

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

en

Médecine vétérinaire

THEME

Les impacts des antioxydants sur la cryoconservation du sperme du bélier

Présenté par :

Melle : **BOUKHEZNA Aya**

Soutenu publiquement, le 20 Octobre 2021, devant le jury :

Pr. LAMARA A.	Professeur (ENSV)	Président
Dr. BOUDJELLABA S.	MCB (ENSV)	Examinateur
Dr. BENHENIA K.	Chercheur permanent(CRBt)	Promoteur
Dr. IDRES T.	MCB (ENSV)	Co-Promoteur

2020-2021

Remerciement

Je remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Je voudrais dans un premier temps remercier mon cher promoteur **Docteur BENHENIA Karim**, du CRBt Constantine, je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour son sérieux, sa patience, sa rigueur et sa généreuse disponibilité durant la préparation de ce mémoire. Malgré la distance et les multiples occupations qui sont les vôtres, monsieur, vous étiez toujours présent et prêt à me supporter et m'aider à chaque fois que je trébuchais, votre sincère et vos judicieux conseils ont contribué à alimenter ma réflexion.

Mes sincères remerciements.

Au Co-promoteur **Docteur IDRES** de l'école nationale supérieure vétérinaire, Pour avoir accepté de m'encadrer et de me diriger, pour la confiance qu'elle m'a accordée en réalisant ce travail.

Mes sincères remerciements.

Au **Docteur LAMARA** de l'école nationale supérieure vétérinaire d'avoir fait l'honneur de présider mon travail.

Hommage respectueux.

Au **Docteur BOUDJELABA** de l'école nationale supérieure vétérinaire, d'avoir accepté d'évaluer et examiner mon projet.

Hommage respectueux.

Au **Docteur BAROUDI**, de l'école nationale supérieure vétérinaire, votre modestie et votre gentillesse font de vous un merveilleux professeur que les étudiants peuvent avoir. Je n'oublierai jamais votre soutien pendant mon stage, je vous en suis si reconnaissante.

Je dédié ce modeste travail

Aux deux piliers de ma vie

Papa et maman, vous êtes ma raison d'être, votre patience, votre soutien et votre encouragement ne peuvent être réduits à de simples mots, si je suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à vos sacrifices et votre croyance en moi. Vous êtes les meilleurs parents du monde, que Dieu le tout puissant vous protège et vous accorde une meilleure santé.

A mon jumeau Nadir et ma petite sœur Yasmine

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Merci d'être dans ma vie, je vous aime beaucoup.

A ma grand-mère, vous étiez toujours là pour me reconforter et m'encourager. Merci de m'avoir élevée avec autant d'amour, que Dieu vous protège Mamma.

A mon oncle **Khali Yassine** et mes tantes **Tata Abla** et **Tata Yasmina**, merci beaucoup pour votre soutien, vous m'avez toujours traité comme votre fille, je vous en suis reconnaissante.

A mes cousines

Kawtar, Nabila, Malika, Hajer, Rayen et Imen ; merci beaucoup, je vous aime énormément.

Mes amies

Manal et Isra, vous m'avez accompagné dans les plus beaux jours de ma vie, merci pour les beaux souvenirs que nous avons partagés.

Hanane, Ines et Leila, nous avons passé des moments inoubliables, de sacrifice, de larme, de fou rire et de joie, vous êtes ma seconde famille avec qui j'ai passé ces cinq ans de folie. Merci pour tous les souvenirs que nous avons partagé ensemble, dans l'espoir que notre amitié reste éternelle.

Manel et yousra, j'ai de la chance d'être votre amie, merci pour tous ces moments simples qui sont devenus inoubliables grâce à vous, je vous souhaite un avenir plein de succès et prospérité.

Khawla, Abir, Saada et Rommaissa, merci pour votre amabilité, tous mes vœux de bonheur.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Partie bibliographique

Chapitre I

Liste des figures	9
I. Anatomie de l'appareil génital du bélier	1
I.1 Testicules	1
I.1.1 Taille des testicules.....	1
I.1.2 Les enveloppes testiculaires.....	1
I.1.2.1 Enveloppe superficielle : le scrotum	2
I.1.2.2 Enveloppe intermédiaire : la tunique celluleuse.....	2
I.1.2.3 Enveloppe profonde	2
I.1.3 Anatomie des testicules	3
I.2 Voies spermatiques extra-testiculaires	4
I.2.1 Epididyme	4
I.2.2 Canaux déférents.....	4
I.2.3 Urètre	5
I.3 Glandes annexes.....	5
I.3.1 Vésicules séminales	5
I.3.2 Prostate	5
I.3.3 Glandes bulbo-urétrales de Cowper	6
I.4 Pénis	6
II. Spermatogenèse.....	6
II.1 Description et régulation hormonale de la spermatogenèse	7
II.2 Les spermatozoïdes	9
II.2.1 Anatomie du spermatozoïde	9
II.2.1.1 La tête.....	9

II.2.1.1.1	Le noyau	9
II.2.1.1.2	L'acrosome	9
II.2.1.2	Le col.....	10
II.2.1.3	Le flagelle.....	11
II.2.1.3.1	La pièce intermédiaire.....	11
II.2.1.3.2	La pièce principale.....	11
II.2.1.3.3	La pièce terminale	12
II.2.2	Morphologie des spermatozoïdes.....	12
II.2.3	Transit épидидymaire.....	13
III.	Le sperme.....	13
III.1	Aspect et composition.....	13
III.2	Volume et concentration.....	14
III.3	Formation du sperme	14
III.4	Variation de production spermatique	14
I.	Collecte du sperme chez le bélier.....	15
I.1	Méthode de collecte du sperme	15
I.1.1	Vagin artificielle	15
I.1.2	L'électro- éjaculateur.....	15
I.1.3	La collecte du sperme épидидymaire.....	16
II.	Evaluation de la qualité du sperme	17
II.1	Examen macroscopique	17
II.1.1	Volume de l'éjaculat.....	17
II.1.2	Couleur et consistance du sperme.....	17
II.2	Examen biochimique	18
II.2.1	Le PH.....	18
II.3	Examen microscopique	18
II.3.1	Concentration du sperme.....	18
II.3.2	Motilité massale	18
II.3.3	Motilité individuelle	19
II.3.4	Morphologie et viabilité des spermatozoïdes.....	20
III.	Dilution du sperme.....	20
III.1	Composition du milieu de dilution	20
III.1.1	Les cryoprotecteurs.....	21

III.1.1.1	Cryoprotecteurs pénétrants	21
III.1.1.2	Les cryoprotecteurs non pénétrants	22
III.1.1.2.1	Jaune d'œuf.....	22
III.1.1.2.2	Le lait	22
III.1.2	Substances nutritives	23
III.1.3	Antibiotiques	23
III.1.4	Substance tampon.....	24
IV.	La conservation du sperme	24
IV.1	Types de Conservation du sperme	24
IV.1.1	Conservation à long terme: congélation	24
IV.1.2	Conservation à court terme : Réfrigération	24
IV.2	Lésions de la cryoconservation	25
IV.2.1	Lésions de la congélation	25
IV.2.2	Lésions de refroidissement (choc au froid)	25
I.	Le stress oxydatif.....	27
I.1	Définition.....	27
I.2	Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	27
I.2.1	Les sources des ERO	27
I.2.2	Principaux radicaux libres	28
I.2.3	Origine des radicaux libres (RL).....	28
I.3	Conséquences du stress oxydatif	28
I.3.1	Conséquences sur les Glucides.....	28
I.3.2	Conséquences sur les Lipides	29
I.3.3	Conséquences sur les Protéines.....	29
I.3.4	Conséquences sur l'ADN.....	29
II.	Le système antioxydant	30
II.1	Le système antioxydant du sperme.....	30
II.2	Les antioxydants enzymatiques	30
II.2.1	La catalase (CAT).....	31
II.2.2	Glutathion peroxydase(GPX)	31
II.2.3	Superoxyde dismutase(SOD)	31
II.2.4	Autres enzymes antioxydants	32
II.2.4.1	Glutathion réductase.....	32

II.3	Les antioxydants non enzymatiques	32
II.3.1	Antioxydants liposolubles.....	32
II.3.1.1	Vitamine E.....	32
II.3.1.2	La vitamine A	33
II.3.1.3	Les caroténoïdes.....	33
II.3.2	Antioxydants hydrosolubles	33
II.3.2.1	La vitamine C	33
II.4	Système de défense du spermatozoïde	34
I.	Matériel et méthodes.....	35
I.1	Matériel	35
I.1.1	Matériel biologique	35
I.1.2	Equipements.....	36
I.1.3	Produits chimiques	37
I.1.4	Consommables	38
I.2	Méthodes	40
I.2.1	Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine-vitamine E.....	40
I.2.2	Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine-cholestérol.....	40
I.2.3	Préparation de la solution TTH pour l'évaluation de la peroxydation des lipides	40
I.2.4	Récolte du sperme de l'épididyme.....	40
I.2.4.1	Evaluation de la mobilité du sperme par le système CASA.....	42
I.2.4.2	Analyse de la fonctionnalité de la membrane des spermatozoïdes	42
I.2.4.3	Test de peroxydation lipidique (LPO)	43
I.2.4.4	Analyses statistiques	43
II.	Résultats.....	44
II.1.1	Mobilité et fonctionnalité de la membrane	44
II.1.2	Peroxydation des lipides.....	46
III.	Discussion.....	47
IV.	Conclusion	49

Liste des figures

Figure 1: Anatomie des enveloppes testiculaires	3
Figure 2: structure interne du testicule et l'épididyme (Frandsen et al., 2013)	3
Figure 3: Diagramme représente la structure de testicule, l'épididyme et le canal déférent (Robaire, 2006).....	5
Figure 4: L'appareil reproducteur du bélier (Evans et Maxwell, 1987)	6
Figure 5: Illustration de tube séminifère et tissu interstitiel (Frandsen et al., 2013).	7
Figure 6: Régulation hormonale de la fonction sexuelle male (VAN DER MOLEN et COLL, 1975 ; BONNES et al., 2005 ; SILVERTHOM et al., 2007).	8
Figure 7: Schéma d'illustration de la tête du spermatozoïde chez les mammifères (Saake et Almquist, 1964a; Garner et Hafez, 2000)	10
Figure 8: Schéma d'illustration du Col du spermatozoïde chez les mammifères (Saake et Almquist, 1964b).....	11
Figure 9: schéma d'illustration du flagelle (pièces intermédiaire, principale et terminale) du spermatozoïde chez les mammifère (Turner, 2003 ; Saake et Almquist, 1964b, Guraya, 1987; Eddy, 2006)	12
Figure 10: Modèle d'un vagin artificielle utilisé chez le bélier et le bouc (IMV Technologie)	15
Figure 11: Electro- éjaculateur (http://Ali express.com).....	16
Figure 12: la méthode de flushing rétrograde (perfusion de la partie caudale de l'épididyme du bélier-GUERIN et al., 2003)	17
Figure 13: Etat de déséquilibre oxydatif	27
Figure 14: Les sources des espèces réactives (POISSON, 2013).	28
Figure 15: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (ESTERBAUER H et al., 1992).	29
Figure 16: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (CADET et al., 2002)	30
Figure 17: Système antioxydant enzymatique (MARFAK, 2003).....	32
Figure 18: Cycle réactionnels de régénération des antioxydants (PHAM-HUY et al., 2008).	34
Figure 19: les testicules manipulés	36
Figure 20: Equipements	37
Figure 21: Les produits chimiques utilisés.....	38

Figure 22: les outils consommables	39
Figure 23: La récolte du sperme.....	41
Figure 24: Pourcentages (Moyenne \pm ES) de l'intégrité de la membrane, la mobilité totale (MT), mobilité progressive (MP) et linéarité (LIN) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE	44
Figure 25: Vitesses des spermatozoïdes, VCL, VSL et VAP (Moyenne \pm ES) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.....	45
Figure 26: Amplitude latérale de tête (ALH) (Moyenne \pm ES) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.	45
Figure 27: fréquence de battement de la tête (BCF) (Moyenne \pm ES) avant congélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.	46
Figure 28: Courbe d'étalonnage de MDA (nmole)	46
Figure 29: MDA (Moyenne \pm ES) (peroxydation des lipides) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.	47

Liste des tableaux

Tableau 1: Taille des différentes parties du spermatozoïde du bélier en μm (SETCHELL, 1977).....	13
Tableau 2: les notes de la motilité massale (DERIVAUX et ECTORS, 1986)	18
Tableau 3: Les notes de la motilité individuelle.	19
Tableau 4: les concentrations de MDA pour tracer une courbe d'étalonnage (la solution a été rajoutée au solution de MDA pour atteindre 500 μl puis un 1 ml de TTH a été rajouté).	43

Introduction général

En Algérie, le cheptel ovin composé d'environ 23 millions de tête est la première source de viandes rouges. (**MINISTERE DEL'AGRICULTURE ET DEVELOPPEMENT RURAL ; 2010**). Cependant, ce cheptel ne permet pas de couvrir la demande nationale, de plus en plus croissante (**CHEMMAM, 2007**). Cette situation contraigne les autorités à recourir à son importation avec des factures colossales (170 millions de dollars pour le premier semestre de 2016, **MINISTERE DU COMMERCE ; 2016**). L'accroissement de l'effectif, l'amélioration génétique ainsi que le développement de la productivité de notre cheptel ovin, permettrait de diminuer les coûts d'importation de cette denrée et contribuera à l'autosuffisance. Ceci est rendu possible grâce à l'application de l'insémination artificielle au moyen d'une semence conservée (**MANAFI, 2011 ; VISHWANATH, 2003**).

En effet, la conservation de la semence, notamment la cryoconservation est la seule technologie permettant la diffusion du progrès génétique à grand échelle. Aussi, elle permet de créer des banques de matériel génétique d'animaux menacés de disparition ou morts. En effet, il est possible de préserver la génétique des animaux morts ou abattus à partir du sperme épидидymaire (**EHLING *et al.*, 2006 ; FICKEL *et al.*, 2007**). La collecte de sperme épидидymaire d'animaux abattus est également une alternative intéressante dans le cadre de l'expérimentation avec une facilité d'accès à la semence par rapport à la collecte sur des animaux vivants (Nichi *et al.*, 2007).

Au cours du processus de conservation, les spermatozoïdes subissent un grand stress (manipulation, refroidissement...) ce qui conduit à un excès de leur consommation d'oxygène et par conséquent un excès de génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) engendrant un épuisement des antioxydants des cellules spermatiques, c'est le stress oxydatif. La première cible des ERO est la membrane plasmique induisant la peroxydation des lipides. Cette dernière peut affecter plusieurs fonctions de la cellule spermatique telles que la mobilité et la réaction acrosomique (**GUERRA *etal*, 2004**).

D'ailleurs, les dommages des membranes plasmiques des spermatozoïdes durant la cryoconservation est la principale cause de la perte de la fertilité. (**AGARWAL *et al.* 2014 ; AITKEN *et al.* 1991 ; DARIN-BENNETT *et* WHITE, 1977**). En outre, le sperme du bélier comporte un taux élevé en acides gras polyinsaturés lui rendant très susceptible à la peroxydation des lipides. La lutte contre le stress oxydatif, notamment la peroxydation des

lipides, durant la cryoconservation du sperme du bélier est une approche indéniable pour améliorer la qualité du sperme post conservation en vue d'augmenter sa fertilité après l'insémination. De ce fait, l'objectif du présent travail est d'étudier l'impact de traiter le sperme du bélier par des antioxydants sur sa qualité après cryoconservation.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

La production du sperme chez le bélier

I. Anatomie de l'appareil génital du bélier

L'appareil génital male est formé par l'ensemble des organes chargés de la production du sperme et son dépôt dans les voies génitales femelle où se réalise la fécondation (BONNES et al., 2005).

Elle comprend : les testicules, les voies spermatiques extra-testiculaires, les glandes annexes et le pénis.

I.1 Testicules

Ce sont des gonades pairs ; de forme sphéroïde ; longuement pendants entre les cuisses en position sous-inguinale, doués d'une double fonction : exocrine et endocrine.

- ✓ La fonction exocrine est la gamétogénèse ou spermatogénèse, elle est assurée par les tubes séminifères qui ; à partir de la puberté ; sont engagés dans la production généralement continue d'un grand nombre de spermatozoïdes.
- ✓ La fonction endocrine est assurée par les cellules de leydig, qui sont regroupées dans le compartiment inter tubulaire en formant une glande interstitielle responsable de la sécrétion des hormones males : les androgènes (DADOUNE et DEMOULIN ,1991 ; BONNES et al., 2005).

I.1.1 Taille des testicules

la taille des testicules varie selon plusieurs facteurs (race, individus ; stade physiologique...); elle est en moyenne de 10cm de long, 6cm de large et 6cm d'épaisseur.son poids unitaire en moyenne est entre 250 à300 grammes (BONNES et al., 2005).

Le rapport poids testicule/poids du corps est égal à 1/200 ; ce rapport est élevé comparativement à d'autre espèces telles que :

*l'homme (1/500)

*le lapin (1/700)

* le taureau (1/640) (VAISSAIRE, 1977;DADOUNE et DEMOULIN, 1991).

I.1.2 Les enveloppes testiculaires

Les testicules sont protégés et soutenus par 3 couches d'enveloppes superposés, de l'extérieure vers l'intérieure, nous citerons :

I.1.2.1 Enveloppe superficielle : le scrotum

- peau du scrotum : mince, élastique et très souple. Commune aux deux testicules, elle a une forme plus au moins bien délimitée.
- dartos : constitué de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, forme un sac autour de chaque testicule.(BONNES et al.,2005)
- Rôle : maintenir les testicules à une température idéal à la formation et la maturation des spermatozoïdes, soit autour 32°C, c'est-à-dire 4 à7°C en dessous de la température corporelle .tous ça est grâce aux contractions musculaires qui provoquent des rides du scrotum en cas de froid (BONNES, 2005 ; CASTONGNON, 2010).

I.1.2.2 Enveloppe intermédiaire : la tunique celluleuse

- est un tissu conjonctif très mobile situé entre le scrotum et les enveloppes profondes.
- Rôle : protecteur, il permet au testicule et son sac fibreux de fuir en cas de choc ou de compression.

I.1.2.3 Enveloppe profonde

- sac fibreux : forme un sac autour de chaque testicule prenant naissance dans l'abdomen et passant par l'anneau inguinal. Chaque sac est fermé par deux tuniques :
 - ✓ la tunique vaginale qui correspond au feuillet externe du péritoine
 - ✓ la tunique fibreuse de nature conjonctive.
- Rôle : permet la fixation du crémaster et la protection du testicule.
- Crémaster : muscle rouge, strié, fixé dorso-latéralement sur chaque sac fibreux.
 - Rôle : thermorégulateur, grâce à ses contractions importantes, il éloigne ou rapproche le testicule du corps. (BONNES et al., 2005)

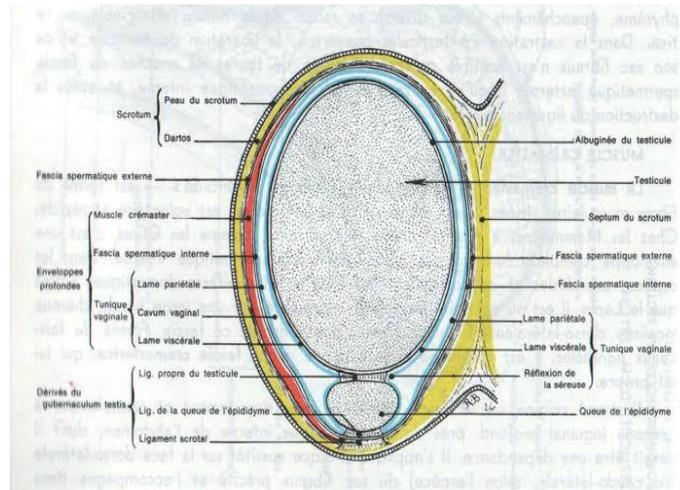


Figure 1: Anatomie des enveloppes testiculaires

I.1.3 Anatomie des testicules

Le testicule à son rôle est revêtu par une capsule fibreuse appelé albuginée, qui s'invagine et délimite des lobules testiculaires. Chaque lobule contient des tubes séminifères.

A la sortie d'un lobule, les tubes séminifères se jettent dans un tube droit. L'ensemble des tubes droits s'anastomosent dans le corps de Highmore et forment un réseau de canaux, le rete-testis qui se dirige vers la tête de l'épididyme (BONNES et al., 2005).

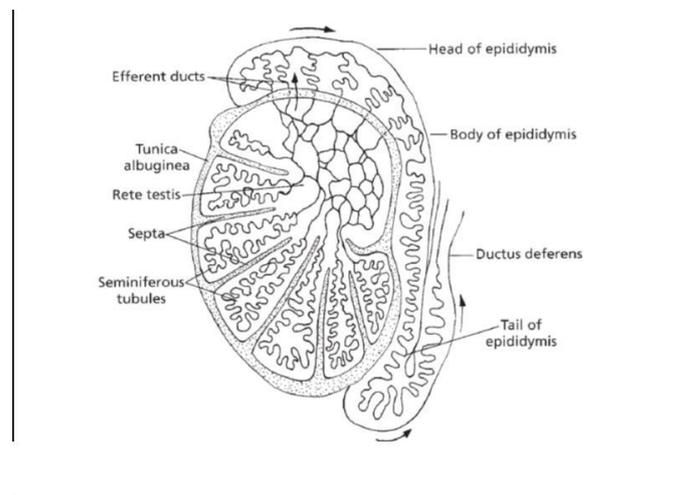


Figure 2: structure interne du testicule et l'épididyme (Frandsen et al., 2013)

I.2 Voies spermatiques extra-testiculaires

I.2.1 Epididyme

C'est un organe plaqué sur l'arrière du testicule auquel il fait suite ; d'une longueur de 60m chez le bélier, reliant les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent.

Il se divise en trois parties : la tête, le corps et la queue. Cette dernière est le lieu de récupération du sperme chez les animaux morts ou abattus.

Autour de ce canal, on note la présence d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (DACHEUX et al., 2001 ; BONNES et al., 2005).

Les spermatozoïdes, après leur production dans les testicules, sont acheminés vers l'épididyme. C'est au niveau de la queue de l'épididyme qu'ils sont stockés. La queue de l'épididyme contient plus de 70% des réserves de spermatozoïdes (20 à 40 milliards).

C'est à l'intérieur de ces tubules que les spermatozoïdes acquièrent leurs motilités et leur pouvoir fécondant (CASTONGNON, 2010).

I.2.2 Canaux déférents

Faisant suite au canal épидидymaire. D'abord, il est contourné ; puis il devient droit pour franchir l'anneau inguinal et gagner la cavité abdominale.

Chaque canal atteint la face dorsal de la vessie où il se renfle en une ampoule avant de se jeter dans l'urètre (BONNES et al., 2005).

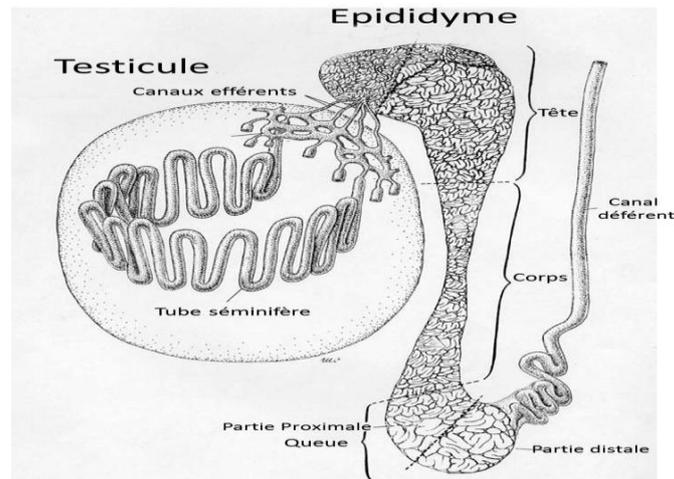


Figure 3: Diagramme représente la structure de testicule, l'épididyme et le canal déférent (Robaire, 2006).

I.2.3 Urètre

C'est un canal impair, sert à la fois à l'excrétion de l'urine et du sperme (BONNES et al., 2005). Il comporte trois parties :

- *L'urètre pelvien, logé dans le bassin
- *Le bulbe de l'urètre, où il quitte le bassin en réalisant une courbure bien marquée. C'est à ce niveau qu'apparaissent les formations érectiles : le corps spongieux et le corps caverneux
- *L'urètre pénien.

I.3 Glandes annexes

Glandes exocrines qui sécrètent la quasi-totalité du plasma séminal (partie liquide du sperme) ; ce sont les deux vésicules séminales, la prostate et la glande bulbo-urétrale de Cowper.

I.3.1 Vésicules séminales

Se situe au-dessus de chaque canal déférent, et déverse sa sécrétion dans l'urètre par le canal éjaculateur qui résulte de la fusion du canal excréteur de la glande avec la portion terminale du canal déférent (BONNES et al., 2005).

I.3.2 Prostate

Organe impair, coiffe l'urètre près du col de la vessie. C'est un agglomérat de glandes possédant chacune son canal excréteur et qui peuvent former un renflement visible appelé le corps de la prostate (BONNES et al., 2005).

I.3.3 Glandes bulbo-urétrales de Cowper

Elles sont situées dorsalement sur l'urètre, juste avant le bulbe. Elles sécrètent avant l'éjaculation un liquide visqueux qui neutralise l'acidité de l'urine restant dans l'urètre (BONNES et al., 2005).

I.4 Pénis

Est l'organe copulateur, il est formé par l'urètre pénien auquel sont annexés des muscles et des formations érectiles.

Le pénis est d'une longueur de 40 cm, il se termine par un renflement ; appelé le glande ; et un appendice vermiforme qui est la terminaison de l'urètre permettant le dépôt de la semence à l'intérieur du vagin (CASTONGNON, 2010 ; BONNES et al., 2005).

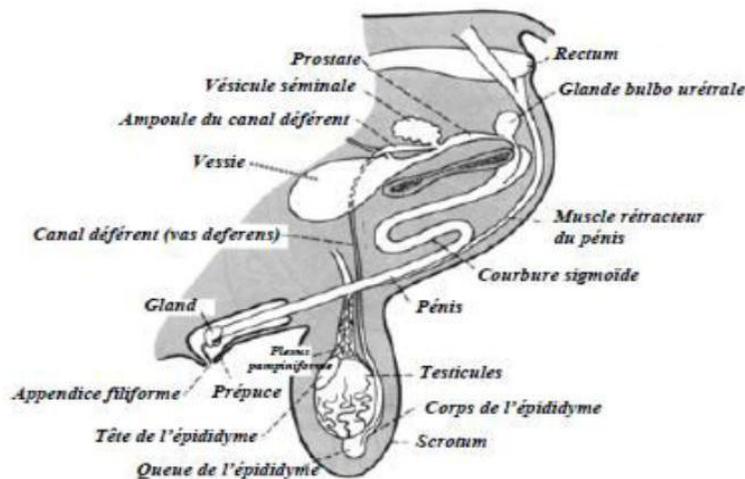


Figure 4: L'appareil reproducteur du bélial (Evans et Maxwell, 1987)

II. Spermatogénèse

La spermatogénèse est un processus complexe et continu de multiplication, de différenciation cellulaire et d'apoptose, qui, à partir des cellules germinales souches diploïdes, les spermatogonies, aboutit à la formation des spermatozoïdes, cellules haploïdes hautement spécialisées. chez le bélial, la spermatogénèse dure 49 jours chez le bélial sexuellement mature, la production de spermatozoïdes est de 21 millions par gramme de testicule et par jour (THIBAULT, 2001 ; BONNES et al., 2005).

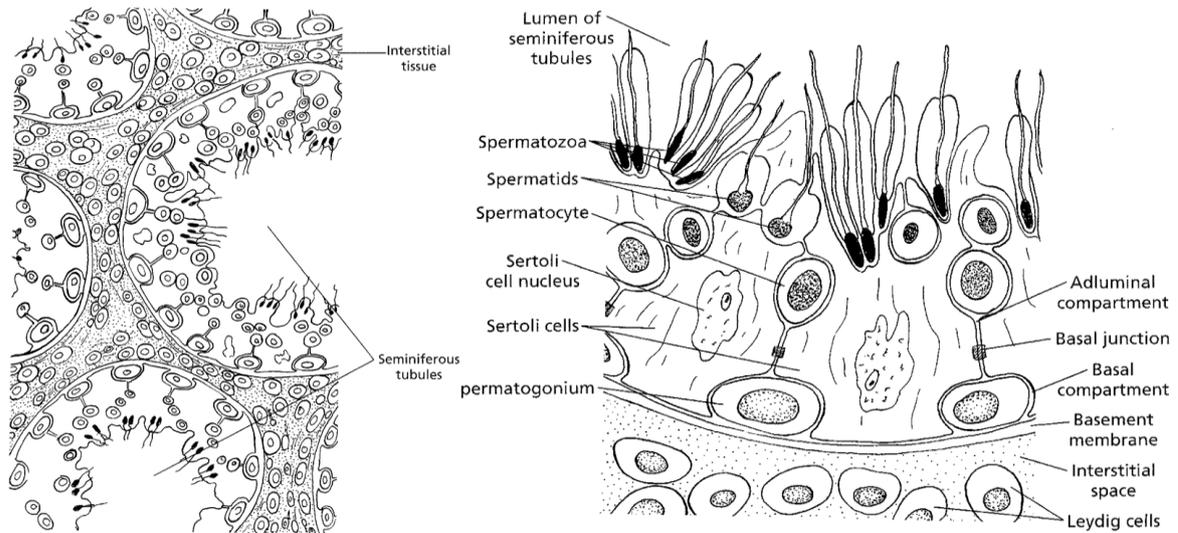


Figure 5: Illustration de tube séminifère et tissu interstitiel (Frandsen et al., 2013).

II.1 Description et régulation hormonale de la spermatogenèse

Au cours de la spermatogenèse, qui se déroule dans l'épithélium des tubes séminifères, les cellules germinales passent successivement par les stades : spermatogonie, spermatocyte I, spermatocyte II, spermatide puis spermatozoïde. Les deux évolutions essentielles qui la caractérisent sont la réduction chromatique réalisée entre les stades spermatocyte I et spermatocyte II ; et la spermiogenèse, différenciation importante qui transforme les spermatides en spermatozoïdes (BONNES et al., 2005).

Ces différentes étapes sont sous contrôle de l'axe gonadotrope, classiquement schématisé dans la figure ci-dessous (**Figure 6**).

La gonadolibérine ou GnRH (Gonadotropin-ReleasingHormone), sécrété par l'hypothalamus contrôle la sécrétion de deux gonadotrophines hypophysaire, la LH (LuteinizingHormone) et la FSH (Follicule Stimulating Hormone), qui agissent en retour de façon trophique sur les gonades.

La LH intervient essentiellement en contrôlant la production de testostérone des cellules de Leydig, alors que La FSH a deux actions, l'une sur les cellules germinales, pour activer leurs multiplication ; l'autre, sur les cellules de sertoli pour qu'ils produisent l'inhibine et l'ABP (Androgènes BindingProtein).

Le complexe testostérone-ABP agit sur les spermatocytes en activant la méiose, et sur les spermatides en stimulant la spermiogénèse.

La testostérone agit par ailleurs sur l'appareil reproducteur, les caractères sexuels secondaires et le comportement sexuel.

La régulation des effets positifs de FSH et LH sur l'activité sexuelle male est assurée par un contrôle en retour du testicule sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. Ce rétrocontrôle négatif qui contribue à diminuer la production des hormones gonadotropes est assurée par la testostérone pour LH et par l'inhibine pour FSH (BONNES et al., 2005).

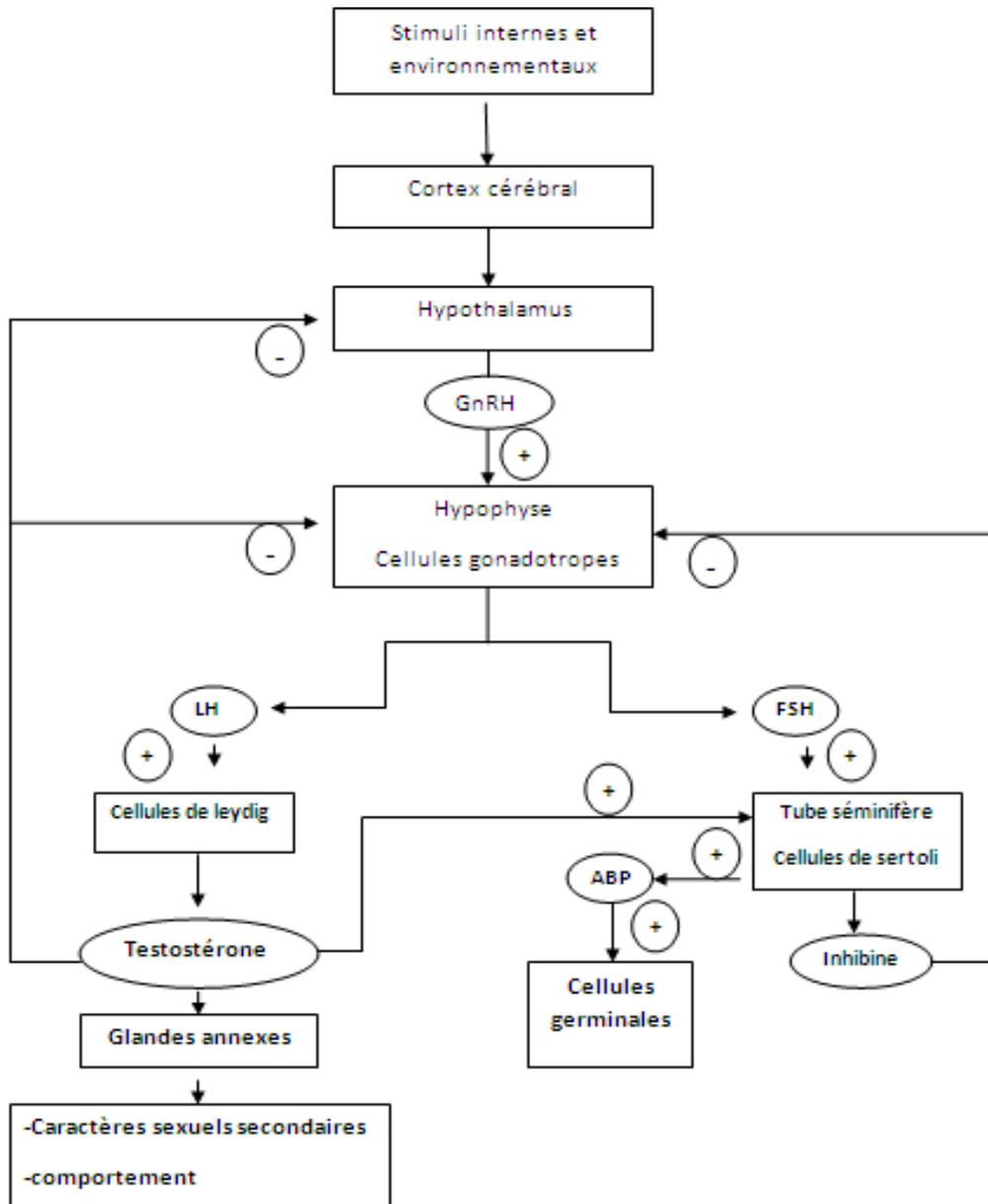


Figure 6 : Régulation hormonale de la fonction sexuelle male (VAN DER MOLEN et COLL, 1975 ; BONNES et al., 2005 ; SILVERTHOM et al., 2007).

II.2 Les spermatozoïdes

II.2.1 Anatomie du spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée, il comporte trois parties : la tête, le col et le flagelle.

II.2.1.1 La tête

De forme ovoïde, constitué d'un noyau à n chromosome, coiffée de l'acrosome

II.2.1.1.1 Le noyau

C'est un composant large de la tête du SPZ, il contient un ADN haploïde très condensé résultant de l'implication des protéines spécifiques appelées les protamines

Le noyau est entouré par un complexe de cytosquelette spécial de la thèque péri nucléaire appelé la feuille post-acrosomiale (GURAYA, 1987).

II.2.1.1.2 L'acrosome

C'est un organite unique développée de l'appareil de Golgi apparait durant les premiers stades de la spermatogénèse. Il est composé de la membrane acrosomiale interne qui et la membrane acrosomiale externe et une matrice remplie de protéase. Chez les mammifères, la superposition de l'acrosome est de manière semblable à un capuchon. Il représente 60 % de la région apicale de la tête (GURAYA, 1987).

La membrane acrosomiale externe est juste sous la membrane plasmique, tandis que la membrane acrosomiale interne superpose sur le noyau et continue avec la membrane acrosomiale externe (GURAYA, 1987).

La région post acrosomiale subit des changements durant la maturation au niveau de l'épididyme, Les principales enzymes présentes dans l'acrosome sont Hyaluronidase, Neuraminidase, Phospholipase, collagénase et l'enzyme de pénétration de corona (CPE : corona pénétration enzyme). Les fonctions ces enzymes sont la digestion de la zone pellucide et la pénétration dans l'ovocyte facilitant ainsi la fécondation (GURAYA, 1987 ; CHENOWETH et LORTON, 2014 ; EDDY, 2006 ; DE JONGE et BARRAT, 2006 ; TULSANI, 2003).

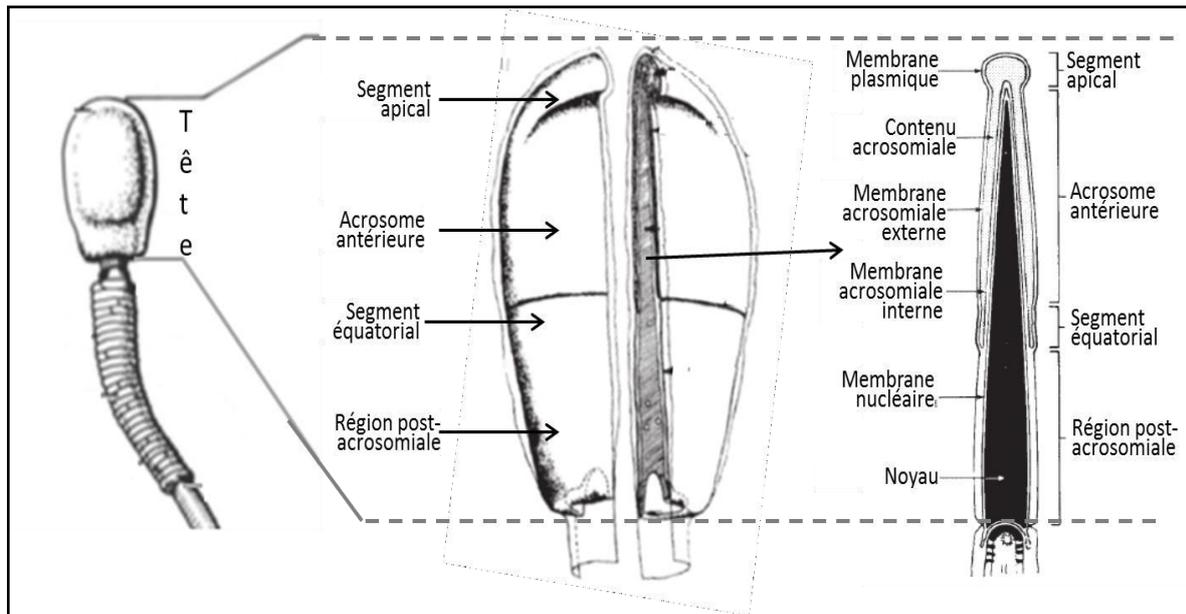


Figure 7: Schéma d'illustration de la tête du spermatozoïde chez les mammifères (Saake et Almquist, 1964a; Garner et Hafez, 2000)

II.2.1.2 Le col

Le col (ou la pièce connectrice), est une région complexe, il correspond à l'espace compris entre les centrioles proximal et distal, c'est un segment reliant entre la tête et la pièce intermédiaire

Le col est composé de la fossette d'implantation, la plaque basale et la pièce d'articulation ou de jonction.

La fossette d'implantation est une dépression ou une cavité avec un aspect concave présente au pôle postérieur du noyau (BARRAT, 2006). La plaque basale tapisse la fossette d'implantation, elle est doublée extérieurement par la membrane nucléaire. La pièce d'articulation est une structure en forme tronquée qui entoure le centriole proximal (GURAYA, 1987). Elle s'étend de la fossette d'implantation jusqu'à le démarrage de la pièce intermédiaire et se fixe solidement à la plaque basale par le capitulum.

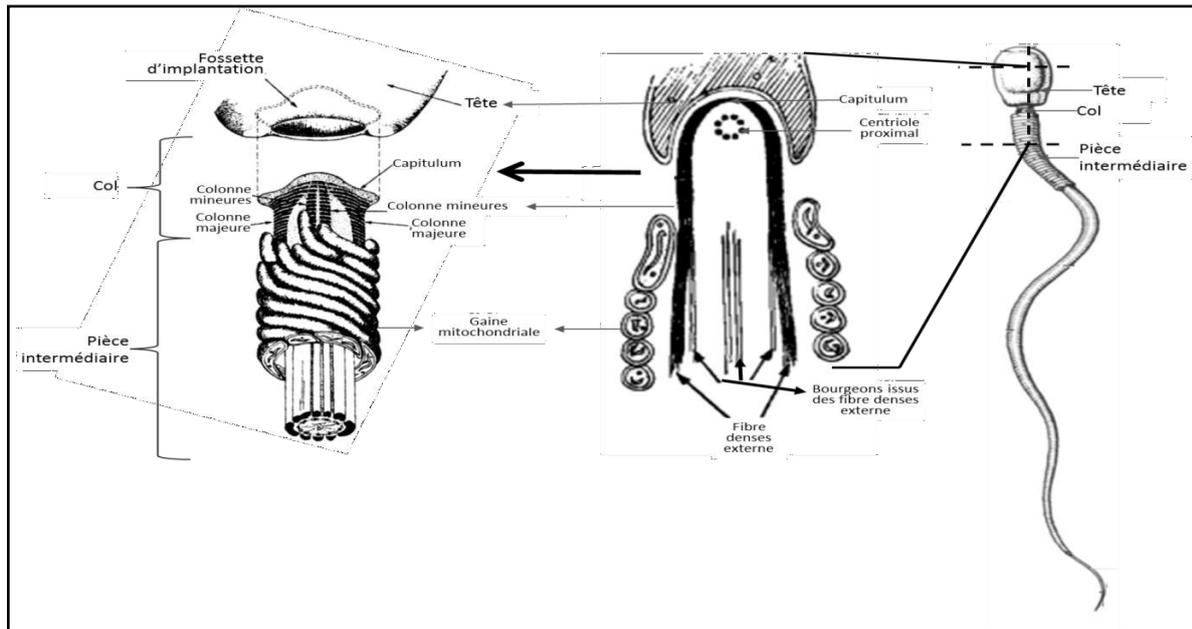


Figure 8: Schéma d'illustration du Col du spermatozoïde chez les mammifères (Saake et Almquist, 1964b)

II.2.1.3 Le flagelle

Le flagelle du spermatozoïde est constitué de 3 segments, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale, il joue un rôle essentiel dans la motilité grâce aux fibres contractiles du filament axial.

II.2.1.3.1 La pièce intermédiaire

C'est le segment du flagelle situant entre le col et l'anneau. L'anneau est l'élément structural dense et filamenteux qui relie la pièce intermédiaire et la pièce principale. Dans la pièce intermédiaire, le complexe axonème-fibres denses externes est entouré par une gaine de mitochondries. Le complexe axonème-fibres denses externes-gaine mitochondriale est recouvert par la membrane plasmique. (GURAYA, 1987).

II.2.1.3.2 La pièce principale

Elle est le segment le plus long du flagelle qui s'étend de l'anneau jusqu'à la pièce terminale. En raison de l'absence de la gaine mitochondriale dans la pièce principale, le diamètre à ce niveau est réduit. La pièce principale est caractérisée par la présence d'une gaine fibreuse. Cette gaine est constituée de nervures semi-circulaires qui se regroupent pour former deux colonnes latérales le long de la pièce principale. La gaine fibreuse assure la stabilité pour les éléments contractiles du flagelle (GURAYA, 1987 ;

CHENOWETH et LORTON, 2014 ; EDDY, 2006 ; DE JONGE et BARRAT, 2006 ; TULSANI, 2003).

II.2.1.3.3 La pièce terminale

Elle est le segment au-delà de l'extrémité terminale de la gaine fibreuse. Elle contient seulement l'axonème couvert directement par la membrane plasmique. (GURAYA, 1987 ; CHENOWETH et LORTON, 2014).

La membrane plasmique entoure la totalité du spermatozoïde (PESCH et BERGMANN, 2006). C'est une structure primordiale qui sépare le milieu intérieur de la cellule du celui extérieur. Elle sert à protéger la cellule du milieu extérieur et assurer les différentes fonctions physiologiques de la cellule.

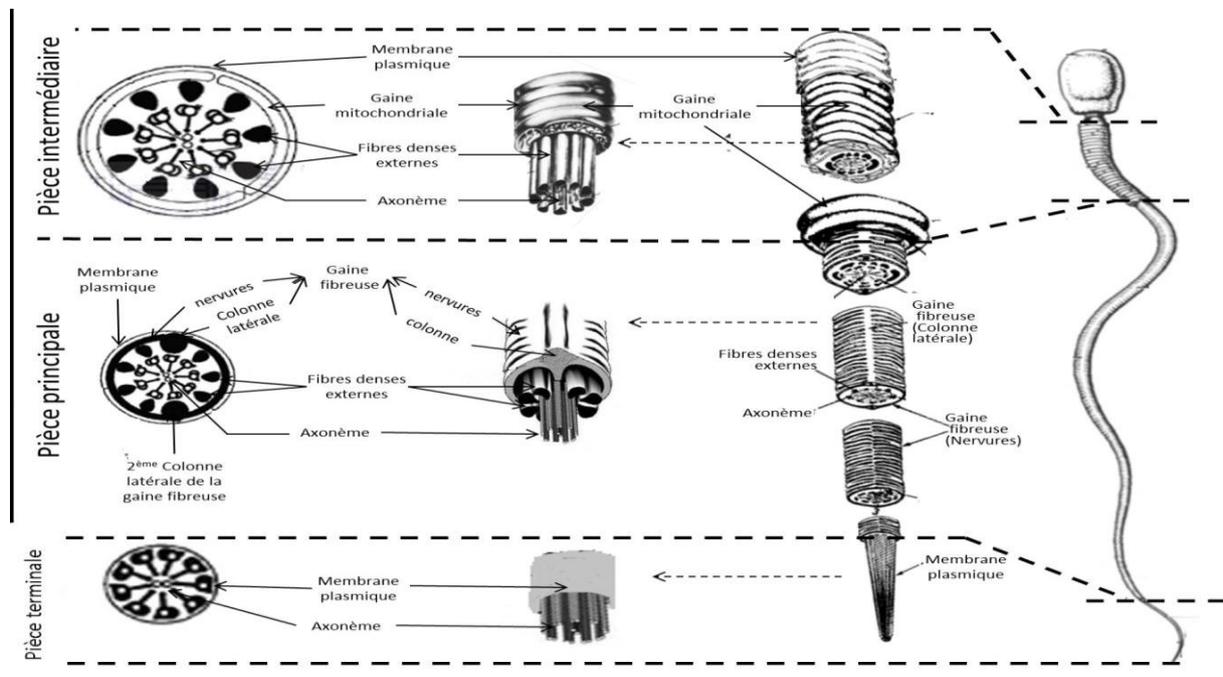


Figure 9: schéma d'illustration du flagelle (pièces intermédiaire, principale et terminale) du spermatozoïde chez les mammifère (Turner, 2003 ; Saake et Almquist, 1964b, Guraya, 1987; Eddy, 2006)

II.2.2 Morphologie des spermatozoïdes

- **La forme:** en général, la forme des spermatozoïdes du béliet est allongée. Ils ont une partie renflée, dite corps ou tête, suivie d'une partie plus longue et effilée, appelée la queue
- **Dimension:** leurs dimensions sont variables.

Tableau 1: Taille des différentes parties du spermatozoïde du bélier en μm (SETCHELL, 1977).

	Tête		Pièce intermédiaire		Pièce principal de la queue	
	Longueur	Largeur	Longueur	Largeur	Longueur	Largeur
Belier	8,2	4,25	14	0,80	40 à45	0,50

II.2.3 Transit épидидymaire

Lors de leur production dans les tubes séminifères les spermatozoïdes immobiles ne sont pas aptes à la fécondation. Ils acquièrent leur pouvoir fécondant lors de leur transit dans l'épididyme qui est assuré principalement par les contractions péristaltiques continues des muscles lisses de la paroi de la tête et du corps épидидyme. C'est la maturation épидидymaire.

Durant la maturation des spermatozoïdes, Le changement le plus évident est la migration de la goutte cytoplasmique, qui est située près du col du spermatozoïde à la sortie du testicule et se déplace vers la pièce intermédiaire lorsque le spermatozoïde arrive à la queue de l'épididyme (COOPER, 1986). Dans le sperme éjaculé, la plupart de ces gouttelettes sont complètement détaché des spermatozoïdes (WHITE, 1974)

III. Le sperme

Le sperme est le liquide émis par le male lors de l'éjaculation, il est constitué de spermatozoïdes en suspension dans le plasma séminal (BONNES et al., 2005).

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

III.1 Aspect et composition

Le sperme est un liquide clair, plus ou moins visqueux, de couleur blanchâtre ou jaunâtre ; sa composition chimique varie selon l'espèce. Il contient des éléments minéraux et de l'acide lactique.

III.2 Volume et concentration

Le volume de l'éjaculat et sa concentration en spermatozoïde sont variable d'une espèce à une autre.

On cite que chez le bélier, le volume de l'éjaculat est de 0,9 ml avec une concentration en spermatozoïdes de 4×10^9 /ml (BONNES et al., 2005).

III.3 Formation du sperme

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds ; leur différenciation se poursuit lors du transit épидидymaire qui dure de 10 à 14 jours, selon l'espèce (DACHEUX et al., 2001) ; le canal déférent prend ensuite le relais pour acheminer ces spermatozoïdes jusqu'à l'urètre.

Tout au long du canal déférent, les glandes annexes assurent la formation du plasma séminal et donc du sperme définitif. Les vésicules séminales secrètent du fructose qui est la source principale d'énergie des spermatozoïdes, ainsi que des phosphates, des citrates, la prostate, quant à elle, une alcalinisation du sperme par sécrétion d'un liquide à PH=8, contenant des phospholipides, des bases azotées et des ions divers.

Le stockage des spermatozoïdes, qui peut durer jusqu'à trois semaines, se fait essentiellement (70%) dans la queue de l'épididyme. Seulement 2% sont emmagasinés dans le canal déférent. Les spermatozoïdes non éjaculés sont résorbés ou éliminés dans les urines (DOUET, 2000).

III.4 Variation de production spermatique

L'activité sexuelle, chez le bélier, est influencée par les variations de la photopériode et donc par la saison de l'année. L'activité est maximale pendant les mois d'automne et d'hiver (période de jours courts) et plus faible au printemps et en été (période de jours longs) (CASTONGNON F, 2010) ; un gramme de testicule de bélier produit $12,2 \times 10^6$ spermatozoïdes en automne contre seulement $9,3 \cdot 10^6$ au printemps à cause de la diminution du rendement de la spermatogénèse (ROSA and BRYANT, 2003).

CHAPITRE II

La collecte du sperme

I. Collecte du sperme chez le bélier

I.1 Méthode de collecte du sperme

La semence ovine peut être obtenue par trois manières

I.1.1 Vagin artificielle

La mise en œuvre de cette technique requiert le recours à un vagin artificiel, à un boute-en-train, et à un opérateur chargé de la collecte (BARIL, 1993)

Le vagin artificiel est conçu de façon à stimuler les mêmes conditions de pression, de température et de lubrification présentes dans le vagin d'une femelle et qui sont favorables à une éjaculation (HAFEZ, 1974)

Cette méthode simple et rapide permet d'obtenir ou de récupérer un éjaculat total non contaminé, il y'a cependant une légère difficulté due au fait que le bélier est très sensible aux conditions de température et de pression du vagin (MICHELAT, 1974).



Figure 10: Modèle d'un vagin artificielle utilisé chez le bélier et le bouc (IMV Technologie)

I.1.2 L'électro-éjaculateur

Selon HAFEZ(1974); une stimulation électrique des glandes vésicales et de l'ampoule du canal déférent, via le rectum, peut induire un écoulement de sperme

L'électro-éjaculateur est un appareil constitué d'une sonde rectale et d'un système électronique, permettant d'envoyer des impulsions électriques cycliques via la sonde. Ces

impulsion excitent la zone lombo-sacré-médullaire et donc les zones déterminant l'érection et l'éjaculation (DOUET, 2000)



Figure 11: Electro- éjaculateur (<http://Ali express.com>)

I.1.3 La collecte du sperme épидидymaire

La collecte du sperme épидидymaire est une technique utilisée dans le cadre de l'insémination artificiel et la fécondation in vitro, permet de recueillir les spermatozoïdes en nombre suffisant pour plusieurs dizaines de IA et FIV.

Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent en lui introduisant un petit tube pour la collection du sperme (DEUTSCHEUR, 2007)

Selon GUERIN et al(2003), le sperme épидидymaire se conserve plusieurs jours à +4°C dans l'organe ou dans le milieu épидидymaire non dilué.

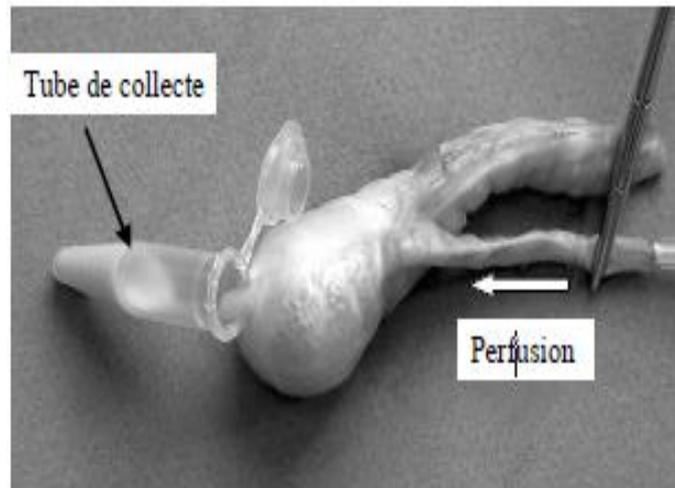


Figure 12: la méthode de flushing rétrograde (perfusion de la partie caudale de l'épididyme du bélier-GUERIN et al., 2003)

II. Evaluation de la qualité du sperme

L'évaluation de la qualité spermatique est indispensable à réaliser avant toute utilisation de la semence pour détecter d'éventuelles anomalies de spermatozoïdes (POSIERE, 2002)

II.1 Examen macroscopique

II.1.1 Volume de l'éjaculat

Chez le bélier, le volume éjaculé est peu abondant mais très concentré, en général les secondes éjaculations d'une même session de collecte sont plus abondantes que les premières (EDUARDO et al., 2003). Selon LACROIX (1976); le volume moyen de l'éjaculation d'un bélier varie entre 0,7 ml et 2 ml.

II.1.2 Couleur et consistance du sperme

La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant (EZEKWE, 1988) .en général, plus le sperme est blanc et visqueux, plus sa concentration en spermatozoïdes est élevée.

Chez le bélier ; le sperme est :

- crèmeux épais correspond à une concentration de 5×10^9 spermatozoïdes/ml
- laiteux correspond à 2×10^9 spermatozoïdes/ml
- trouble correspond à $0,7 \times 10^9$ spermatozoïdes/ml (DOUET, 2000)

II.2 Examen biochimique

II.2.1 Le PH

Chez le bélier, le PH normal est légèrement acide 6,85. il est corrélé à la concentration et à la vivacité du sperme, plus un sperme est concentré, plus son PH est acide et peut atteindre 5,9(DERIVAUX et ECTORS, 1989)

II.3 Examen microscopique

II.3.1 Concentration du sperme

Au niveau des centres d'IA ovine, la concentration de l'échantillon est déterminée le plus souvent en utilisant la spectrophotométrie.

Le principe repose sur la mesure de l'absorbance (ou densité optique) du sperme, après dilution d'un volume constant de semence pure dans une solution de sérum physiologique formolée (GUILLOT, 2002 ; SAGOT, 2009)

Aussi, elle peut être mesurée au moyen d'une cellule hématimètre telle que cellule de Malassez ou bien via l'analyseur informatique(CASA) en utilisant une cellule de Makler.

Selon KABERA(2008);un sperme de bonne qualité a une concentration supérieure à $0,5 \times 10^9$ spz/ml

II.3.2 Motilité massale

C'est un mouvement des spermatozoïdes qui s'observe sur une goutte du sperme au microscope à faible grossissement (x10) (NAJJAR et BEN MRAD, 2013)

Une goutte de semence pure est posée sur une lame chauffée à 37°C, on observe le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes qui forment des tourbillons plus au moins rapides (EILTS, 2004)

La motilité massale est notée sur une échelle de 0 à 5.

Tableau 2: les notes de la motilité massale (DERIVAUX et ECTORS, 1986)

Note	Motilité massale
0	Immobile
1	Mouvement individualisé

2	Mouvement très lent
3	Mouvement faible amplitude
4	Mouvement rapide sans tourbillon
5	Mouvement rapide avec tourbillon

Généralement, seuls les éjaculats ayant une note de motilité supérieure ou égale à 3 sont gardés.

II.3.3 Motilité individuelle

C'est un mouvement de chaque spermatozoïde qui apprécie au microscope au grossissement x40 pour une dilution de 1 à 5 avec de solution tris-buffer ou une autre solution physiologique. Une échelle de 0 à 5 est notée (KABERA, 2008)

D'après BARIL et al(1993); la détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes est selon le tableau 3 :

Tableau 3: Les notes de la motilité individuelle.

Note	Motilité individuelle
0	Pas de déplacement des spermatozoïdes
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblement du spermatozoïde, oscillation de la queue
2	Déplacement lent, tremblement, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement
3	Les spermatozoïdes effectuent des mouvements curvilinéaires tremblement
4	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autre avec une trajectoire courbe
5	Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes

Les taux de spermatozoïdes morts ou anormaux acceptable dans le sperme se situe entre 20 et 26% (COLAS, 1975, COLAS, 1980 ; FANTODJI et al., 2009)

II.3.4 Morphologie et viabilité des spermatozoïdes

L'examen morphologique permet de différencier les spermatozoïdes normaux des anormaux et vivants des non vivants. L'évaluation du pourcentage de défauts de morphologie, et le pourcentage de spermatozoïdes vivants et morts peut réaliser sur les mêmes lames de coloration à l'éosine-nigrosine (AGNIESZKA PARTYKA, 2012)

Lors de coloration à l'éosine-nigrosine, les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs et sans couleurs contre le fond violet de la nigrosine, alors que les spermatozoïdes morts ou endommagés qui ont une membrane plasmique perméable apparaissent de couleur rosâtre.

D'après JOHNSTON S.D et al, (2001); le sperme est admissible s'il contient moins de 25% de spermatozoïdes anormaux, et plus de 60% de spermatozoïdes vivants.

III. Dilution du sperme

Les dilueurs sont des substances qui ont un rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de cristallisation de l'eau (FUERTES, 2008) De plus, ils assurent un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et augmentent le nombre de doses à inséminer (ENGLAND, 1993).

III.1 Composition du milieu de dilution

D'après MIES FILHO(1982) quelle que soit l'espèce, un bon dilueur doit présenter les caractères suivants :

- a-Absence de toxicité
- b-Osmolarité égale ou proche à celle de la semence
- c- PH favorable selon l'espèce
- d-Préparation simple et moindre cout

Il doit également assurer la survie et la bonne conservation des spermatozoïdes frais, conservé ou congelé et pour cela il doit apporter des substances nutritives et jouer un rôle cryoprotecteur (AIRTON al, 2012)

III.1.1 Les cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques, naturel ou de synthèse dont le but est de protéger les cellules des effets délétères des très basses températures (COURBIERE et al, 2009)

On distingue deux catégories :

III.1.1.1 Cryoprotecteurs pénétrants

Ce sont des substances de faible poids moléculaires et perméable à la membrane plasmique du spermatozoïde, ils agissent à l'intérieur et à l'extérieur de celle-ci (BAKHACH, 2007 ; PURDY, 2006)

Lorsqu'ils sont à l'intérieur de la cellule, ils diminuent la cristallisation intracellulaire en limitant les phénomènes de choc osmotique par déshydratation précoce de la cellule, alors qu'à l'extérieur de la cellule, ils augmentent l'osmolarité du diluant et stimulent la déshydratation de cette dernière. (PURDY, 2006)

Il existe différents molécules qui assurent cette fonction y compris : glycérol (PM=92,1) ; éthylène glycol (PM=62,07) ; 1.2propanediol (PM=76.1) ; dimethylsulfoxide-DMSO- (PM=78.13) et d'autres alcools tel que éthanol et méthanol (pALASZ ; 1996)

Le glycérol est le cryoprotecteur pénétrant le plus utilisé, il contribue au changement de la structure des lipides membranaire du spermatozoïde ce qui lui procure une stabilité et une perméabilité à l'eau (HOLT, 2000). La concentration de 6% de glycérol dans le diluant s'est avérée produire une conservation de motilité des spermatozoïdes de la semence congelé (KUNDU, 2001)

Le glycérol présente néanmoins une toxicité importante tant osmotique que biochimique s'il se retrouve en excès dans le milieu ou dans la cellule.

D'un point de vue osmotique, il est responsable d'une hyperosmolarité du milieu lors son incorporation. Une forte concentration du glycérol peut entraîner un choc osmotique. Aussi, si on décongèle les cellules en utilisant un milieu hypo-osmotique le glycérol n'a pas de temps de sortir de la cellule que l'eau rentre déjà massivement, donc cela peut faire éclater la cellule.

D'un point de vue biochimique, le glycérol est capable de se lier aux phospholipides, ce qui diminue la fluidité de la membrane et déplace les protéines enchâssées dans cette dernière.

Contrairement à la toxicité osmotique, la toxicité biochimique est plus réduite quand le temps de contact avec la cellule diminue. (GORDON, 1997 ; MOLINIA, 1994 ; SINGH, 1995).

III.1.1.2 Les cryoprotecteurs non pénétrants

Ce sont des molécules qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique des spermatozoïdes. Leur principe d'action est d'entraîner une fuite d'eau intracellulaire par effet osmotique : leur présence augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde (COURBIERE, 2009 ; PURDY, 2006). Aussi ils protègent les spermatozoïdes des pertes de cholestérol et de phospholipides de la membrane en diminuant la liaison des protéines du plasma séminal à la membrane plasmique (BERGERON, 2007).

Les cryoprotecteurs non pénétrants les plus utilisés sont :

III.1.1.2.1 Jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est un composant utilisé en routine dans la conservation de la semence de plusieurs espèces. Il présente un effet préservateur bien connu de motilité, le métabolisme et la fertilité des spermatozoïdes conservés à +5°C (MAYER et LASLEY, 1945 ; O'SHEA et WALLEES, 1967 ; ROBERTSON ET WASTON, 1987).

Le jaune d'œuf a une action protectrice contre le choc thermique (BLACKSHAW, 1954), et également sur les membranes de l'acrosome et de la mitochondrie pendant le refroidissement.

Aussi, l'addition de ce composé dans un milieu isotonique ou hypertonique augmente la consommation d'oxygène et le métabolisme du fructose par la semence fraîche (bélier et taureau) et après stockage à +5°C cette augmentation est encore plus significative (O'SHEA et WALLEES, 1966)

La fraction active du jaune d'œuf est une lipoprotéine qui s'attache à la surface du spermatozoïde, elle serait en grande partie l'agent cryoprotecteur (WATSON, 1981)

Selon WATSON et MARTIN(1975), l'incorporation de 18% jaune d'œuf avant congélation améliore considérablement la motilité après décongélation des spermatozoïdes.

III.1.1.2.2 Le lait

Le lait est un milieu biologique de composition complexe, son PH d'environ 7,0 et sa pression osmotique autour de 300milliosmoles. Ces deux paramètres sont proches de ceux de la semence (HAFEZ, 1993). L'efficacité du lait en tant que milieu de dilution et conservation de

la semence est liée à son rôle de tampon, son action protectrice contre le choc thermique et son action antioxydante contre quelques métaux lourds (JONES, 1969)

En plus, le lait apporte le lactose comme un substrat énergétique naturel aux spermatozoïdes et améliore leur survie in vitro dans les milieux synthétiques (MARTIN, 1965).

Le lait écrémé est le plus utilisée pour la conservation du sperme de bélier, il doit d'abord être chauffé à 95°C afin d'inactiver la lacténine présente dans la fraction protéique car elle possède des radicaux libres de soufre qui ont un effet toxique sur les spermatozoïdes (FLIPSE et al., 1954).

L'effet cryoprotecteur du lait est attribué à la caséine (fraction protéique). O'SHEA et WALLEES(1966) ont constaté que l'addition de la caséine à un dilueur salin augmente largement la consommation d'oxygène l'utilisation du fructose et la motilité spermatique.

MARTIN (1966) démontre que des concentrations élevées de caséine dépriment la motilité des spermatozoïdes de bélier à 37°C, néanmoins, la survie à 5°C est considérablement amélioré lorsque la concentration de caséine est augmentée de 0,5 à 2g/100ml dans le milieu de conservation.

III.1.2 Substances nutritives

Elles sont nécessaire au métabolisme du spermatozoïde et favorise leurs vitalités et longévités. On utilise couramment le fructose et le glucose, car ce sont des monosaccharides présents naturellement dans le plasma séminal et facilement utilisables par les spermatozoïdes (MOLINA, 1994). On peut utiliser aussi le lait à condition qu'il soit chauffé à 56°C pendant 15min pour détruire les éléments spermicides.

III.1.3 Antibiotiques

Les antibiotiques sont utilisés pour empêcher la multiplication bactérienne du fait de la présence du lait ou du jaune d'œuf qui va permettre le développement des bactéries, aussi le sperme n'est pas stérile donc le risque de contamination est toujours présent.

La plupart du temps on utilise les associations pénicilline-streptomycine ou pénicilline-gentamicine (MOLINIA, 1994).

III.1.4 Substance tampon

Le diluent doit contenir un tampon afin de garder un PH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes (varie entre 6,7 et 7), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350 mOsm).

Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de TRIS ou de citrate de sodium (VISHWANATH, 2003).

IV. La conservation du sperme

IV.1 Types de Conservation du sperme

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

IV.1.1 Conservation à long terme: congélation

La congélation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures souvent dans l'azote liquide à -196°C . C'est une biotechnique qui induit l'arrêt de toute les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (BAKHACH et al, 2007).

La congélation du sperme est généralement effectuée en deux temps dans les congélateurs programmables : une première étape de congélation lente qui permet la déshydratation et l'équilibrage des pressions osmotiques, et une deuxième étape de congélation rapide qui évite l'effet de solution.

La température finale de congélation est de -196°C

IV.1.2 Conservation à court terme : Réfrigération

La conservation du sperme par réfrigération consiste à abaisser la température de cette dernière en présence de dilueur pendant 48H pour maintenir les spermatozoïdes dans des températures permettant de réduire leur mobilité et leur métabolisme sans atteindre le seuil de températures négatives (DECUADRO, 2004).

La réfrigération du sperme de bélier se fait à une température voisine de 4°C , pour éviter les chocs thermiques, elle doit être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de $0.5^{\circ}\text{C} / \text{minute}$ entre 37 et 22°C et de $1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ entre 22 et 4°C . La semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours (HANZEN, 2010).

IV.2 Lésions de la cryoconservation

IV.2.1 Lésions de la congélation

Durant les différentes étapes de cryoconservation, les spermatozoïdes sont exposés aux dangers de lésions de plusieurs facteurs tels que la toxicité des cryoprotecteurs et des électrolytes concentrés, les lésions de refroidissement (choc au froid) (AMANN et PICKETT, 1987), les dommages mécaniques de formation des cristaux de glace et le stress oxydatif (AGARWAL et al, 2014; AITKEN et al, 1991). Ces lésions provoquent des modifications morphologiques, cytologiques et biochimiques pouvant altérer la structure et la fonction du spermatozoïde. En effet, le contrôle de la vitesse de refroidissement et l'ajout des molécules protectrices de spermatozoïdes au milieu de congélation sont les principales approches adoptées pour diminuer les effets délétères de la cryoconservation (BARBAS et MASCARENHAS, 2009 ; SALAMON et MAXWELL, 1995, 2000).

IV.2.2 Lésions de refroidissement (choc au froid)

Le changement de la température provoque des lésions cellulaires est communément appelé le choc au froid. Ce dernier survient entre la température du corps et une température proche de point de congélation. Au-dessous de la température +15 C°, les lésions du choc au froid sont plus sévères (AMANN et PICKETT, 1987)

Dans des conditions physiologiques normales, les membranes cellulaires sont dans une phase fluide, présentant conformation à très désordonnée, dans lequel les phospholipides et les protéines peuvent se mouvoir de différentes manières au sein de la bicouche lipidique, Au cours du refroidissement, les lipides en bicouches subissent des changements radicaux dans l'état physique à une température dite une température de transition de phase. En dessous de cette température de transition, la bicouche lipidique passe de l'état fluide à un état gel compact avec des chaînes des AG pratiquement immobilisées, régulièrement ordonnées, et proches les unes aux autres

Le choc au froid entraîne aussi la destruction de l'acrosome et la perte de son contenu empêchant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. De plus, il augmente la perméabilité de la membrane en altérant l'équilibre hémostasie de la cellule et la capacité régulatrice intracellulaire de calcium requise pour la fécondation (KAROW et CRISTER, 1997 ; AMANN et PICKETT, 1987).

La diminution de l'impact du choc au froid requiert un refroidissement lent et l'utilisation des substances protectrices de la membrane. La vitesse de refroidissement <10°C/h pourrait

diminuer significativement les dommages du choc de froid, mais pas entièrement (KAROW et CRITSER, 1997).

CHAPITRE III

Le stress oxydatif

I. Le stress oxydatif

I.1 Définition

Le stress oxydatif est défaillance de système antioxydant vis-à-vis l'excès de génération des oxydants appelés les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (BERTIRIDIGE, 2000). Il induit des altérations membranaires et nucléaires entraînant une perte de mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (PONS. et al., 2009). Selon (PARTYKA. et al., 2012) le stress oxydatif est reconnu comme l'une des causes les plus importantes de l'infertilité masculine (LANZAFAME, 2009).

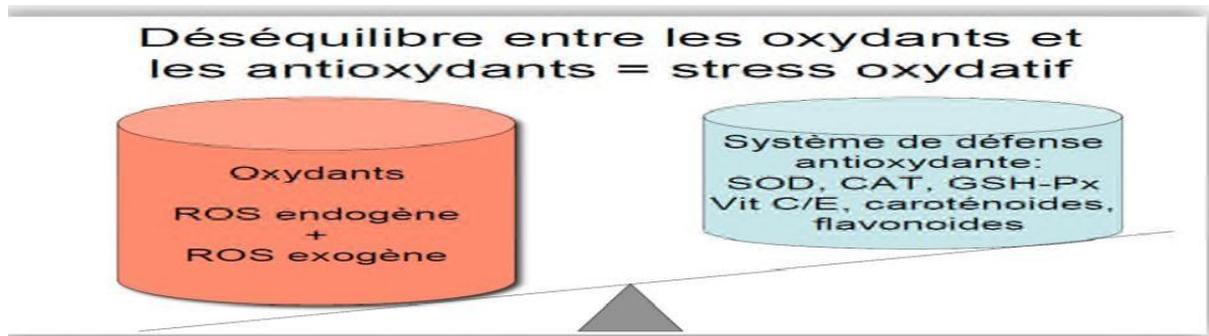


Figure 13: Etat de déséquilibre oxydatif

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

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

I.2.1 Les sources des ERO

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 des spermatozoïdes ; 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 et al., 2009)

I.2.2 Principaux radicaux libres

Les ERO et les ERN sont les termes décrivant collectivement les radicaux libres (PHAM-HUY et al., 2008) avec les principales espèces radicalaires (Anion superoxyde O_2^- , Radical hydroxyle OH^\cdot , Radical peroxyde ROO^\cdot) et non radicalaires (Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , Ozone O_3 , Tetroxyde de diazote N_2O_4). Les espèces oxygénées et azotées non radicalaires exhibent également une action oxydante et peuvent être facilement converties en espèces radicalaires. (HADJIGOGOS, 2003).

I.2.3 Origine des radicaux libres (RL)

La production de radicaux libres peut être d'origine endogène ou exogène et résulte d'activités enzymatiques ou non enzymatiques (PHAM-HUY et al., 2008).

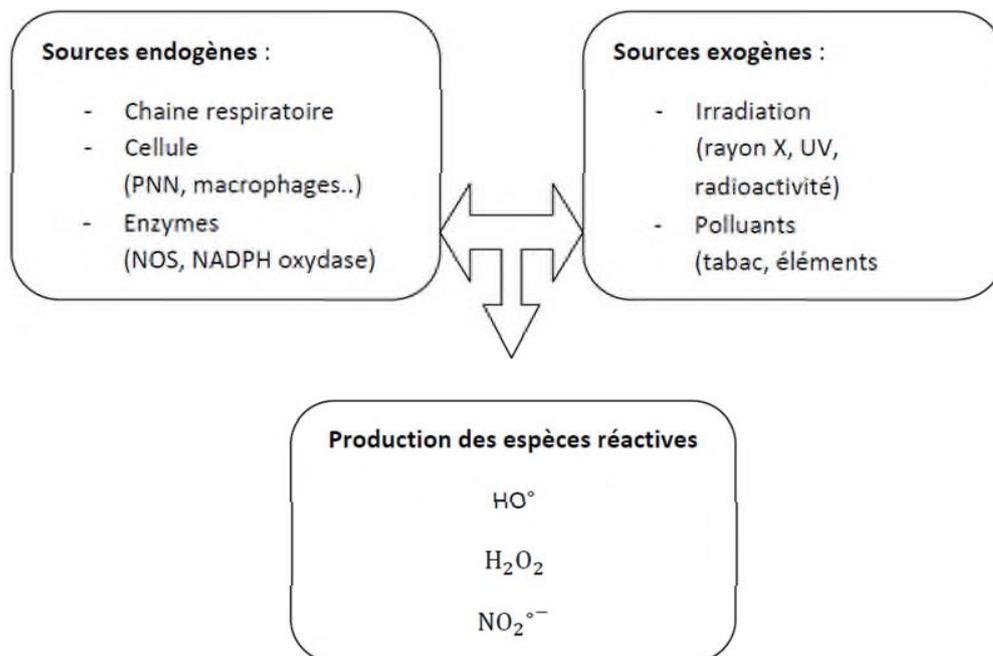


Figure 14: Les sources des espèces réactives (POISSON, 2013).

I.3 Conséquences du stress oxydatif

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, qui 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.3.1 Conséquences sur les Glucides

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de traces métalliques, il libère des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\cdot , lesquels entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE

(OGINO et WANG, 2007).

I.3.2 Conséquences sur les Lipides

Les lipides membranaires sont la première cible des ERO lors du processus de la peroxydation lipidique, cette peroxydation est généralement initiée par le radical hydroxyle, oxygène singlet et le peroxy-nitrique (RE et al., 2005)

La peroxydation lipidique par exposition des gamètes mâles aux 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).

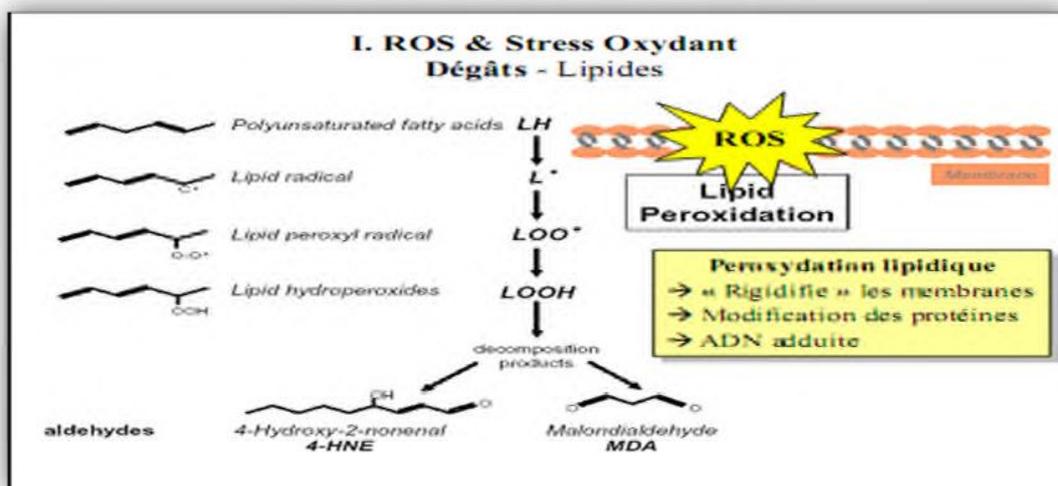


Figure 15: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (ESTERBAUER H et al., 1992).

I.3.3 Conséquences sur les Protéines

Les protéines comportant un groupement sulfhydryque (SH) sont les plus sensibles aux attaques radicalaires (BECKMAN et AMES, 1998). Selon GARDES- ALBERT et al (2003), lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif.

I.3.4 Conséquences sur 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). L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine par exemple peut réagir avec $\cdot\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique (CADET *et al.*, 2002).

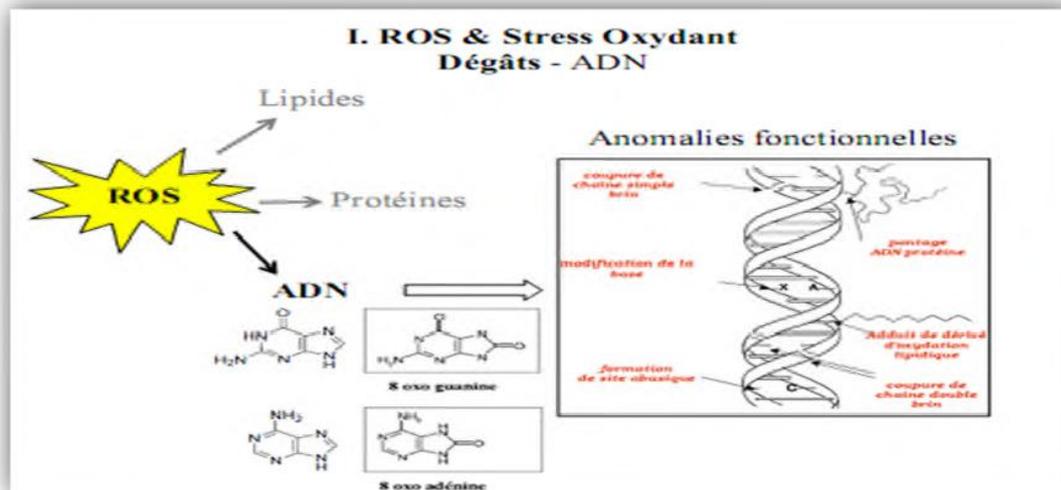


Figure 16: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (CADET *et al.*, 2002)

II. Le système antioxydant

C'est un système de défense de l'organisme qui est représenté par des molécules variées. Elles sont produites soit par l'organisme ou apportées par l'alimentation (BEGUEL *et al.* 2013) il agit en interrompant les réactions en chaîne aboutissant à la production des ERO

II.1 Le système antioxydant du sperme

Les antioxydants présents dans la semence sont des agents protecteurs contre les attaques des ERO. En raison de leurs cytoplasmes réduits, les spermatozoïdes ne sont pas riches en antioxydants comme le plasma séminal. En général, les antioxydants sont classés en deux catégories, antioxydants enzymatiques et antioxydants non enzymatiques (BANSAL *et BILASPURI*, 2011).

II.2 Les antioxydants enzymatiques

Ce sont des enzymes dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution et qui

agissent de manière coordonnée. Les principales enzymes antioxydantes sont la Catalase (CAT), la Superoxyde dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes sont appelées la triade catalytique, elles possèdent une grande affinité pour les ERO avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser (AMIDI et al, 2016 ; VAMECQ et al, 2004).

II.2.1 La catalase (CAT)

Elle présente principalement dans le plasma séminal (CHEN et al. 2003; TRAMER et al, 1998) Le rôle de la catalase (CAT) est de transformer le H_2O_2 en H_2O et O_2 ($2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2 H_2O + O_2$). Elle 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). La fonction potentielle de CAT est associée à la fonction de SOD. Cette dernière constitue la première ligne de défense par la conversion de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , tandis que la CAT détoxifie le H_2O_2 (VAMECQ et al. 2004)

II.2.2 Glutathion peroxydase (GPX)

Différentes GPx ont été connues chez plusieurs espèces telles que les ovins et les lapins (ALVAREZ et STOREY, 1989 ; Li, 1975). Elle existe sous une forme de GPx cytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-intestinale ainsi qu'une iso-enzyme. (URSINI *et al*, 1999).

La GPX est la clef responsable de l'élimination des radicaux alkyles peroxydes (ROO^{\bullet}) de la chaîne de réaction de la peroxydation des lipides. En effet, cette enzyme intervient dans la protection des cellules contre la peroxydation des lipides. De plus, elle détoxifie les H_2O_2 générés par la SOD.

En raison de sa concentration élevée principalement dans le plasma séminal (BILODEAU et al, 2000), la GPx est l'enzyme la plus dominante qui protège le sperme contre le stress oxydatif."

II.2.3 Superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase constitue la première ligne de défense contre le stress oxydatif chez les cellules vivantes. La source majeure de SOD est les glandes accessoires du mâle telles que la prostate et la vésicule séminale (CHEN et al, 2003 ; BILODEAU et al, 2000). La SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Cette

réaction peut se faire spontanément mais de façon moins rapide, ce qui augmente le temps de vie de l'O₂⁻ lui permettant ainsi d'oxyder des composants cellulaires ou de générer des EOR bien plus toxiques (GREGORY *et al*, 1974).

II.2.4 Autres enzymes antioxydants

II.2.4.1 Glutathion réductase

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

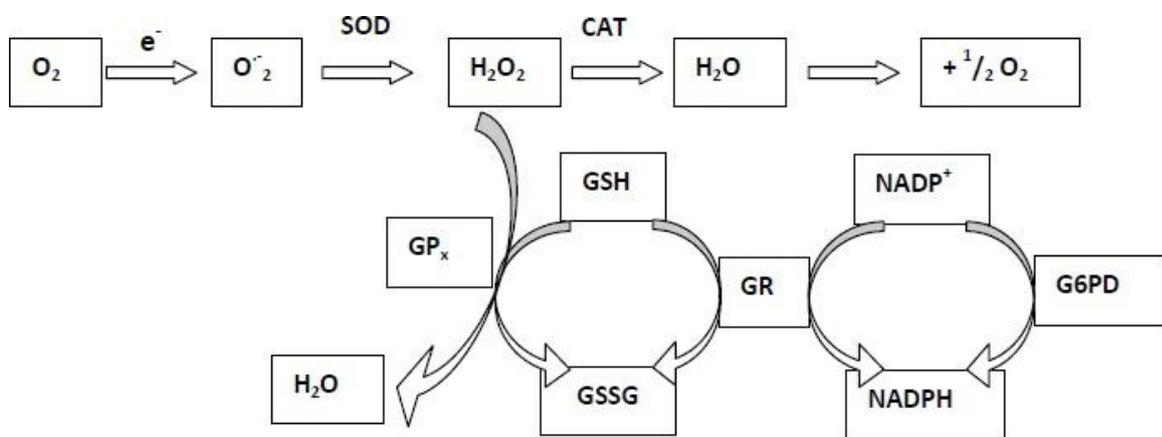


Figure 17: Système antioxydant enzymatique (MARFAK, 2003)

II.3 Les antioxydants non enzymatiques

II.3.1 Antioxydants liposolubles

II.3.1.1 Vitamine E

La vitamine E est une molécule antioxydant liposoluble naturelle non enzymatique présente dans le plasma sérial et dans la membrane cellulaire (SURAI *et al.*, 2001,1998). Elle est considérée comme l'antioxydant le plus puissant. 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 vitamineE et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant. Elle est connue comme une substance efficace pour prévenir ou stopper la peroxydation des lipides membranaires en neutralisant les ERO et empêchant la formation des radicaux alkyles. En outre, la propagation de la peroxydation des lipides requiert la

formation des radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) au niveau des acides gras polyinsaturés, la vitamine E réagit avec les lipides peroxydes en lui donnant un atome hydrogène pour former des lipides hydroperoxydes (Vitamine E + $\text{ROO}\cdot \rightarrow$ Vitamine E \cdot + ROOH). Cette réaction empêche la propagation de la peroxydation des lipides. D'ailleurs, une molécule de vitamine E protège 1000 molécules d'acides gras polyinsaturés (NIKI et al., 2004 ; SURAI et al., 1998; ERNSTER et al., 1992). 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)

Nous allons utiliser cette molécule dans notre étude expérimentale.

II.3.1.2 La vitamine A

La vitamine A appelée également rétinol est une vitamine liposoluble qui existe dans l'organisme sous forme de rétinoïde (rétinol, trétinoïde) et de provitamine A (principalement les α et β -carotènes).

Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, et ce processus est accéléré par la lumière et la chaleur. 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).

II.3.1.3 Les caroténoïdes

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

II.3.2 Antioxydants hydrosolubles

II.3.2.1 La vitamine C

Ou encore appelé acide ascorbique, C'est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Elle a un rôle antioxydant car elle réagit avec $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^{\circ}\text{OH}$. Elle permet aussi de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant (LUTSENKO, 2002).

La vitamine C agit également sur certains hydro peroxydes lipidiques réduisant ainsi la peroxydation lipidique, cette dernière, 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.

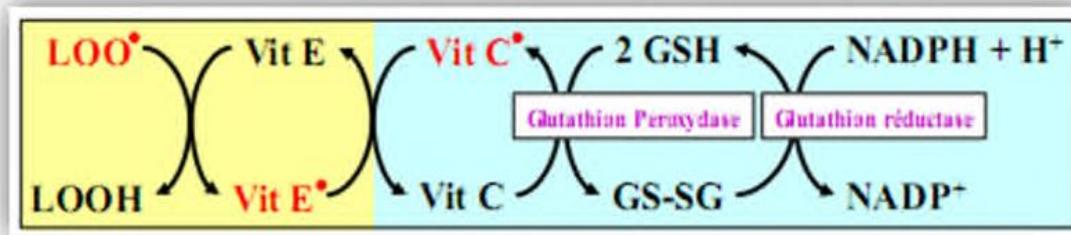


Figure 18: Cycle réactionnels de régénération des antioxydants (PHAM-HUY et al., 2008)

Cependant à forte dose et en présence d'ions, comme le fer, la vitamine C peut devenir pro-oxydante (POLJSAK et al., 2005).

II.4 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. Ils possèdent néanmoins certains composés antioxydants comme l'acide ascorbique (vitamine C) et l'alpha tocophérol (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 antioxydants sont également retrouvées au niveau des spermatozoïdes, notamment GPx1 et GPx4 ainsi que la glutathion réductase (ALVAREZ et STOREY, 1989).

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

PARTIE
EXPERIMENTALE

Introduction

L'insémination artificielle est la biotechnologie la plus utilisée durant ces dernières années, elle est réalisée avec succès chez les bovins, mais elle reste peu employée chez la race ovine due à la fragilité de la semence vis-à-vis du froid. Une fois la semence collectée et conditionnée, son utilisation reste assez limitée dans le temps.

Différentes stratégies ont été explorées pour combattre le choc au froid et le stress oxydatif pendant le processus de congélation/décongélation; à cet égard, le cholestérol a été particulièrement rapporté comme un facteur clé pour lutter contre le choc au froid. Néanmoins, en raison de la lipophilicité du cholestérol, des effets plus importants sont rapportés lorsque la solubilité de cette molécule est augmentée par la cyclodextrine. Chez le bélier particulièrement, il a été rapporté que le complexe cyclodextrines-cholestérol améliore la motilité, la viabilité et l'intégrité de la membrane du sperme (Ahmad et al., 2013;Awad, 2011; Mocé et al., 2010; Motamedi-Mojdehi et al., 2014).

Une autre stratégie basée sur la supplémentation des milieux de conservation par des antioxydants pour combattre le stress oxydatif, notamment la vitamine E, elle est considérée à la fois comme, un stabilisateur de la membrane et comme une molécule antioxydante puissante protégeant la membrane cellulaire contre la peroxydation lipidique et les attaques des ERO (Urano et al., 1987, 1988; Niki et al., 2004). Au cours de la cryoconservation. Nous avons supposé que les effets positifs de la vitamine E pourraient être significativement améliorés en augmentant sa solubilité par sa complexation avec les cyclodextrines.

L'objectif de notre étude expérimentale est d'étudier les impacts des antioxydants sur la qualité du sperme cryoconservé après son décongélation.

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1 Matériel biologique

Testicules, issus de béliers adultes, ont été récupérés à l'abattoir communal de Kaïs, Khenchela.



Figure 19: les testicules manipulés

I.1.2 Equipements

Les principaux appareils utilisés dans les 2 expérimentations étaient : l'appareil de congélation programmable (Thermo-science, CryoMed), lecteur microplaque, le CASA (Computer Assisted sperm analysis) (SCA), la centrifugeuse, Bain-marie, Balance analytique, Plaque chauffante, Containers de l'azote liquide, Agitateur magnétique, Vortex.





Figure 20: Equipements

I.1.3 Produits chimiques

Les principaux produits chimiques utilisés dans cette étude étaient :

Acide Hydrochlorique 37%, Acide citrique, Acide thiobarbiturique, Acide Trichloracétique, Benzylpenicilline, Chloroforme, Cholestérol, Citrate de sodium, Ethanol, Fructose, Glucose, Glycérol, Méthanol, Methyl- β -cyclodextrine, Streptomycine sulfate, Tris-(hydroxyméthylaminométhane), Vitamin E (α -tocophérol).

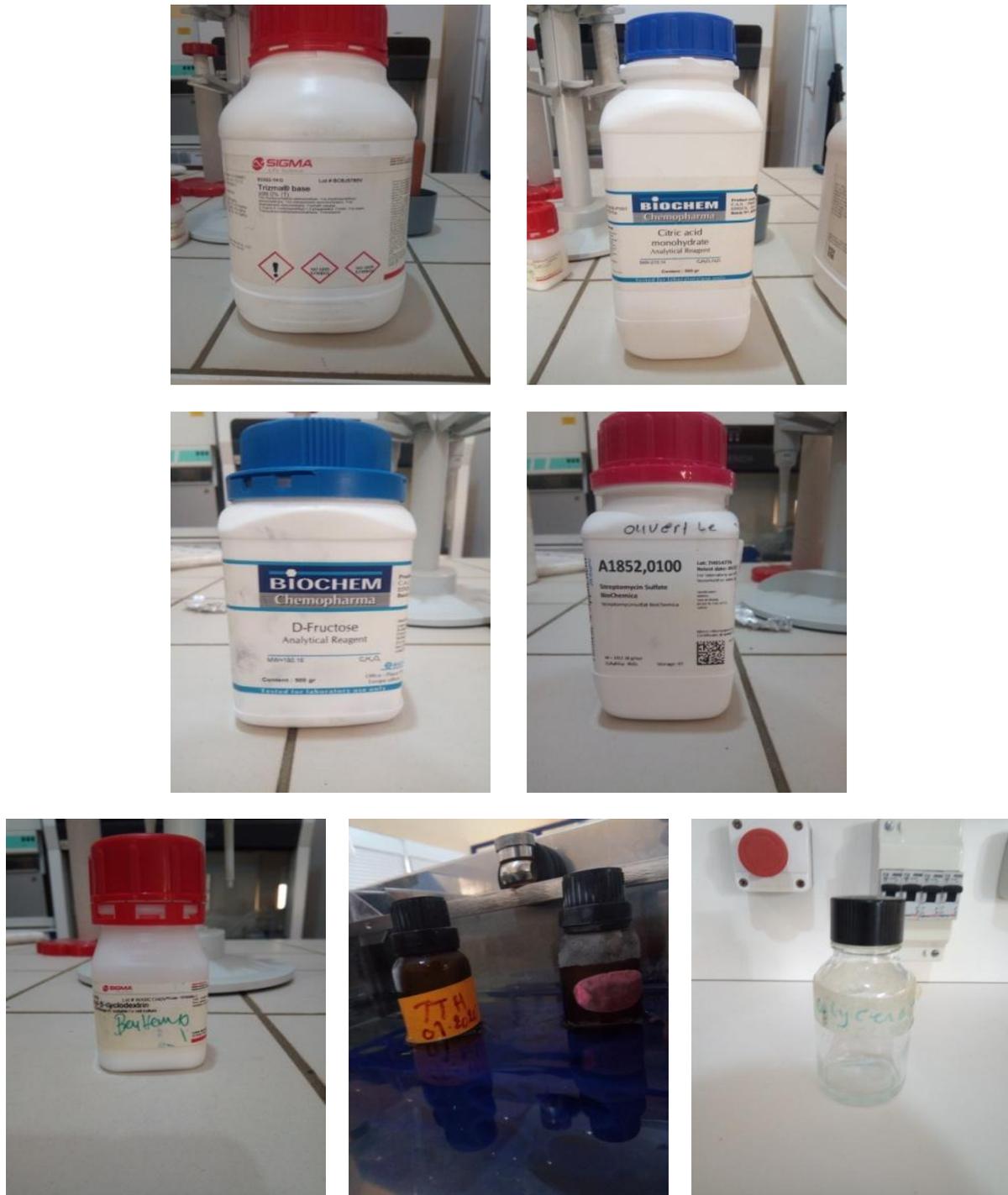


Figure 21: Les produits chimiques utilisés

I.1.4 Consommables

Le principal consommable utilisé dans ce travail était : Paillettes de 0.25 ml (IMV, technologies), Cellule Cellule Léja®, Cellule Malessez®, Poudre de bouchage pour les paillettes, Tubes en verre, Bêchers en verre, Matériel pour la récolte du sperme épидидymaire

(lame bistouri, seringue, ciseau, pince hémostatique), Epindorfs, Lames, Lamelles, microplaques à 96 puits



Figure 22: les outils consommables

I.2 Méthodes

I.2.1 Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine–vitamine E

Le complexe méthyl- β -cyclodextrine–vitamine E (CD-Vit E) a été préparée avec un rapport molaire 1:1 (méthyl- β -cyclodextrine : α -tocophérol) par un procédé de co-évaporation. La méthyl- β -cyclodextrine (309,11 mg) et l' α -tocophérol (100 mg) ont été dissous dans 50 ml d'éthanol. Le mélange obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessiccateur jusqu'à son utilisation (Koontz *et al.*, 2009).

I.2.2 Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine–cholestérol

Le complexe méthyl- β -cyclodextrine cholestérol (CD-CHL) a été préparé comme décrit précédemment par Purdy et Graham (2004). Dans un tube à essai en verre, 1 g a été dissous de méthyl- β -cyclodextrine dans 2 ml de méthanol. Dans un deuxième tube à essai en verre, 200 mg de cholestérol ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. Une portion de 0,45 ml de la solution de cholestérol a été ajoutée à la solution de cyclodextrine. Le mélange obtenu a été maintenu sous agitation pendant 24 h à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessiccateur.

I.2.3 Préparation de la solution TTH pour l'évaluation de la peroxydation des lipides

La solution de TTH est composée de(acide trichloracétique 15% (p/v) + acide thiobarbiturique 0,375% (p/v) dans l'acide chlorhydrique à 0,25N). La préparation de 100ml de l'acide chlorhydrique à 0.25 de normalité était comme suite : 2.053 ml de l'acide chlorhydrique 37%, (densité 1.2) ont été doucement rajoutés aux 25 ml de l'eau distillée, puis le volume a été complété avec l'eau distillée pour atteindre 100 ml. Pour préparer la solution de TTH, 100ml de HCl 0.25N ont été rajoutés aux 0.375g de l'acide thiobarbiturique et 0.15g de l'acide trichloracétique. La solution de TTH a été aliquotée (5ml/aliquote) et conservée à -20°C (Buege et Aust, 1978).

I.2.4 Récolte du sperme de l'épididyme

Trois testicules ont été récupérés à partir de 3 béliers adultes (race berbère). Immédiatement après l'abattage, les testicules ont été transportés à température ambiante (22 °C) au laboratoire de biotechnologies de reproduction au centre du recherche biotechnologique crbt constantine. Le sperme a été récolté par la méthode de rinçage

rétrograde comme rapporté par Martinez-Pastor et al. (2006) dans 1:30 h après récupération des testicules. En bref, l'épididyme et le canal déférent ont été disséqués et séparés du testicule, puis, la queue de l'épididyme et le canal déférent ont été isolés de l'ensemble de l'épididyme. Les vaisseaux sanguins superficiels ont été ponctionnés et leur contenu éliminés par rinçage et essuyage. Le sperme a été récupéré dans un tube en faisant une incision, au moyen d'une lame stérile, près de la jonction des parties, distale et proximale de la queue épидидymaire. Ensuite, le canal déférent a été cathétérisé avec une aiguille 22G émoussé et rincée avec 1 ml du dilueur (Tris sans jaune d'œuf et glycérol) chauffé (37 ° C), suivie d'une injection d'air pour récupérer une quantité maximale de sperme. Le volume, les mobilités (massale et individuelle) et la concentration du sperme collecté ont été évalués immédiatement après la collecte.

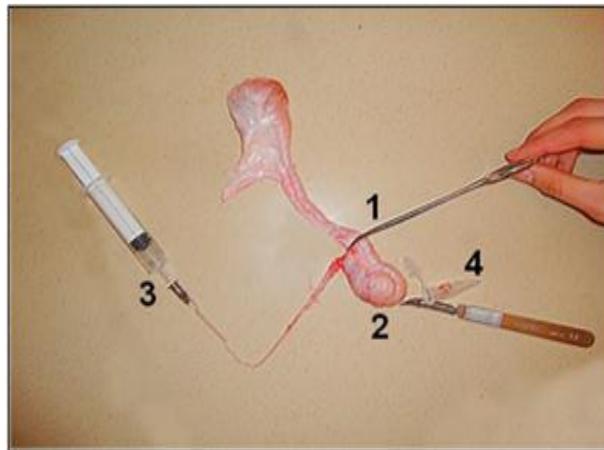


Figure 23: La récolte du sperme

I.2.4.1 Evaluation de la mobilité du sperme par le système CASA

Les différents paramètres de mobilité ont été évalués à l'aide d'un analyseur informatique du sperme (CASA : Computer Aided Sperm Analyser) (Sperm Class Analyser, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelone, Espagne). Pour faciliter la capture d'image, les échantillons ont été dilués par la milieu de base sans jaune d'ouf, glycérol et les complexes chimiques pour atteindre une concentration de $10\text{-}20 \times 10^6$ Spz/ml. 10 μl de chaque échantillon a été placé entre lame-lamelle préalablement chauffées (37°C). Lame-lamelle a été placée sous microscope à contraste de phase (microscope Nikon E200®-LED) muni d'une plaque chauffée (37°C) et les images ont été capturées à l'aide d'une caméra vidéo (appareil photo numérique Basler A312fc Allemagne) à un grossissement $\times 10$ (phase négative). Quatre séquences ont été numérisées et au moins 200 spermatozoïdes ont été analysés. Les réglages standards ont été fixés à 25 images /seconde, $20\text{-}90 \mu\text{m}^2$ pour la surface de la tête et $\text{VCL} > 10 \mu\text{m} / \text{s}$ pour classer un spermatozoïde comme mobile (Tamayo-Canul et al., 2011). Un spermatozoïde ayant VCL, entre 10 et $45 \mu\text{m} / \text{s}$ est lent, entre 45 et $75 \mu\text{m} / \text{s}$ est moyen, $> 75 \mu\text{m} / \text{s}$ est rapide. Les paramètres de mobilité mesurés sont: la mobilité totale (TM%) mobilité progressive (PM%), la linéarité (LIN%); vitesse curviligne (VCL $\mu\text{m}/\text{s}$); vitesse linéaire droite (VSL $\mu\text{m}/\text{s}$); vitesse de trajectoire moyenne (VAP $\mu\text{m}/\text{s}$); amplitude de mouvement latéral de la tête (ALH μm); fréquence de battement transversale (BCF Hertz). Mobilité totale (TM) a été défini comme étant le pourcentage de spermatozoïdes avec $\text{VCL} > 10 \mu\text{m}/\text{seconde}$, et la mobilité progressive (PM) est défini comme étant le pourcentage de spermatozoïdes avec $\text{VCL} > 25 \mu\text{m}/\text{seconde}$ et $\text{STR} > 80\%$ (Mortimer, 1997).

I.2.4.2 Analyse de la fonctionnalité de la membrane des spermatozoïdes

L'intégrité fonctionnelle de la membrane du sperme a été évaluée en utilisant le test de gonflement hypo-osmotique (HOST). Bref, 20 μl de sperme ont été mises en incubation avec 200 μl d'une solution hypo-osmotique 100 mOsM pendant 60 minutes. La solution hypo-osmotique est préparée en mélangeant 9 g de fructose et 4,9 g de citrate de sodium, dilué dans 1 litre d'eau distillée à 37°C . 10 Après l'incubation, 10 μl de semence ont été mis entre lame- lamelle puis, placé sous microscope optique à grossissement $\times 40$. Les spermatozoïdes possédant une queue enflée et enroulé étaient supposés avoir la membrane fonctionnelle. Au moins 150 spermatozoïde sont été pris en compte pour calculer le pourcentage de spermatozoïdes réagi (Bucak et al., 2009).

I.2.4.3 Test de peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été mesurée sur la base de concentration du malondialdéhyde (MDA). Le MDA, un produit final de la peroxydation des lipides, a été quantifié en utilisant le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode décrite par Buege et Aust (1978). Un millilitre de solution TTH (acide trichloracétique + acide thiobarbiturique 0,375% dans l'acide chlorhydrique 0.25N) a été ajouté au sperme (0.5ml). Le mélange a été bouilli pendant 15 minutes, puis refroidi dans un bain de glace. La réaction acide thiobarbiturique-MDA se manifeste par une couleur rose-orange. Après le refroidissement, la suspension a été centrifugée à 18 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite mis dans microplaque à 96 puits (200µl/puits). L'absorbance est mesurée à 532 nm à 25 °

Pour déduire la concentration de MDA de nos échantillons à partir de l'absorbance, nous avons tracé une courbe d'étalonnage à partir d'une solution MDA témoin. Nous avons dilué 0,0012 g MDA dans 100ml d'eau distillé, la concentration de ce mélange a été calculée et elle est de 38,27 nmole. A partir de cette solution, nous avons préparé 05 solutions à concentration connu qui sont résumé dans le tableau suivant :

Tableau 4: les concentrations de MDA pour tracer une courbe d'étalonnage (la solution a été rajoutée au solution de MDA pour atteindre 500µl puis un 1 ml de TTH a été rajouté).			
Concentration connu (nmole/ml)	Volume de la solution MDA (ul)	Volume de la solution A (ul)	Volume de TTH ajouté (ml)
19,12	500	0	1
9,56	250	250	1
4,78	125	375	1
2,39	63	437	1
1,204	32	468	1

Ensuite, nous avons mis ces préparation dans un bain marie à une température de 100°C pendant 15min, puis dans la glace pour stopper la réaction et centrifuger à 18000 tours pendant 10min. nous avons pris 200 ul du surnageant et le mettre dans la microplaque, l'absorbance est mesurée à 532 nm à 25 ° C.

I.2.4.4 Analyses statistiques

Chaque analyse de chaque traitement (mobilité, intégrité de la membrane et MDA) a été répétée au moins 3 fois (au minimum 600 spermatozoïdes ont été analysés/traitement). Pour

les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statview 4.02 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Les valeurs de chaque analyse ont été exprimées en moyenne \pm ES. Les variables utilisées à des fins de comparaison étaient les traitements utilisés (contrôle (CD-CHL), CD-CHL-VitE). Les différences entre les traitements ont été évaluées à l'aide d'une analyse de variance, ANOVA à un critère, suivie d'un test de *post hoc* Fisher. Les valeurs ont été considérées significatives lorsque $P < 0.05$.

II. Résultats

II.1.1 Mobilité et fonctionnalité de la membrane

La mobilité totale (TM) et la mobilité progressive (PM), les vitesses (VCL, VSL et VAP), ALH, BCF linéarité et l'intégrité de la membrane (HOST) de tous les échantillons analysés, après décongélation sont présentées dans la **Figure 24, 25, 26 et 27**.

Les résultats de l'intégrité de la membrane (HOST) a démontré aucune différence significative ($P \geq 0.05$) entre tous les milieux de conservation. Aucune différence significative ($P \geq 0.05$) en termes des paramètres de mobilité (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN et BCF) n'a été enregistrée entre tous les 2 milieux de conservation.

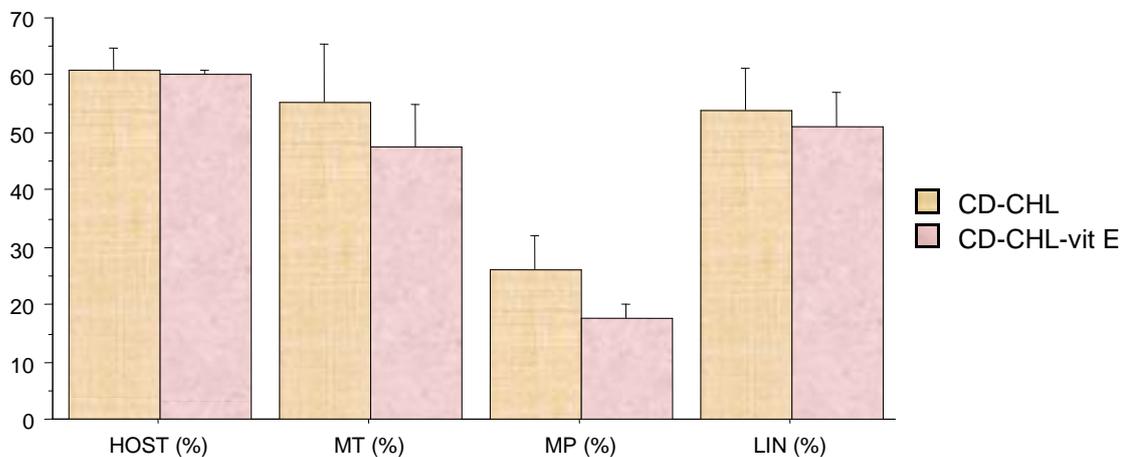


Figure 24: Pourcentages (Moyenne \pm ES) de l'intégrité de la membrane, la mobilité totale (MT), mobilité progressive (MP) et linéarité (LIN) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE

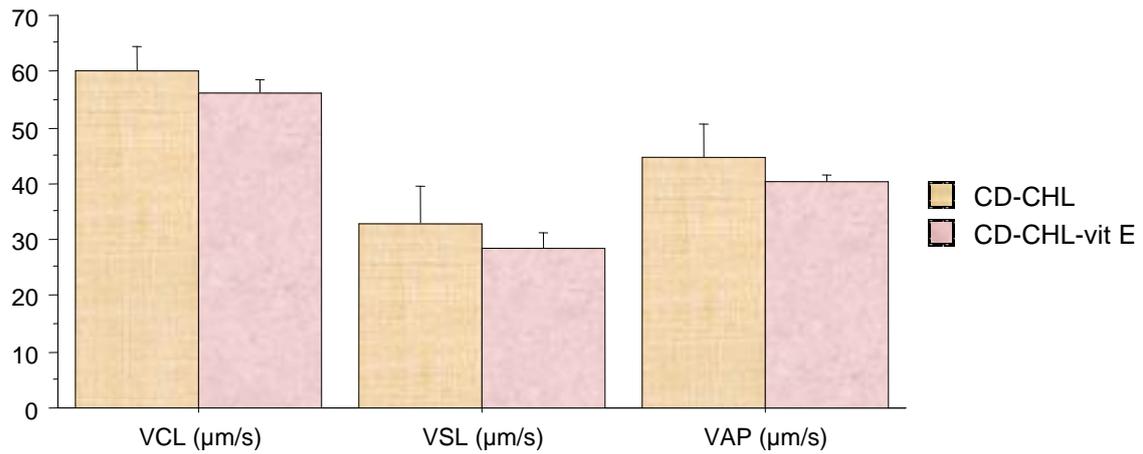


Figure 25: Vitesses des spermatozoïdes, VCL, VSL et VAP (Moyenne \pm ES) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.

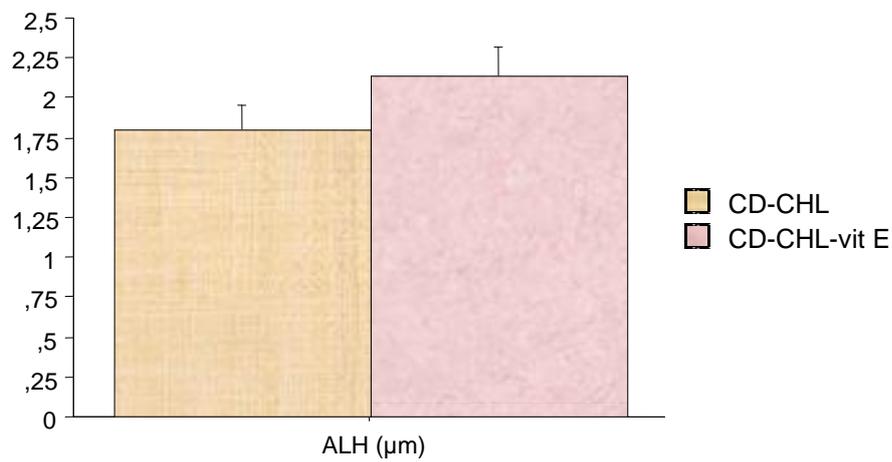


Figure 26: Amplitude latérale de tête (ALH) (Moyenne \pm ES) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.

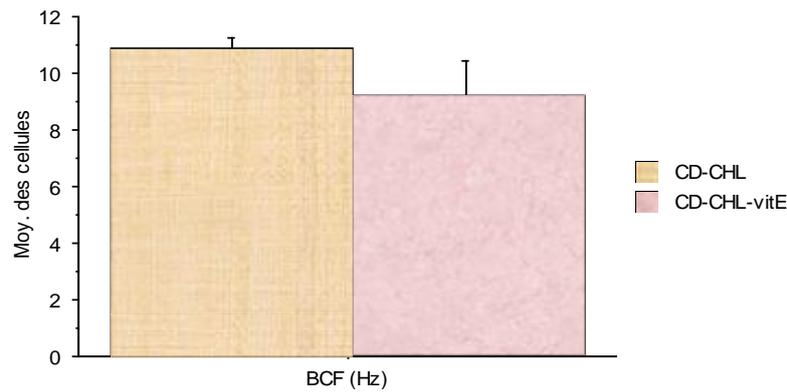


Figure 27: fréquence de battement de la tête (BCF) (Moyenne \pm ES) avant congélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.

II.1.2 Peroxydation des lipides

Les valeurs de l'absorbance de la solution témoin utilisé nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage en fonction ses concentrations connues du MDA. La courbe d'étalonnage est présentée dans **la figure 28**.

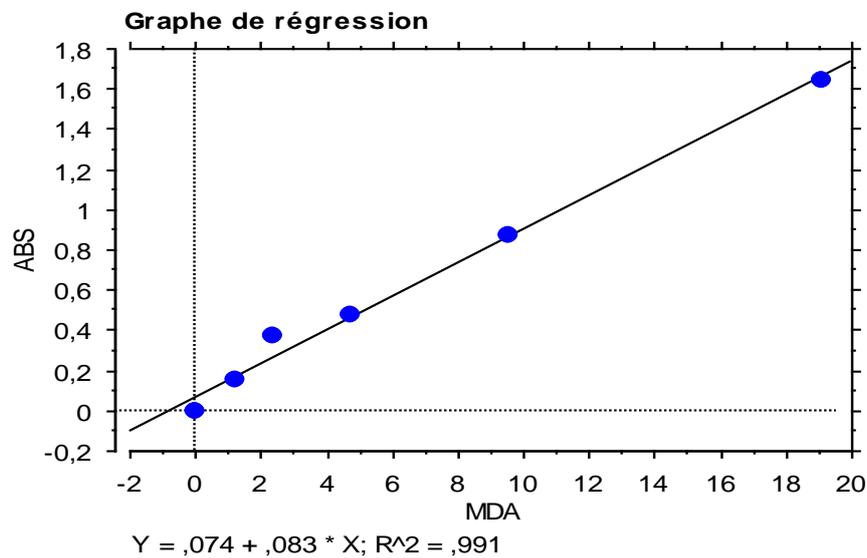


Figure 28: Courbe d'étalonnage de MDA (nmole)

Les résultats de la peroxydation des lipides exprimés par la quantité d MDA généré n'a montré aucune différence significative ($P \geq 0.05$) entre tous les milieux de conservation (Figure 29).

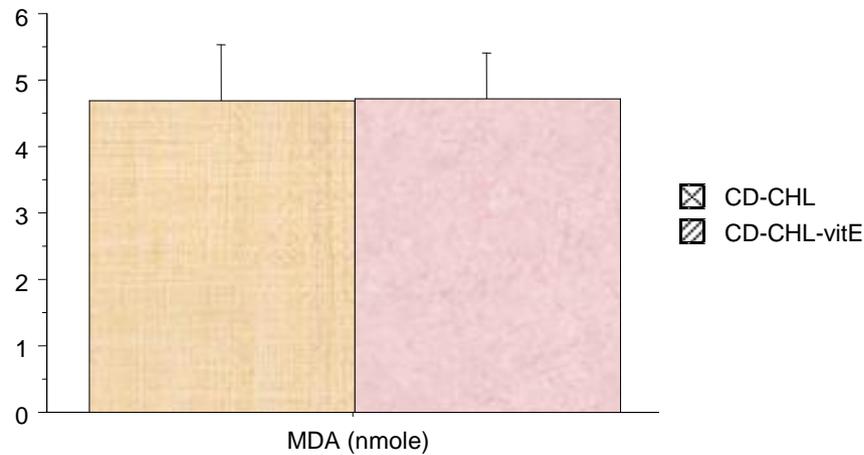


Figure 29: MDA (Moyenne \pm ES) (peroxydation des lipides) après décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (CD-CHL) et le groupe traité avec CD-CHL-VitE.

III. Discussion

L'objectif de cette expérimentation était d'explorer une nouvelle approche dans la préservation du sperme épидидymaire du bélier. L'approche expérimentale consistait en une protection simultanée contre le choc au froid et le stress oxydatif en utilisant le cholestérol et la vitamine E. Comme les deux molécules sont hydrophobes, leur solubilité dans le milieu de congélation était augmentée grâce à leur incorporation dans les cyclodextrines.

Il est bien établi que le cholestérol joue un rôle déterminant dans le maintien de la structure, de la fluidité et de la fonction de la membrane cellulaire dans l'intervalle des températures physiologiques (Aman et Pickett, 1987; Darin-Bennett et White, 1977). Au cours de la cryoconservation, la membrane du sperme est exposée aux dommages du choc au froid avec une déplétion significative du cholestérol affectant l'intégrité de la membrane cellulaire, la mobilité des gamètes et les résultats de fertilité. Il est bien établi, que la sensibilité du sperme des mammifères au choc au froid dépend de la proportion du rapport cholestérol / phospholipides dans la membrane cellulaire. Chez le bélier, ce rapport est plus faible (0.38) comparé au sperme humain (0.99), ce qui explique la plus grande susceptibilité de la membrane du spermatozoïde du bélier au choc au froid (Muiño-Blanco *et al.*, 2008). Il a été rapporté que rapportant des cyclodextrines chargées de cholestérol ont des effets positifs

sur la mobilité des gamètes et/ou l'intégrité de la membrane chez le bélier (Morrier *et al.*, 2004), taureau (Mocé et Graham, 2006; , 2004) et l'étalon (Moore *et al.*, 2005, Pamornsakda *et al.*, 2011). De ce fait, notre milieu de congélation de base comporte le complexe CD-CHL.

En raison de sa forte proportion en acides gras polyinsaturés, la membrane du spermatozoïde du bélier est la première cible des dommages causés par le stress oxydatif. Ainsi, la peroxydation lipidique est la principale lésion causée par les ERO dans la membrane du spermatozoïde, mais aussi dans d'autres composants cellulaires comme l'acrosome et le génome cellulaire (Peris *et al.*, 2007). La vitamine E dans la membrane cellulaire est la première molécule antioxydante luttant contre le stress oxydatif (Peris *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2001) en interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides et en piégeant les ERO (Niki *et al.*, 2004). En effet, La vitamine E protège les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque (Valk et Hornstra, 2000). Ce dernier constitue la majorité des AGPI chez le bélier. De plus, la vitamine E a été proposée comme composant structurel qui stabilise les membranes cellulaires contenant des lipides polyinsaturés (Diplock et Lucy, 1973; Fukuzawa *et al.*, 1977). Ceci est dû à sa localisation dans le noyau lipidique de la membrane et à sa liaison avec les phospholipides (Urano *et al.*, 1987, 1988). Néanmoins, une fois la vitamine E épuisée, la cellule devient vulnérable aux attaques des ERO, en particulier pendant le processus de congélation-décongélation (Peris *et al.*, 2007). Plusieurs travaux dans le domaine de la chimie, ont montré que la complexation de la Vitamine E avec les CDs n'affecte pas l'activité antioxydante de la Vitamine E tout en augmentant sa stabilité contre la photodégradation (López-nicolás *et al.*, 2014). Comme la vitamine E partage le même caractère hydrophobe avec le cholestérol, il a été émis l'hypothèse que le chargement de la vitamine E dans les cyclodextrines pourrait augmenter sa solubilité avec un impact positif sur la membrane cellulaire.

Dans le présent travail, la supplémentation du milieu de congélation de base (CD-CHL) par le complexe Cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-VitE) n'a pas un effet sur tout les paramètres étudiés par rapport au contrôle (CD-CHL), particulièrement la peroxydation des lipides. Ce résultat pourrait indiquer que le cholestérol a un effet antioxydant. En effet, il a été rapporté que le cholestérol est considéré comme un obstacle à la propagation des ERO (López-Revuelta *et al.*, 2007) et un protecteur contre le peroxyde d'hydrogène (Naseer *et al.*, 2015) responsable de la peroxydation des lipides.

IV. Conclusion

En conclusion, les résultats de l'expérimentation montrent que l'ajout de complexe CD-VitE au milieu de congélation à base de CD-CHL n'a pas amélioré la qualité du sperme in vitro, particulièrement la peroxydation des lipides. Cependant, d'autres études élargies sont nécessaires pour évaluer l'effet de complexe CD-Vit E.

Références bibliographiques

A

- * **Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S., 2014.** Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Mens. Health* 32, 1–17. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1
- * **Agnieszka Partyka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski., 2012.** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77, pp1497–1504
- * **Airton A-A., Dacheux J-L., Gerin Y.,(2012).** Insémination artificielle ovine. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. Editeur, presses academiques francophones.
- * **Aitken, R.J., Irvine, D.S., Wu, F.C., 1991.** Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164, 542–551. doi:10.1016/0020-7292(92)90986-S
- * **Aitken, R. J. and M. A. Baker (2006).** "Oxidative stress, sperm survival and fertility control." *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2): 66-9.
- * **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.
- * **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.
- * **Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173. doi:10.1016/S0737-0806(87)80025-4
- * **Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani, M., 2016.** The role of antioxidants in sperm freezing : a review. *Cell Tissue Bank.* doi:10.1007/s10561-016-9566-5

B

- * **Bakhach, J., Casoli, V et Guimberteau, JC. (2007).** La cryopréservation des tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547
- ***Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S., 2011.** Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet. Med. Int.* 2011, 1–7. doi:10.4061/2011/686137
- ***Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D., 2009.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10, 49–62. doi:10.1007/s10561-008-9081-4
- * **Baril G., Chemineau P., Cognié Y.,Guerin Y. et Leboeuf B. (1993).** Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO, Production et Santé Animale,83,Italy (Rome), 125p.
- ***Beckman, K.B., Ames B. N. (1998).** The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- ***Béguel, J.P., Huvet, A., Quillien, V., Christophe, L., Fabioux, C. (2013).** Study of the antioxidant capacity in gills of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157, 63-71.
- ***Bertiridige, D.J. (2000).** What's oxidative stress? *Métabolisme*, 49(2supp.&):3-8..
- Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC.
- ***Bilodeau, J.F., Chatterjee, S, Sirard, M.A., Gagnon, C.,2000.** Levels of antioxidant défenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 55, 282-288.
- ***Blackshaw Aw.,(1954).** the prvention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust j biol sci.* ; 7 :573-582.
- * **Bonnes, G., Desclaude.J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussisau, R., Le loc'h, A., Montmeas, L., Robin, G. et al. (2005).** Reproduction des animaux d'élevages. 2 ème Ed. Dijon : Educagri (Ed.): 407 p.

***Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariözkan, S., Ulutaş, P.A., 2009.** Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rumin. Res.* 81, 13–17.

doi:10.1016/j.smallrumres.2008.10.003

***Buege, J.A., Aust, S.D., 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6

***Burton, G. W. and K. U. Ingold (1984).** "beta-Carotène: an unusual type of lipid antioxydant." *Science* 224(4649): 569-73.

C

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

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

*** Chemmam, M., (2007).** Variation de l'ingestion et des performances chez la brebis « Ouled Djellal » sur pâturage : effet de la saison et de la complémentation. Thèse doctorat (Annaba) 167p.

***Chen H., Chow, P.H., Cheng, S.K., Cheung, A.L., Cheng, L.Y., O W.S., 2003.** Maie génital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J Androl*; 24, 704-711.

*** Chenoweth, P.J., Lorton, S.P., 2014.** *Animal andrology: theories and application.* CAB international, pp 595.

***Cohen, G. and P. Hochstein (1963).** "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* 2: 1420-8.

*** Colas, G., (1975).** Effects of initial freezing temperature, addition glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Repro.Fert*, 42, 277-285.

***Colas, G., (1980).** Variation saisonnière de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I - Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dévelop*, 20, 1789-1799.

***Cooper, T.G., 1986.** The epididymis, sperm maturation and fertilization. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. London Paris Tokyo, 291 pages. DOI: 10.1007/978-3-642-71471-9.

***Courbiere B., Baudot A., Maeoyer C., Salle B., Lornage J. (2009).** La vitrification : technique d'venir pour la cryoconservation ovarienne. *Bases physiques de cryobiologie*.

D

*** Dacheux, F., Dacheux, J-L., 2001.** L'épididyme et les glands annexes. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), *la reproduction chez les mammifères et l'Homme*, 290-315 pp. Coédition INRAEllipses

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

***Dadoune, J-P., Demoulin, A., (2001).** Structure et fonction du testicule. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), *la reproduction chez les mammifères et l'Homme*, 756-289pp. Coédition INRA-Ellipses.

*** Darin-Bennett, A., White, I.G., 1977.** Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470. doi:10.1016/0011-2240(77)90008-6

***Davi, G., G. Ciabattini, 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 Jonge, C.J., Barrat, C.L.R., 2006.** The sperm cell, Production , Maturation, Fertilisation and Generation. Cambridge university, 1ère edition, pp 372

***Derivaux, J., Ectors, F., (1989).** Reproduction chez les animaux domestiques. Editeur Academia 3ème édition, 1141p.

* **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.

***Diplock, A.T., Lucy, J.A., 1973.** The biochemical modes of action of vitamin e and selenium: A hypothesis. FEBS Lett. 29, 205–210. doi:10.1016/0014-5793(73)80020-1

* **Douet, D-G. N., 2000.** Congélation de sperme de mammifères, application aux antilopes. Thèse Docteur vétérinaire. Ecole nationale de Nantes 111P.

E

* **Eddy, E.M., 2006.** The spermatozoon. In physiology of reproduction, volume 1 (Knobli E., Neill J.D., Eds) pp 3-54, chapitre 1.3ème édition. Elsevier Academic Press Publicatione st. louis.M.O., USA.

* **Eduardo Villena, F., Jose Jimenez, R.M., Mendoza, E., Lopez, J.C., (2003).** Technicien en élevage. Editions Cultural, S.A Tome2, MADRID – Espagne, 226 p.

* **Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., Niemann, H., 2006.** Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. Theriogenology 66, 2160–2164.

***Eilts, B, E., (2004).** Male Theriogenology: Semen Evaluation. [Web]:
http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/male_index.htm.(05-05-2011).

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

***Ernster, L., Forsmark, P., Nordenbrand, K., 1992.** The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. Biofactors 3, 241–248

F

* **Fantodji, A., Soro, D., TreYavo, M., (2009).** Caractéristiques spermatiques et maturité des gonades des aulacodes mâles d'élevage en Côte d'Ivoire. *Revue Méd. Vét.*, 160, 1, 44-53.

* **Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., 2007.** Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 81–89. doi:10.1007/s1

***Flipse R-J., Patton S., Almquist J-O.(1954).** Diluents for bovine semen. III. Effect of lactenin and of lactoperoxydase upon spermatozoa viability. *J dairy sci.* 41 :1205-1211.

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

***Fukuzawa, K., Hayashi, K., Suzuki, A., 1977.** Effects of α -tocopherol analogs on lysosome membranes and fatty acid monolayers. *Chem Phys Lipids* 18, 39–48

G

***Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Actual. Chim.* Novembre, 91–96.

***Gregory, E. M., S. A. Goscin and I. Fridovich (1974).** "Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote." *J Bacteriol* 117(2): 456-60.

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

***Guillot J., (2002).** La calcification testiculaire chez les boucs de centres d'insémination artificielle : étude clinique et répercussion sur la reproduction de semence. Thèse Docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire Toulouse 113p.

H

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

***Hafez E.S.E.,(1974)**. Reproduction in farm animals. 3ème édition. Lea et Fabiger, 480p.

***Hafez Ese, (1993)**. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In : reproduction in farm animals Philadelphia 6th edition lea & febigier. 515-525.

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

***Holt W.V., (2000)**. Basics aspects of frozen storage of semen. Animal reproduction science 62, 3-22

J

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

***Jones Rc.,(1969)**. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37, 5, and -79°C. *aut j biol sci.* 22 : 983-94

K

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

***Karow, A.M., Critser, J.K., 1997**. Reproductive tissue banking : scientific principles. Edit, ACADEMIC PRESS, page 472.

***Koontz, J.L., Marcy, J.E., O'Keefe, S.F., Duncan, S.E., 2009**. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants alpha-tocopherol and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1162–1171. doi:10.1021/jf802823q

L

* **Lacroix, M., (1976)**. Circuit physique de la semence ovine, 81-93 pp. In Insémination artificielle ovine Editions SEARLE-PARIS, 105 P.

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

***Li, T.K., 1975.** The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. Biol Reprod. 12, 641-646.

***López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F., 2014.** Cyclodextrins and Antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54, 251-76. doi:10.1080/10408398.2011.582544

***López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., García-Montero, A.C., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M., 2007.** Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. Free Radic. Biol. Med. 42, 1106–1118. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.

***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.

M

*** Manafi, M., 2011.**Artificial insemination in farm animals.InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 312 pages. ISBN:978-953-307-312-5.

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

***Martin Ica., (1966).** Diluents for the preservation of ram spermatozoa.I- Diluents used at 37°C and 5°C, containing casein ; Aust J Biol Sci. 19 :645-53.

***Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., Paz, P. De, Anel, L., 2006.** Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. Theriogenology 65, 471–485. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.045

***Mayer. DT, Lasley. JF ; 1945.** The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities and fertilising capacity of mammalian spermatozoa. J Anim Sci ; 4 :261.

***Michelat J., Chauvier G.,** Encyclopedie Vétérinaire. Edition Vigot Frères-Tome 2. PARIS, 767 p.

***Mies Filho A., (1982).** Reproducao dos animais e inseminacao artificial. 2° volume. Porto alegre, sulina. 5a edicao, 783p.

***Mocé, E., Graham, J.K., 2006.** Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. J. Anim. Sci. 84, 826–33. doi:/2006.844826x.

***Molina F.C., Evans G., Maxwell W.M.C.,(1994).** Effect of polyols on the post thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. Theriology, 42 ,15-23.

*** Molina F.C., Evans G., Quintana-Casares P.I., Maxwell W.M.C.,(1994).** Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim. Repro. Sci, 36, 2, 113-122.

***Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology 51, 241–249.
doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.004

***Morrier, A., Thériault, M., Castonguay, F., Bailey, J., 2004.** Effect of cholesterol loaded methyl-b-cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, July 31–August 4, 2004, 239 (Abstract 636).

***Mortimer, S.T., 1997.** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals 3, 403–439.doi: 10.1093/humupd/3.5.403

***Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., 2008.** Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod. Domest. Anim. 43, 18–31. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x

N

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

***Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, I., Ceylan, A., Boyacıoğlu, M., Kum, C., 2015.** Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against

hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology* 71 ,18-23.
doi:10.1016/j.cryobiol.2015.06.007

*** Nichi, M., Goovaerts, I.G.F., Cortada, C.N.M., Barnabe, V.H., De Clercq, J.B.P., Bols, P.E.J., 2007.** Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro Fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 67, 334–340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.002>

***Niki, E., Noguchi, N., Niki, E., Noguchi, N., 2004.** Dynamics of Antioxidant Action of Vitamin E. *Acc. Chem. Res.* 37, 45-51. doi:10.1021/ar030069m

O

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

***O'shea T., Walles R-G.,(1966).** Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. *Aust J Biol Sci.* 19 :871-82.

*** O'shea T., Walles R-G.,(1967).** The metabolism of ram, bull, dog and rabbit spermatozoa after cooling to 5°C. *Aust J Biol Sci.* 20 :447-60.

P

***Palasz A.T., Mapletorft R.J.,(1996).** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes : Recent advances. *Biotechnologie advances*, vol. 14, no. 2, 127-149.

***Pamornsakda, T., Pojprasath, T., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., 2011.** Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology* 63, 90–95. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.05.006

***Partyka Agnieszka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski., 2012.** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77, pp1497–1504.

***Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L., 2007.** Impact of cryo-preservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74, 878-892. doi: 10.1002/mrd.20686

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

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

***Pons-Rejraji. H, B. Sion, F. Saez, F. Brugnol, L. Janny et. Grizard., 2009.** Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, pp 529–535.

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

R

***Robertson. L, Watson. PF, 1987.** The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. *Animal Reprod Sci.* 15 :177-187.

*** Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003.** Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155–171. Doi :10.1016/S0921-4488(03)00038-5

S

*** Sagot, L., (2009).** Conduite de la reproduction. Insémination animale : du bélier à la paillette. Institut de l'élevage- CIIRPO. INRA Paris. [Web]: www.inst-elevage.asso.fr. (06/05/2011).

*** Salamon S. et Maxwell W.M.C. (1995).** Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37, 185-249.

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

***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.

***Singh M.P., Sinha A.K., Sinsh B.K., (1995).** Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43,1047-1053.

***Surai, P., Fujihara, N., Speake, B., Brillard, J., Wishart, G., Sparks, N., 2001.** Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen - review-. *Asian.Aust. J. Anim. Sci.* 14, 1024-1050.

***Surai,P.,Kostjuk, I.,Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., Ionov, I.,Kutz, E., 1998.** Effect of Vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 64 (1–3), 119–132

T

***Tamayo-Canul, J., Alvarez, M., López-Urueña, E., Nicolas, M., Martinez-Pastor, F., Anel, E., Anel, L., De Paz, P., 2011.** Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 76–82. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.04.011

***Tappel, A. L. (1972).** "Vitamin E and free radical peroxidation of lipids." *Ann N Y Acad Sci* 203 : 12-28.

*** Thibault C, Levasseur, MC. (2001).** La reproduction chez les mammifères et l’homme. Paris: Eddition INRA, 928p

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

***Tramer, F., F. Rocco, F. Micali, G. Sandri and E. Panfili (1998).** Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 59(4): 753-8.

* **Tulsani, D., 2003.** Introduction to mammalian reproduction. Springer-science. 1ère édition, pp 403.

U

***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,

***Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987.** Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 146, 1413–1418

***Urano, S., Yano, K., Matsuo, M., 1988.** Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α -tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 469–475

V

* **Vaissaire, J.P. (1977)** Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. Maloine S.A. Ed., Paris: 457 p.

***Valk, E.E., Hornstra, G., 2000.** Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 31-42.

***Vamecq, J., Vallee, L., Storme, L., Gele, P., Bordet, R., 2004.** Key players in oxidative stress 18, 16-23.

***Vishwanath, R., Shannon, P., 2000.** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62, 23-52.

W

***Wang H. J., Pan Y. X., Wang W.Z., Zucker I; H., Wang W., (2009).** NADPH Oxidase Derived Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Modulates the Exercise Pressor.

***Watson. PF, 1981.** The role of lipid protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *J Reported fertil.* 481-492.

***Watson. PF, Martin. CA, 1975.** The influence of some fraction of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. Aust Biol Sci, 28 :145-152.

Z

***Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F. a., Tirmenstein, M. a., Fariss, M.W., 2001.** Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. Chem. Biol. Interact. 138, 267–284. doi:10.1016/S0009-2797(01)00278-2.

Résumé

Durant le processus de conservation à basse température à -196°C le sperme est plus exposé au dommage oxydatif qui est délétère pour les spermatozoïdes. La protection du sperme ovin contre le stress oxydatif durant la conservation peut être une méthode efficace pour améliorer la qualité du sperme. L'objectif de cette étude est d'étudier les impacts des complexes cyclodextrine-cholestérol, cyclodextrine-cholestérol-vitamine sur la qualité du sperme cryoconservé après processus de congélation-décongélation.

De ce fait, nous avons collecté le sperme du bélier en utilisant la méthode du rinçage épидидymaire. Le sperme collecté a été évalué, puis dilué avec pour qu'il soit conservé dans deux milieux différents, le premier milieu à base de CD-CHL, le deuxième à base de CD-CHL-Vit E, puis nous avons congelé nos échantillon à -196°C .

Après décongélation, la motilité des spermatozoïdes et l'intégrité membranaire (HOST) ont été évalué avec le CASA, ainsi que la peroxydation des lipides en procédant au dosage du MDA (malonaldéhyde).

Nos résultats indique que le cholestérol a un effet antioxydant sur le sperme, alors que l'ajout du complexe CD-vit E avec cèle ci n'a aucun effet significatif.

Nous concluons que la supplémentation du complexe CD-vit E au milieu de conservation à base de CD-CHL n'améliore pas la qualité du sperme conservé, cependant, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité du complexe CD-vit E.

Mots clés : bélier, sperme épидидymaire, conservation, stress oxydatif, cyclodextrine, cholestérol, vitamine E.

Abstract

During the low temperature storage process at -196°C the sperm is more exposed to oxidative damage which is deleterious to the sperm. Protecting sheep semen from oxidative stress during storage can be an effective method of improving semen quality. The objective of this study is to study the impacts of cyclodextrin-cholesterol, cyclodextrin-cholesterol-vitamin complexes on the quality of cryopreserved sperm after the freeze-thaw process.

Therefore, we collected the ram's semen using the epididymal flushing method. The collected sperm was evaluated, then diluted with so that it was stored in two different media, the first medium based on CD-CHL, the second based on CD-CHL-Vit E, then we frozen our samples at -196°C .

After thawing, sperm motility and membrane integrity (HOST) were assessed with CASA, as well as lipid peroxidation by performing the MDA (malonaldehyde) assay.

Our results indicate that cholesterol has an antioxidant effect on semen, while the addition of CD-vit E complex with it has no significant effect.

We conclude that supplementation of CD-vit E complex to CD-CHL-based storage medium does not improve the quality of stored sperm, however, further studies are needed to assess the efficacy of CD-vit E complex.

Key words: ram, epididymal sperm, preservation, oxidative stress, cyclodextrin, cholesterol, vitamin E.

المخلص

أثناء عملية التخزين في درجات حرارة منخفضة عند -196 درجة مئوية، تكون الحيوانات المنوية أكثر عرضة للتلف التأكسدي الذي يلحق الضرر بالحيوانات المنوية. يمكن أن تكون حماية السائل المنوي للأغنام من الإجهاد التأكسدي أثناء التخزين طريقة فعالة لتحسين جودة السائل المنوي. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة تأثير مركبات سيكلودكسترين-كوليسترول، سيكلودكسترين-كوليسترول-فيتامين على جودة الحيوانات المنوية المحفوظة بالتبريد بعد عملية الذوبان بالتجميد.

لذلك، قمنا بجمع السائل المنوي للكباش باستخدام طريقة التنظيف البريخي. تم تقييم الحيوانات المنوية التي تم جمعها، ثم تم تخفيفها بحيث يتم تخزينها في وسطين مختلفين، الوسيط الأول يعتمد على CD-CHL، والثاني على أساس CD-CHL-Vit E، ثم قمنا بتجميد عيناتنا عند -196 درجة مئوية.

بعد الذوبان، تم تقييم حركة الحيوانات المنوية وسلامة الغشاء (HOST) باستخدام CASA، وكذلك بيروكسيد الدهون عن طريق إجراء مقايسة (MDA (malonaldehyde).

تشير نتائجنا إلى أن الكوليسترول له تأثير مضاد للأكسدة على السائل المنوي، في حين أن إضافة مركب CD-vit E معه ليس له تأثير معنوي. نستنتج أن مكملات مجمع CD-vit E إلى وسيط التخزين المستند إلى CD-CHL لا يحسن جودة الحيوانات المنوية المخزنة، ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتقييم فعالية مركب CD-vit E.

الكلمات المفتاحية: الكباش، الحيوانات المنوية البريخية، الحفظ، الإجهاد التأكسدي، السيكلودكسترين، الكوليسترول، فيتامين هـ.