

UNIVERSIT
INSTITUT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES



883THV-1

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

Intitulé

**EVALUATION DE L'EFFET DU TRAITEMENT AVANT
CONGELATION AU CHOLESTEROL, α -TOCOPHEROL ET
CYCLODEXTRINES SUR LES PARAMETRES DE MOBILITE
DE LA SEMENCE CANINE REANIMEE**

Présentée par

BENDAHIB Imad et REZAZI Abderrahmane

Le jury

ADEL Djalel, MAA, ISV/UnivBLIDA1

Président

YAHIMI Abdelkrim, MAA, ISV/UnivBLIDA1

Examineur

BELALA Rédha, MAA, ISV/UnivBLIDA1

Promoteur

Promotion 2013-2014

Remerciements

- ❖ Nous remercions ALLAH.
- ❖ Nous remercions nos chers parents, grands-parents, frères et sœurs.
- ❖ Nous remercions vivement notre promoteur *Dr. Belala Redha* pour le soutien moral qu'il nous a apporté tout au long de l'année pour la mise sur pied de ce mémoire.
- ❖ Nous remercions **Professeur Iguer Ouada Mokrane** pour l'analyseur de semence et les traitements.
- ❖ Nous remercions **Dr Nabi Ibrahim**.
- ❖ Nos sincères remerciements vont à :
 - ❖ *Dr Yahimi et Dr Adel* pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.
- ❖ Nous remercions Dr. Lafri et tous les ingénieurs du LBRA
- ❖ A tous ceux qui nous ont enseigné pendant toute notre vie.
- ❖ A notre collègue *Ledra Nerimane* qui nous aidions pendant tout le travail.
 - ❖ On remercie également tout le personnel de
L'INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRE DE BLIDA.

DEDICACES

Je dédie ce travail...

A, mon père et à ma très chère mère qui m'ont chaleureusement aidé,

A, mes chères sœurs souad, imene, soumia et samia à mes frères fares, mohamed et raouf et qui ont su me donner de précieux conseils et aider dans les moments difficiles,

A tous mes nièces,

A toute la famille Bendahib et à toute la famille Melouah,

A, mes cousins Bilel et Mohamed pour leurs encouragements,

A, tous mes amis surtout youcef, hakim, redouane, oussama, badis, mohamed berkok, et ceux de la cité universitaire.

A mon binome Abderahmene qui a été toujours à coté de moi

A, ma camarade nerimene qui a nous aidions beaucoup, un grand merci pour lui.

A tous mes amis et copains d'études, et surtout pour Ibtissem Baali et Nesrine bouadjnek

Aux prochaines promotions que je ne manquerai pas

D'encourager,

A tous ceux que j'aime.

Bendahib Imad

DEDICACES

A mes parents, qui m'ont assuré leur soutien infaillible tout au long de mon parcours, Je leurs offre mes éternels remerciements.

*A mon frère **Mohamed**, mes sœurs **Asma, Sarah, et Soumia***

*A mes nièces **Rahil et Kawthar***

A tous mes cousins et cousines.

*A mon binôme **Imad** qui a été toujours à coté de moi.*

*A mes amis **Redouane, Housseem, Akli, makhlouf, Hakim, Anouar, Youcef, Mokhtar et Nabil** .*

*Et tout particulièrement à **Narimane** qui nous aides beaucoup durant ce travail.*

Je dédie ce travail en leur souhaitant la réussite.

Abderrahmane

ملخص

إن هذا البحث يتمثل في اختبار فعالية علاج ما قبل التجميد المطبق على منى الكليبات بإضافة مادة الكولستيرول، الألفا توكوفيرول و كذا السيكلو دكسترين، و ذلك عن طريق تحليل معايير التحرك بواسطة جهاز التحليل الحاسوبي بعد إزالة التجميد (الإنعاش).

لقد تم تقييم ثلاثة علاجات مختلفة و هي كالتالي: العلاج بإضافة مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين (Test4 : CLC)، العلاج بإضافة مادة الألفا توكوفيرول المركبة على السيكلودكسترين (Test 5 : CD-VitE) و العلاج بإضافة مزيج من كلا المركبين السابقين الذكر (Test 6 : CLC+CD-VitE).

أظهرت نتائج هذا البحث ما يلي:

- إن علاج ما قبل التجميد المطبق على منى الكليبات بإضافة جرعة 5 مع لكل 100 مليون حيوان منوي من مادة الكوليستيرول المركبة على السيكلودكسترين (Test4 : CLC) يحسن من معايير التحرك المراقبة بعد الإنعاش و ذلك بشكل قطعي إحصائيا بالمقارنة مع الشاهد.
- إن علاج ما قبل التجميد المطبق على منى الكليبات بإضافة جرعة 0.1 ميلي مول من مادة الألفا توكوفيرول المركبة على السيكلودكسترين (Test 5 : CD-VitE) يحسن من معايير التحرك المراقبة بعد الإنعاش و ذلك بشكل قطعي إحصائيا بالمقارنة مع الشاهد.
- إن علاج ما قبل التجميد المطبق على منى الكليبات بإضافة مزيج من كلا المركبين السابقين الذكر (Test 6 : CLC+CD-VitE) يحسن من معايير التحرك المراقبة بعد الإنعاش و ذلك بشكل قطعي إحصائيا بالمقارنة مع الشاهد، و كذلك بالمقارنة مع كلا العلاجين الفرديين سابقين الذكر.

الكلمات-المفتاح: منى الكليبات - التجميد - العلاج - السيكلو دكسترين - الكوليستيرول - الألفا توكوفيرول - 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, la vitamine E et les cyclo dextrines au moyen de l'analyse des paramètres de mobilité par système informatique après réanimation.

Trois traitements différents ont été évalués à savoir le cholestérol inclus au cyclodextrines (Test4 : CLC), la vitamine E incluse au cyclodextrine (Test 5 : CD-VitE) et l'association des deux complexes d'inclusion précédents (Test 6 : CLC+CD-VitE).

Les résultats ont montré que :

- Le traitement avant congélation de la semence canine avec le cholestérol complexé au cyclo dextrines (CLC) à la concentration de $5 \text{ mg}/100 \times 10^6 \text{ spz}$ améliore de façon statistiquement significative les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée par rapport au contrôle.
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec de la vitamine E (α -tocophérol) complexée pour la première fois aux cyclo dextrines (à la concentration de 0.1 mM) améliore de façon statistiquement significative les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée par rapport au contrôle.
- L'association des deux complexes d'inclusion (CLC + CD-VitE) améliore les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée de façon statistiquement significative par rapport au contrôle au aussi par rapport au traitement individuel par l'un ou l'autre des deux complexes d'inclusion cités ci-dessus.

Mots-clés : Semence canine – Congélation – Traitement – Cyclo-dextrines – Cholestérol – Vitamine E – Analyseur informatique.

ABSTRACT

The present work consist of an efficacy evaluation of pre-freezing treatment of dog sperm with cholesterol, vitamin E and cyclodextrins by the mean of analysis of motility parameters performed with CASA (Computerized Aided Sperm Analysis) after thawing.

Three treatments have been evaluated: cyclodextrin pre-loaded with cholesterol (Test4 : CLC), cyclodextrins preloaded with vitamin E (Test 5 : CD-VitE) and the association of both previously mentioned inclusion complexes (Test 6 : CLC+CD-VitE).

Results showed that :

- Treating the dog semen before freezing with 5 mg / 100 x 10⁶ spz of Cyclodextrins pre-loaded with cholesterol "CLC" improved the motility parameters of thawed semen in a way statistically significant compared to control.
- Treating the dog semen before freezing with 0.1 mM of Vitamin E pre-loaded to Cyclodextrins improved the motility parameters of thawed semen in a way statistically significant compared to control.
- Association of both inclusion complexes (CLC + CD-VitE) at half concentration improved the motility parameters of thawed semen in a way statistically significant compared to control and also compared to individual treatment by previously mentioned complexes.

Key-words : Semence canine – Congélation – Traitement – Cyclo-dextrines – Cholestérol – Vitamine E – Analyseur informatique.

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	5
RESUME	6
ABSTRACT	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
TABLE DES MATIERES.....	10
INTRODUCTION	12
REVUE DE LA LITTERATURE	14
1. La semence canine.....	15
1.1. Caractéristiques générales de la semence canine :	15
1.2. Composition de la semence canine.....	16
1.2.1. Le spermatozoïde	16
1.2.2. Le liquide séminal	16
2. Evaluation de la semence canine.....	17
2.1. Les examens de routine :	17
2.1.1. Le spermogramme.....	17
2.1.2. Le spermocytogramme :	18
2.2. L'analyse informatique de la semence.....	19
3. La cryoconservation de la semence canine.....	20
3.1. Définition	20
3.2. Objectifs de la cryoconservation	20
3.3. Le dilueur.....	21
3.3.1. Définition	21
3.3.2. Rôle et caractéristique du dilueur (19).....	21

3.4. Les étapes de la congélation	21
3.4.1. Centrifugation.....	21
3.4.2. La dilution	21
3.4.3. L'équilibration.....	21
3.4.4. Le conditionnement.....	22
3.4.5. La congélation	22
3.4.6. Le stockage	22
3.4.7. La décongélation	22
4. Le traitement de la semence	22
4.1. Effet des antioxydants :	23
4.2. Effet du Cholestérol et des Cyclo-dextrines.....	23
PARTIE EXPERIMENTALE.....	25
INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	26
MATERIELS ET METHODES :	27
1. Animaux	27
2. Récolte et évaluation initiale de l'éjaculat :	27
3-Préparation des dilueurs et traitement de la semence :	28
3.1. Préparation des complexes cyclo dextrines	28
3.2. Préparation des dilueurs expérimentaux	29
3.3. Traitement de la semence.....	29
4-Technique de congélation et de décongélation :	30
5. Analyse informatique de la semence.....	31
6. Analyse statistique.....	32
RESULTATS.....	33
DISCUSSION.....	38
CONCLUSION	41
REFERENCES	42

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.

Le métabolisme normal du spermatozoïde produit en faibles quantités des espèces oxygénées réactives (EOR) ou (ROS) appelées aussi radicaux libres pouvant être toxiques pour la cellule dont essentiellement l'anion superoxide, l'hydroperoxyl et l'hydroxyl. Le spermatozoïde dispose de plusieurs systèmes antioxydants de défense maintenant la balance en équilibre entre la production et la réduction de ces produits toxiques. Une faible quantité de ces espèces oxygénées réactives est nécessaire pour que le spermatozoïde acquière la capacité de fertiliser l'ovocyte.

Les procédés de conservation de la semence canine exacerbent d'une part la production des radicaux libres et compromettent d'autre part les systèmes antioxydants physiologiques du sperme (enzymatique et non-enzymatique). Ce stress oxydant qui en résulte a un effet délétère sur la qualité du sperme conservé compromettant ainsi son pouvoir fertilisant et sa capacité de développement après fertilisation. L'addition d'antioxydants dans le dilueur est une alternative qui limite le stress oxydant et protège le spermatozoïde pendant la conservation.

La vitamine E (α -tocophérol) est un antioxydant puissant capable de neutraliser en toute efficacité le peroxy et d'autres radicaux libres dérivés des lipides impliqués dans les réactions de propagation de la peroxydation des lipides. Ainsi, la vit E est l'un des plus puissants antioxydants qui donnent fin à la propagation de la peroxydation des lipides (26).

En plus du problème de stress oxydant, 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 du stress oxydant et celui de la stabilité membranaire, un traitement avant congélation de la semence canine associant à la fois du cholestérol et de l' α -tocophérol est envisageable. L'action complémentaire des deux molécules assurerait une protection du spermatozoïde et essentiellement une stabilité de sa membrane plasmique pendant la conservation. Cependant, ces deux molécules lipophiles ne sont pas solubles dans le milieu de conservation.

Les Cyclo-dextrines ont des facultés de capter les molécules lipophiles et de les solubiliser en milieux aqueux par la formation de complexe d'inclusion de ces substances. 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 canine.

La vitamine E (α -tocophérol) a été rapportée comme l'antioxydant le plus efficace dans la congélation comme la réfrigération de la semence canine (14, 15). Cependant, aucun auteur n'a tenté jusque-là de complexer l' α -tocophérol aux cyclo-dextrines.

Sur la base de tout ce qui précède, le présent travail se base sur l'idée d'associer dans le même traitement précédant la congélation de la semence canine, les deux complexes d'inclusion (CD-Chl + CD-VitE) de façon à obtenir une action **complémentaire** entre le cholestérol et la vitamine E, ainsi qu'un effet **potentialisateur** des cyclo-dextrines « CDs ». Cette nouvelle association des deux complexes d'inclusion devrait donner une meilleure protection à la semence canine.

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

1.2. Composition de la semence canine

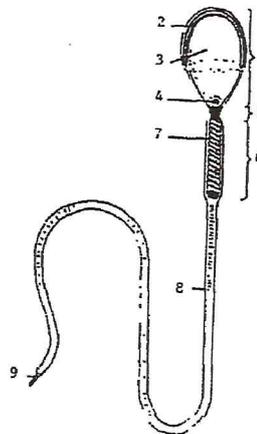
1.2.1. Le spermatozoïde

1.2.1.1. Définition.

Le spermatozoïde est le gamète mâle. Il mesure entre 62 et 66 μm ; sa queue mesure 55 μm . (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 (prostata et les glandes de littre). 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^{ème} ou 1/200^{ème}.

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 μm , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.
- Le «BCF» (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz 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 fois 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°C d'une suspension de cellules après leur préparation. Cette conservation peut-être dure plusieurs années et son utilisation après réchauffement à une température de 37°C (18).

3.2. Objectifs de la cryoconservation

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'années 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 est employé pour diluer la semence et qui protège 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 faut pas qu'être trop rapide pour éviter de nuire les 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 317°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. Les plus importants se rapportent aux antioxydants pour leur effet contre le stress oxydatif.

4.1. Effet des antioxydants :

Les radicaux libres « ROS : Reactive oxygen species » libérés à des faibles quantités par les spermatozoïdes et les leucocytes dans le liquide séminal jouent le rôle de médiateurs dans le fonctionnement normal du spermatozoïde. Leur libération est exacerbée par le processus de cryoconservation, et cette augmentation peut-être responsable d'altérations du sperme chez les mammifères (29-31), associée à une diminution de la motilité spermatique, diminution de la fertilité et la capacitation oocyte-spermatozoïde.

Les antioxydants peuvent réduire l'impact du stress oxydatif et améliorer la qualité de la semence après décongélation. Les antioxydants ne se limitent pas à l'élimination des radicaux libres mais jouent un rôle important dans la fonctionnement physiologique chez les spermes des mammifères (29,32-37).

Plusieurs agents antioxydants ont été évalués dans le traitement avant congélation de semence chez diverses espèces domestiques. La vitamine E, la vitamine C, la catalase, la taurine, le dimethylsulphoxide, l'hypotaurine et la N-acetylcysteine, sont déjà testés in vitro et in vivo pour le traitement des spermes humain, bovin, porc, équin, lapin. (38-44).

Quant au cas particulier de la semence canine, la littérature n'offre que très peu de données relatives.

En 2006, une étude a rapporté l'efficacité d'une supplémentation par voie orale de la vitamine E chez le chien contre le stress oxydatif induit par un traitement à la dexaméthasone (45, 46).

Ce n'est qu'en 2008 et en 2009 qu'apparaissent pour la première fois deux études sur l'effet de plusieurs antioxydants dans le traitement de supplémentation des dilueurs de congélation et de réfrigération de la semence canine. La vitamine E (0.1mM) a donné les meilleurs résultats dans la congélation et la réfrigération de la semence canine (14, 15).

4.2. 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 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. De plus, à notre connaissance, et en matière de traitement de la semence avant congélation, aucune étude n'a eu pour objectif d'étudier l'effet d'un complexe d'inclusion entre la vitamine E et les cyclo-dextrines.

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 parti 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 d'un stress oxydant additionnel et 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 les deux aspects problématiques de la conservation du sperme évoqués plus haut, nous envisageons pour la première fois, l'association de l' α -tocophérol et le cholestérol complexés par inclusion aux cyclodextrines (M β CDs).

Nous recherchons par cette association, une action complémentaire éventuellement potentialisée par les cyclodextrines (M β CDs) qui jouent le rôle d'excipient en solubilisant les deux molécules lipophiles dans le milieu de conservation.

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 récolte.

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 des complexes cyclo dextrines

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.

Complexe CD-vitE :

- Peser 282,3mg de vit E avec 794,28mg de CD.
- Mettre dans agitation pendant 2h , puis dans l'étuve pendant 48h.

Préparation des milieux expérimentaux de conservation :

CDs	Chl	Vit E	CD-Chl	CD-VitE	CD-Chl-Vit E
35,5mg+5ml de tris buffer(TB)	20mg+5ml de TB	1,2mg+10ml de tris b	54,3mg+5ml de TB(2)	9,2mg +10ml TB(1)	1ml de (1) +1,5mlTB+(2)

La préparation de ces complexes a été faite au niveau du laboratoire de chimie des procédés à l'Université de Bejaïa. Ils ont été récupérés sous forme de cristaux et ont 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 des dilueurs expérimentaux

- **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.

- **CDs - α-tocopherol complexe:**

Une solution de travail a été préparée en ajoutant 9,2 mg du complexe CLC à 10 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.

These working solutions have been stored at 4°C and only the required volume (0,5 ml) for treatment is taken off and put at room temperature before use.

- **Association des deux complexes d'inclusion:**

L'association des deux complexes est obtenue en mixant à moitié volume, les deux solutions de travail précédemment décrites.

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 PénicG 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^{er} tube sans traitement ajouté, contient tout simplement un dilueur Tris-base et est considéré comme témoin (Test), le 2^{ème} avec un dilueur qui contient le CLC (cyclodextrins pre-loaded with cholesterol) (Test 4), le 3^{ème} dilueur contient la vitamine E complexée aux cyclodextrines (Test 5), le 4^{ème} dilueur (Test6) contient une association des deux complexes précédents « CLC + Vit E » obtenue en ajoutant $\frac{1}{2}$ volume de chaque complexe ($250\mu\text{l} + 250\mu\text{l}$).

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 équilibration à 4°C pendant deux (02) heures. Au bout de cette équilibration à 4°C, un volume de de semence (10 μl) 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), a high-speed digital camera (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. Paramètres de vitesse (VCL, VSL, VAP, BCF, ALH)
 - A. One-Way-Anova + Tukey test
- Curvilinear Velocity (VCL) :

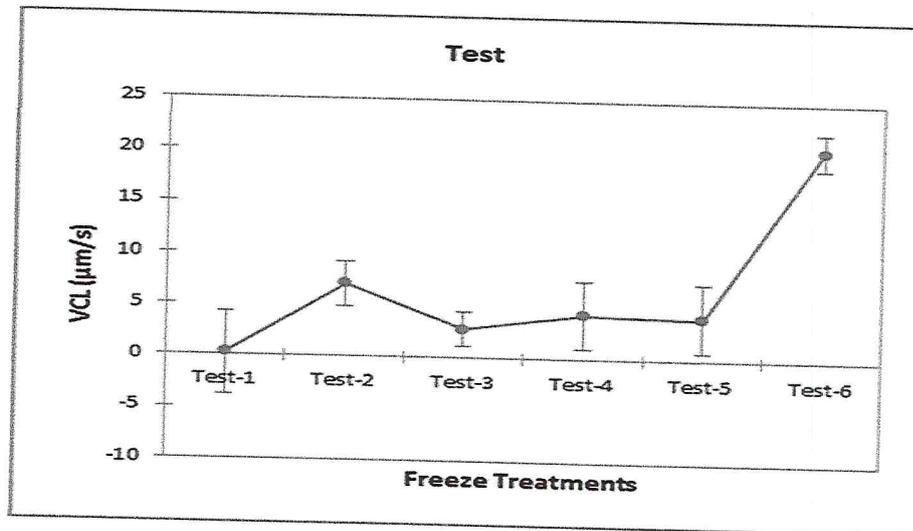


Figure 01: Representation of VCL means per treatment.

(Test1: Contrôle – Test2: « CD » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins – Test5: “CD-VitE” Vitamine E complexée aux cyclodextrines – Test6: “CLC+CD-VitE” Association des deux complexes d’inclusion précédents)

Table N° 01: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters (VCL) of canine semen as measured by CASA.

Freeze Treatment	Mean \pm SEM
CLC+CD-E	20,443 \pm 1.40 ^a
CDs	7,104 \pm 0.42 ^b
CLC	4,366 \pm 1.54 ^b
CD-E	4,131 \pm 1.38 ^{bc}
CHL	2,828 \pm 0.57 ^c
Control	0,240 \pm 0.16 ^c

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

- Straight-line Velocity (VSL) :

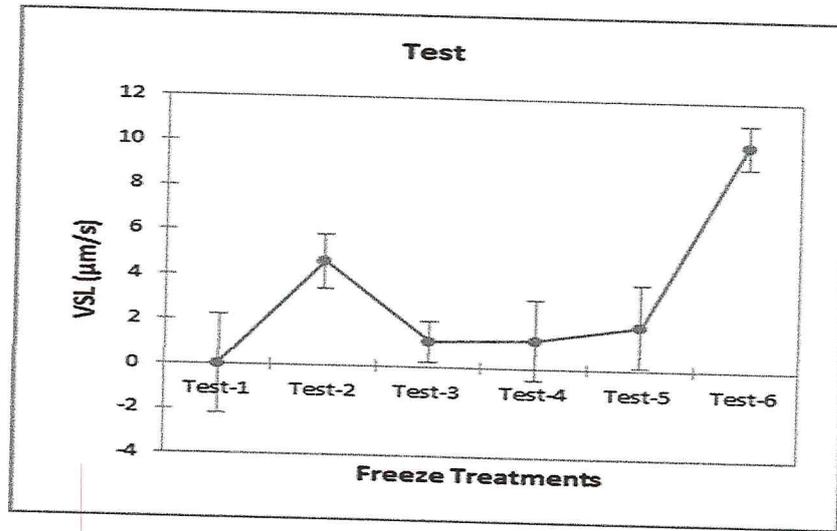


Figure 02: Representation of VSL means per treatment.

(Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins – Test5: “CD-VitE” Vitamine E complexée aux cyclodextrines – Test6: “CLC+CD-VitE” Association des deux complexes d’inclusion précédents)

Table N° 02: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters (VSL) of canine semen as measured by CASA.

Freeze Treatment	Mean \pm SEM
CLC+CD-E	10,053 \pm 0,496 ^a
CDs	4,648 \pm 0,618 ^d
CD-E	1,950 \pm 0,955 ^{bc}
CLC	1,273 \pm 0,927 ^c
CHL	1,142 \pm 0,480 ^c
Control	0,009 \pm 1,125 ^c

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

- Average-pathway Velocity (VAP) :

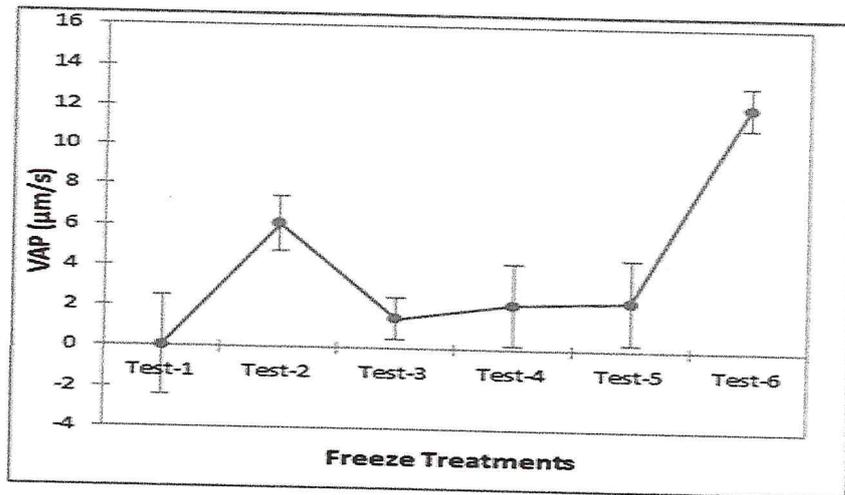


Figure 03: Representation of VAP means per treatment.

(Test1: Contrôle – Test2: « CD » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins – Test5: “CD-VitE” Vitamine E complexée aux cyclodextrines – Test6: “CLC+CD-VitE” Association des deux complexes d’inclusion précédents)

Table N° 03: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters (VAP) of canine semen as measured by CASA.

Freeze Treatment	Means \pm SEM
CLC+CD-E	12,153 \pm 0,551 ^a
CDs	6,082 \pm 0,687 ^b
CD-E	2,419 \pm 1,061 ^c
CLC	2,227 \pm 1,030 ^c
CHL	1,497 \pm 0,534 ^c
Control	0,062 \pm 1,250 ^c

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

2. Paramètres (ALH et BCF) :

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH) :

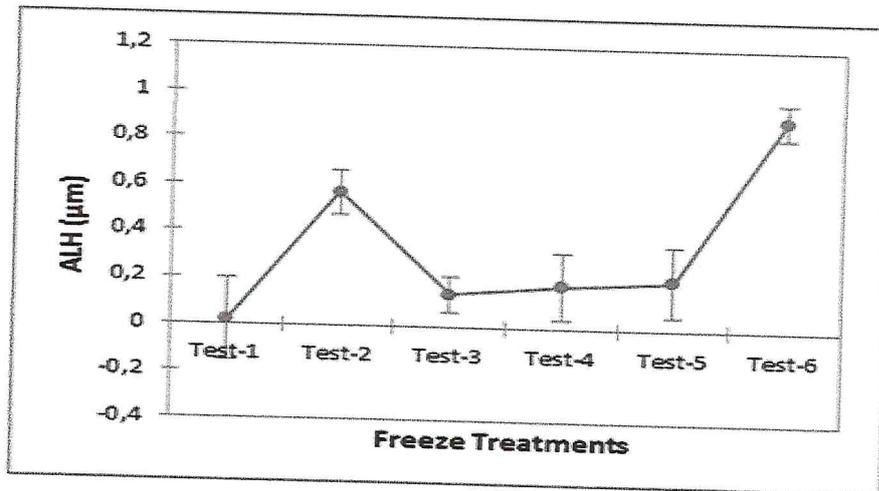


Figure 04: Representation of ALH means per treatment.

(Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins – Test5: “CD-VitE” Vitamine E complexée aux cyclodextrines – Test6: “CLC+CD-VitE” Association des deux complexes d’inclusion précédents)

Table N° 04: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters (ALH) of canine semen as measured by CASA.

Freeze Treatments	Mean \pm SEM
CLC+CD-E	0,896 \pm 0,039 ^a
CDs	0,567 \pm 0,049 ^b
CD-E	0,208 \pm 0,076 ^c
CLC	0,183 \pm 0,074 ^c
CHL	0,141 \pm 0,038 ^c
Control	0,021 \pm 0,089 ^c

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

- Beat cross frequency (BCF) :

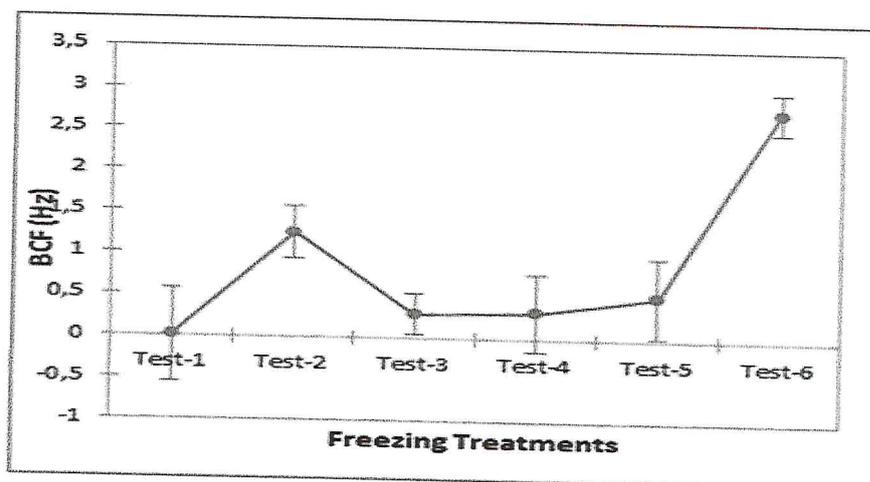


Figure 05: Representation of BCF means per treatment.

(Test1: Contrôle – Test2: « CDs » Cyclo dextrines seules – Test3: « CHL » Cholestérol non complexé – Test4: « CLC » Cholesterol-loaded-cyclodextrins – Test5: “CD-VitE” Vitamine E complexée aux cyclodextrines – Test6: “CLC+CD-VitE” Association des deux complexes d’inclusion précédents)

Table N° 05: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters (BCF) of canine semen as measured by CASA.

Freeze Treatments	Mean \pm SEM
CLC+CD-E	2,752 \pm 0,126 ^a
CDs	1,253 \pm 0,158 ^b
CD-E	0,512 \pm 0,244 ^b ^c
CLC	0,321 \pm 0,236 ^c
CHL	0,289 \pm 0,123 ^c
Control	0,01 \pm 0,287 ^c

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

Table N°06: Least square means (\pm SEM) for post thaw parameters of canine semen as measured by CASA.

Freezing Treatments	VCL (μ m/sec)	VSL (μ m/sec)	VAP (μ m/sec)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
CLC+CD-E	20,443 \pm 1.40 ^a	10,053 \pm 0,496 ^a	12,153 \pm 0,551 ^a	0,896 \pm 0,039 ^a	2,752 \pm 0,126 ^a
CDs	7,104 \pm 0.42 ^b	4,648 \pm 0,618 ^b	6,082 \pm 0,687 ^b	0,567 \pm 0,049 ^b	1,253 \pm 0,158 ^b
CD-E	4,131 \pm 1.38 ^{bc}	1,950 \pm 0,955 ^{bc}	2,419 \pm 1,061 ^c	0,208 \pm 0,076 ^c	0,512 \pm 0,244 ^b ^c
CLC	4,366 \pm 1.54 ^b	1,273 \pm 0,927 ^c	2,227 \pm 1,030 ^c	0,183 \pm 0,074 ^c	0,321 \pm 0,236 ^c
CHL	2,828 \pm 0.57 ^c	1,142 \pm 0,480 ^c	1,497 \pm 0,534 ^c	0,141 \pm 0,038 ^c	0,289 \pm 0,123 ^c
Control	0,240 \pm 0.16 ^c	0,009 \pm 1,125 ^c	0,062 \pm 1,250 ^c	0,021 \pm 0,089 ^c	0,01 \pm 0,287 ^c

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 \pm SEM.

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

DISCUSSION

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).

Ce traitement avec le froid (-96°C) altère significativement le système enzymatique antioxydant du spermatozoïde (système SOD SuperOxyde-Dismutase) d'une part et exacerbe d'autre part la libération des radicaux libres (ROS : Reactive Oxygen Species). Les spermatozoïdes sont vulnérables à l'action des radicaux libres (ROS) à cause de la présence excessive d'acides gras polyinsaturée. Le résultat de ces modifications est un impact négatif du stress oxydatif sur le spermatozoïde réanimé après congélation.

Le traitement de la semence canine avec la vitamine E (α -tocophérol) avant congélation permettrait de protéger le spermatozoïde canin contre l'action du stress oxydatif en réduisant l'impact négatif des radicaux libres (ROS) sur les spermatozoïdes. Dans notre étude, nous avons opté pour la vitamine E, car elle est rapportée comme étant l'antioxydant le plus efficace chez le chien (14, 15).

En effet, nous observons dans nos résultats (Figures et Tableaux n° 1-5) que le dilueur traité à la vitamine E (Test5 :CD-VitE) améliore significativement ($P < 0.05$) par rapport au contrôle (Test 1) tous les cinq paramètres de mobilité évalués sur le spermatozoïde canin réanimé à savoir (VCL, VSL, VAP, BCF, ALH).

Cet effet protecteur du spermatozoïde canin contre le stress oxydatif était attendu, car le même effet est rapporté dans la congélation et la réfrigération du sperme canin lors des travaux de Michael et ses collaborateurs en 2008 et 2009 (14, 15). Avant ces travaux, il n'existait pas de données dans la littérature sur la supplémentation en vitamine E du dilueur de conservation de la semence canine.

Une étude antérieure chez le chien a montré que la vitamine E administrée par voie orale contre balance les effets négatifs induits expérimentalement par un traitement à la dexaméthasone sur la qualité spermatique (65).

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 spermatozoïdes équin, bovin et ovin par le cholestérol (CLC) avant congélation donne une grande cryosurvie par rapport 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 le dilueur de 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.

Nous avons traité le dilueur de congélation avec 5mg de CLC par 100 millions spermatozoïdes à la température ambiante (22°C) pendant une durée d'incubation oscillant entre 15 et 30 minutes. La concentration de 5 mg / 100 10⁶ spz s'est avérée la plus adaptée lors d'une étude préliminaire comparative entre plusieurs concentrations (5mg ver 2.5 mg ver 1.5 mg) non rapportée dans le présent travail.

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 a permis

effectivement d'améliorer significativement ($P < 0.05$) par rapport au contrôle (Test 1) tous les cinq paramètres de mobilité évalués sur le spermatozoïde canin réanimé à savoir (VCL, VSL, VAP, BCF, ALH).

Il est à remarquer (Voir Tableau n° 06) que les résultats du traitement au CLC (Test 4) ne diffèrent pas significativement de ceux du traitement à la vitamine E (Test 5) pour les paramètres de mobilité suivants : VAP, ALH et BCF.

Nous observons également que même si la différence est statistiquement très faible, les résultats obtenus par la vitamine E (Test 5 : CD-Vit E) sont légèrement plus élevés que ceux associés au CLC pour la VSL avec respectivement les valeurs suivantes $1,950 \pm 0,955$ vers $1,273 \pm 0,927$ $\mu\text{m}/\text{sec}$. Par contre, la moyenne de la VCL est plus élevée dans le traitement à la vitamine E (test 5 : cd-Vit E) par rapport au traitement au cholestérol (Test 4 : CLC) avec respectivement les valeurs suivantes $4,366 \pm 1.54$ vers $4,131 \pm 1.38$ $\mu\text{m}/\text{sec}$.

L'association des deux traitements (CLC + CD-Vit E) à demi concentration a permis d'améliorer considérablement et de façon statistiquement significative ($p < 0.05$) les cinq paramètres de mobilité évalués à savoir VCL, VSL, VAP, BCF et ALH par rapport au contrôle avec respectivement les moyennes suivantes $20,443 \pm 1.40$ ver $0,240 \pm 0.16$; $10,053 \pm 0,496$ ver $0,009 \pm 1,125$; $12,153 \pm 0,551$ ver $0,062 \pm 1,250$; $0,896 \pm 0,039$ ver $0,021 \pm 0,089$ et enfin $2,752 \pm 0,126$ ver $0,01 \pm 0,287$.

En plus de la différence au contrôle, cette association, et comme attendu, a permis d'améliorer considérablement et de façon statistiquement significative ($p < 0.05$) les cinq moyennes évaluées (VCL, VSL, VAP, BCF et ALH) par apport aux deux traitements individuels par le cholestérol (Test 4 : CLC) et par la vitamine E (Test 5 : CD-VitE) avec respectivement les résultats suivants $20,443 \pm 1.40$ ver $4,366 \pm 1.54$ ver $4,131 \pm 1.38$; $10,053 \pm 0,496$ ver $1,273 \pm 0,927$ ver $1,950 \pm 0,955$; $12,153 \pm 0,551$ ver $2,227 \pm 1,030$ ver $2,419 \pm 1,061$; $0,896 \pm 0,039$ ver $0,183 \pm 0,074$ ver $0,208 \pm 0,076$ et enfin $2,752 \pm 0,126$ ver $0,321 \pm 0,236$ ver $0,321 \pm 0,236$.

Il est à conclure, dans les conditions de cette expérimentation que, le traitement avant congélation de la semence canine au cholestérol (CLC) et à la vitamine E inclus au cyclo dextrines améliore les paramètres de mobilité évalués par analyseur informatique du spermatozoïde canin réanimé. L'association des deux complexes d'inclusion assure une amélioration plus marquée de la mobilité après décongélation.

CONCLUSION

Nous concluons de ce travail ce qui suit :

- Le traitement avant congélation de la semence canine avec le cholestérol complexé au cyclo dextrines (CLC) à la concentration de $5 \text{ mg}/100 \times 10^6 \text{ spz}$ améliore de façon statistiquement significative les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée par rapport au contrôle.
- Le traitement avant congélation de la semence canine avec de la vitamine E (α -tocophérol) complexée pour la première fois aux cyclo dextrines (à la concentration de 0.1 mM) améliore de façon statistiquement significative les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée par rapport au contrôle.
- L'association des deux complexes d'inclusion (CLC + CD-VitE) améliore les paramètres de mobilité de la semence canine réanimée de façon statistiquement significative par rapport au contrôle au aussi par rapport au traitement individuel par l'un ou l'autre des deux complexes d'inclusion cités ci-dessus.

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 compagny, 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. Elviesier, 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) **Michael AJ, Alexopoulos C et al ; 2008**
- (15) **A. Michael a, C. Alexopoulos a, E. Pontiki b, et al ; 2009.** Effect of antioxidant supplementation in semenextenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal Reproduction Science 112 (2009) 119-135
- (16) **Mocé E, Blanch E, Tomas C and Graham JK.; (2010)** "Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives of Futur" Reprod Dom Anim 45 (Supplem 2), 57-66 (2010).
- (17) **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.
- (18) **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.
- (19) **Fontbonne A. (1991)** Contribution à l'étude du sperme de chien : influence de la glycérolisation et de la dilution. Thèse Mède, Vèt, Alfort.
- (20) **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.

- (21) **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.
- (22) **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.
- (23) **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.
- (24) **Navratil et al., 2003**
- (25) **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.
- (26) **Silva PFN, (2006)** Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD thesis – Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine ISBN: 90-393-4286-5.
- (27) **Linde-Forsberg C, Forsberg M. (1989)** Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil;(Suppl 39):*299–310.
- (28) **Watson PF. (2000)** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci;*60–61:481–92.
- (29) **Griveau JF, Le Lannou D. (1997)** Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20:61–9.
- (30) **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.
- (31) **Neild DM, Gabella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Aguero A. (2003)** Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693–705.
- (32) **Aitken RJ, Fisher H. (1994)** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16(4):259–67.
- (33) **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.
- (34) **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.
- (35) **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.
- (36) **Moore, A.I., E.L. Squires and J.K. Graham, 2005.** Adding cholesterol to stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51: 241-249.
- (37) **Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. (2006)** What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 67:2–8.
- (38) **Alvarez JG, Storey BT. Taurine, Hypotaurine, (1983)** Epinephrine and Albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29:548–55.
- (39) **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.

- (40) 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.
- (41) Moce, E. and J.K. Graham, 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84: 826-833.
- (42) 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.
- (43) A. Michael a, C. Alexopoulos a, E. Pontiki b, et al; 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68 (2007) 204–212
- (44) Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. (2003) Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78:85–98.
- (45) Cassani P, Beconi MT, O'Flaherty C. (2005) Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim Reprod Sci* 86:163–73.
- (46) Hatamoto LK, Sobrinho BCA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM. (2006) Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 66:1610–44.
- (47) 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.
- (48) Holt, 1997
- (49) 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.
- (50) Holt, W. V. (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47–58.
- (51) 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
- (52) 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.
- (53) 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.
- (53) Amann RP, Pickett BW, (1987) Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7, 145–173.
- (54) 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.
- (55) 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.
- (56) 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.

- (57) 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.
- (58) 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.
- (59) 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.
- (60) Moore, A.I., E.L. Squires and J.K. Graham, (2005) Adding cholesterol to stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51: 241-249.
- (61) 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.
- (62) Christiansen, IJ., (1984) *Reproduction in dog and cat*. Bailliere Tindall, London, United Kingdom.
- (63) 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.
- (64) (64) Aitken RJ, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994;16(4):259-67.
- (65) Hatamoto LK, Sobrinho BCA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM. 2006. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 2006;66:1610-44.
- (66) Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J Androl* 2002;23(6):737-52.
- (67) 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.
- (68) 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/>.