

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

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



**Réf : .....**

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

**MASTER**

**Thème**

*Etude de l'effet d'alginate et de la  
vitamine E sur la conservation des  
spermatozoïdes*

**Présenté par :**

**MOUSSI Kamilia & BOURIHANE Nissa**

**Soutenu le :**

**Devant le jury composé de :**

**Mme : RAHMANI Amina**  
**Mr : IGUER OUADA Mokrane**  
**Mme : TALBI Asma**

**Président**  
**Encadrant**  
**Examinateur**

**Année Universitaire : 2022/2023**

# REMERCIEMENT

*Nous exprimons notre profonde gratitude à Dieu tout-puissant pour nous avoir accordé la santé, la volonté d'entreprendre et de mener à bien ce mémoire.*

*Nous souhaitons exprimer notre reconnaissance sincère à notre superviseur, Monsieur Iguerouada Mokrane, pour son encadrement, ses orientations, son soutien et ses conseils précieux.*

*Nous remercions également notre co-superviseure, Mme Taouzinet Lamia, pour avoir consacré son temps, sa patience et pour nous avoir aidés à chaque étape de ce travail grâce à ses remarques pertinentes et ses conseils avisés.*

*Nos remerciements s'étendent également aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude envers tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui, par leurs compétences, nous ont soutenus dans notre parcours académique.*

*Enfin, nous remercions chaleureusement tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Nous exprimons notre gratitude envers nos familles et amis pour leur soutien infailible et la confiance qu'ils ont en nos capacités.*

## *Dédicaces*

*Je souhaite dédier ce mémoire à toutes les personnes qui ont joué un rôle significatif dans sa réalisation.*

*Je tiens à remercier chaleureusement ma famille ; ma mère, mon père, mes sœurs et mes amis qui m'ont soutenu de manière inconditionnelle. Leur amour et leurs encouragements m'ont donné la force et la confiance nécessaires pour surmonter les obstacles et aller de l'avant.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes professeurs et enseignants qui ont contribué à ma formation et à mon développement académique. Leurs enseignements, leurs conseils et leurs retours constructifs ont façonné ma réflexion et ont été d'une valeur inestimable pour l'élaboration de ce mémoire.*

*Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers tous les participants qui ont pris le temps de partager leurs connaissances, de répondre à mes questionnaires ou de participer à mes expériences. Leur contribution a été essentielle pour la collecte des données et la réalisation de cette recherche.*

*C'est avec une profonde reconnaissance que je dédie ce mémoire à toutes ces personnes. Leur soutien, leur confiance et leur implication ont été les piliers de ce travail, et je suis honorée de les avoir à mes côtés tout au long de ce parcours académique.*

**Merci !**

**KAMILIA, M**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mon père Omar, je voudrais te remercier du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi. Ta présence et ton soutien sont inestimables.*

*A ma mère Malika, tu es la personne la plus aimante et attentionnée que je connaisse. Tu as toujours été là pour moi, me soutenant et m'encourageant à poursuivre mes rêves.*

*A mon mari Loucif, tu as toujours été là pour moi, apportant ton amour, ton soutien et ton réconfort.*

*A mes deux frères Bilal et Smail, A ma sœur Karima, vous êtes mes meilleurs compagnons. Votre soutien inconditionnel et vos mots d'encouragement m'ont permis de continuer à avancer, même dans les moments les plus difficiles.*

*A ma chère amie Siham, qui m'a soutenu avec son amitié sincère.*

*A mon binôme Kamilia, je suis reconnaissante pour notre travail d'équipe et notre soutien mutuel.*

*A toute ma famille*

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.*

*Merci !*

*NISSA, B*

## LISTE DES ABREVIATIONS

**IA** : insémination artificiel

**CASA** : Computer Assisted Sperm Analysis

**TRIS** : hydroxyméthylminométhane

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**PH** : potentiel hydrogène

**G** : L-guluronique

**M** : D-mannuronique

**FDA** : Food and Drug Administration

**PKA** : constante d'ionisation

**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium

**Cu<sup>2+</sup>** : ion cuivre

**Ba<sup>2+</sup>** : ion baryum

**CaCl<sub>2</sub>** : chlorure de calcium

**GDL** : D-glucono- $\delta$ -lactone

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique

**CaCO<sub>3</sub>** : carbonate de calcium

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : anion superoxyde

**OH<sup>•</sup>** : radical hydroxyle

**NO<sup>•</sup>** : monoxyde d'azote

**ROO<sup>•</sup>** : radicaux peroxy

**G6PD** : glucose-6-phosphate déshydrogénase

**SOD** : superoxyde dismutase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**Trx** : thiorédoxine peroxydases

**GPx/GR** : glutathion peroxydase / glutathion réductase

**Alg** : alginate

**Chol** : cholestérol

**Vit E** : vitamine E

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE N° 1:</b> STRUCTURE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN (COHEN-BACRIE.,2008). .....	2
<b>FIGURE N°2:</b> ALTERATIONS STRUCTURELLES ET MOLECULAIRES DANS LE SPERME DE MAMMIFERES APRES CRYOCONSERVATION (YANEZ-ORTIZ ET AL., 2022). .....	8
<b>FIGURE N°3:</b> UNITES MERES D'ALGINATES ET STRUCTURE POLYMERE (DUCEAC ET AL., 2022)..	9
<b>FIGURE N° 4 :</b> MECANISME DE GELIFICATION DE L'ALGINATE EN PRESENCE D'IONS CALCIUM (CA <sup>2+</sup> ) (MARTINS ET AL., 2017).....	12
<b>FIGURE N°5:</b> DEUX PRINCIPALES METHODES DE PREPARATION DES GELS D'ALGINATE : (A) METHODE EXOGENE ; (B) METHODE ENDOGENE. (GDL : D-GLUCONO-Δ-LACTONE) (HU ET AL.,2021).....	13
<b>FIGURE N°6:</b> STRUCTURE CHIMIQUE DES TOCOPHEROLS. ....	17
<b>FIGURE N°7:</b> LA STRUCTURE CHIMIQUE DES TOCOTRIENOLS. ....	18
<b>FIGURE N°8 :</b> LA BIOSYNTHESE DE LA VITAMINE E (CUVELIER ET AL.,2003).....	19
<b>FIGURE N°9 :</b> ORIGINE DES DIFFERENTS RADICAUX LIBRES OXYGENES ET ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (FAVIER.,2001) .....	25
<b>FIGURE N°10:</b> CONSEQUENCES PATHOGENES DU STRESS OXYDATIF (FAVIER, A.2006).....	27
<b>FIGURE N°11 :</b> MATERIELS UTILISES DANS LA PREPARATION DES BILLES. ....	30
<b>FIGURE N°12 :</b> MATERIELS UTILISES DANS LA PREPARATION DE LA PHASE MOBILE HPLC.....	31
<b>FIGURE N° 13 :</b> LA FORME DE BILLES D'ALG/VIT E. ....	32
<b>FIGURE N° 14 :</b> LA FORME DE BILLES D'ALG/CHOL. ....	33
<b>FIGURE N°15 :</b> ULTRATURAX. ....	34
<b>FIGURE N°16 :</b> LES ECHANTILLONS DE TRAITEMENT. ....	36
<b>FIGURE N°17 :</b> PHOTO DE CASA (COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS).....	37
<b>Figure N°18 :</b> Histogramme représentant les valeurs de la VSL dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C. ....	39
<b>Figure N°19 :</b> Histogramme représentant les valeurs de la VCL dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C. ....	40
<b>Figure N°20 :</b> Histogramme représentant les valeurs de la VAP dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate)	

VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 41

**Figure N°21 :** Histogramme représentant les valeurs de la BCF dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 42

**Figure N°22 :** Histogramme représentant les valeurs de l'ALH dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 43

**Figure N°23 :** Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs moyens (PM) dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 44

**Figure N°24 :** Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides (PR) dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 45

**Figure N°25 :** Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes mobiles dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C..... 46

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU N° I</b> : PRINCIPALES APLICATIONS D'ALGINATES (HU ET AL.,2021),(HURTADO ET AL.,2022).....	14
<b>TABLEAU N° II</b> : LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES ET LEURS FONCTIONS (BENSAKHRIA.,2018).....	28

## Table des matières

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

### Partie théorique

#### Chapitre I : le spermatozoïde

I.1.MORPHOLOGIE.....	2
I.2.CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES .....	3

#### Chapitre II: techniques de conservation du sperme

II.1.LA CONSERVATION EN FRAIS .....	4
II.2.LA CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE.....	4
II.2.1.Les agents cryoprotecteurs et les dilueurs de semence.....	5
II.2.2.Effets de la cryoconservation sur la qualité du sperme .....	7

#### chapitre III: les alginates

III.1.STRUCTURE CHIMIQUE .....	9
III.2.PROPRIETES BIOLOGIQUES.....	10
III.3.PROPRIETES DE GELIFICATION IONIQUE DE L'ALGINATE.....	11
III.4.LES APPLICATIONS DE L'ALGINATE .....	14
III.5. ÉTUDES EXPERIMENTALES SUR L'UTILISATION DES ALGINATES DANS LA CONSERVATION DES SPERMATOZOÏDES .....	15

#### Chapitre IV: la vitamine E

IV.1.C'EST QUOI LA VITAMINE E :.....	16
IV.2.LA STRUCTURE DE LA VITAMINE E.....	17
IV.2.1.La structure des tocophérols.....	17
IV.2.2.La structure des tocotriénols .....	18
IV.3.LA BIOSYNTHESE DE LA VITAMINE E.....	18
IV.4.METABOLISME CELLULAIRE DE LA VITAMINE (ABSORPTION ET DISTRIBUTION) .....	19
IV.5.LE CATABOLISME DE LA VITAMINE E .....	20

IV.6.LA FONCTION ANTIOXYDANTE DE LA VITAMINE E.....	21
IV.7.EFFETS DE LA VITAMINE E SUR LES PARAMETRES DU SPERME.....	21

## **CHAPITRE V: stress oxydatif**

V.1. DEFINITION DU STRESS OXYDANT, RADICAL LIBRE ET ANTIOXYDANT .....	23
V.1.1.Stress oxydant.....	23
V.1.2.Radical libre .....	23
V.1.3.Antioxydant .....	25
V.2.LES FACTEURS INFLUENÇANT LE STRESS OXYDATIF .....	26
V.2.1.Les facteurs intensifiant la production des ERO .....	26
V.2.2.Les facteurs réduisant la production des ERO .....	26
V.3.CONSEQUENCES CELLULAIRES DU STRESS OXYDATIF .....	26
V.4.LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDATIF.....	28
V.4.1.Les antioxydants enzymatiques.....	28
V.4.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	28
V.4.3.La réparation de l'ADN.....	29

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

I.MATERIEL .....	30
II. METHODES.....	31
II.1.LA PREPARATION DE BILLES D'ALGINATE-VITAMINE E.....	31
II.2.PREPARATION DE BILLES D'ALGINATE-CHOLESTEROL .....	33
II.3.ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC) ..	33
II.4.PREPARATION DE GEL D'ALG/VITÉ ET ALG/CHOL .....	35
II.5.TEST SPERMATIQUE .....	35
II.5.1.Préparation de tris.....	35
II.5.2.Collecte d'échantillon de sperme.....	35
II.5.3.Analyse du sperme.....	36

## **Résultats et discussions**

I- RESULTATS POUR LES BILLES D'ALGINATE-CHOLESTEROL ET VITAMINE E38	
II- RESULTATS POUR LES GELS D'ALGINATE CHOLESTEROL ET VITAMINE E...	38
II-1 RESULTATS.....	38
II-2 DISCUSSION.....	46
<b>Conclusion.....</b>	<b>48</b>

### **Liste des références**

### **Résumé**

# Introduction

# Introduction

---

L'effet de la vitamine E et de l'alginate sur la conservation des spermatozoïdes est un sujet qui attire l'intérêt de nombreux chercheurs dans le domaine de la biologie de la reproduction. D'une part la vitamine E est un antioxydant qui aide à protéger les cellules contre les dommages engendrés par leur oxydation. Elle est également connue pour ses effets bénéfiques sur la qualité des spermatozoïdes (**Guiga.,2019**).

D'autre part l'alginate anionique polysaccharide dérivé des algues brunes, présente des caractéristiques intéressantes pour la conservation des spermatozoïdes. En raison de sa biocompatibilité élevée, de son faible coût et de sa faible toxicité, elle a été largement utilisée dans diverses applications biomédicales. Dans le contexte de la cryoconservation des spermatozoïdes, l'encapsulation des cellules l'alginate offre une protection physique contre les dommages mécaniques qui peuvent survenir pendant la formation de cristaux de glace. De plus, l'alginate peut imiter la matrice extracellulaire des cellules germinales, préservant ainsi leur potentiel de pluripotence et leur capacité de fécondation après la décongélation (**Feyzmanesh., et al 2022**).

Le but d'utilisation de l'alginate dans cette recherche n'est pas l'encapsulation des spermatozoïdes mais plutôt l'encapsulation de la vitamine E à cause de sa nature hydrophobe.

Le présent mémoire se divise en deux parties essentielles, à savoir la partie théorique et la partie pratique. Dans la première partie, cinq chapitres sont abordés : le spermatozoïde, les techniques de conservation du sperme, les alginates, la vitamine E et le stress oxydant. La deuxième partie du mémoire présente le matériel et les méthodes utilisés et les résultats obtenus sont ensuite présentés et analysés dans une partie des résultats et des discussions.

# Partie théorique

# Chapitre I

# Chapitre I : le spermatozoïde

Les spermatozoïdes sont les cellules reproductrices mâles des animaux, y compris les humains. Ils sont produits dans les testicules au cours d'un processus appelé spermatogénèse. Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée qui se compose de trois parties principales : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. La morphologie des spermatozoïdes est similaire pour la plupart des espèces, surtout en ce qui concerne les mammifères, bien que de légères différences puissent exister.

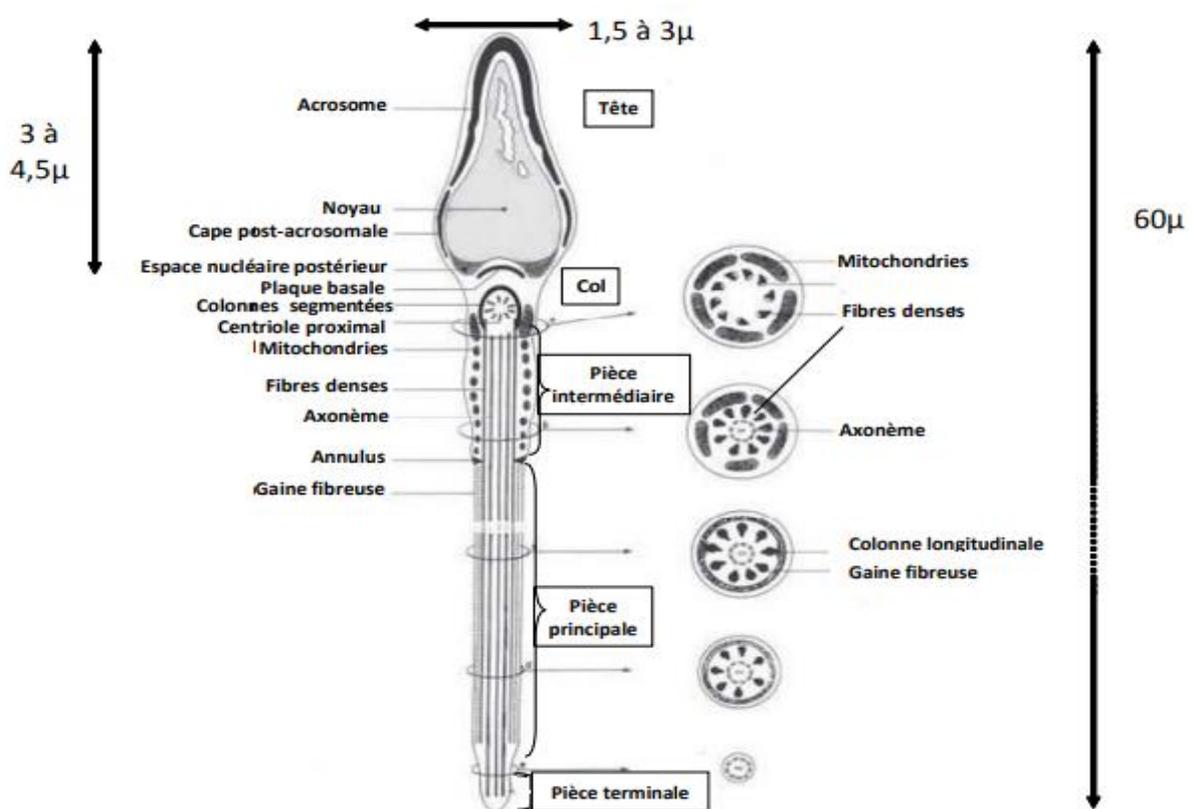


Figure N° 1: structure du spermatozoïde humain (Cohen-Bacrie.,2008).

## I.1.Morphologie

La structure basique du spermatozoïde se divise en trois parties (voir Figure N°1) : la tête du spermatozoïde contient le noyau qui renferme les chromosomes porteurs de l'information génétique. La forme de la tête peut varier, mais elle est généralement ovale ou en forme de

# Chapitre I : le spermatozoïde

---

poire. À l'avant de la tête, on trouve une petite structure appelée acrosome qui contient des enzymes nécessaires à la pénétration de l'ovule lors de la fécondation.

La pièce intermédiaire : Cette région contient les centrioles, qui jouent un rôle important dans la division cellulaire et l'organisation du cytosquelette du spermatozoïde.

Le flagelle, également appelé queue, est une longue structure fine qui permet au spermatozoïde de se déplacer. Il est constitué d'un axe central entouré d'une gaine de protéines appelée axonème. Les mouvements de battements du flagelle propulsent le spermatozoïde dans le liquide environnant (**Mortimer, 2018**).

## **I.2. Caractéristiques fonctionnelles**

Les spermatozoïdes ont une mobilité essentielle pour atteindre et féconder l'ovule. Ils utilisent leur flagelle pour se déplacer en effectuant des mouvements ondulatoires. Avant de pouvoir féconder l'ovule, les spermatozoïdes doivent subir un processus appelé capacitation. Pendant la capacitation, des changements biochimiques se produisent dans leur membrane, les rendant fonctionnellement compétents pour la fécondation. Lorsque le spermatozoïde atteint l'ovule, l'acrosome situé à l'avant de la tête libère des enzymes qui décomposent la couche externe de l'ovule, permettant ainsi au spermatozoïde de pénétrer. Une fois à l'intérieur de l'ovule, la membrane du spermatozoïde fusionne avec celle de l'ovule, libérant ainsi les chromosomes du spermatozoïde dans l'ovule. Cette fusion marque le début de la fécondation (**Gavin-Plagne, 2018**).

Les mitochondries, le flagelle, l'acrosome et la membrane plasmique subissent donc des changements depuis la sortie du sperme de l'appareil mâle jusqu'à son entrée dans l'appareil femelle. Il est donc important d'évaluer les échantillons de sperme avant et après conservation afin de préserver des ressources de qualité. Pour permettre une évaluation objective de certains paramètres de qualité des spermatozoïdes, des outils tels que la cytométrie en flux et l'analyse automatisée du sperme (Computer-Assisted Sperm Analysis - CASA) sont aujourd'hui utilisés de manière courante (**Gavin-Plagne, 2018**).

# Chapitre II

## Chapitre II : techniques de conservation du sperme

---

La conservation du sperme est une pratique répandue dans le domaine de la reproduction animale et également applicable aux êtres humains. Cette technique permet de préserver le sperme dans des conditions optimales en vue de le stocker pour une utilisation ultérieure. Chez les animaux, la conservation du sperme est souvent associée à l'utilisation de l'IA (insémination artificielle) et à des programmes d'amélioration génétique, ce qui permet de l'utiliser même dans des endroits éloignés des centres spécialisés. L'IA est utilisée pour évaluer la descendance des jeunes mâles et pour diffuser les caractéristiques génétiques souhaitées. Le choix de la méthode de conservation dépend de l'efficacité de l'IA pour les espèces spécifiques ainsi que des objectifs du programme d'IA. Plusieurs méthodes de conservation peuvent être utilisées, notamment la congélation et la réfrigération (**Silvestre et al., 2021**).

### II.1.La conservation en frais

L'utilisation de la semence fraîche est une méthode couramment utilisée pour augmenter la production de semences des reproducteurs les plus recherchés. Dans certains cas, cela permet de bénéficier des avancées génétiques de certains individus dont la semence ne peut pas être congelée, mais reste viable lorsqu'elle est réfrigérée. La réfrigération est généralement utilisée pendant de courtes périodes, en maintenant le sperme à des températures proches de 0°C, ce qui ralentit le métabolisme des cellules du sperme sans les congeler complètement. Pour conserver la semence animale fraîche, il est essentiel de la diluer immédiatement après le prélèvement (dans un délai de moins de 15 minutes) et de la refroidir à une température de stockage spécifique (entre 4°C et 15°C, ou 15°C et 20°C) afin de permettre des inséminations ultérieures. En effet, la survie de la semence animale est limitée à des températures comprises entre 34°C et 37°C (**Decuadro-Hansen, 2004**).

### II.2.La cryoconservation de la semence

La cryoconservation du sperme implique la congélation des spermatozoïdes à -196°C, la température d'ébullition de l'azote liquide, un milieu couramment utilisé pour la congélation et le stockage tout en préservant la structure et la fonction des spermatozoïdes intacts (**Sathe, 2021**).

## Chapitre II : techniques de conservation du sperme

---

La cryoconservation du sperme a été introduite il y a environ 200 ans par Lazaro Spallanzani, qui a tenté de préserver les spermatozoïdes en les refroidissant dans la neige. Des progrès scientifiques ultérieurs ont été réalisés avec la découverte par Polge des propriétés cryoprotectrices du glycérol. Depuis lors, des améliorations considérables ont été apportées aux techniques de cryoconservation du sperme chez différentes espèces. Les premières naissances issues de spermatozoïdes cryoconservés ont été signalées dans les années 1950 et 1960. Les banques de sperme ont été développées dans les années 1960 pour le bétail et dans les années 1970 pour les humains. Aujourd'hui, la cryoconservation du sperme est couramment utilisée dans l'insémination artificielle et les technologies de reproduction assistée. Cependant, malgré les progrès réalisés, la recherche se poursuit pour trouver des méthodes permettant de récupérer de manière optimale des spermatozoïdes viables après la cryoconservation (**Hezavehei et al., 2018**).

La cryoconservation du sperme est une méthode efficace pour la gestion et la préservation de la fertilité masculine chez les humains et les animaux domestiques. Elle peut être utilisée lorsque des traitements cytotoxiques ou chirurgicaux peuvent entraîner une insuffisance testiculaire ou une dysfonction éjaculatoire. La congélation du sperme offre une solution adaptée pour préserver la fertilité dans de telles situations, et le sperme congelé et décongelé peut être utilisé pour des techniques d'insémination intra-utérine, de fécondation in vitro ou d'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes. La cryoconservation est également couramment utilisée pour conserver le sperme de donneur, permettant ainsi de réaliser des tests de dépistage des maladies infectieuses. Dans le domaine de l'élevage, l'insémination artificielle avec des spermatozoïdes congelés est largement utilisée pour améliorer génétiquement les troupeaux. Elle permet d'inséminer des femelles sélectionnées avec le sperme congelé d'un mâle de qualité génétique souhaitée (**Hezavehei et al., 2018**).

### **II.2.1. Les agents cryoprotecteurs et les dilueurs de semence**

Un cryoprotecteur et un dilueur de sperme animal sont deux substances utilisées dans des contextes différents, mais ils sont souvent utilisés conjointement lors de la cryoconservation de la semence animale.

## Chapitre II : techniques de conservation du sperme

---

Chez la plupart des espèces, les milieux de cryoconservation du sperme sont composés d'un tampon (Tris), d'un cryoprotecteur non perméable (jaune d'œuf), d'un cryoprotecteur perméable (glycérol), d'une source d'énergie (glucose) et d'autres additifs (antibiotiques, vitamines et antioxydants). (**Yáñez-Ortiz et al., 2022**). Dans la cryoconservation du sperme animal, le cryoprotecteur et le dilueur de sperme sont deux substances utilisées de manière conjointe pour assurer la préservation optimale des spermatozoïdes. Les agents cryoprotecteurs sont ajoutés à la semence avant la congélation pour minimiser les dommages causés par la formation de cristaux de glace et les effets négatifs de la basse température. Ils sont essentiels pour préserver l'intégrité et la viabilité des spermatozoïdes lorsqu'ils sont soumis à des températures extrêmement froides. Les cryoprotecteurs couramment utilisés incluent le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthylène glycol. Ces substances protègent les cellules en réduisant la formation de cristaux de glace et en préservant la structure cellulaire (**Yáñez-Ortiz et al., 2022**).

Quant au dilueur de sperme, il est utilisé pour diluer la semence avant la cryoconservation ou son utilisation en reproduction assistée. Les dilueurs de sperme animal ont plusieurs rôles importants, tels que la dilution de la concentration des spermatozoïdes pour faciliter la manipulation et l'utilisation de la semence, la protection et la nutrition des spermatozoïdes pendant le stockage et le transport, ainsi que le maintien d'un environnement physiologique optimal pour les spermatozoïdes. Ils peuvent contenir des nutriments, des substances protectrices, des agents antimicrobiens, et parfois même des cryoprotecteurs pour améliorer la viabilité des spermatozoïdes pendant la congélation. Les dilueurs de semence sont spécifiques à chaque espèce animale en raison des différentes exigences en termes de composition chimique et de conditions environnementales pour la viabilité des spermatozoïdes. Parmi les dilueurs couramment utilisés, on retrouve le lait écrémé en poudre et le Tris-jaune d'œuf (**Salmon, 2015**).

## Chapitre II : techniques de conservation du sperme

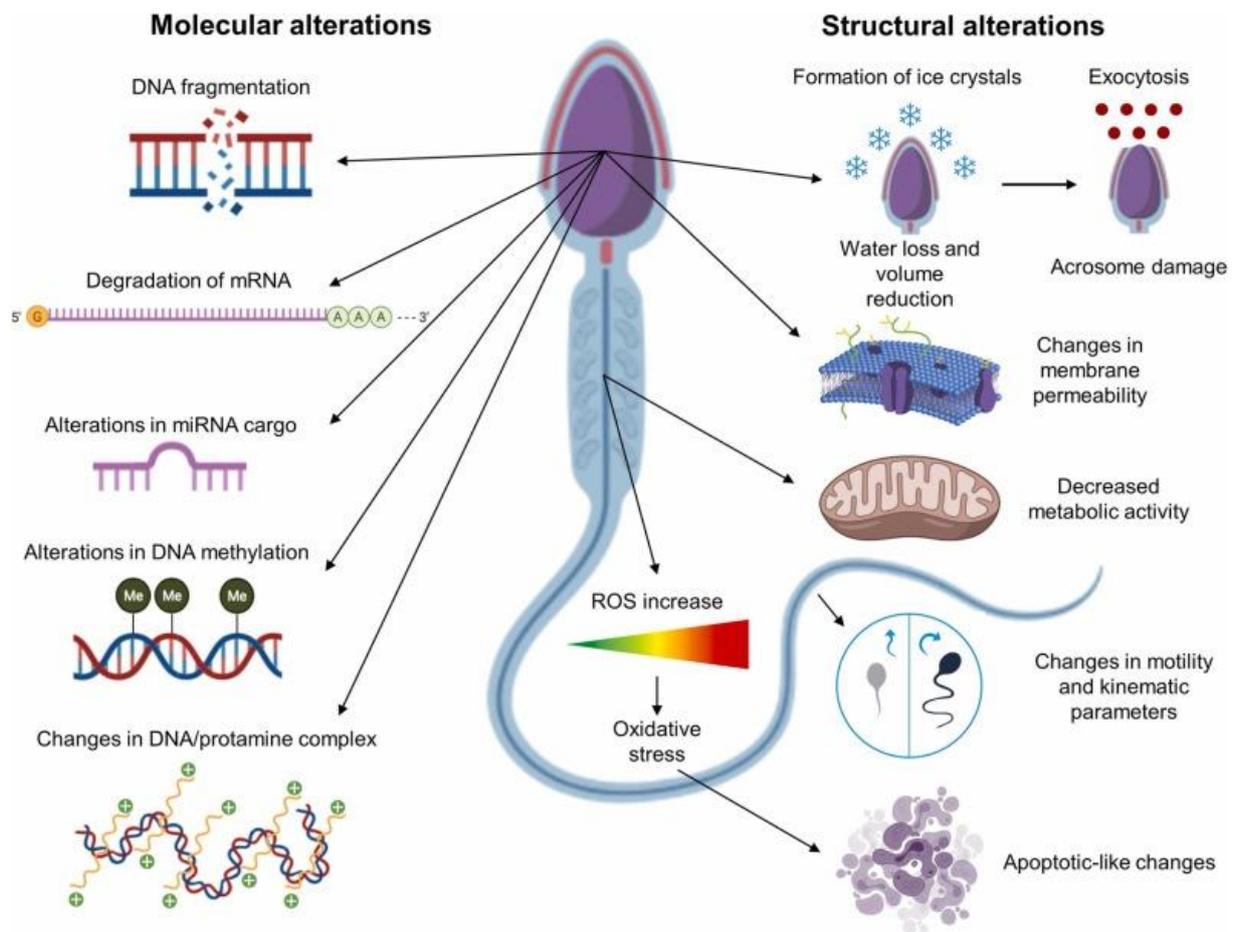
---

### II.2.2.Effets de la cryoconservation sur la qualité du sperme

La cryoconservation du sperme peut entraîner certaines altérations structurelles et moléculaires qui peuvent affecter la viabilité et la fonction des spermatozoïdes (**Figure N°2**). Voici les principales altérations qui peuvent se produire lors de ce processus :

1. Endommagement de l'ADN : La congélation et la décongélation du sperme peuvent causer des dommages à l'ADN, tels que des cassures de brins d'ADN. Ces dommages peuvent altérer la capacité du sperme à féconder un ovule avec succès.
2. Stress oxydatif : La cryoconservation peut augmenter le stress oxydatif dans les cellules spermatiques. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les mécanismes de défense antioxydants de la cellule. Un stress oxydatif accru peut endommager les membranes cellulaires et l'ADN du sperme.
3. Altération de la motilité : La congélation et la décongélation peuvent altérer la motilité des spermatozoïdes. Certains spermatozoïdes peuvent perdre leur capacité à se déplacer correctement, ce qui peut réduire leur aptitude à atteindre l'ovule et à le féconder.
4. Altération de la membrane cellulaire : Les cellules spermatiques sont entourées d'une membrane qui est essentielle à leur intégrité et à leur fonctionnement. La cryoconservation peut causer des dommages à cette membrane cellulaire, entraînant ainsi une diminution de la viabilité et de la fonction des spermatozoïdes.
5. Formation de cristaux de glace : Lorsque le sperme est exposé à des températures très basses, des cristaux de glace peuvent se former à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Ces cristaux de glace peuvent endommager les structures cellulaires sensibles, y compris les membranes cellulaires (**Yáñez-Ortiz et al., 2022**).

## Chapitre II : techniques de conservation du sperme



**Figure N°2:** Altérations structurelles et moléculaires dans le sperme de mammifères après cryoconservation (Yáñez-Ortiz et al., 2022).

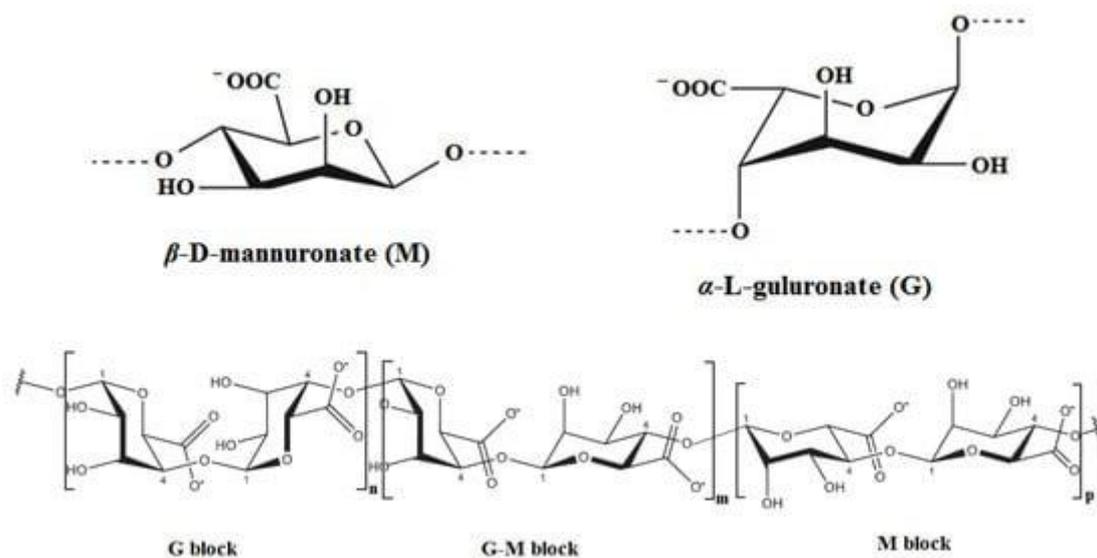
# Chapitre III

## Chapitre III : les alginate

Un pharmacien et chimiste britannique nommé Stanford est crédité de la découverte de l'alginate. Cette substance est fabriquée à partir d'algues brunes et de différentes souches bactériennes. Elle est composée des sels de deux acides uroniques dérivés du mannose : l'acide D-mannuronique et l'acide L-gulonique. L'alginate est un polymère très stable qui reste compatible avec de nombreuses molécules organiques et minérales, malgré les variations de pH et de salinité. Ces propriétés uniques ont suscité un intérêt généralisé pour les utilisations potentielles de l'alginate dans diverses industries, notamment l'alimentation, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et la biomédecine (Goujon, 2004).

### III.1. Structure chimique

Les polymères d'alginate sont constitués de deux types d'unités monomères (Figure N°3) : les résidus d'acide D-mannuronique (M) liés en  $\beta$ -(1-4) et les résidus d'acide L-gulonique (G) liés en  $\alpha$ -(1-4). La structure de base de l'alginate est formée par des chaînes polymères linéaires non ramifiées composées de monomères disposés en blocs de résidus M et G, entrecoupés de régions contenant des séquences MG alternées (Ching et al., 2017).



**Figure N°3:** Unités mères d'alginate et structure polymère (Duceac et al., 2022).

## Chapitre III : les alginates

---

### III.2. Propriétés biologiques

L'alginate est un polymère naturel approuvé par la Food and Drug Administration (FDA). En raison de ses propriétés biologiques, il est largement utilisé dans diverses applications alimentaires, biomédicales et pharmaceutiques. Les alginates sont considérés comme peu toxiques ou non toxiques, non immunogènes, biocompatibles et biodégradables.

Des études de biocompatibilité, de toxicité, d'immunogénicité et de biodégradation ont démontré que l'alginate de sodium peut être utilisé comme excipient dans diverses formes pharmacologiques pour l'administration orale, car il est sûr, non toxique et ne s'accumule pas dans l'organisme. Grâce à sa capacité de chélation, il peut se lier à divers métaux lourds présents dans l'intestin, protégeant ainsi l'organisme de leurs effets. Cependant, lorsqu'il est destiné à l'implantologie ou à l'administration intraveineuse, il est nécessaire de prendre en compte les facteurs qui influent sur sa biocompatibilité et son immunogénicité, tels que la composition chimique (rapport des groupes G/M), la purification, la nature, la quantité et l'impact des contaminants résiduels.

De nombreuses études ont montré que l'utilisation parentérale d'alginate commercial peut entraîner une fibrose et des réponses immunitaires. Afin que les alginates soient sûrs pour l'homme et utilisables dans le domaine biomédical, ils doivent être préparés et purifiés très soigneusement par des méthodes de décontamination lors de l'extraction afin d'éliminer toute trace de métaux lourds, d'endotoxines, de protéines et de composés phénoliques présentant un pouvoir immunogène.

La dégradation enzymatique de l'alginate chez les mammifères est impossible en raison de l'absence d'alginate, une enzyme impliquée dans le processus de séparation des chaînes polymères. De plus, l'alginate de poids moléculaire moyen ou élevé ne peut pas être entièrement éliminé par voie rénale car il est filtré plus lentement par les reins. Face au problème de la biodégradation, des études ont montré que l'alginate peut être dégradé par oxydation, formation de réseaux ioniques et autres méthodes s'il est structurellement modifié (**Frent et al., 2022**).

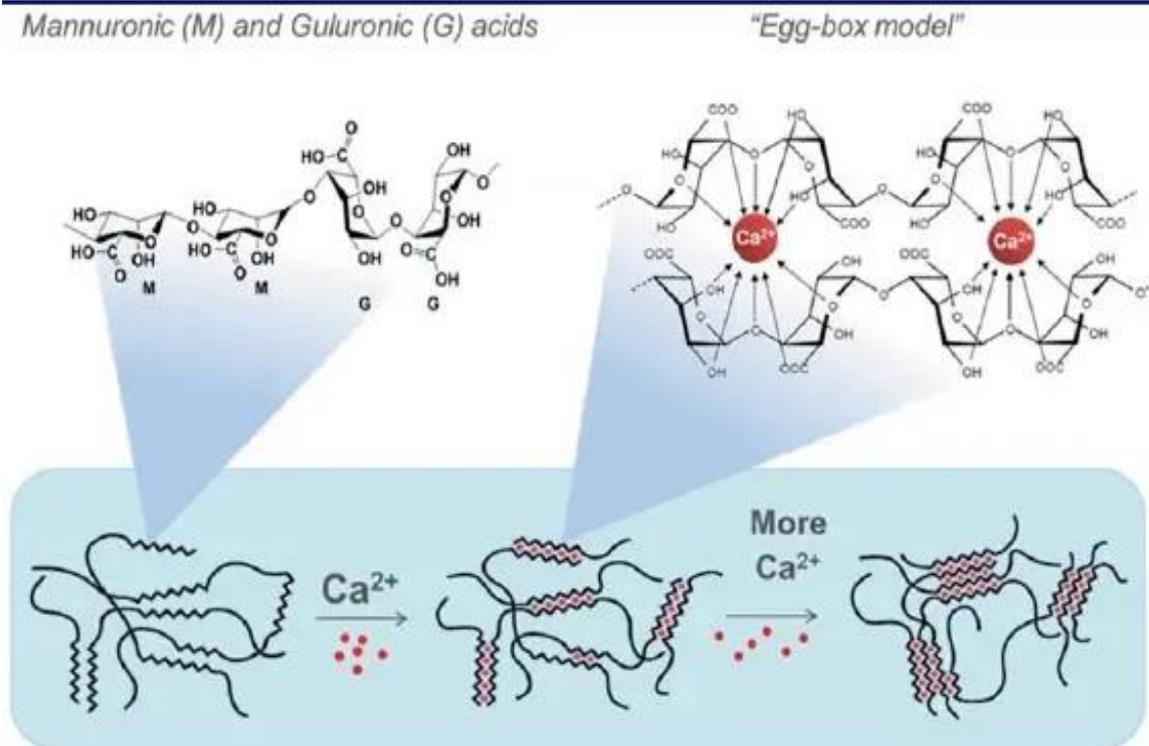
### III.3. Propriétés de gélification ionique de l'alginate

Il existe deux processus par lesquels les alginates sont capables de former des gels :

- ❖ Des gels d'acide alginique : lorsque le pH du milieu est au-dessous du pKa de l'alginate, l'acide alginique est alors non chargé et les associations intermoléculaires peuvent se faire par des liaisons hydrogènes et par interactions hydrophobes (**Dumont., 2016**).
- ❖ L'alginate a la capacité de former des gels ioniques en présence de cations multivalents et divalents. Le gel formé par cette interaction est largement utilisé dans l'encapsulation de substances bioactives dans l'industrie alimentaire, les médicaments dans l'industrie pharmaceutique et l'immobilisation cellulaire dans l'industrie biotechnologique (**Ching et al., 2017**).

La présence de cations tels que,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  peut induire la gélification de l'alginate. Les gels d'alginate induits par des ions sont principalement formés par des interactions électrostatiques entre des groupes carboxyle chargés négativement et des cations chargés positivement dans les molécules d'alginate, entraînant la formation de complexes polyélectrolytes. Le cation divalent le plus couramment étudié qui induit la gélification de l'alginate est le  $\text{Ca}^{2+}$  (**Hu et al., 2021**). L'association du calcium avec l'alginate suit un processus en trois étapes (**Figure N°4**). Premièrement, les ions calcium interagissent avec les résidus mannuroniques et guluroniques pour créer un mono-complexe. Ensuite, les mono-complexes se propagent pour produire des dimères de type « boîte à œufs », impliquant principalement des résidus guluroniques. Enfin, l'association latérale des dimères "boîte à œufs" conduit à la formation de multimères (**Dumont., 2016**).

## Chapitre III : les alginate

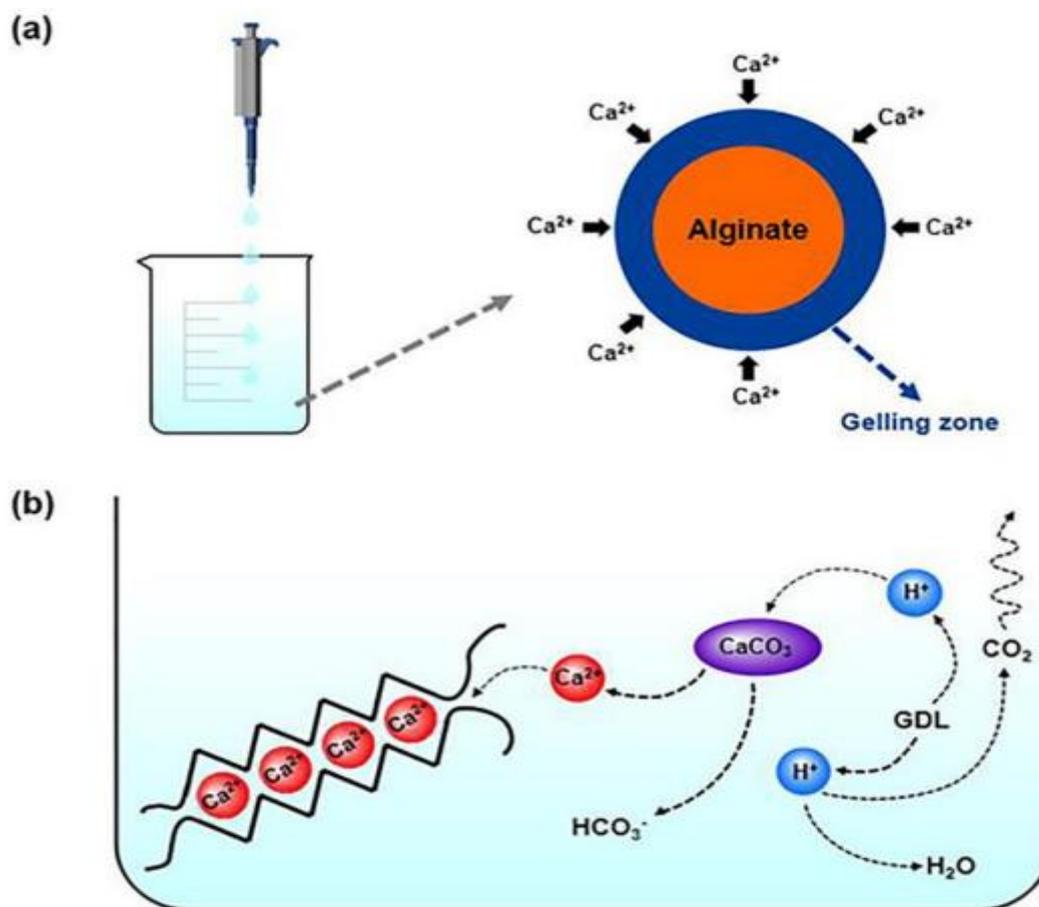


**Figure N° 4 :** Mécanisme de gélification de l'alginate en présence d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )  
(Martins *et al.*, 2017).

Il existe deux méthodes fondamentales pour préparer les gels d'alginate de calcium (**Figure N°5**) : les méthodes de gélification exogène et endogène. Dans la méthode exogène, les cations proviennent de l'extérieur du système d'alginate (**Goujon, 2004**). La solution d'alginate est déposée dans un bain de  $\text{CaCl}_2$ , ce qui permet la formation de particules de gel d'alginate de calcium. Les particules de gel formées présentent un gradient de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'épaisseur en raison d'une gélification rapide (**Hu et al., 2021**). L'inconvénient de cette méthode est l'absence d'uniformité du produit obtenu : la concentration en alginate diminue de la surface au centre du gel (**Goujon, 2004**).

## Chapitre III : les alginate

En revanche, dans la méthode endogène, les cations sont libérés de l'intérieur du système d'alginate (Goujon, 2004). Un déclencheur contrôlé tel que le D-glucono- $\delta$ -lactone (GDL) est ajouté à une solution d'alginate contenant une source de calcium (comme le  $\text{CaCO}_3$  ou le Ca-EDTA), ce qui permet une libération et une diffusion lentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , conduisant ainsi à la formation d'un gel d'alginate de calcium. La méthode endogène évite le problème des gradients de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et permet la formation lente d'une structure de gel uniforme. Cependant, le  $\text{CaCO}_3$  insoluble peut être encapsulé dans le gel formé. Au cours de ce processus de gélification, le  $\text{CaCO}_3$ , en tant que source de  $\text{Ca}^{2+}$ , peut libérer du  $\text{Ca}^{2+}$  libre et former un régime de sol ou de gel autour de lui. Ainsi, le  $\text{CaCO}_3$  est intégré dans ces gels nouvellement formés et limite la diffusion de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, ce qui influence le processus ultérieur de gélification (Hu et al., 2021).



**Figure N°5:** Deux principales méthodes de préparation des gels d'alginate : (a) méthode exogène ; (b) méthode endogène. (GDL : D-glucono- $\delta$ -lactone) (Hu et al.,2021).

## Chapitre III : les alginates

### III.4. Les applications de l'alginate

L'alginate a été utilisé dans un large éventail d'applications, telles que l'alimentation, les cosmétiques, le textile, la nutrition et la santé, la biomédecine et la pharmacie. La propriété commune dans toutes ces applications est la capacité de former des gels en présence d'agents de réticulation d'ions. (Hu et al., 2021)

Les principales applications d'alginates sont résumées dans le **Tableau N°1**.

**Tableau N° I:** principales applications d'alginates (Hu et al.,2021),(Hurtado et al.,2022).

Domaine d'application	Exemple d'application
Biotechnologie, bioingénierie, biomédecine et clinique	<ul style="list-style-type: none"><li>-Pansements pour plaies et brûlures</li><li>-Chélateur de métaux lourds</li><li>-Échafaudages en génie tissulaire</li><li>-Libération contrôlée</li><li>-Bio-impression 3D</li><li>-Prothèses, moules dentaires et matériaux d'empreinte</li><li>-Immobilisation des enzymes et des cellules</li></ul>
Nourriture et boissons	<ul style="list-style-type: none"><li>-Production de crème glacée</li><li>-Liant et épaississant</li><li>-Stabilisateur de mousse de bière</li><li>-Confiserie et gastronomie en général</li></ul>
Protection de l'environnement	<ul style="list-style-type: none"><li>- traitement de la pollution</li></ul>
Cosmétique	<ul style="list-style-type: none"><li>-préparation des masques faciaux</li></ul>
Industrie pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compléments alimentaires</li><li>- Traitement du reflux gastrique</li><li>- Traitement du cancer</li></ul>

### III.5. Études expérimentales sur l'utilisation des alginates dans la conservation des spermatozoïdes

Les alginates ont été largement étudiés pour leur utilisation dans la cryoconservation des spermatozoïdes. Des études ont souvent été réalisées sur des animaux tels que les bovins, les porcs, les lapins et les espèces aviaires pour évaluer l'efficacité de l'alginate en tant qu'agent de conservation et de préservation de la viabilité des spermatozoïdes.

Dans une étude récente, menée par **Feyzmanesh et al. (2022)**, l'effet de l'alginate sur les paramètres du sperme humain pendant la congélation et la décongélation a été examiné. Les chercheurs ont comparé l'efficacité de l'alginate à celle du milieu de conservation couramment utilisé. Les résultats ont montré que l'alginate pouvait prévenir la réaction prématurée de l'acrosome des spermatozoïdes et protéger l'ADN des spermatozoïdes contre la dénaturation lors du processus de congélation rapide.

Une autre étude, réalisée par **Kumar et al. (2019)**, a utilisé des solutions d'alginate pour la cryoconservation des spermatozoïdes de taureaux. Les résultats ont indiqué que l'alginate de sodium augmentait la capacité antioxydante de l'extenseur de sperme. La supplémentation en alginate de sodium a également amélioré la capacité de chélation des métaux et les propriétés antibactériennes de l'extenseur.

En conclusion, les études expérimentales ont montré que les alginates sont prometteurs pour la conservation des spermatozoïdes. Leur capacité à protéger les spermatozoïdes contre les dommages causés par la congélation-décongélation en fait une option attrayante pour améliorer les techniques de conservation des spermatozoïdes utilisées en reproduction animale et humaine.

# Chapitre IV

## Chapitre IV: la vitamine E

---

La vitamine E est un nutriment important qui joue un rôle crucial dans le maintien de la santé. Elle est un antioxydant naturel qui aide à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Dans cette perspective, la vitamine E est considérée comme un élément clé pour maintenir la qualité des spermatozoïdes. En effet, plusieurs études ont montré que la vitamine E peut prévenir les dommages oxydatifs et améliorer la motilité et la survie des spermatozoïdes. Dans ce chapitre, nous allons explorer en détail les effets de la vitamine E sur la santé des spermatozoïdes, en présentant les dernières avancées dans le domaine de la recherche (Asadpour et al., 2011).

### IV.1.C'est quoi la vitamine E :

La vitamine E est un nutriment essentiel pour le corps humain, agissant comme un antioxydant naturel qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs. Elle est liposoluble et se trouve principalement dans les aliments gras tels que les huiles végétales, les noix, les graines et les avocats. La vitamine E existe sous plusieurs formes et joue un rôle crucial dans la prévention des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives et des cancers. Elle est également reconnue pour ses effets bénéfiques sur la santé reproductive, notamment en ce qui concerne la qualité des spermatozoïdes. La vitamine E est souvent utilisée sous forme de complément alimentaire ou de traitement médical pour améliorer la fertilité masculine. Dans l'ensemble, la vitamine E est un nutriment clé pour la santé globale du corps, et il est important de maintenir une consommation adéquate afin de bénéficier pleinement de ses bienfaits. Cette vitamine fait partie de la famille des tocophérols, comprenant quatre substances : l'alpha-tocophérol, la forme biologiquement la plus active qui est la vitamine E, le bêta-tocophérol, le gamma-tocophérol et le sigma-tocophérol. Les tocotriénols (alpha, bêta, gamma et sigma) sont des composés structurellement très proches des tocophérols. En 1982, la Commission mixte de l'Union internationale de chimie pure et appliquée et de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire a décidé d'utiliser le terme "vitamine E" pour englober les huit dérivés (Cuvelier et al., 2003)

### IV.2. La structure de la vitamine E

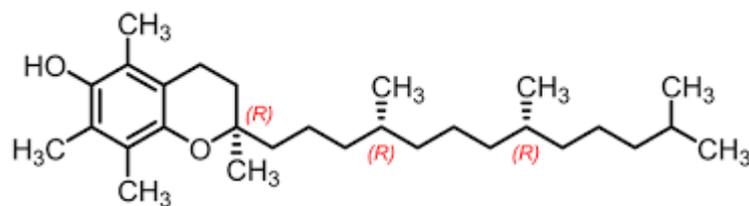
La structure chimique de la vitamine E peut être plus précisément décrite comme un dérivé de l'hydroxychromane (ou chromanol), un composé organique comprenant un noyau aromatique de type phénolique avec un atome d'oxygène en position 3 et un groupe méthyle en position

La chaîne latérale isoprénoïde est liée à l'atome de carbone en position 2 et peut être décrite comme une unité de répétition d'isoprène. Cela signifie que la chaîne latérale est composée de cinq atomes de carbone reliés les uns aux autres avec des liaisons doubles et simples alternées.

La vitamine E comprend huit formes différentes qui se différencient par la nature et la position des groupes méthyle sur la chaîne isoprénoïde. Les quatre formes de tocophérols ont des groupes méthyle en positions 5, 7, 8 et 2', tandis que les quatre formes de tocotriénols ont des groupes méthyle en positions 3, 5, 7 et 8. L'alpha-tocophérol est la forme la plus active et est caractérisée par des groupes méthyle en positions 5, 7 et 8 sur la chaîne isoprénoïde. (Cuvelier et al., 2003).

#### IV.2.1. La structure des tocophérols

Les tocophérols sont constitués d'un noyau chromanol mono-, di- ou tri- méthyl et d'une chaîne saturée à seize atomes de carbone. Les quatre types de tocophérols diffèrent entre eux par la position et le nombre de groupement méthyl sur le noyau chromanol. (Cuvelier et al., 2003).



**d- $\alpha$ -Tocopherol**

**Figure N°6:** structure chimique des tocophérols.

## Chapitre IV: la vitamine E

### IV.2.2. La structure des tocotriénols

Les tocotriénols diffèrent chimiquement des tocophérols par le caractère insaturé de leur chaîne latérale ; c'est-à-dire leur structure se compose également d'un noyau chromanol mono-, di- ou tri- méthyl avec une chaîne carbonée latérale qui contient 3 double liaisons en position 3', 7' et 11' (Cuvelier *et al.*, 2003).

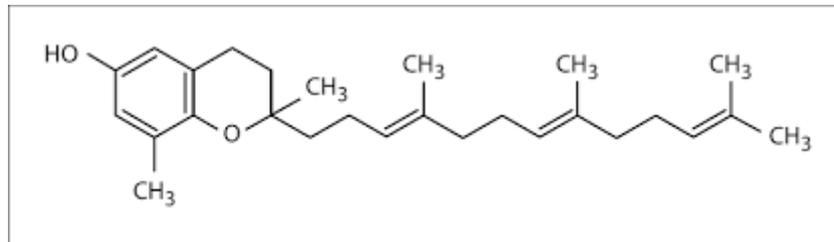


Figure N°7: la structure chimique des tocotriénols.

### IV.3. La biosynthèse de la vitamine E

Cette action s'effectue dans les plantes, les algues et certain plante non photosynthétique telles que les champignons mais pas chez les animaux. La biosynthèse de la vitamine E s'effectue en deux voies ; la voie des tocophérols et la voie des tocotriénols (Cuvelier *et al.*, 2003).

#### a. la voie des tocophérols :

Après une réaction de décarboxylation, une molécule de diphosphate est ajoutée au carbone 6 de l'acide homogentisique, formant ainsi la molécule de 2-méthyl-6-phytylplastoquinol ou phytyltoluquinol. Une méthylation en position 3 se produit ensuite, donnant lieu à la formation de la molécule de 2,3-diméthyl-6-phytylplastoquinol. Cette molécule subit ensuite une étape de cyclisation, ce qui conduit à la formation du gamma-tocophérol. Par ailleurs, une deuxième méthylation en position 5 permet d'obtenir l'alpha-tocophérol. La procédure exacte de synthèse pour les deux autres molécules (sigma et bêta) n'a pas été clairement élucidée (Cuvelier *et al.*, 2003).

#### b. la voie des tocotriénols :

## Chapitre IV: la vitamine E

L'acide homogentisique réagit avec la molécule géranylgeranyl pyrophosphate pour former le 6-géranylgeranyltoquinol, qui est ensuite transformé en sigma-tocotriénol. Des méthylation supplémentaires sont effectuées pour donner naissance aux autres molécules de tocotriénol (alpha, bêta et gamma). Par la suite, la chaîne latérale peut être saturée pour former l'alpha-tocophérol (Cuvelier et al., 2003).

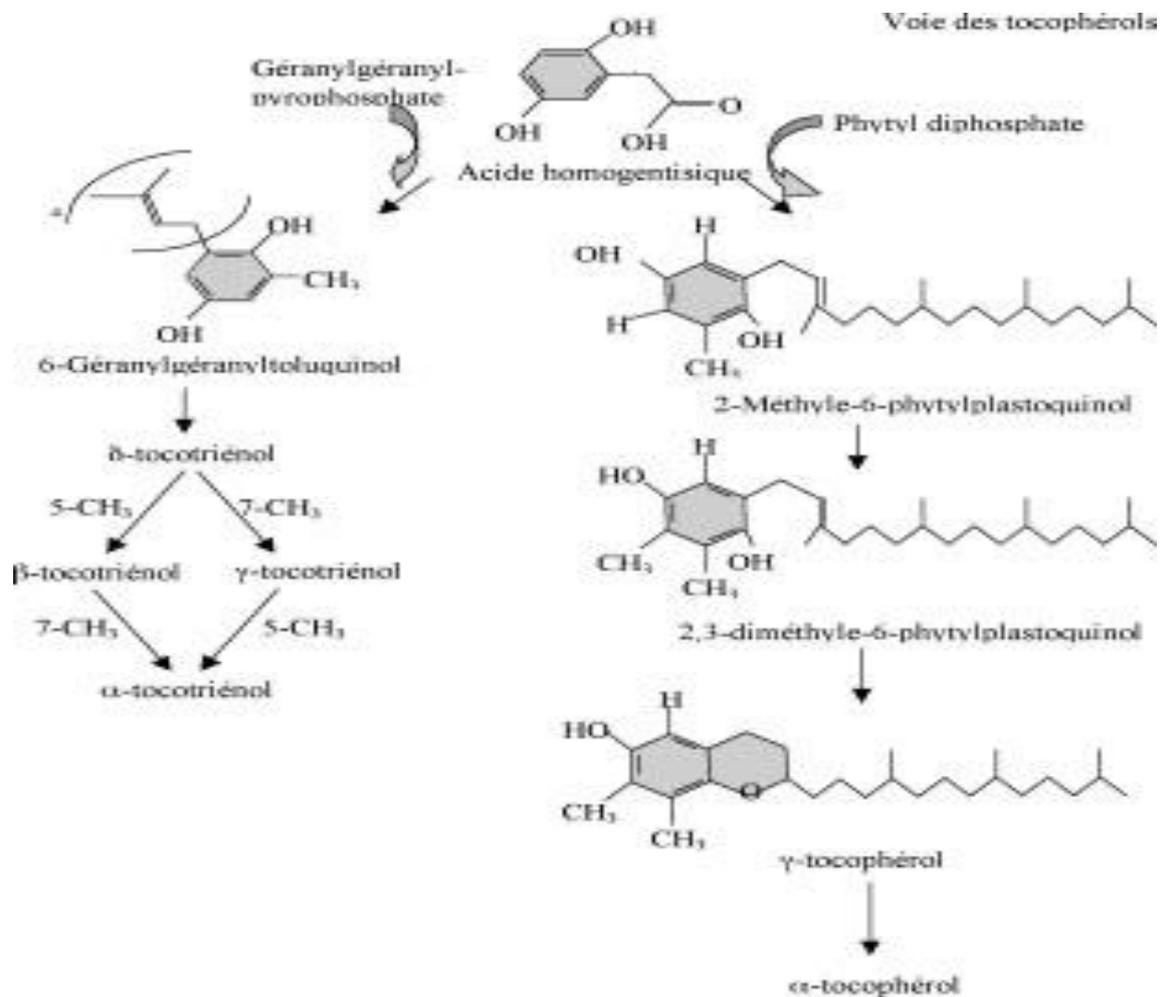


Figure N°8 : la biosynthèse de la vitamine E (Cuvelier et al.,2003).

### IV.4. Métabolisme cellulaire de la vitamine (absorption et distribution) :

## Chapitre IV: la vitamine E

---

### **a. Absorption :**

Les tocophérols sont absorbés de manière similaire aux graisses alimentaires, c'est-à-dire sous forme de micelles dans l'intestin grêle. L'absorption est plus importante dans la partie proximale de l'intestin chez l'homme et dans la partie moyenne chez le rat. Le taux d'absorption de l' $\alpha$ -tocophérol, la forme la plus courante de vitamine E, est d'environ 70% chez l'homme et proche de 65% chez le rat. Il n'y a pas de concurrence entre l' $\alpha$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérol chez le rat. L'absorption des tocophérols et des tocotriénols est principalement influencée par l'état de la paroi intestinale ainsi que par la fonction des sécrétions biliaires et pancréatiques. Ainsi, en cas d'insuffisance pancréatique ou de cholestase, les taux plasmatiques de vitamine E sont réduits chez l'homme et le rat en raison de l'altération de la digestion et de l'absorption des graisses.

Les fibres alimentaires ont des effets variables sur l'absorption de la vitamine E, mais leur effet précis reste peu concluant. De plus, l'ajout de gomme de guar à l'alimentation peut réduire la concentration plasmatique de cholestérol et peut-être de vitamine E, bien que le mécanisme exact reste controversé (Cuvelier et al., 2003).

### **b. La distribution :**

La vitamine E contenue dans les chylomicrons est transportée dans le foie lors de leur captage hépatique, mais une partie peut suivre d'autres voies, comme le transfert vers les autres tissus ou les autres classes de lipoprotéines. La fraction captée par le foie peut être stockée, dégradée ou sécrétée dans la bile. (Borel et al., 2016)

### **IV.5. Le catabolisme de la vitamine E**

Le métabolisme de la vitamine E est principalement localisé dans le foie, les processus de dégradation du métabolisme hépatique restent mal compris. Toutes les formes de vitamine E suivent la même voie métabolique et le catabolisme se produit dans différents compartiments cellulaires. Les métabolites de la vitamine E sont excrétés via l'urine et les selles. La dégradation métabolique de l' $\alpha$ -Tocophérol se produit presque exclusivement dans le foie et implique

## Chapitre IV: la vitamine E

---

plusieurs étapes d'oxydation et de  $\beta$ -oxydation, conduisant finalement à la formation de métabolites à chaîne courte et moyenne. (Guiga.,2019).

### IV.6.La fonction antioxydante de la vitamine E

De nombreuses études ont été menées sur la fonction antioxydante de la vitamine E. Selon Claude-Louis Leger, elle est considérée comme "l'antioxydant majeur des milieux lipidiques tels que les huiles, les membranes biologiques et les lipoprotéines". En tant qu'antioxydant liposoluble, elle joue un rôle essentiel dans la protection des membranes contre les dommages causés par la peroxydation lipidique. Parmi ses formes, l'alpha-tocophérol est considéré comme le plus actif chez l'homme pour remplir cette fonction d'antioxydation (Guiga, 2019).

La vitamine E est utilisée dans différents contextes pathologiques et environnementaux, mais son rôle dans la prévention du cancer n'est pas établi. Son rôle préventif dans les maladies neurodégénératives fait l'objet de recherches en cours. La vitamine E suscite un intérêt particulier dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Leger, 2000).

### IV.7.Effets de la vitamine E sur les paramètres du sperme

Les paramètres du sperme jouent un rôle clé dans la fertilité humaine et animale. La vitamine E peut apporter des avantages significatifs en améliorant les paramètres du sperme, ce qui peut avoir un impact positif sur la fertilité d'un individu. Cette vitamine a un impact sur le nombre de spermatozoïdes, leur motilité, le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire, les anomalies morphologiques des spermatozoïdes ainsi que leur viabilité (Moumeni et al., 2009; Sönmez et al., 2007; Momeni et al., 2012).

De plus, la vitamine E améliore la compétitivité et la qualité du sperme en réduisant les dommages oxydatifs, notamment en inhibant la génération de radicaux libres (ROS), grâce à ses propriétés antioxydantes (Almbro et al., 2011).

## Chapitre IV: la vitamine E

---

# Chapitre V

## Chapitre V : stress oxydatif

---

Le stress oxydatif est un processus physiologique qui survient lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dépasse la capacité de neutralisation des systèmes antioxydants. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses conditions médicales, notamment l'infertilité masculine. En effet, les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif en raison de la présence de grandes quantités de lipides insaturés qui sont susceptibles d'être oxydés. Par conséquent, trouver des moyens de protéger les spermatozoïdes de ce processus revêt une importance cruciale en termes de fertilité (**Haiba et al., 2014**).

### V.1. Définition du stress oxydant, radical libre et antioxydant

#### V.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre les radicaux libres, des molécules instables et réactives, et les antioxydants, des molécules qui protègent les cellules en neutralisant les radicaux libres. Les radicaux libres peuvent causer des dommages aux cellules et aux tissus en réagissant de manière destructive avec d'autres molécules.

Ce phénomène peut entraîner des dommages aux cellules, aux protéines, aux lipides et à l'ADN, conduisant à l'inflammation, au vieillissement accéléré et à des maladies chroniques. Les maladies chroniques associées au stress oxydatif incluent les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ainsi que d'autres troubles chroniques liés à l'inflammation (**Samaranayaka et al., 2010; Chakroun et al., 2008**).

#### V.1.2. Radical libre

Les radicaux libres sont des espèces chimiques hautement réactives qui peuvent être générées dans le corps lors de processus métaboliques normaux tels que la respiration cellulaire, ainsi que par des facteurs externes tels que l'exposition à des toxines environnementales, le tabagisme, les radiations ionisantes et les infections. Ces radicaux libres sont très instables et ont tendance à réagir rapidement avec d'autres molécules pour récupérer leur électron manquant, entraînant ainsi une réaction en chaîne de dommages oxydatifs (**Berger, 2006**).

## Chapitre V : stress oxydatif

---

On distingue deux types de radicaux libres : les radicaux primaires et les radicaux secondaires. Les radicaux primaires sont un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle spécifique en physiologie. Ils comprennent notamment l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ). Ces radicaux primaires peuvent réagir avec d'autres composés biochimiques de la cellule pour former des radicaux secondaires. Les espèces réactives de l'oxygène englobent à la fois les radicaux libres et leurs précurseurs. La réactivité de ces radicaux varie considérablement en fonction de leur nature. Certains radicaux sont peu réactifs, tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le monoxyde d'azote ( $\bullet NO$ ), tandis que d'autres sont extrêmement réactifs, tels que les radicaux peroxydes ( $ROO^{\bullet}$ ) et surtout le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ). Malgré leur réactivité, ces radicaux ne sont pas uniquement toxiques, mais peuvent également jouer des rôles physiologiques importants, tels que la destruction des bactéries à l'intérieur des cellules phagocytaires ou la régulation de fonctions cellulaires vitales (Favier, 2001).

## Chapitre V : stress oxydatif

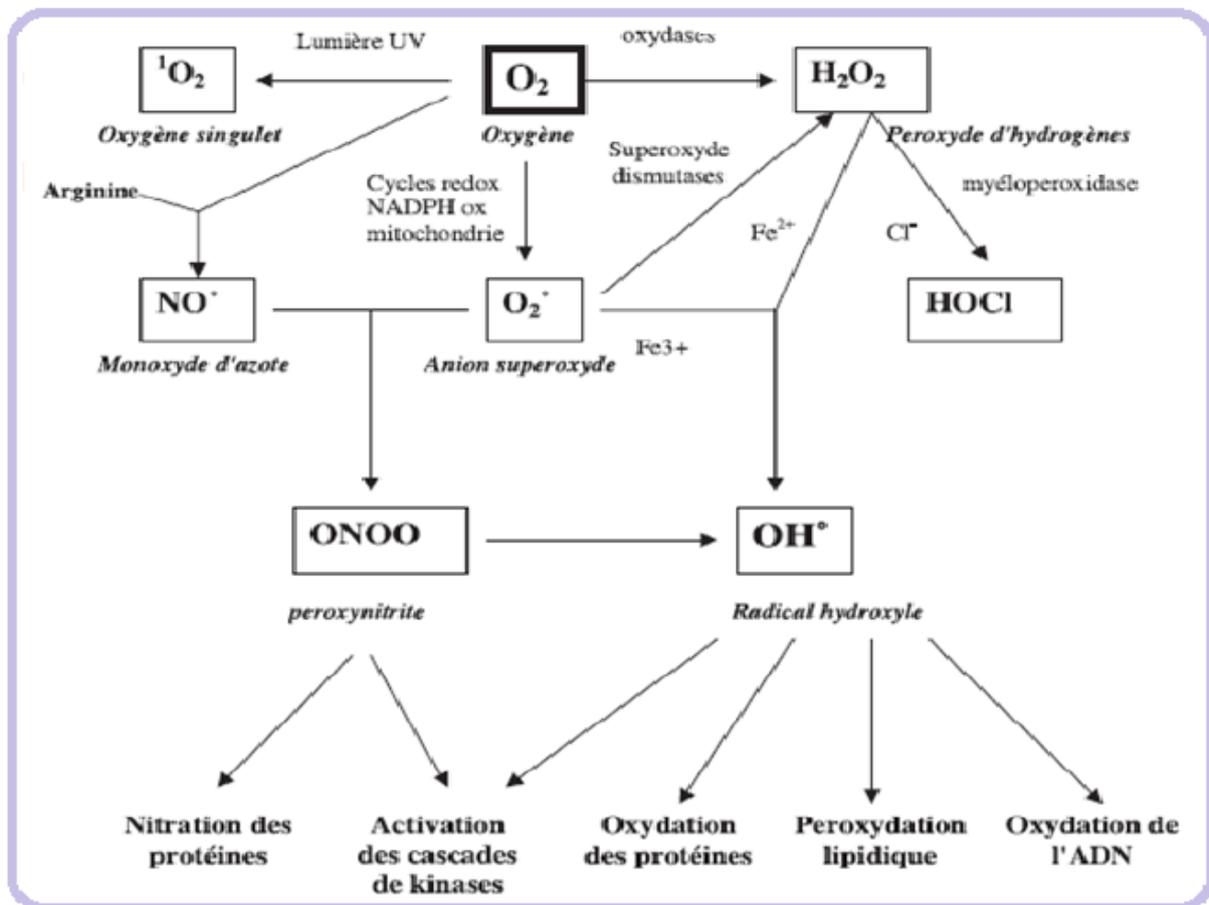


Figure N°9 : origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier.,2001)

### V.1.3. Antioxydant

Un antioxydant est une substance qui peut inhiber ou ralentir le processus d'oxydation d'un substrat chimique. Il agit en neutralisant les radicaux libres en leur fournissant des électrons pour réduire leur réactivité, ou en empêchant leur formation initiale.

Les antioxydants peuvent agir de manière directe ou indirecte en faisant partie de structures enzymatiques ou de cofacteurs d'enzymes antioxydantes. Leurs mécanismes d'action comprennent l'interruption de la cascade d'oxydation, la prévention des dommages en fournissant des électrons, et la réparation des molécules d'ADN endommagées. Les antioxydants sont interdépendants, et en donnant un électron pour neutraliser les radicaux libres, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent être équilibrés ou réduits par d'autres antioxydants dans une cascade d'activité antioxydante.

## Chapitre V : stress oxydatif

---

La famille du glutathion est considérée comme la défense antioxydante intra- et extracellulaire la plus importante contre l'oxydation. Elle agit en régénérant les antioxydants oxydés et en les maintenant dans un état actif pour continuer à neutraliser les radicaux libres (**Berger, 2006**).

### V.2. Les facteurs influençant le stress oxydatif

#### V.2.1. Les facteurs intensifiant la production des ERO

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer la production de ces espèces, notamment :

- l'activité sportive intense peut augmenter les dépenses énergétiques et la consommation d'oxygène, ce qui peut entraîner un stress oxydatif accru.
- l'ischémie des tissus, cela peut entraîner une augmentation des dommages oxydatifs associés à l'inflammation.
- l'hypertension artérielle ; la libération de monoxyde d'azote peut entraîner une hypoperfusion cérébrale et la génération d'ERO, qui peuvent ensuite causer des dommages tissulaires et contribuer au développement de l'œdème cérébral. (**Bensakhria.,2018**).

#### V.2.2. Les facteurs réduisant la production des ERO

- malnutrition : comme les régimes alimentaires déséquilibrés
- déficits enzymatique comme le déficit en G6PD (**Bensakhria.,2018**).

### V.3. Conséquences cellulaires du stress oxydatif

Les effets du stress oxydatif sur les cellules peuvent être variés et dépendent de la dose de stress ainsi que du type cellulaire concerné. **La figure N°10** illustre ces variations.

À de faibles niveaux de stress oxydatif, on observe une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'expression de protéines d'adhésion. Cependant, des niveaux modérés de stress peuvent favoriser l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée. À des doses élevées de stress oxydatif, on peut observer une nécrose cellulaire, tandis que des doses extrêmement élevées peuvent entraîner une désorganisation de la membrane cellulaire et une lyse immédiate.

## Chapitre V : stress oxydatif

Le stress oxydatif peut perturber d'autres processus biologiques tels que la fluidité des membranes, la fonction des récepteurs, la sensibilité à l'insuline, l'immunité cellulaire, la formation de fibrose, les dépôts de lipides et affaiblir les muscles. Il peut également causer la mort neuronale ou favoriser l'apparition de mutations génétiques.

En outre, le stress oxydatif est associé à diverses anomalies pathologiques telles que des mutations génétiques, la carcinogenèse (formation de cancers), des malformations chez les fœtus, des dépôts anormaux de protéines, la fibrose, la formation d'auto-anticorps, l'accumulation de lipides oxydés et l'immunosuppression (affaiblissement du système immunitaire) (Favier, 2006). Ces effets soulignent l'importance de maintenir un équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les antioxydants pour préserver la santé des cellules et des tissus.

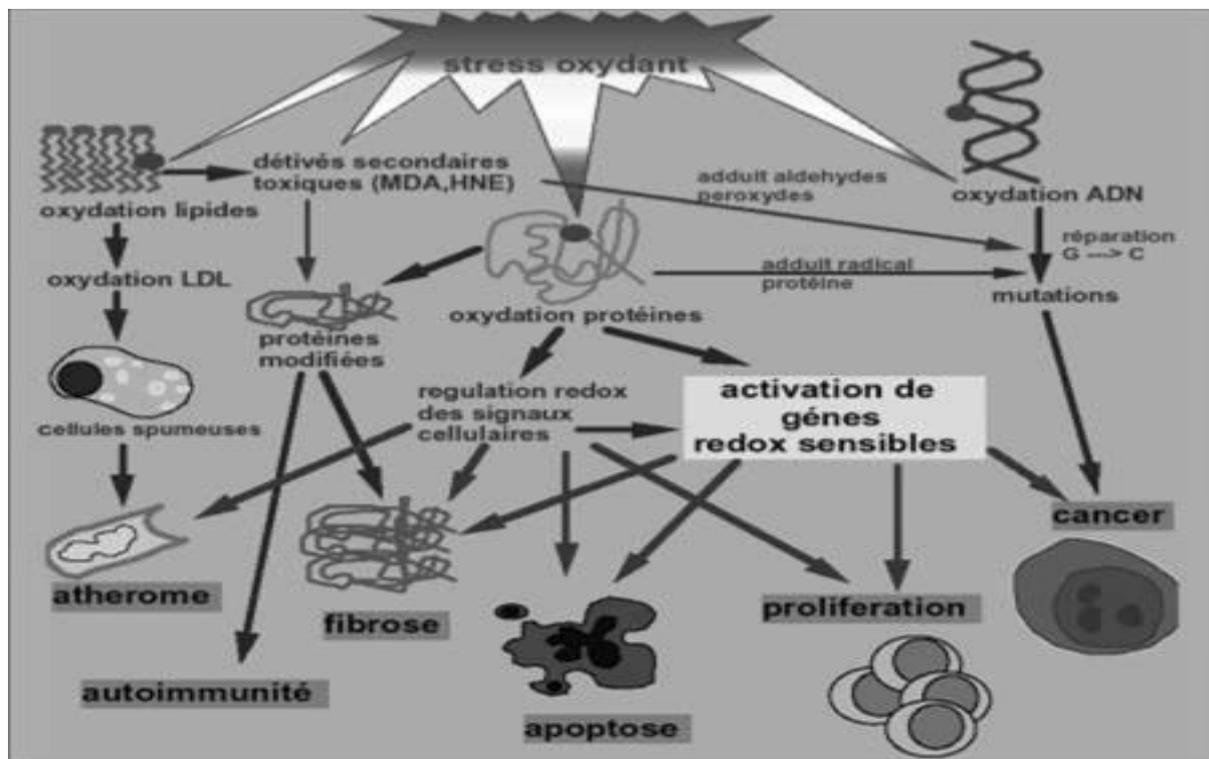


Figure N°10: conséquences pathogènes du stress oxydatif (Favier, A.2006).

## Chapitre V : stress oxydatif

### V.4. Les moyens de lutte contre le stress oxydatif

#### V.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques constituent la première ligne de défense contre le stress oxydatif et sont principalement représentés par les enzymes suivantes :

**Tableau N° II : les antioxydants enzymatiques et leurs fonctions (Bensakhria.,2018).**

Antioxydant	Fonction
Le superoxyde dismutase (SOD)	Élimine l'anion superoxyde par dismutation, réduisant ainsi la disponibilité de $O_2^{\circ-}$ et limitant la cascade radicalaire ( $OH^{\circ}$ , $ONOO-$ ). Le $H_2O_2$ est pris en charge par des enzymes de relais.
La catalase	Cette enzyme héminique ubiquitaire, située à l'intérieur des globules rouges, élimine le $H_2O_2$ par dismutation en deux étapes.
Le système glutathion peroxydase / glutathion réductase (GPx/GR)	Élimine 70% des peroxydes organiques et 94% de $H_2O_2$ par réduction.
Les thiorédoxine peroxydases (Trx)	Éliminent le $H_2O_2$ , les $ROOH$ et les $ONOO-$ par réduction.

#### V.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Il existe plusieurs antioxydants non enzymatiques qui jouent un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydatif.

La vitamine E est un puissant antioxydant pour les structures lipidiques, ce qui signifie qu'elle protège les lipides contre l'oxydation. Elle a également la capacité de neutraliser l'oxygène singulet, une forme réactive de l'oxygène. La vitamine C agit comme un agent réducteur et chélateur, ce qui lui permet de réagir directement avec les radicaux libres et d'éliminer le peroxyde d'hydrogène.

## Chapitre V : stress oxydatif

---

Les caroténoïdes, tels que le  $\beta$ -carotène, sont des précurseurs de la vitamine A et ils interrompent le processus de peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux libres. Les flavonoïdes, également connus sous le nom de vitamine P, et la coenzyme Q10 sont également des antioxydants qui contribuent à la protection contre le stress oxydatif.

Certains oligoéléments, tels que le sélénium et le zinc, sont des cofacteurs de certaines enzymes antioxydantes, telles que la glutathion peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD1) et la SOD3. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la neutralisation des radicaux libres.

Les protéines transporteuses, comme la transferrine, et le fer séquestrent les métaux impliqués dans la génération des espèces réactives de l'oxygène, contribuant ainsi à prévenir les dommages oxydatifs.

Le glutathion, un tripeptide naturel, agit comme un cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes, notamment la GPx. Il joue un rôle essentiel dans la réduction des protéines oxydées en se liant aux espèces électrophiles. De plus, le glutathion est capable d'éliminer directement les espèces réactives de l'oxygène telles que le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. Il peut également former des adduits non toxiques en interagissant avec le 4-HNE, un composé réactif généré lors du stress oxydatif.

En résumé, ces antioxydants non enzymatiques, tels que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes, la coenzyme Q10, le sélénium, le zinc, le glutathion et les protéines transporteuses, jouent tous un rôle important dans la protection contre le stress oxydatif et la neutralisation des radicaux libres (**Bensakhria, 2018**).

### **V.4.3.La réparation de l'ADN**

Ce mécanisme intervient lorsque les antioxydants enzymatiques et non enzymatique s'avèrent insuffisants pour empêcher les lésions et réparer les risques mutagènes. (**Bensakhria.,2018**).

# Partie pratique

# Matériel & méthodes

## Matériel & méthodes

---

Le travail expérimental de ce mémoire a été effectué au sein du laboratoire de biologie et physiologie animale de l'université de Bejaïa, durant la période d'avril à juin 2023. L'objectif de cette étude est la solubilisation de la vitamine E par l'encapsulation avec le polymère d'alginate afin d'améliorer les conditions de conservation du sperme.

### I. Matériel

- Alginate de sodium, chitosane, vitamine E, acide acétique, chlorure de calcium, cholestérol, agitateur magnétique, seringue, bicher, fiole, balance électrique, cristalliseur, papier filtre, l'eau distillé, éprouvette.



**Figure N°11** : matériel utilisé dans la préparation des billes.

## Matériel & méthodes

---

- Flacon, bécher, ultraturax, seringue, filtre seringue, vial, fiol.



**Figure N°12** : matériels utilisés dans la préparation de la phase mobile HPLC.

- Sperme frais, Tris, Des milieux préparés (alginate-vit E, alginate-cholestérol), Une micropipette de 1000 UL et 100 UL, Seringue, Solution de NaCl, Un bécher, Une spatule, Une fiole de 100 ml, Une lame de bistouri, Des Eppendorfs

## II. Méthodes

### II.1. La préparation de billes d'alginate-vitamine E

#### A. Préparation de la solution d'alginate :

L'alginate de sodium (0,25) a été dissous dans 25ml d'eau distillée pour obtenir une solution concentrée. La solution obtenue a été mélangée pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Après l'agitation, la solution d'alginate a été versée dans un bécher contenant 0,05g de la vitamine E et a été agité pendant 1h pour s'assurer que la vitamine E est bien dispersée dans la solution.

## Matériel & méthodes

---

### **B. Préparation de la solution de chitosane :**

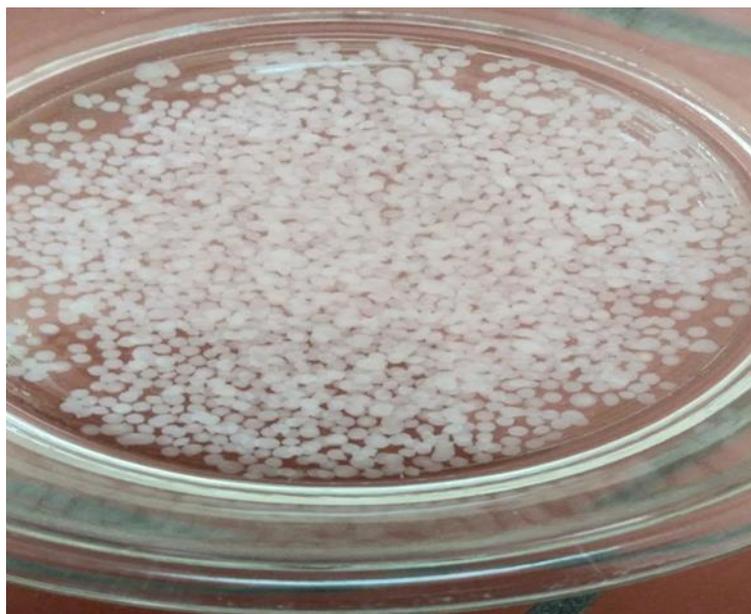
Le chlorure de calcium (1g) a été versé dans une fiole de 25ml qui contient une petite quantité d'eau distillée. Ensuite, (0,25g) d'acide acétique a été ajouté et ajusté avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Cette solution a été agitée pendant 45min.

### **C. La gélification :**

La solution d'alginate et la vitamine E ont été ajoutées goutte à goutte dans la solution de chitosane en utilisant une seringue. Le chitosane forme une membrane autour de chaque goutte de la solution d'alginate, encapsulant ainsi la vitamine E.

### **D. Rinçage des billes :**

Les billes ont été rincées avec de l'eau distillée à plusieurs reprises et ont été filtrées afin d'éliminer les traces de chlorure de calcium et l'acide acétique après leur retrait de la solution de chitosane.



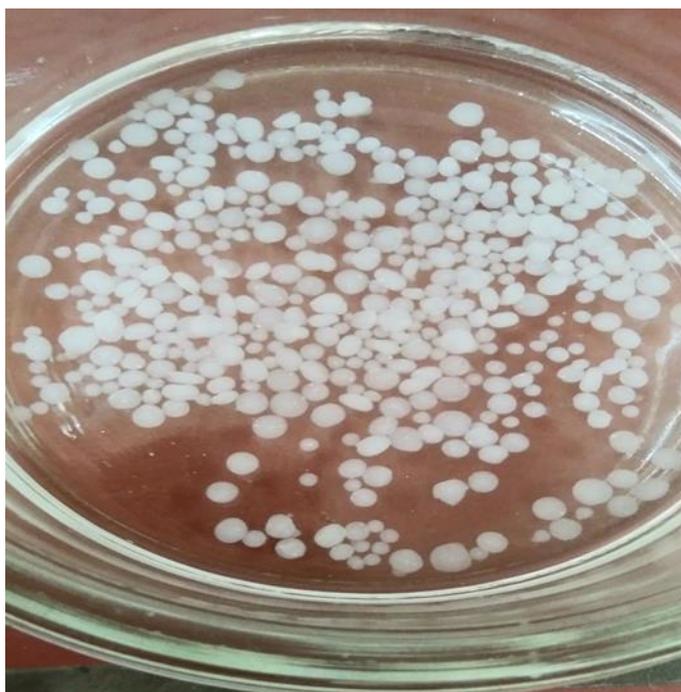
**Figure N° 13 :** la forme de billes d'Alg-vitE.

### **E. Séchage des billes :**

Les billes ont été isolées dans l'étuve et laissées sécher.

### **II.2.Préparation de billes d'alginate-cholestérol**

Nous avons effectué les mêmes étapes de préparation de billes d'alginate-vitamine E



**Figure N° 14 :** la forme de billes d'Alg-chol.

### **II.3.Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

Pour déterminer le taux d'encapsulation de la vitamine E dans les billes d'alginate nous avons effectué une analyse HPLC.

- **Préparation de la phase mobile**

**Etape du protocole**

## Matériel & méthodes

---

Pour préparer la phase mobile de l'analyse HPLC nous avons suivi le protocole suivant :

1. Nous avons préparé un flacon pour peser (0.5g) de billes Alg-VitE.
2. Nous avons utilisé un bicher pour solubiliser les billes dans 25ml de méthanol (solvant)
3. Ensuite, nous avons utilisé un ultraturax pour éclater les billes.



**Figure N°15 : ultraturax.**

4. Nous avons pris une seringue et y placé la solution obtenue pour la transférer dans la vial.
5. Pour filtrer la solution, nous avons utilisé un filtre seringue afin d'éliminer les particules indésirables et obtenir des solutions claire.

### **En ce qui concerne les conditions HPLC :**

1. Nous avons préparé la phase mobile en mélangeant 136ml de méthanol, 56ml d'acétonitrile et 8ml d'eau distillée.

## Matériel & méthodes

---

2. Nous avons soigneusement mélangé les composants jusqu'à obtenir une solution homogène.
3. Cette solution a été utilisée comme phase mobile dans l'analyse HPLC pour séparer et quantifier la vitamine E encapsulée dans l'alginate.

### II.4. Préparation de gel d'Alg-vitE et Alg-chol

Méthode suivie :

#### 1-Gels alginate-Vit E :

Nous préparons une solution en mélangeant 0,25g d'alginate dans 3ml d'eau, puis nous ajoutons 50mg de vitamine E et homogénéisons le mélange. Une fois la solution formée, nous pesons 0,006g de celle-ci et ajoutons ensuite 3ml de tris. Ensuite, cette nouvelle solution est agitée avec un ultraturax.

#### 2-Gel alginate-cholestérol :

La même procédure que celle de la vit E suivie pour la fabrication du gel.

### II.5. Test spermatique

#### II.5.1.Préparation de tris

Pour la préparation de 100mL de la solution de tris on aura besoin de 0,1g de pénicilline, 1,4 g d'acide citrique, 1g de fructose, 2,4g de tris et 100 ml d'eau distillée. (Taouzin et al.,2020)

La préparation consiste à mélanger tous les constituants dans un bécher et de les mettre dans un agitateur pour qu'ils s'homogénéisent.

#### II.5.2.Collecte d'échantillon de sperme

A partir d'une gonade d'espèce ovin, une incision se fait au niveau du corps épидидymaire, pour la séparation de la partie tête-queue de l'épididyme. A l'aide d'une seringue

## Matériel & méthodes

---

remplie de la solution NaCl qui se mit au canal déférent, une injection et une collecte du sperme après incision de la tête.

### II.5.3. Analyse du sperme

Cette analyse consiste à préparer trois échantillons et un contrôle.

Le contrôle est un mélange de 270 uL de tris + 30 uL du sperme. (Après l'analyse l'observation n'était pas bonne donc un ajout de 100 uL de tris est effectué et c'était la même chose pour les trois échantillons qui suivent).

Les trois échantillons sont :

- 270 uL de la solution de l'alginate-vit E + 30 uL de sperme
- 270 uL de la solution de l'alginate-cholestérol + 30 uL de sperme
- 270 uL d'alginate-vit E + 270 uL d'alginate-cholestérol + 30 uL de sperme

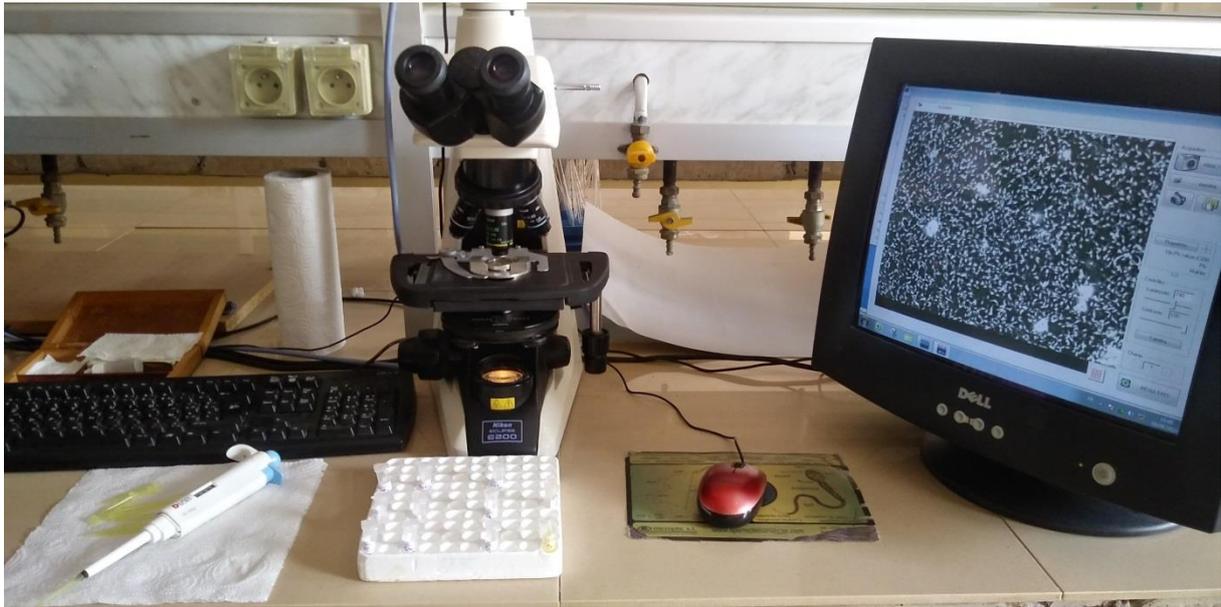


**Figure N°16** : les échantillons de traitement.

Pour chaque échantillon on prépare et on analyse trois préparations à T0 ; juste après manipulation, à T1 ; après 24h, à T2 ; après cinq jours et T3 ; après six jours. Notant que la conservation se fait à 4C°.

L'analyse a été réalisé par le CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) .

## Matériel & méthodes



**Figure N°17** : photo de CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis).

Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis ou analyse de sperme assistée par ordinateur) est un équipement qui permet d'évaluer de manière automatique, objective et standardisée la concentration, la mobilité, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes d'un échantillon. La plupart de ces systèmes sont basés sur des techniques d'analyse d'images. (Wilson-Leedy.,2006)

L'analyse informatique de la cinétique des spermatozoïdes a pour objet d'analyser la trajectoire des spermatozoïdes in vitro.

Il permet de générer un certain nombre de paramètres qui sont ; les différentes vitesses de progression, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, statiques, rapides et progressifs.

# Résultats & discussion

## Résultats & discussion

---

### I- Résultats pour les billes d'alginate-cholestérol et vitamine E

Le traitement que nous avons effectué en utilisant la solution Alg-vitE ou Alg-Chol dans le milieu de conservation n'a pas été couronné de succès. Après avoir effectué de test spermatique sur le logiciel CASA, nous avons constaté que les spermatozoïdes étaient immobiles. Il est possible que cela soit dû à la présence de résidus d'acide acétique qui n'a pas été totalement éliminé lors des rinçages de billes d'alginate. Comme nous n'avons pas eu le temps pour refaire la préparation de billes d'alginate ou d'effectuer d'autre rinçages, nous avons préparé un autre échantillon en utilisant un gel d'alginate contenant la vitamine E.

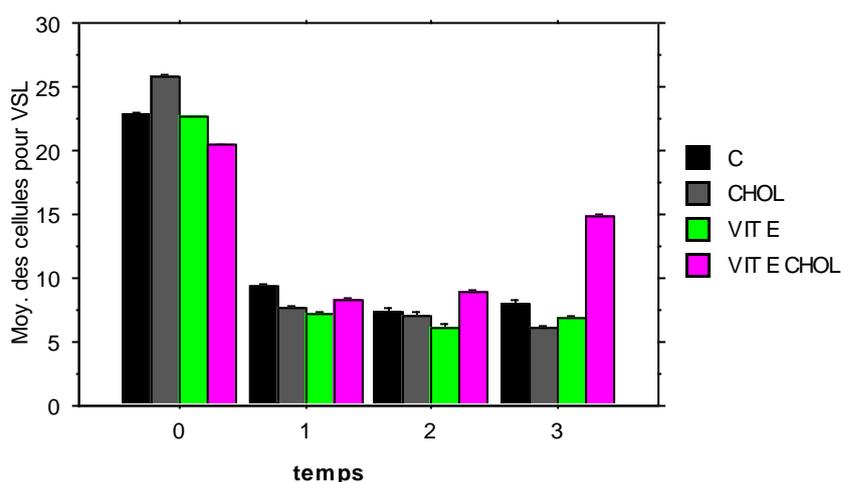
### II- Résultats pour les gels d'alginate cholestérol et vitamine E

#### II-1 Résultats

##### - Les résultats de la VSL

La figure 18 représente la moyenne des VSL (la vitesse en ligne droite moyenne parcourue par les spermatozoïdes) en fonction du temps, avec les quatre échantillons analysés pendant quatre différentes périodes. A T0 les quatre échantillons montrent les valeurs les plus élevées suivant l'ordre suivant : cholestérol (25,85 $\mu$ m/s), contrôle (22,86 $\mu$ m/s), vitamine E (22,59 $\mu$ m/s), vitamine E+ Cholestérol (20,40 $\mu$ m/s). A T1 une diminution remarquable des valeurs de la moyenne des cellules ; C (9,45 $\mu$ m/s), VIT E+CHOL (8,35 $\mu$ m/s), CHOL (7,71 $\mu$ m/s) et VIT E (7,20 $\mu$ m/s), avec un changement d'ordre des échantillons par rapport aux valeurs enregistrés. T2, correspondant à 24 heures de conservation, les valeurs enregistrées sont proches de celle de T1 avec une légère amélioration de l'échantillon VIT E+CHOL (8,85 $\mu$ m/s) par rapport aux autres C (7,31 $\mu$ m/s), CHOL (7,09 $\mu$ m/s) et VIT E (6,82 $\mu$ m/s) qui ont marqué une régression. A T3, nous pouvons observer une amélioration de l'échantillon VIT E+CHOL (14,78 $\mu$ m/s), suivie par C (7,97 $\mu$ m/s) puis vit E (6,82 $\mu$ m/s) et enfin CHOL (6,08 $\mu$ m/s).

## Résultats & discussion



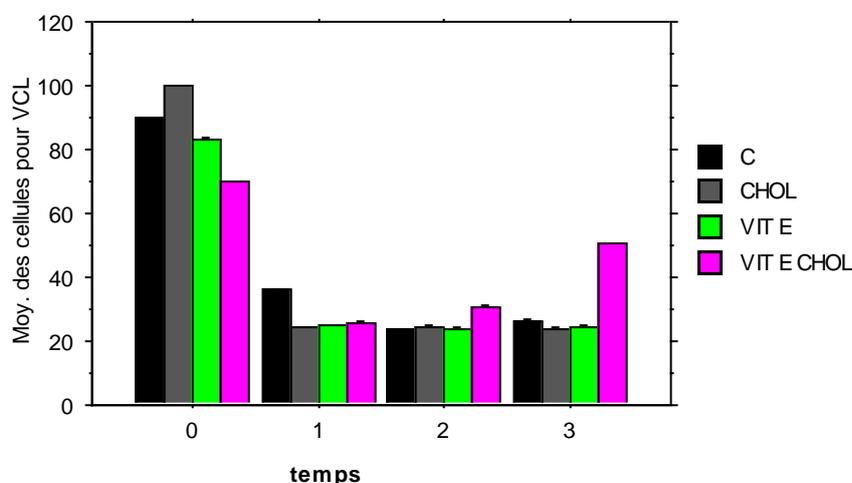
**Figure 18 :** Histogramme représentant les valeurs de la VSL dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérols solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.

### - Les résultats de la VCL

La figure 19 représente les valeurs de la VCL (la vitesse curviligne moyenne parcourue par les spermatozoïdes) en fonction du temps dans les différents traitements utilisés. À T0 tous les échantillons analysés montrent des valeurs supérieures par rapport à d'autres périodes d'analyse, notant que le cholestérol vient en première position avec  $100,06 \pm 0,21 \mu\text{m/s}$  suivie par le contrôle avec  $89,95 \pm 0,33 \mu\text{m/s}$  puis la VIT E avec  $83,33 \pm 0,21 \mu\text{m/s}$  et à la fin VIT E +CHOL avec  $69,99 \pm 0,28 \mu\text{m/s}$ . À T1, nous pouvons voir que les valeurs obtenues ont diminué de presque 50% comparativement à T0 et que la valeur la plus élevée c'est celle du contrôle avec  $36,18 \pm 0,23 \mu\text{m/s}$  suivie par VIT E+CHOL avec  $25,70 \pm 0,26 \mu\text{m/s}$  puis la VIT E  $24,79 \pm 0,30 \mu\text{m/s}$  et le cholestérol avec  $24,29 \pm 0,28 \mu\text{m/s}$ . À T2, les valeurs enregistrées sont presque celle de T1 mis à part la valeur de CHOL+VIT E est augmentée légèrement avec  $30,82 \pm 0,35 \mu\text{m/s}$  puis le CHOL  $24,09 \pm 0,70 \mu\text{m/s}$  et le contrôle  $23,45 \pm 0,54 \mu\text{m/s}$  et ensuite la fin la vit E avec  $23,57 \pm 0,52 \mu\text{m/s}$ . A T3, observons une augmentation significative de l'association CHOL+VIT E avec  $50,40 \pm 0,39 \mu\text{m/s}$  puis vient le contrôle en deuxième position avec  $26,40 \pm$

## Résultats & discussion

0,63 $\mu$ m/s et la VIT E 24,21  $\pm$  0,48 $\mu$ m/s et le CHOL en dernière position avec 23,96  $\pm$  0,42  $\mu$ m/s.



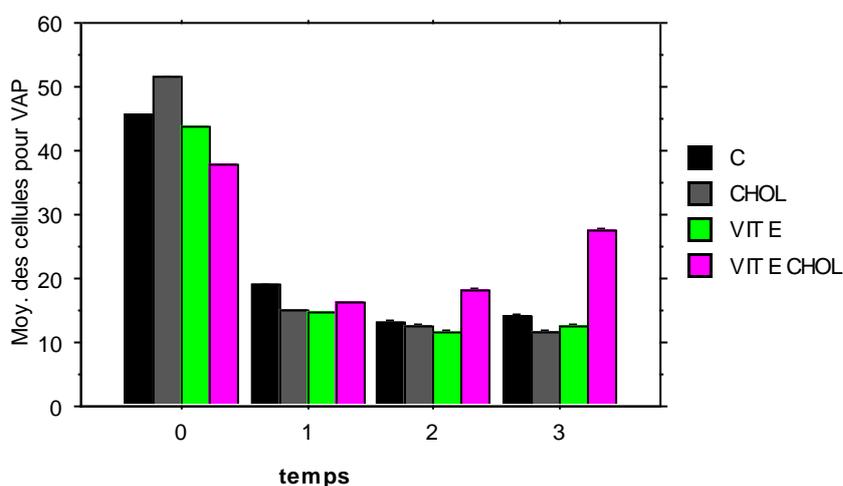
**Figure 19** : Histogramme représentant les valeurs de la VCL dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérols solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.

### - Les résultats de la VAP

La figure 20 représente les valeurs de la VAP (la vitesse moyenne du trajet parcourus par les spermatozoïdes) en fonction du temps. À T0, toutes les valeurs enregistrées marquent des valeurs supérieures par rapport aux autres périodes, où le CHOL montre 51,15  $\pm$  0,12 $\mu$ m/s suivi du contrôle avec 45,53  $\pm$  0,17 $\mu$ m/s et la VIT E qui vient en troisième position 43,66  $\pm$  0,11 $\mu$ m/s et en dernier l'association VIT E+CHOL avec 37,71  $\pm$  0,15 $\mu$ m/s. A T1, après conservation des échantillons pendant 24h, nous observons une diminution de la vitesse moyenne du trajet parcourus, où le contrôle vient en première position 18,92 $\pm$  0,13 $\mu$ m/s suivie par VIT E+CHOL avec 16,16  $\pm$  0,18 $\mu$ m/s puis le CHOL 14,95  $\pm$  0,17 $\mu$ m/s et enfin la VIT E 14,60  $\pm$  0,19 $\mu$ m/s. A T2, nous remarquons que les valeurs sont presque les valeurs de T1 avec une légère différence de la valeur de VIT E+CHOL qui marque une augmentation avec 18,23

## Résultats & discussion

$\pm 0,22\mu\text{m/s}$  et une diminution du reste des valeurs ; contrôle  $13,21 \pm 0,34\mu\text{m/s}$  le CHOL  $12,49 \pm 0,37\mu\text{m/s}$  et la VIT E avec  $11,56 \pm 0,29\mu\text{m/s}$ . A T3, nous pouvons aisément remarquer l'effet de l'ensemble VIT E+CHOL qui montre une valeur de  $27,48 \pm 0,22\mu\text{m/s}$  suivi du contrôle  $14,15 \pm 0,32\mu\text{m/s}$  et la VIT E avec  $12,55 \pm 0,27\mu\text{m/s}$  et en fin le CHOL avec  $11,69 \pm 0,25\mu\text{m/s}$ .



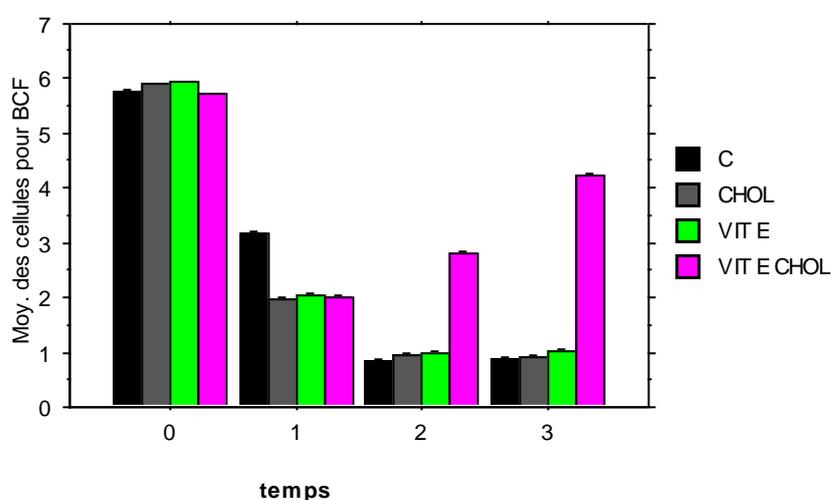
**Figure 20 :** Histogramme représentant les valeurs de la VAP dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérols solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.

### - Les résultats de la BCF

La figure 21 représente les valeurs de la BCF (la fréquence de battement des têtes des spermatozoïdes) en fonction du temps. À T0, tous les échantillons analysés montrent une fréquence de battement élevée avec une meilleure valeur pour la VIT E suivie par le CHOL, le contrôle et l'association VIT E+CHOL en dernier. À T1, une diminution de la fréquence est remarquable pour tous les échantillons où le contrôle vient en premier, suivie par la VIT E puis par VIT E+CHOL et le CHOL en dernier. A T2, la première observation que nous pouvons

## Résultats & discussion

remarquer c'est le changement de l'ordre des échantillons, où cette fois c'est la VIT E+CHOL qui montre la valeur la plus élevée. À T3, le VIT E+CHOL, est le seul échantillon qui montre une valeur supérieure à celle de T2 contrairement aux reste des échantillons qui garde presque les mêmes valeurs.



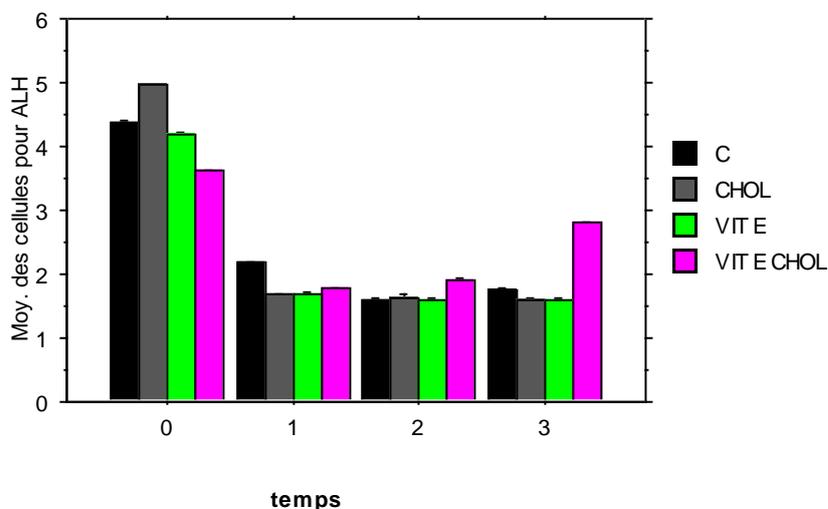
**Figure 21** : Histogramme représentant les valeurs de la BCF dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérols solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.

### - Les résultats de l'ALH

La figure 22 représente les valeurs de la l'ALH (l'amplitude de la tête des spermatozoïdes lors du mouvement) en fonction du temps. À T0, les quatre échantillons analysés montrent des valeurs supérieures à celle des autres périodes avec le CHOL en première position, suivie par le contrôle, la VIT E et VIT E+CHOL. À T1, nous remarquons une diminution et un changement de l'ordre de classement des échantillons où le contrôle est classé en premier suivi du VIT E+CHOL et en dernier les deux préparations VIT E et le CHOL. À T2, la VIT E+CHOL est classée en premier suivie par le CHOL puis par le contrôle et la VIT E en dernier. À T3, une

## Résultats & discussion

amélioration remarquable de l'amplitude de la tête est observée pour l'association VIT E+CHOL comparativement à T1 et T2.

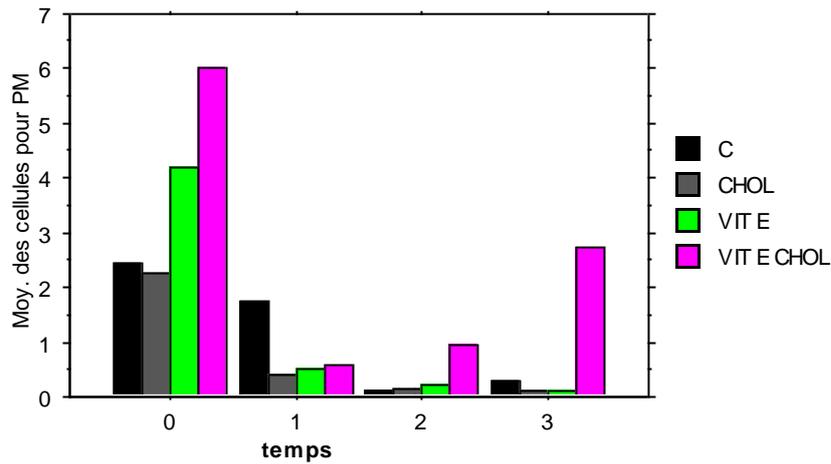


*Figure 22 : Histogramme représentant les valeurs de l'ALH dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérols solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.*

### - Les résultats des spermatozoïdes progressifs moyens

La figure 23 représente les pourcentages des spermatozoïdes PM (progressive moyenne) des quatre échantillons en fonction du temps. À T0, les quatre échantillons montrent des valeurs différentes dont la meilleure est celle de l'ensemble VIT E+CHOL. A T1, le contrôle reste le meilleur avec 2,4%. À T2, le meilleur enregistrement c'est celui de VIT E+CHOL, les trois autres échantillons montrent des valeurs presque nulles et à T3 c'est VIT E+CHOL les valeurs les plus élevées.

## Résultats & discussion

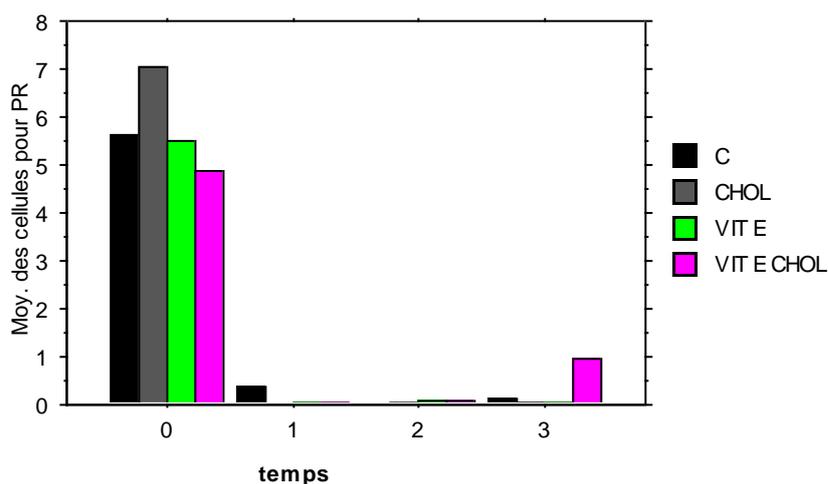


*Figure 23 : Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs moyens (PM) dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.*

### - Les résultats des spermatozoïdes progressifs rapides

La figure 24 représente les pourcentages des spermatozoïdes PR (progressive rapides). Nous pouvons voir qu'à partir de T1 les valeurs sont quasiment nulles et ce n'est qu'à partie de T3 qu'on observe de meilleures valeurs dans le groupe VIT E+CHOL.

## Résultats & discussion

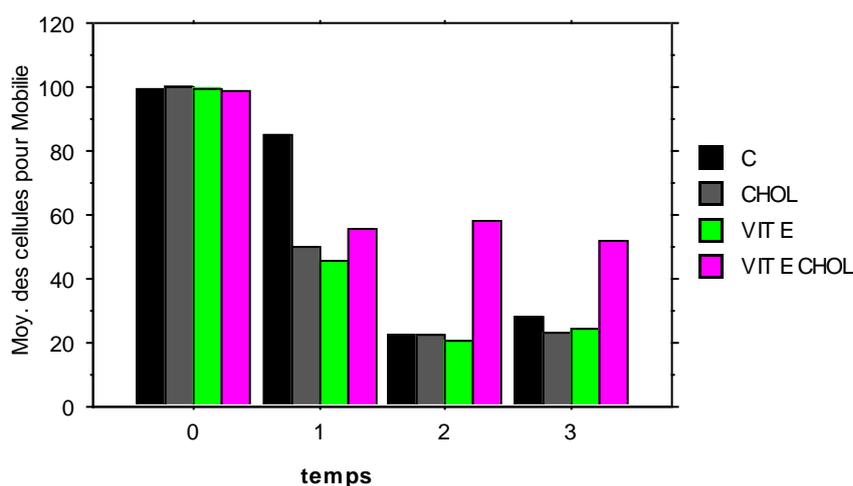


*Figure 24 : Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides (PR) dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.*

### - Les résultats des spermatozoïdes mobiles

La figure 25 représente les pourcentages des mobiles en fonction du temps dans les quatre traitements utilisés. À T0 les valeurs pour l'ensemble des échantillons sont quasiment similaires. Après 24h de conservation une diminution importante de la mobilité est observée à l'exception du contrôle. À T2 et T3 le traitement VIT E+CHOL montre les valeurs les plus élevées qui restent similaires à celles observées à T1.

## Résultats & discussion



*Figure 25 : Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes mobiles dans les groupes C (contrôle), CHOL (cholestérol solubilisée par l'alginate) VIT E (vitamine E solubilisée dans l'alginate) VIT E+ CHOL (vitamine E +cholestérol solubilisés par l'alginate) en fonction du temps de conservation à 4C.*

### II-2 Discussion

Les travaux d'Ibrahim et al. (2021) ont examiné l'effet de la vitamine E et du cholestérol chargé de cyclodextrine. Leurs résultats montrent que la cyclodextrine chargée d'alpha tocophérol, la cyclodextrine chargée de cholestérol ou leur combinaison améliorent significativement la motilité et les paramètres cinématiques après 24h à 4°C.

Parallèlement, l'étude de Taouzin et al. (2021), qui a examiné l'effet de la vitamine E chargée en liposome pour la protection du sperme bovin dans un milieu de cryoconservation, a montré que les liposomes chargés de vitamine E suivis de polyéthylène glycol (VIT E-CHOL) ont eu l'effet significatif le plus élevé sur tous les paramètres de motilité étudiés (VSL, VCL et VAP) après 48h de stockage au froid. De plus, la supplémentation individuelle en vitamine E ou en cholestérol a montré une amélioration des paramètres par rapport au témoin, et leur combinaison a montré une performance plus efficace.

## Résultats & discussion

---

Cependant, aucune étude antérieure n'avait exploré l'effet de l'assemblage de la vitamine E et du cholestérol encapsulés par l'alginate sur la motilité et les paramètres cinématiques du sperme. Nos résultats montrent une amélioration de l'ensemble des paramètres étudiés (VSL, VCL, VAP, BCF, ALH, PM, PR et mobilité) après cinq jours (à partir de T2).

Les similitudes entre nos résultats et ceux de l'étude d'Ibrahim et al. (2021) et de Taouzin et al. (2021) pourraient être attribuées à l'utilisation de méthodologies similaires, notamment l'encapsulation de la vitamine E et du cholestérol. De plus, les propriétés du cholestérol en tant que composant clé des membranes cellulaires et de la vitamine E en tant qu'antioxydant pourraient expliquer la cohérence des résultats concernant l'amélioration de la motilité du sperme.

# Conclusion

## Conclusion

---

### **Conclusion**

Le présent mémoire a pour objectif de solubiliser la vitamine E en l'encapsulant à l'aide d'un polymère d'alginate afin d'améliorer le milieu de conservation du sperme. En tant qu'antioxydant puissant, la vitamine E joue un rôle crucial dans la protection des spermatozoïdes contre les dommages oxydatifs, préservant ainsi leur fonctionnalité et leur capacité de fécondation.

Dans le cadre de notre travail, nous avons préparé un milieu de conservation du sperme contenant de la vitamine E pour lutter contre le stress oxydatif, du cholestérol pour renforcer la membrane plasmique et de l'alginate pour les solubiliser.

Les conclusions de cette étude indiquent que l'encapsulation de la vitamine E dans l'alginate présente des avantages pour la qualité et la survie des spermatozoïdes lors de leur conservation. De plus, ces résultats permettent de conclure que la combinaison d'Alg-vitE et d'Alg-chol est la formule la plus prometteuse, car elle offre une action complémentaire de l'alginate, de la vitamine E et du cholestérol. Cette approche ouvre des perspectives intéressantes pour améliorer les techniques de conservation du sperme et peut avoir un impact significatif dans le domaine de la reproduction assistée.

# Liste des références

**Akash, M. S. H. et Rehman, K. (2020).** Essentials of pharmaceutical analysis (pp. 29-56). Singapour:: Springer.

**Almbro, M., Dowling, D. K., & Simmons, L. W. (2011).** Effects of vitamin E and beta-carotene on sperm competitiveness. *Ecology Letters*, 14(9), 891-895.

**Asadpour, R., Jafari, R., & Tayefi-Nasrabad, H. (2011, March).** Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and tris-based extenders. In *Veterinary research forum* (Vol. 2, No. 1, pp. 37-44). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.

**Bensakhria, A. (2018).** Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.

**Berger, M. M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(1), 48-53.

**Borel, P. A., & Amiot-Carlin, M. J. (2016).** Absorption, métabolisme et effets santé de la vitamine E. *Lipid Nutri+*, (32), 1-6.

**Cohen-Bacrie, P. (2008).** Qualité et sélection du sperme. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 37, S4-8.

**Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017).** Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1133-1152.

**Chakroun Feki, N., Zribi, N., Eleuch, H., Gdoura, R., Sellami, A., Bahloul, A., ... & Keskes Ammar, L. (2008).** Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux chez l'homme infertile. *Andrologie*, 18(3), 197-205.

**Cuvelier, C., Dotreppe, O., & Istasse, L. (2003).** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét.*, 147, 315-324

**Decuadro-Hansen, G. (2004).** La réfrigération et la congélation du sperme: expérience chez l'animal. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 32(10), 887-893.

- Duceac, I. A., Stanciu, M. C., Nechifor, M., Tanasă, F., & Teacă, C. A. (2022).** Insights on Some Polysaccharide Gel Type Materials and Their Structural Peculiarities. *Gels*, 8(12), 771.
- Favier, A. (2006, November).** Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.
- Feyzmanesh, S., Halvaei, I., & Baheiraei, N. (2022).** Alginate Effects on Human Sperm Parameters during Freezing and Thawing: A Prospective Study. *Cell Journal (Yakhteh)*, 24(7), 417-423.
- Frent, O. D., Vicas, L. G., Duteanu, N., Morgovan, C. M., Jurca, T., Pallag, A., ... & Marian, E. (2022).** Sodium alginate—Natural microencapsulation material of polymeric microparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12108.
- Gavin-Plagne, L. (2018).** Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères dans un milieu synthétique et chimiquement défini (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- Goujon, I. (2004).** Les Alginates: excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique Application à la synthèse d'un gel chimique.
- Guiga, M. S. (2019).** *Vitamine E: métabolisme, rôle physiologique: intérêt et risques d'une supplémentation* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Haiba, F., Kerboua, K., Ait Hami, N., & Benmahdi, L. (2014).** Stress oxydatif et infertilité masculine: premiers résultats de l'expérience algérienne pilote à l'HMRUO/2 RM. *Revue Médicale de l'HMRUO*, 1, 2-7.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2018).** Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*, 37(3), 327-339.
- Hu, C., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2021).** Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 578-588

- Hurtado, A., Aljabali, A. A., Mishra, V., Tambuwala, M. M., & Serrano-Aroca, Á. (2022).** Alginate: Enhancement strategies for advanced applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4486.
- Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., ... & Yadav, P. S. (2019).** Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. *Animal reproduction science*, 209, 106166.
- Labbé, C., Blesbois, E., Leboeuf, B., Guillouet, P., Stradaioli, G., & Magistrini, M. (2002).** Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques: Protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes. *Proceedings of the Congrès Du Bureau Des Ressources Génétiques, La Châtre, France*, 15-17.
- Leger, C. L. (2000).** La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 7(3), 258-265.
- Martins, E., Poncelet, D., Rodrigues, R. C., & Renard, D. (2017).** Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. *Journal of microencapsulation*, 34(8), 754-771.
- Momeni, H. R., & Eskandari, N. (2012).** Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats.
- Mortimer, D. (2018).** The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 24(12), 567-592.
- Moumeni, h., soleymani, m. M., abnoui, m., & mahmoudi, m. (2009).** Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with par-nonylphenol.
- Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Lahiani-Skiba, M., Skiba, M., & Iguer-Ouada, M. (2022).** Drug Release, Stability And Efficiency Of Vitamin E Loaded In Liposomes For Bovine Sperm Protection In Cryopreservation Medium. *CryoLetters*, 43(1), 50-57.

**Salmon, M. V. (2015).** Le cholestérol comme agent cryoprotecteur pour la congélation des semences animales (Doctoral dissertation, Université Laval).

**Samaranayaka, A. G. P. (2010).** *Pacific hake (Merluccius productus) fish protein hydrolysates with antioxidative properties* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).

**Sathe, S. (2021).** Cryopreservation of semen. *Bovine reproduction*, 986-999.

**Silvestre, M. A., Yániz, J. L., Peña, F. J., Santolaria, P., & Castelló-Ruiz, M. (2021).** Rôle des antioxydants dans le stockage liquide refroidi des spermatozoïdes de mammifères. *Antioxydants*, 10(7), 1096.

**Sönmez, M., Yüce, A., & Türk, G. (2007).** The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 23(2), 226-231.

**Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022).** Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246, 106904.

## Résumé

L'étude a été menée pour déterminer l'intérêt des alginates et la vitamine E dans la conservation des spermatozoïdes. L'objectif principal de cette étude a été la solubilisation de la vitamine E, le cholestérol a également été utilisé dans les expériences. Deux méthodes de préparation ont été utilisées, la première consistait à préparer des billes d'alginate contenant de la vitamine E ou le cholestérol. Après avoir réalisé les traitements et effectué des analyses du sperme à l'aide du (CASA), nous avons observé que les spermatozoïdes étaient immobiles, signifiant un potentiel effet toxique probablement par les restes d'acide acétique utilisé dans la préparation. . La deuxième méthode a été mise en œuvre en préparant un gel d'alginate contenant de la vitamine E ou le cholestérol. La semence diluée a été répartie en quatre groupes et traitée comme suit : contrôle, avec de l'Alginate-vitamine E, avec de l'Alginate-cholestérol et avec l'association des deux (l'Alginate-vitamine E et l'Alginate-cholestérol) semence diluée additionné de l'Alg-vitE-chol et conservés à 4°C. Les échantillons ont été évalués à l'aide du CASA à plusieurs moments : t0, après 24h, après 48h et après 5 jours de conservations. Les résultats montrent l'intérêt de l'association de la vitamine E et du cholestérol les deux solubilisés par l'alginate.

## Abstract

The study was conducted to determine the interest of alginates and vitamin E in the conservation of spermatozoa. The main objective of this study was the solubilization of vitamin E, cholesterol was also used in the experiments. Two methods of preparation were used, the first consisted of preparing alginate beads containing vitamin E or cholesterol. After carrying out the treatments and carrying out semen analyzes using (CASA), we observed that the spermatozoa were immobile, signifying a potential toxic effect probably by the remains of acetic acid used in the preparation. . The second method was implemented by preparing an alginate gel containing vitamin E or cholesterol. The diluted semen was divided into four groups and treated as follows: control, with Alginate-vitamin E, with Alginate-cholesterol and with the combination of the two (Alginate-vitamin E and Alginate -cholesterol) diluted semen supplemented with Alg-vitE-chol and stored at 4°C. The samples were evaluated using CASA at several times: t0, after 24 h, after 48 h and after 5 days of storage. The results show the interest of the association of vitamin E and cholesterol, both solubilized by alginate.

## ملخص

أجريت الدراسة لمعرفة مدى فائدة الألبينات وفيتامين هـ في الحفاظ على الحيوانات المنوية. كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو إذابة فيتامين هـ ، كما تم استخدام الكوليسترول في التجارب. تم استخدام طريقتين للتحضير ، الأولى تتكون من تحضير حبيبات الألبينات المحتوية على فيتامين هـ أو الكوليسترول. بعد إجراء العلاجات وإجراء تحليلات السائل ، لاحظنا أن الحيوانات المنوية كانت غير متحركة ، مما يدل على وجود تأثير سام محتمل (CASA) المنوي باستخدام على الأرجح من بقايا حمض الأسيتيك المستخدم في المستحضر. . الطريقة الثانية تم تنفيذها عن طريق تحضير هلام الجينات المحتوي على فيتامين هـ أو الكوليسترول. تم تقسيم السائل المنوي المخفف إلى أربع مجموعات وعولجت على النحو التالي: مجموعة التحكم ، مع الألبينات - فيتامين إي ، مع الألبينات - الكوليسترول ومع مزيج من الاثنين (ألبينات - فيتامين إي والألبينات - كوليسترول) السائل المنوي المخفف مع ألج فيت - الكولي ويخزن في 4 درجات مئوية. تم تقييم ، بعد 24 ساعة ، بعد 48 ساعة وبعد 5 أيام من التخزين. تظهر النتائج t0: في عدة مرات CASA العينات باستخدام أهمية ارتباط فيتامين هـ والكوليسترول ، وكلاهما يذوب بواسطة الجينات