

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : des sciences biologiques de l'environnement.
Filière : Biologie et physiologie animale comparée.
Option : Bio-ressources animales et biologie intégrative.



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**L'intérêt du polyéthylène glycol dans la
solubilisation du cholestérol et de la
vitamine E pour une conservation optimale
du sperme bovin**

Présenté par :

Boucheffa Belkacem & Mennas Djamal

Soutenu le : 13 juin 2016

Devant le jury composé de :

Mr. Ayad A.H	Professeur	Président
Mr. Iguerouada M	Professeur	Encadreur
Mme. Hamaidi G	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Nous tenant tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la foi, la force, et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenant à exprimer nos sincères considérations et remerciements à notre promoteur Mr. le professeur Iguer-ouada M, pour ses précieux conseils, son aide, son orientation, sa gentillesse et sa générosité. Qu'il veuille bien agréer notre profonde et éternelle gratitude.

Nous tenant à remercier également les membres de jury : Mr. le professeur Ayad A. H. de nous avoir fait l'honneur de présider ce travail et M^{ne} Hamaidi G. d'avoir accepté de consacrer son temps pour l'évaluation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnels du laboratoire de biologie animale du bloc 12, en particulier Mr. khellouf Aladdin, et m^{elle} Khaled Amel pour leur patience, leur sympathie et le temps qu'ils nous en consacré.

Enfin nous n'oublions pas de remercier toute la promotion BRABI avec qui nous avons passé des moments agréables et tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les bovins

I. Rappels anatomiques sur l'appareil génital du taureau	3
I.1. Partie glandulaire	4
I.1.1. Testicules	4
I.2. Partie excrétrice	5
I.2.1. Voies génitales	5
a. L'épididyme	5
b. Le canal déférent	5
c. l'urètre	5
II. Physiologie de l'appareil reproducteur du taureau	5
II.1. La spermatogénèse	5
II.1.1. Le sperme	6
II.1.2. Le spermatozoïde	7
II.1.3. Plasma séminal	7
II.1.3.1 L'effet bénéfique du plasma séminal	8
a. Le plasma séminal et la motilité spermatique	8
b. la stabilisation des membranes spermatiques	8
II.1.3.2 L'effet délétère du plasma séminal	8
a. Le plasma séminal et la capacitation précoce	8

Chapitre II : Le stress oxydatif

I. le stress oxydatif	9
I.1. Conséquences du stress oxydant	9
I.2. Les espèces oxygénées réactives (EOR)	9
I.2.1. Les sources des EOR	10
I.2.2. Les principaux radicaux libres	10
a. L'anion superoxyde : $O_2^{\circ-}$	10
b. Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2	10
c. Le radical hydroxyle : $^{\circ}OH$	10
III. Contrôle de la production des EOR	11
III.1. Le système antioxydant	11
III.1.1. Le système antioxydant enzymatique	11
a. La superoxyde dismutase (SOD)	12
b. La catalase (CAT)	12
c. La glutathion peroxydase (GPx)	12
d. La glutathion réductase (GR)	12
III.1.2. Les antioxydants non enzymatiques	13
a. La vitamine E	13

b. La vitamine C	14
c. La vitamine A	14
d. Le glutathion : GSH	14
IV. Les EOR dans la fonction spermatique	14
IV.1. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes	15
a. Rôle dans de la compaction de l'ADN	15
b. Rôle dans la capacitation	16
c. Activation de la motilité	16
IV.2. Les EOR et leurs effets délétères sur le spermatozoïde	17
a. Peroxydation lipidique	17
b. Dommages oxydatifs de l'ADN	17
IV.2.3. Système de défense spermatozoïde	18
Chapitre III : Technologie de la semence	
I. La collecte du sperme	19
I.1. Collecte du sperme au vagin artificielle	19
I.2. L'électro éjaculation	19
I.3. La collecte du sperme épидидymaire	19
I.3.1. La méthode retrograde flushing	20
II. Analyse de la qualité du sperme récolté	20
II.1 Examens macroscopiques du sperme	20
II.1.1 Volume de l'éjaculat	20
II.1.2. Couleur de l'éjaculat	20
II.2. Examens microscopiques	21
II.2.1. Motilité massale	21
II.2.2 Motilité individuelle	21
II.2.3. Pourcentage de spermatozoïdes vivants	22
III. la conservation du sperme	22
III.1 Polyéthylène glycol (PEG)	22
III.1.1. Définition	22
III.1.2 Structure et propriétés	22
a. Structure	22
b. Propriétés	22
III.1.3 La toxicité	23
III.1.4 Le rôle du PEG	23
III.1.5. Domaine d'application du PEG	23
IV. le cholestérol	24
IV.1. Définition et rôle	24
IV.2. Le cholestérol et la membrane spermatique	24
V. La conservation de la semence	25
V.1. La conservation de la semence à 4°C	25
V.2. La cryoconservation de la semence	26
V.2.1. Les agents cryoprotecteurs	26
V.2.1.1 Le glycérol	27
V.2.1.2 Le tréhalose	27
V.3. Les dilueurs de semences	27

Partie expérimentale
Chapitre I : Matériel et méthodes

I. La collecte du sperme épидидymaire	28
a. Le matériel	28
b. La méthode de la collecte	28
b.1. Isolation de l'épididyme	29
b.2. La collecte proprement dite	29
II. L'analyse du sperme collecté	29
II.1. Analyse macroscopique	29
II.2. Analyse microscopique	30
II.2.1. La motilité massale	30
II.2.2. La concentration	30
III. La préparation des solutions	30
III.1. Protocole de préparation du dilueur Tris	30
III.2. Préparation des milieux de conservation	31
III.2.1. Matériels	31
a. Les réactifs	31
b. matériels	31
III.2.2 Méthodes	31
III.2.3. Protocole de préparation des traitements de conservation	32
a. préparation du milieu (PEG-CHOL)	32
b. préparation du milieu (PEG-VITE)	32
c. préparation du milieu (VITE-CHOL)	32
d. Préparation du complexe (PEG-CHOL-VIT E)	32
III.2.3.1. Préparation des échantillons (traitement+sperme)	32
III.2.3.2. La dilution pour l'analyse	32
Chapitre II : Résultats et discussion	
I. L'analyse macroscopique	33
II. L'analyse microscopique	34
Conclusion	38

Liste des abréviations

AC : adénylate cyclase.

ADN : acide disoxyribo nucléique.

AMPc : adénosine mono phosphate cyclique.

ARN : acide ribonucléique.

ATP : Adénosine Triphosphate.

BSP : binder of sperm.

Ca : calcium.

C/P : le ratio cholestérol/phospholipides.

C° : degré Celsius.

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis.

CAT : La catalase.

CHOL : cholestérol.

EOR : espèces oxygénées réactives.

Fig : figure.

g : gramme.

g/ml : gramme/millilitre.

GP, (GPx2 et GPx3) : glutathion peroxydase 2 et 3.

GPx4 ou PHGPx : glutathion peroxydase.

GPx4 : glutathion peroxydase 4.

GPxs : glutathion peroxydase.

GR : glutathion réductase.

GSH : Le glutathion.

H : heure.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

LDL : lipoprotéine à faible densité.

LOO• : radical libre lipidique.

ml : millilitre.

NADPH oxydase : complexe enzymatique.

O₂^{°-} : L'anion superoxyde.

°OH : radical hydroxyle.

PEG : Polyéthylène glycol.

PKA : Protéine Kinase A.

R-OOH : hydroperoxydes.

SOD : Superoxyde dismutase.

SPZ : spermatozoïde.

T : temps.

T° : température.

Tris : hydroxyméthyleaminométhane.

UV : ultras violet.

VITE : La vitamine E.

VSL : velocity straightline path / vitesse progressive linéaire.

µl : microlitre.

µm/sec : micromètre/seconde.

% : pourcentage.

Liste des figures

Figure 1 : Appareil génital du taureau	3
Figure 2 : Schéma de l'épididyme accolé au testicule	4
Figure 3 : Schéma représentatif des étapes de la spermatogenèse	6
Figure 4 : Anatomie du spermatozoïde de taureau.	7
Figure 5 : Réductions successives de la molécule d'oxygène formant les différents EOR ...	11
Figure 6 : Action du superoxyde dismutase et de la catalase	12
Figure 7 : Formule chimique développée de l' α -tocophérol	13
Figure 8 : Illustration de l'action supposée des EOR dans la compaction de l'ADN	15
Figure 9 : Cascades de phosphorylation modulées par les EOR	16
Figure 10 : Systèmes de défense enzymatiques présents au niveau des spermatozoïdes et du plasma séminal	18
Figure 11 : La structure du cholestérol	24
Figure 12 : Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à $T^{\circ}=4^{\circ}\text{C}$ dans les 07 milieux utilisés, analysés à différents temps T_0, T_1, T_2, T_3	35
Figure 13 : Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs dans tous les milieux de conservation à T_0 et à T_3	37
Figure 14 : La VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux : (TRIS), (CHOL) et (CHOL-PEG) à T_0 et à T_3	37
Figure 15 : La VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux :(TRIS), (VITE-PEG) et (VITE) à T_0 et à T_3	38
Figure 16 : La VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux : (TRIS), (CHOL-VIT E) et (COMPLEXE) à T_0 et à T_3	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Notation de la motilité massale dans l'espèce bovine.	21
Tableau 2 : Différences lipidique entre les spermatozoïdes de plusieurs espèces.	25
Tableau 3 : la concentration nécessaire de chaque réactif dans un ml de Tris	32
Tableau 4 : Les caractéristiques macroscopiques des testicules utilisés.....	34

INTRODUCTION

L'augmentation de la population, la prospérité croissante et l'urbanisation engendrent une demande accrue des produits animaux en particulier ceux des bovins, une étude estime que la demande mondiale devrait augmenter de 70% pour subvenir aux besoins d'une population qui atteindra 9,6 milliards d'habitants en 2050, (**GERBER *et al.*, 2013**).

Ces données interpellent sur la nécessité de se pencher et de s'appuyer sur les biotechnologies de la reproduction en optimisant ces techniques notamment l'insémination artificielle qui reste la plus utilisée pour promouvoir l'expansion et l'amélioration génétique d'un troupeau.

Les gamètes males des bovins subissent des modifications pendant leurs transit qui leurs permettent d'acquérir un pouvoir fécondant et une mobilité. Certains de ces processus de maturation sont sous la dépendance des espèces oxygénées réactives (EOR) qui peuvent être en partie produites par le spermatozoïde lui même, (**O'FLAHERTY *et al.*, 1999**). Cependant l'excès de ces (EOR) provoque un stress oxydant pouvant altérer l'intégrité et la fonction du spermatozoïde et conduire à une infertilité, (**JONES *et al.*, 1979**).

Dans une optique d'amélioration de la qualité du sperme bovin et par conséquent celle de l'insémination artificielle, la semence doit être conservée dans un milieu adéquat et approprié qui fourni les conditions optimales aux spermatozoïdes. Cependant, durant la conservation, le stress oxydatif reste un des facteurs qui altère la mobilité et le pouvoir fécondants des gamètes. Dans le présent travail, nous explorons l'intérêt de conservation à 4°C ajoutant au milieu de conservation du cholestérol connue pour son effet protecteur de la membrane plasmique (**DARIN-BENNETT et WHITE, 1977**) en association avec la vitamine E un puissant antioxydant (**TAPPEL *et al.*, 1972**).

Etant hydrophobes et donc insolubles dans les milieux de conservation, ces deux molécules ne peuvent exprimer leur effet optimal. Les cyclodextrines, des oligosaccharides cycliques, ont montré toute leur utilité dans l'augmentation de la solubilité de ces deux molécules avec des impacts sur la mobilité spermatique (**BELALA *et al.*, 2016**). De même, des travaux ont montré l'intérêt des cyclodextrines dans la solubilisation du cholestérol et son insertion dans la membrane cytoplasmique (**MOCE *et al.*, 2010**).

Introduction

Dans le présent travail nous nous sommes fixés comme objectif de remplacer la cyclodextrine par le polyéthylène glycol (PEG) et testé l'intérêt de celui-ci dans la solubilisation du cholestérol et la vitamine E afin d'optimiser la conservation du sperme épидидymaire bovin.

Partie bibliographique

CHAPITRE I

La reproduction chez les bovins

I. Rappels anatomiques sur l'appareil génital du taureau :

L'appareil génital du taureau (figure 1) est constitué par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et de son dépôt dans les voies génitales de la femelle (**BARONE, 2001**). Le tractus génital du taureau comprend trois parties (**HAZEN, 2010**).

- une partie glandulaire composée des testicules et des enveloppes testiculaires (scrotum, gaine vaginale et crémaster).
- une partie excrétrice représentée par les voies génitales (épididymes et conduits déférents) et les voies uro-génitales (urètre, pénis).
- les glandes annexes (prostate, glandes vésiculaires, glandes bulbo-urétrales) développées autour de la portion pelvienne de l'urètre. Ces glandes accessoires mêlent leurs produits de sécrétion au fluide testiculaire pour constituer le sperme.

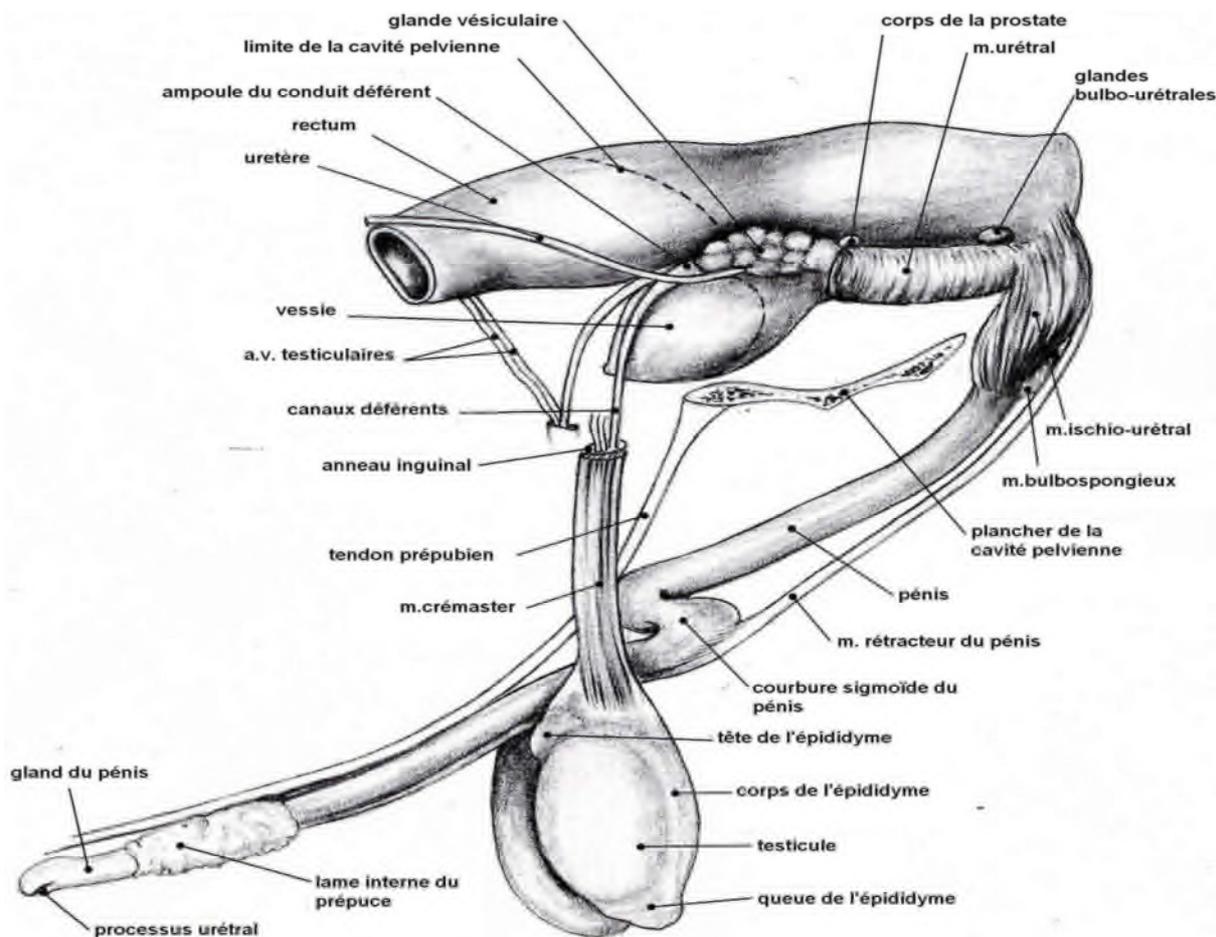


Figure 1 : Appareil génital du taureau (**CONSTANTINESCA, 2004**).

I.1. Partie glandulaire :

I.1.1. Testicules :

Les testicules (figure 2) sont des organes ovoïdes, bilobés, de couleur blanchâtre et de consistance ferme, suspendus dans le scrotum. Les testicules ont une origine méso néphrotique. Chez le taureau, ils descendent dans les enveloppes testiculaires avant même la naissance, vers trois à quatre mois de la vie intra-utérine (CHENOWETH *et al.*, 2007).

Les testicules sont pourvus d'une fonction exocrine ou spermatique et d'une fonction endocrine (synthèse de l'androgène par les cellules de Leydig, synthèse d'œstrogènes, de l'Anti-Müllerian Hormone (AMH), de l'Androgen Binding Protein (ABP) et de l'inhibine par les cellules de Sertoli). Le testicule est recouvert par une membrane fibreuse, résistante, non élastique appelée albuginée (BARONE,2001).

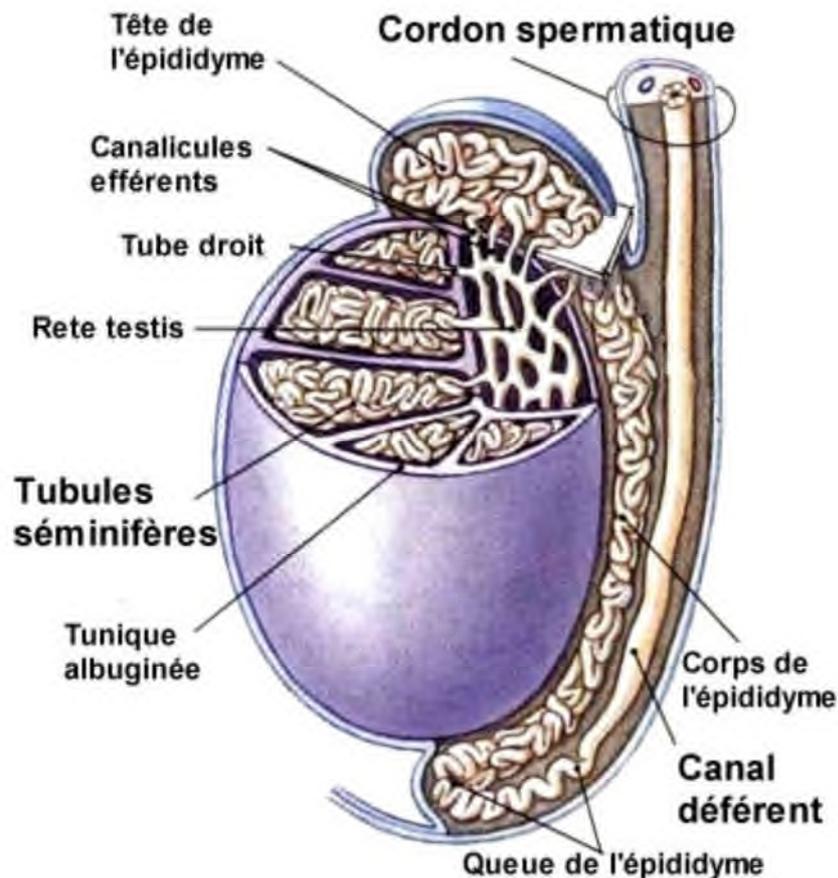


Figure 2 : Représentation schématique de l'épididyme accolé au testicule (THIBAUT et LEVASSEUR, 2001).

I.2. Partie excrétrice :

I.2.1. Voies génitales :

a. L'épididyme

L'épididyme est un corps allongé le long du bord postérieur du testicule auquel il fait suite chez les ruminants (Figure 2). Il est constitué d'un épithélium pseudo-strié et de nombreuses microvillosités. L'épididyme est composé de trois parties qui sont: la tête, le corps et la queue. Chez le taureau, la durée du transit épидидymaire des spermatozoïdes est de 9 à 13 jours (**HAZEN, 2010**).

L'épididyme joue plusieurs rôles essentiels pour la fertilité mâle. Il est impliqué dans le transport, la concentration, la maturation et le stockage des spermatozoïdes. Alors que la tête et le corps épидидymaires sont responsables de la maturation spermatique, la queue est plus impliquée dans le stockage assurant qu'un nombre suffisant de gamètes soit présent à chaque éjaculation (**HAZEN, 2010**).

b. Le canal déférent :

Il fait suite au canal épидидymaire et s'élargit en une ampoule défférentielle qui s'abouche à l'urètre contiguïté de la vésicule séminale

c. l'urètre :

Est un canal impair allant de la vessie au méat urinaire et servant de passage pour le sperme lors de l'éjaculation et l'urine pendant la miction. La longueur de l'urètre peut atteindre 100 à 120 cm chez un taureau adulte. Il comporte deux parties qui sont: l'urètre pelvien situé dans la cavité pelvienne et l'urètre pénien situé dans le pénis. Chez le taureau, l'urètre a la particularité de présenter un trajet en S : c'est le S pénien, il contribue à l'allongement du pénis lors de l'érection (**EDUCAGRI, 2005**).

II. Physiologie de l'appareil reproducteur du taureau :

II.1. La spermatogénèse :

La spermatogénèse est l'ensemble des processus de division et de différenciation cellulaire de la lignée germinale souche aboutissant à la formation de gamètes mâles ou

spermatozoïdes. Ces processus commencent dès la vie fœtale, deviennent très actifs à la puberté et se poursuivent jusqu'à la sénescence chez le mâle dans les parois du tube séminifère. Deux évolutions essentielles se produisent au cours de la spermatogenèse:

- la réduction du nombre de chromosomes de « $2n$ » à « n » au cours de la méiose, une division spécifique aux cellules germinales.
- et la maturation des cellules germinales aboutissant, à des cellules hautement spécialisées, les spermatozoïdes. La spermatogenèse se déroule en quatre phases (figure 3) qui sont dans l'ordre: la phase de multiplication des spermatogonies, la phase d'accroissement des spermatocytes 1, la phase de réduction chromatique, et la phase de différenciation des spermatides ou spermiogenèse. La spermatogénèse dure 54 jours chez le taureau (THIBAUT et LEVASSEUR, 2001).

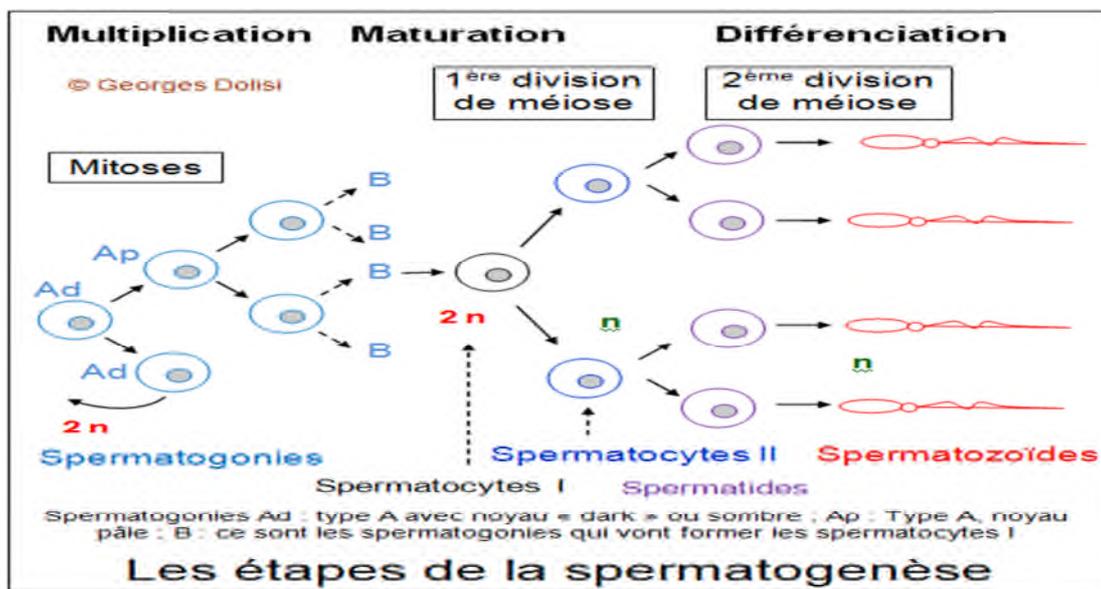


Figure 3 : Schéma représentatif des étapes de la spermatogenèse (THIBAUT et LEVASSEUR, 2001)

II.1.1. Le sperme :

Le sperme est un liquide opaque, et blanchâtre produit au cours de l'éjaculation. Il est composé de spermatozoïdes en suspension dans le liquide séminal qui est un mélange des sécrétions des différentes glandes génitales mâles (prostate, vésicule séminale). Les spermatozoïdes représentent 20 % et le liquide séminal 80% du volume de l'éjaculat.

II.1.2. Le spermatozoïde :

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui ne se développe plus et ne se divise plus une fois formé. Sa taille varie entre 50 à 80 μm . Le spermatozoïde comporte trois principales parties qui sont (figure 4) :

- la tête, partie essentielle, est presque exclusivement constituée d'un noyau haploïde et coiffé de l'acrosome.
- la pièce intermédiaire, elle est riche en mitochondries et en enzymes propres aux métabolismes du spermatozoïde.
- le flagelle, ses mouvements favorisent le déplacement du spermatozoïde.

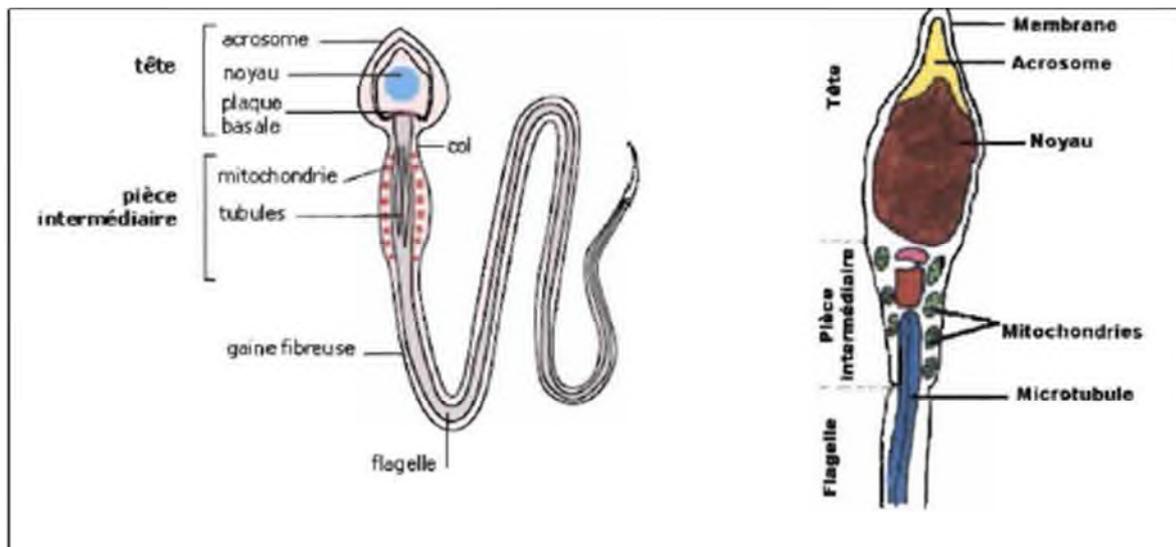


Figure 4 : anatomie du spermatozoïde de taureau (YAYE ,2009).

II.1.3. Plasma séminal :

Le plasma séminal est le principal composant du sperme. Il est constitué par les sécrétions des glandes annexes de l'épididyme et des cellules de Sertoli. Il renferme des constituants inorganiques et divers constituants organiques.

II.1.3.1 L'effet bénéfique du plasma séminal :

a. Le plasma séminal et la motilité spermatique :

Il a été décrit chez le taureau que certaines protéines sont en mesure d'augmenter la motilité spermatique (SANCHEZ-LUENGO *et al.*, 2004). en se fixant sur la pièce intermédiaire des spermatozoïdes lors de leur passage dans le canal déférent et induisant ainsi l'activation irréversible des pompes ioniques Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique.

b. la stabilisation des membranes spermatiques :

Souvent reliées à l'induction de la capacitation (MANJUNATH *et al.*, 2007). Certaines protéines BSP (Binder Sperm) interviennent également dans la stabilisation de la membrane plasmique après l'éjaculation. Certains auteurs ont démontré que des protéines de la famille BSP sont en mesure de se fixer aux groupements cholines des phospholipides membranaires de spermatozoïdes de taureau, empêchant leur départ spontané de la membrane plasmique et ceci, de l'éjaculation jusqu'à la capacitation (VILLEMURE *et al.*, 2003).

II.1.3.2 L'effet délétère du plasma séminal :

a. Le plasma séminal et la capacitation précoce :

Les protéines BSP du plasma séminal sont connues pour leur fonction de protection de l'intégrité des membranes spermatiques après l'éjaculation, comme présenté précédemment, mais elles sont surtout connues pour leur habilité à promouvoir la capacitation des spermatozoïdes du bovin et du porc (LUSIGNAN *et al.*, 2007). Pendant le mélange de la semence et du plasma séminal au moment de l'éjaculation, les protéines BSP induisent un premier départ rapide de cholestérol de la membrane spermatique (5 à 8% de cholestérol), avant de se fixer aux phospholipides membranaires pour promouvoir la stabilisation de la membrane des spermatozoïdes (VILLEMURE *et al.*, 2003). Cette stabilisation de la membrane spermatique via les BSPs est maintenue tout le long du tractus génital femelle jusqu'à l'oviducte. Les lipoprotéines à faible densité (LDL) présentes dans l'oviducte interagissent avec les protéines BSP entraînant un second efflux de cholestérol médiateur de la capacitation chez l'espèce bovine (MANJUNATH *et al.*, 2007).

Chapitre II

Le stress oxydatif

I. le stress oxydatif :

Dans les circonstances physiologiques, les radicaux libres oxygénés sont produits en permanence mais en faible quantité. Ils interviennent dans des voies de signalisation importantes dont celles impliquées dans la survie cellulaire. Dans ces conditions normales, la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre ce qui est indispensable car un excès des espèces oxygénées réactives (EOR) présente des propriétés toxiques. Si un déséquilibre a lieu en faveur des prooxydants, il conduit à un phénomène appelé stress oxydant (**MORENA M. et al ., 2002**). 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**).

I.1. Conséquences du stress oxydant :

Le stress oxydant provoque des lésions directes sur les molécules biologiques telles que l'oxydation des glucides, des lipides, des protéines et également des acides nucléiques. Les conséquences de l'action des espèces oxygénées réactives (EOR) sur toutes ces molécules peuvent être à l'origine de perturbations cellulaires graves allant même jusqu'à la mort cellulaire par activation des voies de l'apoptose. (**AITKEN et al., 2006**).

I.2. Les espèces oxygénées réactives (EOR) :

L'oxygène est indispensable à la vie des animaux, des plantes et de certains microorganismes vivants en aérobie. En effet, il est essentiel pour la production d'énergie sous forme d'ATP qui est réalisée par des mécanismes d'oxydo-réduction, c'est à dire de transfert d'un ou plusieurs électrons d'une molécule à l'autre. Lors de ces différentes réactions, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène. Lorsqu'un nombre impair d'électrons est transféré sur celui-ci, il est transformé en dérivés de l'oxygène appelés radicaux libres oxygénés ou espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont toxiques pour l'organisme. Ces radicaux libres oxygénés sont des molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**HALLIWELL et al., 1994**). ce qui engendre une instabilité. Cette particularité n'est que transitoire et se termine par l'acceptation ou le transfert d'un électron avec une autre molécule. Le degré de réactivité des radicaux libres est variable, mais une instabilité

importante provoque un transfert d'électron rapide sur une autre molécule de manière peu spécifique (HALLIWELL *et al.*, 1994).

I.2.1. Les sources des EOR :

En dehors des radiations ionisantes (UV, rayon X, rayon gamma) capables de produire directement le radical hydroxyle à partir de l'eau, le plus souvent la principale source d'ERO est la chaîne de transfert d'électrons des mitochondries ; la production d'oxydants par les neutrophiles et les macrophages est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADH-oxydase (WANG H.J. *et al.*, 2009).

I.2.2. Les principaux radicaux libres :

a. L'anion superoxyde : $O_2^{\circ-}$

C'est un radical chargé négativement, il provient du fait que l'oxygène dans son état fondamental possède 2 électrons non appariés et doit recevoir un électron à la fois, ce qui est le cas lors de la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire. Le radical superoxyde peut agir comme un oxydant ou un réducteur (BEGUEL J.P., 2012).

b. Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2

En conditions physiologiques ce composé est peu toxique même si il est capable de traverser les membranes. Cependant, il est à l'origine de composés radicalaires très réactifs et très toxiques. De ce fait son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut se dérouler dans différents compartiments cellulaires, C'est un oxydant impliqué notamment dans la voie de l'apoptose (HALLIWELL B. et GUTTERIDGE J., 1999).

c. Le radical hydroxyle : $^{\circ}OH$

Il est plus réactif que les autres, il peut réagir avec tous types de molécules et il est responsable de : la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines de l'ADN nucléaire et mitochondrial et aussi des ARN (BEGUEL J.P., 2012).

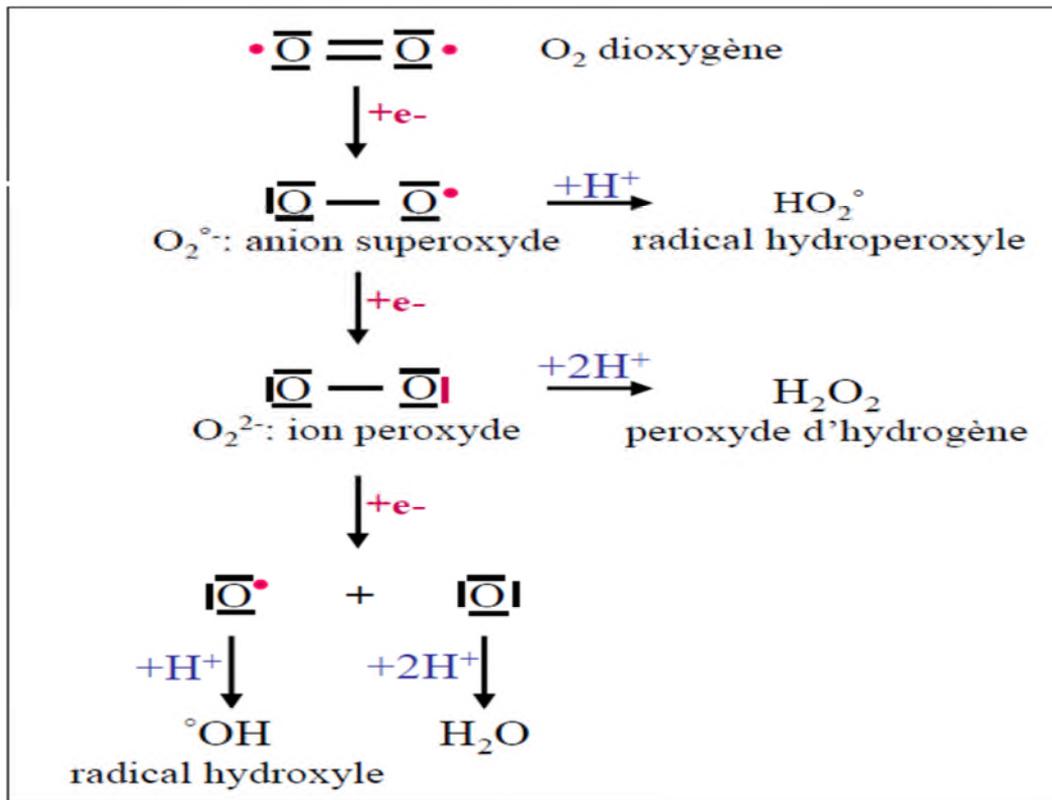


Figure 5 : représentation des réductions successives de la molécule d'oxygène formant les différents EOR (GILLE et SIGLER, 1995).

III. Contrôle de la production des EOR :

III.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).

III.1.1. Système antioxydant enzymatique

Se sont des enzymes dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution et qui agit de manière coordonnée. Parmi les enzymes antioxydants en cite :

a. La superoxyde dismutase (SOD) :

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 . Cette réaction peut se faire spontanément mais de façon moins rapide, ce qui augmente le temps de vie de l' $O_2^{\circ-}$ lui permettant ainsi d'oxyder des composants cellulaires ou de générer des EOR bien plus toxiques (GREGORY *et al.*, 1974).

b. La catalase (CAT) :

La catalase n'utilise que l' H_2O_2 comme substrat et fonctionne lorsque celui-ci est présent à des concentrations élevées bien supérieures aux conditions physiologiques de l'ordre 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 : (figure 16) et La glutathion peroxydase (GPxs). Le déclenchement de leur action respective est en fonction de la concentration du substrat.

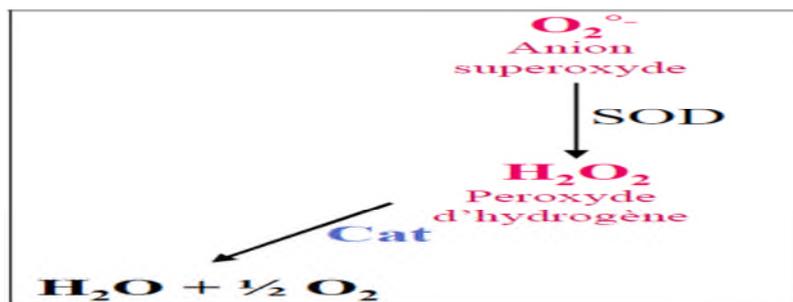


Figure 6 : L'action du superoxyde dismutase et de la catalase. (HUANG *et al.*, 1997).

c. La glutathion peroxydase (GPx) :

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

d. La glutathion réductase (GR) :

Contrairement à la catalase, les glutathion peroxydases métabolisent une grande variété d'hydroperoxydes (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).

III.1.2. Les antioxydants non enzymatiques :

Un grand nombre de molécules ont des propriétés anti oxydantes, parmi celle-ci les différentes vitamines (E, C, et A) et le glutathion.

a. La vitamine E :

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui a des propriétés anti oxydantes en conjugaison avec la vitamine C et le glutathion. Elle est présente en grande quantité dans les huiles végétales, et il en existe huit formes dont la plus active est l'alpha-tocophérol (figure 7). Celui-ci est capable d'interagir avec l'O₂^{-°}, H₂O₂, et °OH. La vitamine E joue son rôle d'antioxydant 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 (DAVI *et al.*, 1999).

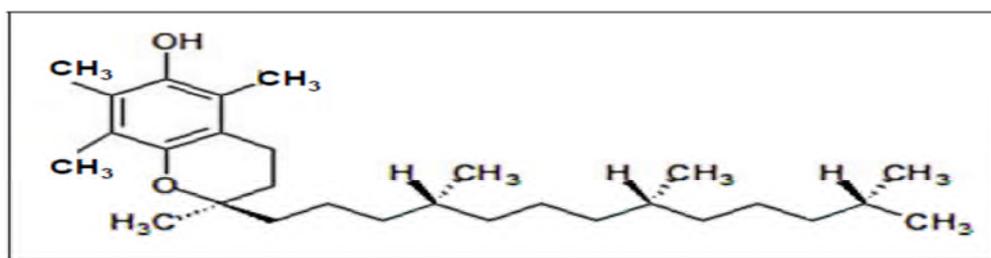
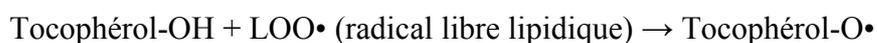


Figure 7 : Formule chimique de l'alpha-tocophérol (DAVI *et al.*, 1999).

Cette activité anti oxydante est liée à sa capacité à capter l'électron célibataire des radicaux libres. Après ce processus la vitamine E se retrouve sous forme d'un radical alpha-tocophéroxyl. Une fois activé, le tocophérol peut ensuite réagir avec un nouveau radical libre pour former une espèce neutre, ou être régénéré par des agents réducteurs hydrosolubles tels que la vitamine C, ou le glutathion (KAYDEN *et al.*, 1965).



b. La vitamine C :

C'est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Il s'agit de l'acide L-ascorbique et de ses sels, les ascorbates de sodium et de calcium. Elle a un rôle antioxydant, car elle réagit avec l' $O_2^{\cdot-}$, $^{\circ}OH$. Elle permet de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant (**LUTSENKO *et al.*, 2002**). Elle agit également sur certains hydroperoxydes 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 pro-oxydante (**POLJSAK *et al.*, 2005**).

c. La vitamine A :

La vitamine A appelée également rétinol et ses précurseurs comme le β -carotène sont liposolubles. Dans l'organisme, elle existe sous forme de rétinol, de rétinal, d'acide rétinoïque et de rétinyl phosphate. Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, et ce processus est accéléré par la lumière et la chaleur. Elles sont liposolubles et leur rôle principal est la protection des membranes cellulaires en réduisant la peroxydation lipidique. Elles agissent en captant les radicaux libres et les EOR (**BURTON et INGOLS, 1984**).

d. Le glutathion : GSH :

Le glutathion présente entre autre la propriété d'être un puissant antioxydant qui protège les cellules des radicaux libres. Cette propriété est liée au fait qu'il est capable de se combiner avec l' $O_2^{\cdot-}$, l' H_2O_2 , et l' $^{\circ}OH$. Il protège ainsi les cellules de la peroxydation lipidique. Enfin, il permet la régénération de la vitamine E qui agit également comme un antioxydant. Le GSH est aussi impliqué dans des réactions enzymatiques antioxydantes comme co-substrat avec des glutathion peroxydases (**Li *et al.*, 1995**).

IV. Les EOR dans la fonction spermatique:

La présence d'EOR dans une suspension de spermatozoïdes humains a été détectée

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 éliminées, 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.

IV.1. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes :

a. Rôle dans la compaction de l'ADN :

Le spermatozoïde contient une glutathion peroxydase active contre les phospholipides peroxydés appelée GPx4 ou PHGPx. C'est une enzyme séléno-dépendante qui est liée aux mitochondries et à la chromatine des spermatozoïdes matures (GODEAS *et al.*, 1997). L'activité de cette enzyme requiert un accepteur d'électron qui peut être sous forme d' H_2O_2 , d'acides gras hydroperoxydés, ou de phospholipides hydroperoxydés. Ces composés peuvent être produits à partir de l' $O_2^{\circ-}$

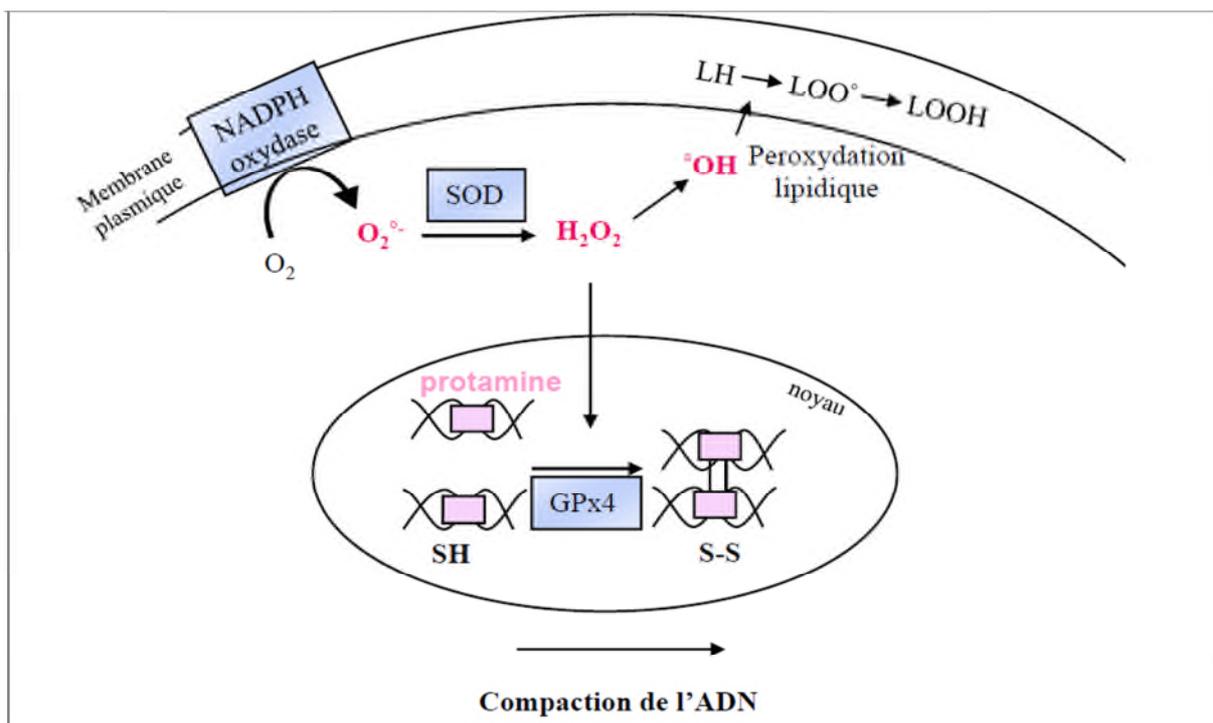


Figure 8: Illustration de l'action supposée des EOR dans la compaction de l'ADN.

La production d' $O_2^{\circ-}$ par la NADPH oxydase du spermatozoïde, et sa dismutation en H_2O_2 par la SOD contribue à la compaction de l'ADN (figure 8) grâce au pontage des protamines par l'enzyme GPx4 (WEIR et ROBAIRE 2006).

b. Rôle dans la capacitation :

La capacitation prépare les spermatozoïdes à la réaction acrosomique indispensable à la fécondation de l'ovocyte. Ce processus est lié à différents événements : un influx d'ions calciques, une augmentation du pH intracellulaire, et d'AMPc. Il existe un lien étroit entre la production des EOR et ce processus (LAMIRANDE et O'FLAHERTY, 2008).

c. Activation de la motilité :

L'activation de la motilité est la conséquence d'une augmentation du pH mais également d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Les EOR sont capables de moduler le taux d'AMPc intracellulaire. De plus, il a été montré que l'exposition des gamètes mâles aux EOR induit l'augmentation intracellulaire de l'AMPc *via* un mécanisme qui est inhibé par la SOD (ZHANG et ZHENG, 1996). Les EOR semblent donc intervenir dans l'activation de la motilité par l'induction de l'AMPc, mais les mécanismes cellulaires mis en jeu ne sont pas connus.

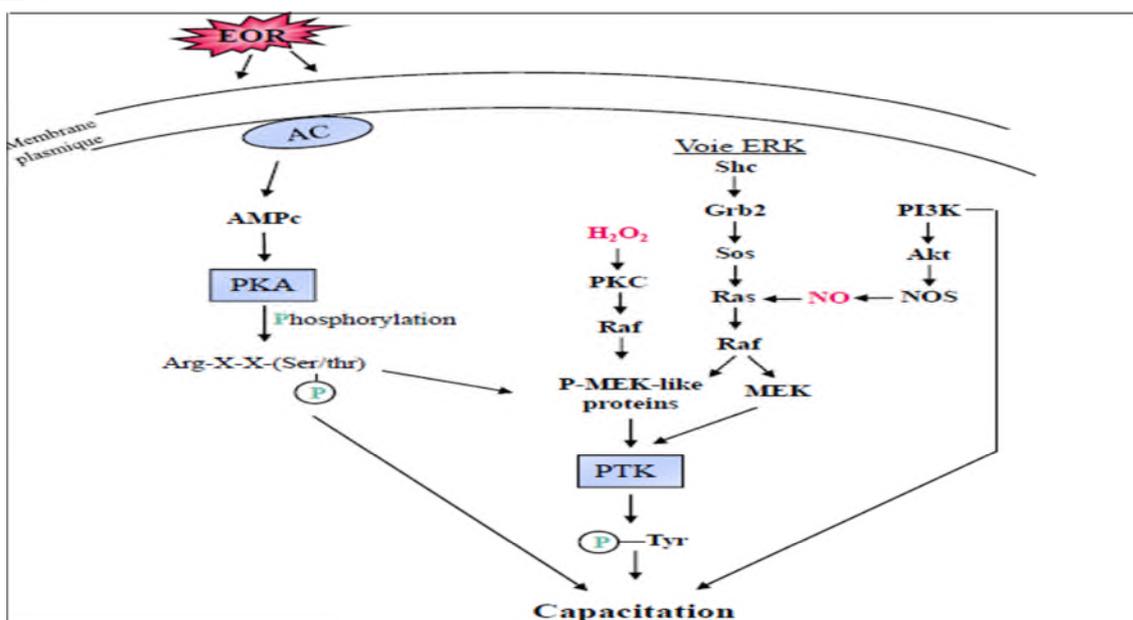


Figure 9: Cascades de phosphorylation modulées par les EOR.

Les EOR stimulent l'AC (adenylate cyclase), ce qui conduit à l'augmentation d'AMPc intracellulaire et à l'activation de la PKA (protéine kinase A). Celle-ci phosphoryle certaines protéines qui par l'intermédiaire d'autres voies conduisent à la capacitation (**LAMIRANDE et O'FLAHERTY, 2008**).

IV.2. 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 au 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**).

IV.2.3. Système de défense du spermatozoïde :

La forte compaction de l'ADN du spermatozoïde et son volume cytoplasmique faible réduisent la capacité du spermatozoïde à lutter contre les attaques radicalaires. Les spermatozoïdes possèdent néanmoins certains composés antioxydants comme du glutathion réduit, de l'acide ascorbique ou encore de la vitamine E. Cette dernière est retrouvée chez le rat en plus grande quantité sur les spermatozoïdes issus de la tête que de la queue de l'épididyme (TRAMER *et al.*, 1998). Des enzymes antioxydantes sont également retrouvées au niveau des spermatozoïdes, notamment GPx1 et GPx4 ainsi que la glutathion réductase (ALVAREZ et STOREY, 1989). La Cu-Zn SOD est exprimée dans l'épididyme, elle est sécrétée et est capable de se lier aux spermatozoïdes. La catalase est également présente sur les spermatozoïdes mais seulement chez certaines espèces et son expression reste à un niveau faible.

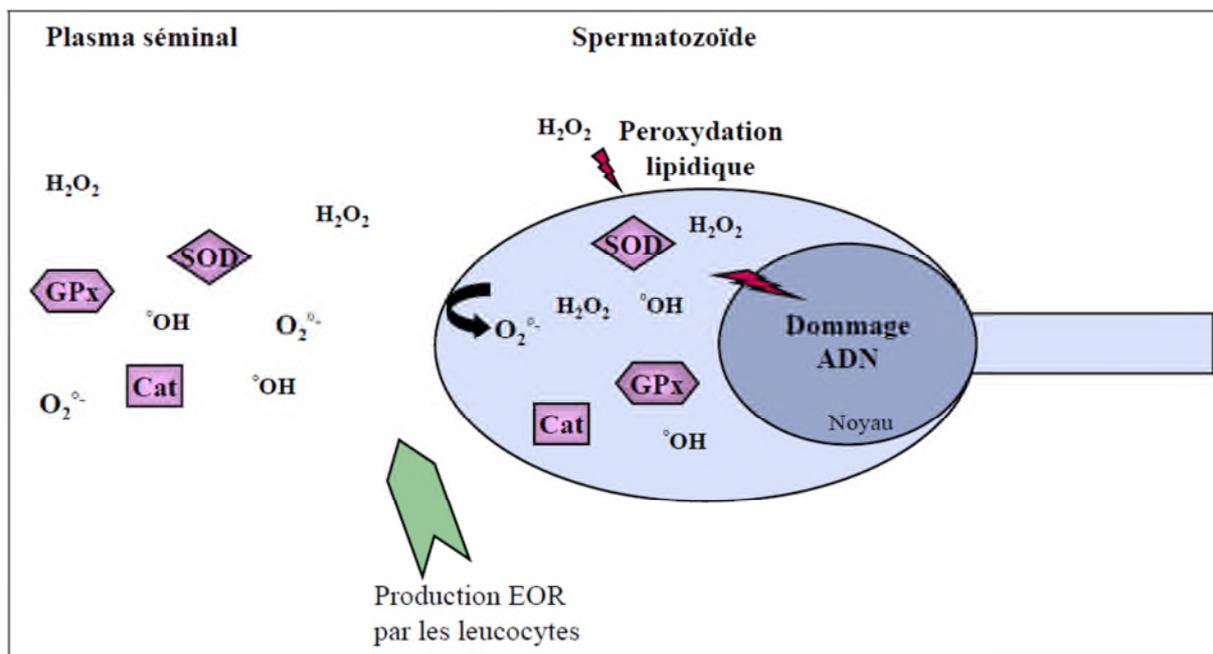


Figure 10 : Systèmes de défense enzymatiques présents au niveau des spermatozoïdes et du plasma séminal (GARRIDO *et al.*, 2004).GPx: Glutathion peroxydase / Cat: Catalase / SOD: Superoxyde dismutase.

Chapitre III

Technologie de la semence bovine

Selon l'agence française de normalisation (AFNOR), la semence est un produit préparé (récolté, dilué, analysé, et conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. L'ensemble des opérations de préparation de la semence bovine peut être comparé à une chaîne dont chaque maillon constitue un stade technologique très important (ADAMOU-N'DIAYE *et al.*, 2003).

I. La collecte du sperme :

La récolte du sperme est l'ensemble des procédés par lesquels le sperme est recueilli chez un animal vivant. Le sperme est prélevé sur des animaux sains, reconnus indemnes de maladies. Plusieurs techniques de récolte ont été utilisées au fil du temps avec les progrès scientifiques. La récolte au vagin artificiel et à l'électroéjaculation restent cependant les deux méthodes de récolte les plus utilisées actuellement au niveau de l'espèce bovine (PAREZ et DUPLAN, 1987).

I.1. Collecte du sperme au vagin artificielle:

La collecte du sperme au vagin artificiel constitue la technique la plus utilisée dans le monde au niveau de l'espèce bovine. C'est un procédé de récolte qui se rapproche le plus des conditions naturelles d'éjaculation (BOLY, 1986). Elle permet de simuler les conditions naturelles offertes par le vagin de la vache, (nécessite un entraînement préalable des mâles).

I.2. L'électro éjaculation :

elle permet de collecter de la semence sur n'importe quel mâle adulte grâce à une sonde rectale qui provoque l'excitation de différents nerfs (en particulier le nerf sciatique) par stimulation électrique, ce qui entraîne des contractions musculaires involontaires de l'animal et donc aboutit à l'éjaculation (CURRY, 2007).

I.3. La collecte du sperme épидидymaire :

On peut prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant sous anesthésie générale avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent (DEUTSCHEUR *et al.*, 2007). Comme on peut aussi procéder à une collecte post-mortem à partir d'un animal mort. Trois méthodes principales de récupération de sperme épидидymaire post-mortem ont été adoptées dans différentes espèces domestiques et sauvages, cependant la méthode rétrograde reste la plus utilisée.

I.3.1. La méthode « rétrograde-flushing » :

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

II. Analyse de la qualité du sperme récolté :

Elle consiste à apprécier les caractéristiques du sperme collecté, notamment celles en relation avec le pouvoir fécondant et les technologies de conditionnement. L'examen séminologique de l'éjaculat comprend un examen visuel (macroscopique), un examen microscopique et une évaluation par test métabolique ou test de résistance.

II.1 Examens macroscopiques du sperme :

L'évaluation visuelle permet d'apprécier le volume de l'éjaculat, sa couleur et sa viscosité. Il est rapidement réalisé après la collecte du sperme.

II.1.1 Volume de l'éjaculat :

Le volume du sperme collecté varie selon l'espèce et pour une même espèce donnée, il est en fonction de l'état physiologique de l'individu, de l'âge, de la saison, de la race, de la méthode de récolte ou encore des conditions sanitaires et alimentaires (**HANZEN, 2008**). Au niveau de l'espèce bovine, le volume du sperme varie entre 0,5 à 14 ml avec un volume moyen de 4 ml (**PAREZ et DUPLAN, 1987**). Le volume du sperme est généralement mesuré par lecture directe sur le tube de collecte gradué (de 0 à 15 ml).

II.1.2. Couleur de l'éjaculat :

Le sperme normal du taureau est de couleur blanchâtre (**PAREZ et DUPLAN, 1987**). Cette couleur peut être cependant modifiée pour des raisons d'ordre physiologiques et surtout pathologiques. La couleur jaune du sperme est due à une teneur élevée en carotène provenant

des vésicules séminales. Elle peut également résulter de la présence de pus ou d'urine dans le sperme. Une coloration rosâtre ou rougeâtre traduit la présence du sang dans le sperme.

II.2. Examens microscopiques :

Ils comportent l'évaluation de la motilité, de la concentration en spermatozoïdes, du pourcentage en spermatozoïdes vivants et de la morphologie des spermatozoïdes.

II.2.1. Motilité massale :

Elle s'apprécie au microscope optique au grossissement x10. A l'examen microscopique d'une goutte de sperme non diluée, l'observateur s'intéresse aux mouvements et au déplacement des spermatozoïdes dans le liquide séminal. A l'issue de l'observation, en fonction du mouvement de masse des spermatozoïdes, une note de 0 à 5 est attribuée à chaque éjaculat (Tableau 1).

Note	Pourcentage approximatif	Nature du mouvement
0	0 %	Aucun mouvement en surface
1	20 %	Léger mouvement a la surface
2	40 %	Mouvement net mais ne formant pas de vague
3	60 %	début de vague
4	80 %	vague très nette
5	100 %	tourbillon nettement visible

Tableau 1 : Notation de la motilité massale dans l'espèce bovine (**PAREZ et DUPLAN, 1987**).

II.2.2 Motilité individuelle :

Elle s'apprécie au microscope optique au grossissement x40. C'est l'appréciation du mouvement des spermatozoïdes par leur déplacement à travers le champ microscopique. Les mouvements normaux des spermatozoïdes sont oscillatoires et progressifs. Ce test se réalise sur du sperme dilué à 1/10 avec du sérum physiologique. Il permet de déterminer approximativement le taux de spermatozoïdes vivant (**PAREZ et DUPLAN, 1987**).

II.2.3. Pourcentage de spermatozoïdes vivants :

La détermination se fait à l'aide de colorants spéciaux (Eosine nigrosine, bleu de méthylène ou bleu de bromophénol) qui peuvent traverser la membrane des spermatozoïdes morts et les différencient donc des vivants.

III. la conservation du sperme :

III.1 Polyéthylène glycol (PEG) :

III.1.1. Définition :

C'est un polymère biocompatible, non ionique et non toxique utilisé dans les domaines biomédicaux, biotechnologiques et pharmaceutiques (ANNUNZIATA O. *et al.*, 2002). Il est appelé également macrogol dans le domaine médical (TANI *et al.*, 2002).

III.1.2 Structure et propriétés

a. Structure

Le PEG est un enchainement d'unités structurales répétitives de monomère d'éthylène glycol :

-Monomère: $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ethylene glycol

-Dimère : $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ Diéthylène glycol

-Polymer : $(\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{ CH}_2\text{-O-CH}_2\text{ CH}_2\text{)}_n$ polyethylene glycol (ROBERTS M.J. *et al.*, 2002).

Le PEG peut être synthétisé par l'interaction d'oxyde d'éthylène avec l'eau ou d'oligomère d'éthylène glycol (KADAJJI V.G. *et* BETAGERI G.V ., 2011).

b. Propriétés

Le PEG à plusieurs propriétés :

-il n'est ni absorbé, ni fermenté.

-il est soluble dans l'eau et dans beaucoup de solvants organiques comme : le toluène, le chlorure de méthylène, l'éthanol et dans l'acétone (TANI *et al.*, 2002).

-Il résiste à la reconnaissance du système immunitaire (**BRITTON KEYS K., 1998**).

III.1.3 La toxicité :

La sensibilisation sur la peau a été observée chez quelques sujets humains avec certains macrogols. (**SMYTH H.F., 1955**).

Cependant des doses orales de 10 grammes de macrogol ont été tolérés par des volontaires humains ayant reçus ces doses sans l'expression de symptômes toxicologiques ou cliniques (**SHAFFER C.B., 1947**).

Les polyéthylènes glycols ayant une moyenne des poids moléculaires de 400, 1500, et 4000 ne causent aucun effet indésirable chez les chiens lorsqu'ils sont administrés à 2% dans leur régime alimentaire pendant un an.

III.1.4 Le rôle du PEG :

-Il augmente l'activité enzymatique en raison des interactions favorables entre la coenzyme NADP et PEG.

-Le PEG 400 permet une haute solubilité des sels et peut être utilisé dans des réactions d'oxydations et de substitution (**PANCERA M.S., 2002**).

-Le PEG augmente le volume et l'hydratation du contenu intestinal,

-Le PEG enlève les cellules précancéreuses de la muqueuse et agit pratiquement comme les anticancéreux cytotoxiques classiques, à ceci près qu'il n'est ni absorbé ni toxique, ni coûteux (**CORPET D.E. et al., 2003**).

-Le PEG protège les épithéliums contre les agressions physiques et chimiques du flux fécal.

-De plus, le PEG par ces propriétés de polymère amphiphile favorise la restauration des membranes cellulaires lésées (**TOGO T. et al., 1999**).

III.1.5. Domaine d'application du PEG :

Les macrogols sont utilisés sous formes liquides pour les préparations des produits pharmaceutiques tels que les parentérales pour des capsules de gélatines, on fait également appel au PEG dans le domaine cosmétique pour la préparation des crèmes où il agit comme

agent de nettoyage (MRTIN J.O. 1981), mais aussi dans les déodorants et parfums (TURNEY M.E., 1981).

IV. le cholestérol :

IV.1. Définition et rôle :

C'est un lipide (figure 11) de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimique, il est présent dans tous les tissus des animaux et il est indispensable pour ses multiples fonctions :

- un rôle structurel dans l'architecture cellulaire
- un rôle dans le transport des graisses hépatiques et sanguines
- un rôle capital en tant que précurseur des hormones stéroïdes

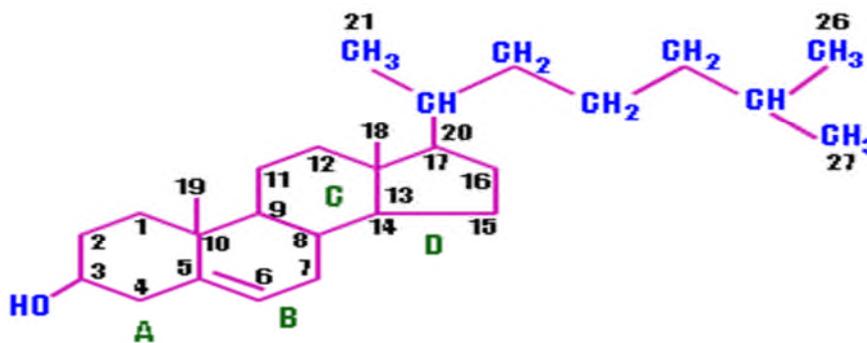


Figure 11 : Structure du cholestérol. (LLBIOCH, 2003).

IV.2. Le cholestérol et la membrane spermatique :

La membrane spermatique est constituée de lipides et de protéines avec les lipides organisés en bicouches. Les lipides de la bicouche ont une extrémité hydrophile orientée vers l'extérieur et une extrémité hydrophobe vers l'intérieur de la membrane (CHAKRABARTY *et al.*, 2007). Les lipides les plus représentés sont les phospholipides et le cholestérol qui peuvent se déplacer latéralement sur la membrane spermatique (AMANN & PICKETT, 1987).

Les phospholipides membranaires subissent une transition de phase passant de la phase dite liquide vers la phase cristalline. En revanche, tous les lipides ne subissent pas la transition de phase au même moment que les protéines. De ceci résulte une diminution des mouvements lipidiques au sein de la membrane conduisant à une instabilité et une perte des

fonctions (**AMANN & PICKETT, 1987**). Selon certaines études, le ratio cholestérol/phospholipides (C/P) élevé des membranes spermatiques de certaines espèces Permettait leur résistance au choc du froid (**WHITE, 1993**).

espèces	homme	lapin	bouc	rat	taureau	bélier	porc
(C/P)	0.99	0.88	0.59	0.55	0.45	0.37	0.35

Tableau 2 : Différences lipidique entre les spermatozoïdes de plusieurs espèces (**BAHR, 1964**).

En réduisant la perméabilité membranaire, le cholestérol diminue les transferts d'eau, maintenant intact la structure membranaire des cellules pendant les variations osmotiques au moment de la cryoconservation (**AKSOY *et al.*, 2010**).

V. La conservation de la semence :

V.1. La conservation de la semence à 4°C :

La conservation de la semence de taureau, bouc, bélier ou cheval au frais consiste à abaisser progressivement sa température à 5°C après une fois diluée (**O'HARA *et al.*, 2010**). Cette baisse de la température a pour but de réduire les dépenses métaboliques et de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes (**GADEA, 2003**). Le dilueur Glucose-citrate-jaune d'œuf est l'un des premiers à avoir été testé avec succès (**SALAMON & MAXWELL, 2000**). D'autres dilueurs de conservation de la semence au frais sont à base de Tris : Tris-glucose-jaune d'œuf et le Tris-citrate-fructose-jaune d'œuf (**SALAMON & MAXWELL, 2000**). Le dilueur à base de lait est également utilisé pour la conservation de la semence fraîche chez le bélier et de taureau (**O'HARA *et al.*, 2010**).

Les dilueurs optimisés pour la conservation de semence de taureau en frais, comme le Triladyl® et Caprogen® (les deux à base de jaune d'œuf), peuvent permettre un maintien de la qualité spermatique pendant 6 jours à 5°C et l'obtention d'un taux de fertilité en fécondation *in vitro* de 25 et 66% lorsque les semences sont diluées dans du Triladyl® et du Caprogen®, respectivement (**VERBERCKMOES *et al.*, 2005**).

V.2. La cryoconservation de la semence :

La cryoconservation se définit comme l'utilisation de très basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intact leur structure et leurs fonctions. Cette dernière partie de la définition est la plus difficile à maîtriser puisque les cellules et tissus ne sont pas naturellement programmés pour résister à la congélation et la majorité des cellules non protégées subissent d'importants dommages à basse température. Il devient donc indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères (**MAZUR, 1984**).

L'eau est non seulement indispensable à la vie de toute cellule mais elle est également le principal agent responsable des cryodommages au moment de la congélation. Pendant sa congélation, l'eau va subir une transition de phase passant d'un état liquide à un état cristallin (**MAZUR, 1968**). De ceci résulte la formation de cristaux de glace et l'augmentation de la concentration en solutés présents dans le milieu. Les cristaux de glace, au cours de leur formation, transpercent les membranes des cellules tandis que l'augmentation de la concentration en solutés crée un changement de l'osmolarité du milieu, entraînant des pressions mécaniques importantes sur les membranes cellulaires (**MAZUR, 1968**).

V.2.1. Les agents cryoprotecteurs :

Ils réduisent la formation des cristaux de glace délétères pour les membranes cellulaires en augmentant la concentration totale en soluté. Des études ont démontré que le changement d'osmolarité au moment de la congélation était la principale cause de dommage cellulaire, plus que la formation de cristaux de glace (**Lovelock, 1953a**). De ces études ont été déduites les propriétés des agents cryoprotecteurs :

- le cryoprotecteur doit être soluble dans l'eau et le rester à basse température afin d'abaisser la température de congélation.
- il doit avoir un faible taux de toxicité afin d'être utilisé à sa concentration d'efficacité optimale.
- il doit être toléré par le tractus génital femelle.

V.2.1.1 Le glycérol :

c'est le plus utilisé des cryoprotecteurs, il possède une action à la fois intra et extracellulaire, il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis ce qui diminue le risque de perforation des membranes (STANESCU P.M. et ALIN I. B., 2012).

V.2.1.2 Le tréhalose :

Le tréhalose est un disaccharide composé de deux molécules de glucose, qui a la particularité d'être remarquablement thermostable, et possède un seuil de congélation très élevé (température de congélation -197°C dans 100mg/mL d'eau) (JAIN & ROY, 2009).

V.3. Les dilueurs de semences :

Les dilueurs de semences sont des solutions aqueuses servant à augmenter le volume d'un éjaculat pour l'amener à la concentration de conservation souhaitée. Afin d'être efficace, le dilueur doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes (glucose ou fructose), conserver un pH (Tris, Hepes) et une osmolarité physiologique (NaCl, KCl), empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et faciliter l'ajout d'agent cryoprotecteur (GADEA, 2003).

Les dilueurs à base de jaune d'œuf et de lait de vache sont les plus répandus pour la conservation des semences d'animaux d'élevage en frais ou en congelé (O'SHEA & WALES, 1966).

Cependant l'utilisation de produits d'origine animale dans la composition des dilueurs, comme le jaune d'œuf, présente parfois un risque d'introduction de maladies animales non-contrôlées pour la semence mais également pour les femelles inséminées (AKHTER *et al.*, 2011). Pour pallier à cela, certains auteurs se concentrent sur la conception de dilueurs synthétiques exempts de produit d'origine végétale.

les dilueurs synthétiques sont perçus comme une alternative aux dilueurs à base de jaune d'œuf, sans toutefois présenter une amélioration de la qualité spermatique post-dégel (GIL *et al.*, 2003).

Partie expérimentale

Chapitre I

Material et méthodes

Dans le but de conserver les caractéristiques de la semence bovine lors de la réfrigération nous avons testé de nouveaux milieux à base de PEG, CHOL, et de vitamine E. La partie pratique de notre travail c'est déroulée au niveau du laboratoire de biologie animale du bloc N° : 12 au sein de l'université A.MIRA / Bejaïa.

L'expérimentation à été réalisée dans la période allant du 14 au 27 mars sur le sperme épидидymaire de trois testicules de bovins différents, dont les conditions d'élevage, l'âge et l'état corporelle sont inconnus. Les testicules sont fraîchement obtenus chez les bouchers de la ville de Bejaïa juste après l'abatage.

I. La collecte du sperme épидидymaire :

a. Le matériel :

Afin d'établir une collecte du sperme épидидymaire, il nous à fallût :

- une lame de rasoir.
- une seringue.
- un épидорff.
- de l'eau physiologique.
- du papier aluminium.
- du papier absorbant.
- des gants en latex.
- et un stérilisateur.

b. La méthode de la collecte :

Pour la collecte du sperme épидидymaire nous avons procédé de la sorte :

b.1. Isolation de l'épididyme :

- laver le testicule à l'eau courante et à température ambiante.
- enlever la gaine externe du testicule (l'albuginée) à l'aide d'une lame à rasoir.
- toujours à l'aide d'une lame à rasoir, isoler soigneusement l'épididyme du testicule.
- mettre en évidence le canal déférent de l'épididyme en le débarrassant de la tunique qui l'enrobe.
- rincer l'épididyme et le canal déférent avec de l'eau physiologique.
- réaliser une série de ponctions sur la queue épидидymaire, afin de débarrasser celle-ci des gouttes du sang qui peuvent contaminer la semence lors de la collecte.
- rincer avec de l'eau physiologique et tamponner la queue épидидymaire à l'aide du papier absorbant pour bien nettoyer.

b.2. La collecte proprement dite :

- introduire une seringue remplie d'air et de 0,6ml du Tris buffer dans la lumière du canal déférent.
- réaliser une incision au niveau de la queue épидидymaire avec une lame stérilisée au préalable.
- placer un épидидorff gradué au niveau du point d'incision.
- vider l'air et le Tris de la seringue tout en maintenant le contact de l'aiguille avec la lumière du canal bien fermer pour créer une pression qui conduit à l'écoulement de la semence dans l'épидидorff de collecte.

II. L'analyse du sperme collecté :**II.1. Analyse macroscopique :**

Directement après la collecte nous avons noté à température ambiante :

-Le volume : lecture directe sur l'épindorff.

-La couleur de la semence : par observation à l'œil nu.

II.2. Analyse microscopique :

II.2.1. La motilité massale :

Le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes est estimé directement après la collecte par observation d'une goutte de sperme sous microscope optique au grossissement $\times 10$, pour évaluer le mouvement et une note de 0 à 5 est attribuée.

II.2.2. La concentration :

La concentration du sperme des trois testicules est obtenu directement à partir d'un analyseur informatique du sperme (CASA), en tenant compte du taux de dilution.

Dans l'analyse microscopique du sperme nous avons utilisé le matériel suivant :

-un microscope optique.

-un analyseur informatique du sperme (CASA) : Computer Assisted Sperm Analysis.

-des lames.

-des micropipettes de 10 μ l, 100 μ l, et 1000 μ l.

-des embouts et des épindorffs.

III. La préparation des solutions :

Le sperme est dilué dans le dilueur Tris.

III.1. Protocole de préparation du dilueur Tris:

Dans 100 ml d'eau distillé on ajoute :

- 2.42 g du Tris (amino-hydroxyméthyle).
- 1.38 g d'acide citrique pour régulariser le PH et l'osmolarité.
- 01 g de fructose comme apport nutritif.
- 0.1 g de la pénicilline (antibiotique) pour lutter contre une éventuelle contamination.

III.2. Préparation des milieux de conservation :

III.2.1. Matériels :

a. Les réactifs :

- Le dilueur (Tris buffer), -Le (PEG), -Le (CHOL) et la (VIT E)

b. Le matériel :

- un erlen-Meyer
- un Becher
- des flacons étiquetés
- balance analytique
- un agitateur
- barons magnétiques

III.2.2 Méthodes :

Le tableau ci-dessous montre la concentration finale des différents réactifs après dilution du sperme en (mg/ml).

VITE	0.2mg/ml	CHOL	0.5mg/ml	VIT E-CHOL	(0.2+0.5)mg/ml
VITE-PEG	2mg/ml	CHOL-PEG	5mg/ml	VITE-CHOL-PEG	(2+5) mg/ml

Tableau 3 : Les concentrations des molécules actives après dilution du sperme.

III.2.3. Protocole de préparation des traitements de conservation :

a. préparation du milieu (PEG-CHOL) :

- 150mg (90% PEG+10% CHOL) $\xrightarrow{\text{dans}}$ 20 ml de Tris.

b. préparation du milieu (PEG-VITE) :

- 60mg (90% PEG+10% VITE) $\xrightarrow{\text{dans}}$ 20 ml de Tris.

c. préparation du milieu (VITE-CHOL) :

20mg (VITE) + 49,99mg (CHOL) $\xrightarrow{\text{dans}}$ 66.66 ml de Tris

d. Préparation du complexe (PEG-CHOL-VIT E) :

Nous avons mélangés : 60mg (VITE-PEG) +150mg (CHOL-PEG) $\xrightarrow{\text{dans}}$ 20 ml de Tris

III.2.3.1. Préparation des échantillons (traitement+sperme) :

Nous avons utilisé 1 volume de sperme pour deux volumes de traitement 1:3 et nous avons pris le milieu Tris buffer comme contrôle.

Une première analyse est réalisé avec le CASA pour l'ensemble des 07 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 toutes les heures durant 3 heures.

III.2.3.2. La dilution pour l'analyse :

Prélever 10 µl de sperme conservé qui sera dilué dans 100 µl de Tris. Ensuite on dépose une goutte de 10 µl du sperme dilué sur la lame Makler et on exécute l'analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA).

Chapitre II

Résultats et discussion

Dans ce présent chapitre nous allons exposer et discuter les résultats obtenus au cours de notre travail. L'objectif est de proposer un milieu de conservation au frais adéquat et convenable pour le sperme bovin.

On c'est donc basé sur le simple fait que le meilleur milieu sera celui qui assurera une meilleure conservation de la mobilité ainsi qu'une meilleure vitesse linéaire des spermatozoïdes (VSL).

I. L'analyse macroscopique :

Les caractéristiques macroscopiques du sperme de chaque mâle (testicule) étudié sont représentés dans le tableau suivant :

Male	Couleur du sperme	Volume/ml
N°1	Blanche rosâtre	1.4 ml
N°2	Blanche rosâtre	0.7 ml
N°3	blanchâtre	0.5 ml

Tableau 4 : tableau représentatif des caractéristiques macroscopiques.

La différence des volumes peuvent être liée à la différence de l'état corporelle des mâles, leur différence d'âge, leur environnement, et aussi leur mode d'alimentation. Le volume enregistré reste relativement proche de l'espèce bovine qui varie en générale entre 0.5 ml et 14 ml avec une moyenne de 4 ml (**PAREZ et DUPIAN, 1987**). Cependant ces données concernent le sperme éjaculé qui présente un volume plus élevé par rapport au sperme récolté au niveau de l'épididyme sur lequel nous avons travaillé et cela s'explique par le fait que le liquide séminal vient s'ajouter au sperme épидидymaire lors de l'éjaculation.

Concernant la couleur du sperme, le mâle N°3 a une couleur blanchâtre ce qui signifie que le sperme est normale.

La semence récoltée chez les mâles N°1 et N°2 présentent une couleur rosâtre ce qui peut se traduire par la présence du sang dans le sperme, les deux substances sont éventuellement rentré en contact lors de la réalisation de la collecte d'où l'intérêt de l'ajout d'antibiotiques à nos milieux de conservations afin de parer toutes contaminations.

II. L'analyse microscopique :

D'une manière générale on constate que le milieu Tris (control) représente le pourcentage le plus faible en termes de mobilité (Fig 12) parmi les milieux utilisés et ce de T1→T3 avec un pourcentage qui ne dépasse pas les 20 %.

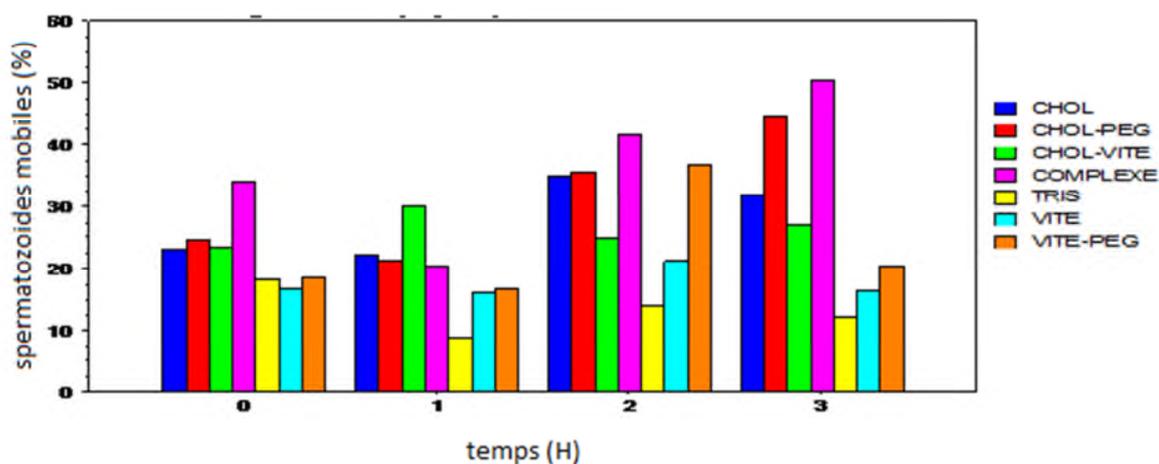


Figure 12 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à $T^{\circ}= 4^{\circ}\text{C}$ dans les 07 milieux utilisés, analysés à différents temps T_0 , T_1 , T_2 , T_3 .

Cela s'explique probablement par le fait que les spermatozoïdes non supplémentés ont subi un stress oxydatif et que leur ressources antioxydantes sont épuisées.

En ce qui concerne le CHOL et CHOL-PEG, on remarque qu'à T_0 et à T_1 les deux milieux ont un pourcentage de mobilité plus ou moins égale [T_0 (CHOL) : 23,16, (CHOL-PEG): 24,57] %, [T_1 (CHOL) : 22,15, (CHOL-PEG) : 21,13] %, à T_2 on constate une augmentation du pourcentage de mobilité par rapport à celui enregistré précédemment pour les deux milieux CHOL : 35 %, CHOL-PEG : 35,55 %, à T_3 : une légère diminution pour le CHOL : 32 % et une augmentation considérable pour le CHOL-PEG: 44,61 %.

Les valeurs retrouvées dans les milieux CHOL et CHOL-PEG sont de loin meilleures que celles enregistrées dans le milieu Tris (control) traduisant ainsi l'effet bénéfique du CHOL sur la stabilisation de la membrane plasmique des spermatozoïdes exposés au froid. On note également que le milieu CHOL-PEG présente un pourcentage de mobilité plus élevé par rapport au CHOL seul, ce qui montre l'intérêt du PEG dans l'augmentation de la solubilisation du CHOL.

Pour les deux milieux VITE et VITE-PEG, la figure 12 montre qu'à T_0 et T_1 les valeurs des pourcentages de la mobilité sont d'un ordre rapprochées et sont respectivement comme suit : VITE = 16,82 et 16,08%, VITE-PEG=18,47 et 16,65%. A T_2 le pourcentage de mobilité atteint son plus haut niveau avec pour la VITE 21,2% et la VITE-PEG 36,75%, pour ensuite chuter à T_3 et retrouver les valeurs enregistrées à T_0 et T_1 avec toujours une meilleure mobilité lorsque on additionne le PEG a la vitamine E.

Le pourcentage de mobilité des milieux VITE et VITE-PEG étant supérieur au milieu Tris (CONTROL) montre que la vitamine E a permis de piéger les radicaux libres et de rééquilibrer la balance antioxydants/prooxydants. Il apparait aussi que le milieu VITE en association avec le PEG, (VITE-PEG) est plus prometteur en termes de conservation de la mobilité que la vitamine E seule. Le PEG augmenterait la solubilisation de la vitamine E et ainsi potentialiserait l'effet antioxydant de cette dernière.

La baisse du pourcentage de mobilité enregistrée à T_3 comparativement à T_2 peut être expliqué par le fait que la vitamine E ne soit pas régénérée après avoir été oxydée.

Les pourcentages de mobilité pour les milieux CHOL-VITE et CHOL-VITE-PEG montre qu'à T_0 , T_2 , T_3 le milieu CHOL-VITE-PEG présente les meilleurs résultats comparés au CHOL-VITE avec respectivement pour le CHOL-VITE-PEG : 33,97 %, 41,63 %, et 50,42 % et pour le CHOL-VITE : 23,30 %, 24,91 %, 26,86 %.

Le pourcentage de mobilité présente ainsi des fluctuations dans les différents milieux utilisés à travers les temps d'analyse avec une diminution progressive pour le milieu contrôle (Tris), et un meilleur pourcentage de mobilité pour le complexe (CHOL-VITE-PEG).

Les résultats qui suit concernant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides (Fig. 13), la vitesse linéaire des spermatozoïdes (VSL, Fig 14, 15 et 16) renforcent les résultats obtenus sur le pourcentage de mobilité des spermatozoïdes. La figure 13 montre l'effet remarquable du PEG dans l'augmentation du pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides, en effet dans tous les milieux ayant été supplémentés avec du PEG nous observons une augmentation considérable et plus particulièrement dans le complexe (CHOL-VITE-PEG).

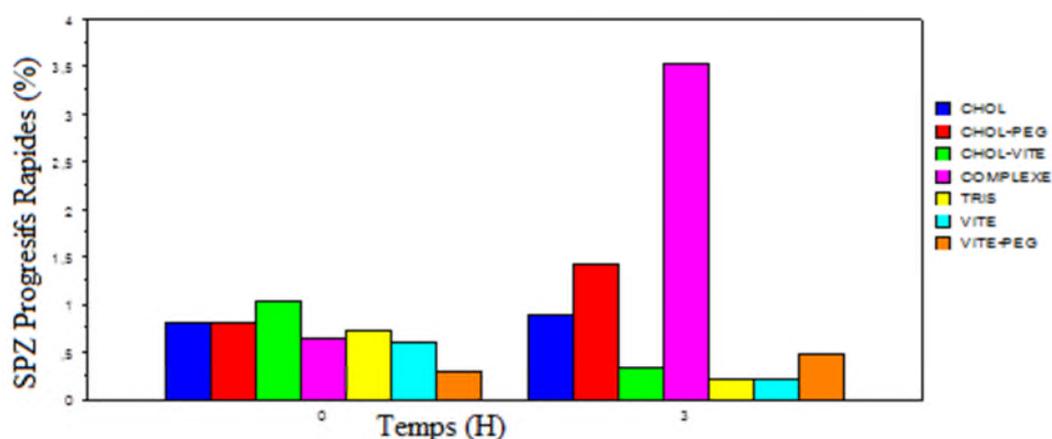


Figure 13 : Histogrammes représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides dans tous les milieux de conservation à T_0 et à T_3 .

La figure (14) confirme l'effet du PEG dans la solubilisation du CHOL en montrant à T_3 une VSL plus importante dans le milieu CHOL-PEG comparé aux autres milieux et notamment au milieu control (Tris).

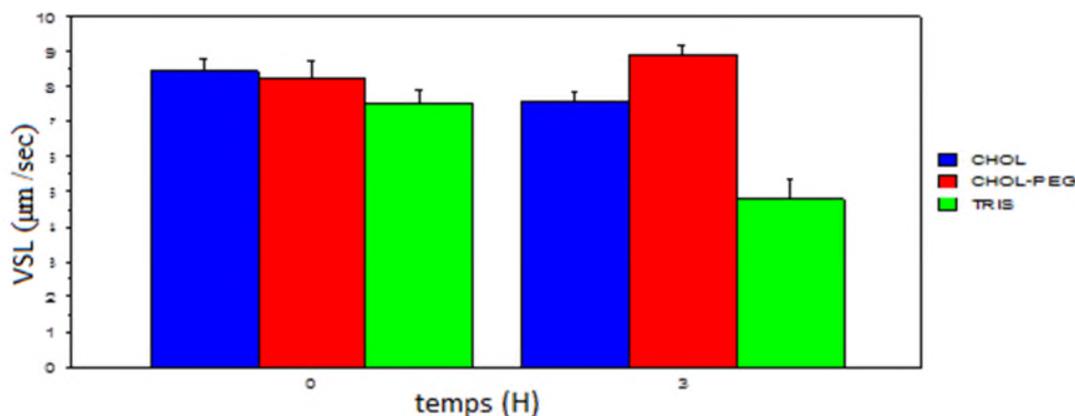


Figure 14 : Histogrammes représentant la VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux : TRIS, CHOL et CHOL-PEG à T_0 et à T_3 .

Nous avons constaté à T_3 (figure 15) une diminution de la VSL dans les milieux TRIS (control) et VITE et une augmentation de celle-ci dans le milieu VITE-PEG comparativement à T_0 . L'effet du PEG dans l'amélioration de la solubilisation de la vitamine E c'est ainsi manifesté à T_3 .

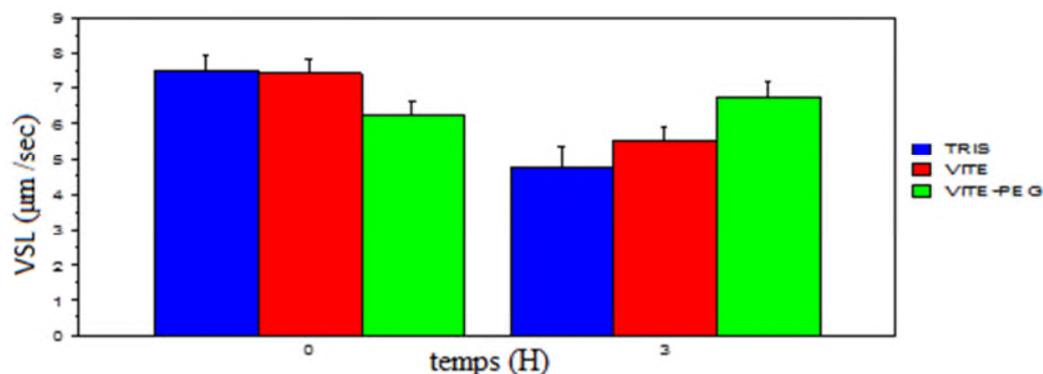


Figure 15 : Histogrammes représentant la VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux : (TRIS), (VITE-PEG) et (VITE) à T_0 et à T_3 .

Comparativement au milieu Tris (control), qui présente une VSL en diminution (**Fig16**), nous avons noté une importante augmentation significative dans le complexe à T_3 ($13.2\mu\text{m}/\text{sec}$), cette valeur reste la plus élevée. En effet, dans les figures précédentes les milieux CHOL-PEG et VITE-PEG ont montré les VSL les plus importantes mettant ainsi en évidence l'intérêt du PEG dans la solubilisation de ses deux molécules hydrophobes.

L'augmentation de la VSL dans le complexe CHOL-VITE-PEG suppose un effet combiné entre les trois molécules et qui a conduit à de meilleurs VSL. Le CHOL a probablement renforcé la solidité de la membrane plasmique, la vitamine E a lutté contre le stress oxydatif, et le PEG a permis à ces deux molécules d'exprimer leur potentiel en augmentant leur solubilité.

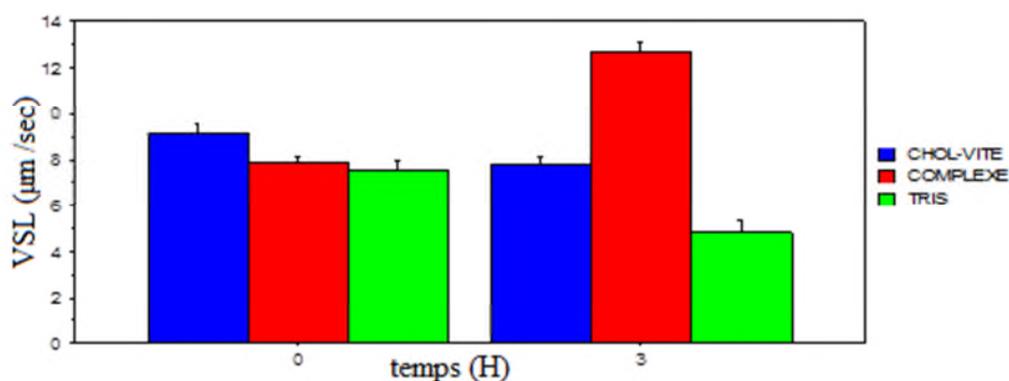


Figure 16 : Histogrammes représentant la VSL en ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes dans les milieux : (TRIS), (CHOL-VITE) et (COMPLEXE) à T_0 et à T_3 .

Conclusion

Dans les conditions physiologiques normales le spermatozoïde est conçu de manière à subir une cascade de modifications très importantes notamment au niveau de la membrane lui permettant de féconder l'ovocyte.

En allant à l'encontre de cet ordre naturel, la conservation des gamètes males engendre des cryodommages notamment par la voie du stress oxydatif. Ainsi, s'impose la nécessité de développement de milieux de conservation permettant de préserver les paramètres spermatiques et d'assurer des résultats de fertilité satisfaisants après insémination artificielle.

Les résultats présentés dans ce travail révèlent l'importance du PEG dans l'amélioration de l'action préventive du cholestérol et de la vitamine E en augmentant leur solubilité dans les milieux de conservation de la semence. L'effet optimal sur la conservation de la mobilité des gamètes est obtenu quand ces trois molécules sont utilisées simultanément formant un complexe PEG-CHOL-VITE. L'effet remarquable de ce complexe (PEG-CHOL-VITE) serait lié à deux facteurs essentiels : la solubilisation du cholestérol et de la vitamine E par le PEG et une action complémentaire du cholestérol, pour renforcer la membrane cytoplasmique, et de la vitamine E pour lutter contre le stress oxydatif.

A l'état actuel, l'approche utilisée dans ce travail ne peut conclure à des impacts certains sur la fertilité, cependant dans les activités de recherche à envisager dans le future seraient justement d'explorer l'intérêt du complexe PEG-CHOL-VITE dans l'amélioration des résultats de l'insémination artificielle.

- **Adamou-n'diaye, M., Gbangboche, A.B., Adjovi, A. et Jondet, R., (2003).** Cryopréservation de la semence de taureau de race Borgou au Bénin. *Revue Méd. Vét.* 154 (1), 3-8.
- **Aksoy, M, Akman, O, Lehimcioglu, N C & Erdem, H (2010).** Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 120 166-72.
- **Alvarez, J. G. and B. T. Storey (1989).** "Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation." *Gamete Res* 23(1): 77-90.
- **Aitken, R. J., J. S. Clarkson and S. Fishel (1989).** "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biol Reprod* 41(1): 183-97.
- **Aitken, R. J. and M. A. Baker (2006).** "Oxidative stress, sperm survival and fertility control." *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2): 66-9.
- **Akhter, S, Ansari, M S, Rakha, B A, Ullah, N, Andrabi, S M & Khalid, M (2011).** In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5 degrees C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell(R)), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod Domest Anim* 46 45-9.
- **Amann, R P & Pickett, B W(1987).** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7 145-73.
- **Annunziata O., Asherie N., Lomakin A., Pande J., Ogun O. and Benedek G. B., (2002),** Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions, 22, 14165-14170.
- **Babior, B. (1997).** "Leukocytes." *Curr Opin Hematol* 4(1): 1-2.
- **Bahr, G F & Zeitler, E (1964).** Study of bull spermatozoa. Quantitative electron microscopy. *J Cell Biol* 21 175-89.
- **Barone, R., (2001).** Anatomie comparée des mammifères domestique Vol 4, splanchnologie II, 3ème édition Edition Paris, France, 896 p.
- **Béguel J.P., (2012).** Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*, thèse : université de Bretagne occidentale.

- **Béguel J.P., Arnaud Huvet , Virgile Quillien , Christophe Lambert, Caroline Fabioux (2013).** Study of the antioxidant capacity in gills of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157 , 63-71.
- **Burton, G. W. and K. U. Ingold (1984).** "beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." *Science* 224(4649): 569-73.
- **Chakrabarty, J, Banerjee, D, Pal, D, De, J, Ghosh, A & Majumder, G C (2007).** Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54 27-35.
- **Chenoweth, P.J., Robert, S., Youngquist, Walter, R. et THREFALL, (2007).** Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull in current therapy in large animal, second edition Edition. *Theriogenology*, 217 p.
- **Cohen, G. and P. Hochstein (1963).** "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* 2: 1420-8.
- **Contantinesca, G. Et I. (2004).** Clinical dissection guide for large animals. Horse and Large Ruminants – 2ème édition. Iowa: Iowa State Press,. p 321.
- **Corpet D. E., Parnaud G, Tache S., Pierre F., (2003).** le polyéthylène glycol, un puissant supprimeur du cancer colorectal, découvert en étudiant l'effet promoteur 26p : 291-300.
- **Curry, M R (2007).** Cryopreservation of mammalian semen. *Methods Mol Biol* 368 303-11.
- **Davi, G., G. Ciabattoni, A. Consoli, A. Mezzetti, A. Falco, S. Santarone, E. Pennese, E. Vitacolonna, T. Bucciarelli, F. Costantini, F. Capani and C. Patrono (1999).** "In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation." *Circulation* 99(2): 224-9.
- **de Lamirande, E. and C. O'Flaherty (2008).** "Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases." *Biochim Biophys Acta* 1784(1): 106-15.
- **Deutscher, G.H., Wells, M.E., et Battaglia, R.A. (2007).** Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and effects of in vivo storage I Angus bulls. *Journal of animal science*, 39 (36), 1136-1143
- **EDUCAGRI, (2005).** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri Edition, Dijon, France 407 p.

- **Gadea, J (2003).** Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 1 17-27.
- **Garrido, N., M. Meseguer, C. Simon, A. Pellicer and J. Remohi (2004).** "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility." *Asian J Androl* 6(1): 59-65.
- **Gerber, P J, Steinfeld, H, Henderson, B, Mottet, A, Opio, C, Dijkman, J, Falcucci, A & Tempio, G (2013).** Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome.*
- **Gil, J, Rodriguez-Irazaqui, M, Lundeheim, N, Soderquist, L & Rodriguez-Martinez, H (2003).** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59 1157-70.
- **Gille, G. and K. Sigler (1995).** "Oxidative stress and living cells." *Folia Microbiol (Praha)* 40(2): 131-52.
- **Godeas, C., F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G. Sandri and E. Panfili (1997).** "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 57(6): 1502-8.
- **Gomez, E., D. S. Irvine and R. J. Aitken (1998).** "Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function." *Int J Androl* 21(2): 81-94.
- **Gregory, E. M., S. A. Gosciniak and I. Fridovich (1974).** "Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote." *J Bacteriol* 117(2): 456-60.
- **Halliwell, B. (1994).** "Free radicals and antioxidants: a personal view." *Nutr Rev* 52(8 Pt 1): 253-65.
- **Halliwell, B., Gutteridge J., (1999).** *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed Oxford University Press.
- **Hazen, c., (2010).** Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. ORBI. Université de Liège, 8 P.
- **Henkel, R., T. Ichikawa, R. Sanchez, W. Miska, H. Ohmori and W. B. Schill (1997).** "Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes." *Andrologia* 29(6): 295-301.

- **Huang, T. T., M. Yasunami, E. J. Carlson, A. M. Gillespie, A. G. Reaume, E. K. Hoffman, P. H. Chan, R. W. Scott and C. J. Epstein (1997).** "Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts." *Arch Biochem Biophys* 344(2): 424-32.
- **Jain, N K & Roy, I (2009).** Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* 18 24-36.
- **Jones, R., T. Mann and R. Sherins (1979).** "Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma." *Fertil Steril* 31(5): 531-7.
- **Kadajji V.G et Guru V. Betageri, (2013).** Water soluble Polymers for Pharmaceutical Applications, p 1972-2009.
- **Kayden, H. J., R. Silber and C. E. Kossmann (1965).** "The role of vitamin E deficiency in the abnormal autohemolysis of acanthocytosis." *Trans Assoc Am Physicians* 78: 334-42.
- **Lausanne A.R.L., (2010).** Le stress Oxydatif, Dr Méd. Dany Mercan Unilab dany.mercan@unilabs.com
- **Li, Y., T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace and C. J. Epstein (1995).** "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* 11(4): 376-81.
- **Lovelock, J E (1953).** The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10 414-26.
- **Lusignan, M F, Bergeron, A, Crete, M H, Lazure, C & Manjunath, P (2007).** Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod* 76 424-32.
- **Lutsenko, E. A., J. M. Carcamo and D. W. Golde (2002).** "Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress." *J Biol Chem* 277(19): 16895-9.
- **Macleod, J. (1943).** "The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa." *Am. J. Physiol.* 138: 512-18.
- **Manjunath, P, Bergeron, A, Lefebvre, J & Fan, J (2007).** Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65 217-28.

- **Martin (1981)**. J.O.U.S. 4, 268, 502 (Eli Lilly and Co.) May 19.
- **Martinez-Pasteur, F., Garcia-macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., Paz, P.D., et Anel, L. (2006)**. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenologie*, 65 (3), 471-485.
- **Mazur, P (1968)**. Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl Haematol* 29 764-77.
- **Mazur, P (1984)** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 C125-42.
- **McKelvey-Martin, V. J., N. Melia, I. K. Walsh, S. R. Johnston, C. M. Hughes, S. E. Lewis and W. Thompson (1997)**. "Two potential clinical applications of the alkaline singlecellgel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2).Human sperm and male infertility." *Mutat Res* 375(2): 93-104.
- **Moce, E, Purdy, P H & Graham, J K (2010)**. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 118 236-47.
- **Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J.P. et Canaud B., (2002)**. Stress oxidant, hémo-incompatibilité et complications de la dialyse au long cours (p201).
- **O'Flaherty, C. M., N. B. Beorlegui and M. T. Beconi (1999)**. "Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction." *Theriogenology* 52(2): 289-301.
- **O'Hara, L, Hanrahan, J P, Richardson, L, Donovan, A, Fair, S, Evans, A C & Lonergan, P (2010)**. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73 541-9.
- **O'Shea, T & Wales, R G (1966)**. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5 degrees C on diluted ram and bull semen. *Aust J Biol Sci* 19 871-82.
- **Pancera S.A, Luis H.M, Watson Loh B, Itri R.C, Pessoa A .Jr D., Petri D.F.S, (2002)**. The effect of poly (ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6phosphite dehydrogenises in solution p:291-300.
- **Parez, M. et Duplan, J.M., (1987)**. L'insémination artificielle bovine, ROGER MARION Edition. reproduction et amélioration génétique, Paris, France 256 p.

- **Poljsak, B., Z. Gazdag, S. Jenko-Brinovec, S. Fujs, M. Pesti, J. Belagyi, S. Plesnicar and P. Raspor (2005).** "Pro-oxidative vs antioxidative properties of ascorbic acid in chromium (VI)-induced damage: an in vivo and in vitro approach." *J Appl Toxicol* 25(6): 535- 48.
- **R. Belala , S. Fatmi , R. Kaidi , M Iguer-ouada (2016).** Benefits of cholesterol and α -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Revue Méd. Vét.*, 167, 1-2, 22-27.
- **Roberts M.D., Harris J.M., (2002),** Chemistry for peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Review* 54; 459-476.
- **Salamon, S & Maxwell, M C (2000).** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62 77-111.
- **Sanchez-Luengo, S, Aumuller, G, Albrecht, M, Sen, P C, Rohm, K & Wilhelm, B (2004).** Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. *J Androl* 25 234-44.
- **Sawyer, D. E., B. G. Mercer, A. M. Wiklendt and R. J. Aitken (2003).** "Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa." *Mutat Res* 529(1-2): 21-34.
- **Shaffer C.B.J., (1947).** *Pharm. Assoc. Sci Ed.*36: p152.
- **Smyth H.F., (1947),** The toxicity of high molecular weight Polyethylene glycols, *J. Am Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 36, p 157-160.
- **Stanescu P. M. et Alin I. B., (2012),** Freezing of dog's sperm: a review, *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 17, No.5.
- **Suleiman, S. A., M. E. Ali, Z. M. Zaki, E. M. el-Malik and M. A. Nasr (1996).** "Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E." *J Androl* 17(5): 530-7.
- **Tani A., Charoenpanich J., Mori T., Takeichi M., Kimbara K. et Kawai F., (2002),** Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads, 153,338-346.
- **Tappel, A. L. (1972).** "Vitamin E and free radical peroxidation of lipids." *Ann N Y Acad Sci* 203: 12-28.
- **Thibault, C. et Levasseur, M., (2001).** La reproduction chez les mammifères et l'homme, INRA Edition, Paris, France 928 p.

- **Togo T., Alderton J.M., Alderton J.M., BI G.Q.,Steihardt R.A. (1999).** the mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J. Cell Sci.*, 112, 719-731.
- **Tramer, F., F. Rocco, F. Micali, G. Sandri and E. Panfili (1998).** Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 59(4): 753-8.
- **Turney-M. E. (1981),** U.S 4, 280, 994 (Union Carbide Corp.) july 28,
- **Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et Flohe L., (1999).**Dual function of the selenoprotein PHGPx during spermmaturation. *Science* 285: 1393-1396,
- **Van Kuijk, F. J. and E. A. Dratz (1987).** "Detection of phospholipid peroxides in biological samples." *Free Radic Biol Med* 3(5): 349-54.
- **Villemure, M, Lazure, C & Manjunath, P (2003).** Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 1 39.
- **Wang H. J., Pan Y. X., Wang W.Z., Zucker I; H., Wang W., (2009).** NADPH Oxidas Derived Reactive Oxygene Species in Skeletal Muscle Modulates the Exercise Pressor
- **Weir, C. P. and B. Robaire (2007).** "Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat." *J Androl* 28(2): 229-40.
- **White, I G (1993).** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5 639-58.
- **Yaye, A.H., (2009).** Congélation automatique de la semence de taureaux Azawak au Niger: comparaison de deux programmes avec deux dilueurs. Mémoire d'ingénieur des Techniques Agricoles. Université Abdou Moumouni, Faculté d'Agronomie Niamey, République du NIGER, 70 P.
- **Zhang, H. and R. L. Zheng (1996).** "Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion." *Free Radic Res* 24(4): 261-8.

Références électroniques :

- www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/LLbioch/ (2003) : consulté le 26 mai 2016.

Résumé

La composition particulière de la membrane plasmique spermatique du bovin induit une sensibilité accrue de cette cellule au stress oxydant. Associée à cette sensibilité, la production des espèces oxygénées réactives (EOR) par le spermatozoïde lui-même nécessite une régulation très fine du statut oxydant, expliquant la présence de système antioxydant dans l'organisme. Or, la plus part des systèmes de protection disparaissent ou sont moins efficaces lors des phases de conservation au frais des gamètes, et cela entraîne des conséquences graves pour le spermatozoïde.

Afin de présenter un milieu adéquat pour la conservation réfrigérée du sperme bovin nous avons voulu tester l'intérêt du polyéthylène glycol (PEG) dans le renforcement de l'action protectrice du cholestérol (CHOL) sur la membrane spermatique lors de la conservation ainsi que sur l'effet antioxydant de la vitamine E (VITE).

En effet nos résultats on montrer que les meilleurs milieux de conservation sont ceux associés au (PEG), un meilleur pourcentage de mobilité des spermatozoïdes est exprimé dans les milieux (PEG-CHOL), (PEG-VITE) et (PEG-CHOL-VITE) en comparaison avec les milieux dépourvus de cette molécule (CHOL), (VITE) et (CHOL-VITE).

Mots clés : sperme, bovin, conservation, stress oxydatif, Polyéthylène glycol, cholestérol, vitamine E.

Abstract

The particular composition of the sperm plasma membrane of bovine induced increased sensitivity of the cell to oxidative stress. Associated with this sensitivity, the production of the reactive species oxygenated (EOR) by the spermatozoa itself requires a very fine regulation of the statute oxidative, explaining the presence of antioxidant system in the organization. However, more the share of the protection systems disappear or are less effective at the time of the phases of conservation to the expenses of the gametes, and that entrained of the serious consequences for the spermatozoa.

In order to present an adequate medium for the cooled conservation of bovine sperm we wanted to test the interest of polyethylene glycol (PEG) in the reinforcement of the protective action of cholesterol (CHOL) on the spermatic membrane at the time of the conservation as on the antioxidant effect of the vitamin E (VITE).

Indeed our results one showing that the best mediums of conservation are those associated (PEG), a better percentage of mobility of the spermatozoa is expressed in the mediums (PEG-CHOL), (PEG-VITE) and (PEG-CHOL-VITE) in comparison with the mediums deprived of this molecule (CHOL), (VITE) and (PEG- CHOL-VITE).

Key words: sperm, bovine, conservation, oxidative stress, Polyethylene glycol, cholesterol, vitamin E.