

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 :

Lundi 10H

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

MASTER

Thème

*Etude de l'intérêt des liposomes vitamine
E dans la conservation des
spermatozoïdes*

Présenté par :

MAAMACHE Fouad & LATRACHE Chaima

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mme: SAD-EDDINE Ouadaï

Président

Mr : IGUER OUADA Mokrane

Encadreur

Mme : RAHMANI Amina

Examineur

Année Universitaire : 2022/2023

Tout d'abord on remercie ALLAH le tout puissant qui nous a éclairé le chemin et nous a donné le courage, la volonté, la santé et la patience pour réaliser et mener à terme ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur M. IGEROUADA Mokrane, de nous avoir aidé et orienté, pour ses conseils et ses encouragements permanents, et d'avoir acceptée d'être notre promoteur.

Nous adressons nos sincères remerciements aux membres du jury, et nous remercions vivement : M. AYAD Abdelhanine de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Nous remercions également notre examinatrice : Mme. RAHMANI Amina, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.

Enfin, nous tenons à remercier sincèrement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Chaima et foua

Dédicaces

Avant tout, je dois rendre grâce à dieu de m'avoir donné le courage de terminer ce travail

Je dédie ce modeste travail

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, ma mère

À l'école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger, mon père

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte, je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir, puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie

*Et à ma chère sœur et ses petits, À mes chers frères
À tous mes amis. À mon binôme et sa famille*

Et à mon professeur

Chaima

Dédicaces

*A mes chers parents ; aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez fait pour
Mon instruction et mon bien être.*

*Que ce modeste travail soit la satisfaction de vos vœux tant formulés, le fruit de
Vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterais jamais assez.*

*A mon très cher frère Rayan ; puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et
vous aider*

*A tous mes chères amies ; Ayoub, Issam, Ala Edin, Housseem, Hicham, Kadhem
et Meriem, sara, imane, chaima.*

A ma chérie R

*Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles, que dieu te protège et
t'offre la chance
Et le bonheur et la joie.*

Merci d'être toujours à mes côtés.

Fouad

Table des matières

Liste des abréviations :	I
Listes des figures.	II
Listes des tableaux.	III
Introduction Générales	1

Partie Théorique

CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique

I . LES LIPOSOMES	3
I.1 Définition des liposomes	3
I.2 Morphologie des liposomes	3
I.3 Les constituants majeurs des liposomes : les phospholipides	4
I.3.1 Composition des liposomes	4
I.4 La préparation des liposomes.....	6
I.5 Stabilité des liposomes	9
1. Fluidité membranaire :.....	9
2. Agrégation des liposomes :.....	9
3. Dégradation chimique des liposomes.....	9
4. La congélation des liposomes	9
I.6 Applications des liposomes	10
I.7 Les perspectives et défis de l'utilisation des liposomes	12
II. la vitamine E	13
II.1 La définition vitamine E.....	13
II.2 structure chimique.....	13
II.3 Le rôle de la vitamine E	15
1. Antioxydant :.....	15
2. Santé cardiovasculaire :	15
3. Système immunitaire :	16

4. La santé de la peau	16
III. Le stress oxydatif	16
III.1 La définition stress oxydatif	16
III.2 Conséquences du stress oxydant	17
III.3 Les espèces oxygénées réactives (EOR)	17
III.4 Mécanisme de production des espèces réactives oxygénées (ERO).....	18
1. Les sources des EOR	18
2. Origine endogène des ERO.....	18
III.5 Contrôle de la production des EOR	20
1. Le système antioxydant.....	20
2. Les EOR dans la fonction spermatique:.....	33
3. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes :	23
a. Rôle dans la compaction de l'ADN :	23
b. Rôle dans la capacitation :	23
c. Activation de la motilité :	23
4. Les EOR et leurs effets délétères sur le spermatozoïde :	24
a. Peroxydation lipidique :.....	24
b. Dommages oxydatifs de l'ADN :.....	24
5. Système de défense du spermatozoïde :	25
IV. La biotechnologie de la cryoconservation des spermatozoïdes	26
IV.1 Le sperme animal.....	26
IV.2 La composition du sperme animale.....	26
1. Le liquide séminal	26
2. Le spermatozoïde	26
3. La spermatogénèse	27
4. L'infertilité masculine.....	27

IV.3 Le concept de cryoconservation.....	27
1. Le principe de la cryoconservation du sperme	27
2. Pourquoi la cryoconservation de la semence ?	27
3. Les méthodes de conservations de la semence	27
A. La réfrigération des semences	27
B. La congélation de la semence	28
4. Les étapes de conservation de sperme.....	28
A. La collecte du sperme	28
B. L'évaluation de sperme (Spermogramme)	28
C. La dilution	29
IV.4 Facteurs influant la qualité et la fertilité de la semence après conservation	29
1. Les dommages cellulaires liés à la congélation et au refroidissement	
2. La susceptibilité des spermatozoïdes au stress oxydatif	30
3. Méthodes d'améliorations de la qualité de la semence :.....	30
IV.5 Le Vitamine E et l'optimisation de la fertilité masculine	31

Partie Pratique

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

INTRODUCTION	33
I. Matériel et méthodes	33
I.1 La collecte du sperme épидидymaire	33
I.1.1 Protocole expérimental	33
A. Le matériel.....	34
B. La méthode de la collecte	35
C. La collecte de sperme.....	35
I.2 L'analyse du sperme collecté.....	36
I.2.1 Analyse macroscopique	36
I.2.2 La concentration et les paramètres de mobilité	37
I.3. La préparation des solutions.....	37
1. Protocole de préparation du dilueurs Tris	37

2. Protocole de préparation du Liposome et la vitamine E.....	38
3. Protocole de préparation du jaune de l'œuf	39

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Résultats	41
Diagramme 1	41
Diagramme 2	42
Diagramme 3	43
Diagramme 4	44
Diagramme 5	45
II. Discussion	47
Conclusion et Perspectives:	Erreur ! Signet non défini.
Références	

LISTE DES FIGURE

Partie Théorique

CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique

Figure 1; Structures des liposomes.....	4
Figure 2: Structure de phospholipide	5
Figure 3: Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides.....	6
Figure 4: Les différents types des compartiment des phospholipides.....	6
Figure 5: Schémas représentatif de la méthode de Bangham.....	7
Figure 6: Formation de membranes lipidiques par réversion de phase.....	8
Figure 7: Formation de membrane lipidique par élimination de détergent.....	8
Figure 8: Schéma d'un liposome avec des substances encapsulées ou complexées	10
Figure 9 :Structure et dénomination des quatre tocophérols.....	14
Figure 10: Structure et dénomination des quatre tocotriénols.....	14
Figure 11: représentation la définition du stress oxydant.	17
Figure 12; Production mitochondriale de ERO La chaîne respiratoire (Leininger et al., 2006).....	19
Figure 13: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes(J. Pincemail et al. / Nutrition clinique et métabolisme 16 (2002) 233–239	21
Figure 14: Formule chimique de l' α -tocophérol (DAVI et al., 1999).....	22
Figure 15: : Représentation schématique de quelques mécanismes de protection de l'embryon in vivo contre le stress oxydatif.....	25
Figure 16: Schéma d'un spermatozoïde mature avec microscope électronique.	26

Partie Pratique

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Figure 17: les équipements utilisés pour l'extraction du sperme .	34
Figure 18: le testicule et l'épididyme.	35
Figure 19 : étape de collecte de spermatozoïdes.	35
Figure 20: Analyse microscopique de sperme.	36
Figure 21: photo d'analyseur informatique de sperme.	37
Figure 22: photo de la mobilité de sperme.	37
Figure 23 : les composants des solutions.	38
Figure 24: Agitation pendant 30min.	38
Figure 25: la machine de roteavapoteur.	38
Figure 26 : étape d'agitation.	38
Figure 27 : Les déferons concentration des liposomes et la vitamine E.	39
Figure 28: les milieux de conservation	40

Chapitre III : Résultats et discussions

Figure29: Histogramme représentant les valeurs de la VSL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés. .	42
Figure 30: Histogramme représentant les valeurs de la VCL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés. .	43
Figure 31: Histogramme représentant les valeurs de la linéarité en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés. .	44
Figure 32 : Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés. .	45
Figure 33: Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés. .	46

Liste des tableaux

Tableau 1 : Détermination de la note de motilité massale de la semence.....	36
---	----

INTRODUCTION GENERALE

Les gamètes assurent la préservation des patrimoines génétique des êtres vivants et le passage des caractères des espèces à travers les générations successives, ce phénomène se traduit dans le concept de reproduction. Cette dernière nécessite la présence l'ovule de femelle et les spermatozoïdes prévues dans le liquide séminal du mâle.

Les spermatozoïdes passent au long des voies génitales féminine pour assurer la fécondation, cela affecte ses performances. Les méthodes de conservation assurent la préservation des spermatozoïdes et en préservant leur performance pour une utilisation optimal en insémination artificiel.

La conservation à basse température et la congélation des spermatozoïdes sont des méthodes privilégiées pour favoriser la diffusion du progrès génétique. De plus, la congélation permet la préservation ex situ de la diversité génétique, La préservation de la diversité génétique représente actuellement un défi majeur pour garantir la durabilité de l'approvisionnement en ressources animales destinées à l'homme et pour préserver la biodiversité (**Blesbois et al, 2007**). Malheureusement, pendant la conservation, un stress oxydatif se produit, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité du processus de conservation, notamment au niveau des spermatozoïdes.

Le stress oxydatif cause la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est causée par la chaîne de transport d'électrons des mitochondries ainsi que par divers autres mécanismes. Les ERO se forment lorsque les défenses antioxydantes cellulaires de l'organisme ne sont pas en mesure de les détoxifier complètement, ce qui entraîne un stress oxydant. Ce dernier correspond à un processus d'oxydation cellulaire élevée, résultant de l'action de plusieurs agents endogènes et exogènes (**Boucelha et al. 2014**). Tout cela affecte la membrane cytoplasmique du sperme et sa mort.

En revanche, on a découvert des antioxydants qui réduisent l'oxydation, et parmi ces antioxydants, on peut citer la vitamine E.

La vitamine E, également connue sous le nom de tocophérol, est un nutriment essentiel pour le corps humain. Il s'agit d'une vitamine liposoluble et d'un puissant antioxydant. La vitamine E joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, qui sont des molécules instables produites lors du métabolisme normal et en réponse à des facteurs environnementaux tels que la pollution et le stress. Elle contribue également à la santé de la peau, au bon fonctionnement du système immunitaire et à la protection des acides gras essentiels dans le corps. La vitamine E se trouve naturellement dans

certains aliments, tels que les noix, les graines, les huiles végétales et les légumes à feuilles vertes (**National Institutes of Health - Office of Dietary Supplements**).

Les scientifiques ont également recours à des milieux adaptés et excellents pour la préservation, riches en toutes les nécessités, dont nous pouvons mentionner les liposomes. Les liposomes sont de petites structures composées de couches lipidiques qui ressemblent aux membranes cellulaires. Ils sont utilisés dans les domaines médicaux et biologiques comme moyen de préservation et de délivrance de médicaments et d'autres substances biologiques. Les liposomes se composent de deux couches lipidiques entourant une cavité centrale contenant une substance aqueuse. L'utilisation des liposomes dans les applications scientifiques est renforcée par leur capacité à charger une variété de substances biologiques et médicamenteuses, facilitant ainsi leur transfert et leur délivrance aux tissus et organes cibles. Les liposomes sont idéaux pour améliorer l'absorption et le ciblage des médicaments dans le corps. Ils fournissent une enveloppe protectrice pour le médicament jusqu'à ce qu'il atteigne le site souhaité, réduisant ainsi la toxicité et les effets secondaires indésirables. Les propriétés des liposomes peuvent être modifiées pour améliorer leur solubilité, leur stabilité et leur perméabilité (**Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov**).

Dans notre travail, nous avons tenté de développer des milieux pour la conservation des spermatozoïdes pendant des périodes plus longues. Nous avons également ajouté des antioxydants à certains de ces milieux. Ces milieux sont basés sur une variation du nombre et du type de phospholipides. Ils contiennent des proportions variables (jaune d'œuf, Tris, liposome et vitamine E) à des concentrations différentes. Nous les suivrons dans le temps pour évaluer l'efficacité de ces milieux.

Chapitre I

I. Les liposomes

I.1 Définition les Liposome

Les liposomes sont des petites vésicules sphériques dont la paroi est formée d'une ou plusieurs bicouches, le plus souvent de nature phospholipidique, renfermant un espace interne aqueux. Leur intérêt réside principalement sur la possibilité de vectoriser des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y encapsuler des principes actifs de solubilité très différente (hydrophile, amphiphile ou lipophile).

Suite à l'identification de leur structure en 1965 (**Bangham et al, 1965**), les liposomes furent d'abord utilisés comme modèles de membranes biologiques. En effet, les membranes biologiques sont constituées de bicouches lipidiques (phospholipides et cholestérol) et entre autres, de protéines et de glucides. Les bicouches de lipides possèdent une surface polaire et un cœur non polaire. Ce dernier agit comme une barrière au passage des ions et aux autres entités polaires mais représente un environnement favorable pour les molécules non polaires. Ce n'est qu'au début des années '70 que les liposomes furent envisagés en tant que vecteurs de médicaments par (**Gregoriadis et Ryman 1972**). Leur intention était alors d'administrer une enzyme à des patients. Cette approche thérapeutique comportait plusieurs avantages. D'une part, l'encapsulation de l'enzyme à l'intérieur de membranes lipidique permettait d'éviter le contact direct entre une protéine étrangère et l'hôte. D'autre part, les liposomes étant généralement constitués de substances issues des membranes cellulaires (lipides et cholestérol), ils furent rapidement considérés comme biodégradables, non-toxiques et non-immunogènes (**Gregoriadis, 1976**).

I.2 Morphologie des liposomes

Les liposomes sont des systèmes constitués de molécules amphiphiles bi caténares (deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire) dont la représentation schématique est présentée ci-dessous. Les molécules lipidiques s'organisent selon une certaine conformation dans l'espace. Une équation permet de rendre compte de l'arrangement et de prédire la formation d'agrégats en milieu aqueux (**Lasic.1998**)

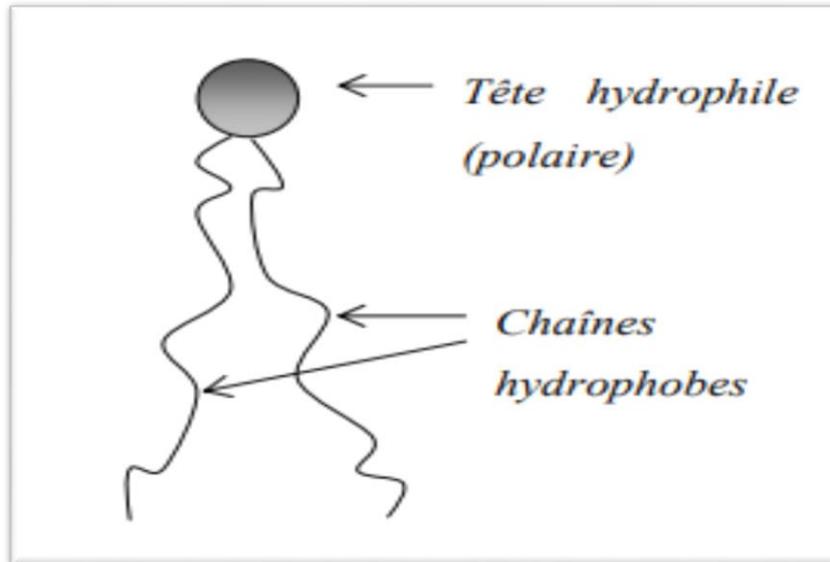


Figure 1; Structures des liposomes

I.3 Les constituants majeurs des liposomes : les phospholipides

I.3.1 Composition des liposomes:

La matière première des liposomes comprend généralement un ou plusieurs phospholipides, éventuellement un stérol et une substance ionique lorsque les liposomes souhaités doivent avoir une charge positive ou négative. Les caractéristiques des liposomes dépendent de leur mode de fabrication et du choix des composants de la bicouche, notamment des phospholipides, qui influencent fortement la rigidité (ou la fluidité) ainsi que la charge de la bicouche. Par contre, ils ont l'avantage d'être atoxiques et facilement dégradés, car ils font partie des constituants naturels des membranes biologiques. (Lorin, et *all* 2004).

Les lipides sont des corps gras d'origine naturelle. Les lipides les plus répandus au niveau des membranes biologiques sont les Glycéro lipides, les sphingolipides et les stérols. Les phospholipides font partie de la famille des Glycéro lipides. Les glycérolipides sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe polaire, qui constitue la tête polaire du lipide. Dans le cas des phospholipides, il s'agit du groupe phosphate, lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés. Les acides gras possèdent généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peuvent comporter une ou plusieurs insaturations, non conjuguées en général. C'est essentiellement la tête polaire (groupe phosphate dans notre cas) qui va dicter le comportement des différents

lipides et qui va permettre leur classification ; ainsi, dans le cas des phospholipides (**Banerjee et al 1999**) (**Large et (2021)**).

On trouve : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS)... (**Delattre et al ,1993**).figure 2 suivant:

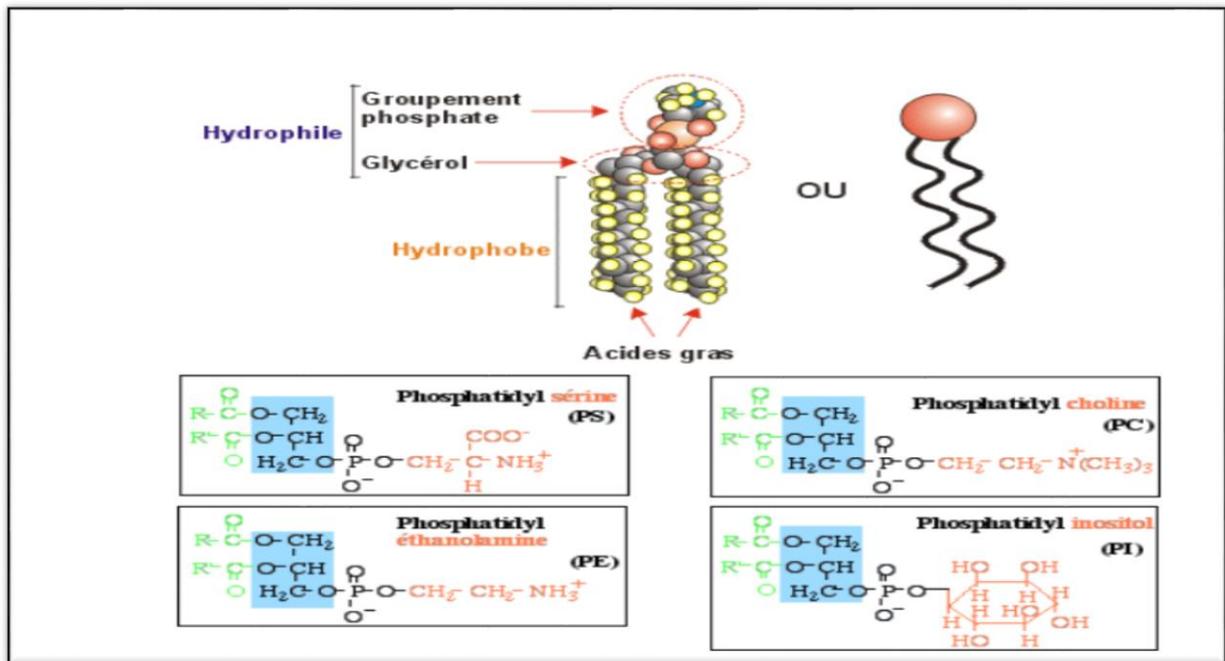


Figure 2: Structure de phospholipide.

Trois types particuliers d'arrangement. La micelle normale, la micelle inverse et la vésicule. Une micelle est un compartiment sphérique fermé constitué d'une couche de surfactant ;

Selon L'orientation de la partie polaire du surfactant vers L'extérieur ou vers l'intérieur de la sphère, on définit respectivement les micelles normales et les micelles inverses (Figure 3 et 4)

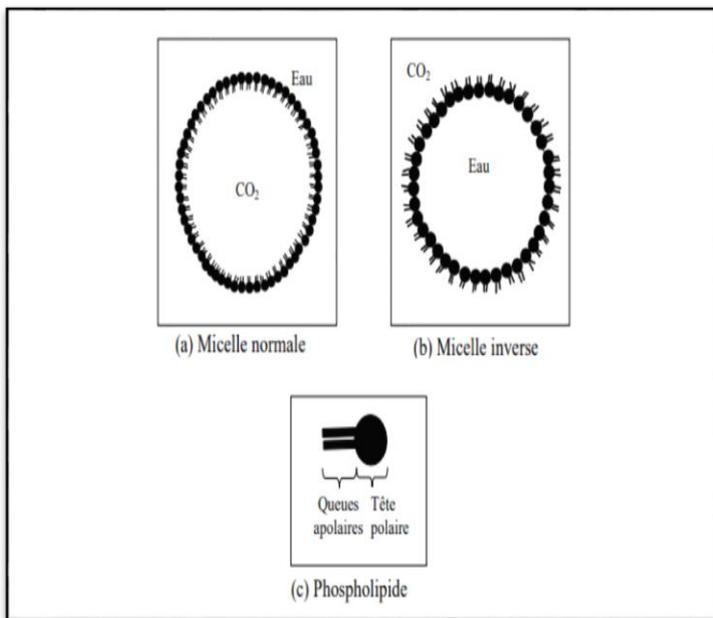


Figure 3: Les différents types des compartiments des phospholipides

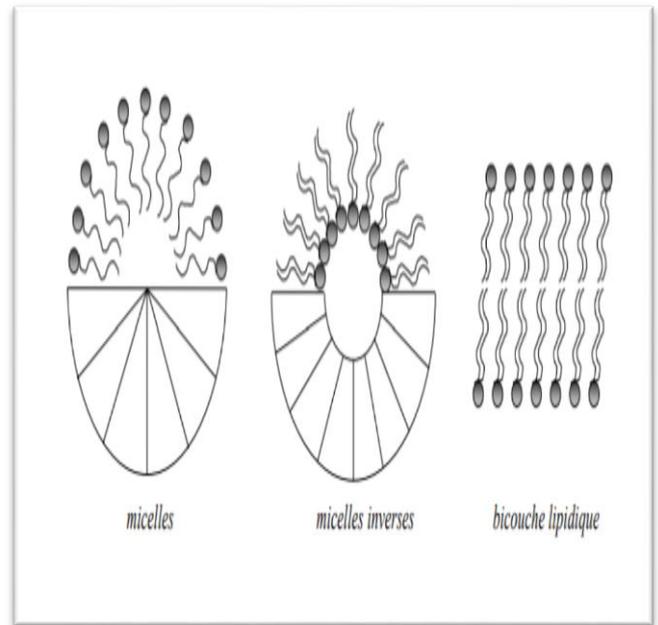


Figure 4: Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides

I.4 La préparation des liposomes:

La méthode la plus simple et la plus primitive a été préparé par (Bangham *et al.* 1965) pour fabriquer des liposomes, elle consiste à évaporer le solvant organique comme le chloroforme : méthanol (2 : 1) dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux. Cette méthode appelé l'hydratation simple. Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du (des) lipide(s) choisi(s). Aboutir à la formation d'un film composé des phospholipides. Enfin, on place le film mince dans un milieu aqueux. Dans ce milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant : il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, ce sont des liposomes MLV qui sont majoritairement produits. (Garnier. 2009)

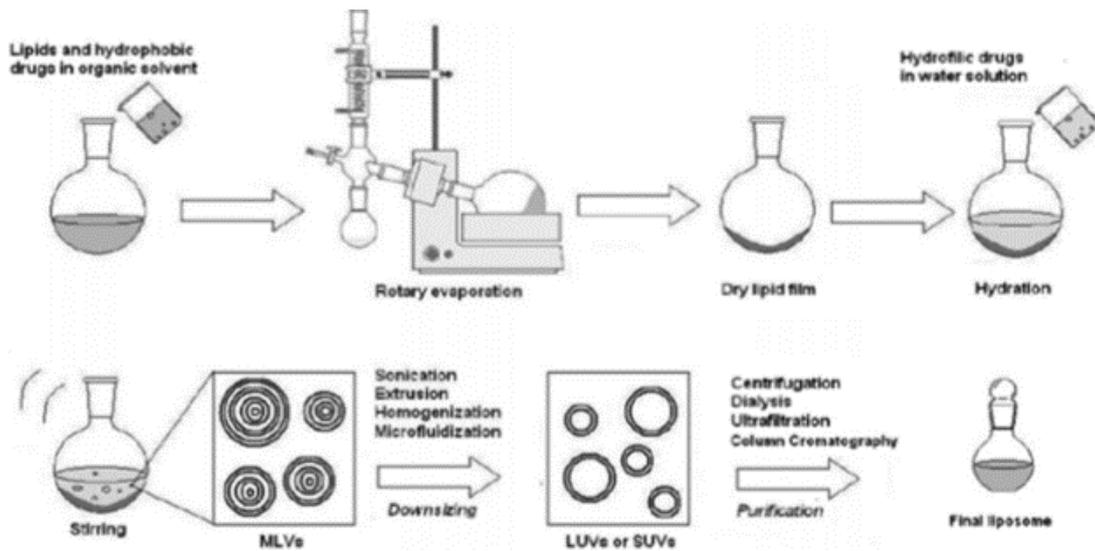


Figure 5: Schémas représentatif de la méthode de Bangham.

Dans la méthode de réversion de phase (Papahadjopoulos, Watkins, 1967), L'évaporation en phase inverse (EPI) est basée sur la formation de gouttelettes d'eau entourées de lipides et dispersées dans un solvant organique (en général un volume de phase aqueuse pour trois volumes de phase organique : l'éther) pour former une émulsion eau dans huile (des gouttes d'eau dans lesquelles les lipides s'orientent avec leur tête hydrophile en contact avec l'eau et leur queue hydrophobe en contact avec l'éther). L'éther est ensuite progressivement évaporé sous vide ce qui conduit à la formation de liposomes. Les vésicules obtenues sont principalement uni lamellaires et de grande taille malgré une certaine hétérogénéité des populations de liposomes vis-à-vis de ces paramètres. (Belala ; 2016)

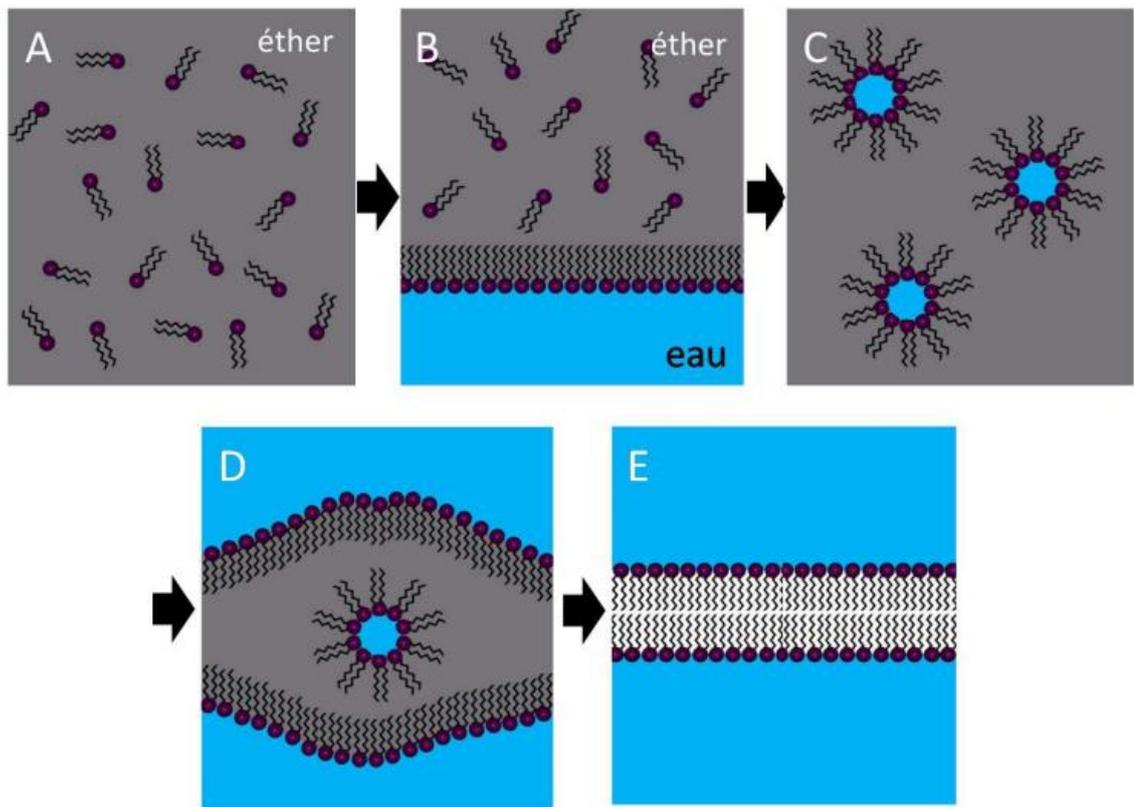


Figure 6 : Formation de membranes lipidiques par réversion de phase.

Une autre méthode est souvent utilisée, c'est la formation des liposomes par élimination détergent (McConnell, 1977) La dissolution des mélanges de lipides dans un excès de détergent va permettre de casser ces agrégats et de disperser les lipides dans des micelles. Il se forme alors des micelles mixtes lipides-détergent en équilibre avec des monomères de détergent. Dans un deuxième temps le détergent est éliminé, par exemple par dialyse, de façon contrôlée, ce qui conduit à la formation de bicouches mixte lipide-détergent puis de membranes sans détergent (Lorin et al ; 2004).

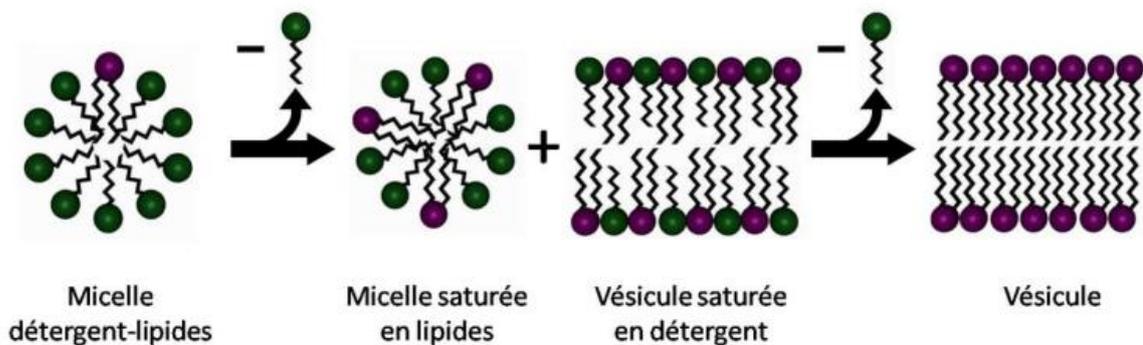


Figure 7: Formation de membrane lipidique par élimination de détergent.

I.5 Stabilité des liposomes

1. Fluidité membranaire :

La fluidité membranaire est définie comme l'aptitude des phospholipides à se mouvoir au sein de la membrane (**E. Shechter, 2002**). Une bicouche phospholipidique dans son état ordonné type gel présente donc une fluidité plus faible que dans son état désordonné type fluide. Ainsi, la température influence fortement l'organisation des phospholipides au sein de la bicouche phospholipidique. Le passage d'un état type gel à un état type fluide pour la bicouche ou la présence locale de zones désorganisées au sein d'une structure majoritairement organisée pour la bicouche favorise les phénomènes de fusion entre liposomes. Plus généralement, en cas de changement de température, une suspension liposomiale sera altérée avec relargage des principes actifs encapsulés.

2. Agrégation des liposomes

L'agrégation des liposomes en solution est un phénomène inévitable lorsque les liposomes ne sont constitués que de phospholipides naturels. Cette agrégation est due à l'existence des forces attractives de van der Waals, c'est-à-dire de forces induites à l'extrémité des phospholipides. Une fois au contact, des phénomènes de fusion (coalescence) entre liposomes peuvent se produire.

3. Dégradation chimique des liposomes

Les phospholipides sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles [29]. Ces deux dégradations altèrent l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut entraîner la libération des principes actifs encapsulés. Les conditions (température, cinétique) conduisant à ces dégradations ne sont pas détaillées.

4. La congélation des liposomes

L'idée de congeler une suspension liposomiale après sa formation afin de la conserver peut sembler avantageuse car la congélation est un processus rapide, semblable à une trempe et ainsi, on peut penser que la suspension liposomiale n'aurait pas le temps de se dégrader. Elle serait figée en l'état. Des exemples de congélation/décongélation sur des suspensions liposomiales sont présentés dans la littérature (**P. Machy et al, 1987, T. Pillot, M. Goethals, 1996**).

Mais à chaque fois, il est souligné que ces cycles de congélation/décongélation fragilisent la membrane des liposomes et provoquent une évolution des liposomes : à partir d'une suspension de SUV, on obtient une suspension de LUV (P. Machy *et al*, 1987) et, à partir d'une suspension de MLV, on obtient une suspension de LUV (T. Pillot, M. Goethals, 1996). Ces applications sont parfois utiles, par exemple, pour augmenter l'efficacité d'encapsulation d'une suspension de SUV, cette dernière est transformée en une suspension de LUV par des cycles de congélation/décongélation (P. Machy *et al*, 1987). Mais la congélation ne permet pas de conserver une suspension liposomiale en l'état.

I.6 Applications des liposomes :

Les liposomes furent découverts au début des années 60 (C. Magnan 1998 ; A. Bangham, 1965) et au départ, principalement utilisés comme modèle membranaire pour l'étude de la structure et des propriétés des membranes biologiques (A. Bangham, 1965). De par leur nature non-toxique, biodégradable, les liposomes furent rapidement reconnus pour leur possible utilisation comme systèmes de délivrance de médicaments (SDM) par voie cutanée, parentérale ou orale. L'un des avantages des liposomes est qu'ils peuvent encapsuler des composés hydrophiles ou lipophiles, soit dans l'espace interne aqueux, soit dans la bicouche phospholipidique ; des composés peuvent également être intégrés à la membrane phospholipidique par complexation.

Les premiers essais ne furent malheureusement pas à la hauteur des espérances. Tout d'abord, la durée de vie des liposomes dans le sang est limitée car le système immunitaire détruit les liposomes au niveau du foie et de la rate par phagocytose.

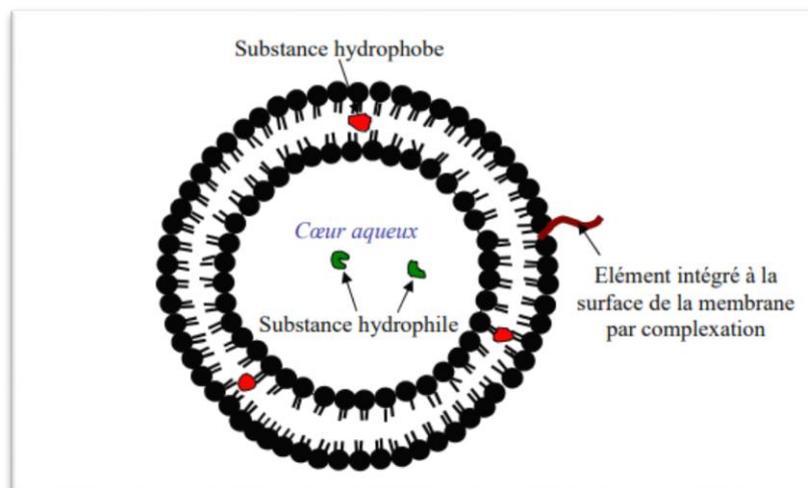


Figure 8: Schéma d'un liposome avec des substances encapsulées ou complexées.

Ensuite, lors d'une utilisation par voie entérale, les liposomes sont dégradés en milieu intestinal par les sels biliaires et les lipases pancréatiques (**R. N. Rowland et al, 1980**).

Depuis les années 1990, les progrès réalisés dans la formulation des liposomes permettent, aujourd'hui, de s'affranchir de ces difficultés. Aux liposomes dit « bruts », se sont substitués des liposomes « furtifs » (entourés de polymères - polyéthylène glycol – pour éviter la phagocytose (**D. D. Lasic et al 1991 ; N. Van Rooijen et al ;1980**), des immunoliposomes (liposomes furtifs auxquels ont été attachés des ligands spécifiques à la surface externe pour cibler une cellule ou un tissu (**J. W. Park,1997**) et enfin, des liposomes cationiques (liposomes furtifs dont la surface interne et externe est chargée positivement afin d'accroître les interactions avec les membranes cellulaires et l'ADN (**X. Gao et al,1993 ; J. G. Smith et al,1993**). Grâce à leur biodisponibilité accrue et la possibilité de ciblage spécifique, ces nouveaux SDM sont utilisés pour le traitement du sida (**D. D. Lasic,1998 J. Bestman-Smith,2000**), du cancer (**D. D. Lasic et al 1991 , A. Gabizon et al 1997, D. Lasic, 1998**), de la malaria (**D. D. Lasic et al 1991 , C. R. Alving,1989**), des maladies touchant les poumons, le foie ou la rate (**D. D. Lasic et al 1991**), et plus généralement le traitement des maladies infectieuses; la vaccination (**D. D. Lasic et al 1991 ; J. J. Bergers et al,1996, S. Gould-Fogerite ,1996**) ; le diagnostic (rayons X, infrarouge) (**D. D. Lasic et al 1991**) ; la thérapie génique (**C. Ropert ,1999**).

Enfin, l'ophtalmologie (**S. Ebrahim et al,2005**). L'application des liposomes directement sur la peau et la libération de principes actifs pénétrant les tissus permettent des applications multiples en dermatologie ou cosmétologie .Ainsi, l'utilisation des liposomes touchent d'autres secteurs que le secteur médical avec des débouchés dans l'industrie textile (coloration de textiles ou modification de surface(**I. S. C. de Sousa, 2010**), dans l'agroalimentaire (encapsulation d'arôme, de nutriments, d'enzymes , encapsulation d'antibiotiques d'origine naturelle pour le bétail (**S. Varona et al ,2011**) Les liposomes sont aussi utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans des liposomes permet de contourner ce problème (**Lasic, 1998 ; Schechter, 2002 ; Redziniak, 2003**).

Les applications qui nous concernent le plus est l'application des liposomes en cryoconservation, Les liposomes peuvent être chargés d'antioxydants qui entraînent une augmentation significative de la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la viabilité, de l'intégrité de la membrane plasmique et de l'activité des mitochondries dans les spermatozoïdes. En outre, les liposomes peuvent être chargés avec un

contenu lié aux lipides pour améliorer l'efficacité de la régénération de la membrane plasmique pendant le processus de congélation-décongélation des spermatozoïdes de bélier. Les liposomes ont été utilisés comme additifs Cryo protecteurs chez plusieurs espèces animales, y compris l'équidé, le porc et le bœuf (Mehdipour, *et al*, 2017 ; Belala, 2016).

I.7 Les perspectives et défi de l'utilisation des liposomes

Des chercheurs bien immergés dans les sciences d'intégration de la nanotechnologie à la médecine font des estimations pour l'utilisation des nano robot dans les traitements futurs des maladies, Des nano-robots sont désormais capables d'entrer et d'évoluer dans le corps humain en atteignant une cible très petite avec une précision quasi optimale. Dans un futur très proche, ils seront capables d'effectuer des actes chirurgicaux simples et des missions d'exploration. Les procédés de miniaturisation s'améliorent et deviennent de plus en plus performants. Tout c'est possible grâce à l'utilisation des liposomes pour l'encapsulation et le transport de ces petits agents dans le corps humain (Sidibé *et al* ,2017) D'autres recherches ont déjà commencé à utiliser ces systèmes de transport pour l'intégration des ARNm chez les malades ayant des déficiences des hormones/ des certains enzymes ou protéines ou les cas des vaccination pendant les pandémies (Couvreur, 2022) L'utilisation qui reste toujours l'un des plus importants pour les études et applications de liposomes sont les propriétés membranaires. En effet, ils constituent un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques. L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires. L'effet de paramètres tels que la composition lipidique, la température, la force ionique, l'asymétrie lipidique et le pH du milieu peut être étudié (Szoka, Papahadjopoulos, 1980; Tonkonog *et al*. 1982 ; Carrión *et al*. 1994 ; Nacka *et al*. 2001). Les défis de ces études restent toujours le manque des datas autour leurs effets futurs sur la santé sur les réactions publiques des patients et des personnels gouvernant le secteur de santé et éthique et toujours les défis technique autour la production des liposomes destinés au Cryo préservation surtout les couts élevés lors de la préparation.

II. Vitamine E

II.1 La définition vitamine E :

La vitamine E C'est l'un des éléments extraits des plantes et les algues et des champignons (Et la plus grande quantité que nous trouvons dans les huiles végétales) et est considéré comme un antioxydant important, car c'est un antioxydant. La chimie de la vitamine E est relativement complexe.

En 1922, H.MEvans avait remarqué que des rats soumis à un régime exclusivement Lacté avaient perdu leur fonction de reproduction et que celle-ci ne pouvait être Restaurée par aucune des vitamines connues à l'époque. Le facteur nutritionnel responsable de cette carence fut trouvé d'abord dans l'huile de germe de blé puis dans diverses plantes oléagineuses. Deux composés purs furent caractérisés en 1936 et nommés α - et γ -tocophérols] (VILKAS, M. (1994). Vitamines mécanismes d'action chimiques (Edition HERMANN. pp 111-152).

II.2 STRUCTURE CHIMIQUE

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Ce nom provient du grec tokos pour progéniture et pherein pour porter. Cette famille comprend 4 substances : l' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol.

La nomenclature des molécules de la vitamine E : des tocophérols (T) et tocotriénols (T3). La commission sur la nomenclature biochimique (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1982) Après finalement donnée terme «vitamine E » pour tous les dérivés tocophérols et tocotriénols démontrant qualitativement une activité biologique d' α -tocophérol.

La structure chimique de ces molécules est importante pour la compréhension de la méthode d'analyse, du métabolisme ainsi que du mode d'action de la vitamine E.

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou triméthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones (Fernholz, 1938).

Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol.

Substituants des tocophérols	R ¹	R ²	R ³	Nom
------------------------------	----------------	----------------	----------------	-----

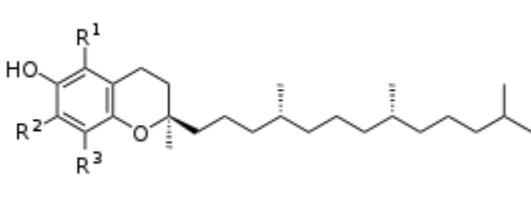
	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocophérol
	CH ₃	H	CH ₃	β-tocophérol
	H	CH ₃	CH ₃	γ-tocophérol
	H	H	CH ₃	δ-tocophérol

Figure 9 : Structure et dénomination des quatre tocophérols.

La structure chimique du tocotriénol est également cycles mono-, di- ou triméthylchromanol avec des chaînes carbonées pendantes mais contenant trois doubles A gauche des positions 3', 7' et 11'.

Substituants des tocotriénols	R ¹	R ²	R ³	Nom
-------------------------------	----------------	----------------	----------------	-----

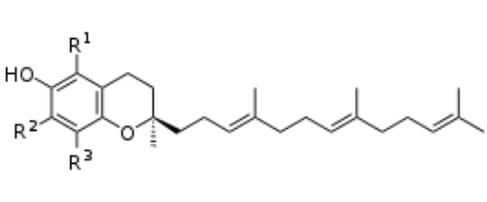
	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotriénol
	CH ₃	H	CH ₃	β-tocotriénol
	H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotriénol
	H	H	CH ₃	δ-tocotriénol

Figure 10: Structure et dénomination des quatre tocotriénols.

Les molécules chirales peuvent exister sous différents stéréo-isomères, quelques éléments de chimie permettent de mieux comprendre la notion de chiralité, pour bien étudier la vitamine E. Quand la molécule a un centre chiral, d. Atome de H. Le carbone est lié à quatre groupes différents, qui peuvent se présenter en deux groupes. Différentes formes, photo de l'une d'elles. L'autre dans le miroir s'appelle l'énantiomère. La seule différence entre les énantiomères est la suivante. Degré de chiralité. Par conséquent, ces molécules ont les mêmes propriétés achirales que les points. Point de fusion, point d'ébullition, densité, Ils ne peuvent pas être séparés les uns des autres en raison de leur solubilité différente, etc. méthodes en fonction de ces propriétés. Cependant, ils ont des propriétés chirales différentes. Et c'est arrivé. Les énantiomères sont généralement propriétés biologiques exceptionnelles, parce que leur réponse biologique. Des bases attrayantes molécule chirale. Cette particularité est soulignée. Loin. Molécule avec 3. Ainsi, un centre de chiralité peut exister comme Distribué en 8 stéréoisomères différents Transformer en quatre paires d'énantiomères : RRRSSS, RSR-SRS,

RRS-SSR, RSS-SRR. R et S sont des règles rectales - Droite - et effrayante - gauche - qui Voir le sens du mouvement d'horlogerie ou Un mécanisme antihoraire dans lequel des groupes de centres chiraux sont liés les uns aux autres classé sur la base Numéro atomique (Hart, 1987). Par conséquent, chaque tocophérol est présent dans 8 ou moins. Différents stéréoisomères comme la Il a trois centres chiraux en C2 et C4' et C8'. α -tocophérol, etc. RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS et SSS, Cependant, le seul stéréoisomère naturel de ceux-ci est (2R, 4R, 8'R)- α -tocophérol, d. H. RRR- α -tocophérol. C'est Il en va de même pour les autres tocophérols Il y a donc 32 stéréoisomères Famille des tocophérols (Tableau I). La vitamine E est disponible en vente libre Habituellement maintenant soit Forme stéréoisomérique naturelle du RRR- α -tocophérol Une forme synthétique appelée alpha-tocophérol tout-racémique ou alpha-tocophérol tout-racémique, qui est un mélange de : A peu près le même montant que le 8 Un stéréoisomère d' α -tocophérol. De plus, il peut également contenir de la vitamine E. forme non estérifiée, ou Il existe souvent sous une forme estérifiée. Les esters de vitamine E sont obtenus par estérification du groupe hydroxyle en position 6 du cycle. chromanol et acétate, ou Encore une fois avec du succinate, du nicotinate ou du phosphate. Ces formulaires Plus d'avantages lorsqu'estérifié Stable et résistant à l'oxydation (Ruperez *et al.* 2001).

II.3 Le rôle de la vitamine E :

1. Antioxydant :

- La vitamine E agit comme un antioxydant en neutralisant les radicaux libres .les radicaux libres sont des espèces réactives d'oxygène qui peuvent causer des dommages oxydatifs aux cellules .La vitamine E aide à protéger les membranes cellulaires contre ces dommages (Halliwell B , et Gutteridge JMC ,**Free Radicals in Biology and Medicine.2015**).

2. Santé cardiovasculaire :

- Des études ont suggéré que la vitamine E peut réduire Le risque des maladies cardiovasculaires en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et en réduisant l'agrégation plaquettaire (Stephens NG,*et al* .**Lancet .1996**).
- Cependant, des essais cliniques plus récents n'ont pas montré de bénéfices significatifs de la supplémentation en vitamine E sur la prévention des maladies cardiovasculaires (Miller ER, *et al* .**Ann Intern Med .2005**).

3. Système immunitaire :

- La vitamine E joue un rôle dans le maintien sain en améliorant la fonction des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (**Meydani SN, et al. J Nutr. 2000**).
- Elle peut également moduler l'inflammation en régulant la production de cytokines pro-inflammation (**Lee GY, et al. Nutrients. 2018**).

4. La santé de la peau :

- La vitamine E comme un hydratant naturel et peut aider à réduire la sécheresse, les irritations et les inflammations cutanées. De plus, elle peut favoriser la cicatrisation des plaies et protéger la peau contre les dommages causés par les rayons ultraviolets du soleil.

III. Le stress oxydatif

III.1 La définition stress oxydatif :

Le stress oxydatif est une condition causée par un déséquilibre dans le corps. Génération d'éléments oxydants et Mécanismes de défense antioxydant (Fig. 11) Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense. Le stress oxydant est initié et contribue par ses conséquences multiples touchant les acides Nucléiques, les protéines ou les lipides à la pathogénie de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives ou le cancer. Évaluer et enfin analyser les oxydants, les mécanismes de défense les produits secondaires qui peuvent en résulter.

La rupture de cet équilibre est multifactorielle. Elle peut être due à une production trop forte de radicaux, à une défaillance des systèmes de défense ou alors, à une carence en un ou plusieurs antioxydants apportés par la nutrition tels que les vitamines ou les oligo-éléments. (**LAUSANNE A.R.L., 2010**).

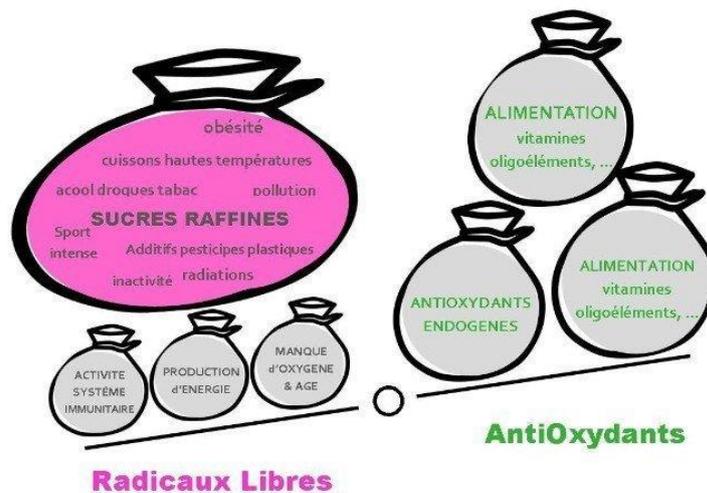


Figure 11: représentation la définition du stress oxydant.

III.2 Conséquences du stress oxydant :

Le stress oxydatif endommage directement les biomolécules telles que :

B. Oxydation des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

Toutes ces molécules sont le résultat d'une exposition à des espèces réactives de l'oxygène (ROE).

Peut causer de graves dommages cellulaires pouvant même entraîner la mort

Cellules en activant les voies de signalisation apoptotiques. (AITKEN *et al.*, 2006)

III.3 Les espèces oxygénées réactives (EOR) :

L'oxygène est nécessaire à la vie de certains organismes, notamment les animaux, les plantes et les micro-organismes, car il contribue à la production du principal facteur d'exécution de diverses fonctions, à savoir l'énergie (ATP). L'énergie que nous obtenons grâce aux processus d'oxydation (Échange d'électrons).

Lors de ces différentes L'accepteur d'électrons final est l'oxygène. Si le nombre d'électrons est impair

Lorsqu'il y est transféré, il est converti en dérivés de l'oxygène appelés radicaux libres.

Oxygène ou espèces réactives de l'oxygène (REO) qui sont toxiques pour le corps. Ces radicaux libres oxygénés sont des molécules contenant un ou plusieurs électrons Non appariés (**HALLIWELL et al, 1994**). Cela provoque une instabilité et peut finir par accepter ou transférer un autre électron composé, Le degré d'interaction des radicaux est instable et il n'est pas fixe, ce qui provoque un transfert rapide de l'électron sur une autre molécule de manière peu spécifique (**HALLIWELL et al, 1994**).

III.4 Mécanisme de production des espèces réactives oxygénées (ERO)

La génération de radicaux libres consiste principalement en un clivage homolytique Une liaison covalente de deux unités, chacune avec un électron, Enlèvement ou ajout d'électrons. Ces espèces réactives de l'oxygène sont Les différents mécanismes appartiennent généralement à deux classes : intrinsèques et extrinsèques (**Franco et al, 2008 ; Costa et al, 2014 ; Lushchak et al, 2014 ; Sies et al 2017**).

1. Les sources des EOR :

Il est possible de générer des rayonnements autres que les rayonnements ionisants (rayons ultraviolets, rayons X, rayons gamma).

Radicaux hydroxyles obtenus directement à partir de l'eau, qui est généralement la principale source d'ERO

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Production d'agent oxydant

Les neutrophiles et les macrophages sont également des sources importantes d'Enzyme NADH oxydase (**WANG H.J. et al, 2009**).

2. Origine endogène des ERO :

La mitochondrie

La mitochondrie est la source majoritaire de production de radicaux libres, Principalement l'anion superoxyde et ce à travers la chaîne respiratoire. Cette production Débute lorsque les composés NADH et FADH₂ sont oxydés libérant ainsi de l'hydrogène et Des électrons qui sont transportés le long de cette chaîne conduisant à une réduction de L'oxygène en H₂O.

Il arrive qu'il y soit des fuites de certains électrons amenant à formerL'anion superoxyde qui sous l'action du superoxyde dismutase (SOD) est dismuté en H₂O₂ (**Li et al, 2013 ; Zorov et al, 2014 ; Costa et al, 2014 ; Jitschin et al, 2014 ; Lushchak et al, 2014**).

D'autres enzymes mitochondriales sont aussi impliquées dans la génération des ERO, tels que : la NADPH oxydase, la monoamine oxydase, α -Glycérophosphate déshydrogénase (Zorov et al, 2014 ; Costa et al, 2014 ; Sies et al 2017). Ce mécanisme de production des ERO est résumé dans la (figure 12).

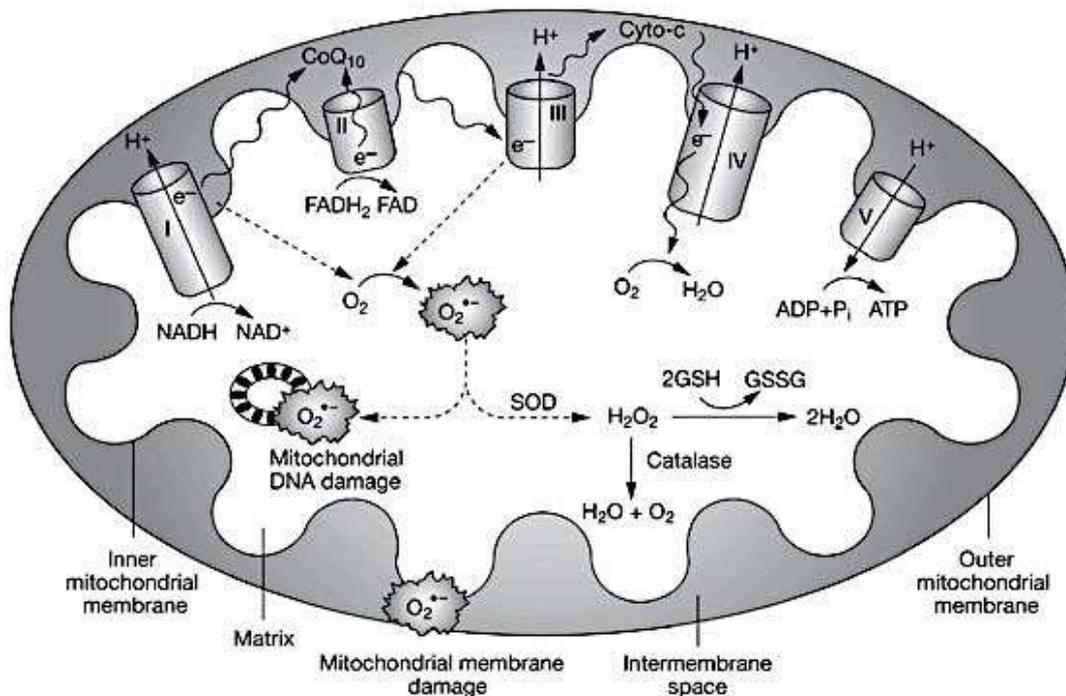


Figure 12; Production mitochondriale de ERO La chaîne respiratoire (Leininger et al, 2006).

L'inflammation

L'inflammation est un processus qui permet également la production d'ERO. Lorsqu'il est stimulé par la présence d'agents pathogènes dans le corps, l'activation des enzymes dans la membrane plasmique des cellules piègeuses, appelée NADPH oxydase, peut utiliser l'oxygène moléculaire pour former d'importantes quantités d'anions superoxydes (Favier, 2003 ; Beevi et al, 2007 ; Winterbourn, 2008 ; Costa et al, 2014).

Le peroxyosome

Les peroxyosomes du foie sont les plus importants de l'organisme avec une production importante d'H₂O₂ résultant essentiellement d'une oxydation peroxyosomale des acides gras (Valko et al, 2006 ; Franco et al, 2008 ; Phaniendra et al 2014 ; Costa et al, 2014).

III.5 Contrôle de la production des EOR :

1. Le système antioxydant

C'est un réseau de molécules variées qui réagissent entre elles. Elles sont produites par l'organisme ou apportées par l'alimentation, pour empêcher ou limiter les dommages cellulaires, c'est un système de défense de l'organisme (**BEGUEL J.P. et al.,2013**).

Système antioxydant enzymatique :

Ce sont des enzymes dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée. Parmi les enzymes antioxydants, on cite :

Le superoxyde dismutase (SOD) :

Le superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Cette réaction peut se produire spontanément, mais s'accumule plus lentement. Durée de vie $O_2^{\cdot-}$. Cela oxyde les composants cellulaires et Produit un EOR beaucoup plus toxique (**GREGORY et al, 1974**).

La catalase (CAT) :

La catalase utilise uniquement H_2O_2 comme substrat, Présent à des concentrations élevées bien au-delà des conditions physiologiques de l'ordre de grandeur de $10^{-6}M$ (**COHEN et HOCHSTEIN, 1963**).

L' H_2O_2 qui vient donc d'être formé par la SOD, peut être à son tour métabolisé par la catalase (GPxs). Le déclenchement de leur action respective est en fonction de la concentration du substrat.

La glutathion peroxydase (GPx) :

Elle existe sous une forme de GPxcytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-intestinale ainsi qu'une iso-enzyme. Elle est considérée comme une enzyme destructrice très proche ayant la propriété de réduire les peroxydes (**URSINI F. et al. 1999**).

La glutathion réductase (GR) :

Contrairement à la catalase, les glutathions peroxydases métabolisent une grande variété d'hydro peroxydes (R-OOH) en plus de l' H_2O_2 . Néanmoins pour certaines formes de GP, (GPx2 et GPx3) le substrat H_2O_2 reste préférentiel. Par contre, la GPx4 est la seule capable d'agir directement sur les hydroperoxydes de phospholipides (**VAN KUIJK et al.1986**).

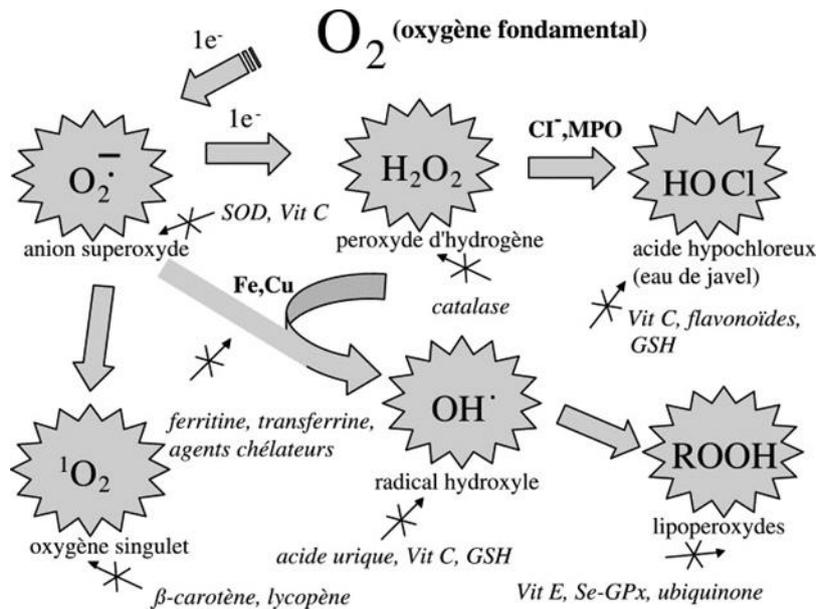


Figure 13: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes(J. Pincemail et al. / Nutrition clinique et métabolisme 16 (2002) 233–239

Les antioxydants non enzymatiques

Antioxydants liposolubles

La vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble aux propriétés antioxydantes. Conjugaison de la vitamine C avec le glutathion. Disponible en vrac. Une huile végétale, il existe huit formes dans lesquelles l'alpha tocophérol est le plus actif.

Il peut interagir avec $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $^{\circ}OH$. La vitamine E fait son travail d'antioxydants principalement dans les membranes biologiques (TAPPEL et al.1972) Notamment au niveau de la membrane mitochondriale qui contient de forts taux de vitamine E et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant. Une supplémentation en vitamine E limite la peroxydation lipidique chez des sujets soumis à un stress oxydant comme dans le cas d'une hypercholestérolémie ou d'un diabète (DAVIET al, 1999).

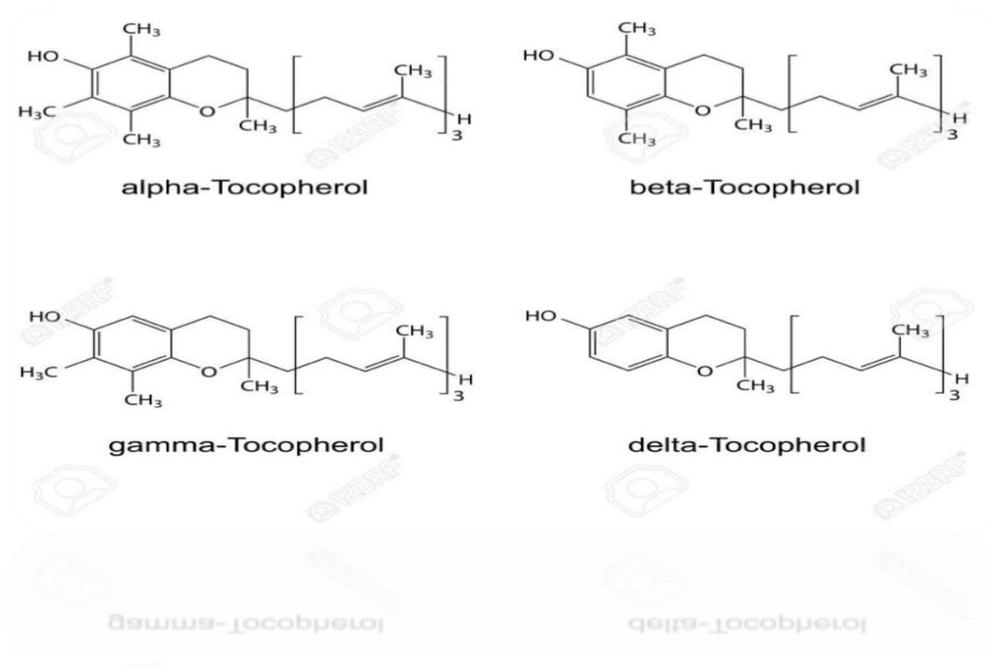


Figure 14: Formule chimique de l' α -tocophérol (DAVI *et al*, 1999).

Les caroténoïdes

Les pigments caroténoïdes sont omniprésents dans la nature et jouent un rôle important pour la cytoprotection des organismes. Caroténoïdes comme le lycopène et le β -carotène sont des composés biologiques importants qui peuvent inactiver les molécules excitées électroniquement comme l'oxygène dans un processus appelé **Effrayant (Mascio *et al*, 1991)**.

Antioxydants hydrosolubles :

La vitamine C

C'est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Il s'agit de l'acide ascorbique et de ses sels, les ascorbates de sodium et de calcium. Elle a un rôle antioxydant, Chapitre III LE STRESS OXYDATIF Page 31 Car elle réagit avec l' $O_2^{\cdot -}$, $^{\cdot}OH$. Elle permet de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant (**LUTSENKO *et al*, 2002**). Elle agit également sur certains hydro peroxydes lipidiques réduisant ainsi la peroxydation lipidique la vitamine C permet également de régénérer la vitamine E qui a un rôle antioxydant plus important. Elle est elle-même régénérée par le glutathion à partir de la forme oxydée de l'acide ascorbique. Cependant à forte dose et en présence d'ions, comme le fer, la vitamine C peut devenir prooxydante (**POLJSAK *et al*, 2005**).

2. Les EOR dans la fonction spermatique:

La présence d'EOR dans une suspension de spermatozoïdes humains a été détectée Partie bibliographique Le stress oxydatif 15 pour la première fois en 1943 par le fait de la

présence des leucocytes (**MACLEOD et al. 1943**). En effet, les leucocytes sont une source importante d'EOR, puisqu'ils sont capables d'en produire principalement sous forme d' $O_2^{\circ-}$ à partir de la NADPH oxydase (**BABIOR et al. 1997**). Cependant des résultats ultérieurs, avec des préparations de spermatozoïdes dans lesquelles les leucocytes ont été éliminés, ont par la suite démontré que les spermatozoïdes sont capables de générer eux même de l' $O_2^{\circ-}$ (**HENKEL et al. 1997**). Les mécanismes cellulaires responsables de cette formation sont encore mal connus mais deux sources potentielles d' $O_2^{\circ-}$ ont été évoquées : une NADPH oxydase spermatique et les mitochondries.

3. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes :

a. Rôle dans la compaction de l'ADN :

Le spermatozoïde contient une enzyme appelée GPx4 ou PHGPx, qui est une glutathion peroxydase active contre les phospholipides peroxydés. Cette enzyme, qui dépend du sélénium, est associée aux mitochondries et à la chromatine des spermatozoïdes matures (**GODEAS et al, 1997**). Pour son activité, l'enzyme a besoin d'un accepteur d'électrons, qui peut être de l' H_2O_2 , des acides gras hydroperoxydés ou des phospholipides hydroperoxydés.

Ces composés peuvent être générés à partir de l' O_2 . Le NADPH oxydase du spermatozoïde produit des $O_2^{\circ-}$, qui sont ensuite transformés en H_2O_2 par la SOD. Cette réaction contribue à la compaction de l'ADN en facilitant le pontage des protamines grâce à l'enzyme GPx4 (**WEIR et ROBAIRE, 2006**).

b. Rôle dans la capacitation :

La capacitation est un processus qui prépare les spermatozoïdes à la réaction acrosomique nécessaire pour la fécondation de l'ovocyte. Cette préparation implique plusieurs événements, tels qu'un influx d'ions calcium, une augmentation de PH intracellulaire et l'AMPc. Il existe une forte corrélation entre la production des espèces réactives de l'oxygène (EOR) et ce processus (**LAMIRANDE et O'FIAHERTY, 2008**).

c. Activation de la motilité :

L'activation de la motilité résulte à la fois d'une augmentation du PH et d'une élévation de l'AMPc intracellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (EOR) sont capables de réguler le niveau d'AMPc à l'intérieur de la cellule. De plus, des études ont démontré que l'exposition des gamètes males aux EOR provoque une augmentation intracellulaire de l'AMPc par le biais d'un mécanisme inhibé par la SOD (**ZHANG et ZHENG, 1996**). Par conséquent, il semble

que les EOR jouent un rôle dans l'activation de la motilité en induisant l'AMPc, bien que les mécanismes cellulaires impliqués ne soient pas encore connus.

4. Les EOR et leurs effets délétères sur le spermatozoïde :

a. Peroxydation lipidique :

La première indication des effets néfastes des EOR sur les spermatozoïdes a été montrée en 1979 (**JONES et al. 1979**). Ces auteurs ont observés une corrélation entre la peroxydation lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes humains et la perte sévère de leur motilité, L'exposition des gamètes mâles aux EOR induit une perte de leur motilité qui est directement corrélée au niveau de peroxydation lipidique de la membrane des spermatozoïdes (**GOMEZ et al, 1998**). L'addition de l' α -tocophérol, qui a une capacité antioxydante importante notamment en empêchant la peroxydation lipidique, induit la restauration de la motilité spermatique ce qui montre que cette peroxydation est bien à l'origine de cette perte de motilité (**SULEIMAN et al, 1996**). Cette peroxydation lipidique par exposition des gamètes mâles à l'ERO ne modifie pas seulement la motilité des spermatozoïdes mais agit également sur l'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique des spermatozoïdes. En effet, cette peroxydation empêche également la fusion du spermatozoïde à l'ovocyte et la réaction acrosomique (**AITKEN et al. 1989**).

b. Dommages oxydatifs de l'ADN :

Le stress oxydant est capable de causer des dommages aussi bien sur l'ADN mitochondrial que nucléaire des spermatozoïdes (**SAWYER et al, 2003**). Le génome mitochondrial est particulièrement vulnérable aux attaques oxydatives. L'ADN nucléaire des cellules germinales est cependant plus résistant que celui des cellules somatiques aux dommages oxydatifs. Expérimentalement, un plus haut niveau d'irradiation est nécessaire pour engendrer des dommages à l'ADN des gamètes mâles comparés aux autres cellules (**MCKELVEY-MARTIN et al, 1997**).

5. Système de défense du spermatozoïde :

La compaction dense de l'ADN du spermatozoïde et son faible volume cytoplasmique limitent sa capacité à contre les attaques des radicaux libres.

Cependant, les spermatozoïdes sont équipés de certains composés antioxydants tels que la glutathion réduit, l'acide ascorbique et la vitamine E. Des études chez le rat ont montré une

présence plus élevée de la vitamine E sur les spermatozoïdes de la tête de queue de l'épididyme (TRAMER *et al.* 1998). Des enzymes antioxydants telles que GPx1, GPx4 et la glutathion réductase sont également présentes dans les spermatozoïdes (ALVAREZ et STOREY, 1989). La Cu-Zn SOD est exprimée dans l'épididyme, sécrétée et capable de se lier aux spermatozoïdes. La catalase est également présente sur les spermatozoïdes, mais seulement chez certaines espèces, et son expression reste faible.

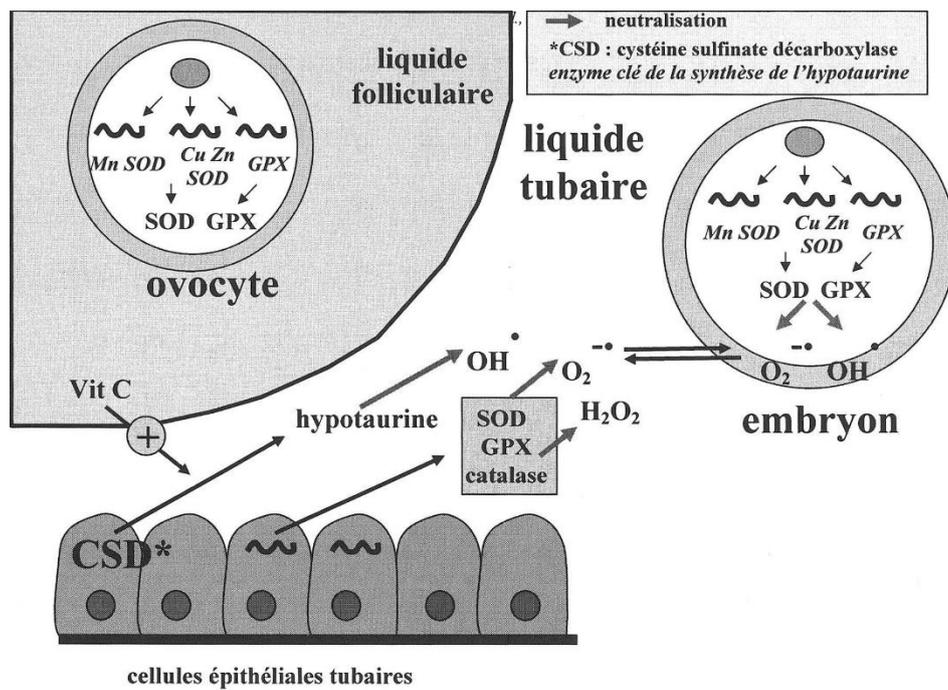


Figure 15: Représentation schématique de quelques mécanismes de protection de l'embryon in vivo contre le stress oxydatif.

La biotechnologie de la cryoconservation des spermatozoïdes

IV.1 Le sperme animal :

C'est un fluide organique expulsé du corps lors de l'éjaculation contenant les spermatozoïdes secrétés par les organes sexuels mâles (**Girod et Czyba, 1997**).

Les spermatozoïdes représentent 20 % et le liquide séminal 80% du volume de l'éjaculat.

IV.2 La composition du sperme animale :

1. Le liquide séminal :

Les spermatozoïdes éjaculés baignent dans un plasma séminal issu des sécrétions des cellules du tractus génital mâle. (**Blesbois et Brillard, 2005**).

2. Le spermatozoïde :

Une cellule autonome hautement spécialisée. Le spermatozoïde est la seule cellule programmée pour vivre hors de L'organisme qui la produit.

Selon **Dacheux, (2001)** ; **Knobil et al (1988)**. Le SPZ comporte trois principales parties qui sont :

- La tête
- La pièce intermédiaire
- Le flagelle (**Eddy et al : 2003**).

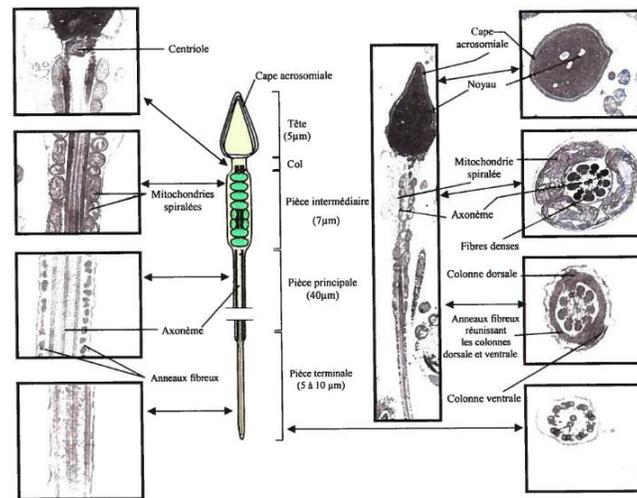


Figure 16: Schéma d'un spermatozoïde mature avec microscope électronique.¹

3. La spermatogénèse :

L'activité sexuelle a un effet stimulant sur la production de spermatozoïdes, car elle augmente la sécrétion de testostérone, une hormone qui stimule la spermatogénèse (Castonguay, 2018 ; Barret, 2011).

4. L'infertilité masculine :

Des statistiques récentes indiquent que l'infertilité, définie comme l'incapacité à concevoir après un an de rapports sexuels non protégés, affecte environ 10 à 15% des couples. L'homme est impliqué dans plus de 50% des cas (WHO, 1999; Sharlip et coll., 2002).

IV.3 Le concept de cryoconservation :

La cryoconservation correspond à la préparation des cellules ou des tissus en vue de leur stockage pour un usage ultérieur. Le stockage généralement est fait à une température inférieure à - 80 degré. Cette procédure permet la conservation des cellules pendant une longue période et l'utilisation doit être précédée par un réchauffement à la température ambiante. Ce processus a pour but de stopper les réactions biochimiques dans la cellule. Les spermatozoïdes de mammifère sont les premières cellules à être congelés avec succès dans les années 50. (Mazur et al 1984).

¹ Stevens A. et Lowe J. Histologie humaine. Traduction française de la 2^e édition anglaise. Editeurs: De Boeck université. 1997, 408p.

1. Le principe de la cryoconservation du sperme :

La cryoconservation du sperme implique le stockage du sperme à des températures inférieures à zéro c'est-à-dire la congélation tant qu'il n'est pas possible de garder le spermatozoïde à la température du corps vu de la mobilité cellulaire importante si l'on suit cause d'une activité métabolique intense.

2. Pourquoi la cryoconservation de la semence ?

La cryoconservation du sperme contribue à l'amélioration génétique par l'insémination artificielle, élimine les barrières géographiques dans l'application de l'insémination artificielle (IA) et soutient la préservation des races menacées, et donc la conservation de la biodiversité. **(Baril et al 1988 Gavin-Plagne, L. (2018).**

La cryoconservation est associée à des dommages au niveau de la membrane cellulaire, du cytosquelette, de l'ADN et des mitochondries en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui affectent la santé et la sécurité des cellules. **(Saadeldin et al, 2020).**

3. Les méthodes de conservations de la semence :

A. La réfrigération des semences :

L'insémination avec la semence fraîche repose sur l'utilisation des semences conservées à 15°C ou à 4°C (pendant 10h) pour inséminer les femelles en œstrus. Cependant, la fertilité de la semence est meilleure après conservation à 15°C. **(Fatet et al., 2008) et (Belkasmi, 2018)**

Pour le sperme réfrigéré, immédiatement après la récolte, le sperme est dilué dans un bain-marie maintenu à 35-37°C **(Magistini, 1990)**. Les dilueurs ont un pH proche de celui du plasma séminal, apportent des éléments nutritifs et contiennent des substances tampon, des antibiotiques et des Cryo protecteurs ; ces derniers protégeant les spermatozoïdes des effets de la congélation et de la décongélation. La vitesse du refroidissement doit être contrôlée et adaptée à la température de conservation. **(Palmer 1984)**

B. La congélation de la semence :

La méthode de congélation utilise l'azote liquide dans laquelle la semence est conservée à -196°C. Cette conservation est rendue possible grâce à l'action Cryo protectrice de certains produits tels que le glycérol. Cette méthode permet de conserver les semences pendant plusieurs années si le niveau d'azote est régulièrement respecté. Cependant la conservation du sperme s'accompagne généralement d'une baisse du taux de fertilité) et les taux de réussite de l'IA ne seront jamais similaires à la reproduction naturelle, puisqu'il semble que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes diminue légèrement au cours de la conservation (**LITIM & BEREKSI, 2011**), (**F. Castonguay, 2018**).

4. Les étapes de conservation de sperme :**A. La collecte du sperme :**

Les géniteurs sont préparés et collectés sur des mâles castrés, les femelles étant déconseillées pour des raisons sanitaires et de sécurité. La préparation sexuelle comprend une phase d'attente passive pendant laquelle le taureau se conditionne en sentant le bœuf en train (réaction de Flehmen), en le léchant, posant la tête sur la croupe et essayant de le chevaucher. Après un temps variable selon les individus arrive la préparation active pendant laquelle le taureau est autorisé à chevaucher mais pas à donner le coup de rein. Cette pratique permet d'augmenter la quantité de semence récoltée et sa qualité. Après un nombre de fausses montes adapté au taureau, la semence est collectée à l'aide d'un vagin artificiel. **Niemann et Wrenzycki, (2018) ; Gérard, et al, P. (2008)**

B. L'évaluation de sperme (Spermogramme) :

Le spermogramme est une étude stricte du sperme qui revêt le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité. Dans la section suivante il ne sera fait mention que des éléments les plus importants à savoir la mobilité et la numération. (**Baril et al. 1993**)

Une fois collecté, le sperme est transmis au laboratoire pour but d'apprécier :

- **Le volume : (Parez et Duplan, 1987)**
- **La viscosité de sperme : (Björndahl. et al ,2010).**
- **Couleur de l'éjaculat : Parez et Duplan (1987)**

- Le pourcentage de gamètes mobiles (Parez et Duplan ,1986).
- Le pourcentage des gamètes anormaux (Baril et al 1993)
- La concentration en spermatozoïdes

C. La dilution :

Après évaluation, la semence est diluée dans un milieu salin contenant du glycérol (Cryo protecteur), avec ou sans jaune d'œuf. L'ajout d'antioxydante augmente in vitro les paramètres de vélocité des spermatozoïdes et pour certains taureaux améliore la fertilité in vivo (Gérard et al, 2008).

IV.4 Facteurs influant la qualité et la fertilité de la semence après conservation

1. Les dommages cellulaires liés à la congélation et au refroidissement

Pour comprendre les dangers sur la cellule lors de la cryoconservation et comment les protocoles de congélation fonctionnent de façon influençant la fécondité des semences congelées, il est nécessaire d'examiner les événements intracellulaires et extracellulaires qui surviennent dans les cultures de cellules animales pendant le processus de congélation (Aswood-Smith, M. J., 1980 ; Farrant, J., 1989) La réfrigération initiale de la température ambiante à 0°C ralentit le métabolisme cellulaire, interrompant rapidement le transport actif et la pompe ionique. Cette interruption n'endommage généralement pas la cellule si le milieu de culture est osmotiquement équilibré. Lorsque le refroidissement se poursuit (0° à -20°C), des cristaux de glace commencent à se former dans l'environnement extracellulaire, ce qui augmente la concentration en solutés du milieu de culture. De ce fait, l'eau commence à sortir des cellules pour aller dans le milieu extracellulaire partiellement congelé, ce qui initialise le processus de déshydratation et de rétrécissement cellulaires. (Ryan, J; Shannon et Macy 1973).

Lorsque le processus de refroidissement est rapide, des cristaux de glace intracellulaires se forment avant la fin du processus de déshydratation cellulaire. Ces cristaux de glace déchirent les membranes et les organelles cellulaires et entraînent la mort de la cellule pendant le processus de décongélation. Lorsque le processus de réfrigération est lent, l'eau libre intracellulaire est expulsée de la cellule par la force osmotique, entraînant une déshydratation et un rétrécissement complets de la cellule. Ceci peut également entraîner une mort cellulaire mais il n'existe pas de consensus sur les mécanismes impliqués. (Mazur ; 1984).

Les contraintes physiques du rétrécissement cellulaire peuvent provoquer quelques dégâts, entraînant une perte de membrane irréparable et une perturbation du cytosquelette et des organelles. Les concentrations élevées en solutés dans le milieu extracellulaire non congelé (essentiellement de l'eau salée) peuvent également provoquer des dégâts. Ces solutés attaquent les cellules par l'intérieur et l'extérieur, endommageant la membrane et provoquant un déplacement du pH et une dénaturation générale des protéines. Cependant, lorsque la vitesse de refroidissement est suffisamment lente pour empêcher la formation de glace intracellulaire, mais suffisamment rapide pour éviter les effets de déshydratation graves, les cellules peuvent survivre aux processus de congélation et de décongélation. La zone ou fenêtre de survie est facilement observable chez de nombreuses bactéries ou autres procaryotes, mais pour la plupart des cellules eucaryotes, elle est inexistante ou très difficile à trouver sans utiliser d'agents Cryo protecteurs. Ces agents ont peu d'effet sur les dommages causés par une congélation rapide (formation de cristaux de glace intracellulaires), mais préviennent ou diminuent généralement les dommages dus à la congélation lente (déshydratation et rétrécissement). La température finale de conservation est également critique pour réussir une cryoconservation. Pour stopper entièrement l'horloge biologique, les températures de conservation doivent être maintenues en -130 (**Mazur, P., 1984**).

2. La susceptibilité des spermatozoïdes au stress oxydatif :

Au cours de la conservation, les spermatozoïdes produisent des super oxydes, en particulier le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'ion super oxyde O₂⁻ et l'oxyde nitrique (NO) (**Aitken et Baker 2004, Chatterjee et Gagnon 2001 ; Koppers et al 2008**). Ces super oxydes provoquent une diminution de la mobilité par l'inhibition de la production d'ATP par les mitochondries et une altération de la membrane plasmique par peroxydation des lipides membranaires. La supplémentation des milieux de conservation avec des antioxydants permet de limiter les effets négatifs des super oxydes (**Maxwell et Stojanov 1996, Maxwell et Watson 1996 ; Koppers et al 2008**).

La peroxydation des lipides Chez les mammifères, la membrane plasmique des spermatozoïdes est nettement différente de celle des cellules somatiques en ce qui concerne sa composition lipidique. La membrane plasmique contient des niveaux élevés d'acides gras poly-insaturés. Ces lipides sont responsables de la fluidité des membranes (**Sanocka D, et Kurpisz M. 2004**).

Lorsque les niveaux de ROS sont élevés, ils dégradent les acides gras polyinsaturés, provoquant une cascade de réactions chimiques aboutissant à la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides dans le sperme peut entraîner une destruction de près de 60 % des acides gras, d'où une altération des propriétés membranaires du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes sont équipés de mécanismes de défense antioxydants et sont susceptibles d'éteindre les DRO protégeant ainsi les cellules gonadiques et les spermatozoïdes matures des dommages oxydatifs. Cependant, dans des conditions pathologiques, la production incontrôlée des dérivés dépasse la capacité antioxydante du plasma séminal entraînant un stress oxydatif (Feki, et al 2003).

La génération de dérivées actives peut se produire comme une conséquence normale du métabolisme oxydatif ou peut résulter de mécanismes spécifiques au sein de types cellulaires particuliers, tels que l'explosion oxydative des leucocytes. Ce déséquilibre peut entraîner des dommages à la structure des cellules et des macromolécules telles que les composants de la membrane plasmique, les protéines et l'ADN (Martínez et al, 2009).

Le stress oxydatif est aussi connu pour affecter l'intégrité du génome des spermatozoïde : il peut provoquer des brisures simple ou double brin d'ADN (Aitken et Krausz, 2001), et oxyder des bases azotées de l'ADN (Kodama et coll., 1997). Malheureusement, dans les techniques de reproduction médicalement assistées, ces effets ne peuvent être détectés avant la fécondation ; ils peuvent même se voir amplifiés lorsque les spermatozoïdes sont préparés pour l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) (Lopes et al, 1998)

3. Méthodes d'améliorations de la qualité de la semence :

Les agents Cryo protecteur : Les agents Cryo protecteurs sont ajoutés dans les diluants afin de protéger les spermatozoïdes durant la congélation. L'agent Cryo protecteur le plus efficace et le plus utilisé est le glycérol ; agent perméant, il peut donc pénétrer et diffuser à l'intérieur des cellules.

Il abaisse la température de nucléation de l'eau à l'intérieur de la cellule, ce qui diminue les risques de formation des cristaux de glace intracellulaire qui est létale pour les cellules. (Watson, 1981 ; Holt WV. 2000)

Les agents antioxydants : Les DRO sont générés durant la cryoconservation causants des dommages cellulaires causés par le déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (DRO) et la diminution des mécanismes antioxydants. Pour contrer les effets néfastes des DRO. On ajoute des antioxydants comme l'tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, la taurine et les thiasés. L'acide urique, la taurine et les thiols (Nichi, M. 2003).

IV.4 Le Vitamine E et l'optimisation de la fertilité masculine :

La vitamine E a été utilisée chez le lapin, le bélier et le sanglier. Lapin, le bélier et le sanglier pour améliorer la qualité du sperme, Afin d'améliorer la qualité des spermatozoïdes congelés, des antioxydants peuvent être ajoutés aux diluants. La vitamine E, la catalase, l'acrobate de sodium, l'hydroxy toluène améliorent le pourcentage de spermatozoïdes motiles suivant leur dégel (Castellini et al, 2002 ; Hatamoto et al, 2006).

Il est important de noter que la réduction des radicaux peroxydes lipidiques en hydro peroxydes mène à l'oxydation de l'alpha-tocophérol en radical tocophéroxyde. Le recyclage de l'alpha tocophérol s'effectue par la vitamine C, capable de régénérer un tocophérol actif à partir du radical tocophéroxyde, permettant de maintenir à un niveau constant la capacité antioxydante de l'alpha-tocophérol. De cette façon, l'alpha-tocophérol peut être fonctionnel contre les RLO, et ce, à de faibles concentrations (Buettner, 1993).

In vitro, l'addition de vitamine E au milieu de préparation des spermatozoïdes permet de réduire les dommages oxydatifs causés par la centrifugation (Aitken et Clarkson, 1988) ; ceci se traduit par une augmentation de leur capacité à fusionner avec les ovocytes dé pellucides de hamsters (Aitken et coll., 1989). L'ajout de tels antioxydants, seuls ou en combinaison, serait associée à une diminution de la production de RLO dans le sperme; cependant, ceci ne semble pas bénéfique à la motilité des spermatozoïdes et pourrait même induire des dommages à leur chromatine (Donnelly et coll., 1999)

La nanotechnologie d'encapsulation peut être appliquée pour protéger les antioxydants (qui sont le Vitamine E dans ce cas-là) de la dégradation par contact direct de facteurs externes tels que la lumière, l'oxygène et les produits chimiques, la chaleur et la pression. Cette technologie peut également accroître la solubilité et la stabilité des antioxydants, ce qui leur confère une meilleure biodisponibilité dans les fluides biolog.

Chapitre II

Introduction

Notre objectif est d'essayer de conserver la semence dans différents milieux (Tris, jaune d'œuf, les liposomes et la vitamine E). E. La partie pratique de notre travail s'est déroulée au niveau du laboratoire de biologie animale du bloc N° : 12 au sein de l'université A.MIRA / Bejaïa.

Nous avons utilisé du sperme épидидymaire provenant de trois testicules ovins différents, pour lesquels les conditions d'élevage.

Les milieux de liposomes et la vitamine E ont été préparés au Centre de Recherche en Biotechnologie(CRPT) dans le cadre de notre recherche. Le CRBT est un institut spécialisé situé à Constantine, en Algérie, dédié à la recherche et au développement dans le domaine de la biotechnologie.

I. Matériel et méthodes

I.1. La collecte du sperme épидидymaire :

I.1.1. Protocole expérimental :

D. Le matériel :

- Le testicule.
- Lame pistoré.
- Une seringue.
- un épindorff.
- du papier aluminium.
- du papier absorbant.
- des gants en latex.
- un stérilisateur.
- Nacl (Chlorure de sodium 0,9%) ou TRIS.



Figure 17: les équipements utilisés pour l'extraction du sperme.

E. La méthode de la collecte :

Isolation de l'épididyme Pour la collecte du sperme épидидymaire, nous suivons les étapes suivantes :

- Nous commençons par laver soigneusement le testicule avec de l'eau courante à température ambiante, afin d'éliminer les résidus de sang. Ensuite, nous l'essuyons avec du papier absorbant et le plaçons sur du papier aluminium.
- Ensuite, nous retirons la membrane externe du testicule avec précaution.
- Nous procédons ensuite à la séparation délicate de l'épididyme en veillant à éviter toute blessure.
- Une fois l'épididyme séparé, nous localisons le canal déférent qui y est attaché. Nous lavons à nouveau l'épididyme avec de l'eau pour nous assurer d'éliminer complètement tout résidu de sang pouvant contaminer le sperme lors de la collecte.
- Enfin, nous plaçons l'épididyme sur du papier afin de le nettoyer soigneusement. Il est important de suivre ces étapes avec précaution pour garantir une collecte efficace et de qualité du sperme épидидymaire.



Figure 18: le testicule et l'épididyme.

F. La collecte de sperme

- Nous remplissons une seringue avec du NaCl ou un tampon TRIS et nous introduisons dans la lumière du canal déférent.
- Nous réalisons une incision au niveau de la queue épидидymaire à l'aide d'une lame préalablement stérilisée.
- Nous plaçons un tube à centrifuger gradué au niveau du point d'incision.
- Nous vidons tout doucement le contenu de la seringue jusqu'à ce que l'épididyme se gonfle et que le sperme commence à s'écouler dans le tube à centrifuger de collecte



Figure 19 : étapes de collecte de spermatozoïdes.

I.2 L'analyse du sperme collecté :**I.2.1 Analyse macroscopique :**

Elle consiste à analyser :

- La couleur de la semence par observation à l'œil nu.
- Le volume par lecture directe sur l'épindorff. Analyse microscopique :

La motilité massale : Le mouvement du sperme peut être observé en observant une goutte de sperme avec un microscope optique au grossissement x10.

L'étude de la motilité massale du sperme a permis de détecter des notes allant de 0 à 5.

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

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

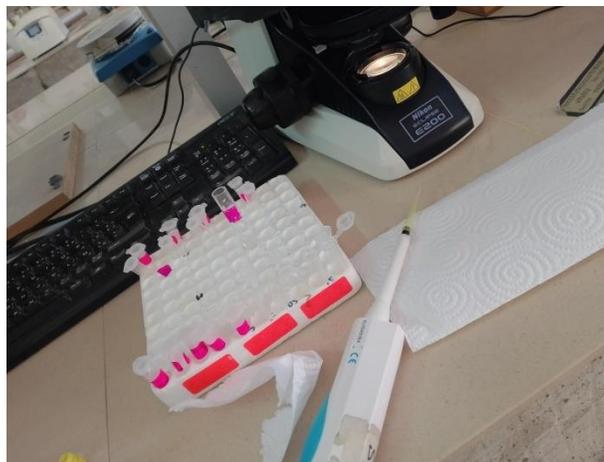


Figure 20: Analyse microscopique de sperme.

I.2.2 La concentration et les paramètres de mobilité

L'analyseur informatique du sperme (CASA), est utilisé pour la mesure de concentration et des paramètres de mobilité notamment :

1. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles.
2. Les différentes vitesses de progression : VCL (curvilinear velocity), VSL (velocity straight line), VAP (velocity average pathway), ALH (amplitude of lateral head displacement).
3. Le pourcentage de spermatozoïdes statiques.
4. Le pourcentage de spermatozoïdes rapides.
5. Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs.



Figure 21: photo d'analyseur informatique de sperme.



Figure 22: photo de la mobilité de sperme.

I.3 La préparation des solutions

1. Protocole de préparation du dilueurs Tris :

Equiper 50 ml de TRIS :

- 1,514 g du TRIS (L -&- phosphatidylcholines).
- 0,625 g de fructose comme apport nutritif.
- 0,85 g d'acide citrique pour régulariser le PH et l'osmolarité.
- 0,05 g Streptomycine Sulfate Solt.
- 0,034 g de la pénicilline (antibiotique) pour lutter contre une éventuelle contamination.
- 50 ml de TRIS



Figure 23: les composants des solutions.



Figure 24: Agitation pendant 30min.



25: la machine de rotavapoteur.

Figure

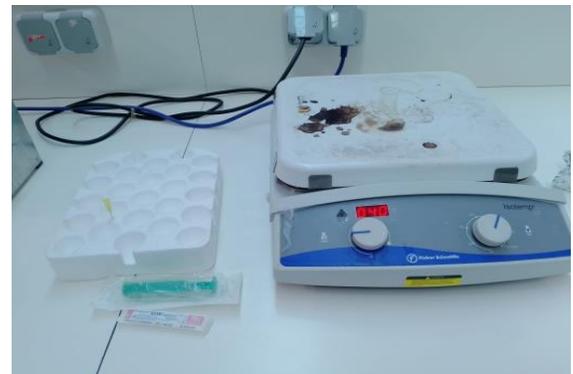


Figure 26 : étape d'agitation.

2. Protocole de préparation du Liposome et la vitamine E :

- Phase organique : solvant (12,5 éthanol). -Peser 125mg lécithine dans 12,5ml éthanol +20,83 CHL +2,5mg.

- Phase liquide : TRIS (0,25ml).
- Injection dans la phase liquide en agitation 2500 tours / min.
- Extraction l'éthanol par rotavapteur.

3. Protocole de préparation du jaune de l'œuf :

0,5 ml du jaune d'œuf avec 2,5 ml de Tris, bien mélanger et centrifuger pendant 10 min.

Préparation des milieux de conservation :

- Le contrôle (TRIS) :
1/4de spermatozoïdes + 3/4de Tris (100 µl de sperme +400 µl de Tris).
- Le jaune d'œuf 100 µL de spermatozoïdes + 400 µL de jaune d'œuf.
- Les liposomes et la vitamine E - Liposomes et vitamine E 1%. - Liposome et vitamine E 0,5%.
- Liposome et vitamine E 0,25%. - Liposome et vitamine E 0 ,1%.

- **Le jaune d'œuf**

100 µL de spermatozoïdes + 400 µL de jaune d'œuf.

- **Les liposomes et la vitamine E (Les concentration déferont)**

- Liposomes et vitamine E 1%.
- Liposome et vitamine E 0,5%.
- Liposome et vitamine E 0,25%.
- Liposome et vitamine E 0 ,1%.



Figure 27 : concentration des liposomes et la vitamine E.

Préparation des échantillons (traitement, sperme) : Nous avons utilisé 1 volume de sperme pour 3 volumes de traitement et nous avons pris le milieu Tris buffer comme contrôle. Une première analyse est réalisée avec le CASA pour l'ensemble des 4 milieux à T0 juste après la préparation des échantillons et à température ambiante. Le sperme est ensuite mis à 4°C pour conservation et analysé après 24h et 48h et 62 h.



Figure 28: les milieux de conservation.

CHAPITRE III

I. Résultats

Diagramme 01 :

La figure 29 représente les valeurs de la VSL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Au temps 0 : On observe une grande différence entre les milieux de conservation en termes de pourcentage. Le liposome 0,5% présente le pourcentage le plus élevé, avec un taux de plus de 30%. Il est suivi par le liposome 0,25% avec un taux de 27%, puis le liposome 0,1% avec un taux de 24%, et enfin le liposome 0,1% avec un taux de 22,5%. On constate également que la valeur du jaune d'œuf est meilleure que celle du Tris, et que la séquence est la suivante : liposome 0,5% < jaune d'œuf > Tris.

Au temps 1 : Une différence apparaît dans les ratios de l'effet des liposomes sur les VSL. Le liposome 0,1% présente le pourcentage le plus élevé, suivi du liposome 0,25% avec un pourcentage notable. Ensuite, le jaune d'œuf occupe la quatrième position, suivi du Tris. On remarque également une proportionnalité entre les liposomes 1% et 0,5%.

Au temps 2 : Le liposome 0,1% se positionne en tête avec le pourcentage le plus élevé, suivi du jaune d'œuf et du liposome 0,25%. Les liposomes 1% et 0,5% suivent ensuite.

Au temps 3 : Le liposome 0,1% maintient son avantage, suivi du Tris avec des proportions presque égales. Les liposomes 0,5%, 0,25% et 1% suivent ensuite.

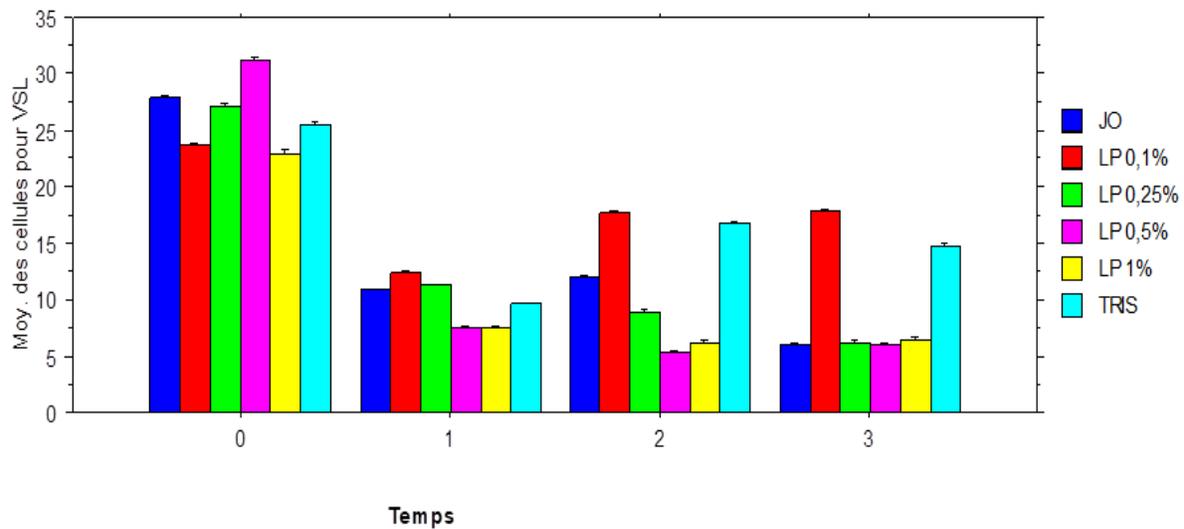


Figure29 : Histogramme représentant les valeurs de la VSL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Diagramme 02 :

La figure 30 représente les valeurs de la VCL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Au temps 0 : Le liposome 0,5% présente le pourcentage le plus élevé avec une grande différence par rapport aux autres milieux de conservation. Ensuite, on observe le liposome 1%, le liposome 0,25%, le liposome 0,1%, et enfin le jaune d'œuf. On remarque également une diminution de l'effet du Tris.

Au temps 1 : Il y a un changement radical par rapport au temps 0. Le liposome 0,1% affiche le pourcentage le plus élevé, suivi du jaune d'œuf, puis du Tris. Les liposomes 0,25%, 1% et 0,5% suivent respectivement.

Au temps 2 : Le liposome 0,1% conserve sa stabilité et son efficacité, suivi par le Tris, le jaune d'œuf, le liposome 0,25%, le liposome 0,5%, et enfin le liposome 1%.

Au temps 3 : Le liposome 0,1% maintient sa stabilité en affichant le pourcentage le plus élevé, suivi du Tris. On observe une baisse significative du pourcentage de jaune d'œuf, tandis que les liposomes 0,25%, 0,5% et 1% convergent avec des ratios similaires.

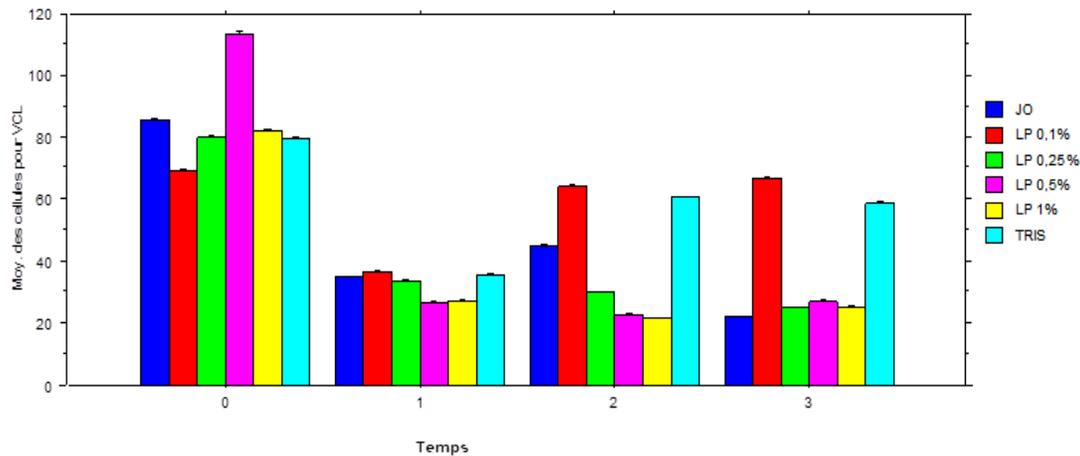


Figure 30: Histogramme représentant les valeurs de la VCL en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés

Diagramme 03 :

La figure 31 représente les valeurs de la linéarité en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Au temps 0 : On observe un pourcentage élevé de la linéarité dans le milieu contenant 0,1% de liposome, suivi du liposome 0,25%, puis du Tris, du jaune d'œuf, du liposome 0,5%, et enfin du liposome 1%.

Au temps 1 : On remarque une stabilité de l'activité des liposomes 1% et 0,25% pour la lignée 2, suivis du jaune d'œuf. Les liposomes 0,5% et 1% présentent des ratios très proches, tandis que l'effet du Tris diminue.

Au temps 2 : On observe une diminution de l'effet du liposome 0,1% par rapport au liposome 0,25%. Le Tris et le jaune d'œuf montrent également une diminution d'activité, tandis que les liposomes 0,5% et 1% maintiennent un effet similaire

Au temps 3 : Le jaune d'œuf conserve son effet intact, tandis qu'on observe une légère diminution de l'activité des liposomes 1%, 0,5%, 0,25% et 0,1%. Le Tris se positionne après les liposomes 0,5% avec une valeur similaire.

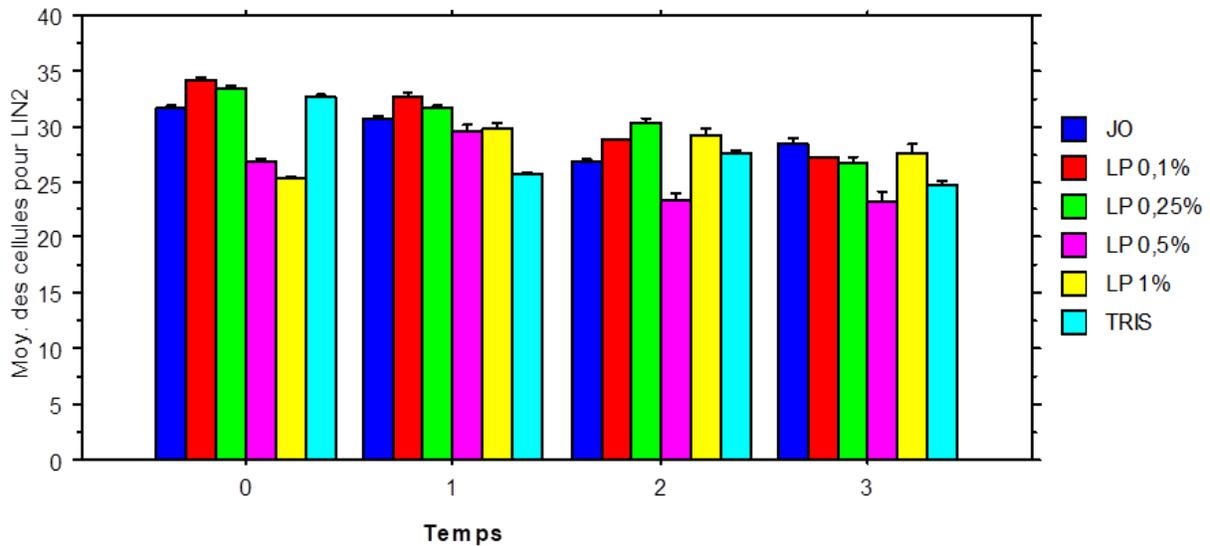


Figure 31: Histogramme représentant les valeurs de la linéarité en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Diagramme 04 :

La figure 32 représente les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Au temps 0 : On observe que le milieu contenant 0,25% de liposome est très efficace par rapport aux autres milieux à base de liposomes. Il est suivi par le jaune d'œuf et le Tris, qui montrent un effet similaire au liposome 0,5%, puis vient le liposome 1%, et enfin le liposome 0,1%.

Au temps 1 : Au temps 1, on remarque un changement radical dans les résultats. Le liposome à 0,1% montre un effet notable après la congélation, avec un pourcentage proche de celui du liposome à 0,25%.

Au temps 2 : L'activité du liposome 0,1% reste significative, suivie du Tris, puis du jaune d'œuf. Les autres milieux montrent une activité négligeable.

Au temps 3 : On constate que l'effet du liposome 0,1% sur la motilité des spermatozoïdes persiste avec la même intensité, suivi du Tris. Les autres milieux n'ont pas d'effet notable.

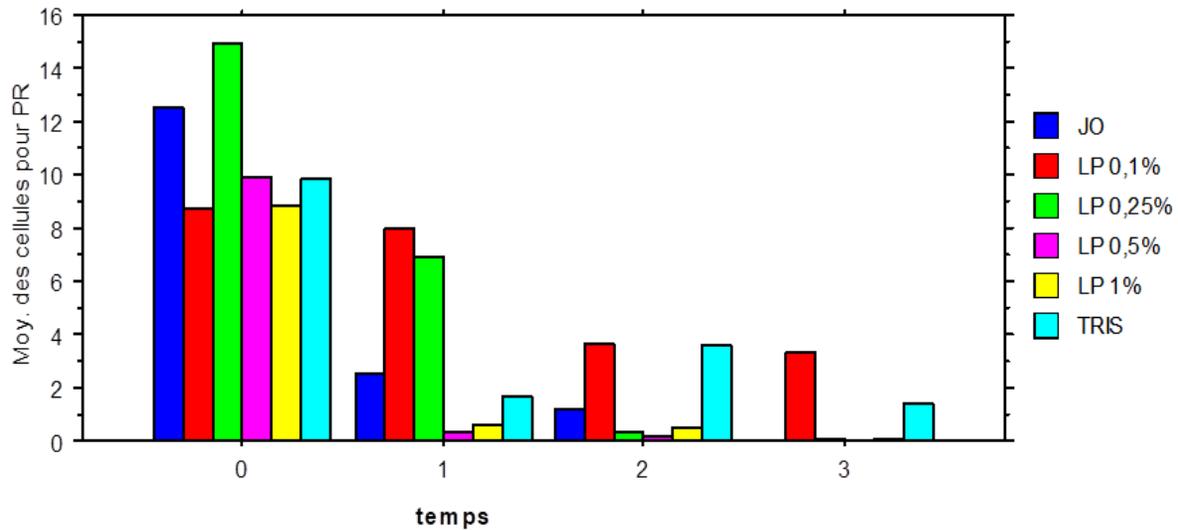


Figure 32 : Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Diagramme 05 :

La figure 33 représente les pourcentages des spermatozoïdes progressifs en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

Au temps 0 : Le milieu contenant 0,25% de liposome présente l'effet le plus élevé, suivi du liposome 0,1%, du jaune d'œuf et du Tris. On observe un effet plus faible pour le liposome 0,5% et le liposome 1%.

Au temps 1 : Après un certain laps de temps, on constate que le liposome 0,1% commence à avoir un effet sur la mobilité des spermatozoïdes, tandis que le liposome 0,25% maintient son effet élevé.

On observe une diminution de l'efficacité du jaune d'œuf et du Tris, suivis du liposome 1%, puis du liposome 0,5%.

Au temps 2 : Le milieu contenant 0,1% de liposome conserve son efficacité, suivi du Tris, puis du liposome 1%, du jaune d'œuf, et enfin du liposome 0,5%.

Au temps 3 : L'effet du milieu contenant 0,1% de liposome persiste avec la même intensité, suivi du Tris. Les autres milieux présentent des effets presque négligeables.

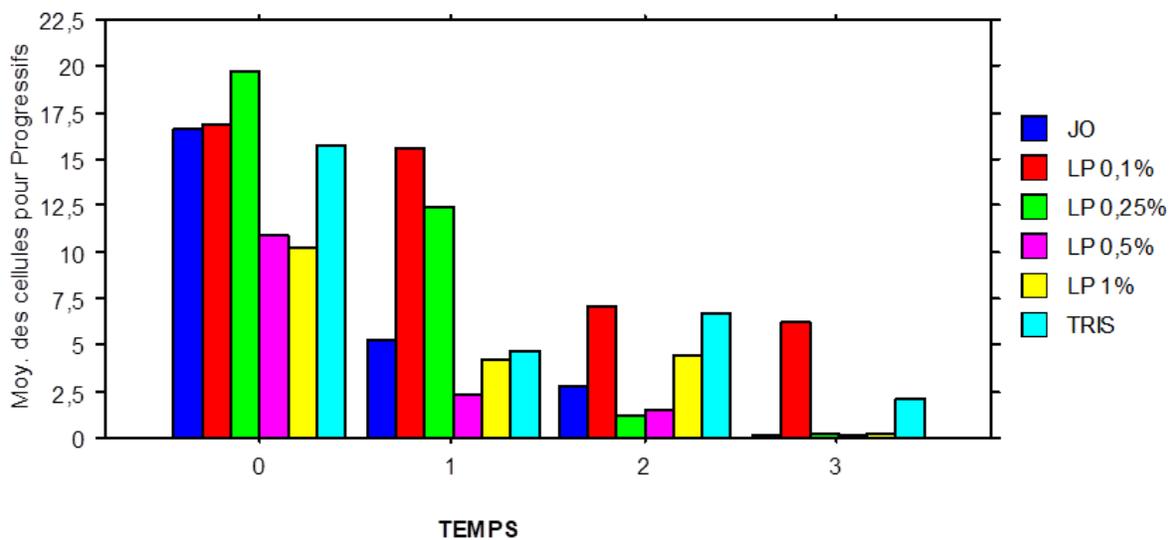


Figure 33: Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs en fonction du temps de conservation dans les différents traitements utilisés.

II. Discussion

Il est connu que l'utilisation des milieux de conservation pour le sperme avant la réfrigération/congélation permet de préserver la motilité des spermatozoïdes et d'augmenter les chances de survie lors du processus de congélation. Ainsi, le choc thermique, le stress oxydatif et la formation des cristaux de glace sont les principales causes de la diminution de la fécondité du sperme par rapport au sperme frais. Plusieurs auteurs ont également montré une réduction de la cinétique des spermatozoïdes.

Nous avons donc utilisé trois milieux différents : le jaune d'œuf, le milieu TRIS et un milieu liposomique contenant de la vitamine E. Les résultats obtenus montrent que le milieu liposomique a un effet protecteur sur les spermatozoïdes après une conservation à froid pendant 24 heures, puis 48 heures, et enfin 62 heures. Cela est évident dans les 5 diagrammes qui présentent les paramètres de la cinétique du sperme épидидymaire bovin : T0, T1 (après 24 heures de conservation), T2 (après 48 heures) et T3 (après 62 heures). Le milieu contenant les liposomes a systématiquement donné les meilleurs résultats en comparaison avec le jaune d'œuf et le milieu TRIS. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kumar et al. (2015), qui ont prouvé que l'utilisation du jaune d'œuf (la lécithine) est efficace en cryoconservation, mais moins efficace que l'utilisation des liposomes. L'étude de Taouzin et al. (2021) montre également que l'utilisation du milieu liposomique augmente la survie des spermatozoïdes par rapport au milieu TRIS. Une autre observation concerne la capacité du milieu de conservation contenant les liposomes à maintenir une cinétique élevée des spermatozoïdes après la conservation à froid (T1, T2 et T3) par rapport aux deux autres milieux. Cette observation peut s'expliquer par l'effet antioxydant de la vitamine E. Taouzin et al. (2021) ont montré l'intérêt de la solution liposomique chargée en vitamine E. En effet, l'étude de la cinétique de libération des liposomes a montré une amélioration significative de la solubilité de la vitamine E, atteignant 99% après 48 heures. Les résultats obtenus montrent une meilleure viabilité et une vitesse de déplacement accrue du sperme réfrigéré à 4 °C pendant 48 heures dans un milieu contenant nos solutions liposomiques. Ce phénomène est présenté dans le schéma ci-joint illustrant la cinétique de libération de la vitamine E. Une autre explication peut être donnée, comme proposée par les auteurs (Köse, G.T. ; Arica, M.Y. et Hasirci, V., 1998 ; Purdy et Graham, 2015) où il a été suggéré que les liposomes, avec leur contenu en phospholipides et en acides gras saturés et insaturés, peuvent fusionner avec la membrane plasmique des spermatozoïdes et atténuer les dommages causés par l'exposition à l'oxygène et

par le processus de congélation-décongélation. En ce qui concerne l'utilisation des différentes concentrations de liposomes, nous avons utilisé les concentrations suivantes de manière consécutive : 0,1 %, 0,25 %, 0,5 % et 1 %. Tous les diagrammes montrent que la cinétique après conservation des SPZs est meilleure dans le milieu liposomal chargé en vitamine E avec une concentration de liposomes de 0,1 %

CONCLUSION

L'objectif de cette recherche est de vérifier l'efficacité d'un système de vecteur, le liposome encapsulant la vitamine E, destiné à la supplémentation du milieu de conservation spermatique à 4 °C pendant 24, 48 et 62 heures. La vitamine E est un antioxydant qui peut être utilisé pour lutter contre les effets du stress oxydatif, en particulier ceux observés au niveau des cellules spermatiques lors de la cryoconservation. Les liposomes sont utilisés comme moyen de protection des spermatozoïdes contre le froid. Nous avons comparé ce système innovant à un milieu de conservation TRIS et au jaune d'œuf. Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité de notre solution liposomiale en utilisant un test de motilité spermatique après cryoconservation sur du sperme animal. Les résultats obtenus montrent une meilleure viabilité et une vitesse de déplacement du sperme réfrigéré à 4°C par rapport au jaune d'œuf et au milieu TRIS. Cela s'explique par la présence simultanée de la vitamine E, sa solubilisation et sa stabilisation, ainsi

que la présence de liposomes pour réparer les dommages causés à la membrane cellulaire par la cryoconservation. Les différentes concentrations des milieux liposomiaux (0,1 %, 0,25 %, 0,5 % et 1 %) montrent que la concentration optimale de liposomes dans le milieu de conservation cryo-spermatique est de 0,1 %. Ce résultat ouvre la voie à la détermination des raisons et des conséquences de ces observations.

REFERENCE

- Aitken R.J. ET Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod.* 2001; 122: 497-506
- Aitken R.J. ET West K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int. J. Androl.* 1990; 13: 433-451.
- Aitken R.J., Baker M.A., 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 581-588.
- Aitken, R. J., J. S. Clarkson and S. Fishel (1989). "Génération of réactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biol Reprod* 41(1): 183-97.
- Aswood-Smith, M. J., 1980. Low Temperature Preservation of Cells, Tissues and Organs, p. 19-44. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. M. J. Aswood-Smith and J. Farrant, Eds. (Pitman Medical Limited, Kent, England)
- Barret, J. P. (2011). *Zootechnie générale*. Lavoisier.
- Banerjee, R., Das, P. K., Srilakshmi, G. V., Chaudhuri, A., & Rao, N. M. (1999). Novel series of non-glycerol-based cationic transfection lipids for use in liposomal gene delivery. *Journal of medicinal chemistry*, 42(21), 4292-4299.
- Begam S, Panda N, Rana S, Behera L & Dehuri P (2019) *World Journal of Pharmaceutical Research* 8, 11.
- Björndahl, Lars, ET autres 2010. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*, New York, Cambridge University Press, , 336 p. Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 42(3), 334-346.
- Blesbois, E. and Brillard, J. P.(2007). Specific features of in vivo and in vitro sperme storage in birds. *Animal* 1:1472–1481.)
- Brzezińska-Ślebodzińska, E., Ślebodziński, A. B., Pietras, B., & Wieczorek, G. (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological trace element research*, 47, 69-74.

- Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Beghelli D. Effect of supranutritional level of dietary a-tocopherol acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology* 2002;58:1723–32.
- Castonguay, F. (2018). *la reproduction chez les ovin*. (Université Laval, Québec, Canada, Ed. ed.). Canada
- Chatterjee S., Gagnon C., 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 451-458.
- Christensen., V.L. (1995). Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: Bakst, M.R., Wishart, G.J. _Eds., Proc. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 90–106)
- D’Souza-Schorey, C.; Clancy, J.W. Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 2012, 26, 1287–1299.
- Damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil. Steril.* 1997; 68: 5 19-524
- Dussauge, J. P. (1963). *La production du mulet par insémination artificielle au Maroc* (Doctoral dissertation, École Nationale Vétérinaire d'Alfort).
- Feki, N. C., Therond, P., Jouannet, P., & Auger, J. (2003). Composition lipidique des spermatozoides humains et susceptibilitd au stress oxydant avant et apr s migration dans le mucus cervical. *Andrologie*, 13(381-392).
- 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).
- Gérard, O., Ponsart, C., Petit, M., & Humblot, P. (2008). Evolution des techniques de préparation de la semence et d’insémination artificielle chez les bovins. *Rencontres Recherches Ruminants3R-Rencontres Recherches Ruminants. IDELE, Paris.*
- Gérard, O., Ponsart, C., Petit, M., & Humblot, P. (2008). Evolution des techniques de préparation de la semence et d’insémination artificielle chez les bovins. *Rencontres Recherches Ruminants3R-Rencontres Recherches Ruminants. IDELE, Paris.*
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3- 22.
- <https://www.invitra.fr/spermatozoides-et-antioxydants/> (Site accédité par le Web Médica Acreditada (WMA) Date initiale d'accréditation du site : 30/10/2018. Dernière révision du site : 13/10/2022. État actuel de l'examen d'agrément : Correct.
- Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghozzi, H., Hammami, S., & Bahloul, A. (2003). Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of andrology*, 49(2), 83-94.
- Kessopoulou, E., Powers, H. J., Sharma, K. K., Pearson, M. J., Russell, J. M., Cooke, I. D., & Barratt, C. L. (1995). A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and sterility*, 64(4), 825-831.
- Kodama H., Yamaguchi R., fukada J. et colt. Increased oxidative deoxyribonucleic acid

- Koh Y.H., Yoon S.J. ET Park J.W. Lipid peroxidation product mediated DNA damage and mutagenicity. *J. Biochem. Mol. Biol.* 1997; 30: 188-193
- Kohler C. 2011. L'appareil génital masculin. Support Cours (Version PDF) – Université Médicale Virtuelle Francoph:15.
- Korani S, Korani M, Bahrami S, Johnston TP, Butler AE, Banach M & Sahebkar A (2019) *Drug Discovery Today* 24, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.023>
- Köse, G.T.; Arica, M.Y.; Hasirci, V. Low-Molecular-Weight Heparin-Conjugated Liposomes with Improved Stability and Hemocompatibility. *Drug Deliv.* 1998, 5, 257–264.
- LITIM, M., & BEREKSI, R. Effet de la supplémentation sur la qualité et/ou la quantité spermatique chez les béliers de race Ouled Djellal Effect of supplementation on the quality and/or quantity of sperm in rams of the Ouled Djellal breed.
- Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G. ET Casper R. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 896-900.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., & Brasseur, R. (2004). Les liposomes: description, fabrication et applications. BASE.
- Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A., & Auguste, D. T. (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced drug delivery reviews*, 176, 113851.
- Machtinger, R.; Laurent, L.C.; Baccarelli, A.A. Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum. Reprod. Update* 2015, 22, 182–193
- Magistrini M., 1990. Techniques de conservation de la semence d'étalon. *Elevage et Insémin.*, 238 (juillet): 3-10.
- Martínez Pastor, F., Aisen, E., Fernández Santos, M. D. R., Estes, M. C., Maroto Morales, A., García Álvarez, O., & Garde López-Brea, J. J. (2009). Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa.
- Matsuda Y., Seki N., Utsugi-Takeuchi T. et coll. X-ray and mitomycin C (MMC) induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the x-ray and MMC damage. *Muta. Res.* 1989; 211:65-75
- Maxwell W.M.C., Stojanov T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1013-1020.
- Maxwell W.M.C., Watson P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 55-65.
- Mazur, P., 1984. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications, p. C125-C142. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16)
- Mazur, P., 1984. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications, p. C125-C142. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16)

- Nichi, M. (2003). *Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Nicolich C., 1989. L'insémination artificielle équine. Thèse méd vét Nantes n° 22, ENV Nantes, Nantes, 205 p.
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (Eds.). (2018). *Animal Biotechnology*. Springer.
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (Eds.). (2018). *Animal Biotechnology*. Springer. on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds . J. Appl. Poult. Res. Spring 2008 vol. 17 no.
- Perez, M., & Duplan, J. M. (1987). Artificial insemination in cattle. Reproduction, genetic improvement. Artificial insemination in cattle. Reproduction, genetic improvement.
- Purdy, P.H.; Graham, J.K. Membrane Modification Strategies for Cryopreservation. Cryopreserv. Freeze. Dry. Protoc. 2015, 1257, 337–342. [
- Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 2013, 200, 373–383.
- Riaz M, Mahmood Z, Shahid M, Saeed MU, Tahir IM, Shah SA, Munir N, El-Ghorab A. Impact of reactive oxygen species on antioxidant capacity of male reproductive system. Int J Immunopathol Pharmacol. 2016 Sep;29(3):421-5.
- Ryan, J. (Date non spécifiée). Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales. *Bulletin technique. Corning Incorporated, Life Sciences, Lowell MA.*
- Saadeldin, I. M., Khalil, W. A., Alharbi, M. G., & Lee, S. H. (2020). The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals*, 10(12), 2281.
- Sharlip ID., Jarow J.P., Belker A.M. ET col. Best practice policies for male infertility. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 873-882.
- Sharma R. ET Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urol.* 1996; 48: 835-850.
- Shen H.M., Chia S-E., Ni Z-Y. ET col! Detection of oxidative DNA damages in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod. Endo.* 1997; 11: 675-680.
- Siudzińska.A and Łukaszewicz E. (2008). Effect of Semen Extenders and Storage Time
- Stevens A. et Lowe J. *Histologie humaine. Traduction française de la 2^e édition anglaise.* Editeurs: De Boeck université. 1997, 408p.
- Strzezek J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol* 2002; 2: 243-266
- Watson PF. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A (eds.), *Effects of low temperature on biological membrane.* London: Harcourt Brace Jovanovich; 1981: 189-218
- World Health Organization (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge, 32-68.

- Zhi-Lin Miao, Ying-Jie Deng, Hong-Yang Du, Xu-Bin Suo, Xiao-Yu Wang, Xiao Wang, Li Wang, Li-Jie Cui and Na Duan, (2015) *Experimental and Therapeutic Medicine* 9, 941-946
- Ioshi, S.V., Vaidya, S.G., Nerurkar, V.R. & Soman, C. (1993). Treatment of gamma radiation-induced transplanted leukemia in ICRC mice by liposomally encapsulated 5-fluoro uracil. *Leuk. Res.*, 17, 601-617.
- A. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 238-252.
- A. Gabizon, D. Goren, A. T. Horowitz, D. Tzemach, A. Lossos and T. Siegal, Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 24 (1997) 337-344.
- Allen, T.M. (1981). A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. 640, 385-397.
- Allen, T.M. (1994). The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 13, 285-309.
- Allen, T.M. (1997). Liposome targeting in animal models: problems and opportunities. *J Liposome Res.*, 7, 315-329.
- Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 750-763.
- Allen, T.M., Austin, G.A., Chonn, A., Lin, L. & Lee, K.C. (1991). Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposomes composition and size. *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 56-64
- Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol. Biol.*, 13, 238-252.
- Barbet J. Immunoliposomes. In: *Liposomes, New systems and new trend in their applications*; Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet J-P. Editions de Santé (1995) 159-191.
- Belala, R. (2016). *Optimisation De La Conservation De La Semence Canine [Thèse de Doctorat, Université Saad Dahleb - Blida]*.
- Brunner, J., Skrabal, P., & Hausser, H. (1976). Single bilayer vesicles prepared without sonication physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(2), 322-331.
- C. Magnan, *Etude de la micronisation de phospholipides par fluides supercritiques*, Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III (1998) France.
- C. R. Alving, Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria (review), *Trends in Parasitology*. 2 (1986) 101-107.
- C. Ropert, Liposomes as a gene delivery system, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32 (1999) 163-169.
- Couvreur, P. (2022). Délivrance de l'ARN à l'aide de nanoparticules lipidiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 206(9), 1208-1213.

- Cullis, P.R. & de Kruijff, B. (1978). The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. A 3 IP NMR study. *Biochim Biophys Acta*, 513, 31-42.
- D. D. Lasic and D. Papahadjopoulos, *Medical applications of liposomes*, Elsevier. (1998).
- D. D. Lasic, J. F. Martin, A. Gabizon, C. K. Huang and D. Papahadjopoulos, Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times, *Biochemistry Biophysical Acta*. 1070 (1991) 187-192.
- D. Lasic, Novel applications of liposomes, *Trends in Biotechnology*. 16 (1998) 307-321
- E. Shechter, *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. 2ème édition, Paris. Masson (2002).
- Freise, J., Muller, W.H., Brotsch, C. & Schmidt, f.W. (1980). "In vivo" distribution of liposomes between parenchymal and non parenchymal cells in rat liver. *Biomedicine*, 32, 118-1123.
- Garnier, B. (2009). Développement de vecteurs liposomaux fonctionnalisés par des protéines dérivées de l'Annexine 5 et encapsulant des marqueurs pour l'imagerie (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
- Gregoriadis, G. & Ryman, B.E. (1972b). Lysosomal localization of fructofuranosidase containing liposomes injected into rats. *Biochem. J.* 129, 123-133
- Gregoriadis, G. (1976) the carrier potential of liposomes in biology and medicine. *Neu Eng. J.* 295, 704-710 et 765-770.
- Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T. & Hojo, H. (1983). Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Res.*, 43, 5328-5334.
- I. S. C. de Sousa, E. M. S. Castanheira, J. I. N. Rocha Gomes and M. E. C. D. Real Oliveira, Study of the release of a microencapsulated acid dye in polyamide dyeing using mixed cationic liposomes, *Journal of Liposome Research*. Under submission (2010).
- Israelachvili, J.N., Marceija, S. & Rom, R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* 13, 121-200.
- J. Bestman-Smith, A. Désormeaux, M. J. Tremblay and M. G. Bergeron, Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, *AIDS*. 14 (2000) 2457-2465.
- J. Delattre, P. Couvreur, F. Puisieux, J.-R. Philippot and F. Schuber, *Les Liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, L. é. INSERM, 1993, p. 266.
- J. G. Smith, R. L. Walzem and J. B. German, Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochemistry Biophysical Acta*. 21 (1993) 871-878.
- J. J. Bergers, W. D. Otter and D. J. A. Crommelin, Liposome-based cancer vaccines, *Journal of Liposome Research*. 6 (1996) 339-355.

- J. W. Park, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos and C. C. Benz, Immunoliposomes for cancer treatment, *Advances in Pharmacology*. 40 (1997) 399-435.
- Juliano, R.L. & Stamp, D. (1975). The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 65 1-658.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., & Bresseur, R. (2004). Les liposomes: description, fabrication et applications. BASE.
- Mehdipour, M., Kia, H. D., Nazari, M., & Najafi, A. (2017). Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology*, 78, 34-40.
- N. C. Phillips and C. Tsoukas, Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome, *Blood*. 79 (1992) 1137-1143.
- N. Van Rooijen and R. Van Nieuwmegen, Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own, *Immunological Communications*. 9 (1980) 243-256.
- P. Machy and L. D. Leserman, Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie, L. E. Inserm, 1987, p. 1576.
- Papahadjopoulos, D... Cowden, M. & Kimelberg, H. (1973a). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 330, 8-26.
- Patel, H.M. (1992). Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 9, 39-90.
- R. Lipowsky and E. Sackmann, Structure and dynamics of membranes, *Handbook of biological physics* (Elsevier). 1A (1995).
- R. N. Rowland and J. F. Woodley, The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase, *Biochemistry Biophysical Acta*. 620 (1980) 400-409.
- R. Podlipec and J. Strancar, Interaction of liposomes on endothelial cells, University of Ljubljana, Slovenia. (2010).
- Rahrnan. A., More, N. & Schein. P.S. (1982). Doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and its protection by liposomal administration. *Cancer Res.*, 42, 1817-1825.
- Roerdink, f., Dijkstra, J., Hartman, G., Bolscher, B. & Scherphof, G. (1981). The involvement of parenchymal, Kupffer and endothelial liver cells in the hepatic uptake of intravenously injected liposomes. Effects of lanthanum and gadolinium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 677, 79-89.
- S. Ebrahim, G. A. Peyman and P. J. Lee, Applications of liposomes in ophthalmology, *Survey of Ophthalmology*. 50 (2005) 167-182.
- S. Gould-Fogerite and R. J. Mannino, Mucosal and systemic immunization using cochleate and liposome vaccines, *Journal of Liposome Research*. 6 (1996) 357-379.

- S. Varona, A. Martin and M. J. Cocero, Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by PGSS (Particles from Gas-Saturated Solutions), *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 2088-2097
- Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: Studies with poly (ethylene glycol) - coated vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1062 (1991) 77-82.
- Senior, J.H. (1987). fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Cr11. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3, 123-193.
- Sidibé, M. B., Toloba, Y., Traore, D., & Cisse, I. (2017). Le Concept des Nano-robots et leurs applications. *Maghrebien Journal of Pure and Applied Science*, 3(2), 3-2.
- Srinath P, Diwan P.V. Stealth liposomes, an overview. *Indian Journal of Pharmacology* 26 (1994) 179-184.
- T. Pillot, M. Goethals, B. Vanloo, C. Talussot, R. Brasseur, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu and L. Lins, Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 28757-28765
- V. P. Torchilin and V. E. Weissiq, *Liposomes: a practical approach* (2nd Edition) Oxford University Press, New-York. (2003) Chapter 1.
- Gao and L. Huang, Cationic liposomes and polymers for gene transfer, *The Journal of Liposome Research*. 3 (1993) 17-30.
- Zalipsky S. Synthesis of end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate chemistry* 4 (1993) 296-299.

Résumé

Lorsque les spermatozoïdes sont soumis à des températures extrêmement basses lors de la conservation cela peut entraîner des dommages cellulaires. Cependant, l'incorporation de liposomes peut aider à minimiser ces dommages. Les liposomes peuvent agir comme une barrière physique entre les spermatozoïdes et les conditions extrêmes de conservation. De plus, les liposomes peuvent encapsuler des substances protectrices telles que la vitamine E. Justement l'objectif du présent travail est d'utiliser la vitamine E incorporée dans des liposomes pour la délivrer à des spermatozoïdes ovins conservés à 4°C. Les différentes concentrations des milieux liposomiaux (0,1 %, 0,25 %, 0,5 % et 1 %) ont montré que la concentration optimale de liposomes dans le milieu de conservation est de 0,1 %.

Abstract

When sperm are subjected to extremely low temperatures during storage this can lead to cell damage. However, the incorporation of liposomes can help minimize this damage. Liposomes can act as a physical barrier between sperm and extreme storage conditions. In addition, liposomes can encapsulate protective substances such as vitamin E. The objective of this work is to use vitamin E incorporated into liposomes to deliver it to ovine sperm stored at 4°C. The different concentrations of the liposomal media (0.1%, 0.25%, 0.5% and 1%) showed that the optimal concentration of liposomes in the preservation medium is 0.1%.

ملخص

عندما تتعرض الحيوانات المنوية لدرجات حرارة منخفضة للغاية أثناء التخزين، فقد يؤدي ذلك إلى تلف الخلايا. ومع ذلك، فإن دمج الجسيمات الشحمية يمكن أن يساعد في تقليل هذا الضرر. يمكن أن تعمل الجسيمات الشحمية كحاجز مادي بين الحيوانات المنوية والهدف من هذا العمل E. وظروف التخزين القاسية. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تغلف الجسيمات الشحمية مواد وقائية مثل فيتامين E. Justement المدمج في الجسيمات الشحمية لإيصالها إلى الحيوانات المنوية للأغنام المخزنة عند 4 درجات مئوية. أظهرت E هو استخدام فيتامين التركيزات المختلفة للوسائط الشحمية (0.1%، 0.25%، 0.5% و 1%) أن التركيز الأمثل للجسيمات الشحمية في وسط حفظ الحيوانات المنوية هو 0.1%.