

UNIVERSITE DE BLIDA1



1028THV-1

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

Intitulé

**CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE :**

**« EFFET DU TRAITEMENT AVANT CONGELATION AU CLC  
SUR LES PARAMETRES DE MOBILITE DE LA SEMENCE  
REANIMEE »**

Présenté par

**LEDRA Narimane Nesrine**

**Le jury**

**ADEL Djallel, MAA, ISV/UnivBLIDA1**

**Président**

**KALEM Ammar, MAA, ISV/UnivBLIDA1**

**Examinateur**

**BELALA Rédha, MAA, ISV/UnivBLIDA1**

**Promoteur**

**YAHIMI A/El-Krim, MAA, ISV/UnivBLIDA1**

**Co-Promoteur**

Promotion 2014-2015

## Remerciements

*Avant de commencer la présentation de ce travail, je remercie d'abord ALLAH et Je profite de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements pour mon grand et respectueux professeur BELALA Rédha d'avoir accepté de m'encadrer pour mon projet de fin d'études, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.*

*Je tiens à remercier aussi le Pr Mokrane IGUEROUADA de l'université de Bejaia pour: les complexes CLC et autres traitements, l'analyseur informatique de semence.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et toutes mes pensées de gratitude à Dr Adel Djallel et KALEM Ammar de m'avoir honoré en acceptant de juger mon modeste travail.*

*Mes remerciements vont aussi à Dr.Lafri, Dr. kaydi et tous les ingénieurs du LBRA.*

*Veillez trouver ici le témoignage de mon respect le plus profond pour Dr. Yahimi.*

*Mes remerciements à ma tante qui m'a accompagné de près durant tout ce travail, pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce projet.*

*Mes remerciements vont aussi à tous mes professeurs, enseignants et toutes les personnes qui m'ont soutenus jusqu'au bout, et qui n'ont pas cessé de me donner des conseils très importants en signe de reconnaissance.*

# Dédicaces

*Que ce travail témoigne de mes respects :*

*A mes parents : Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*A mes très chères sœurs LILIA et LIZA en témoignage de l'attachement de l'amour et de l'affection que je porte pour elles.*

*A mon cher frère AMINE et son épouse IMENE et leurs petits (NADA, RAZANE et YUCEF).*

*A mon cher mari MOHAMED I.*

*A mes camarades ABDERRAHMANE et IMED qu'ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.*

*A tous mes professeurs : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.*

*A tous mes amis : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

## ملخص

إن هذا البحث يتمثل في اختبار فعالية علاج ما قبل التجميد المطبق على مني الكليبات بإضافة مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين، وذلك عن طريق تحليل معايير التحرك بواسطة جهاز التحليل الحاسوبي بعد إزالة التجميد (الإنعاش).

لقد تم تقييم ثلاثة جرعات علاجية مختلفة (5 ملغ / 2.5 ملغ / 1.25 ملغ لكل 100 مليون حيوان منوي من مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين) بهدف الحصول على الجرعة المناسبة للعلاج. بعد ذلك تم تقييم ثلاثة علاجات مختلفة و مقارنتها فيما بينها و مع الشاهد و هي كالتالي: العلاج بإضافة مادة السيكلودكسترين الغير مركبة (MβCD : Test2)، العلاج بإضافة مادة الكوليسترول الغير مركب (Cholestérol : Test3) و أخيرا العلاج بإضافة مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين (CLC : Test4).

### أظهرت نتائج هذا البحث ما يلي:

- إن جرعة 5 مع لكل 100 مليون حيوان منوي من مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين (CLC : Test4) أعطت أحسن النتائج بالنسبة لمعايير تحرك الحيوانات المنوية بعد الإنعاش مقارنة بالجرعات الخفيفة الأخرى
- إن علاج ما قبل التجميد المطبق على مني الكليبات بإضافة جرعة 5 مع لكل 100 مليون حيوان منوي من مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين و كذا إضافة مادة الكوليسترول الغير مركب لم تمكن من ادخال أي تحسين قطعي إحصائيا بالمقارنة مع الشاهد على معايير التحرك المراقبة بعد الإنعاش.
- إن علاج ما قبل التجميد المطبق على مني الكليبات بإضافة مادة "السيكلودكسترين الغير مركبة" (MβCD : Test2) قد أظهر تحسينا في جميع معايير التحرك المدروسة بعد الإنعاش و ذلك بشكل قطعي إحصائيا بالمقارنة مع الشاهد، و كذلك بالمقارنة مع كلا العلاجين سابقين الذكر.

الكلمات-المفتاح: مني الكليبات - التجميد - العلاج - السيكلودكسترين - الكوليستيرول - مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين - جهاز التحليل الحاسوبي.

## RESUME

Le présente travail consiste en une évaluation de l'efficacité du traitement avant congélation de la semence canine par le cholestérol complexé aux cyclo-dextrines (CLC) au moyen de l'analyse des paramètres de mobilité par système informatique après réanimation de la semence.

Trois concentrations de traitement au CLC (5mg, 2.5mg et 1.25mg/100 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes) ont été évaluées et comparées entre elles à la recherche de la concentration optimale. Une fois la concentration optimale définie, trois traitements différents ont été évalués et comparés entre eux et au contrôle à savoir les cyclo dextrines seules non complexées (Test2 : MβCDs), le cholestérol non complexé (test3 : Chl) et le cholestérol complexé au cyclo-dextrines (Test4 : CLC).

Les résultats ont montré que :

- La concentration de traitement au **CLC de 5 mg/100x10<sup>6</sup>** spermatozoïdes donne les meilleurs résultats en matière de paramètres de mobilité de la semence canine réanimée comparée aux concentrations plus faibles (2.5 mg et 1.25 mg/100x10<sup>6</sup> spermatozoïdes).
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec le cholestérol complexé aux cyclo-dextrines (CLC) à la concentration de 5 mg / 100 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes ainsi que le traitement avec le cholestérol libre non complexé aux cyclo-dextrines n'apportent aucune amélioration statistiquement significative par rapport au contrôle des paramètres de mobilité de la semence canine réanimée.
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec les méthyl béta-cyclo-dextrines seules non complexées (MβCDs) améliore de façon statistiquement significative (P<0.05) par rapport au contrôle et aux autres traitements évalués les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée.

**Mots-clés : Semence canine – Congélation – Traitement – Cyclo-dextrines – Cholestérol – CLC - Analyseur informatique.**

## ABSTRACT

The present work consist of an efficacy evaluation of pre-freezing treatment of dog sperm with Cholesterol-preloaded-Cyclodextrins (CLC) by the mean of analysis of motility parameters performed with CASA (Computerized Aided Sperm Analysis) after thawing.

Three CLC concentrations (5mg, 2.5mg et 1.25 mg/100x10<sup>6</sup> spz) have been evaluated and compared to find the optimal concentration. Once the latter aim achieved, three treatments have been evaluated and compared to the control: Methyl  $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ -CDs = test 2) cholesterol (chl : test 3) cyclodextrin pre-loaded with cholesterol (Test4 : CLC).

Results showed that:

- The high concentration (5mg CLC/100 x 10<sup>6</sup> spz) gave the best results of motility parameters of canine semen frozen-thawed compared to low concentrations (2.5 mg and 1.25 mg CLC/100 x 10<sup>6</sup> spz).
- Pre-freezing treatment of dog semen with both CLC ( 5 mg / 100 x 10<sup>6</sup> spz) and free cholesterol did not show any significant improvement of motility parameters of thawed god semen.
- Pre-freezing treatment of dog semen with methyl beta-cyclodextrins alone without cholesterol (M $\beta$ CDs) showed a statistically significant (P<0.05) improvement of motility parameters of thawed god semen, compared to untreated control and to two other evaluated treatments.

**Key-words : Canine semen – freezing – treatment – Cyclo-dextrins – Cholestérol – CLC – CASA.**

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure ou Tableau	Titre	Page
Figure n° 01 :	Representation Schématique d'un spermatozoïde	
Figure n° 01 :	Representation of VCL means per treatment.	27
Figure n° 02 :	Representation of VSL means per treatment.	28
Figure n° 03 :	Representation of VAP means per treatment.	29
Figure n° 04 :	Representation of ALH means per treatment.	30
Figure n° 05 :	Representation of BCF means per treatment.	31
Tableau n° 01 :	Description des trois phases de l'éjaculat du chien	
Tableau n° 01 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (VCL) of canine semen as measured by CASA.	27
Tableau n° 02 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (VSL) of canine semen as measured by CASA.	28
Tableau n° 03 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (VAP) of canine semen as measured by CASA.	29
Tableau n° 04 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (ALH) of canine semen as measured by CASA.	30
Tableau n° 05 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (BCF) of canine semen as measured by CASA.	31
Tableau n° 06 :	Least square means ( $\pm$ SEM) for post thaw parameters (VCL, VSL, VAP, ALH and BCF) of canine semen as measured by CASA.	31

## LISTE DES ABREVIATIONS

CASA	Computer Aided Sperm analyser
VCL	Velocity Curvilinear
VSL	Velocity Straight line
VAP	Velocity average Pathway
ALH	Amplitude of Lateral Head Displacement
BCF	Beat Cross Frequency
TRIS	Tri-hydroxy-méthyl-amino méthane
CDs	Cyclo dextrines
CLC	Cholesterol-loaded-cyclodextrins
SOD	Superoxyde Diosmutase
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
ROS	Reactive Oxygen Species
PeniG	Penicilline G
DHS	Dihydrostreptomycine

## TABLE DES MATIERES

Remerciements .....	2
DEDICACES .....	3
ملخص .....	4
RESUME .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	8
TABLE DES MATIERES .....	9
INTRODUCTION .....	11
REVUE DE LA LITTERATURE .....	13
1. La semence canine .....	14
1.1. Caractéristiques générales de la semence canine: .....	14
1.2. Composition de la semence canine .....	15
1.2.1. Le spermatozoïde .....	15
1.2.2. Le liquide séminal .....	15
2. Evaluation de la semence canine. ....	16
2.1. Les examens de routine : .....	16
2.1.1. Le spermogramme .....	16
2.1.2. Le spermogramme : .....	17
2.2. L'analyse informatique de la semence .....	18
3. La cryoconservation de la semence canine .....	19
3.1. Définition .....	19
3.2. Objectifs de la cryoconservation .....	19
3.3. Le dilueur .....	20
3.3.1. Définition .....	20
3.3.2. Rôle et caractéristique du dilueur (19) .....	20
3.4. Les étapes de la congélation .....	20
3.4.1. Centrifugation .....	20

3.4.2. La dilution .....	20
3.4.3. L'équilibration.....	20
3.4.4. Le conditionnement.....	21
3.4.5. La congélation .....	21
3.4.6. Le stockage .....	21
3.4.7. La décongélation .....	21
4. Le traitement de la semence .....	21
4.1. Effet du Cholestérol et des Cyclo-dextrines .....	22
4.2. Effet de la concentration de traitement en CLC.....	23
PARTIE EXPERIMENTALE .....	24
INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	25
MATERIELS ET METHODES : .....	26
1. Animaux .....	26
2. Récolte et évaluation initiale de l'éjaculat : .....	26
3-Préparation des dilueurs et traitement de la semence : .....	27
3.1. Préparation du complexe cyclo dextrines - cholestérol.....	27
3.2. Préparation de la solution de traitement.....	28
3.3. Traitement de la semence.....	28
4-Technique de congélation et de décongélation : .....	29
5. Analyse informatique de la semence .....	30
6. Analyse statistique.....	30
RESULTATS .....	32
DISCUSSION.....	40
Introduction .....	40
CONCLUSION .....	44
REFERENCES .....	45

## INTRODUCTION

Avec l'avènement des techniques de reproduction assistée chez les carnivores domestiques et sauvages, la conservation de la semence est devenue une technique importante employée abondamment pour franchir les limitations de la reproduction naturelle et surmonter les problèmes d'infertilité chez le mâle. C'est aussi une méthode pour une large diffusion des gènes à partir des mâles reproducteurs de haute valeur génétique et également de préservation des espèces menacées d'extinction.

La stabilité de la membrane plasmique du spermatozoïde semble être une condition sine qua non au succès de ces procédés de conservation de la semence canine. En effet, les procédés de conservation et notamment les cycles de congélation-décongélation provoquent des changements dans l'architecture de la membrane plasmique des spermatozoïdes capables d'affecter la fonctionnalité de certaines protéines membranaires. La déplétion de ces dernières peut compromettre la progression adéquate du spermatozoïde dans le tractus femelle et par conséquent sa capacité fertilisante (26).

Le cholestérol est le composant majeur de la membrane plasmique du spermatozoïde qui a le rôle essentiel dans cette stabilité. Récemment, il a été montré que des niveaux élevés en cholestérol (Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin) introduits dans la membrane plasmique du spermatozoïde bovin avant sa congélation permettent d'améliorer considérablement sa survie après décongélation (30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42).

Ainsi, pour prendre en charge le problème de la stabilité membranaire, un traitement avant congélation de la semence canine au cholestérol est envisageable. Cependant, le cholestérol est une molécule lipophile non soluble dans le milieu de conservation ou la solution de traitement.

Les Cyclo-dextrines qui sont des oligosaccharides cycliques obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon, ont des facultés de capter les molécules lipophiles et de les solubiliser en milieux aqueux par la formation de complexe d'inclusion de cette substance. Elles possèdent une face externe hydrophile et des sites internes hydrophobes capable d'encapsuler des composés hydrophobes comme le cholestérol (16). Elles vont agir comme un excipient et les molécules complexées comme des principes actifs.

Il est rapporté dans la littérature que ce complexe d'inclusion du cholestérol aux cyclo-dextrines « CLC » est capable d'améliorer la cryosurvie pendant la réfrigération et la congélation du sperme chez plusieurs espèces de mammifères (30, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42), Cependant, il n'y a pas eu jusqu'aujourd'hui de travaux relatifs à l'effet du cholestérol « CLC » sur la congélation du sperme canin.

En matière de concentration de traitement du CLC, la littérature signale plusieurs concentrations efficaces pour diverses espèces animales variant entre 1,25 et 5 M par  $100 \times 10^6$  spermatozoïdes (16). Comme le traitement au CLC n'a jamais été tenté chez l'espèce canine, il est force de constater que le facteur concentration de traitement ne fût non plus jamais étudié.

Sur la base de tout ce qui précède, le présent travail consiste à:

- Comparer trois concentrations différentes de traitement au CLC (1.25, 2.5 et 5 M /  $100 \times 10^6$  spermatozoïdes).
- Évaluer l'effet du traitement de la semence canine au CLC avant congélation sur les paramètres de mobilité après réanimation en comparant le CLC au cholestérol seul (Chl) et aux cyclo-dextrines seules ( $M\beta CD$ ).

# **REVUE DE LA LITTERATURE**

## 1. La semence canine

La semence canine est un liquide qui contient des spermatozoïdes (gamètes male) et des sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux sécrétions se mélangent lors de l'éjaculation (2).

### 1.1. Caractéristiques générales de la semence canine :

L'éjaculat du chien est un liquide blanchâtre, dont le volume dépend de la race et de l'individu; il varie d'un à quatre-vingt millilitres (3). Il se compose de trois fractions qui diffèrent dans leur origine, leur volume et leur composition.

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (4)

	ORIGINE	ASPECT	VOLUME	PH	COMPOSITION
<b>PHASE PRE-SPERMATIQUE</b>	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 -6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes  + Liquide prostatique
<b>PHASE SPERMATIQUE</b>	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 ml	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes  + Sécrétion épидидymaire
<b>PHASE POST-SPERMATIQUE</b>	Prostatique	Clair	4 à 30 ml et plus	6.5 -7.0	+ Très rare spermatozoïdes  + Liquide prostatique

## 1.2. Composition de la semence canine

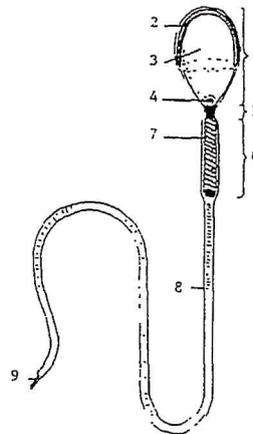
### 1.2.1. Le spermatozoïde

#### 1.2.1.1. Définition.

Le spermatozoïde est le gamète mâle. Il mesure entre 62 et 66  $\mu\text{m}$ ; sa queue mesure 55  $\mu\text{m}$ . (4). C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. Il présente plusieurs différences comparant aux cellules somatiques. Par exemple, la teneur en eau des cellules somatiques est très élevée à celle des spermatozoïdes. Ceci explique la relative pauvreté des spermatozoïdes en cytoplasme et avec le haut degré de condensation de la chromatine (5).

#### 1.2.1.1. Description du spermatozoïde

Figure n° 01 : Représentation Schématique d'un spermatozoïde (d'après Adoue [1])



Légende : 1 : tête - 2 : acrosome - 3 : noyau - 4 : centriole - 5 : col - 6 : pièce intermédiaire - 7 : mitochondries - 8 : pièce principale - 9 : pièce terminale.

### 1.2.2. Le liquide séminal

Le liquide séminal représente plus de trois quarts du volume de l'éjaculat. Il est sécrété par les glandes sexuelles accessoires (prostate et les glandes de littéré). Certains éléments composant le liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin et d'autres sont produits par les glandes sexuelles (2).

La phase prostatique est la phase liquidienne du sperme qui assure les rôles de véhicule, de protection (action bactériostatique, et contre les ions superoxydes libérés par les

spermatozoïdes mourants), de dilution et enfin de nutrition. La phase urétrale secrétée par les glandes de Littre qui sont moins développées.

## **2. Evaluation de la semence canine.**

Afin d'estimer la fertilité du mâle il faut évaluer la qualité de la semence (6). L'évaluation de la semence fraîche renseigne sur le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée-réanimée renseigne sur les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation (7).

Il existe deux niveaux d'évaluation de la qualité spermatique à savoir les examens de première intention et les examens de seconde intention. Les premiers sont des tests de routine ne nécessitant que peu de matériel et qui sont réalisables par le vétérinaire praticien dans son exercice en clientèle. Les seconds sont des tests plus approfondis et plus appliqués dans l'étude du sperme, et qui sont réservés aux centres spécialisés.

### **2.1. Les examens de routine :**

Ils sont communément appelés le spermogramme et le spermocytogramme. Ils sont couramment effectués avant chaque insémination artificielle et avant toute congélation ou réfrigération de la semence.

#### **2.1.1. Le spermogramme**

Le spermogramme est une étude stricte du sperme qui revêt le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité (4). Dans la section suivante il ne sera fait mention que des éléments les plus importants à savoir la mobilité et la numération.

##### **2.1.1.1. L'examen microscopique de la mobilité**

C'est un examen réalisé sur une platine chauffante (37°C) pour éviter le ralentissement des spermatozoïdes causé par leur refroidissement. Cette analyse doit être effectuée rapidement après le prélèvement.

Il existe deux niveaux d'observation microscopique de la mobilité spermatique, à savoir la mobilité massale et la mobilité individuelle.

**L'examen de la mobilité massale** est l'observation des mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes sur une goutte de sperme mise sur une lame au grossissement 10. La notation se fait sur une grille de 0 à 5.

**L'examen de la mobilité individuelle** est l'observation d'une goutte de sperme placée entre lame et lamelle au fort grossissement 40 afin d'apprécier la mobilité progressive. Le but de ce test est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ainsi que la proportion de spermatozoïdes fléchants c'est-à-dire qui traversent le champ rapidement en ligne droite. Une semence de bonne qualité comporte 70% de spermatozoïdes fléchants (4, 11).

L'analyse de la mobilité spermatique par microscopie optique demeure un examen subjectif, même si l'erreur est réduite en confiant toujours la lecture au même opérateur expérimenté.

#### **2.1.1.2. La numération**

La numération est la détermination du nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. Le sperme est dilué dans un liquide hypertonique comme le chlorure de sodium à 3% pour immobiliser les spermatozoïdes, cette dilution est réalisée dans un tube capillaire gradué (mélangeur de Potain). La dilution est faite par rapport à la concentration observée lors de l'examen microscopique, elle est soit 1/100<sup>ème</sup> ou 1/200<sup>ème</sup>.

Les spermatozoïdes sont dénombrés grâce à cellule hématimétrique dite de Thoma ou de mallassez. Une goutte est déposée entre lame et lamelle et l'observation au grossissement 40 et les spermatozoïdes sont dénombrés dans les quatre carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. La concentration est donnée par la formule suivante :

$$\text{Equation1: } N=n \times V \times (1/d) \times 50000$$

$$\text{Equation2: } N=(\text{moyR1-5}) \times V \times 100 \times 250 \times 1000$$

légende : (N: nombre spz /éjaculat - n : somme R1-5 - V : volume de fraction spermatique(ml) – d : dilution )

#### **2.1.2. Le spermocytogramme :**

Il s'agit de l'appréciation de la morphologie des spermatozoïdes. La lecture s'effectue sur un frottis coloré. Plusieurs anomalies sont rencontrées et classées en anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire (persistance gouttelette cytoplasmique) et du flagelle. La

lecture de cent spermatozoïdes est effectuée au grossissement 40 pour obtenir le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux dans la semence (13).

Un sperme canin est fécondant lors d'un spermocytogramme n'excédant pas 20 à 30 % de d'anomalies (4). L'application de ce seuil est importante lorsque la semence est destinée à la congélation et doit garder un pouvoir fécondant après décongélation.

## **2.2. L'analyse informatique de la semence** (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis):

L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres, obtenu grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde (10). Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (7).

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

- La motilité totale (TMOT) : Ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.
- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) : Ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP > 50  $\mu\text{m}/\text{seconde}$  et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.
- Le pourcentage des spermatozoïdes statiques : Il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- les mouvements rapides, moyens et lents des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).
- les différentes vitesses de progression :
  - ✓ La "VCL" (Velocity Curvilinear): Cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.
  - ✓ La "VSL" (Velocity Straight line): Cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet.
  - ✓ La "VAP" (Velocity Average Pathway): Cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.

- L'ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) : Ce paramètre correspond à la distance, en  $\mu\text{m}$ , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.
- Le «BCF» (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps).

Il s'agit d'une méthode d'analyse rapide qui permet d'analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage coûteux réservé pour les centres spécialisés (17).

Dans l'espèce canine, Günzel-Appel et al (1993) sont les premiers à évaluer l'intérêt de cet outil dans l'analyse de la semence canine. Selon Iguer-Ouada (2001), quatre études seulement ont utilisé cet outil entre 1993 et 2001.

En 2001, Iguer-Ouada et Verstegen ont validé pour la première le système Hamilton Thorn (HTR-IVOS10) pour l'analyse du sperme canin. Ce système a depuis été largement utilisé dans l'analyse de la semence canine (12).

En 2011, Dorado J et ses collaborateurs ont validé le système d'analyse informatique « SCA : Sperm Class Analyzer - version 3.2.0 fabriqué par Microptic SL, Barcelona, Spain » pour l'analyse de la semence canine. Ce système s'est avéré d'une bonne précision dans l'analyse du sperme canin à condition d'être utilisé avec les bonnes spécifications techniques recommandées dans cette étude (8).

### **3. La cryoconservation de la semence canine**

#### **3.1. Définition**

La cryoconservation est la conservation à une température inférieure à  $-80^{\circ}\text{C}$  d'une suspension de cellules après leurs préparation. Cette conservation peut-être dure plusieurs années et son utilisation après réchauffement à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  (18).

#### **3.2. Objectifs de la cryoconservation**

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'année sans l'altérer (18). Elle permet donc de conserver le matériel génétique d'espèces de bonne qualité ou en danger.

### **3.3. Le dilueur**

#### **3.3.1. Définition**

Le dilueur est un milieu spécifique employé pour diluer la semence protéger les spermatozoïdes contre les effets délétères de la congélation.

#### **3.3.2. Rôle et caractéristique du dilueur (19)**

- Isotonicité : pour ne pas perturber les conditions osmotiques des spermatozoïdes.
- PH et pouvoir tampon : pH optimal se situe au niveau de la neutralité, et aussi a un pouvoir tampon pour éviter l'acidité causée par l'activité métabolique des spermatozoïdes.
- Pouvoir nutritif : il contient des substances nutritives pour maintenir la survie des spermatozoïdes.
- Pouvoir antioxydants : contre les radicaux libres.
- Action stabilisante : comme le j'aune d'œuf protège les spermatozoïdes.
- Action protectrice : contre les cristaux formés lors de la congélation.
- Action antibactérienne : contient des antibiotiques.

### **3.4. Les étapes de la congélation**

#### **3.4.1. Centrifugation**

C'est la séparation des spermatozoïdes au liquide séminal. Il ne faut pas qu'elle soit trop rapide pour éviter de nuire aux spermatozoïdes. Une centrifugation de : 180×g, 720×g, 1620×g et 2880×g pendant 5 minutes. Les deux dernières provoquent une atteinte de l'intégrité membranaire et la meilleur et 720×g pendant 5 minutes. (20)

#### **3.4.2. La dilution**

L'ajout de dilueur et fait à 37°C, et se fait goutte à goutte pour éviter le choc de spermatozoïdes. L'ajout de dilueur peut se faire en une seule étape avant l'équilibration ou en plusieurs étapes. L'ajout de glycérol en une seule étape ou en trois étapes ne donne aucune différence significative. (1, 21, 22, 23)

#### **3.4.3. L'équilibration**

Il s'agit de laisser la semence dans son dilueur à une température de 4°C (cette température est diminué le processus métaboliques préjudiciables aux spermatozoïdes et

diminuer la toxicité du glycérol à fort température) pendant un temps assez long, pour que le glycérol et les constituants du dilueur d'agir sur la semence.

La durée est très variable d'après les auteurs. 1h30 n'a pas mise en évidence de différence significative avec un temps long (1).

#### **3.4.4. Le conditionnement**

C'est de fractionner la semence pour être facilement utilisable est identifiable. Le conditionnement se fait soit dans des pastilles ou des paillettes.

#### **3.4.5. La congélation**

Elle se réalise en deux étapes, d'abord une étape de refroidissement préalable à -70°C, les paillettes sont déposées sur un portoir à l'intérieur d'une boîte de polystyrène dans les vapeurs d'azote pendant 10 minutes, la 2ème étape est l'immersion dans l'azote liquide à -196°C, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide.

#### **3.4.6. Le stockage**

Les paillettes sont déposées dans des visotubes identifiés. Ces visotubes sont ensuite stockés dans des containers d'azote.

#### **3.4.7. La décongélation**

La décongélation la plus utilisée est à 37°C. Une étude montre qu'aucune différence significative n'est observée entre 7.5 secondes à 65°C et 60 secondes à 37°C, cette étude est faite par des paillettes de 0.25mL. Adoue(1). Une décongélation à 70°C pendant 8 secondes donne des meilleurs résultats pour des paillettes de 0.5mL (25).

### **4. Le traitement de la semence**

La cryoconservation de la semence influence considérablement la qualité de la semence après décongélation et la dégrade par rapport à la semence fraîche (27). Cette réduction est le résultat de la diminution de la viabilité et le dysfonctionnement de la survie de spermatozoïdes après décongélation (28).

Divers traitements de supplémentation sont rapportés dans la littérature pour la protection et l'amélioration de la qualité de la semence canine. Entre autres, nous citons le traitement de la semence avant congélation à base du cholestérol inclus aux cyclo-dextrines (CLC).

## 4.1. Effet du Cholestérol et des Cyclo-dextrines

La cryoconservation présente la disposition de la fertilité du sperme. Cependant le potentiel de la congélation-décongélation sur la fertilité du sperme est compromis parce qu'il y a l'altération de la structure et la physiologie de la cellule spermatique (47-49).

La sensibilité du sperme au choc causé par le froid est déterminée par la composition en phospholipides membranaires et par le ratio cholestérol/phospholipides (50). Le sperme qui possède le ratio cholestérol/phospholipides « humain, lapin » élevé est plus résistant au choc par le froid par rapport à celui qui contient un ratio bas « équin, bovin, ovin » (51, 52, 53).

A la température de 37°C, la membrane plasmique est à l'état fluide où les protéines et les phospholipides peuvent bouger latéralement dans la membrane (53). Quand la membrane est soumise au froid, elle passe de l'état fluide à l'état solide. Le cholestérol confère à la membrane plasmique une protection pendant ce changement de phase et renforce la stabilité de cette membrane (16).

Les Cyclo-dextrines qui sont des oligosaccharides cycliques obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon, ont des facultés de capter les molécules lipophiles et de les solubiliser en milieux aqueux par la formation de complexe d'inclusion de cette substance. Elles possèdent une face externe hydrophile et des sites internes hydrophobes capables d'encapsuler des composés hydrophobes comme le cholestérol. Elles vont agir comme un excipient et les molécules complexées comme des principes actifs (16).

Les cyclo-dextrines sont utilisées pour modifier le contenu du cholestérol de la membrane cellulaire (54, 55). Les cyclo-dextrines libres (non complexées) ont plutôt tendance à extraire le cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde. Par contre, quand les cyclo-dextrines sont complexées au cholestérol sous forme d'un complexe d'inclusion (CLC : cyclodextrins pre-loaded with cholesterol), elles jouent plutôt un rôle important dans la solubilisation, le transport et l'insertion du cholestérol au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde (24).

Plusieurs observations montrent que ce complexe d'inclusion « CLC » est capable d'améliorer la cryosurvie du sperme pendant la congélation/décongélation chez certaines espèces mammifères (56-61).

Pour le cas particulier de la semence canine, la littérature n'offre strictement aucune donnée sur un éventuel essai du cholestérol « CLC » dans le traitement de la semence canine.

#### 4.2. Effet de la concentration de traitement en CLC

Le sperme est traité au CLC à des concentrations comprises entre 1 et 2 mg CLC/120 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes, même si pour certaines espèces des concentrations plus fortes (5 mg CLC/ 120x10<sup>6</sup> spermatozoïdes) ont été rapportées (Voir le tableau ci-dessous).

Espèce	Auteurs	Concentration	Motilité Totale (%)		Intégrité membranaire (%)	
			Contrôle	CLC	Contrôle	CLC
Bœuf	Purdy et Graham (2004 & 2005)	1.5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	42	60	46	56
	Mocé et Graham (2006)	2 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	58	58	45	62
Cheval	Moore et al (2005)	1.5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	62	72	47	56
	Spiziri et al (2010)	1.5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	37	51	/	/
Bouc	Barrera-Compean et al (2005)	2.5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	42	52	53	57
Bélier	Mocé et al (2010)	2 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	28	46-45	24	45-47
	Purdy et al (2010)	2 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	36	38	41	49
Porc	Torres et al (2009)	1.5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	37	46	/	/
Souris	Loomis et Graham (2008)	2 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	9-52	38-55	/	/
Lapin	Mocé et Graham (2005)	5 mg/120x10 <sup>6</sup> spz	14	17	33	31

D'après (16)

Comme la littérature est fruste en matière d'essai du CLC dans le traitement de la semence canine, aucune donnée n'est par conséquent disponible sur la concentration de traitement.

# PARTIE EXPERIMENTALE

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS

La conservation du sperme est de plus en plus utilisée ces derniers temps avec l'avènement des nouvelles technologies de reproduction assistée chez les canidés domestiques et sauvages. La reproduction assistée se présente comme solution à divers problèmes d'infertilité chez le mâle et un outil de promotion de l'élevage professionnel et de large diffusion des gènes à partir des reproducteurs de haute valeur génétique. Il s'agit également d'un moyen de préservation des populations canines autochtones et des espèces de canidés sauvages menacées d'extinction.

Les procédés de conservation liquide et de cryoconservation du sperme canin sont à l'origine entre autres d'une instabilité de la membrane plasmique du spermatozoïde, avec un effet délétère sur la qualité de cette semence. Ceci compromet fortement le succès des techniques de reproduction assistée.

Pour remédier à cette situation et améliorer les résultats de la reproduction assistée chez cette espèce, plusieurs traitements de supplémentation des milieux de conservation ont été tentés avec des résultats variables.

Ainsi, et pour prendre en charge cet aspects problématique de la conservation du sperme évoqués plus haut, nous envisageons pour la première fois, l'essai d'un traitement avant congélation de la semence canine au cholestérol complexés par inclusion aux cyclo dextrines (CLC). Une comparaison a été également faite entre trois concentrations de traitement au CLC à savoir 1.25, 2.5 et 5 M par million de spermatozoïdes à la recherche de la concentration optimale.

Nous recherchons par ce traitement, un effet stabilisateur de la membrane plasmique et ainsi une action protectrice de la semence canine exprimée éventuellement par une amélioration des paramètres de mobilité des cellules après réanimation.

## MATERIELS ET METHODES :

### 1. Animaux

Trois chiens adultes en bonne santé, de sexe mâle et de fertilité confirmée ont participé à la présente étude en tant que donneurs de sperme après bien sur une période d'entraînement à la récolte. Ces chiens sont récoltés plusieurs fois avec une période d'abstinence obligatoire de deux à trois jours entre deux récoltes.

### 2. Récolte et évaluation initiale de l'éjaculat :

Les éjaculats sont obtenus par une stimulation manuelle selon la technique décrite par Christiansen (1984) (62). Plusieurs éjaculats par chien sont collectés durant cette expérimentation avec une période d'abstinence d'au moins 2 à 3 jours.

Les échantillons sont laissés à température ambiante pendant toute la période d'évaluation et de traitement jusqu'à la congélation. Pour le contrôle de la mobilité, seul le volume mis entre lame et lamelle est réchauffé à 37°C sur platine chauffé.

Chaque éjaculat est soumis à une évaluation initiale comportant la numération des spermatozoïdes, le contrôle de mobilité par méthode subjective et le spermocytogramme (contrôle de la morphologie). Cette évaluation initiale se base sur des critères d'inclusion dans l'étude (motilité >70% ; concentration >400 millions spz/ml ; Pourcentage de spermatozoïdes normaux morphologiquement >70%), et tout échantillon ne répondant pas à ces critères est d'emblée rejeté de l'étude. Ces mêmes critères sont les conditions généralement admises pour la congélabilité de la semence canine.

**La mobilité** est évaluée par méthode subjective afin de déterminer la mobilité massale et le pourcentage des spermatozoïdes mobiles fléchants. Pour cela, une goutte de semence est observée directement à la recherche des mouvements de masse (mobilité massale) ou déposée entre lame et lamelle et observée par un microscope optique à contraste de phase doté d'une platine chauffée à 37°C (62).

Un contrôle de motilité de la semence fraîche est effectué sur chaque échantillon par analyseur informatique (Système SCA Microptic SL Bercole, Spain). Ce contrôle de la semence à l'état frais ne fait pas partir de l'évaluation initiale, il sert plutôt à comparer la motilité avant et après congélation.

**La numération** des spermatozoïdes est effectuée en utilisant une cellule hématimétrique de Thoma. Pour ce faire, nous avons dilué 10 µL de semence avec 990 µL d'une solution de NaCl à 3 % afin d'obtenir une suspension diluée au 1/100ème. Nous avons déposé une goutte de cette semence diluée sur la cellule de Thoma et nous avons compté le nombre de spermatozoïdes présents dans les 4 carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. Nous avons ensuite extrapolé ce nombre à l'éjaculat selon la formule suivante:

$$\text{Equation1 : } N=n \times V \times (1/d) \times 50000$$

$$\text{Equation2: } N=(\text{moyR1-5}) \times V \times 100 \times 250 \times 1000$$

légende : (N: nombre spz /éjaculat - n : somme R1-5 - V : volume de fraction spermatique(ml) – d : dilution )

**Le spermocytogramme** est effectué en observant cent (100) spermatozoïdes sur une lame de semence colorée par l'éosine-nigrosine qui a déjà servi pour le test de vitalité. Nous avons ainsi déterminé le pourcentage des spermatozoïdes normaux, et des anormaux en classifiant les anomalies par anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

### 3-Préparation des dilueurs et traitement de la semence :

#### 3.1. Préparation du complexe cyclo dextrines - cholestérol

Complexe CD-chl :

- Peser une masse de 350 mg de chl avec 601mg de MbCD , puis ajouté 50 ml d'éthanol
- Le mélange est mettre sous agitation pendant 2h.
- mettre dans l'étuve pendant 24h, enfin ils ont récupérer les complexe sous forme de poudre.

**Préparation des milieux expérimentaux de conservation :**

CDs	Chl	CD-Chl
35,5mg+5ml de tris buffer(TB)	20mg+5ml de TB	54,3mg+5ml de TB(2)

La préparation de ce complexe a été faite au niveau du laboratoire de chimie des procédés à l'Université de Bejaïa. Il a été récupéré sous forme de cristaux et a été mis en solution au niveau de notre laboratoire de recherche (LBRA-ISV-Université de BLIDA1) au

début de notre expérimentation. La solution de traitement a été conservée au réfrigérateur à 4°C.

### **3.2. Préparation de la solution de traitement**

- **CD - CHL complexe (CLC) :**

Une solution de travail a été préparée en ajoutant 54,3 mg du complexe CLC à 5 ml d'une solution de Tris buffer à la température ambiante (22°C) et en mixant la solution brièvement en utilisant le vortex puis filtrée en utilisant un filtre-seringue de 24 µm de diamètre.

### **3.3. Traitement de la semence**

La semence est centrifugée en 700×g pendant 06 min puis on enlève le surnageant selon la méthode de Linde-forsberg (2001) avec une micropipette (68). La fraction riche en sperme est diluée avec une solution de Tris-base (*Tris 3,025 g, Acide citrique 1,7g, glucose 1,25g Pénig 0.1g, DHS 0,1g, eau distillée jusqu'à 100 ml*), pour obtenir une concentration de 400 millions spz/ml.

A partir de cette semence diluée, quatre volumes de 500µl ont été pipetés dans quatre tubes d'essai. A chaque tube, on a ajouté 500 µl de la solution de traitement correspondant pour avoir un millilitre de semence traitée et concentrée à 200×10 spz/ml (dilution 1:1). Le 1<sup>er</sup> tube sans traitement ajouté, contient tout simplement un dilueur Tris-base et est considéré comme témoin (Test), le 2<sup>ème</sup> tube (Test 2) contient les méthyl beta-cyclo dextrines seules, le 3<sup>ème</sup> tube (Test 3) contient le cholestérol libre non complexé aux cyclo dextrines et le 4<sup>ème</sup> tube (Test 4) contient le CLC (cyclodextrins pre-loaded with cholesterol).

Un temps d'incubation de 15 à 30 min est observé pour le traitement. A la fin de cette incubation, un deuxième contrôle de motilité par analyseur informatique a été effectué, puis le dilueur de congélation (*Tris 3,025 g, Acide cit 1,7g, Glucose 1,25g Pénig 0.1g, DHS 0,1 g, 4ml Glycérol, 20ml de Jaune d'œuf et Eau distillée 83ml*) a été ajouté (1 :1) à chaque tube pour obtenir une concentration de 200 millions spz/ml. Juste après ajout de dilueur de congélation, les quatre tubes sont mis en équilibre à 4°C pendant deux (02) heures. Au bout de cette équilibre à 4°C, un volume de semence (10µl) est réchauffé à 37°C pour un contrôle de motilité par analyseur informatique.

#### **4-Technique de congélation et de décongélation :**

Les paillettes Françaises de 0.5ml (Cassou IMV Technologies IMV Aigles France) sont pré-identifiées et codifiées (par marquage indélébile à défaut de couleur) pour différencier les quatre traitements. Les gobelets et visotubes à utiliser sont identifiés et codifiés par couleur (quatre couleur pour quatre traitements) avant leur mise en canister dans le container d'azote.

L'ensemble du matériel de congélation (paillettes de congélation de 0.5ml, rampe, clayette, poudre de bouchage) est préparé et mis à 4°C deux (02) heures avant son utilisation afin qu'il soit à la même température que la semence.

A terme des deux heures d'équilibration, la semence est remplie dans des paillettes de 0,5 ml par aspiration, en prenant soin de chasser une goutte et créer une bulle d'air pour le bouchage. Chaque tube contenant deux (02) ml de semence permet de remplir quatre (04) paillettes 0.5ml. Les paillettes sont ensuite obstruées du côté de leurs extrémités libres à l'aide d'une poudre de PVC se polymérisant au contact de l'eau, puis placées horizontalement sur une rampe calibrée par une clayette et laissées encore une demi-heure.

Le refroidissement et la congélation sont effectués par méthode archaïque au moyen d'une boîte à frigolithe (polystyrène). Le refroidissement qui précède la congélation proprement dite est effectué en mettant les paillettes dans leur position horizontale (sur la rampe de congélation) dans la vapeur d'azote à quatre (04) cm au-dessus du niveau liquidien de ce gaz pendant dix (10) minutes. Au bout de ces dix minutes de refroidissement, la congélation est effectuée par immersion des paillettes dans l'azote liquide contenu dans la boîte de congélation.

Le stockage se fait dans un container d'azote (BT 17 litres à six canisters) jusqu'à leur décongélation. Les paillettes congelées sont récupérées dans la boîte de congélation et mises dans les visotubes correspondants (code couleur) au sein du container de stockage. Le contrôle de niveau d'azote est effectué périodiquement et l'appoint du BT de stockage se fait automatiquement à partir d'un container d'appoint de 60 litres qu'on garde toujours plein pendant toute l'expérimentation.

La décongélation des paillettes se fait par immersion dans un bain-marie à 37°C pendant une minute puis le contenu est récupéré dans un tube et laissé pendant 10 minutes à 37°C avant analyse informatique.

## **5. Analyse informatique de la semence**

Le contrôle de la motilité par analyseur informatique a été effectué à quatre niveaux différents à savoir : sperme frais (fresh semen), après traitement (post treatment), après équilibration (post chilled) et après décongélation (post thaw).

Pour l'analyse informatique de la semence, nous avons utilisé l'analyseur SCA de Microptics qui a été déjà validé pour l'analyse de la semence canine (8).

L'analyseur informatique "Sperm Class Analyzer, version vétérinaire 5.4 (SCA®2014, Microptic SL, Barcelona, Spain), déjà validé pour l'analyse de la semence canine (8), a été utilisé pour évaluer simultanément les différents paramètres de motilité spermatique. Ce système d'analyse intègre un microscope trinoculaire à contraste de phase négative (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan), une double platine chauffée histologique et microscopique (IMV Technologies), une caméra numérique à haute vitesse (A312fc, Basler™ AG, Ahrensburg, Germany) et un ordinateur de marque ACER (Intel inside®, Pentium® 4) pour sauvegarder et analyser les données après acquisition.

Dans nos expériences, et pour chaque analyse, un volume de 5 µl de semence diluée est placé sur une cellule Makler (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) préchauffée à (37°C) puis laissé se stabiliser pendant 1 min sur la platine chauffée avant analyse (63).

Les paramètres informatiques de motilité spermatique ont été mesurés par le système SCA dont les cinq (05) paramètres étudiés dans notre travail à savoir: curvilinear velocity (CLV, µm/sec): ou vitesse curvilinéaire qui est la vitesse mesurée à travers la trajectoire réelle décrite point par point par le spermatozoïde, straight line velocity (SLV, µm/sec): ou vitesse rectiligne qui est la vitesse mesurée en ligne droite entre le point du début et celui de la fin de la trajectoire du spermatozoïde, average path velocity (APV, µm/sec): ou vitesse à trajectoire lissée, the mean amplitude of the lateral head displacement (LHD, µm): ou amplitude moyenne des déplacements latéraux de la tête du spermatozoïde, the beat cross frequency (BCF, Hz): ou la fréquence de croisement entre la tête du spermatozoïde et la trajectoire lissée dans les deux directions.

## **6. Analyse statistique**

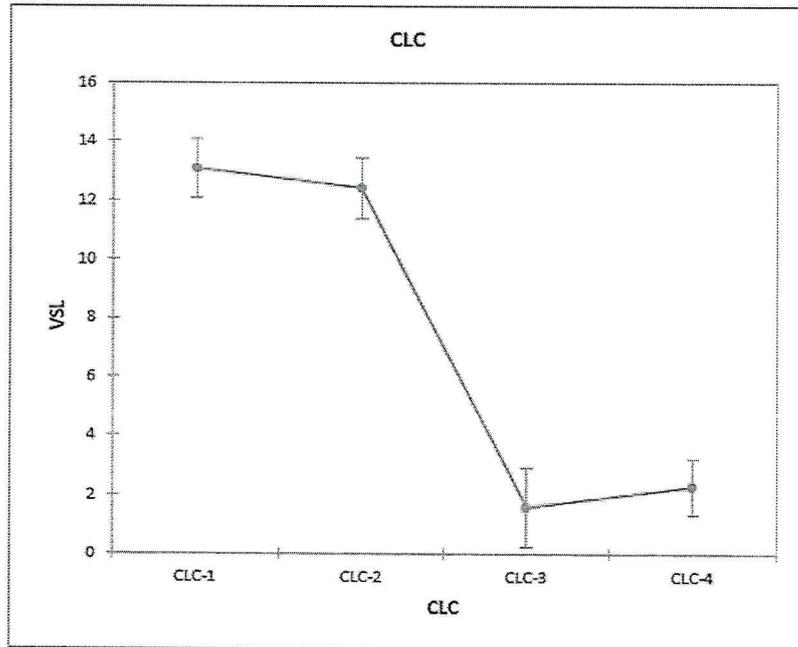
Les résultats bruts sont générés sur un fichier Microsoft Excel par l'analyseur informatique. Ils sont par la suite analysés par le logiciel XLSTAT 2014 (version

d'évaluation) pour appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), puis le test de Tukey afin d'étudier les différences entre les traitements.

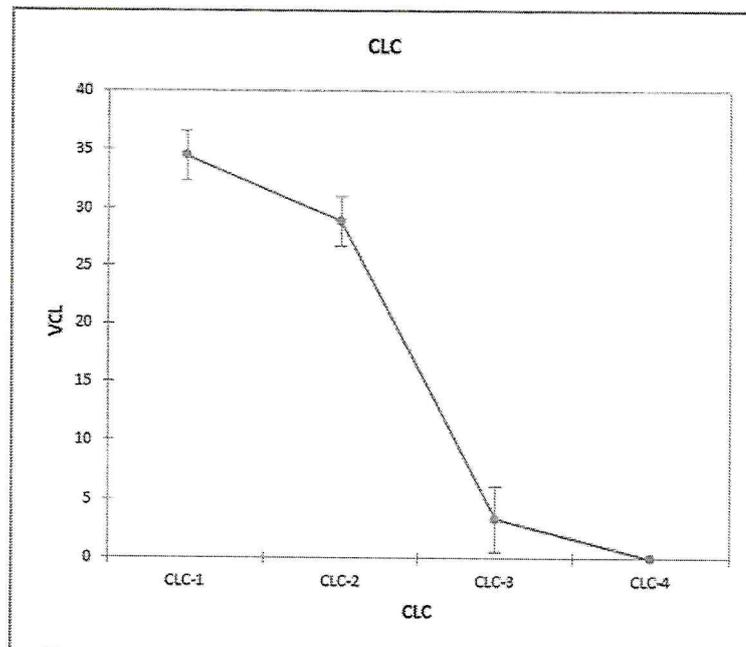
L'expérimentation est répétée trois fois et les résultats sont enfin présentés sous forme de moyennes plus ou moins erreur standard de la moyenne (Mean±SEM), et la différence est considéré comme significative si  $p < 0.05$ .

# RESULTATS

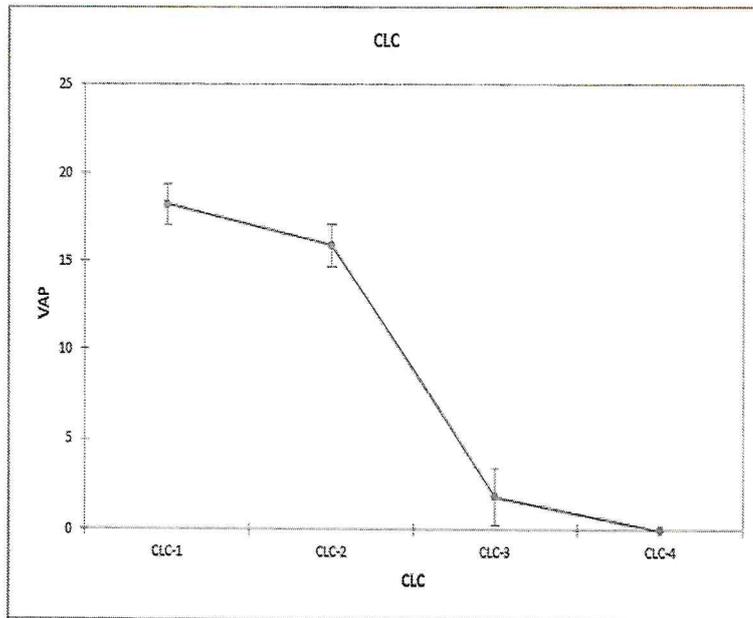
## 1. Etude comparative de trois concentrations de traitement au CLC.



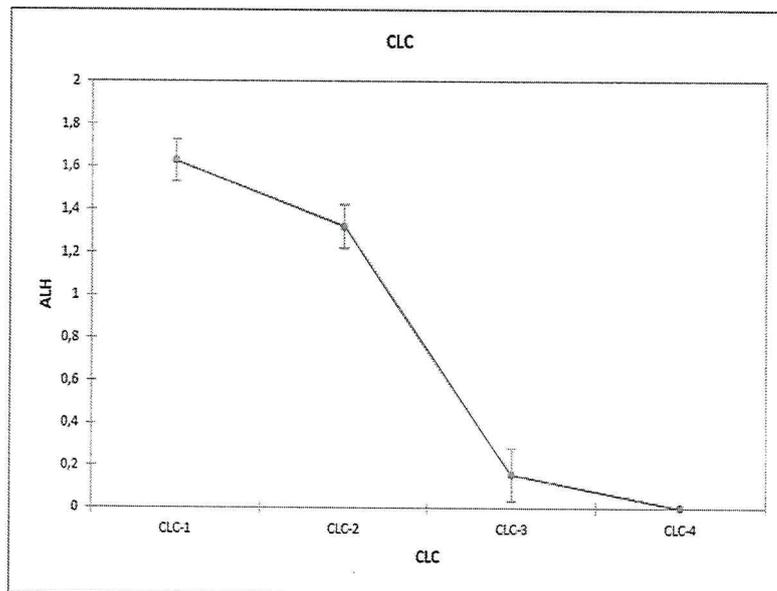
**Figure 01 :**  
**Graphique des valeurs moyennes de la VSL pour les trois concentrations de CLC (1 : Contrôle, 2 : 5mg, 3 : 2.5 mg, 4 : 1.25mg)**



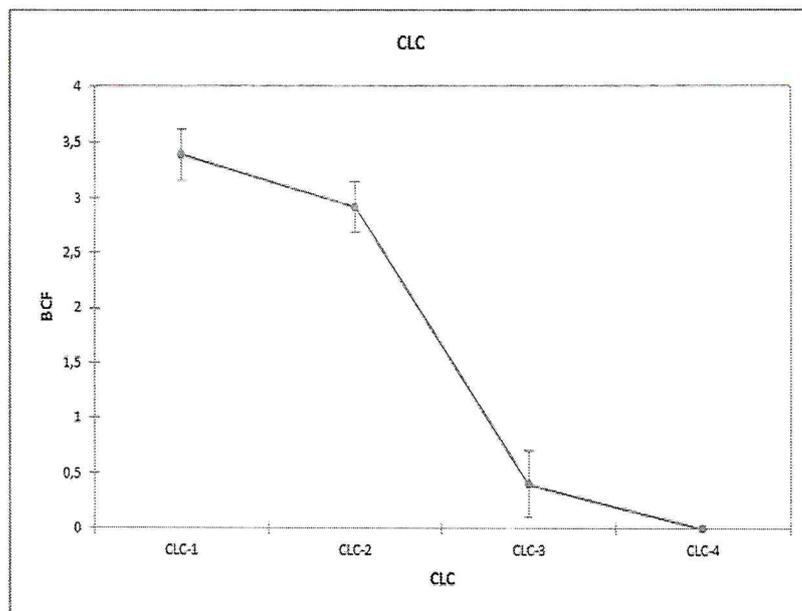
**Figure 02 :**  
**Graphique des valeurs moyennes de la VCL pour les trois concentrations de CLC (1 : Contrôle, 2 : 5mg, 3 : 2.5 mg, 4 : 1.25mg)**



**Figure 03 :**  
Graphique des valeurs moyennes de la VAP pour les trois concentrations de CLC (1 : Contrôle, 2 : 5mg, 3 : 2.5 mg, 4 : 1.25mg)



**Figure 04 :**  
Graphique des valeurs moyennes de la ALH pour les trois concentrations de CLC (1 : Contrôle, 2 : 5mg, 3 : 2.5 mg, 4 : 1.25mg)

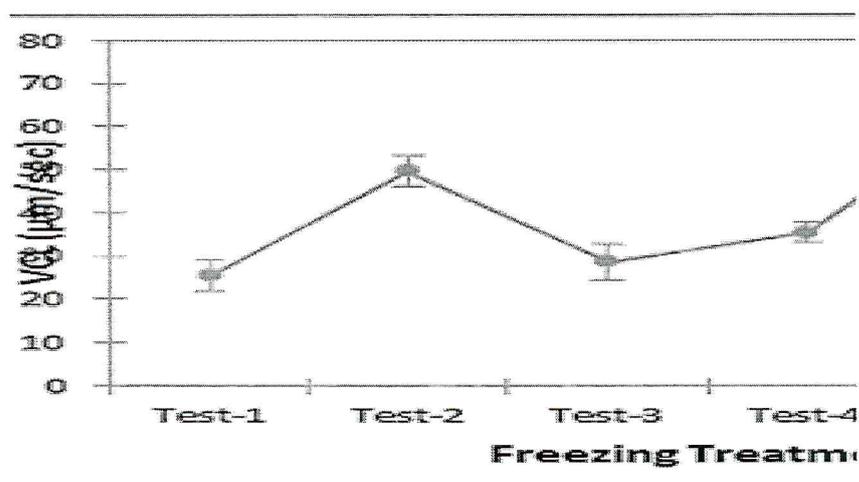


**Figure 05 :**  
**Graphique des valeurs moyennes de la BCF pour les trois concentrations de CLC**  
**(1 : Contrôle, 2 : 5mg, 3 : 2.5 mg, 4 : 1.25mg)**

## 2. Etude comparative de trois traitements avant congélation

### 2.1. Les paramètres de mobilité spermatique après réanimation:

#### 2.2. La vitesse curvilinéaire (VCL):



**Figure 06: Représentation des Moyennes de VCL par traitement.**

(Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins –

**Tableau N° 01:**

Moyennes de VCL pour la semence canine congelée –réanimée mesurées par analyse informatique.

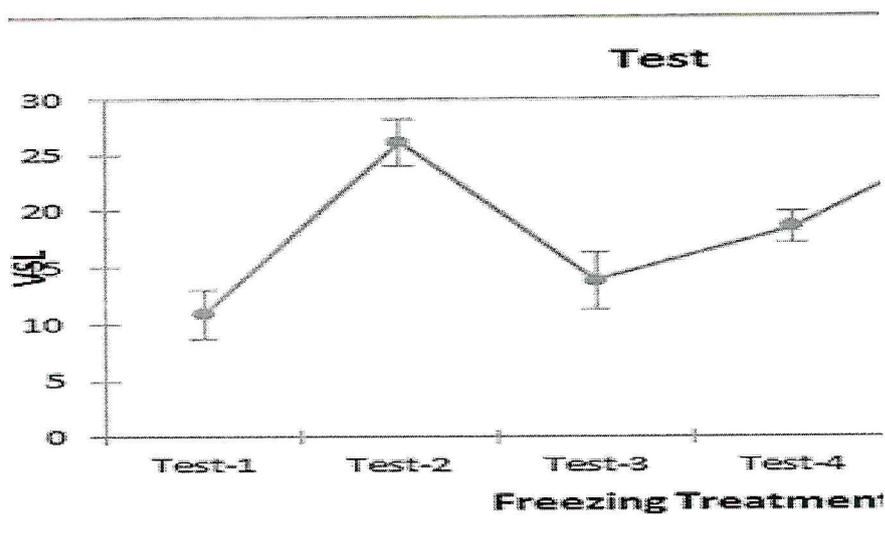
“Least square means ( $\pm$ SEM)”

Traitements	Moyenne $\pm$ SEM
CDs	49,596 $\pm$ 1,796 <sup>a</sup>
CLC	35,417 $\pm$ 1,204 <sup>b</sup>
CHL	28,618 $\pm$ 2,097 <sup>bc</sup>
Control	25,443 $\pm$ 1,840 <sup>c</sup>

Anova of VCL with Tukey test .

Means within a column with unlike superscripts are different (P<0.05)

2.3. La vitesse rectiligne (VSL) :



**Figure 07: Représentation des Moyennes de VSL par traitement.**  
 (Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé –  
 Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins –

**Tableau N° 02:**

Moyennes de VSL pour la semence canine congelée –réanimée mesurées par analyse informatique.

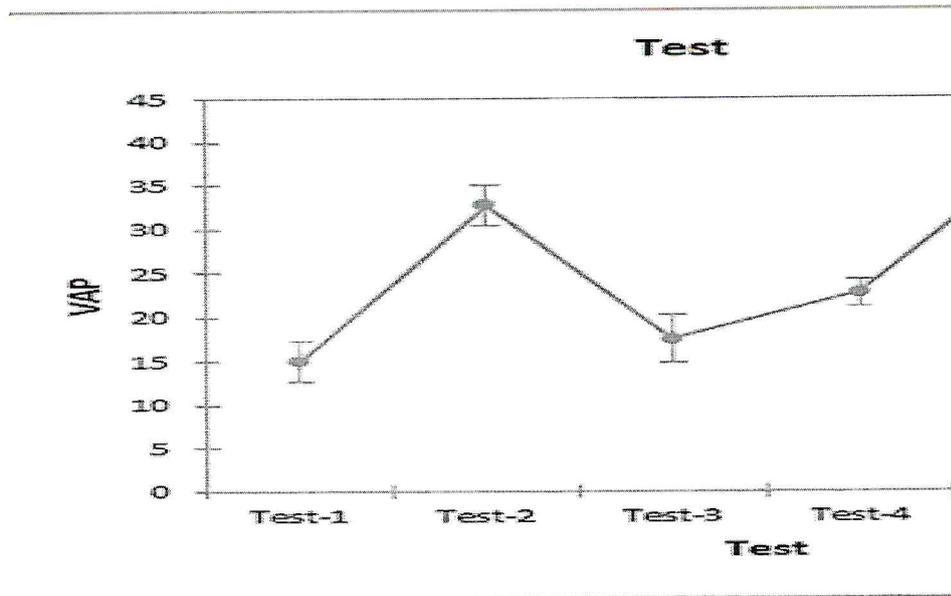
“Least square means (±SEM)”

Traitements	Moy±SEM
CDs	26,166±1,092 <sup>a</sup>
CLC	18,542±0,732 <sup>b</sup>
CHL	13,839±1,275 <sup>c</sup>
Control	10,856±1,118 <sup>c</sup>

Anova of VSL with Tukey test .

Means within a column with unlike superscripts are different (P<0.05)

2.4. La vitesse à trajectoire lissée (VAP) :



**Figure 08: Représentation des Moyennes de VAP par traitement..**  
 (Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé –  
 Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins –

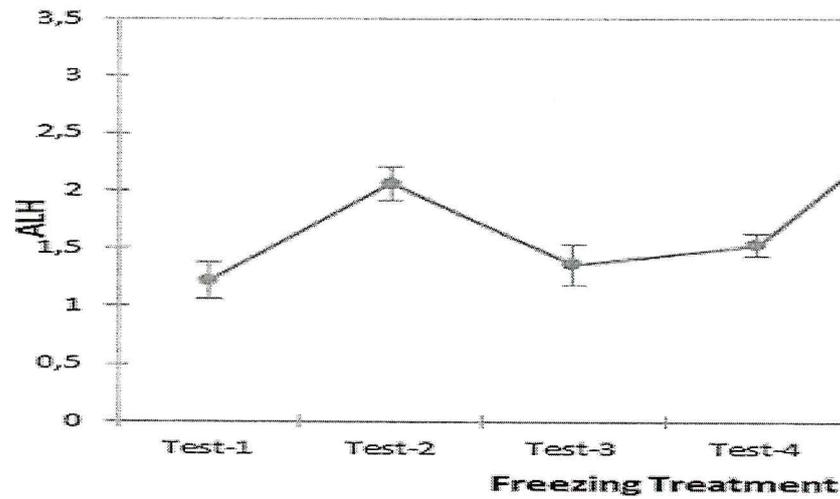
**Tableau N° 03:**

Moyennes de VAP pour la semence canine congelée –  
 réanimée mesurées par analyse informatique.  
 “Least square means (±SEM)”

Traitements	Moy±SEM
CDs	32,667±1,157 <sup>a</sup>
CLC	22,739±0,776 <sup>b</sup>
CHL	17,532±1,351 <sup>c</sup>
Control	15,034±1,185 <sup>c</sup>

Anova of VAP with Tukey test .  
 Means within a column with unlike superscripts are different (P<0.05)

2.5. L'amplitude des déplacements latéraux de la tête (ALH) :



**Figure 09: Représentation des Moyennes de ALH par traitement.**  
 (Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé –  
 Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins –

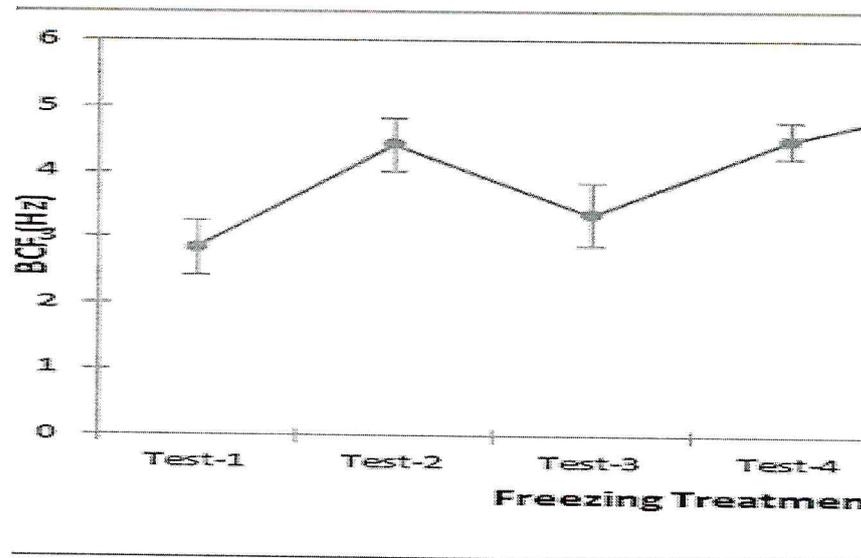
**Tableau N° 04:**

Moyennes de ALH pour la semence canine congelée –  
 réanimée mesurées par analyse informatique.  
 “Least square means (±SEM)”

Traitements	Moy±SEM
CDs	2,058±0,077 <sup>a</sup>
CLC	1,536±0,051 <sup>b</sup>
CHL	1,366±0,090 <sup>d</sup>
Control	1,220±0,079 <sup>c</sup>

Anova of ALH with Tukey test .  
 Means within a column with unlike superscripts are different (P<0.05)

2.6. La fréquence de battement de la tête (BCF) :



**Figure 10: Représentation des Moyennes des BCF par traitement.**  
 (Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé –  
 Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins –

**Tableau N° 05:**

Moyennes de BCF pour la semence canine congelée –  
 réanimée mesurées par analyse informatique.  
 “Least square means (±SEM)”

Traitements	Moy±SEM
CDs	4,503±0,141 <sup>a</sup>
CLC	4,429±0,211 <sup>a</sup>
CHL	3,354±0,246 <sup>b</sup>
Control	2,840±0,216 <sup>b</sup>

Anova of BCF with Tukey test .  
 Means within a column with unlike superscripts are different (P<0.05)

**Tableau N°06:** Least square means (±SEM) for post thaw parameters of canine semen as measured by CASA.

Traitement	VCL (µm/sec)	VSL (µm/sec)	VAP (µm/sec)	ALH (µm)	BCF (Hz)
CDs	49,596±1,796 <sup>a</sup>	26,166±1,092 <sup>a</sup>	32,667±1,157 <sup>a</sup>	2,058±0,077 <sup>a</sup>	4,429±0,211 <sup>a</sup>
CLC	35,417±1,204 <sup>b</sup>	18,542±0,732 <sup>b</sup>	22,739±0,776 <sup>b</sup>	1,536±0,051 <sup>b</sup>	4,503±0,141 <sup>a</sup>
CHL	28,618±2,097 <sup>bc</sup>	13,839±1,275 <sup>c</sup>	17,532±1,351 <sup>c</sup>	1,366±0,090 <sup>dc</sup>	3,354±0,246 <sup>b</sup>
Control	25,443±1,840 <sup>c</sup>	10,856±1,118 <sup>c</sup>	15,034±1,185 <sup>c</sup>	1,220±0,079 <sup>c</sup>	2,840±0,216 <sup>b</sup>

VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity; VAP, average path way; ALH, Lateral head displacement; BCF, Cross-beat frequency. CASA, Computer-assisted sperm analysis; SEM, standard error of the mean.

Data are presented as Means±SEM.

Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.05)

# DISCUSSION

## Introduction

La cryoconservation expose le sperme au stress mécanique et osmotique qui diminue la survie de la cellule et altère la fonctionnalité spermatique et dans le même sens réduit sa longévité et sa fertilité comparées à la semence fraîche (41, 64).

Le cholestérol diminue la fluidité de la membrane avant la phase de transition, par contre il augmente cette fluidité de la membrane après transition de la phase fluide à la phase solide sous l'effet du froid. Cet effet est plus accentué dans une membrane riche en phospholipides saturés par rapport à celle qui contient plus de phospholipides insaturés (41).

La sensibilité du spermatozoïde aux effets délétères causés par le choc du froid est déterminée par la composition de la membrane plasmique en phospholipides et par le ratio cholestérol/phospholipides (48, 67). Le spermatozoïde qui possède un haut ratio cholestérol/phospholipides est naturellement plus résistant au choc par le froid par rapport au sperme qui contient un faible ratio cholestérol/phospholipides (66). Le spermatozoïde à faible ratio cholestérol/phospholipides profiterait donc plus du traitement de supplémentation en cholestérol qu'un spermatozoïde à faible ratio cholestérol/phospholipides.

Les cyclo-dextrines sont utilisées comme excipient (complexe d'inclusion du cholestérol au CDs) qui solubilise et véhicule le cholestérol dans le dilueur de congélation jusqu'à la membrane cytoplasmique du spermatozoïde où le cholestérol est libéré pour s'incorporer dans cette membrane et augmenter son ratio cholestérol-phospholipide et la rendre plus résistante au choc du froid. Cette action protectrice pourrait améliorer la qualité de la semence réanimée après congélation.

En effet, plusieurs recherches antérieures montrent que le traitement des spermés équin, bovin et ovin par le cholestérol (CLC) avant congélation donne une grande cryosurvie par apport au sperme non traité (13, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42).

Jusqu'à la date d'aujourd'hui, aucune étude n'est disponible dans la littérature sur l'évaluation de l'efficacité du cholestérol (CLC) dans la congélation de la semence canine. Notre étude vise à ce niveau d'évaluer donc pour la première fois l'action du cholestérol complexé au cyclo dextrines (CLC) sur les paramètres de mobilité du sperme canin congelé et réanimé.

### **Effet de la concentration de traitement du CLC**

Nous avons traité la semence canine avant congélation avec 5mg de CLC par 100 millions spermatozoïde à la température ambiante (22°C) pendant une durée d'incubation oscillant entre 15 et 30 minutes.

La concentration de 5 mg / 100  $10^6$  spermatozoïdes s'est avérée la plus adaptée lors d'une comparaison entre les concentrations de 5mg, 2.5 mg et 1.25 mg. Cette plage de concentrations évaluées inclut toutes les concentrations rapportées dans la littérature pour les diverses espèces animales (16).

Ce résultat en faveur de la forte concentration en CLC (5 mg CLC/100x10<sup>6</sup> spz) concorde avec la concentration de 5 mg/120x10<sup>6</sup> spermatozoïdes rapportée par Mocé et Graham en 2005 pour la semence du lapin qui a le même ratio cholestérol : phospholipide que la semence canine (69).

### **Effets du traitement au CLC (5 mg CLC/100x10<sup>6</sup> spz)**

Nous observons dans nos résultats (Voir Figures et Tableaux n° 1-5) que le traitement de la semence canine au cholestérol (CLC) à la concentration citée ci-dessus et à la température ambiante (22°C) et pendant une incubation de 15 à 30 minutes n'a pas permis d'améliorer significativement par rapport au contrôle (Test 1) les paramètres de mobilité évalués sur le spermatozoïde canin réanimé à savoir (VSL, VAP, BCF, ALH).

Pour la VCL on note une différence faiblement significative ( $P < 0.05$ ) entre le traitement au CLC et le traitement au Cholestérol non complexé ( $35,417 \pm 1,204^b$  versus  $28,618 \pm 2,097^{bc}$  respectivement). Une différence significative ( $P < 0.05$ ) est enregistrée également pour le même paramètre (VCL) entre le traitement au CLC et le contrôle ( $35,417 \pm 1,204^b$  versus  $25,443 \pm 1,840^c$  respectivement). Quant aux autres paramètres de mobilité (VSL, VAP, ALH et BCF), aucune différence significative n'a pu être relevée entre le CLC d'une part et d'autre part le cholestérol non complexé ainsi que le contrôle. (Voir Tableau n° 06).

Par contre, et de façon totalement inattendue, le traitement au cyclo-dextrines seules (M $\beta$ CDs) a permis d'obtenir une nette amélioration et de façon statistiquement significative ( $P < 0.05$ ) par rapport au contrôle et aussi par rapport au CLC et au cholestérol non complexé, la totalité des paramètres de mobilité étudiées.

Pour respectivement la VCL, la VSL, la VAP, l'ALH et le BCF, le traitement aux CDs seules comparé au contrôle a montré les résultats suivants :  $49,596 \pm 1,796^a$  versus  $25,443 \pm 1,840^c$ ,  $26,166 \pm 1,092^a$  versus  $10,856 \pm 1,118^c$ ,  $32,667 \pm 1,157^a$  versus  $15,034 \pm 1,185^c$ ,  $2,058 \pm 0,077^a$  versus  $1,220 \pm 0,079^c$  et finalement  $4,429 \pm 0,211^a$  versus  $2,840 \pm 0,216^b$ .

Le ratio cholestérol : phospholipide de la membrane plasmique du spermatozoïde est déterminant dans la stabilité et la fluidité membranaire à basse température. Ce ratio permet donc de classer les spermatozoïdes par espèces comme étant cryo-résistants ou cryo-sensibles (51). Les ratios des spermatozoïdes bovin, ovin, caprin et équin par exemple sont faibles, ce qui explique l'efficacité du traitement au CLC chez ces espèces renforçant la membrane plasmique en cholestérol et la rendant ainsi plus stable et plus résistante à l'effet du froid. Ceci s'exprime par une amélioration de la motilité et l'intégrité membranaire du spermatozoïde (16, 51). D'autres espèces produisent des spermatozoïdes moins sensibles au froid tel que le chien et le chat et d'autres hautement résistants comme le lapin la volaille et l'homme (51).

Le fait que le CLC n'a pas conféré de protection au spermatozoïde canin dans notre étude s'expliquerait par le fait que le spermatozoïde canin possède déjà un ratio cholestérol : phospholipide élevé et se trouve de ce fait classé parmi les spermatozoïdes les moins Cryo-sensibles au même titre que le spermatozoïde du lapin (Cryo-résistant) (16, 51) qui lui aussi ne semble pas profiter du traitement au CLC (69).

#### **Effets des cyclo-dextrines seules.**

Par ailleurs, l'effet des cyclo-dextrines seules non complexées (M $\beta$ CDs) ne semble pas faire le consensus dans la littérature qui rapporte beaucoup de controverses entre les espèces à ce propos. Certains auteurs rapportent que les CDs au contact des spermatozoïdes vont extraire les molécules de cholestérol de la membrane plasmique et rendre de ce fait cette cellule instable (70, 71 et 72). Ces résultats sont plutôt valables pour les espèces cryo-sensibles. D'autres auteurs rapportent chez le lapin et la truite plutôt le même taux de Cryo-survie des spermatozoïdes comparés au contrôle non traité (69, 73). Ceci est valable pour les espèces cryo-résistants. Il y a des auteurs qui ont trouvé que le traitement aux CDs seules est associé à un taux de réaction acrosomique plus élevé que le contrôle non traité (74).

Paradoxalement, il a été rapporté chez le bélier (espèces cryo-sensible) des résultats contradictoires ne permettant de tirer aucune conclusion cohérente quant aux

bénéfices d'augmenter ou de diminuer le taux du cholestérol en traitant au CLC ou au CDs seules (75, 76, 77). Les raisons de cette inefficacité du traitement au CLC chez des espèces cryo-sensibles demeure non encore élucidées.

Nos résultats vont dans le même sens que les auteurs ayant rapporté un effet d'amélioration de la qualité du sperme réanimé traité avant congélation aux cyclo-dextrines seules (69). Le lapin qui produit des spermatozoïdes résistants au froid et qui pourrait servir de modèle pour le chien (en absence de résultats pour le chien) ne montre aucune dégradation de la qualité spermatique après traitement aux cyclo-dextrines seules (69).

Il est probable que cet effet protecteur des CDs est valable pour les spermatozoïdes ayant des ratios cholestérol : phospholipide élevé au moment où le CLC ne confère aucune protection. Cette hypothèse a besoin d'être vérifiée par d'autres travaux expérimentaux.

Il est à conclure, dans les conditions de cette expérimentation, et contrairement à ce qu'il était attendu que, le traitement avant congélation de la semence canine au cholestérol inclus au cyclo dextrines (CLC) n'apporte aucune amélioration significative par rapport au contrôle des paramètres de mobilité évalués par analyseur informatique du spermatozoïde canin réanimé. Les cyclo-dextrines seules non complexées (M $\beta$ CDs) confèrent une meilleure protection aux spermatozoïdes et améliorent nettement et significativement par rapport au contrôle les paramètres de mobilité de la semence canine congelée et réanimée.

## CONCLUSION

Nous concluons de ce travail ce qui suit :

- La concentration de traitement au **CLC de 5 mg/100x10<sup>6</sup>** spermatozoïdes donne les meilleurs résultats en matière de paramètres de mobilité de la semence canine réanimée comparée aux concentrations plus faibles (2.5 mg et 1.25 mg/100x10<sup>6</sup> spermatozoïdes).
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec le cholestérol complexé aux cyclo-dextrines (**CLC**) à la concentration de 5 mg / 100 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes ainsi que le traitement avec le cholestérol libre non complexé aux cyclo-dextrines n'apportent aucune amélioration statistiquement significative par rapport au contrôle des paramètres de mobilité de la semence canine réanimée.
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec les cyclo-dextrines seules non complexées (**M $\beta$ CDs**) améliore de façon statistiquement significative (P<0.05) par rapport au contrôle et aux autres traitements évalués les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée.

## REFERENCES

- (1) : **Adoue C. ; 1991.** Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin : influence de la durée d'équilibration et de la température de décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 194 pp.
- (2) **Prins G.S. (1998)** Semen. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
- (3) **Johnston S.D., Root Kustritz M.V., 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.
- (4) **Fontbonne A., Dumont C. (1992)** Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- (5) **Millette C.F. (1998)** Spermatozoa. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 586-596.
- (6) **Eilts B.E. (2005)** Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. Theriogenology, 64, 692-697.
- (7) **Péna Martinez A.I. (2004)** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim. Reprod. Sci., 82-83, 209-224.
- (8) **Dorado J et al ; 2011**
- (9) **Günzel-Appel et al (1993)**
- (10) **Iguer-Ouada M ; 2001**
- (11) **Fontbonne A. (1995)** Infécondité du chien mâle. In : Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elsevier, Paris, Volume 5, 1-13.
- (12) **Iguer-Ouada M and Verstegen JP; 2001**
- (13) **Ott R.S., Goffaux M., Thibier M. (1987)** Examen morphologique des spermatozoïdes. El. et Ins., 221, 15-20.
- (14) **Mocé E, Blanch E, Tomas C and Graham JK.; (2010)** "Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives of Future" Reprod Dom Anim 45 (Supplem 2), 57-66 (2010).
- (15) **Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D., De Kruif A. (2005)** New techniques for the assessment of canine semen quality : a review. Theriogenology, 64, 706-709.
- (16) **Amann R.P. (1998)** Cryopreservation of sperm. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.
- (17) **Fontbonne A. (1991)** Contribution à l'étude du sperme de chien : influence de la glycérolisation et de la dilution. Thèse Mède, Vèt, Alfort.
- (18) **Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., De Kruif A. (2002)** Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. Theriogenology, 57, 1669-1681.
- (19) **Fontbonne A., Badinnd F. (1993)** Canine artificial insemination with frozen semen : comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 325-327.
- (20) **Péna A.I., Barrio F., Quintela, Herradon P.G. (1998)** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. Theriogenology, 50, 163-174.

- (21) **Silva A.R., Cardoso R.C.S., Uchoa D.C., Silva L.D.M. (2003)** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- (22) **Navratil et al., 2003**
- (23) **Veyer E. (2002)** Congélation de semence dans l'espèce canine. Effets de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 60 pp + annexes.
- (24) **Silva PFN, (2006)** Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD thesis – Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine ISBN: 90-393-4286-5.
- (25) **Watson PF. (2000)** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*;60–61:481–92.
- (26) **Combes, G.B., D.D. Varner, F. Schroeder, R.C. Burghardt and T.L. Blanchard, 1998.** Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Proceedings of the 7th International Symposium on Equine Reproduction*, July 12-17, 1998, Pretoria, South Africa, pp: 35-36.
- (27) **He, L., J.L. Bailey and M.M. Buhr, 2001.** Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol. Reprod.*, 64: 69-79.
- (28) **Purdy, P.H. and J.K. Graham, 2004.** Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction and fertility. *Biol. Reprod.*, 71: 522-527.
- (29) **Purdy, P.H., M.H. Fox and J.K. Graham, 2005.** The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, 51: 102-112.
- (30) **Moore, A.I., E.L. Squires and J.K. Graham, 2005.** Adding cholesterol to stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51: 241-249.
- (31) **Galantino-Homer, H.L., W.X. Zeng, S.O. Megee, M. Dallmeyer and D. Voelkl et al., 2006.** Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 638-650.
- (32) **Li, G., J. Saenz, R.A. Godke and R.V. Devireddy, 2006.** Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction*, 131: 875-886.
- (33) **Moce, E. and J.K. Graham, 2006.** Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84: 826-833.
- (34) **Torres, P., C. Serres, C. Gomez-Cuetara, I. Santiago and E. Mateos et al., 2006.** Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 94: 148-151.
- (35) **M. H. T. Troedsson, I. K. M. Liu, and B. G. Crabo, (1998)** Sperm transport and survival in the mare, *Theriogenology*, vol. 49, no. 5, pp. 905–915.
- (36) **Holt, 1997**
- (37) **P. R. Loomis and J. K. Graham, (2008)** Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols, *Animal Reproduction Science*, vol. 105, no. 1-2, pp. 119–128.
- (38) **Holt, W. V. (2000)** Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47–58.

- (39) **Watson, P. F. (1981)** The effects of cold shock on sperm cell membranes. Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. G. J. Morris and A. Clarke, ed. Academic Press, London, UK. Pages 189–218
- (40) **Parks, J. E., and D. V. Lynch. (1992)** Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255–266.
- (41) **White, I. G. (1993)** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:639–658.
- (42) **Amann RP, Pickett BW, (1987)** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7, 145–173.
- (43) **Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, X. Ning, G. D. Moore, J. P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J. G. Alvarez, and G. S. Kopf. (1999)** Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* 274:3235–3242.
- (44) **Christian, A. E., M. P. Haynes, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat. (1997)** Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 38:2264–2272.
- (45) **Purdy, P.H. and J.K. Graham, (2004)** Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction and fertility. *Biol. Reprod.*, 71: 522-527.
- (46) **Purdy, P.H., M.H. Fox and J.K. Graham, (2005)** The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, 51: 102-112.
- (47) **Combes, G.B., D.D. Varner, F. Schroeder, R.C. Burghardt and T.L. Blanchard, (1998)** Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. Proceedings of the 7th International Symposium on Equine Reproduction, July 12-17, 1998, Pretoria, South Africa, pp: 35-36.
- (48) **He, L., J.L. Bailey and M.M. Buhr, (2001)** Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol. Reprod.*, 64: 69-79.
- (49) **Moore, A.I., E.L. Squires and J.K. Graham, (2005)** Adding cholesterol to stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51: 241-249.
- (50) **Galantino-Homer, H.L., W.X. Zeng, S.O. Megee, M. Dallmeyer and D. Voelkl et al. (2006)** Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 638-650.
- (51) **Christiansen, IJ., (1984)** Reproduction in dog and cat. Bailliere Tindall, London, United Kingdom.
- (52) **Smith, S.C., England, G.C.W. (2001)** Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured by computer-aided sperm analysis. *J Reprod Fertil* 57:151–159.
- (53) **Aitken RJ, Fisher H. 1994.** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994;16(4):259–67.
- (54) **Saleh RA, Agarwal A. 2002.** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J Androl* 2002;23(6):737–52.
- (55) **Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA.** Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 2004;36(8): 994–1010.
- (56) **Linde-Forsberg, C., 2001** Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In: Concannon PW, England G.C.W., Verstegen J. (Eds.), Recent advances in Small Animal reproduction , A1209.0501. IVIS, Ithaca, <http://www.ivis.org/>.

- (57) **Mocé E et Graham JK., 2005** : Effect of Egg Yolk, cooling thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm In: The American Society of Andrology (rd.), 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Andrology , Seattle, WA, USA, j andrology Suppl March-April, 79, Abstract 121.
- (58) **Mocé E, Purdy PH, Graham JK, 2010**: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim rerod Sci* 118, 236-247.
- (59) **Companyo M, Iborra A, Villaverde j, Martinez P, Morros A, 2007** : Membrane fluidity changes in goat sperm induced by chelesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochim Bio-phys Acta* 1768, 2246-2255.
- (60) **Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS, 1999** : cholesterol efflux –mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol Chem* 274, 3235-3242.
- (61) **Müller K, Müller p, pincemy g, Kurz A, Labbe C, 2008**: Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol reprod* 78, 390-399.
- (62) **Mao J, Wu GM, Prather RS, Smith MF, Cantley T, Rieke A, Didion BA, Day BN, 2005** : Effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo developpement in the absence or presence of caffeine. *Theriogenology* 64, 1913-1927.
- (63) **Blanch E, Tomas C, Mocé ML, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Mocé E, 2008** : effect of CLC and two diluents on boar sperm cryosurvival. In: Gomez E (ed.), 1<sup>st</sup> Joint International Meeting of AERA-BAS, Gijon, Spain. *Reprod Domest Anim* 43, 71-72 (Abstract P59).
- (64) **Blanch E, Tomas C, Mocé ML, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Mocé E, 2009** : Influencia de la adición de colesterol al semen de verraco y el tiempo de almacenamiento a 16°C sobre la calidad del semen congelado. In : Association Interprofessional para Produccion Agrario-AIDA (ed.), XIII Jornadas sobre Produccion Animal, Zaragoza, Spain. AIDA, Tomo II, pp. 729-731.
- (65) **Tomas C, Gil MA, Mocé E, Hernandez M, Martinez EA, Vazques JM, Roca J, 2009** : Exposure fresh sperm to CLC improves in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. In : de Kruif A, Van Soom A (eds), 13<sup>th</sup> Annual Coinference of the European Society for Domestic animal Reproduction (ESDAR), Ghent, Belgium. *Reprod Domest Anim* 44 (Suppl. 3), 128 (Abstract P172).