ml a démontré des effets bénéfiques sur la viabilité des spermatozoïdes appuyé par le test de toxicité sanguine et un taux de piégeage des radicaux libre le plus élevé, mais son impact sur la motilité été négatif. D'autre part, l'acide gallique à 5µg/ml à donner des résultats modérés dans la plupart des tests et présente un effet spermicide à une concentration de 20µg/ml. Les deux concentrations de l'extrait phénolique à 10µg/ml et celui de 50µg/ml ont donné des résultats égaux au control (Tris) dans les divers tests, à l'exception des paramètres de mobilité spermatique où la concentration de 50µg/ml montre un effet plus important comparé à tous les autres milieux en particulier chez l'ovin. Cette étude suggère que l'utilisation des concentrations adéquates des composés et extraits naturels peuvent avoir des effets bénéfiques sur la qualité du sperme conservé à 04°C, avec un effet spécifique pour chaque espèce.

Mots clés : sperme, petits ruminants, conservation, *Lactuca virosa*, composés bioactifs, paramètres spermatiques.

Abstract

The aim of the present work was to examine the impact of wild lettuce (*Lactuca virosa*) extract and two natural compounds, namely quercetin and gallic acid, on epididymal sperm from small ruminants (sheep and goats) after preservation at 04°C. Three parameters indicative of sperm quality were measured: motility, viability and oxidative status. Two other tests were also studied: DPPH and the blood toxicity test. Analysis was carried out at specific time intervals of 0, 2, 4 and 24 hours. The results showed that quercetin at 5µg/ml demonstrated beneficial effects on sperm viability supported by the blood toxicity test and the highest free radical scavenging rate, but its impact on motility was negative. On the other hand, gallic acid at 5µg/ml gave moderate results in most tests and showed a spermicidal effect at a concentration of 20µg/ml. The two concentrations of phenolic extract at 10µg/ml and that of 50µg/ml gave results equal to the control (Tris) in the various tests, with the exception of sperm mobility parameters where the 50µg/ml concentration showed a greater effect compared to all other media, particularly in sheep. This study suggests that the use of appropriate concentrations of natural compounds and extracts can have beneficial effects on the quality of semen stored at 04°C, with a specific effect for each hope.

Key words: sperm, small ruminants, conservation, *Lactuca virosa*, bioactive compounds, sperm parameters.

ملخص

كان الهدف من هذه الدراسة هو فحص تأثير مستخلص الخس البري (*Lactuca virosa*) ومركبين طبيعيين، وهما الكيرسيتين وحمض الغاليك، على الحيوانات المنوية من المجترات الصغيرة (الأغنام والماعز) بعد حفظها في درجة حرارة 04 درجة مئوية. تم قياس ثلاثة معايير تدل على جودة الحيوانات المنوية: الحركة، والحيوية والحالة التأكسدية، كما تمت دراسة اختبارين آخرين: اختبار DPPH واختبار سمية الدم. تم إجراء التحليل على فترات زمنية محددة من 0 و2 و4 و24 ساعة. أظهرت النتائج أن الكيرسيتين بجرعة 5 ميكروغرام/مل أظهر تأثيرات مفيدة على حيوية الحيوانات المنوية مدعومة باختبار سمية الدم وأعلى معدل مسح للجذور الحرة، لكن تأثيره على الحركة كان سلبياً. من ناحية أخرى، أعطى حمض الغاليك بتركيز 5 ميكروغرام/مل نتائج معتدلة في معظم الاختبارات وكان له تأثير مبيد للحيوانات المنوية بتركيز 20 ميكروغرام/مل. أعطى تركيزان من المستخلص الفينولي بتركيز 10 ميكروغرام/مل و50 ميكروغرام/مل نتائج مساوية للوسط الضابط (Tris) في الاختبارات المختلفة، باستثناء معايير حركة الحيوانات المنوية حيث أظهر تركيز 50 ميكروغرام/مل تأثيراً أكبر مقارنةً بجميع الوسائط الأخرى، خاصةً في الأغنام. تشير هذه الدراسة إلى أن استخدام تركيزات مناسبة من المركبات والمستخلصات الطبيعية يمكن أن يكون له تأثيرات مفيدة على جودة السائل المنوي المخزن في درجة حرارة 04 درجة مئوية، مع تأثير محدد لكل نوع.

الكلمات المفتاحية: الحيوانات المنوية، الحيوانات المجتررة الصغيرة، الحفظ، لاكتوكا فيروسا، المركبات النشطة بيولوجياً، معايير الحيوانات المنوية