

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Optimisation de la cryoconservation de la
semence du bélier**

Présentée par : **BENHENIA Karim**

Les membres du jury :

Mme. AIN BAAZIZ Hacina	Professeur	ENSV d'Alger	Présidente
Mr. LAMARA Ali	MCA	ENSV d'Alger	Directeur de thèse
Mme. TEMIM Soraya	Professeur	ENSV d'Alger	Co-directrice de thèse
Mr. GHOZLANE Faissal	Professeur	ENSA d'Alger	Examineur
Mr. SAFSAF Boubakeur	MCA	Université de Batna	Examineur
Mr. BENOUNE Omar	MCA	Université de Batna	Examineur

Année universitaire : 2016/2017

Résumé

Durant la cryoconservation, la membrane plasmique du spermatozoïde du bélier présente une susceptibilité très élevée au choc au froid et à la peroxydation des lipides membranaires.

L'objectif de ce travail était de développer une nouvelle approche de cryoconservation de la semence du bélier. Cette approche consistait en la protection simultanée contre le choc au froid et la peroxydation des lipides en traitant le sperme, avant congélation, par les complexes, Cyclodextrine – Cholestérol (CD-CHL) et Cyclodextrine-Vitamine E (CD-Vit E).

A cet effet, deux expérimentations ont été menées : l'**Expérimentation 1** a été réalisée pour étudier l'impact bénéfique du cholestérol (CHL) et de la vitamine E lorsqu'ils sont pré-chargés dans la cyclodextrine (CD), seul ou associée, sur le sperme épидidymaire cryoconservé. L'**Expérimentation 2** a été effectuée pour optimiser la concentration de CD-Vit E associée à la CD-CHL (2mg/120x10⁶ Spz) pour la cryoconservation du sperme d'éjaculat du bélier de race *Ouled Djellal*.

Les résultats montrent, qu'après décongélation, l'association de CD-Vit E avec CD-CHL (CD-CHL-Vit E) améliore significativement ($P < 0.05$) la mobilité totale, la mobilité progressive, la fonctionnalité de la membrane, les différentes vitesses de mobilité (VCL, VSL, VAP) et LIN par rapport au contrôle et aux autres traitements. De même que, CD-CHL-Vit E confère une protection significativement ($P < 0.05$) plus élevée contre la peroxydation des lipides membranaires. Par ailleurs, nos expériences indiquent que la concentration de 2 mg de CD-Vit E est, significativement la plus efficace pour l'amélioration des paramètres suscités ainsi que la viabilité des spermatozoïdes et leur protection contre la peroxydation des lipides membranaires par rapport au contrôle et aux autres concentrations de 4 et 6mg.

En conclusion, nos résultats révèlent que la nouvelle approche associant, à la fois, les 2 complexes CD-CHL et CD-Vit E dans le milieu de congélation améliore significativement le taux de survie des spermatozoïdes du bélier après décongélation. De plus, les résultats obtenus montrent que la concentration optimale du complexe CD-Vit E associé au complexe CD-CHL, pour la cryoconservation du sperme du bélier de race *Ouled Djellal*, est de 2mg/120x10⁶ Spz.

Mots clés: Cyclodextrine, Cholestérol, Vitamine E, Mobilité, Fonctionnalité de la membrane, Peroxydation des lipides.

Abstract

During cryopreservation, plasma membrane of ram spermatozoa presents a very high susceptibility to cold shock and lipid peroxidation.

The objective of this work was to develop a new approach for the cryopreservation of ram sperm. This approach consisted of simultaneous protection against cold shock and lipid peroxidation by a pre-freezing treatment of sperm with the complexes, Cyclodextrin-Cholesterol (CD-CHL) and Cyclodextrin-Vitamin E (CD-Vit E).

For this purpose, 2 experiments were conducted: **Experiment 1** was carried out to investigate the potential benefit of vitamin E (Vit E) and cholesterol (CHL) when preloaded in cyclodextrins (CD), alone or in association to protect ram epididymal sperm during the freezing-thawing process. **Experiment 2** was performed to optimize the concentration of CD-Vit E associated with CD-CHL (2mg /120x10⁶Spz) for *Ouled Djellal* breed ram semen cryopreservation.

The results show that, after thawing, the association of CD-CHL with CD-Vit E (CD- CHL-Vit E) improve total motility, progressive motility, membrane functionality, sperm velocities (VCL, VSL and VAP) and LIN ($P < 0.05$), compared to control and other treatments. Similarly, CD-CHL-Vit E provides significantly ($P < 0.05$) higher protection against membrane lipid peroxidation. Moreover, our experiments show that the concentration of 2 mg of CD-Vit E is significantly ($P < 0.05$) the most effective for the improvement of the parameters mentioned, as well as the viability of the spermatozoa and their protection against membrane lipidperoxidation compared to control and other concentrations of 4 and 6 mg.

In conclusion, our results reveal that the new approach combining the both complexes, CD-CHL and CD-Vit E, in the freezing extender improves significantly the cryosurvival of ram sperm. Moreover, the obtained results show that the optimal concentration of the CD-Vit E complex to be associated with the CD-CHL, for cryopreservation of *Ouled Djella* breed ram sperm, is 2mg /120x10⁶ Spz.

Keywords: Cyclodextrin, Cholesterol, Vitamin E, Mobility, Membrane functionality, Lipid peroxidation.

ملخص

أثناء الحفظ بالتجميد، غشاء البلازما للحيوانات المنوية للكباش لديه حساسية عالية جدا لصدمة البرد وتأكسد الدهون. كان الهدف من هذا العمل هو وضع طريقة جديدة للحفظ بالتجميد للسائل المنوي للكباش. هذه الطريقة تتألف من الحماية في وقت واحد ضد صدمة البرد وتأكسد الدهون وهذا بمعالجة الحيوانات المنوية قبل التجميد، بسيكلودكسترين-كولسترول (CD-CHL) وبسيكلودكسترين-فيتامين هـ (CD-Vit E).

شمل هذا العمل تجربتين: **التجربة 1** أجريت لدراسة الفائدة المحتملة للكولسترول (CHL) وفيتامينه (Vit E) عندما تعبأ في السيكلودكسترين (CD)، وحدها أو مجتمعة، في الحفظ بالتجميد للمني البربخ. **التجربة 2** أجريت لتحديد التركيز المثالي لـ CD-Vit E المقترنة بـ CD-CHL (2 مغ/ $10^6 \times 120$ نطفة) للحفظ بالتجميد للسائل المنوي للكباش من السلالة/أولاد جلال.

أظهرت النتائج، بعد ذوبان الجليد، أن الجمع بين CD-CHL و CD-Vit E (CD-CHL-Vit E) له أثر جوهري ($P < 0.05$) على مجموع الحركة، الحركة التقدمية، وظيفة الغشاء ومختلف السرعات (VCL, VAP et VSL) و LIN. بينت تجاربنا أن التركيز 2 ملغ من CD-Vit E حسن بشكل فعال ($P < 0.05$) المؤشرات المذكورة كما هو الحال لنسبة بقاء النطاف وحمايتها من تأكسد الدهون مقارنة بالشاهد والتركيزين 4 و6 ملغ.

في الختام، نتائجا تظهر أن النهج الجديد الذي يجمع بين CD-CHL و CD-Vit E في وسط التجميد حسن بصورة كبيرة في معدل البقاء على قيد الحياة للحيوانات المنوية للكباش بعد ذوبان الجليد. وعلاوة على ذلك، فإن النتائج المتحصل عليها تدل على أن التركيز الأمثل للمعقد CD-Vit E المرتبطة بالمعقد CD-CHL للحفظ بالتجميد للحيوانات المنوية لكباش من سلالة أولاد جلال هو 2مغ/ $10^6 \times 120$ نطفة.

كلمات مفتاح: سيكلودكسترين، كولسترول، فيتامين هـ، الحركية، وظيفة الغشاء، تأكسد الدهون

Dédicace

En guise de reconnaissance envers mon DIEU le Tout Puissant

Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique

Espérant qu'il lui sera utile.

Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

AMon encadreur le Docteur LAMARA Ali,

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,

Qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme. Je tiens surtout à vous remercier pour vos conseils qui m'ont été de grande utilité.

ACo-encadreur le professeur TEMIM Soraya,

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,

Que je remercie, vivement, d'avoir accepté la co-direction de mon projet de recherche.

Hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur Iguer-Ouada Mokrane,

De l'université de Abd rehman Mira, Béjaïa,

Qui, avec une extrême gentillesse, a partagé notre intérêt pour le sujet, nous a encouragé dans la réalisation de cette thèse en Algérie, nous a accompagné et guidé, durant ce travail, nous a assuré les moyens pour la réalisation de l'expérimentation 1 et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

Nos Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Fatmi Sofiane

De l'université de Abd rehman Mira, Béjaïa,

Qui nous a préparé les produits spécifiques de ce travail, nous a transféré les techniques de la préparation de ces produits. Sans qui, ce travail n'aurait pas faisable.

Nos Sincères remerciements.

Au Professeur AIN BAAZIZ Hacina,

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Nous lui adressons, ici, l'expression de notre profond remerciement.

Au Professeur GHOZLANE Faissal,

De l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'EL-HARRACH,

Qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

Aux Messieurs, le DocteurSAFSAF Boubakeur et le Docteur Benoune omar,

De l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques—université de Batna,

Qui ont accepté de faire partie de ce jury de thèse,

Sincères remerciements.

A Monsieur Adrar Salah

Responsable de l'abattoir communal de Béjaïa, Qui nous a fourni la matièrebiologique, Merci infiniment.

A Monsieur BOUDJENAH Ahmed,

Directeur Général de l'ITELv qui nous a encouragé pour réaliser la deuxième expérimentation, offert tous les moyens durant ce travail.

Nos vifs remerciements.

Au staff technique de la ferme de Ain M'lila (ITELv)

Hamza, Aissa et à leur tête la directrice pour leur aide jusqu'à l'aboutissement de ce travail.

Nos sincères remerciements,

Aux membres de laboratoires de biotechnologies animales

Du centre de recherche en biotechnologies à constantine, Chamso, Radwan, Sara, Romaïssa, Donya, labiba, Adnane, fayçal, Mourad, Abd Elhak et hamza.

A Mes Amis,

Rahab Hamza qui m'a aidé durant ce travail, m'a aidé dans la rédaction de l'article et de la réalisation de ce travail.

Slamnia Abd Rehman, Kashi Imad, Krazdi Nadjib et Idres Takfarinas, qui m'ont encouragé et soutenu au cours de ce projet, Merci beaucoup pour le temps et l'effort que vous avez consacré pour moi.

Fraternellement

A Mes chers parents

Pour leur soutien, leur patience et leur présence à mes côtés tout au long de mon parcours ... merci.

Avec tout mon amour et ma reconnaissance.

A Mes frères et Mes Sœurs,

Surtout ma grande sœur Hayet qui m'a soutenu durant toute ma vie, pour elle, chaque jour, je prie Dieu pour la guérir de sa maladie.

A Ma petite famille,

Qui m'a soutenu et m'encouragé jusqu'à l'aboutissement de ce travail.

Pour sa patience durant mes nombreuses absences. Merci.

Liste des abréviations et des sigles

% :	Pourcentage
°C:	Degré Celsius
µl:	Microlitre
µm:	Micromètre
ABTS:	ABTS: 2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline acide 6-sulfonique)
ADN:	Acide nucléique désoxyribose
AGPI:	Acides Gras Polyinsaturés
ALH :	Amplitude Lateral of the Head (mouvement latéral de la tête)
BCF:	Beat Cross Frequency (fréquence de battement transversal)
CASA:	Computer Aided Sperm Analysis
CAT:	Catalase
CD :	Cyclodextrine
CD-CHL :	Cyclodextrine-Cholestérol
CD-CHL-Vit E :	Cyclodextrine-Cholestérol-Vitamine E
CD-Vit E :	Cyclodextrine-Vitamine E
CHL :	Cholestérol
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
g :	Gramme/gramme
GPx:	Glutathion
h :	Heure
HCl:	Acide HydroChlorique
HOST:	HypoOsmotic Swelling Test
LIN:	Linearity (linéarité)
LPO :	Peroxydation des lipides(lipid peroxydation)
M :	Mole
MDA :	Malondialdéhyde
mg :	Milligramme
min :	Minute
ml:	Mililitre
mM :	Millimole
N:	Normalité
nmole :	Nanomole
PBS:	phosphate buffer saline
PM :	Progressive Motility (mobilité progressive)
PM:	Poids Moléculaire
s :	Seconde
SCA:	Sperm Class Analyser
SOD:	Superoxyde
Spz:	Spermatozoïdes
TAC :	Total Antioxidant Capacity (capacité antioxydante totale)
TM :	Total Motility (mobilité totale)
TRIS :	Tris (hydroxyméthylaminométhane)
TTH:	Trichloracétique- Thiobarbiturique-HCL
v/v :	volume/volume
VAP :	Velocity Average Path (vitesse de trajectoire moyenne)
VCL :	Velocity CurviLinear (vitesse curviligne)
Vit E :	Vitamine E
VSL :	VSL : Velocity Straight Linear (vitesse linéaire droite)
ZP:	Zone Pellucide

Liste des figures

Figure1 : Structure interne du testicule et l'épididyme	1
Figure2 : Diagramme représente la structure de testicule, l'épididyme et le canal déférent	1
Figure3 : Illustration de tube séminifère et tissu interstitiel	1
Figure4 : Structure du spermatozoïde chez les mammifères	4
Figure5 :Schéma d'illustration de la tête du spermatozoïde chez les mammifères	5
Figure6 :Schéma d'illustration du col du spermatozoïde chez les mammifères.....	6
Figure7 :Schéma d'illustration du flagelle du spermatozoïde chez les mammifère	7
Figure8 :.Structure de l'axonème	7
Figure9 : Mouvement latéral et rotation des phospholipides.....	8
Figure10 : Architecture de la membrane plasmique.....	8
Figure11 :Principaux composants lipidiques de la membrane cellulaire	9
Figure12 :Insertion de cholestérol dans la bicouche phospholipidique.....	9
Figure13 : Structure de mitochondrie.....	14
Figure14 : Cycle de Krebs.....	15
Figure15 : Chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP.....	16
Figure16 :Structure de α -tocophérol.....	21
Figure17 : Géométrie et répartition de charges de la molécule d'eau	22
Figure18 : Liaisons H entre les molécules d'eau et sa structure tétraédrique.....	22
Figure19 : Formation des cristaux extracellulaire	24
Figure20 : Schéma représente les différentes étapes la congélation lente	25
Figure21 : Illustration de la transition d'un gel vers l'état de cristal liquide.....	29
Figure 22 : Structure chimique de β -cyclodextrine et sa structure géométrique 3 D	45
Figure23 : Etapes de récolte du sperme épидидymaire par rinçage rétrograde	54
Figure24 : Récolte du sperme par électroéjaculation chez le bélier de race <i>Ouled Djellal</i>	55
Figure25 : Mobilité massale.....	56
Figure26 : Comptage des spermatozoïdes par Cellule Malassez.....	57
Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 1	59
Figure 28 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 2	61
Figure29 : Principaux paramètres de mobilité mesurés par le CASA.....	63
Figure30 : Test du gonflement hypo-osmotique (HOST)	64
Figure31 : Viabilité par éosine	65
Figure32 : Viabilité par HOECHST 33258.....	66
Figure33 : Test de peroxydation des lipides,.....	67
Figure34 : Pourcentages de la mobilité totale, mobilité progressive et test de gonflement hypoosmotique (HOST) après la décongélation de la semence épидидymaire	70
Figure35 : Moyenne de la vitesse de trajectoire, vitesse linéaire, la vitesse de trajet moyen, pourcentage de linéarité, amplitude de déplacement latéral de la tête et la fréquence du battement de a tête après la décongélation de la semence épидидymaire du bélier	71
Figure36 : Moyenne (\pm ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après la décongélation de la semence épидидymaire	72
Figure37 : Moyennede la capacité antioxydante totale(TAC) après la décongélation de la semence épидидymaire.....	73
Figure38 : Pourcentages de la mobilité totale, mobilité progressive , viabilité (éosine), viabilité (HOECHST 33258), test de gonflement hypoosmotique après la décongélation de la semence du bélier de la race <i>Ouled Djellal</i> ,.....	75

Figure39: Moyenne (\pm ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après la décongélation de la semence du bélier de la race *Ouled Djellal*,77

Liste des tableaux

Tableau 1: les dimensions de la tête et les pièces intermédiaire et principale chez les mammifères4

Tableau 2:pourcentages des spermatozoïdes rapides, Moyens, Lents et Statiques du sperme d'électroéjaculation du bélier de race *Ouled Djellal*.....74

Avant-Propos

La bibliographie de cette thèse est présentée dans l'introduction. Cette dernière comporte quatre points (titres) principaux.

Le premier point, anatomie et fonction du spermatozoïde, a pour objectif de rappeler la structure du spermatozoïde particulièrement, la composition lipidique de la membrane cellulaire. Cette dernière permet de comprendre la sensibilité du spermatozoïde du bélier au choc au froid et le stress oxydatif.

Le second point est le métabolisme énergétique du spermatozoïde, notamment la phosphorylation oxydative et la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le but de ce point est de connaître l'origine des espèces réactives de l'oxygène et le système antioxydant du sperme.

Le troisième point de l'introduction comporte le mécanisme et les différentes étapes de la cryoconservation de la semence. La partie la plus détaillée est «lésions de la cryoconservation» notamment le choc au froid et le stress oxydatif, l'objet de ce travail.

Les cyclodextrines, constituant le quatrième point de la partie bibliographique, sont utilisées pour solubiliser le cholestérol et la vitamine E dans le milieu de congélation dans notre étude.

La transition de la partie bibliographique à la partie pratique s'est faite par une problématique. Cette dernière a démontré le problème de la sensibilité du sperme au choc au froid et au stress oxydatif (peroxydation des lipides) en proposant de tester une nouvelle approche basée sur l'utilisation de complexes, cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL) et cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E) dans le milieu de congélation pour protéger le sperme contre le choc au froid et la peroxydation des lipides.

La partie pratique comporte deux expérimentations. La première a été réalisée pour tester une nouvelle approche de combinaison de CD-CHL et CD-Vit E sur la semence épидidymaire cryoconservée du bélier. Les résultats de cette expérimentation ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Small Ruminant Research*. Cette expérimentation a démontré l'effet bénéfique de la nouvelle approche sur le sperme congelé. La deuxième a été effectuée pour optimiser la concentration de CD-Vit E pour le sperme du bélier de race *Ouled Djellal*. 2 mg de CD-Vit E / 120×10^6 Spz est la dose recommandée.

Au terme de ce travail, il a été conclu que la combinaison entre CD-CHL et CD-Vit E ouvre des perspectives dans la cryoconservation du sperme, particulièrement, chez les espèces ayant un ratio cholestérol : phospholipides faible.

SOMMAIRE

I.	Introduction	1
I.1	Anatomie et fonction du spermatozoïde.....	1
I.1.1	Production du sperme	1
I.1.1.1	Production des spermatozoïdes	1
I.1.1.2	Maturation épидидymaire	2
I.1.1.3	Les sécrétions des glandes annexes	3
I.1.1.4	Variation de la production spermatique chez le bélier	3
I.1.2	Anatomie du spermatozoïde	4
I.1.2.1	La tête	4
I.1.2.2	Le col.....	5
I.1.2.3	Le flagelle.....	5
I.1.2.4	La membrane plasmique.....	7
I.1.2.4.1	Composition lipidique de la membrane.....	8
I.1.3	Les fonctions du spermatozoïde	11
I.1.3.1	Capacitation.....	11
I.1.3.2	Liaison ovocyte-spermatozoïde et la réaction acrosomiale.....	11
I.1.3.3	Fusion des deux gamètes et premières divisions cellulaires.....	12
I.2	Métabolisme énergétique du spermatozoïde et la génération des espèces réactives de l'oxygène	13
I.2.1	Métabolisme énergétique du spermatozoïde	13
I.2.1.1	Structure et fonction des mitochondries	14
I.2.1.1.1	Structure	14
I.2.1.1.2	Fonction.....	15
I.2.2	Génération des ERO par la semence	17
I.2.2.1	Rôle physiologique des ERO.....	18
I.2.2.2	Génération pathologique des ERO	19
I.2.3	Le système antioxydant du sperme.....	19
I.2.3.1	Les antioxydants enzymatiques	20
I.2.3.1.1	Catalase	20
I.2.3.1.2	Glutathion peroxydase.....	20
I.2.3.1.3	Superoxyde dismutase.....	20
I.2.3.2	Antioxydants non enzymatiques.....	21
I.2.3.2.1	Vitamine E.....	21
I.3	Cryoconservation de la semence ovine	22
I.3.1	Les bases de la cryobiologie.....	22
I.3.1.1	Les bases physiques de l'eau	22

I.3.1.1.1	Congélation de l'eau.....	22
I.3.1.1.2	Etat liquide	22
I.3.1.1.3	Etat de surfusion.....	23
I.3.1.1.4	Etat solide (cristallisation).....	23
I.3.2	Comportement de la cellule pendant la congélation.....	24
I.3.2.1	Effet du refroidissement sur la cellule (refroidissement entre la température ambiante et la température de cristallisation)	24
I.3.2.2	Effet de cristallisation et de refroidissement	24
I.3.2.2.1	Formation des cristaux de glace	24
I.3.2.2.2	Effet solution (Déshydratation de la cellule).....	25
I.3.2.3	Cryoprotecteurs	25
I.3.2.3.1	Définition	26
I.3.2.3.2	Cryoprotecteurs pénétrants la cellule	26
I.3.2.3.3	Les cryoprotecteurs non pénétrants la cellule	26
I.3.2.3.4	Mode d'action	26
I.3.2.3.5	Choix des cryoprotecteurs	27
I.3.2.4	Lésions de la cryoconservation	27
I.3.2.4.1	Lésions de refroidissement (choc au froid)	28
I.3.2.4.2	Stress oxydatif	31
I.3.2.4.3	Formation des cristaux de glace et l'effet de solution.....	36
I.3.2.4.4	Toxicité des Cryoprotecteurs.....	37
I.3.2.4.5	Les lésions pendant le réchauffement	37
I.3.2.4.6	Choc osmotique.....	38
I.3.3	Application de la cryoconservation de la semence.....	38
I.3.3.1	Dilution du sperme	38
I.3.3.1.1	Composants des milieux de congélation	39
I.3.3.2	Congélation de sperme	41
I.3.3.2.1	Équilibration entre le sperme et le milieu de congélation	41
I.3.3.2.2	Conditionnement de la semence.....	42
I.3.3.2.3	Congélation proprement dite	42
I.3.3.3	Décongélation.....	43
I.3.3.4	Fertilité de la semence cryoconservée	43
I.4	Les cyclodextrines	44
I.4.1	Définition.....	44
I.4.2	Propriétés des CDS.....	44
I.4.3	Les cyclodextrines modifiées	45
I.4.4	β -cyclodextrines méthylées et sperme.....	46
I.4.5	Préparation des complexes à base de CDs	46
II.	Problématique et objectifs	47

III.	Matériel et méthodes	51
III.1	Matériel	51
III.1.1	Matériel biologique	51
III.1.2	Equipements	51
III.1.3	Produits chimiques	52
III.1.4	Consommables	52
III.2	Méthodes	52
III.2.1	Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine-vitamine E	52
III.2.2	Préparation du complexe méthyl- β -cyclodextrine-cholestérol	52
III.2.3	Préparation de la solution TTH pour l'évaluation de la peroxydation des lipides	53
III.2.4	Récolte du sperme de l'épididyme	53
III.2.5	Récolte du sperme de l'électroéjaculation.....	54
III.2.6	Evaluation du sperme récolté	55
III.2.7	Expérimentation 1 : Etude de l'impact du complexe cyclodextrine-vitamine E tout seul ou associé au complexe cyclodextrine-cholestérol (nouvelle approche) sur le sperme épидидymaire cryoconservé.....	57
III.2.8	Expérimentation 2 : Optimisation de la concentration du complexe cyclodextrine-Vitamine E associé au complexe cyclodextrine-cholestérol pour la cryoconservation du sperme d'électroéjaculation du bélier de la race <i>Ouled Djellal</i>	60
III.2.9	Evaluation de la qualité du sperme après la décongélation	62
III.2.9.1	Evaluation de la mobilité du sperme par le système CASA	62
III.2.9.2	Analyse de la fonctionnalité de la membrane des spermatozoïdes.....	63
III.2.9.3	Evaluation de la viabilité par Eosine	64
III.2.9.4	Evaluation de la viabilité par HOECHST 33258.....	65
III.2.9.5	Essais biochimiques.....	66
III.2.9.5.1	Préparation des échantillons.....	66
III.2.9.5.2	Test de peroxydation lipidique (LPO).....	66
III.2.9.5.3	Capacité Antioxydante Totale	67
III.2.9.6	Analyses statistiques.....	68
IV.	Résultats	69
IV.1	Expérimentation 1	69
IV.1.1	Pourcentages de mobilité totale, mobilité progressive et fonctionnalité de la membrane....	69
IV.1.2	Paramètres cinématiques (VCL, VAP, VSL, LIN, ALH, BCF).....	70
IV.1.3	Peroxydation des lipides.....	72
IV.1.4	Capacité antioxydante totale.....	73
IV.2	Expérimentation 2	74
IV.2.1	Paramètre de mobilité.....	74
IV.2.2	La Viabilité.....	75
IV.2.3	Fonctionnalité de la membrane du sperme	76

IV.2.4 Peroxydation des lipides.....	76
V. Discussion	77
V.1 Expérimentation 1	77
V.2 Expérimentation 2	81
VI. Recommandations et perspectives.....	84
VII. Références bibliographiques	85
VIII. Annexes.....	102

I. Introduction

I.1 Anatomie et fonction du spermatozoïde

I.1.1 Production du sperme

Le sperme est composé de deux fractions, les spermatozoïdes et le plasma séminal. Les spermatozoïdes sont produits au niveau des testicules (Figures n° 1 et 2) et acquièrent la mobilité et la capacité de fécondation au niveau de l'épididyme (maturation). L'épididyme (Figures n°1 et 2) est aussi un lieu de séjour des spermatozoïdes matures jusqu'à l'éjaculation (Chenoweth et Lorton, 2014).

Au cours de l'éjaculation, les sécrétions des glandes annexes constituent le plasma séminal. Le plasma séminal fournit une énergie requise pour la mobilité et une protection durant le déplacement des spermatozoïdes (Chenoweth et Lorton, 2014).

I.1.1.1 Production des spermatozoïdes

La spermatogénèse est le processus qui aboutit à la production des spermatozoïdes. Elle est mise en place à la puberté et se maintient tout au long de la vie reproductive de mâle post pubertaire. Chez le bélier, la puberté est environ de 6 mois. La spermatogénèse se déroule dans les testicules, plus précisément dans les tubes séminifères (**Figure n°3**), durant laquelle les spermatozoïdes sont formés de cellules souches ; spermatogonies (**Figure n°3**). L'entrée de différents îlots de spermatogonies en spermatogénèse se fait de façon régulière et cyclique : tous les 10 jours chez le bélier. Un cycle complet dure, par ailleurs, 49 jours. Les spermatozoïdes subissent une maturation dans l'épididyme où ils sont stockés jusqu'à l'éjaculation (Chenoweth et Lorton, 2014).

La spermatogénèse implique trois types cellulaires dans trois processus successifs :

- Les spermatogonies (cellules souches) subissent des divisions mitotiques. Ces dernières (entretiennent) renouvellent et rajeunissent les cellules souches de la ligne germinale et produisent également les cellules diploïdes : Les spermatocytes primaires.

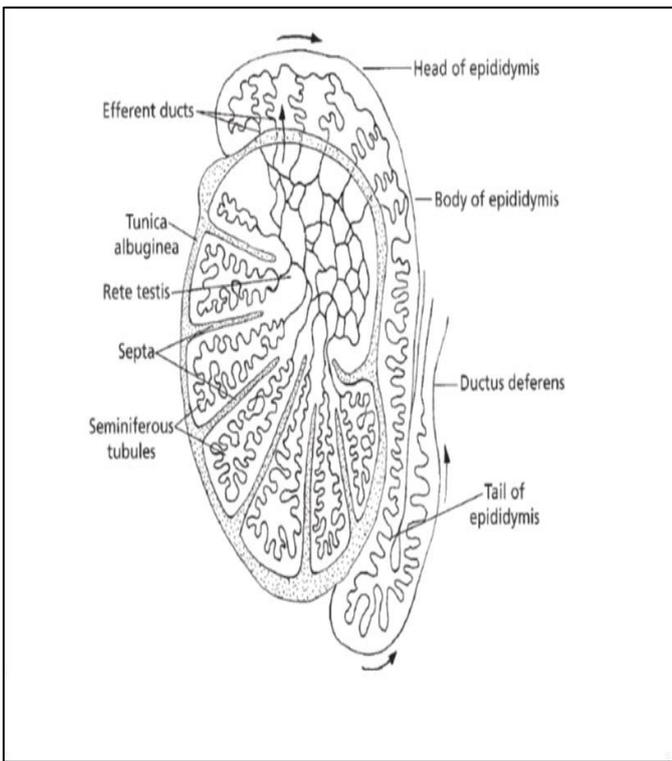


Figure 2 : Structure interne du testicule et l'épididyme (Frandsen et al., 2013).

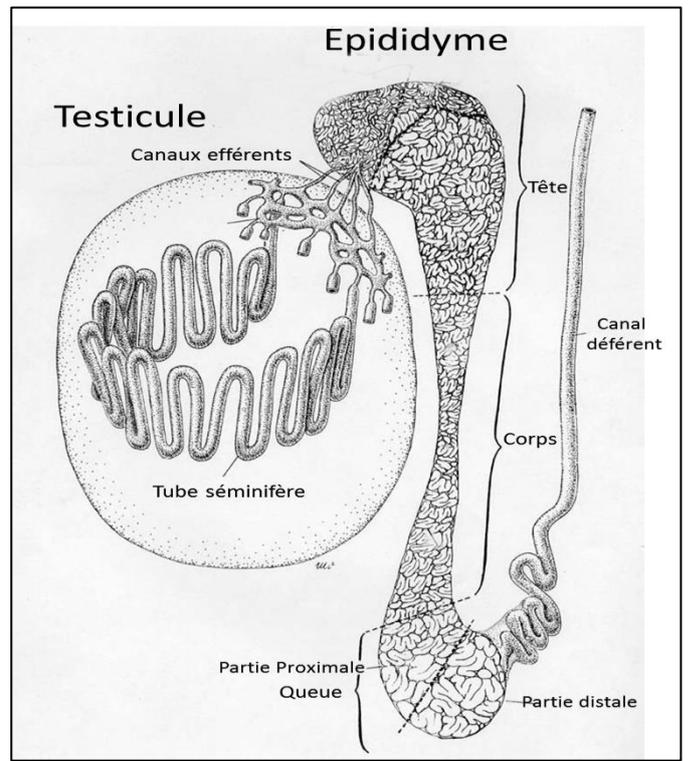


Figure 1 : Diagramme représente la structure de testicule, l'épididyme et le canal déférent (Robaire, 2006). Incision pour la récolte du sperme se fait près de la jonction des parties distale et proximale de la queue de l'épididyme

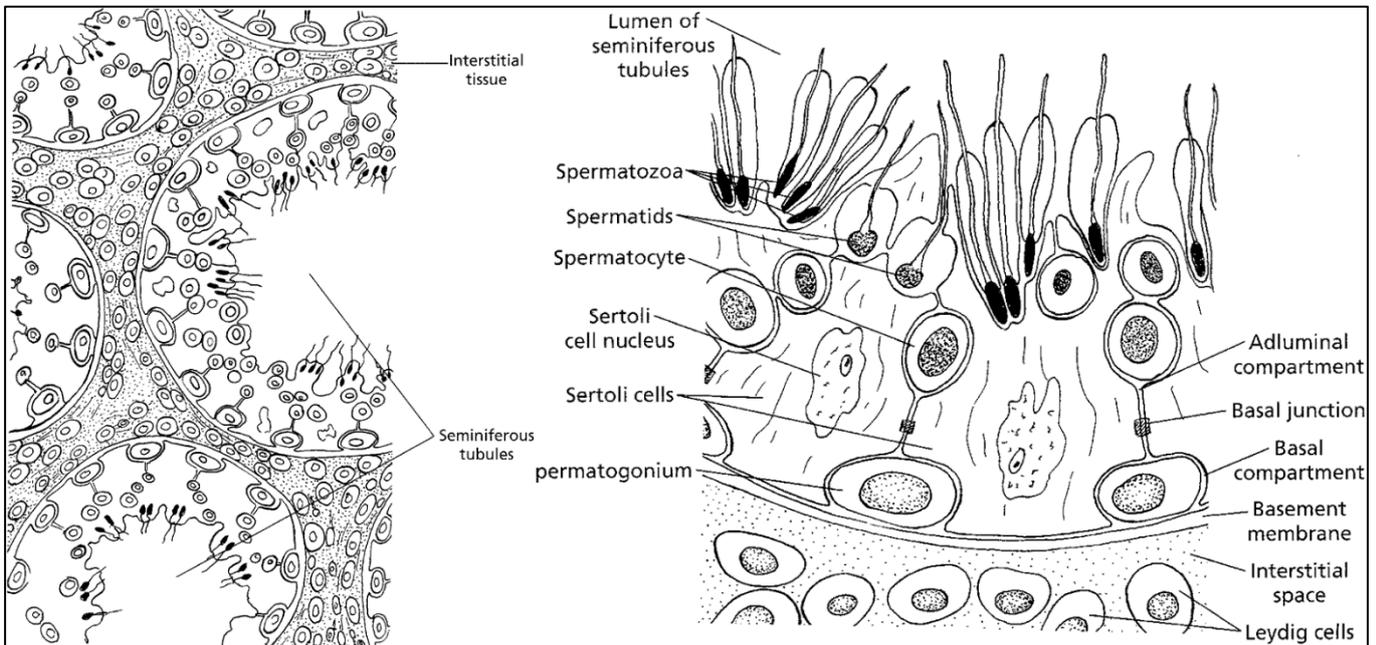


Figure 3 : Illustration de tube séminifère et tissu interstitiel (Frandsen et al., 2013).

- Chaque spermatocyte primaire subit une méiose conduisant à la formation de 4 cellules haploïdes : les spermatides
- Les spermatides évoluent en spermatozoïdes par la spermiogénèse. Cette dernière est une différenciation cellulaire, durant laquelle, il y a une transformation morphologique dramatique des spermatides pour former les spermatozoïdes, des cellules très spécialisées, (Eddy et O'Brien, 1994 ; Kerr *et al.*, 2006).

I.1.1.2 Maturation épидидymaire

Les spermatozoïdes immobiles sont libérés dans les lumières des tubes séminifères puis ils passent rapidement dans le rete testis et, via les canaux efférents dans la première partie de l'épididyme, la tête. D'ailleurs, l'épididyme est composé de trois parties ; la tête, le corps et la queue. (Chenoweth et Lorton, 2014 ; Kerr *et al.*, 2006)

A la sortie du testicule (canaux efférents), les spermatozoïdes ne sont pas encore matures. Ils ne sont ni mobiles, ni fécondants, leur différenciation se poursuit en dehors de la gonade notamment durant le transit épидидymaire. Le transit dans l'épididyme est assuré principalement par les contractions péristaltiques continues des muscles lisses de la paroi de la tête et du corps de l'épididyme. Toutefois, les sécrétions de rete testis et les cils tapissant les canaux efférents aident à la progression des spermatozoïdes. Par ailleurs, la progression des spermatozoïdes dans le testicule et l'épididyme est lente et quasiment permanent, elle dure 14 jours chez le bélier. Durant le transit épидидymaire, notamment au niveau de la tête et du corps, les spermatozoïdes subissent un processus nommé la maturation leur rendant fertile c'est-à-dire l'acquisition de la mobilité et la capacité de fécondation. Au niveau de la queue de l'épididyme les spermatozoïdes matures sont stockés. En cas d'éjaculation, le sperme quitte brusquement la partie distale de la queue épидидymaire, atteignant le canal déférent puis l'urètre (Chenoweth et Lorton, 2014).

Durant la maturation des spermatozoïdes, Le changement le plus évident est la migration de la gouttelette cytoplasmique, qui est située près du col du spermatozoïde à la sortie du testicule et se déplace vers la pièce intermédiaire lorsque le spermatozoïde arrive à la queue de l'épididyme (Cooper, 1986). Dans le sperme éjaculé, la plupart de ces gouttelettes sont complètement détaché des spermatozoïdes (White, 1974). En outre, pendant leur transit et leur séjour dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent de nombreux changements

physiologiques et biochimiques résultant de la modification de leurs membranes plasmiques et leur interaction avec les sécrétions épидидymaires. Les principaux changements biochimiques comprennent la condensation de la chromatine des spermatozoïdes, des changements dans la composition des protéines de surface et des phospholipides membranaires, ainsi que du rapport cholestérol / phospholipide (Sullivan *et al.*, 2005). En effet, la condensation de la chromatine par la substitution des histones par des protamines fournit une protection du matériel génétique durant le parcours du spermatozoïde dans les voies génitales. Les changements dans la composition lipidiques par l'accroissement des acides gras non saturés et la diminution du rapport cholestérol / phospholipide augmentant la fluidité membranaire requise pour le processus de fécondation notamment, la capacitation, la réaction acromiale et la fusion des gamètes. Les spermatozoïdes interagissent avec nombreuses protéines synthétisées et sécrétées par l'épididyme nécessaires pour la fécondation telle que la protéine (P34H) qui est impliquée dans l'interaction du spermatozoïde-zone pellucide chez l'homme (De Jonge et Barrat, 2006 ; Sullivan *et al.*, 2005 ; Cooper, 1986).

I.1.1.3 Les sécrétions des glandes annexes

Au cours de l'éjaculation, les sécrétions des glandes annexes composent la quasi-totalité du plasma séminal, fraction liquide du sperme. C'est l'étape finale de formation du sperme.

Les vésicules séminales, la glande cowper et la prostate sont les principales glandes annexes présentes chez l'animal. Leurs sécrétions sont un support mécanique pour l'efficacité de l'éjaculation et de la mobilité. Elles créent un milieu alcalin augmentant le métabolisme des spermatozoïdes. Elles apportent de fructose, source d'énergie, nécessaire pour la mobilité des spermatozoïdes (Chenoweth et Lorton, 2014).

I.1.1.4 Variation de la production spermatique chez le bélier

La production spermatique est corrélée positivement avec l'activité sexuelle de l'animal. Chez le bélier, l'activité sexuelle est maximale durant les saisons où les jours sont courts. Par conséquent, la production spermatique est maximale pendant les mois d'automne et d'hiver et plus faible au printemps et en été (période de jours longs) (Rosa and Bryant, 2003).

I.1.2 Anatomie du spermatozoïde

Chez les mammifères, le spermatozoïde est constitué de 3 parties, la tête, le col et le flagelle (**Figure n°4**). Ce dernier est composé de 3 pièces : intermédiaire, principale et terminale. La longueur du spermatozoïde varie entre 50 et 90 μm (**Tableau n°1**). La membrane plasmique entoure la totalité du spermatozoïde (Pesch et Bergmann, 2006).

I.1.2.1 La tête

La tête du spermatozoïde (Spz) du bélier ou du taureau est en forme ovale et aplatie. Elle est divisée en deux segments : (i) l'acrosome antérieure et la région post-acrosomiale, la jonction entre les 2 régions antérieure et postérieure est appelée l'anneau nucléaire ou segment équatoriale. Sous-jacent de l'acrosome antérieure et continue jusqu'à la base de la tête c'est le noyau (**Figure n°5**).

Le noyau : c'est un composant large de la tête du Spz, il contient un ADN haploïde très condensé résultant de l'implication des protéines spécifiques appelées les protamines. Cet ADN condensé caractérise la cellule qui ne se divise pas, toutes les activités de transcription sont inactivées. Le noyau est entouré par un complexe de cytosquelette spécial de la thèque périnucléaire appelé la feuille post-acrosomiale (Guraya, 1987).

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

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

Le segment équatorial est référé comme lysosome spécialisé. La région post-acrosomiale subit des changements durant la maturation au niveau de l'épididyme, ces changements jouent un rôle significatif dans la fusion du Spz avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Cette dernière est une étape qui suit la pénétration du Spz à travers la corona radiata et la zone pellucide (réaction acrosomiale). Les principales enzymes présentes dans l'acrosome sont Hyaluronidase, Pro-acrosine, Acrosine, Estérase, Neuraminidase, Acide

Tableau 1 : les dimensions de la tête et les pièces intermédiaire et principale chez les mammifères (μm) (Pesch et Bergmann, 2006)

Espèce	Tête		Pièce intermédiaire		Pièce principale		Longueur du SPZ
	Longueur	largeur	Longueur	largeur	Longueur	largeur	
Homme	3.4-4.6	1.5-2.8	3.5-5.0	0.8-0.6	44-50	0.5-0.4	50-60
Cheval	5.0	2.4	8.0	0.5	30	0.49	60
Taureau	9.15	4.25	14.84	0.67	50	0.51	75-90
bélier	8.2	4.25	14.0	0.8	45	0.5	70-90

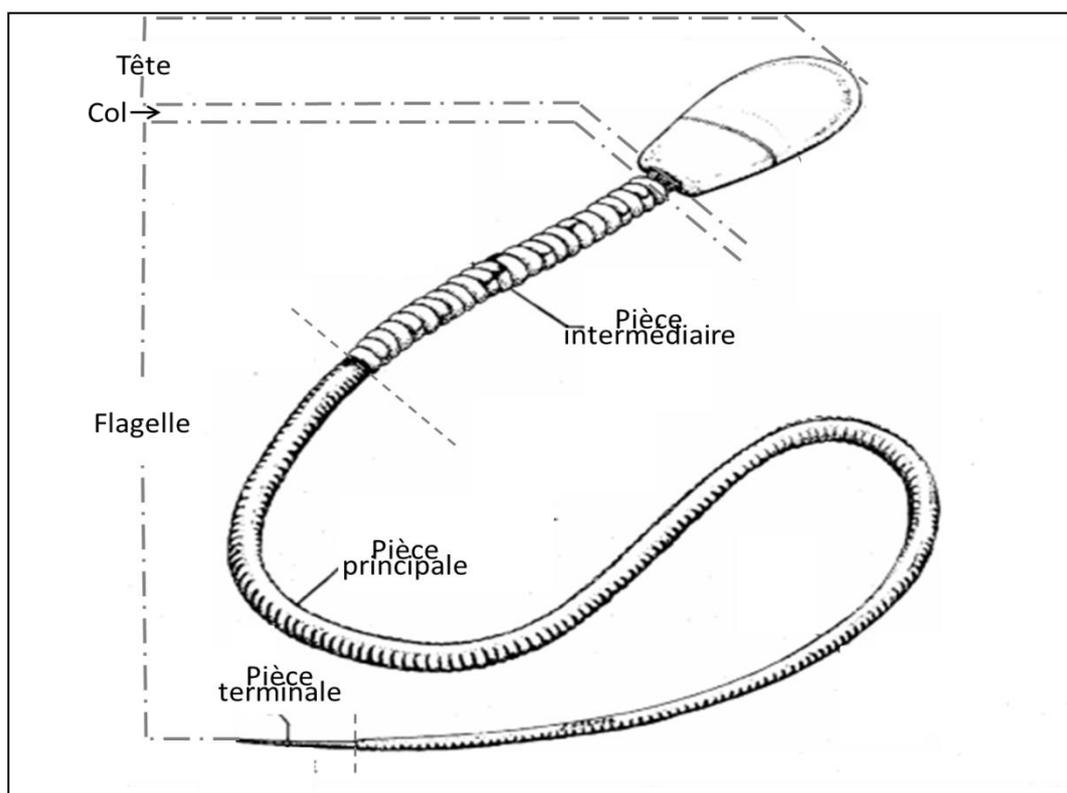


Figure 4 : Structure du spermatozoïde chez les mammifères (Garner et Hafez, 2000)

Phosphatase, Phospholipase, collagénase, β -N-acétyl glucosaminidase et l'enzyme de pénétration de corona (CPE : corona penetration enzyme). Les fonctions de ces enzymes sont la digestion de la zone pellucide et la pénétration dans l'ovocyte facilitant ainsi la fécondation (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

I.1.2.2 Le col

Le col (collet ou la pièce connectrice), est une région complexe, il correspond à l'espace compris entre les centrioles proximal et distal, c'est un segment reliant entre la tête et la pièce intermédiaire (**Figure n°6**). Le col est composé de la fossette d'implantation, la plaque basale et la pièce d'articulation ou de jonction. La fossette d'implantation est une dépression ou une cavité avec un aspect concave présente au pôle postérieur du noyau. La plaque basale tapisse la fossette d'implantation, elle est doublée extérieurement par la membrane nucléaire. La pièce d'articulation est une structure en forme tronquée qui entoure le centriole proximal (Guraya, 1987). Elle s'étend de la fossette d'implantation jusqu'à le démarrage de la pièce intermédiaire. Elle se fixe solidement à la plaque basale par le capitulum. La pièce d'articulation résulte de l'union complexe de 9 colonnes longitudinales segmentées. Chaque deux colonnes latérales (2 à droite et 2 à gauche) se fusionnent pour former 2 colonnes latérales épaisses dites colonnes majeures. Ces dernières se soudent crânialement pour former le capitulum. Ce dernier s'articule avec la plaque basale. Les cinq autres colonnes longitudinales segmentées sont dites alors colonnes. Des colonnes segmentées prennent naissance 9 fibres denses entourant l'axonème. Le col et l'axonème sont formés d'une paire de centrioles (un proximal et l'autre distal). Ces deux centrioles sont présents dans les spermatides au moment de la formation du flagelle. Le centriole distal forme le col et l'axonème, tandis que le proximal est associé avec la formation du col. Le centriole proximal se trouve à l'intérieur de la pièce de l'articulation et immédiatement sous le capitulum. Cependant, le centriole distal disparaît chez le spermatozoïde mature (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

I.1.2.3 Le flagelle

Le flagelle du spermatozoïde est constitué de 3 segments, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (**Figure n°7**). Les 3 segments sont entourés par une seule membrane plasmique commune.

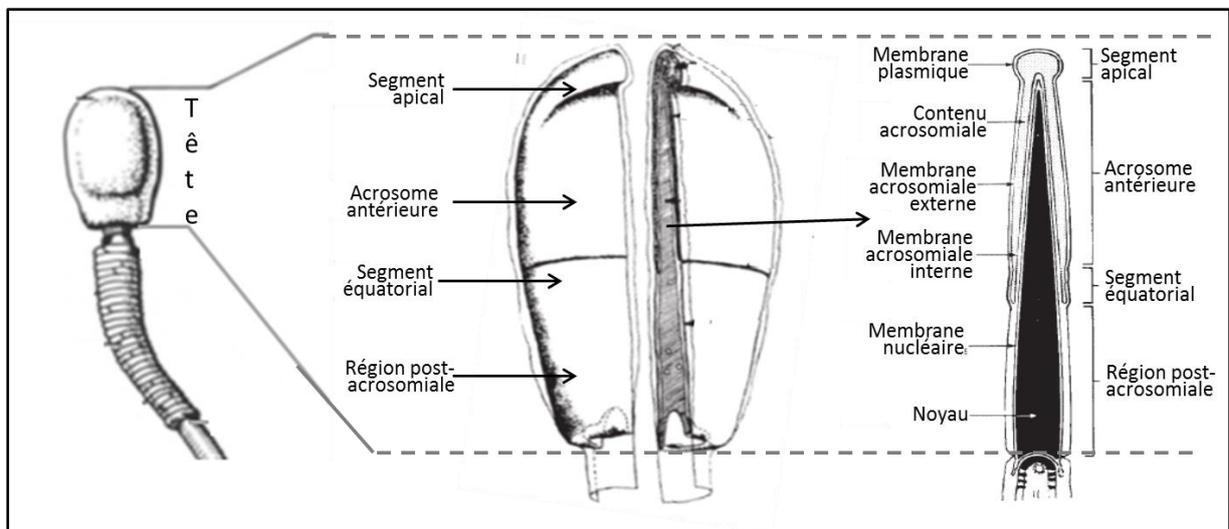


Figure 5 : Schéma d'illustration de la tête du spermatozoïde chez les mammifères (Saake etAlmquist, 1964a; Garner etHafez, 2000)

Les parties structurales primaires du flagelle sont l'axonème (filament axial)(**Figure n°8**), la gaine mitochondriale, les fibres denses externes et la gaine fibreuse(**Figure n°7**).

L'axonème situé au centre s'étend sur toute la longueur du flagelle. Il est composé de 9 doublets de microtubules périphériques régulièrement espacés et une paire centrale de microtubules singlets (9+2). Chaque doublet de microtubules externes est lié au doublet adjacent par des liens de nexine. Chaque doublet de microtubules externes est composé de 2 tubules A et B. le tubule A est composé de 13 protofilaments, tandis que le tubule B est composé de 10 protofilaments. Les bras radiaux sont des structures protéiques de réticulation faisant relier chaque tubule A à la gaine centrale. La paire centrale de microtubules est composée de 2 tubules, C1 et C2. Ces deux tubules sont reliés entre eux par des ponts réguliers ressemblent à des barreaux d'une échelle. Chaque tubule central est constitué de 13 protofilaments. Chaque tubule A est attaché par un bras interne et externe de dynéine. Les bras dynéines s'étendent vers le tubule B du doublet adjacent.

Les dynéines sont des protéines motrices qui sont responsables de la génération de la force requise pour le mouvement du flagelle. Elles transforment l'énergie chimique contenue dans l'ATP en énergie mécanique en provoquant le glissement les microtubules les uns par les autres. Ces glissements se manifestent par des flexions du flagelle. Celles-ci sont grâce aux structures de réticulation entre les doublets de microtubules externes et la gaine centrale (Guraya, 1987).

Les fibres denses ont une structure cytosquelette très remarquable, composés de 9 fibres qui entourent l'axonème et s'étendent à travers le col, la pièce intermédiaire et la pièce principale. La gaine mitochondriale est un ensemble de mitochondries disposées en forme d'hélice autour des fibres denses de la pièce intermédiaire, tandis que les fibres denses externes de la pièce principale sont entourés seulement par la gaine fibreuse. La pièce terminale est composée seulement de l'axonème (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

La pièce intermédiaire : c'est le segment du flagelle situant entre le col et l'anneau. L'anneau est l'élément structural dense et filamenteux qui relie la pièce intermédiaire et la pièce principale. Dans la pièce intermédiaire, le complexe axonème-les fibres denses externes est entouré par une gaine de mitochondries. Le complexe axonème-les

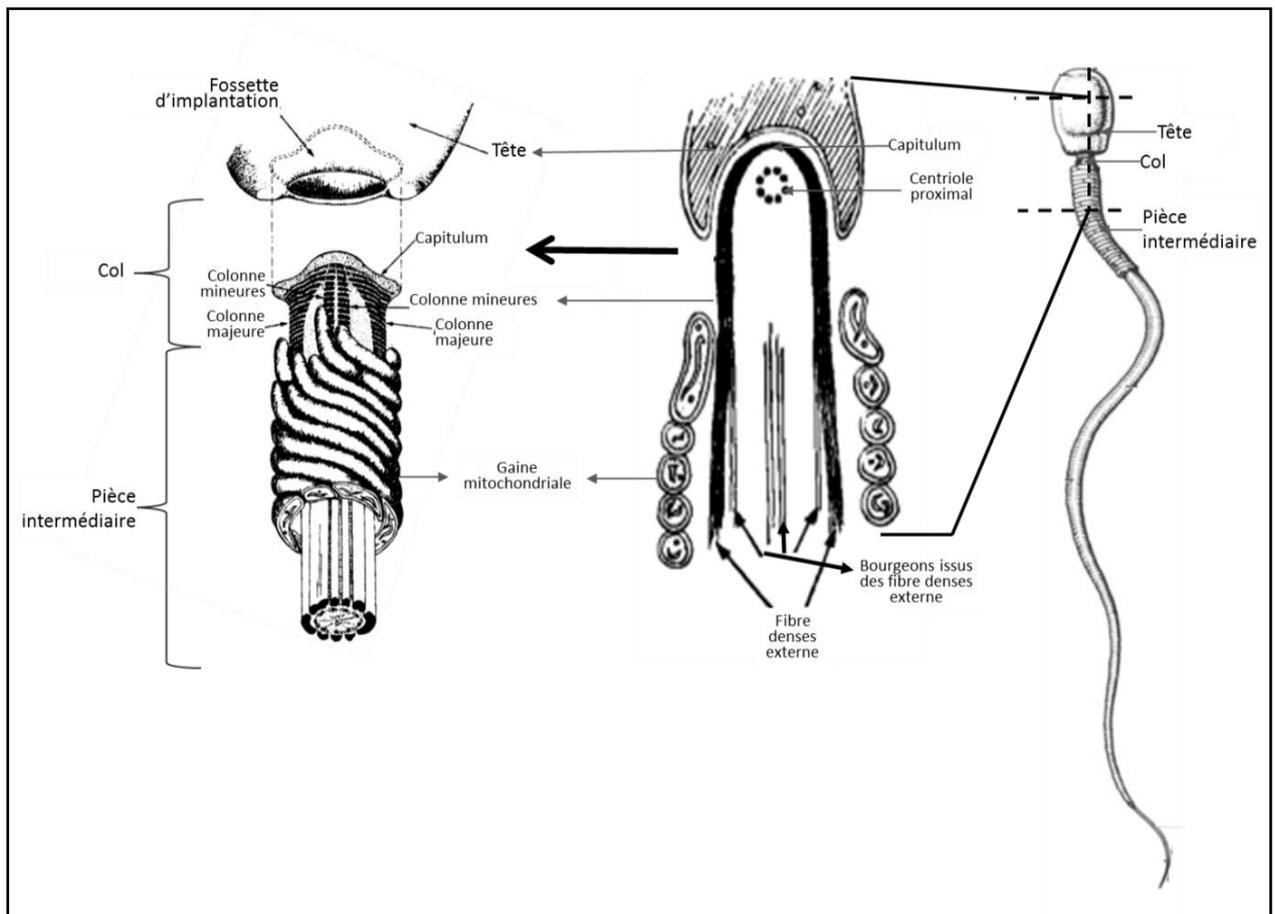


Figure 6 : Schéma d'illustration du Col du spermatozoïde chez les mammifères (Saake et Almquist, 1964b)

fibres denses externes- gaine mitochondriale est recouvert par la membrane plasmique. Les mitochondries de la pièce intermédiaire génèrent l'énergie sous forme d'ATP utilisée pour la locomotion du Spz. La membrane interne de la mitochondrie est le site de production d'énergie 80% dans la pièce intermédiaire. Le nombre et la taille des mitochondries varient d'une espèce à l'autre, chez l'homme et le rat, le nombre est 15 et 350, respectivement (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

La pièce principale : elle est le segment le plus long du flagelle qui s'étend de l'anneau jusqu'à la pièce terminale. En raison de l'absence de la gaine mitochondriale dans la pièce principale, le diamètre à ce niveau est réduit. La pièce principale est caractérisée par la présence d'une gaine fibreuse. Cette gaine est constituée de nervures semi-circulaires qui se regroupent pour former deux colonnes latérales le long de la pièce principale. La gaine fibreuse assure la stabilité pour les éléments contractiles du flagelle. La gaine fibreuse se termine à la limite distale de la pièce principale et le commencement de la pièce terminale (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

La pièce terminale : elle est le segment au-delà de l'extrémité terminale de la gaine fibreuse. Elle contient seulement l'axonème couvert directement par la membrane plasmique.

Les fibres denses externes et la gaine fibreuse sont des cytosquelettes du flagelle non contractiles. Les rôles exacts de ces structures ne sont pas connus. Cependant, elles fournissent un recul élastique nécessaire pour les mouvements du flagelle (Guraya, 1987 ; Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003).

I.1.2.4 La membrane plasmique

La membrane plasmique du spermatozoïde est une structure primordiale qui sépare le milieu intérieur de la cellule du celui extérieur. Elle délimite le compartiment intérieur de la cellule notamment le noyau et les organites cytoplasmiques. Il sert pour protéger la cellule du milieu extérieur et pour assurer les différentes fonctions physiologiques de la cellule. La membrane plasmique du spermatozoïde possède une particularité structurale représentée par différentes parties hétérogènes assurant différentes fonctions requises pour la fécondation. En effet, La membrane au niveau de l'acrosome de la tête du spermatozoïde est

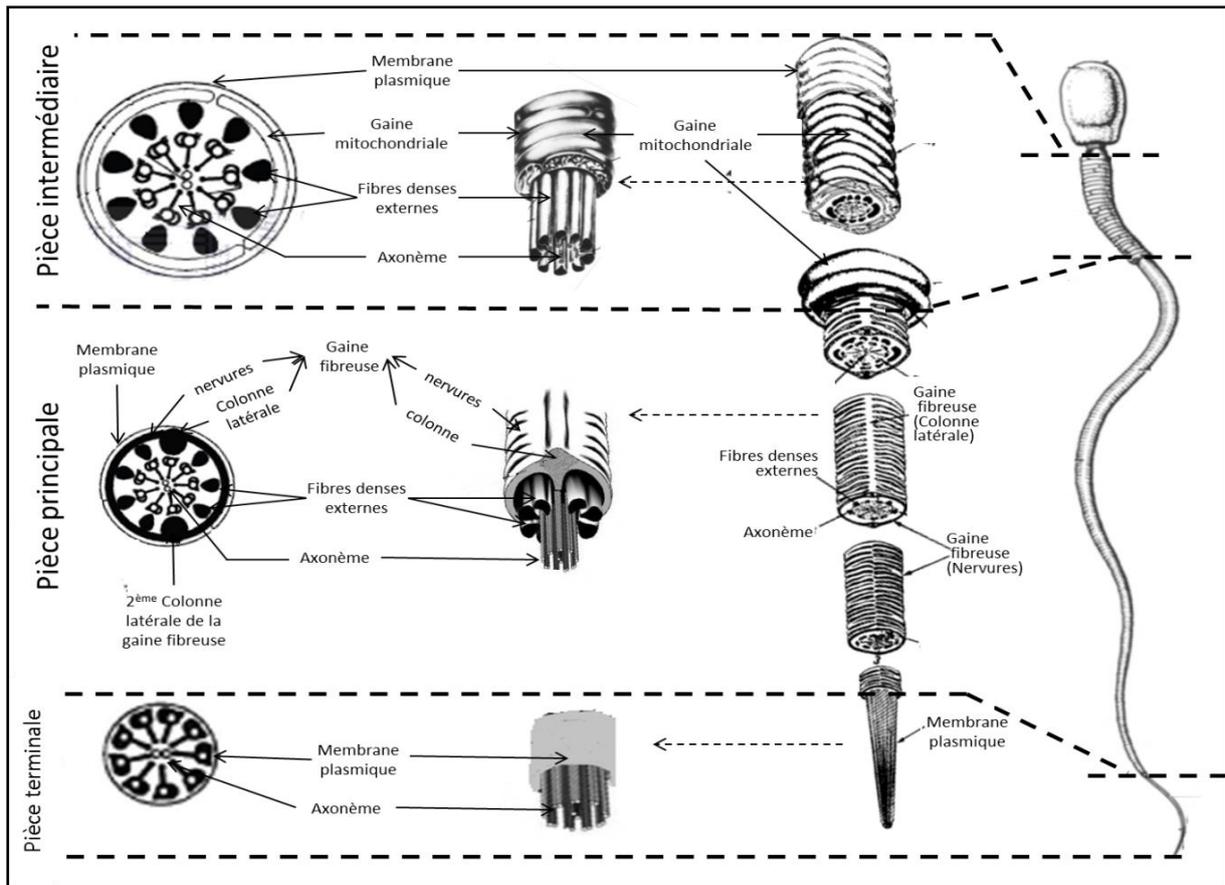


Figure 7 : Schéma d'illustration du flagelle (pièces intermédiaire, principale et terminale) du spermatozoïde chez les mammifère (Turner, 2003 ; Saake etAlmquist, 1964b, Guraya, 1987; Eddy, 2006)

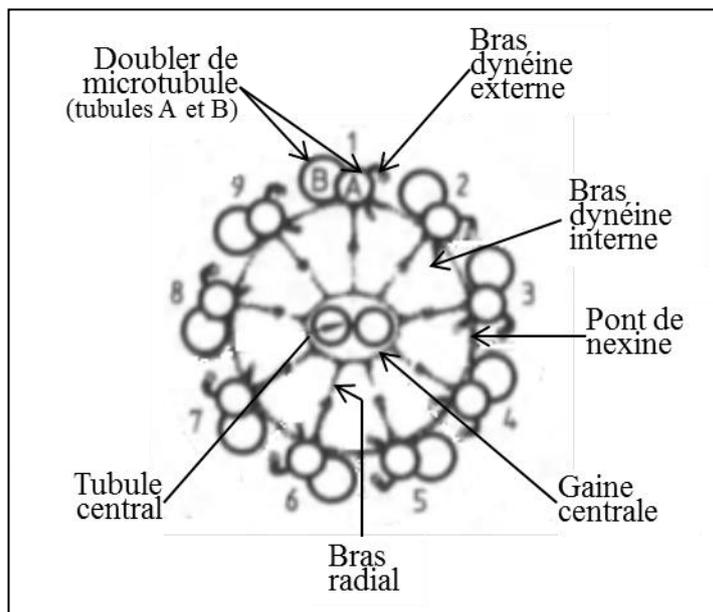


Figure 8 : Structure de l'axonème (Guraya, 1987)

le lieu de capacitation, de réaction acrosomiale et de fusion avec la membrane de l'ovocyte. Malgré ces particularités, la membrane plasmique du spermatozoïde, comme toutes les membranes cellulaires, conforme au modèle mosaïque fluide (Singer et Nicolson, 1972) : mosaïque car la composition de la membrane est hétérogène ; lipides, protéines et glycocalyx (les glycolipides et les glycoprotéines), fluide car le noyau hydrophobe de la bicouche lipidique est désordonné permettant aux phospholipides différents mode de mobilité notamment un mouvement latéral dans le plan de la bicouche lipidique et des mouvement de rotation autour de l'axe de la bicouche lipidique (**Figure n°9**).

Les composants de la membrane plasmique sont organisés pour donner la structure suivante : une double couche phospholipidique constitue une matrice de base fluide, des protéines membranaires soit complètement intégrés dans (protéines intégrales) ou faiblement attachés à (protéines périphériques) la bicouche lipidique, des oligosaccharides, à la surface de la membrane, peuvent s'associer à des molécules lipidiques ou protéiques formant les glycolipides et les glycoprotéines (Singer et Nicolson, 1972) (**Figure n°10**).

Durant la cryoconservation, la membrane cellulaire du spermatozoïde subit des altérations au niveau des composants lipidiques. Ces altérations sont issues des modifications de sa structure architecturale due au choc au froid et des attaques des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées. La perte du cholestérol, stabilisateur de la membrane, est la principale modification survient au niveau de la membrane. La peroxydation des lipides est la lésion principale causée par les ERO. Au niveau de la membrane, la déplétion du cholestérol et la peroxydation des lipides pourraient conduire à la mort cellulaire ou à la perte de différentes fonctions du spermatozoïde nécessaires pour la fécondation (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 1991; Darin-Bennett et White, 1977).

I.1.2.4.1 Composition lipidique de la membrane

On distingue trois grands groupes de lipides entrants dans la composition des membranes plasmiques : (i) les lipides complexes composés d'au moins trois éléments de nature différente. Ils comprennent les phosphoglycérides (phospholipides et plasmalogènes) et les glycolipides ; (ii) les lipides simples. Ils englobent principalement les acylglycérols ou glycérides (mono-, di- et triglycérides), les acides gras (AG) et les stérols ; (iii) les protéolipides, constitués d'une protéine et d'une ancre lipidique permettant le fichage de la protéine dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. L'essentiel de notre propos va

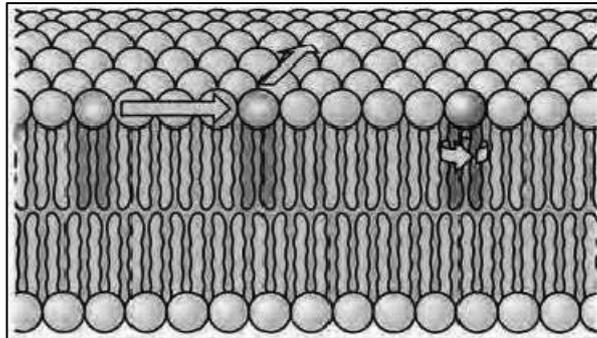


Figure 9: Mouvement latéral et rotation des phospholipides (Cooper et Haussman, 2007)

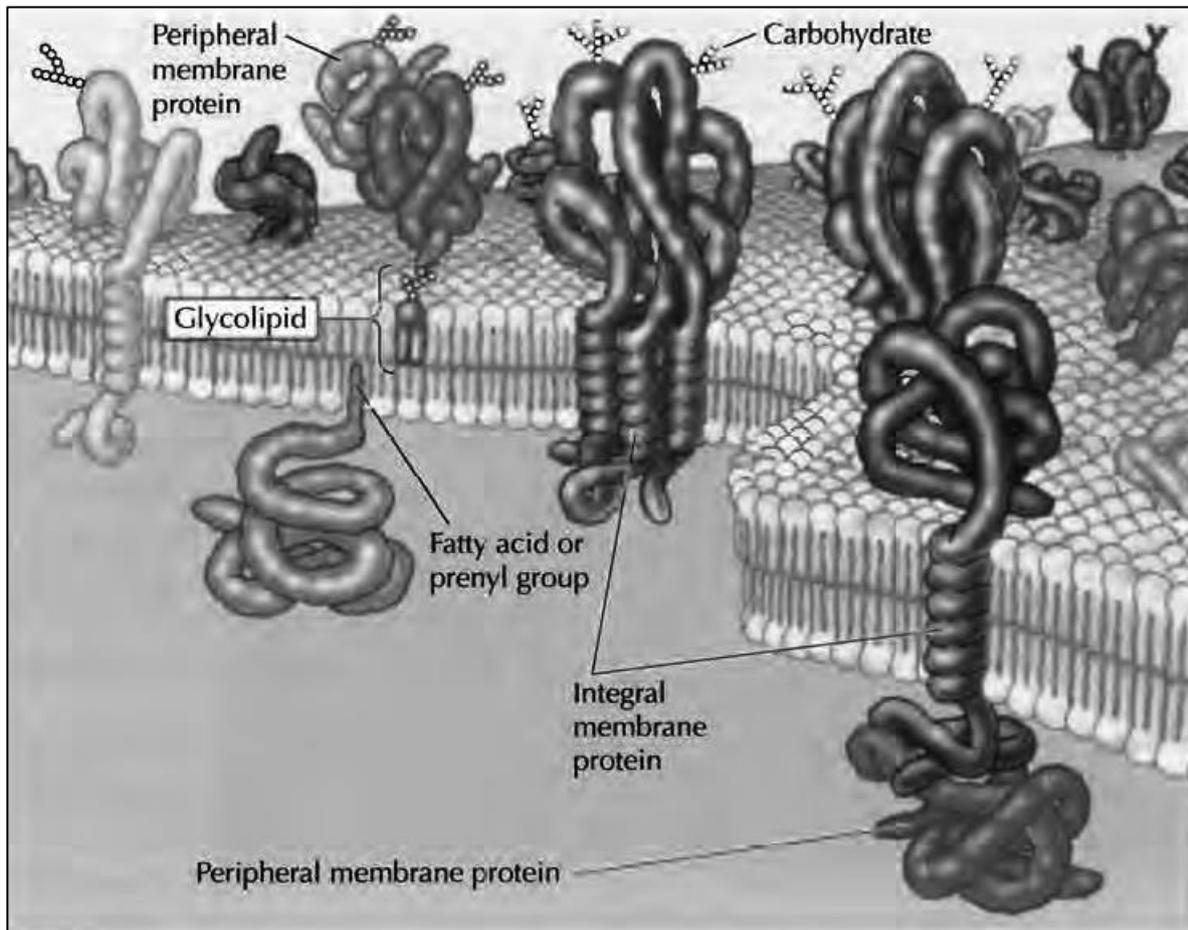


Figure 10: Architecture de la membrane plasmique, modèle mosaïque et fluide selon le modèle de Singer et Nicolson (1992) (Cooper et Haussman, 2007)

concerner les lipides complexes, notamment les phosphoglycérides, et les lipides simples, notamment, les acides gras et le cholestérol. Les autres composants lipidiques, dont l'importance pour le gamète n'est pas à négliger, ne seront pas traités ici (Rejraji *et al.*, 2009 ; Darin-Bennet et White, 1977 ; Darin-Bennet *et al.*, 1974, 1973).

I.1.2.4.1.1 Les lipides complexes

Les phosphoglycérides sont composées du glycérol à 3 carbones, chacun de deux premiers carbones est liés à un acide gras, le troisième est lié à l'acide phosphorique. Les acides gras sont liés au glycérol soit par une liaison ester formant un phospholipide, soit par une liaison éther formant un plasmalogène. Les phosphoglycérides forment la structure primordiale de la membrane cellulaire : la bicouche phospholipidique. Le phospholipide est une molécule amphipatique, composée de deux groupes hydrophobes formés de 2 acides gras, et un autre groupe polaire hydrophile formé de l'acide phosphorique. Dans les milieux aqueux, les phospholipides forment spontanément deux couches dont les acides gras de chaque phospholipide sont tournés vers le cœur de la membrane et le groupe polaire exposé sur l'un ou l'autre de la surface membranaire. La nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique permet de définir différentes catégories de phospholipides. Les phospholipides les plus fréquemment rencontrés dans les membranes des cellules animales sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycérol (PG) et le diphosphatidylglycérol (**Figure n°11**). Chez le bélier, PE et PI représentent à elles seules 70 à 80 % des phospholipides de la membrane plasmique du spermatozoïde. La PS et le PI représentent respectivement 4 et 3 % des phospholipides totaux des spermatozoïdes. Les plasmalogènes sont les « lipides éthers » les plus fréquents dans les cellules animales, y compris dans la membrane spermatique. Ils représentent entre 30 et 50 % des phospholipides membranaires. Ils interviennent également dans les phénomènes de fusion membranaire, de transports ioniques, de flux de cholestérol et agissent parfois comme antioxydants (Rejraji *et al.*, 2009).

I.1.2.4.1.2 Les lipides simples

I.1.2.4.1.2.1 Les acides gras

Les acides gras sous forme libre sont des constituants mineurs des membranes. Ils sont généralement sous forme d'esters associés à la partie polaire des lipides. Comparativement aux cellules somatiques, le spermatozoïde chez toutes espèces confondues

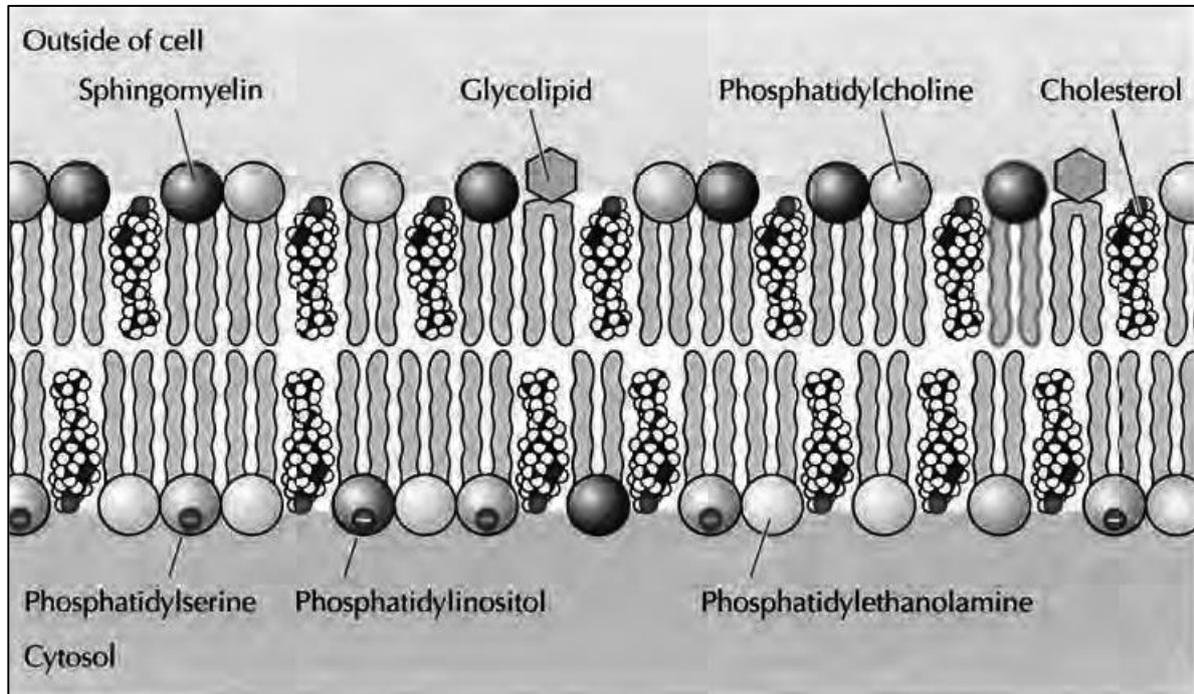


Figure 11 : Principaux composants lipidiques de la membrane cellulaire (Cooper et Haussman, 2007).

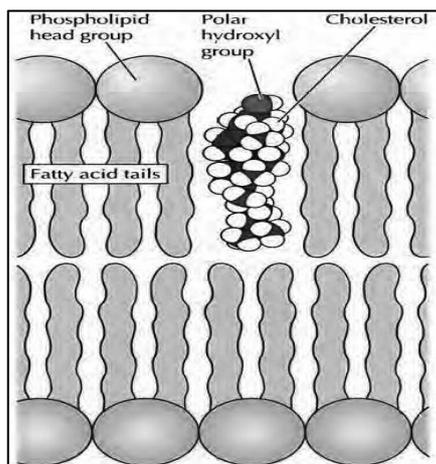


Figure 12 : Insertion de cholestérol dans la bicouche phospholipidique (Cooper et Haussman, 2007).

contient une proportion élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI). Chez le bélier et le taureau le ratio acides gras insaturés/acides gras saturés est approximativement 3/1 (Holt et North, 1985). Les AGPI les plus rencontrés sont les acides arachidonique (20 : 4n-6), docosapentanoïque (22 : 5n-3) et docosahexaénoïque. Chez le bélier, on retrouve une forte concentration de docosahexaénoïque mais pas du tout de docosapentanoïque. Les AGPI, particulièrement, docosapentanoïque, donnent une grande fluidité pour la membrane, par conséquent, une élasticité élevée octroyant au spermatozoïde une résistance à la variation du volume (Rejraji *et al.*, 2009). Cependant, les AGPI rendent le spermatozoïde plus vulnérable aux attaques des ERO engendrant la peroxydation des lipides, le mécanisme de peroxydation des AGPI est détaillé dans la section, lésions de cryoconservation (Agarwal *et al.*, 2014).

I.1.2.4.1.2.2 Les stérols, le cholestérol

Les stérols sont des molécules plus compactes et plus apolaires que les phosphoglycérides. Ils sont des éléments essentiels des membranes cellulaires, ils représentent le deuxième constituant lipidique majeur des membranes spermatiques après les phospholipides. Le cholestérol est le stérol le plus répandu dans les membranes plasmiques, lysosomiales, endosomiales et golgiennes. Il constitue 30 % des lipides totaux des membranes plasmiques. Le cholestérol est composé d'une queue hydrophile composée de 4 cycles hydrocarboné et une tête polaire hydrophobe composée de groupe bêta-hydroxyle. Le cholestérol s'insère dans la bicouche phospholipidique dont le groupe hydroxyle de sa tête est placé à la hauteur des groupes polaires hydrophiles des phospholipides, tandis que la queue hydrocarbonée du cholestérol interagit avec les chaînes hydrocarbonées des acides gras voisins de la tête du cholestérol(**Figure n°12**). Grâce à cette propriété d'insertion dans la membrane cellulaire, le cholestérol est, par excellence, un stabilisateur de la membrane. Le cholestérol augmente l'ordre membranaire, et sa perte est une étape obligatoire dans la capacitation du spermatozoïde. La fluidité de la membrane plasmique est nécessaire pour les différentes fonctions du spermatozoïde et elle est tributaire de la quantité du cholestérol. La quantité de cholestérol dans la membrane est toujours à comparer à celle des phospholipides (Rejraji *et al.*, 2009 ; Cooper et Haussman, 2006). Le rapport cholestérol/phospholipides est indicateur principal de la fluidité membranaire et est déterminant dans les phénomènes de capacitation et de réaction acrosomiale (Cross, 1998). Durant la cryoconservation, le refroidissement de la semence pourraient altérer les composants lipidiques de la membrane modifiant sa fluidité, c'est le choc au froid, le mécanisme de choc au froid est détaillé dans la

section, lésion de la cryoconservation. Chez les espèces ayant un rapport cholestérol/phospholipides élevé, tel que l'homme (0,99), résistent mieux au choc au froid. Cependant, certaines espèces tel que le bélier (0,38), possédant un rapport cholestérol/phospholipides faible rendent le spermatozoïde plus sensible au choc au froid (Darin-Bennett et White, 1977).

I.1.3 Les fonctions du spermatozoïde

I.1.3.1 Capacitation

Le spermatozoïde des mammifères provenant de la queue de l'épididyme ou éjaculé ne peut exprimer sa fécondance qu'après un séjour de plusieurs heures dans les voies génitales de la femelle. Les changements que doit subir le spermatozoïde pour acquérir la capacité à féconder un ovocyte sont qualifiés de capacitation (Austin, 1951 ; Chang, 1951).

La capacitation consiste, dans un premier temps, à l'élimination du plasma séminal. In vivo, les spermatozoïdes quittent le plasma séminal pour les sécrétions génitales femelles. Ces dernières possèdent une double potentialité : assurer la capacitation tout en permettant une longue survie (Bailey, 2010).

La capacitation implique des changements membranaires et des changements de mobilité. Les changements membranaires consistent en une redistribution ou enlèvement des protéines et des lipides tel que le cholestérol (Spungin *et al.*, 1995; Nolan et Hammerstedt, 1997 ;Cross, 2003), tandis que les changements de mobilité rendent le spermatozoïde hyperactif, caractérisé par une mobilité non progressive avec une amplitude de battement du flagelle élevée. L'acquisition de la mobilité hyperactive est un évènement essentiel de la capacitation, nécessaire pour la fécondation (Kulan et Shivaji, 2001).

I.1.3.2 Liaison ovocyte-spermatozoïde et la réaction acrosomiale

La zone pellucide est la matrice extracellulaire qui entoure l'ovocyte. La zone pellucide a plusieurs fonctions telles que l'induction de la réaction acrosomiale, protection de polyspermie et protection de l'embryon avant son implantation dans l'utérus (Yanagimachi, 1994). Elle est composée de 3 protéines ZP1, ZP 2, ZP3 (Litscher et Wassarman, 2007). ZP1 est considérée comme premier récepteur du spermatozoïde responsable de l'induction de la réaction acrosomiale. ZP2 est considérée comme deuxième récepteur qui s'attache à la

membrane interne de l'acrosome réagit (Yanagimachi, 1994). ZP1 pourrait intervenir dans la formation et le maintien de la structure de la zone pellucide (Litscher et Wassarman, 2007).

Une fois capacité, le spermatozoïde est capable de se fixer sur la zone pellucide induisant la réaction acrosomiale. La réaction acrosomiale est décrite comme un évènement exocytotique dont la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde, sous l'effet d'un influx d'ions de calcium, se fusionne avec la membrane externe de l'acrosome pour libérer le contenu acrosomial. L'acrosome contient différentes protéines enzymatiques interviennent dans la digestion de la zone pellucide et la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. Les principales enzymes présentes dans l'acrosome sont Hyaluronidase, Pro-acrosine, Acrosine, Estérase, Neuraminidase, Acide Phosphatase, Phospholipase, collagénase, β -N-acétyl glucosaminidase et l'enzyme de pénétration de corona (CPE : corona penetration enzyme). Les fonctions spécifiques de certaines enzymes sont bien documentées.

L'hyaluronidase libérée par l'acrosome joue un rôle dans la dispersion ou dans la digestion de cumulus oophorus (matrice externe de l'ovocyte). La CEP est responsable du passage à travers la corona radiata. La proacrosine présent dans la membrane acrosomiale externe est convertie en acrosine. Cette dernière permet la pénétration de Spz à travers de la zone pellucide dans l'ovocyte. La neuraminidase améliore évidemment le passage de Spz à travers la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte (Chenoweth et Lorton, 2014 ; Eddy, 2006 ; De Jonge et Barrat, 2006 ; Tulsani, 2003 ; Guraya, 1987).

I.1.3.3 Fusion des deux gamètes et premières divisions cellulaires

Le spermatozoïde qui a effectué sa réaction acrosomiale traverse la zone pellucide par deux processus, mécanique représenté par la mobilité hyperactive et enzymatique représenté par la libération des enzymes acrosomiales. La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte entraîne l'expulsion des granules corticaux prévenant la polyspermie.

Le spermatozoïde après avoir franchi la zone pellucide, pénètre dans l'espace périvitellin et entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Il s'immobilise alors et les deux gamètes fusionnent (Gadella et Luna, 2014 ; Yanagimachi, 1994).

Au cours de la fusion, La membrane plasmique du spermatozoïde est intégrée à celle de l'ovocyte. Par contre, la membrane acrosomiale interne est incorporée dans le cytoplasme de l'ovocyte en même temps que le noyau du spermatozoïde. L'enveloppe

nucléaire disparaît rapidement après la fusion et les chromatines, mâle et femelle se décondensent pour former les pronoyaux mâle et femelle. Puis, une enveloppe nucléaire se forme autour des deux pronoyaux. Les pronoyaux mâle et femelle se déplacent vers le centre de la cellule et la première division mitotique est initiée pour former l'embryon (Gadella et Luna, 2014).

I.2 Métabolisme énergétique du spermatozoïde et la génération des espèces réactives de l'oxygène

I.2.1 Métabolisme énergétique du spermatozoïde

La première fonction du spermatozoïde est de transporter le matériel génétique mâle intact et de l'introduire dans l'ovocyte. Pour assumer cette fonction, le spermatozoïde doit, juste après son éjaculation, se propulser du vagin vers l'oviducte, le lieu de fécondation. Au cours de son trajet, le spermatozoïde a d'autres fonctions indispensables pour la fécondation telles que la capacitation et la réaction acrosomiale. Pour assurer ses fonctions, le spermatozoïde utilise l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate) produite par lui-même. Le spermatozoïde dégrade les monosaccharides à six carbones notamment le fructose ou le glucose pour générer les ATP. Pour la génération de l'ATP, le spermatozoïde recourt à 2 voies de métabolismes : (i) métabolisme énergétique anaérobique (la glycolyse) et (ii) métabolisme aérobie (l'oxydation phosphorylante « OXPHOS » ou la respiration cellulaire) (Du Plessis *et al.*, 2015b).

La glycolyse dégrade le fructose ou le glucose à travers une série de réactions enzymatiques produisant 2 molécules à 3 carbones, les pyruvates, 2 ATP et réduisant 2 molécules de co-enzyme, NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) en NADH. La glycolyse, avec un bilan énergétique faible (2ATP/glucose), est considérée à la fois, comme un processus de production d'énergie dans les conditions d'anaérobiose avec ou comme première étape de l'OXPHOS dans les conditions d'aérobiose (Cooper et Hausman, 2006 ; Voet et Voet, 2005).

Le NADH, formé au cours de la glycolyse, doit être réoxydé. En absence d'oxygène (anérobiose), le NADH est réoxydé en NAD^+ par la conversion du pyruvate en

lactate ou éthanol. En présence d'oxygène, l'OXPPOS réoxyde NADH en NAD⁺ en libérant une énergie emprisonnée en ATP par les mitochondries.

Dans les conditions anaérobiques, le pyruvate issu de la glycolyse est converti en alcool (lactate ou éthanol), tandis que dans les conditions aérobiques le pyruvate est décarboxylé donnant l'acétyl-CoA, molécule utilisée dans les étapes suivantes de l'OXPPOS pour produire plus d'ATP (Cooper et Haussman, 2006 ; Voet et Voet, 2005).

Dans le spermatozoïde, les sièges de glycolyse sont la tête et la pièce principale du flagelle. Les enzymes de glycolyse telles que hexokinase, lactate déshydrogénase et glyceraldéhydes 3- phosphate déshydrogénase sont aussi identifiées dans les spermatozoïdes. L'importance de la glycolyse pour le spermatozoïde, malgré son bilan faible en énergie (2ATP), est de fournir l'énergie au niveau de la tête et la pièce principale où l'OXPPOS n'a pas lieu. L'OXPPOS survient, en présence d'oxygène, au niveau des organites cellulaires appelés les mitochondries. La pièce intermédiaire est la seule région du spermatozoïde contenant les mitochondries (Cooper et Haussman, 2006 ; Voet et Voet, 2005). Par conséquent, la pièce intermédiaire est le seul endroit de la production d'ATP par l'OXPPOS (Alcivar *et al.*, 1989 ; Bahr et Engler, 1970)

Au cours de l'OXPPOS, le spermatozoïde notamment les mitochondries génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui pourraient attaquer différents composants de la cellule engendrant des lésions cellulaires parfois létales. Les ERO sont un axe capital de notre étude d'où la nécessité de détailler l'OXPPOS afin de comprendre l'origine et le mécanisme de génération des ERO et le système de défense de la cellule contre leurs attaques.

I.2.1.1 Structure et fonction des mitochondries

I.2.1.1.1 Structure

Les mitochondries sont des organites membraneux distribués dans le cytosol des cellules eucaryotes. Elle comporte une double membrane, une membrane externe (MME) et une membrane interne (MMI) séparées par un espace intermembranaire (**Figure n°13**). La membrane interne délimite un compartiment soluble appelé matrice, dans laquelle a lieu le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs). La matrice contient aussi le génome mitochondrial, composé d'ADN circulaire et ribosomes. La membrane interne forme des replis également appelés "crêtes". Les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont situées dans la membrane interne de la mitochondrie. Le nombre de mitochondries par cellule

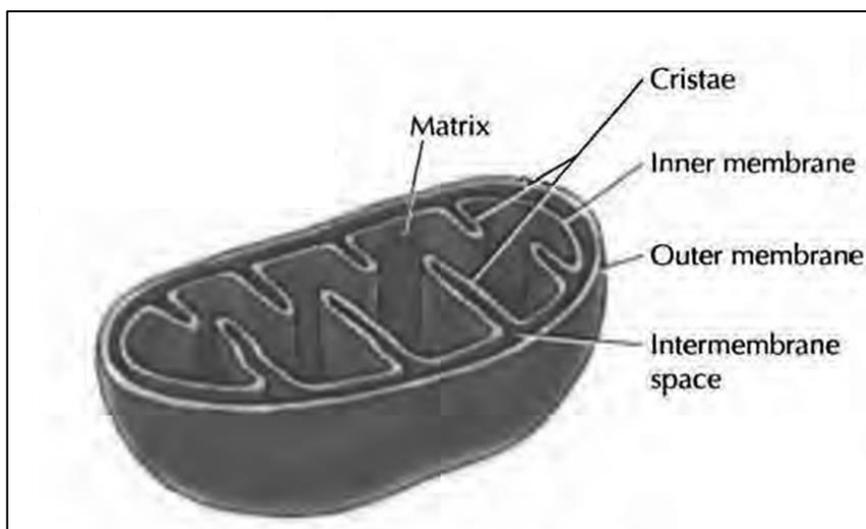


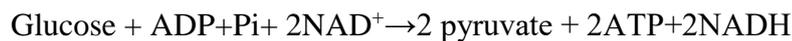
Figure 13 : Structure de mitochondrie (Cooper et Haussman, 2007)

dépend de type de la cellule. Le microscope électronique a révélé que les mitochondries ont, dans la cellule intacte, les dimensions d'une bactérie : 0.5 µm de diamètre et moins d'1 µm de large (Voet et Voet, 2005)

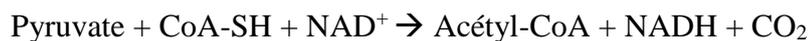
I.2.1.1.2 Fonction

La fonction principale des mitochondries est la production, via l'oxydation phosphorylante des substrats organiques, une énergie sous forme d'ATP servant à tout le métabolisme des êtres vivants. (Diez-Sanchez *et al.*, 2003 ; Sue et Schon, 2000). L'oxydation phosphorylante se déroule dans les mitochondries impliquant 5 étapes :

(i) Dégradation de glucose ou fructoses pour donner deux molécules de pyruvates (glycolyse) avec réduction de 2 molécules de NAD⁺ en 2 NADH et production de 2 ATP. Cette étape se déroule hors les mitochondries (Cooper et Haussman, 2006).



(ii) Décarboxylation oxydante, au niveau des mitochondries, de chaque pyruvate en présence co-enzyme A (CoA) pour donner l'acétyl-CoA et réduire une molécule de NAD⁺ en NADH (Cooper et Haussman, 2006).



(iii) Acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs (matrice mitochondriale), subit une succession de réactions de catabolisme conduit à la production d'une molécule de GTP qui donne par la suite une molécule d'ATP, libération de CO₂ et d'énergie, conservée dans les 3 NADH et 1 FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide) (**Figure n°14**) (Cooper et Haussman, 2006).

(iv) Réoxydation des NADH et FADH₂ en NAD⁺ et FAD libérant des protons H⁺ et des électrons puis la formation des ATP (Cooper et Haussman, 2006).

La réoxydation de NADH et FADH₂ se fait dans la chaîne respiratoire située dans la membrane interne de la mitochondrie (**Figure n°15**). Les électrons à haut potentiel, des

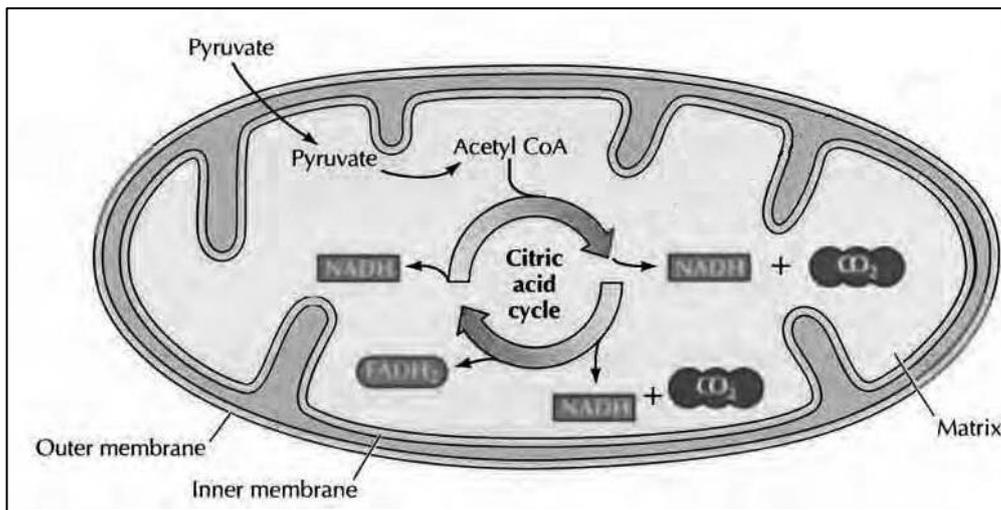


Figure 14 : Cycle de Krebs (Cooper et Hausman, 2007)

coenzymes NADH et FADH₂, entre dans la chaîne respiratoire en réduisant le coenzyme Q en coenzyme QH₂ (Cooper et Haussman, 2006).

La chaîne respiratoire est composée principalement de 4 complexes protéiques : Complexe I (NADH-Q-réductase), II (succinate-Q-réductase), III (cytochrome réductase) et le Complexe IV (cytochrome oxydase)(**Figure n°15**). Le complexe I catalyse le transfert d'électrons de NADH à la coenzyme Q (QH₂). La réoxydation de FADH₂ est assurée à l'occasion de l'oxydation de succinate par le complexe II (succinate-Q-réductase), les électrons sont aussi transférés à la coenzyme Q (QH₂). Donc, l'ensemble des électrons prélevés aux substrats organiques lors de cycle de Krebs est pris en charge définitivement par le coenzyme Q. Le complexe III assure la réduction du cytochrome C par le coenzyme Q réduite (QH₂). La mobilité de cytochrome c assure le transfert des électrons du complexe III au complexe IV. Le complexe IV transfère finalement les électrons sur le dioxygène (O₂), l'accepteur final de ces électrons. La réduction de l'O₂ produit des ions O⁻², combinés avec les protons H⁺, formant de l'eau.

Lors de transport d'électrons, les protons H⁺ issus de la réoxydation de NADH et FADH₂ sont pompés activement de la matrice mitochondriale, en trois sites, les complexes I, II et III, vers l'espace intermembranaire créant un gradient de protons H⁺. Les détails de mécanisme de gradient de protons H⁺ n'est pas totalement connu. Ce gradient constitue une énergie de 2 types ; chimique et électrique, issus de la différence en concentration et en charge des protons H⁺ entre le milieu intermembranaire et la matrice mitochondriale(**Figure n°15**). Cette énergie est utilisée pour la synthèse de l'ATP (Cooper et Haussman, 2006 ; Jin et Bethke, 2002).

(v) La synthèse de l'ATP, le site de synthèse est la membrane interne mitochondriale. La synthèse se fait par l'enzyme ATPase (Complexe V).

Le gradient de protons H⁺ c'est-à-dire la concentration élevée de H⁺ dans l'espace intermembranaire induit un flux passif des protons H⁺ de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. L'ADP et le Pi étant piégés dans l'ATPase, le flux des protons H⁺ à travers de cette enzyme, entraîne la formation d'ATP et sa libération dans la matrice. La formation et la libération des ATP sont effectuées grâce à l'énergie du flux des protons H⁺(**Figure n°15**).

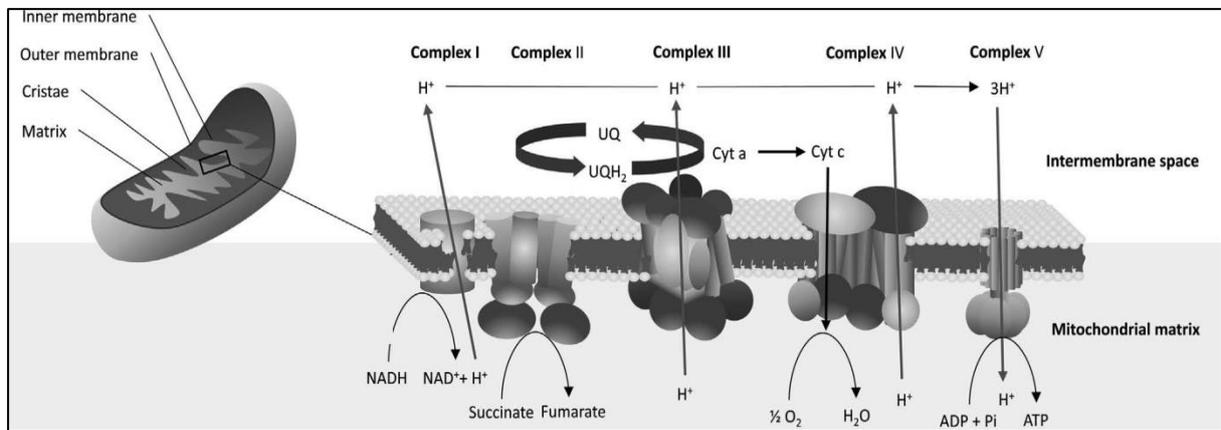


Figure 15 : Chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP (Benkhalifa et al., 2014)

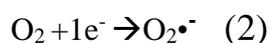
Le rendement de l'énergie d'une molécule de glucose pourrait être calculé à partir de ces données : une molécule de NADH donne 3 ATP, une molécule de FADH₂ donne 2ATP et molécule de GTP donne 1ATP (Cooper et Haussman, 2006 ; Mitchell, 1961). Le rendement est calculé selon les ATP, les GTP, le NADH et FADH₂ générés durant les étapes ci-citées :

$$2 \text{ ATP} + (2\text{NADH} \times 3) \text{ (i)} + 2\text{NADH} \times 3 \text{ (ii)} + (6\text{NADH} \times 3) + (2\text{FADH}_2 \times 2) + 2\text{GTP} \text{ (iii)} = 38 \text{ ATP} \text{ (Cooper et Haussman, 2006)}$$

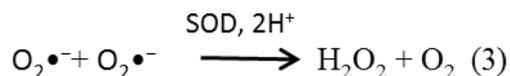
I.2.2 Génération des ERO par la semence

Les espèces réactives de l'oxygène représentent une collection des molécules issues du métabolisme de l'oxygène pour produire d'énergie sous forme d'ATP. Les principales ERO générées par la semence sont le superoxyde (O₂•⁻), le peroxyde hydrogène (H₂O₂), Hydroxyle (OH•), hydroxyle anion (OH⁻) nitrique oxyde (NO•). Certains de ces ERO sont des radicaux libres tel que le superoxyde car elles possèdent un ou des électrons non appariés sur la couche périphérique de l'atome. Les autres ERO possèdent des électrons appariés telle que le peroxyde hydrogène (Gardès-albert *et al.*, 2003).

Durant la respiration des spermatozoïdes, les enzymes de la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne des mitochondries réduit la majorité de l'oxygène (O₂) par 4 électrons pour former l'eau (réaction (1)). Toutefois, cette chaîne laisse « fuiter » un électron qui réduit l'O₂ en un radical libre appelé le superoxyde (O₂•⁻) (réaction (2)). Environ 2% de l'O₂ consommé subit une réduction monoélectronique (Gardès-albert *et al.*, 2003).

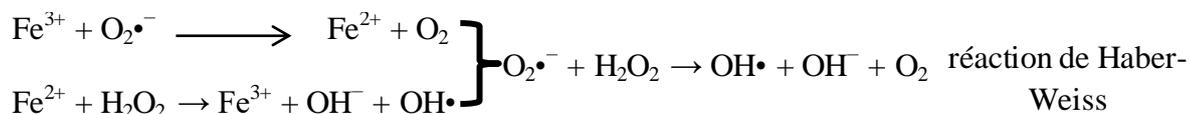
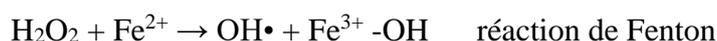


Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé par des enzymes appelées superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation en formant une autre ERO, le peroxyde d'hydrogène (réaction (3)). Il existe deux types de superoxyde dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu,Zn-SOD) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse (Mn-SOD) et est présente dans les mitochondries (Gardès-albert *et al.*, 2003) .



Le peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée) formé n'est pas un radical libre mais une espèce réactive de l'oxygène ayant tous ses électrons périphériques appariés. Il est relativement stable et Il diffuse facilement à travers les membranes.

La partie majeure de la toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH• en présence de cations métalliques tels que les ions ferreux (Fe²⁺) (réaction (4), dite de Fenton) et les ions ferriques (Fe³⁺) (réaction (5) dite de Haber-Weiss. Le radical hydroxyle est extrêmement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques tels que la peroxydation des lipides membranaires et la fragmentation d'ADN (Gardès-albert *et al.*, 2003).



I.2.2.1 Rôle physiologique des ERO

Un niveau physiologique des ERO jouerait un rôle important dans les processus physiologiques normaux du spermatozoïde. Au cours du transit épидидymaire, les ERO modifient par oxydation les caractéristiques structurales et biochimiques de l'ADN, des protéines et des lipides du spermatozoïde. Ils contribuent ainsi à la condensation nucléaire, au remodelage des membranes et à l'acquisition d'une mobilité rectiligne. Dans le tractus génital de la femelle, ils interviennent dans la capacitation, la réaction acrosomiale, l'acquisition d'une mobilité hyperactive, et la fusion spermatozoïde-ovocyte.

La capacitation est la dernière phase du développement du spermatozoïde nécessaire pour la fécondation de l'ovocyte. La production contrôlée des ERO se fait dans les spermatozoïdes au cours du processus de capacitation, initiant diverses modifications moléculaires. Plusieurs activations enzymatiques et régulations d'expression génique impliquent l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC). Les ERO entraînent une

augmentation de l'AMPc qui est nécessaire à l'acquisition d'une mobilité hyperactive par les spermatozoïdes. La mobilité hyperactive est un état spécifique des spermatozoïdes essentiel pour la fécondation qui est considérée comme le prolongement de la capacitation. Les spermatozoïdes hyperactifs présentent une forte amplitude, un mouvement flagellaire asymétrique, un déplacement de la tête accru et une mobilité non linéaire. Après le passage du cumulus oophorus, le spermatozoïde hyperactif se lie à la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte et initie une libération des enzymes protéolytiques, créant un pore dans la matrice extracellulaire de la ZP. Les spermatozoïdes pénètrent ensuite cette barrière physique et fusionnent avec l'ovocyte. Le rôle des ERO dans la réaction acrosomiale *in vivo* implique une action des spermatozoïdes sur la ZP par phosphorylation de trois protéines de la membrane plasmique. L'activation *in vitro* de la réaction acrosomiale est également obtenue lorsque des concentrations physiologiques d'oxydants sont ajoutées au plasma séminal. Enfin, la régulation de la fluidité membranaire du spermatozoïde se fait grâce à la quantité élevée d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Les ERO peuvent augmenter la fluidité membranaire et faciliter la fusion entre spermatozoïde et ovocyte, lequel se produit au cours de la cascade biochimique de la capacitation et de la réaction acrosomiale (Du Plessis *et al.*, 2015a ; Lamirande *et al.*, 1997 ; Aitken, 1979).

I.2.2.2 Génération pathologique des ERO

Les spermatozoïdes subissant un stress tel que le stress de la congélation génèrent excessivement les ERO en épuisant le système de défense représenté par les antioxydants du sperme, c'est le stress oxydatif. En effet, l'excès des ERO altèrent les différentes structures des spermatozoïdes et leur fonction en diminuant ainsi leur fertilité. La peroxydation des lipides membranaires et la fragmentation de l'ADN sont les principaux dommages des ERO (Bucak *et al.*, 2008 ; Aitken et Baker, 2004). Ces dommages seront détaillés dans la section, lésions de cryoconservation.

I.2.3 Le système antioxydant du sperme

Le spermatozoïde combat les attaques des ERO grâce aux antioxydants. Ces derniers agissent en interrompant les réactions en chaîne aboutissant à la production des ERO. Les antioxydants présents dans la semence sont des agents protecteurs contre les dommages des ERO. En raison de leurs cytoplasmes réduits, les spermatozoïdes ne sont pas riches en antioxydants comme le plasma séminal. Généralement, les antioxydants sont classés en deux catégories, les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Bansal et Bilaspuri, 2011).

I.2.3.1 Les antioxydants enzymatiques

Les principaux antioxydants enzymatiques sont la Catalase (CAT), la Superoxyde dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes sont appelées la triade catalytique CAT/GPx/SOD. Ces enzymes travaillant ensemble possèdent une grande affinité pour les ERO avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser (Amidi *et al.*, 2016 ; Vamecq *et al.*, 2004).

I.2.3.1.1 Catalase

Cette enzyme est rapportée comme un détoxifiant potentiel du peroxyde d'hydrogène. ($2\text{H}_2\text{O}_2 - \text{CAT} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Elle présente principalement dans le plasma séminal (Chen *et al.*, 2003; Tramer *et al.*, 1998). En général, la fonction potentielle de CAT est associée à la fonction de SOD. Cette dernière constitue la première ligne de défense par la conversion de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , tandis que la CAT détoxifie le H_2O_2 (Vamecq *et al.*, 2004).

I.2.3.1.2 Glutathion peroxydase

Différentes GPx ont été connues chez plusieurs espèces telles que les ovins et les lapins (Alvarez et Storey, 1989 ; Li, 1975). Cette enzyme, composée de glutathion (GSH) et le sélénium, est un donneur d'un électron. Elle est la clef responsable de l'élimination des radicaux alkyles peroxy (ROO•) de la chaîne de réaction de la peroxydation des lipides. En effet, cette enzyme intervient dans la protection des cellules contre la peroxydation des lipides. De plus, la GPx détoxifie aussi les H_2O_2 générés par la SOD. La réaction de GPx avec les radicaux libres conduit à l'oxydation de GSH et la formation d'un dimère (2 molécules) de GSH (GSSH), c'est la forme oxydée de GSH. En présence NADH et la glutathion réductase (GSR), les GSSH génèrent les GPx ($2\text{GPx} (2\text{GSH}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSH} + 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{GSSH} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GSR}} 2\text{GSH} (\text{GPx}) + \text{NADP}^+$) (Vamecq *et al.*, 2004). En raison de sa concentration élevée principalement dans le plasma séminal (Bilodeau *et al.*, 2000), la GPx est l'enzyme la plus dominante qui protège le sperme contre le stress oxydatif.

I.2.3.1.3 Superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase constitue la première ligne de défense contre le stress oxydatif chez les cellules vivantes. La source majeure de SOD est les glandes accessoires du mâle telles que la prostate et la vésicule séminale (Chen *et al.*, 2003 ; Bilodeau *et al.*, 2000) .

La SOD est un antioxydant enzymatique qui catalyse le $O_2^{\bullet-}$ en générant H_2O_2 ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$) (Vamecq *et al.*, 2004).

I.2.3.2 Antioxydants non enzymatiques

Les fonctions des antioxydants non enzymatiques lipophiles ou hydrophiles sont d'inhiber l'initiation et la propagation de la peroxydation des lipides et d'éliminer les ERO. Les principaux antioxydants non enzymatiques présents dans le sperme sont : la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (l'acide ascorbique), la vitamine A (Rétinol) et l'acide urique (Amidi., 2016).

I.2.3.2.1 Vitamine E

La vitamine E est une molécule antioxydante liposoluble naturelle non enzymatique présente dans le plasma séminal et dans la membrane cellulaire (Surai *et al.*, 2001, 1998). Elle est considérée comme l'antioxydant le plus puissant. Elle est connue comme une substance efficace pour prévenir ou stopper la peroxydation des lipides membranaires en neutralisant les ERO. En effet, la peroxydation des lipides est initiée en présence des ERO notamment le peroxyde (HO^{\bullet}), ce dernier arrache l'atome d'hydrogène du radical de l'acide gras insaturé formant un radical alkyl (R^{\bullet}). La vitamine E pourrait réagir avec le peroxyde en lui donnant un atome d'hydrogène (**Figure n°16**). Donc, la vitamine E combat l'initiation de la peroxydation de lipide en empêchant la formation des radicaux alkyles. En outre, la propagation de la peroxydation des lipides requiert la formation des radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) au niveau des acides gras polyinsaturés. La vitamine E réagit rapidement avec les radicaux peroxydes des lipides avant la réaction de ces derniers avec les lipides adjacents. La vitamine E réagit avec les lipides peroxydes en lui donnant un atome d'hydrogène pour former des lipides hydroperoxydes ($Vitamine\ E + ROO^{\bullet} \rightarrow Vitamine\ E^{\bullet} + ROOH$). Cette réaction empêche la propagation de la peroxydation des lipides. D'ailleurs, une molécule de vitamine E protège 1000 molécules d'acides gras polyinsaturés (Niki *et al.*, 2004 ; Surai *et al.*, 1998; Ernster *et al.*, 1992). La vitamine E a été aussi considérée comme un composant stabilisateur de la membrane cellulaire, particulièrement pour les cellules ayant un taux élevé en acides gras polyinsaturés. Cette stabilité est liée à sa localisation dans les noyaux lipidiques et à ses liaisons avec les phospholipides (Urano *et al.*, 1987, 1988).

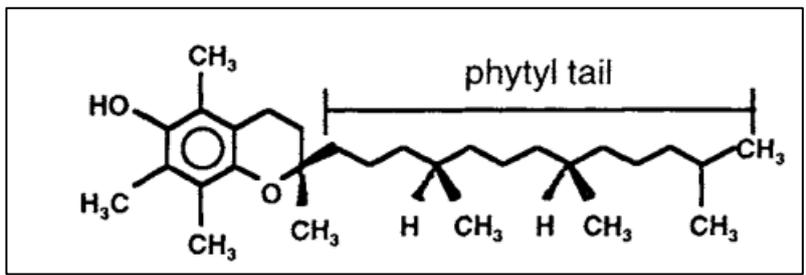


Figure 16 : Structure de α -tocophérol (Traber et al., 1999)

I.3 Cryoconservation de la semence ovine

I.3.1 Les bases de la cryobiologie

I.3.1.1 Les bases physiques de l'eau

L'eau, est une molécule constituée d'un atome d'oxygène dont la couche externe est insaturée (Constituée de 6 électrons). Elle nécessite, donc, la contribution de deux atomes d'hydrogène (Un seul électron) en vue de sa saturation. L'ensemble des atomes sont liés par des liaisons dites covalentes à forte énergie (nécessitant une forte énergie pour leur rupture) mais ces derniers ne se trouvent pas en symétrie spatiale et se voient espacés d'un angle de 120° par rapport à l'atome d'oxygène (Daniel et brigitte, 2004). Cette asymétrie octroi à l'atome d'oxygène deux pôles négatifs tandis que chaque atome d'hydrogène se voit attribuer un pôle positif. L'orbite de la molécule est dit dipolaire éclectique avec deux pôles négatifs et autant de pôles positifs (**Figure n°17**) (Reed, 2008).

Chaque molécule d'eau peut se lier à quatre molécules d'eau adjacentes par des interactions électrostatiques en formant des liaisons hydrogènes ou liaison H. Chaque liaison H s'établit toujours entre un atome d'hydrogène engagé dans une liaison covalente chargée positivement et un atome d'oxygène, lui-même engagé dans une liaison covalente, chargée négativement. Etant donné la répartition des charges positives et négatives, chaque molécule d'eau peut en principe établir 4 liaisons d'hydrogène de faible énergie avec les molécules voisines (**Figure n°18**) (Daniel etBrigitte, 2004).

I.3.1.1.1 Congélation de l'eau

La compréhension du phénomène de congélation de l'eau permet d'étudier le comportement de différentes cellules vis-à-vis la congélation et par conséquent l'optimisation des protocoles de congélation pour chaque type de cellule avec une survie optimale après la décongélation. Durant la congélation, l'eau passe par trois états, liquide, surfusion et la cristallisation.

I.3.1.1.2 Etat liquide

Entre la température ambiante et la température de surfusion, l'eau est en état liquide, les molécules d'eau sont en perpétuel mouvement. De nombreuses liaisons hydrogènes se créent, alors, et se cassent entre elles (Karow, 2001) (la durée moyenne de la liaison hydrogène entre deux molécules d'eau est 1.10^{-9} sec (Daniel etBrigitte, 2004).

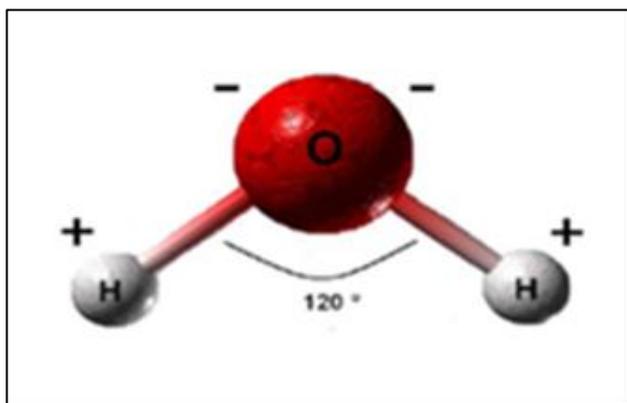


Figure 17: Géométrie et répartition de charges de la molécule d'eau (Daniel et al., 2004)

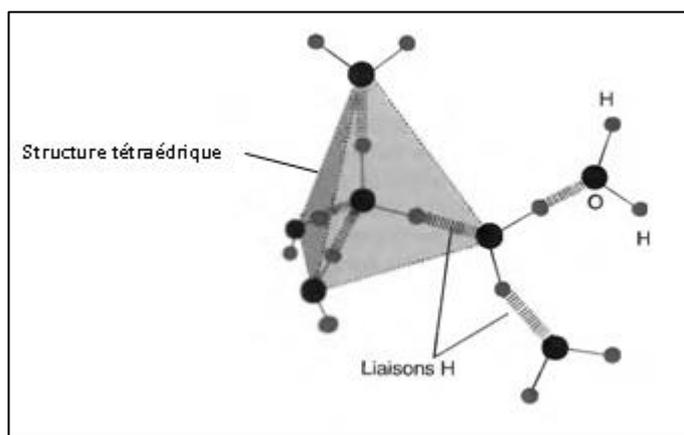


Figure 18 : Liaisons H entre les molécules d'eau et sa structure tétraédrique (Daniel, 2004).

I.3.1.1.3 Etat de surfusion

Entre la température de surfusion et la température de cristallisation, l'eau est en état de surfusion, lorsqu'une petite quantité de liquide est refroidie en dessous de sa température de congélation (point de nucléation), elle ne gèle pas immédiatement, mais demeure pour quelques temps dans un état instable dit de « surfusion » dû à l'absence de noyau de cristallisation (Odagescu, 2005).

I.3.1.1.4 Etat solide (cristallisation)

L'état de surfusion ne peut pas durer indéfiniment, il cesse spontanément à une température dite de nucléation, en dessous de laquelle le liquide se cristallise (Odagescu, 2005). La nucléation est définie comme le développement d'un noyau de taille critique à partir des agrégats de molécules d'eau (Odagescu, 2005). La formation d'un noyau se fait au hasard, mais une fois le noyau formé, le liquide "surfondu" se solidifie rapidement. Dans le cas de l'eau pure, ce phénomène de nucléation a lieu à -40°C. L'expansion de « noyaux » est un processus connu sous le nom de « croissance de cristaux de glace » ou « la cristallisation ». La cristallisation se propage jusqu'à la transformation de la totalité de l'eau en cristaux de glace. La différence fondamentale entre l'état liquide et l'état solide de l'eau est que les molécules d'eau qui forment les cristaux sont arrangées de manière uniforme et répétitive dans lesquels chaque molécule d'eau est toujours liée aux quatre molécules d'eau voisines (**Figure n°18**) par des liaisons H (forme tétraédrique) (Chaikin et Lubensky., 1995).

La structure cristallographique de la glace dépend des conditions de température et de pression (Odagescu, 2005), mais la taille des cristaux de glace dépend de la vitesse de refroidissement. Plus le refroidissement est rapide, plus le nombre de cristaux est grand et plus ces derniers sont petits (Courbière *et al.*, 2009).

Peu importe la structure des cristaux de glace, leur présence en extra ou en intracellulaire entraîne des lésions létales pour la cellule. Le premier objectif de la cryoconservation est d'éviter, au maximum, la formation de cristaux de glace particulièrement intracellulaire (Vanderzwalmen *et al.*, 2010).

I.3.2 Comportement de la cellule pendant la congélation

I.3.2.1 Effet du refroidissement sur la cellule (refroidissement entre la température ambiante et la température de cristallisation)

Durant le refroidissement, les activités enzymatiques et métaboliques de la cellule sont diminuées au fur et mesure de la chute de la température. Cependant, Le changement de température au cours d'un refroidissement peut entraîner des lésions cellulaires même en l'absence de formation de cristaux de glace, c'est le « choc au froid». De plus, le refroidissement augmente la consommation d'oxygène par la cellule et par conséquent un excès de production des espèces réactives d'oxygène (ERO) c'est « le stress oxydatif ». Le stress oxydatif comme le choc au froid provoquent des lésions cellulaires parfois létales. La peroxydation des lipides de la membrane cellulaire est la principale lésion causée par le stress oxydatif. En outre, les autres organites ne sont pas à l'abri des attaques des ERO (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 1991; Amann et Pickett, 1987; Darin-Bennett et White, 1977) .

I.3.2.2 Effet de cristallisation et de refroidissement

I.3.2.2.1 Formation des cristaux de glace

Si une solution isotonique contenant une cellule est refroidie, les cristaux de glace vont se former en premier lieu dans le milieu extracellulaire (**Figure n°19**) (Vanderzwalmen *et al.*, 2010), ils se forment au fur et à mesure de la descente de température (refroidissement). La cristallisation intracellulaire nécessite la présence des cristaux de glace extracellulaire et que ces derniers doivent être en contact avec le milieu intracellulaire soit par la présence des brèches dans la membrane plasmique soit par sa disparition totale (Barry *et al.*, 2004), c'est la propagation de la glace extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Barry *et al.*, 2004). La température de cristallisation du milieu de congélation du sperme dépend de la vitesse de refroidissement, elle est généralement entre -5 °C et -15°C (Amann et Pickett, 1987).

La formation de cristaux de glace principalement intracellulaire provoque des lésions mécaniques représentées par des ruptures des organites intracellulaires ainsi que de leur membrane. Ces lésions peuvent être immédiatement létales ou induire des déficits fonctionnels au sein de la cellule (Fuller *et al.*, 2004 ; Amann et Pickett, 1987).

La gravité des lésions des cristaux de glaces dépend de la taille de cristaux de glaces extracellulaire. La taille de cristaux est régit par la vitesse de refroidissement. De ce fait, il existe pour chaque type de cellule une vitesse de refroidissement optimale permettant



Figure 19 : Formation des cristaux extracellulaire (Leibo, 2008)

la congélation la moins délétère possible avec une survie maximale des cellules. En effet, la vitesse de refroidissement optimale permet de former des grands cristaux de glace extracellulaire. Ces derniers sont tolérés par la cellule et ne traversent pas la membrane plasmique. Cependant, la vitesse de refroidissement rapide entraîne une formation de nombreux cristaux de glace extracellulaire de petites tailles. Ce type de cristaux peut traverser la membrane cellulaire en propageant la cristallisation vers l'intérieur des cellules engendrant des dommages létaux plus graves pour la cellule (Meryman, 2007).

I.3.2.2.2 Effet solution (Déshydratation de la cellule)

Comme les premiers cristaux extracellulaire sont formés à partir d'eau pure, la concentration des sels dissouts augmente dans celle-ci qui est progressivement piégée dans la glace (Courbière *et al.*, 2009) et le milieu extracellulaire devient hypertonique. De l'eau intracellulaire sort de la cellule par osmose pour rééquilibrer le milieu conduisant à sa déshydratation. Ce phénomène est appelé l'effet solution.

La déshydratation d'une cellule durant la cristallisation extracellulaire est un processus indéniable pour la survie des cellules à basses températures. En effet, la déshydratation permet d'augmenter les concentrations des solutés intracellulaires y compris le cryoprotecteur. Elle diminue fortement la température de la nucléation du milieu intracellulaire (point de déclenchement de la cristallisation). A l'immersion directe des cellules dans l'azote liquide, les liquides intracellulaires se solidifient si rapidement que les molécules d'eau n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline. Ce qui induit la formation d'un état vitreux intracellulaire (Vanderzwalmen *et al.*, 2006). Un état de vitrification intracellulaire est un état amorphe solide mais sans cristaux de glace (Dessolle *et al.*, 2009). Le but principal de la congélation lente est d'empêcher la cristallisation intracellulaire et de réaliser l'état de vitrification à l'intérieur de la cellule (**Figure n°20**) (Meryman, 2007).

I.3.2.3 Cryoprotecteurs

La stratégie de résistance au froid de certains animaux poïkilothermes dits à sang froid démontre la possibilité de survivre à de très basses températures, souvent très en dessous de la température de congélation de leurs liquides biologiques. Ces animaux, comme par exemple certains lézards, tortues ou arthropodes, arrivent à empêcher les processus de cristallisation grâce à la synthèse de substances antigels parmi lesquelles on compte le

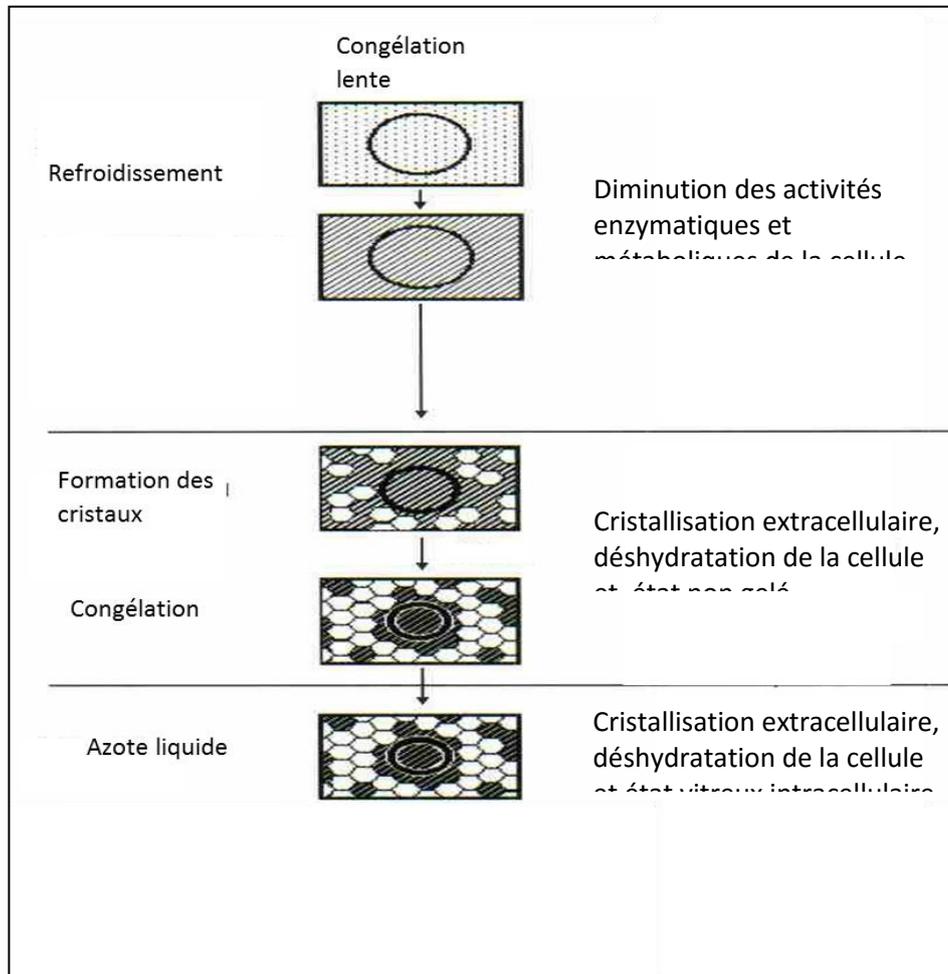


Figure 20 : Schéma représente les différentes étapes la congélation lente (Mukaida et al., 2002). (Hexagones représentent les cristaux de glace. Les concentrations de cryoprotecteurs sont démontrées par l'ombre foncée)

glycérol, le glucose, le sorbitol, des glycoprotéines antigél naturelles. Ces substances antigél régulent les processus de cristallisation et sont appelées cryoprotecteurs (Courbière *et al.*, 2009). Les objectifs de la cryoconservation sont de limiter ces lésions et pour cela, des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants la cellule sont utilisés. De plus, la vitesse de congélation et le volume congelé sont contrôlés (Chian et Quinn, 2010).

I.3.2.3.1 Définition

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

On distingue deux catégories de cryoprotecteurs, des cryoprotecteurs ne pénétrant pas la cellule (tréhalose, galactose, polyvinylpyrrolidone ...) et des cryoprotecteurs pénétrant la cellule (glycérol, éthylène glycol, diméthylsulfoxyde (DMSO)...).

I.3.2.3.2 Cryoprotecteurs pénétrants la cellule

Ce sont des substances organiques très solubles, dérivées le plus souvent d'alcools ou du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ils sont caractérisés par un poids moléculaire faible. Les cryoprotecteurs les plus utilisés en biologie de la reproduction sont : 1,2 propanediol (PM=76.1), DMSO (PM=78.13), glycérol (PM=92.1), éthylène-glycol (PM=62.07) et d'autres alcools (Palasz et Mapletoft, 1996).

I.3.2.3.3 Les cryoprotecteurs non pénétrants la cellule

- **A poids moléculaire faible**, nous citons : galactose (PM=180.2), glucose (PM=181.1), sucrose (PM =342.3), tréhalose (PM=378.3) et tous autres sucres.
- **A poids moléculaire élevé (> 50, 000 Daltons)** comme la polyvinylpyrrolidone (7.34), l'alcool polyvinylique (34.109), l'amidon hydrox éthylique (7.34), le hyaluronate de sodium (46.78) et d'autres polymères (Palasz et Mapletoft, 1996).

I.3.2.3.4 Mode d'action

Les cryoprotecteurs contiennent des groupements électronégatifs capables de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Ainsi, si les molécules d'eau sont

fortement liées au cryoprotecteur, leur mobilité diminue et la viscosité de la solution augmente, avec comme conséquence une diminution du taux de cristallisation. Grâce à leur grande affinité avec l'eau, les cryoprotecteurs interfèrent donc avec les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace (Courbière *et al.*, 2009).

Les cryoprotecteurs sont capables de diminuer le point de congélation des solutions.

Les cryoprotecteurs aident à déshydrater les cellules par l'effet osmotique, réduisant ainsi la quantité d'eau intracellulaire et en résulte une diminution du risque de formation des cristaux intracellulaires (Veeck, 2003).

A l'intérieur des cellules, les cryoprotecteurs pénétrants augmentent la concentration des solutés intracellulaires afin de diminuer la formation de cristaux intracellulaires (Courbière *et al.*, 2009). A fortes concentrations, ils empêchent même toute cristallisation et conduisent à un état dit vitrifié (Dessolle *et al.*, 2009).

Bien que, les mécanismes de cryoprotection font encore l'objet de nombreuses recherches, les scientifiques s'accordent à dire que le cryoprotecteur, qu'il soit pénétrant ou non, a une action avérée sur les processus de congélation et de décongélation, conditionnant le succès de ces dernières (Palasz et Mapletoft, 1996).

I.3.2.3.5 Choix des cryoprotecteurs

Le choix de cryoprotecteurs dépend de la toxicité, la solubilité, la pénétration cellulaire et la vitesse de refroidissement utilisée (Borini et Coticchio, 2009). En pratique courante, la cryopreservation de la cellule avec des techniques de congélation conventionnelles comporte, le plus fréquemment, l'utilisation d'un seul cryoprotecteur pénétrant la cellule à une faible concentration. L'utilisation des concentrations faibles de cryoprotecteur permet de réduire significativement sa toxicité vis-à-vis les cellules. Chez les mammifères, le glycérol est le cryoprotecteur le plus utilisé en cryoconservation de la semence (Salamon et Maxwell, 1995).

I.3.2.4 Lésions de la cryoconservation

Les manipulations durant les différentes étapes de cryoconservation exposent les spermatozoïdes aux dangers de lésions de plusieurs facteurs tels que la toxicité des

cryoprotecteurs, les lésions de refroidissement (choc au froid) (Amann et Pickett, 1987), le stress oxydatif (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 1991), les dommages mécaniques de formation des cristaux de glace, la toxicité des électrolytes concentrés, les lésions de rupture et le gonflement osmotique (Kasai, 1996 ; Medeiros *et al.*, 2002). Ces lésions provoquent des modifications morphologiques, cytologiques et biochimiques pouvant altérer la structure et la fonction du spermatozoïde. Comme les spermatozoïdes n'ont pas une machine de biosynthèse des molécules nécessaires pour une adaptation métabolique et structurale durant la cryoconservation, les travaux de recherche ont pour objectif de prévenir ou minimiser les lésions de la cryoconservation. En effet, le contrôle de la vitesse de refroidissement et l'ajout des molécules protectrices des spermatozoïdes au milieu de congélation sont les principales approches adoptées pour diminuer les effets délétères de la cryoconservation (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Salamon et Maxwell, 1995, 2000).

I.3.2.4.1 Lésions de refroidissement (choc au froid)

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

Dans les conditions physiologiques normales, les membranes cellulaires sont dans une phase fluide, présentant une conformation très désordonnée, dans laquelle les phospholipides et les protéines peuvent se mouvoir de différentes manières rotation et déplacement latéral, au sein de la bicouche lipidique (**Figure n°5**). Cependant, certaines protéines (domaines) entre autres les récepteurs membranaires sont appelées "Radeaux". Elles sont ordonnées et noyées dans la bicouche phospholipidique. Ces Radeaux sont enrichis en cholestérol (Cooper et Haussman, 2006 ; Brown et London, 2000 ; Amann et Pickett, 1987). La fluidité membranaire est indispensable pour différentes fonctions cellulaires : absorption, sécrétion, protection, adhérence, communication, capacitation, réaction acrosomiale, etc. La fluidité de la membrane et la conformation de la bicouche lipidique sont principalement déterminées par la structure des chaînes hydrocarbonées des acides gras (AG). Les AG courts réduisent la tendance des chaînes hydrocarbonées d'interagir entre eux en augmentant la fluidité et le désordre conformationnel de la double couche lipidique (Mantsch et McElhaney 1991).

Au cours du refroidissement, les lipides en bicouches subissent des changements radicaux dans leur état physique à une certaine température dite **température de transition de phase**. En dessous de cette température, la bicouche lipidique passe de l'état fluide à un état gel compact avec des chaînes des AG pratiquement immobilisées, régulièrement ordonnées et proches les unes des autres (**Figure n°21**). Dans cet état, les liaisons C-C entre les chaînes aliphatiques des AG adoptent, toutes, la configuration anti (position toutes-trans). Par conséquent, les chaînes sont parallèles avec une structure serrée et compactée. La température de transition de phase dépend de différents facteurs, tels que la composition lipidique de la membrane et le degré de l'hydratation de la membrane (Voet et Voet, 2005 ; Mantsch et McElhane, 1991). Chez le bélier, la température de transition de phase du spermatozoïde est d'environ 16°C (Holt et North 1984, 1986). A la température de transition de phase, certains lipides sont encore à l'état fluide et d'autres sont à l'état rigide ce qui induit des redistributions des molécules. Parmi ces remaniements, c'est le mouvement des protéines vers les lipides qui sont encore à l'état fluide formant, ainsi, des agrégats protéiques (Amann et Pickett, 1987). Ces derniers pourraient former entre eux des canaux augmentant la perméabilité au niveau de différentes régions de la membrane plasmique tels que l'acrosome et la région post-acrosomiale. Chez le bélier, l'ultrastructure du spermatozoïde refroidit jusqu'à 5°C montre la fracture de la membrane, le gonflement de l'acrosome et la désintégration des mitochondries. Ces dommages pourraient être expliqués par l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique issue des canaux formés d'agrégats de protéines (Amann et Pickett, 1987 ; Holt et North, 1984). Différents travaux de recherche montrent l'impact du choc au froid sur le spermatozoïde. En effet, le choc au froid altère les voies énergétiques du spermatozoïde, aérobie et anaérobie (glycolyse et l'oxydation), en limitant la génération de l'ATP requise pour sa mobilité. D'ailleurs, la perte de la mobilité et de l'intégrité de la membrane sont les principales manifestations du choc au froid observées après la décongélation de la semence. En outre, le choc au froid entraîne la destruction de l'acrosome et la perte de son contenu empêchant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. De plus, le choc au froid augmente la perméabilité de la membrane en altérant l'équilibre hémostasique de la cellule et la capacité régulatrice intracellulaire de calcium requise pour la fécondation (Karow et Crister, 1997 ; Amann et Pickett, 1987).

Après le réchauffement, les remaniements au niveau de la membrane plasmique surviennent au cours de la transition de phase sont irréversibles, car la membrane cellulaire ne reprend pas sa structure initiale. En effet, elle passe de l'état gel à un nouvel état dit cristal

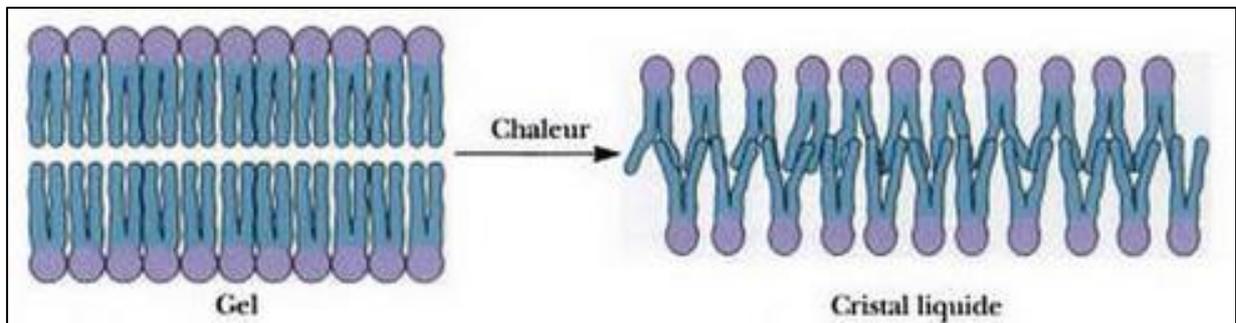


Figure 21 : Illustration de la transition d'un gel vers l'état de cristal liquide lorsque la membrane est chauffée jusqu' à sa température de transition de phase. Notez que la surface de la membrane doit s'accroître et que son épaisseur doit diminuer au cours de la transition de phase (Voet et Voet, 2005).

liquide(**Figure n°21**). Dans l'état, cristal liquide, les liaisons C-C entre les chaînes aliphatiques des AG adoptent toutes la configuration gauche. Donc, les dommages du choc au froid sont irréversibles (Voet et Voet, 2005).

Chez les mammifères, la susceptibilité élevée du spermatozoïde au choc au froid, est liée à la composition lipidique de la membrane plasmique. La relation entre la composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde et le choc au froid est largement étudiée. Premièrement, le cholestérol est un composant principal de la membrane cellulaire, il maintient la stabilité structurale de la membrane cellulaire à des basses températures en luttant contre les dommages du choc au froid. Sa quantité dans la membrane est déterminée par rapport aux phospholipides. La proportion cholestérol/phospholipide permet de déterminer la sensibilité du sperme au choc au froid. En effet, chez certaines espèces, tels que l'homme et le lapin, le sperme résiste au choc au froid grâce à leurs proportions élevées en cholestérol ; 0.88 et 0.99, respectivement. Cependant, chez le bélier, le sperme ayant une proportion faible en cholestérol (0.38) présente une sensibilité élevée au choc au froid. De plus, après le réchauffement, les dommages du choc au froid deviennent plus graves car la cryoconservation induit la déplétion du cholestérol (Muiño-Blanco *et al.*, 2008; Darin-Bennett et White, 1977).

Deuxièmement, le degré de la saturation des acides gras de la membrane détermine aussi la sensibilité de la membrane au choc au froid. Chez les mammifères y compris le bélier, la membrane du spermatozoïde est riche en acides gras polyinsaturés, par conséquent, une sensibilité élevée au froid (Holt et North, 1985). Il est évident que le sperme du bélier est très sensible au choc au froid dû à la faible quantité de cholestérol et une quantité élevée en acides gras polyinsaturés.

Durant la cryoconservation, la diminution de l'impact du choc au froid requiert un refroidissement lent et l'utilisation des substances protectrices de la membrane. La vitesse de refroidissement $<10^{\circ}\text{C/h}$ pourrait diminuer significativement les dommages du choc au froid, mais pas entièrement (Karow et Critser, 1997). D'où l'intérêt d'utiliser des substances protectrices des membranes, entre autres, le jaune d'œuf et le lait (Karow et Critser, 1997). Chez le bélier, le jaune d'œuf est le plus utilisé (Salamon et Maxwell, 1995, 2000) car il contient des lipoprotéines, des phospholipides et du cholestérol renforçant cette protection (Karow et Critser, 1997). Actuellement, l'impact du cholestérol dans le milieu de conservation est rendu plus efficace grâce à l'utilisation d'un transporteur, en l'occurrence, la cyclodextrine, qui permet son insertion dans la membrane cellulaire des spermatozoïdes de

différentes espèces (Ahmad *et al.*, 2013 ; Awad, 2011 ; Mocé *et al.*, 2010b ; Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2014).

I.3.2.4.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un excès de génération des oxydants par le sperme communément appelés « les espèces réactives de l'oxygène, ERO » associé à une défaillance de son système antioxydant (Sies, 1986).

Durant les différentes étapes de sa cryoconservation (collecte, dilution, refroidissement, congélation...), le sperme subit différents stress principalement, le stress thermique. Les différents stress de la cryoconservation, augmentent le métabolisme énergétique du spermatozoïde en consommant plus d'oxygène. L'augmentation du métabolisme énergétique entraîne un excès de génération des ERO. Ces derniers épuisent les antioxydants présents dans le sperme et dans le plasma séminal et, par conséquent, la cellule spermatique devient plus vulnérable aux attaques des ERO. Les ERO attaquent les différents composants organiques du spermatozoïde, les protéines, les lipides, les carbohydrates et l'ADN génomique et mitochondrial engendrant des altérations structurales et fonctionnelles. La peroxydation des lipides membranaires et la fragmentation de l'ADN, issues de l'attaque des ERO, sont les principaux dommages responsables de la perte de la mobilité, la viabilité et la fertilité du sperme. Parfois, la fécondation est réussie en présence du dommage ou d'une mutation de l'ADN génomique. Cependant, ceux-ci pourraient conduire au trouble du développement embryonnaire et à la naissance des produits avec différentes pathologies (Agarwal *et al.*, 2014; Guthrie et Welch, 2012 ; Aitken et Baker, 2004).

I.3.2.4.2.1 Peroxydation des lipides

Chez les mammifères, la membrane plasmique du spermatozoïde contient un taux élevé en acides gras polyinsaturés (AGPI) (Alvarez *et al.*, 1987) ce qui lui octroie une fluidité (Bell *et al.*, 1993). La fluidité de la membrane est requise pour les fonctions vitales de la cellule spermatique tel que le processus de fécondation particulièrement, la capacitation, la réaction acrosomiale et la fusion des gamètes (Bell *et al.*, 1993). Cependant, les AGPI rendent les spermatozoïdes plus susceptibles à la peroxydation des lipides (LPO) résultant des attaques des ERO (Yu, 1994). Les principales cibles de cette peroxydation des lipides sont, donc, les AGPI libres, associés à des lipoprotéines ou sous forme de phospholipides et les stérols.

Chez les bovins, la susceptibilité du sperme à la peroxydation des lipides augmente suite au choc au froid (de la température ambiante à 4 ou 5°C). Similairement, chez le bélier, la peroxydation des lipides et d'autres composants organiques est formée quand la température est maintenue à 4°C.

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui requiert l'implication de 3 phases : initiation, propagation et terminaison (Niki *et al.*, 2005; Aitken et Fisher, 1994; Cheesman 1993).

i) **L'initiation** : Durant cette phase, n'importe quel radical libre tels que OH• et NO• arrache un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂-) du radical alkyle (**RH**) des AGPI en formant un radical alkyle (R•) dit radical acide gras polyinsaturé (AGPI•) ($\text{AGPI-H} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{AGPI}\cdot + \text{H}_2\text{O}$)

ii) **La propagation** : Dans les conditions aérobiques, le radical AGPI• réagit avec une molécule de l'O₂ pour former un radical alkyle peroxy (ROO•) dit AGPI peroxy (AGPI-OO•) ($\text{AGPI}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{AGPI-OO}\cdot$). L'AGPI-OO• peut arracher un atome d'hydrogène d'un AGPI adjacent en créant un nouveau radical AGPI• ($\text{AGPI-OO}\cdot + \text{AGPI-H} \rightarrow \text{AGPI-OOH} + \text{AGPI}\cdot$), il s'agit de la propagation de l'oxydation. Le radical AGPI-OO• devient, alors, un radical hydroperoxy (AGPI-OOH).

iii) **La terminaison** : la chaîne de réaction de la peroxydation des lipides se termine par la réaction entre le radical AGPI• et O₂^{-•} pour former un radical hydroperoxy (AGPI-OOH) ($\text{AGPI}\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{AGPI-OOH}$) ou par la recombinaison de deux radicaux pour former des composés plus ou moins stable (exemple : $\text{AGPI-OO}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{AGPI-OOR}$).

Malgré l'étape de terminaison de la réaction, la présence des formes ioniques des métaux de transition comme le fer ou le cuivre, les lipides peroxydés peuvent générer de nouveaux radicaux lipidiques (AGPI-O• ou AGPI-OO•) qui seront alors à l'origine d'une reprise des réactions de peroxydation des lipides (Niki *et al.*, 2005; Aitken et Fisher, 1994; Cheesman 1993).

Les lipides peroxydés formés par l'action des ERO vont être dégradés. Cette dégradation génère des alcanes, des aldéhydes et des acides par rupture des liaisons covalentes. Les aldéhydes, en particulier, sont connus pour leur toxicité. Ils peuvent réagir avec nombreuses molécules biologiques comportant un groupement amine ($-NH_2$), thiol ($-SH$) ou carbonyle ($-CO$), formant des adduits sur les protéines, les lipides et l'ADN (Sies, 1986). Ces composés dus à la peroxydation lipidique peuvent générer des dommages dans tous les compartiments cellulaires (Sies, 1986). En effet, la peroxydation lipidique des membranes spermatiques provoque une augmentation de leur rigidité en altérant leurs fonctions (perméabilité, réaction acrosomiale...). Elle altère aussi les protéines par les produits de dégradation engendrant une perte de fonction des protéines membranaires (enzymes, récepteurs). La peroxydation des lipides altère gravement la mobilité, la viabilité et les processus de capacitation, de réaction acrosomiale et de fusion des gamètes. Ce phénomène est, aussi, reconnu comme nocif pour le sperme des différentes espèces : bovins, ovins, caprins et lapin. Chez l'homme, la peroxydation des lipides est considérée comme l'une des causes majeures du déclin de la fertilité du sperme (Agarwal *et al.*, 2014; Gazo *et al.*, 2014; Guthrie et Welch, 2012; Cerolini *et al.*, 2006 ; Sanocka et Kurpisz, 2004).

Le niveau de la peroxydation des lipides est mesuré grâce à la quantification du malondialdéhyde (MDA) en utilisant l'acide thiobarbiturique. Le MDA est considéré comme le point final de la chaîne de réaction de la peroxydation des lipides (Bucak *et al.*, 2007, 2008 ; Buege et Aust, 1978).

I.3.2.4.2 Fragmentation de l'ADN

La peroxydation des lipides membranaires sont la première cible du stress oxydatif provient de la cryoconservation du sperme. Le stress oxydatif est capable aussi de causer des dommages (fragmentation) significatifs de l'ADN mitochondrial et l'ADN génomique (Wright *et al.*, 2014). La fragmentation de l'ADN génomique est un point crucial en termes de fertilité, puisque le bon déroulement du développement embryonnaire et la bonne santé du produit repose sur le fait que le patrimoine génétique parental transmis soit exempt d'erreurs et de modifications. La fragmentation de l'ADN spermatique, due au stress oxydatif, est largement étudiée particulièrement chez l'homme. Durant le transit épидидymaire les protéines histidines sont remplacées par les protamines qui octroient à la chromatine des spermatozoïdes une structure très compactée bien organisée. Cette structure a pour objectif de protéger l'information génétique. L'ADN génomique du spermatozoïde est plus résistant aux

dommages causés par les ERO par rapport à l'ADN mitochondrial. Cette résistance au stress oxydatif est tributaire de la structure compactée de l'ADN génomique (Agarwal *et al.*, 2014 ; Noblanc, 2013 ; Zini *et al.*, 2009).

Toutefois, dans certains cas où la compaction est médiocre et la protamination de la chromatine est incomplète, l'ADN devient plus vulnérable aux attaques des ERO. Des cassures simples et double-brin de l'ADN résultant de l'action des ERO ont été observées dans les spermatozoïdes. En effet, ces cassures sont issues des modifications des bases azotées et des liaisons covalent inter et intra-brins avec les protéines chromatiniennes. De plus, les ERO peuvent réagir avec toutes les bases (Adénine, Thymine, Guanine, Cytosine) en engendrant l'apparition des mutations ou la suppression des gènes. En outre, les modifications affectant les bases azotées ou la formation des liaisons covalentes anormales, peuvent entraîner une modification de la conformation du filament d'ADN et bloquer les processus de réplication et de transcription (Agarwal *et al.*, 2014 ; Zin et Agarwal, 2011).

Lorsque l'ADN est faiblement endommagé, il peut être réparé et le spermatozoïde retrouve la capacité à féconder l'ovocyte. C'est uniquement lors de la fécondation que l'ovocyte prendra en charge la réparation des dommages de l'ADN spermatique. Dans les cas où les mécanismes de réparation par l'ovocyte ne suffisent pas, les dommages pourraient, altérer le développement et l'implantation de l'embryon dans l'utérus, augmenter la morbidité après la naissance ou l'apparition des pathologies comme le cancer chez les enfants. Les dommages sur l'ADN sont, aussi, impliqués dans l'apoptose (Agarwal *et al.*, 2014 ; Noblanc, 2013). Chez le bélier, la cryoconservation facilite la fragmentation de l'ADN génomique en affectant les différents paramètres d'évaluation de la qualité du sperme (Peris *et al.*, 2004). En effet, la mobilité du sperme est le premier paramètre affecté par l'atteinte de l'ADN (Wright *et al.*, 2014).

Le dommage de l'ADN mitochondrial pourrait aussi affecter la fertilité du sperme. La production d'énergie par les mitochondries nécessaire pour la mobilité du sperme est contrôlée par leur propre ADN (Wright *et al.*, 2014). De ce fait, un spermatozoïde ayant un ADN altéré a une faible probabilité de féconder l'ovocyte. Celle-ci est liée à la perte de la mobilité du spermatozoïde, facteur crucial pour la réussite de la fécondation. Chez l'homme, les ERO pourraient engendrer des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial responsables de l'apparition de plusieurs maladies, principalement, les maladies neuromusculaires et neurodégénératives (Zin et Agarwal, 2011).

I.3.2.4.2.3 Dommages des protéines et des carbohydrates

L'oxydation des protéines et les carbohydrates sont deux phénomènes compliqués. Ceux-ci dus aux variétés des protéines et des glucides présents dans la cellule. Durant la cryoconservation, les ERO pourraient attaquer les protéines structurales et fonctionnelles engendrant des dommages parfois létaux pour la cellule. Les ERO sont capables de modifier des liaisons au niveau des protéines provoquant leur agrégation. Ces protéines agrégées deviennent plus sensibles à la protéolyse. Les ERO pourraient aussi attaquer les sites actifs des protéines compromettant leur fonction. Par exemple, si une protéine du transport ou du canal est attaquée par un radical libre, les gradients transmembranaires d'ions sont affectés conduisant à la mort cellulaire. Les glucides liés aux protéines ou des lipides pourraient aussi être attaqués par les ERO formant un radical carboné et H₂O₂, les conséquences sont moins graves que les dommages précédents (Noblanc, 2013 ; Dean *et al.*, 1997).

I.3.2.4.2.4 Manifestations du stress oxydatif sur la semence décongelée

La production excessive des ERO se manifeste sur la semence décongelée par une diminution de la mobilité, la viabilité et l'atteinte morphologie des spermatozoïdes. Ces paramètres sont les principaux paramètres corrélés avec la fertilité du mâle. La diminution de la mobilité pourrait être liée principalement à l'atteinte des membranes et des génomes des mitochondries. Celle-ci affecte la production de l'énergie requise pour les mouvements des spermatozoïdes. La diminution de la viabilité et l'atteinte de la morphologie des spermatozoïdes sont, principalement, tributaires de la perte de l'intégrité de la membrane et de l'acrosome causée par la peroxydation des lipides. La fragmentation de l'ADN génomique du spermatozoïde est, aussi, l'une des causes majeures de la mort cellulaire. D'ailleurs, elle intervient dans l'apoptose (Gazo *et al.*, 2015 ; Agarwal *et al.*, 2014, Wright *et al.*, 2014).

I.3.2.4.2.5 Protection contre le stress oxydatif durant la cryoconservation

Les spermatozoïdes combattent le stress oxydatif par les antioxydants présents dans leurs cytoplasmes et le plasma séminal. Les principaux antioxydants du sperme sont la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (l'acide ascorbique), la Catalase (CAT), la Superoxyde dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GPx). Les fonctions des antioxydants sont d'inhiber l'initiation et la propagation de la peroxydation des lipides et d'éliminer les ERO.

Durant la cryoconservation, les antioxydants de la semence ne suffisent pas pour assurer une protection optimale des spermatozoïdes contre les ERO. En effet, le processus de dilution et le cytoplasme réduit des spermatozoïdes n'assure pas une quantité suffisante protectrice en antioxydants. En outre, les spermatozoïdes n'ont ni la capacité de régénération des molécules antioxydantes une fois épuisées par les ERO ni un système de réparation des lésions causées par le stress oxydatif. De ce fait, la supplémentation du milieu de congélation par des molécules antioxydantes est, actuellement, l'approche principale pratiquée pour minimiser les effets délétères du stress oxydatif. Cette approche a amélioré significativement la qualité de la semence post décongélation, pratiquement chez toutes les espèces. Chez le bélier, elle est basée sur l'utilisation d'un seul ou plusieurs antioxydants tels que la Catalase, la Glutathion, la vitamine E... Cette dernière est considérée comme un antioxydant puissant présent dans la membrane cellulaire combattant les ERO et la peroxydation des lipides. En raison de sa faible solubilité dans les milieux de conservation, la supplémentation de la vitamine E dans les milieux de congélation a donné des résultats divergents. Malgré les travaux de recherches sur le stress oxydatif, l'adoption des antioxydants conventionnels pour la cryoconservation de la semence n'est pas encore achevée.

I.3.2.4.3 Formation des cristaux de glace et l'effet de solution

La formation des cristaux de glace extra et intracellulaire est considérée comme la source majeure des lésions des membranes et des organites cellulaires, tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, et la dénaturation du cytosquelette de la cellule (Baust et Baust, 2007). Le phénomène peut se produire entre -5 et -80°C (principalement, entre -5 et -40°C) et a, la plupart du temps, des effets mécaniques délétères sur toutes les structures (Tucker et Liebermann, 2007).

La toxicité de l'effet solution pourrait être de deux types. D'une part, ce serait la forte concentration en solutés intracellulaires qui endommagerait la cellule. D'autre part, la contraction induite par une déshydratation trop importante, réduirait le volume du spermatozoïde jusqu'à une valeur seuil que le spermatozoïde ne pourrait plus tolérer, ce qui endommagerait les membranes (Courbière *et al.*, 2009).

Pour empêcher les lésions causées par les cristaux de glace intracellulaire, le spermatozoïde doit être chargé avec un cryoprotecteur et la solution de congélation doit être refroidie lentement de sorte que le contenu cellulaire devienne concentré par une

déshydratation progressive en réponse à la concentration de la fraction extracellulaire non gelée pendant la croissance de la glace extracellulaire (Gardner *et al.*, 2004).

La vitesse optimale de refroidissement permet à la cellule de se déshydrater suffisamment (Bakhachet *al.*, 2007) et permet aussi de former des cristaux de glace extracellulaire de grandes tailles. Ces derniers peuvent être tolérés par la cellule. Les grands cristaux extracellulaire ne traversent pas la membrane cellulaire, donc il n'y a pas de propagation de la glace de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Meryman, 2007).

En raison de cytoplasme réduit du spermatozoïde, les lésions causées par les cristaux de glace sont moins importantes par rapport aux autres lésions de cryoconservation telle que la peroxydation des lipides.

I.3.2.4.4 Toxicité des Cryoprotecteurs

L'utilisation des cryoprotecteurs est un élément essentiel pour réduire les lésions causées par les cristaux de glace pendant la cryoconservation. A des concentrations élevées, les cryoprotecteurs sont toxiques. La cryoconservation de la semence requiert en général l'utilisation d'un seul cryoprotecteur à faible concentration, ce qui permet de réduire significativement sa toxicité (Salamon et Maxwell, 2000).

I.3.2.4.5 Les lésions pendant le réchauffement

Les lésions qui se produisent durant le réchauffement sont les mêmes que celles observées pendant la congélation, évidemment dans un ordre d'inversion (Tucker et Liebermann., 2007).

La cellule cryoconservée est en état rétrécie (déshydraté). Son réchauffement lui permet de restaurer son volume normal. La restauration lente de l'équilibre osmotique de la cellule au cours du réchauffement lent l'expose à la toxicité des solutés et du cryoprotecteur intracellulaires. Cependant, le réchauffement rapide réduit la durée de l'exposition des spermatozoïdes aux concentrations élevées des solutés et du cryoprotecteur en diminuant, par conséquent, la toxicité de la cellule.

Au cours du réchauffement, la semence traverse la température critique comprise entre -15°C et -60°C (Amann et Pickett, 1987). Par conséquent, la recristallisation intracellulaire peut se produire durant le réchauffement. Cette recristallisation est responsable de lésions irréversibles de la cellule (Barry *et al.*, 2004). Le réchauffement doit être rapide pour éviter la recristallisation (Dessolle *et al.*, 2009). En effet, le réchauffement rapide permet

de traverser les températures critiques empêchant la cristallisation intracellulaire.

Chez le bélier, la décongélation des paillettes s'effectue, en général, en les plongeant dans un bain marie à 38-42°C pendant 30 secondes. La vitesse de réchauffement à 38°C est environ de 700°C/min (Amann et Pickett, 1987).

I.3.2.4.6 Choc osmotique

Au cours de l'équilibration de la semence avec le milieu de congélation, l'eau sort rapidement de la cellule, contrairement au le cryoprotecteur qui diffuse lentement dans son milieu intérieur d'où la déshydratation de cellule qui pourrait être intolérable engendrant des lésions parfois létales. Un retour partiel de l'eau à l'intérieur de la cellule permet de rétablir l'équilibre osmotique (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Amann et pickett, 1987).

Lors de la congélation, les cristaux de glace se forment, généralement, d'abord dans le milieu extracellulaire entraînant une déshydratation de la cellule par l'effet solution. Il peut résulter de cette déshydratation une importante diminution du volume des cellules et par effet osmotique, elle peut endommager la membrane cellulaire et altérer le cytosquelette intracellulaire si elle conduit à une forte contraction des cellules. Les tensions exercées sur la membrane provoquent alors une diminution irréversible du volume cellulaire, jusqu'au moment où les cellules atteignent le volume critique, au-dessous duquel elles meurent du fait de fortes contraintes mécaniques (Odagescu, 2005). La vitesse optimale de refroidissement permet à la cellule de se déshydrater suffisamment (Bakhachet *al.*, 2007) en diminuant les risques de lésions osmotiques.

Au cours de réchauffement, la cellule restaure son volume initial. Le réchauffement rapide permet une reprise rapide de l'équilibre osmotique. Cette dernière diminue le temps de l'exposition des spermatozoïdes aux concentrations élevées toxiques du cryoprotecteur et des solutés intracellulaires (Amann et Pickett, 1987).

I.3.3 Application de la cryoconservation de la semence

I.3.3.1 Dilution du sperme

L'objectif principal de la dilution est d'inséminer plusieurs femelles à partir d'un seul éjaculat. Chez le bélier, le taux de dilution n'est pas conventionnel. Cependant, il est en générale effectué pour atteindre une concentration entre 80 et 500 x10⁶ Spz/ml (Barbas et Mascarenhas, 2009).

La dilution est faite par un milieu dit dilueur ou milieu de congélation. Ce dernier doit assurer la protection et la nourriture des spermatozoïdes durant la congélation. La composition des milieux de congélation est plus ou moins variée. Néanmoins, la majorité des milieux développés sont à base du jaune d'œuf. Ce dernier est plus souvent, ajouté au moment de l'utilisation (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Salamon et Maxwell, 1995, 2000). Les composants du milieu de congélation doit :

- Protéger les cellules contre les cristaux de glace
- Etre isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- Posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spermatozoïdes,
- Avoir un PH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un PH optimal pendant tout le temps de la conservation,
- Avoir un pouvoir antioxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- Avoir une activité antimicrobienne,
- Posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes

I.3.3.1.1 Composants des milieux de congélation

I.3.3.1.1.1 Cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs les plus utilisés pour la semence sont les cryoprotecteurs pénétrants. Chez le bélier, le glycérol est le cryoprotecteur de choix. Sa concentration varie entre 3 et 7% (v/v). Il protège les spermatozoïdes contre les effets délétères des cristaux de glace (Salamon et Maxwell, 1995, 2000).

I.3.3.1.1.2 Protecteurs membranaires

Il s'agit principalement du jaune d'œuf et du lait qui sont ajoutés au dilueur car ils possèdent plusieurs propriétés intéressantes, notamment celle de protéger les membranes des spermatozoïdes. Chez le bélier, le jaune d'œuf est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation. Néanmoins, le mécanisme de cette protection n'est pas encore totalement élucidé. Le plus souvent, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20 % (Salamon et Maxwell, 1995, 2000). Le jaune d'œuf est une substance biologique, il est considéré comme une source de contamination importante, il présente plusieurs composants autres que les phospholipides néfastes pour le sperme. De ce fait, des études ont été faites pour substituer le jaune d'œuf par des molécules synthétiques ou semi-synthétiques.

Les milieux de conservation à base des molécules synthétiques tels que le complexes cyclodextrine-cholestérol (Ahmad *et al.*, 2013 ; Awad, 2011 ; Mocé *et al.*, 2010b ; Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2014) et les liposomes (Pillet *et al.*, 2012) ont été testés et développés. D'ailleurs, IMV technologies et Minitube commercialisent des milieux de congélation à base de lécithine exempte de jaune d'œuf (Bioxcell et Andromed®) principalement pour les bovins (Salmani *et al.*, 2013) . Les lipoprotéines à faible densité LDL (low density lipoprotéin) extraites du jaune d'œuf sont des molécules semi-synthétiques, elles ont remplacé avec succès le jaune d'œuf dans les milieux de conservation chez plusieurs espèces tels que le taureau et le chien (Bencharif *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2011). Cependant, en raison de l'alourdissement de l'opération de l'extraction des LDL, la commercialisation des milieux à base des LDL n'est pas encore achevée.

I.3.3.1.1.3 Substances tampons

Le métabolisme des spermatozoïdes engendre une acidification du milieu extracellulaire qui est toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes. Des substances tampons doivent donc être utilisées afin de maintenir le pH autour de la neutralité. Le tri-hydroxyméthyl-aminométhane (TRIS) est le plus communément employé, en association avec de l'acide citrique monohydrate. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible (Evans et Maxwell, 1987).

I.3.3.1.1.4 Substances nutritives

Le jaune d'œuf et/ou le lait constituent une partie des substances nutritives employées dans les dilueurs. Cependant, afin de fournir suffisamment d'énergie aux spermatozoïdes, des sucres sont rajoutés. De plus, ces derniers permettent de maintenir la pression osmotique du milieu et possèdent une action cryoprotectrice (Salmon et Maxwell, 1995, 2000).

Il a été démontré que le sperme du bélier contient seulement le fructose, mais les spermatozoïdes peuvent aussi métaboliser le glucose (Salamon et Maxwell, 2000). Les dilueurs contiennent, donc, soit du glucose (Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2014; Aisen *et al.*, 2002) soit du fructose (Bucak *et al.*, 2009 ; Gil *et al.*, 2000). Un éventuel avantage à utiliser l'un ou l'autre de ces deux sucres dans le dilueur de congélation n'a pas pu être démontré de façon consensuelle par les différents auteurs qui se sont intéressés à ce sujet.

I.3.3.1.1.5 Antibiotiques

Le sperme n'étant pas stérile et le dilueur pouvant être un bon milieu de culture, des antibiotiques sont utilisés pour lutter contre la prolifération bactérienne. En général, la dihydro-streptomycine et la benzyl-pénicilline sont utilisées car elles sont bien tolérées par les spermatozoïdes (Evans et Maxwell 1987).

I.3.3.2 Congélation de sperme

C'est une congélation lente classique basée sur l'équilibration entre un milieu de congélation contenant un cryoprotecteur principalement, le glycérol et le spermatozoïde et elle utilise la vapeur de l'azote liquide pour une descente progressive de la température jusqu'à la congélation. Elle est caractérisée par la formation de cristaux de glace extracellulaires et la formation d'un état vitreux intracellulaire. Le processus de congélation se termine par le stockage dans l'azote liquide. (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Salamon et Maxwell, 2000).

La cryoconservation de la semence comporte les étapes suivantes : (i) équilibration entre la semence et le milieu de congélation, la température de l'équilibration étant généralement 4°C (ii) état de surfusion et nucléation (iii) cristallisation.

I.3.3.2.1 Équilibration entre le sperme et le milieu de congélation

Juste après la dilution, la semence est refroidie jusqu'à 4°C. La semence est gardée à cette température pendant 2 heures, c'est le temps nécessaire pour l'équilibration entre la semence et le cryoprotecteur du milieu de conservation (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Salamon et Maxwell, 2000).

Généralement, le refroidissement de la semence se fait par la mise directement de la semence dans un réfrigérateur à 4°C. Cependant, le changement brusque de la température au cours du refroidissement peut entraîner des lésions cellulaires même en l'absence de formation de cristaux de glace. Ces lésions sont issues principalement du choc au froid et du stress oxydatif. Des lésions se produisent au niveau de la membrane cellulaire et au niveau des organites intracellulaires (Agarwal *et al.*, 2014; Medeiros *et al.*, 2002; Aitken *et al.*, 1991 ; Amann et Pickett, 1987). Pour minimiser le choc au froid et le stress oxydatif durant le refroidissement, la baisse de la température se fait progressivement grâce à un appareil programmable de congélation (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Purdy, 2006 ; Kumar *et al.*, 2003).

Durant l'équilibration de la semence avec le milieu de conservation, l'eau intracellulaire quitte rapidement les spermatozoïdes, contrairement au cryoprotecteur qui pénètre lentement les cellules conduisant à la déshydratation (Gardner *et al.*, 2009). Puis le retour partiel de l'eau permet de créer un équilibre entre les milieux intra et extracellulaire, on parle de l'équilibration. Cette dernière permet de remplacer une quantité d'eau intracellulaire par un cryoprotecteur pénétrant en vue de minimiser la formation de cristaux de glace intracellulaire (Barbas et Mascarenhas, 2009).

I.3.3.2.2 Conditionnement de la semence

A la fin de l'étape de l'équilibration, la semence se conditionne généralement dans des paillettes de 0.25 et 0.5ml. L'avantage de cette paillette par rapport aux supports précédents (ampoule de verre de 1 ml) est d'inclure une meilleure exposition du spermatozoïde et du milieu de congélation à l'effet de refroidissement de l'azote liquide et la facilité de stocker un grand nombre de paillettes dans des unités dans l'azote liquide (Barbas et Mascarenhas, 2009; Salamon et Maxwell, 2000).

I.3.3.2.3 Congélation proprement dite

Juste après le conditionnement, le protocole conventionnel de la congélation consiste de suspendre les paillettes 4-5cm au-dessus de l'azote liquide pendant 12-15min. Par la suite, les paillettes sont immergées dans l'azote liquide pour le stockage (Salamon et Maxwell, 2000 ; Bucak *et al.*, 2009 ; Purdy, 2006).

L'utilisation de l'appareil programmable de congélation après l'équilibration a pour objectif de contrôler la vitesse de refroidissement et, par conséquent, la vitesse de cristallisation. Cet appareil permet de (i) diminuer le choc au froid, (ii) former des grands cristaux de glace extracellulaire moins létaux pour les spermatozoïdes (iii) contrôler la température de l'immersion dans l'azote liquide. En effet, l'immersion de la semence dans l'azote liquide à très basse température généralement entre -100°C et -150°C permet de franchir rapidement la température de la cristallisation de milieu intracellulaire en formant l'état vitreux (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Purdy, 2006; Kumar *et al.*, 2003 ; Salamon et Maxwell, 2000 ; Amann et pickett, 1987).

La semence de différentes espèces animales ne présente pas la même sensibilité au choc au froid. De ce fait, il n'existe pas, à ce jour, une courbe de congélation standard pour le sperme, même au sein de la même espèce (Byrne *et al.*, 2000 ; Leboeuf *et al.*, 2000).

L'immersion dans l'azote liquide permet de préserver la semence pour une durée indéterminée. La vitesse de refroidissement durant l'immersion dans l'azote liquide est -2000°C/min (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

I.3.3.3 Décongélation

Durant le processus congélation/décongélation, le réchauffement est une étape importante pour la survie des spermatozoïdes aussi bien que l'étape de congélation. La décongélation s'effectue en plongeant directement les paillettes congelées dans un bain marie à une certaine température pendant un temps donné. Au cours de cette étape, il faut éviter tout contact de la semence avec l'eau car celle-ci est toxique pour les spermatozoïdes.

Même si une décongélation rapide est préconisée, le couple temps-température utilisé pour la décongélation dépend de la technique de congélation pratiquée. Chez le bélier, la décongélation à 70°C ou à 50 °C pendant 5 secondes ou 9 secondes, respectivement, donne de meilleurs résultats en termes de qualité de la semence après décongélation. Mais, il est difficile de contrôler avec précision ce faible temps de décongélation et il est plus risqué de laisser les paillettes trop longtemps à 70°C ou 50 °C. De ce fait, la décongélation des paillettes s'effectue, en général, en les plongeant dans un bain marie à 38-42°C pendant 30 secondes (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Salamon et Maxwell, 1995).

I.3.3.4 Fertilité de la semence cryoconservée

La fertilité de la semence congelée après l'insémination artificielle est variée d'une espèce à l'autre. Chez certaines espèces telles que les bovins, l'insémination artificielle est conventionnelle car la fertilité de la semence congelée est proche ou égal à celle de la semence fraîche (Vishwanath et Shannon, 2000 ; Herman, *et al.*, 1994). Cependant, chez le bélier, la cryoconservation diminue radicalement la fertilité de la semence limitant la pratique de l'insémination artificielle. En vue d'améliorer la fertilité de la semence du bélier, les travaux de recherches récents ont pour objectifs de comprendre mieux la fragilité de la semence ovine et de compléter les milieux de congélation par des molécules spécifiques afin d'augmenter la résistance des spermatozoïdes vis-à-vis des effets délétères de la cryoconservation. En effet, différentes études ont montré la susceptibilité élevée de la membrane du spermatozoïde du bélier au processus de congélation/décongélation. Cette sensibilité est exprimée principalement par la perte de l'intégrité et de la fonctionnalité de la membrane après la décongélation. De ce fait, la protection de la membrane durant les différentes étapes de cryoconservation notamment le refroidissement, la congélation et la

décongélation pourrait augmenter significativement la fertilité de la semence ovine après l'IA (Medeiros *et al.*, 2002 ; Maxwell et Watson, 1996).

I.4 Les cyclodextrines

I.4.1 Définition

Les cyclodextrines naturelles (CDs), cyclomaltose, cycloamyloses ou dextrines de Schardinger sont des oligosaccharides cycliques de 6, 7 et 8 unités de glucose reliées par des liaisons $\alpha(1,4)$, et dénommés respectivement α -CD, β -CD et γ -CD (Ellouze *et al.*, 2011). Les CDs ont été découvertes par le chimiste français Antoine Villiers (Crini, 2014). Elles sont issues de la dégradation de starch de l'amidon par l'enzyme de l'hydrolyse cycloglycosyltransférase. Elles sont caractérisées par une structure de cône tronqué présentant une cavité interne lipophile formée d'atomes d'hydrogènes et d'atomes d'oxygènes glucosidiques et une surface externe hydrophile composée de groupements hydroxyles (Dodziuk, 2006 ; Jin, 1988).

I.4.2 Propriétés des CDS

La structure tronconique des CDs leur confère une capacité à former des complexes d'inclusions avec différents types de molécules. Celle-ci est grâce, essentiellement, à des interactions hydrophobes entre le macrocycle (CD) et son substrat. Dans ce processus, la molécule de CD « hôte » admet à l'intérieur de sa cavité une ou plusieurs autres molécules appelées « invités » sans qu'aucune liaison covalente ne s'établisse. Ces liaisons sont plus stables avec une faible énergie (Laza-Knoerr *et al.*, 2010).

La propriété de CDs naturelles ou modifiées d'inclure des molécules dans leurs cavités est largement exploitée dans différents domaines (Eastburn et Tao, 1994) : pharmacologie (Loftsson et Brewster, 1996), biologie (Mocé *et al.*, 2010a), cosmétique (Buschmann et Schollmeyer, 2002), nutrition et chimie principalement pour augmenter la solubilité des molécules hydrophobes tels que les stérols (Mocé *et al.*, 2010a ; Zidovetzki et Levitan, 2007) et les vitamines lipophiles (López-Nicolás *et al.*, 2013). D'autres avantages ont été enregistrés grâce à la formation de complexes hôte-invité(s) : la protection des molécules contre la dégradation causée par les UV et l'oxydation, le maintien de la stabilité et de l'activité des substrats, le contrôle de la volatilité et de la sublimation et l'augmentation de la biodisponibilité des médicaments (Buschmann et Schollmeyer, 2002 ; Loftsson et Brewster, 1996).

La complexation dépend largement de la dimension des CDs (cavité) et l'arrangement stérique des groupes fonctionnels des molécules invitées. En effet, la majorité des molécules invitées interagissent avec β -CDs (**Figure n°22**) que α -CDs car le diamètre de la cavité de β -CDs (6-6.5Å) accommode les groupes aromatiques trouvés dans de nombreuses molécules. En revanche, le diamètre de α -CDs (4.7-5.3) est réduit pour une bonne accommodation des molécules. Les interactions entre γ -CDs (7.5-8.3) et plusieurs molécules sont aussi possibles (Loftsson et Brewster, 1996). Cependant, le prix élevé de ce type de CDs limite intensivement leur utilisation.

I.4.3 Les cyclodextrines modifiées

Malgré l'accommodation des β -CDs pour la majorité des molécules invitées, elles ont une faible solubilité (18.5 g/l) par rapport α -CDs (145 g/l) et γ -CDs (232 g/l) (Szejtli, 1998). La faible solubilité de β -CD a été corrigée par la formation des dérivés communément appelés β -CDs modifiées ou dérivés de β -CDs. Ces dérivés sont issus des modifications de la surface externe hydrophile en substituant l'atome d'hydrogène ou le groupe hydroxyle tout entier par une grande variété de groupes, neutres ou ioniques tels que les groupes alkyles, hydroxyalkyles, sulfobutyles, glucosyles, acetyles, etc. En effet, la solubilité des β -CDs méthylées (méthyl- β -CD) est considérablement augmentée par rapport aux β -CDs parents. Environ 55 g de diméthyl- β -CD pourrait être dissous dans 100 ml d'eau. De plus, la production des CDs modifiées a pour autres objectifs que l'augmentation de la solubilité, telles que l'amélioration de la capacité de complexation et la fixation d'un groupe spécifique (pour la modélisation enzymatique) (Jacquet, 2006). Plus de 1500 dérivés de CDs ont été décrits dans la littérature mais la plupart d'entre eux ne connaîtront aucune utilisation à grande échelle à cause des difficultés liées à leur synthèse et du coût élevé qui en résulte (Jacquet, 2006).

Les dérivés ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier :

- Les β -CDs méthylées,
- Les β - et γ -CDs hydroxypropylées,
- Les β -CDs sulfobutylées,
- Les CDs branchées (glucosylées, maltosylées),

- Les CDs sulfatées (Jacquet, 2006).

Dans le paragraphe suivant nous allons-nous intéresser aux β -CDs méthylées utilisées dans notre expérimentation.

I.4.4 β -cyclodextrines méthylées et sperme

Méthyl- β -CDs sont générées par la méthylation de β -CDs en substituant les groupes hydroxyles par des groupes méthyles. Celle-ci améliore significativement la solubilité des β -CDs natives. Méthyl- β -CDs possèdent une forte capacité de complexation pour un grand nombre de composés peu solubles dans l'eau. Mais leur affinité pour le cholestérol est si forte qu'elles peuvent l'extraire des membranes cellulaires et provoquer la capacitation des spermatozoïdes (Zidovetzki et Levitan, 2007). Par ailleurs, l'incubation du sperme avec le complexe méthyl- β -CDs-cholestérol (CD-CHL) a permis d'incorporer le cholestérol dans les membranes des spermatozoïdes (Pamornsakda *et al.*, 2011 ; Moore *et al.*, 2005). L'incorporation de cholestérol dans la membrane cellulaire est due aux liaisons non covalentes entre CD et CHL qui se casse facilement permettant la libération de CHL. L'augmentation du cholestérol membranaire est utilisée comme un moyen pour combattre le choc au froid du sperme. Le traitement du sperme des différentes espèces avant la congélation avec CD-CHL avait un impact positif sur la mobilité, la viabilité et l'intégrité de la membrane du sperme décongelé (Mocé et Graham, 2006; Purdy and Graham, 2004). Les CDs naturelles et modifiées sont largement utilisées pour former des complexes avec les vitamines lipophiles particulièrement la vitamine E (α -tocophérol) (CD-Vit E). Ce complexe CD-Vit E a augmenté la solubilité de la vitamine E, sa stabilité en la protégeant contre la photodégradation. De plus, l'inclusion de vitamine E dans les CDs n'influence pas sur son activité antioxydante. Le complexe méthyl- β -cyclodextrine-Vitamines E (M- β -CD-Vit E) a amélioré la solubilité et la biodisponibilité de la vitamine E. Le complexe M- β -CD-Vit E est utilisé dans les tests d'évaluation de la capacité totale antioxydante des molécules. De plus, les CD-Vit E pourraient servir dans les industries alimentaires et cosmétiques pour prolonger la stabilité à l'oxydation des aliments et de soigner la peau contre l'oxydation (López-Nicolás *et al.*, 2012 ;Koontz *et al.*, 2009; Regiert, 2005;Huang *et al.*, 2002).

I.4.5 Préparation des complexes à base de CDs

L'interaction entre les CDs et les différentes molécules pour former des complexes est hydrophobique. De ce fait, la force du complexe CD- molécule invitée dépend

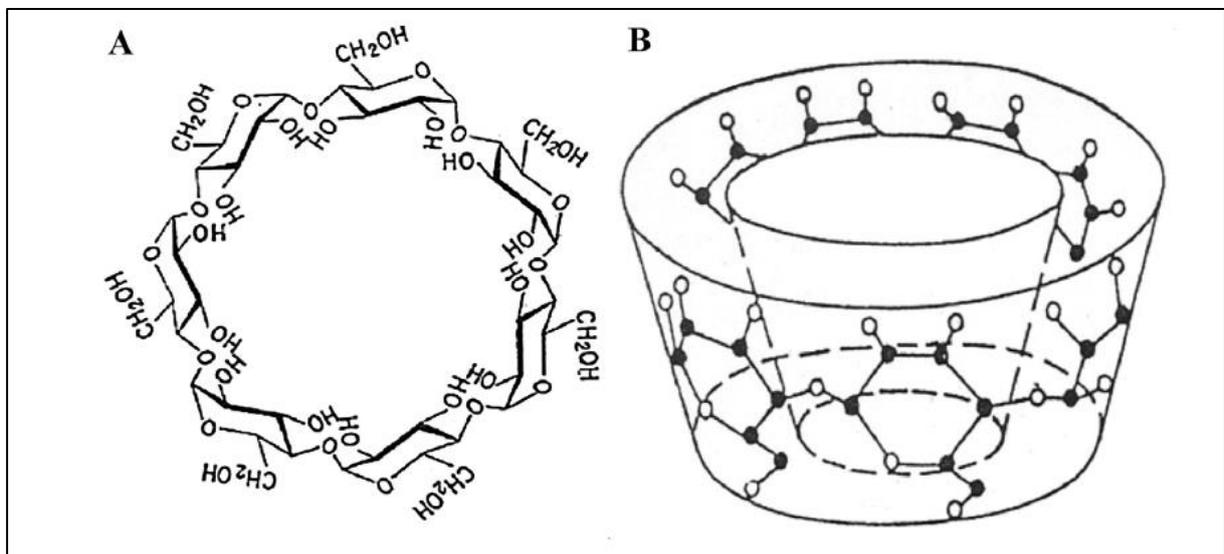


Figure 22 : Structure chimique de β -cyclodextrine (A) et sa représentation de sa structure géométrique 3 D (Kanwar et al., 2011)

de la nature de cette dernière. En effet, plus la molécule est lipophile (ex : cholestérol et Vitamine E) plus elle est accommodée à la cavité de CD.

Plusieurs méthodes de formation de complexes sont développées. Le choix de la méthode est tributaire des caractéristiques des CDs et des molécules invitées. La préparation des complexes en suspension (en solution) ne garantit pas la stabilité et la persistance des complexes aussi bien que la préparation à l'état solide. Les principales méthodes de la préparation des complexes à l'état solide sont (Das *et al.*, 2013; Valle, 2004) :

-Méthode à l'état solide, la préparation des complexes est réalisée par différentes techniques telle que la micro-irradiation.

-Méthode semi-solide, la préparation est basée sur un malaxage des CDs et les molécules invitées en rajoutant une petite quantité d'eau ou du solvant.

-Méthode en solution, la préparation est basée sur la dissolution des CDs et les molécules invitées dans le même solvant ou dans solvants différents. Puis une agitation du mélange CDs-molécules invitées afin de créer les complexes. Juste après, le solvant est éliminé par l'évaporation, sublimation ou le flux de gaz azoté. Cette méthode est largement utilisée pour la préparation de CD-CHL pour le sperme. Le cholestérol dissout dans le chloroforme et les CDs dissout dans le méthanol, le mélange est vortexé jusqu'à l'obtention d'une solution claire. L'élimination des solvants se fait par le flux de l'azote (Purdy et Graham, 2004). Pour la vitamine E, le principe est le même mais la durée de l'agitation est longue (24 h) et le mélange requiert une protection de la solution contre la lumière qui dégrade la vitamine E (Koontz *et al.*, 2009).

II. Problématique et objectifs

En Algérie, le cheptel ovin est composé d'environ 23 millions de têtes. Il est réparti en 3 principales races : *Ouled Djellal*, Rumbi et Hamra (Ministère de l'Agriculture et Développement Rural ; 2010, Chellig, 1992). Il représente la première source de viandes rouges pour la population Algérienne. Cependant, ce cheptel ne permet pas de couvrir la demande nationale, de plus en plus croissante (Chemmam, 2007), contraignant les autorités à recourir à son importation avec des factures colossales (170 millions de dollars pour le premier semestre de 2016, Ministère du commerce ; 2016). L'accroissement de l'effectif, l'amélioration génétique ainsi que le développement de la productivité de notre cheptel ovin,

permettrait de diminuer les coûts d'importation de cette denrée et contribuera à l'autosuffisance. Ceci est rendu possible grâce à l'application des biotechnologies liées à la reproduction, notamment, la cryoconservation du sperme et l'insémination artificielle (Manafi, 2011 ; Vishwanath, 2003).

L'insémination artificielle est la biotechnologie la plus pratiquée dans le monde, avec des intérêts génétiques, économiques et sanitaires certains. D'ailleurs, plus de 90 % de lait et plus de 60 % des viandes, consommés, sont issus de produits nés d'insémination artificielle (Hublot, 1999). Cette biotechnologie est rendue plus rentable encore et plus large d'utilisation grâce à la cryoconservation de la semence.

En effet, la cryoconservation de la semence est la seule technologie permettant la diffusion du progrès génétique à grand échelle. Elle permet, aussi, de créer des banques de matériel génétique d'animaux menacés de disparition ou morts. En effet, il est possible de préserver la génétique des animaux morts ou abattus à partir du sperme épидидymaire (Ehling *et al.*, 2006; Fickel *et al.*, 2007).

Cependant, malgré ses avantages, la cryoconservation du sperme, chez la plupart des espèces y compris le bélier, octroie une fertilité plus réduite après l'insémination artificielle par rapport au sperme frais (Watson, 2000 ; Hammerstedt *et al.*, 1990). Les dommages des membranes plasmiques des spermatozoïdes durant la cryoconservation est la principale cause de la perte de la fertilité. Comme le spermatozoïde a une faible quantité d'eau intracellulaire, les dommages de la membrane plasmique dus aux cristaux de glace intracellulaire sont minimes (Morris, 2006 ; Morris *et al.*, 2007). Par contre, le choc au froid et le stress oxydatif engendrent des dommages membranaires sévères et irréversibles (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 1991; Darin-Bennett et White, 1977). En effet, le choc au froid provoque la déstabilisation de la membrane et la perte de sa fluidité, tandis que le stress oxydatif induit une lésion majeure, la peroxydation des lipides membranaires. Le remaniement et les lésions membranaires du spermatozoïde altèrent l'intégrité de la membrane, la mobilité spermatique et la fertilité du sperme.

Les composants lipidiques de la membrane plasmique lui octroient une fluidité nécessaire pour plusieurs processus intervenant dans la fécondation notamment la capacitation, la réaction acrosomiale et la fusion avec la membrane de l'ovocyte (Rejraji *et al.*, 2009). Cependant, les composants lipidiques de la membrane du spermatozoïde la rendent

plus sensible au choc au froid et au stress oxydatif. Comparativement aux autres espèces, la membrane plasmique du bélier est très sensible au choc au froid en raison de sa proportion faible en cholestérol/phospholipide (0,38) (Muiño-Blanco *et al.*, 2008) et sa quantité élevée en acides gras polyinsaturés (White, 1993). Ces derniers sont aussi fortement vulnérables aux attaques des ERO durant le stress oxydatif induisant la peroxydation des lipides (Peris *et al.*, 2007).

Différentes stratégies ont été explorées pour combattre le choc au froid et le stress oxydatif pendant le processus de congélation/décongélation. A cet égard, le cholestérol a été, particulièrement, désigné comme un facteur clé pour lutter contre le choc au froid. Néanmoins, en raison du caractère hydrophobe du cholestérol, les milieux de congélation supplémentés en cholestérol ont eu peu d'impacts en termes de survie des spermatozoïdes cryoconservés (Graham et Foote, 1987). Des effets plus importants sont, cependant, rapportés lorsque la solubilité de cette molécule est augmentée. En effet, la cyclodextrine, une molécule hydrosoluble, capable de fixer le cholestérol et de l'insérer dans la membrane plasmique, a permis d'augmenter, considérablement, après décongélation, la survie du sperme épидидymaire de l'étalon (Pamornsakda *et al.*, 2011) et du sperme éjaculé des différentes espèces animales, notamment, le porc, le bouc, le taureau et l'étalon (Blanch *et al.*, 2012 (Pamornsakda *et al.*, 2011); Konyali *et al.*, 2013 ; Moore *et al.*, 2005; Purdy et Graham, 2004). Chez le bélier particulièrement, il a été rapporté que le complexe Cyclodextrine-Cholestérol (CD-CHL) améliore la mobilité, la viabilité et l'intégrité de la membrane du spermatozoïde (Ahmad *et al.*, 2013 ; Awad, 2011 ; Mocé *et al.*, 2010b ; Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2014).

Par ailleurs, afin de combattre le stress oxydatif, une autre stratégie basée sur la supplémentation des milieux de conservation par des antioxydants, notamment, la vitamine E, est largement étudiée (Agarwal *et al.*, 2014 ; Aitken *et al.*, 1991). En effet, la vitamine E, une molécule lipophile présente dans la membrane cellulaire, est considérée, à la fois, comme un stabilisateur de la membrane et un antioxydant puissant protégeant la membrane cellulaire contre la peroxydation lipidique et les attaques des ERO (Urano *et al.*, 1987, 1988 ; Niki *et al.*, 2004). La vitamine E n'est pas synthétisée par les spermatozoïdes, une fois le stock épuisé durant l'épreuve de la cryoconservation (Zhang *et al.*, 2001). Si bien que les dilueurs du sperme du bélier et d'autres espèces animales, supplémentés en vitamine E, ont réduit, quelques fois, la peroxydation des lipides et amélioré la qualité du sperme décongelé (Beconi

et al., 1993; Hu *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Néanmoins, nous avons supposé que les effets positifs de la vitamine E, une molécule hydrophobe comme le cholestérol, pourraient être significativement améliorés en augmentant sa solubilité par sa complexation avec les cyclodextrines.

A notre connaissance, l'impact du complexe Cyclodextrine-Vitamine E (CD-Vit E) sur le sperme cryoconservé n'a jamais été rapporté, auparavant, ce, quelle que soit l'espèce animale.

L'objectif de notre projet doctoral était d'optimiser la cryoconservation de la semence du bélier :

- (i) en étudiant l'impact du complexe CD-Vit E sur le sperme épидидymaire du bélier après le processus de congélation/décongélation ;
- (ii) en étudiant une nouvelle approche conférant une protection supplémentaire au sperme épидидymaire contre le choc au froid et le stress oxydatif en utilisant simultanément les complexes CD-CHL et CD-Vit E ;
- (iii) en appliquant cette nouvelle approche pour la cryoconservation du sperme éjaculé du bélier de la race *Ouled Djellal* tout en optimisant la concentration de CD-Vit E.

III. Matériel et méthodes

Ce travail de recherche est composé de deux expérimentations : (i) expérimentation 1 a été réalisée pour étudier l'impact du complexe cyclodextrine-vitamine E seul ou associé au complexe cyclodextrine- cholestérol sur le sperme épидидymaire du bélier. (ii) expérimentation 2 a été effectuée pour optimiser la concentration de cyclodextrine-vitamine E associé au complexe cyclodextrine- cholestérol pour la cryoconservation du sperme du bélier de race *Ouled Djellal* (électroéjaculation).

Notre travail a été réalisé sur une période s'étalant du mois de septembre 2011 au mois de mai 2016 au niveau du laboratoire de biotechnologies de reproduction de l'université de Abderrahmane Mira, Bejaïa (première expérimentation) et du laboratoire de biotechnologies animales du centre de recherche en biotechnologies, Constantine (deuxième expérimentation).

III.1 Matériel

III.1.1 Matériel biologique

Pour l'**expérimentation 1**, les testicules, issus de béliers adultes de la race berbère, ont été récupérés à l'abattoir communal de Bejaïa (**Figure n°23, A**).

Quant à l'**expérimentation 2**, les échantillons du sperme éjaculé ont été récoltés sur 05 béliers adultes de la race *Ouled Djellal* (**Figure n°24, A**) élevés à la station d'Ain M' lila de l'ITElv (Institut techniques des élevages) d'Oum El-Bouaghi.

III.1.2 Equipements

Les principaux appareils utilisés dans les 2 expérimentations étaient : l'appareil de congélation programmable (Thermo-science, CryoMed) (**Annexe n° 7**), le spectrophotomètre (Thermo-science, **Annexe n°8**), le CASA (Computer Assisted sperm analysis) (SCA, **Annexe n°4**), la centrifugeuse (Sigma, **Annexe n°6**), la hotte à flux laminaire, le microscope à fluorescence (Leika), le microscope optique, (Leika), Sonicateur (**Annexe n°5**), Bain-marie, Balance analytique, Rotavap (évaporateur rotatif), Plaque chauffante, Containers de l'azote liquide, Agitateur magnétique, Vortex, Electroéjaculateur (mintube, **Figure n°24 B**) et Photomètre (spermacue, mintube).

III.1.3 Produits chimiques

Les principaux produits chimiques utilisés dans cette étude étaient :

Acide Hydrochlorique 37%, Acide citrique, Acide thiobarbiturique, Acide Trichloracétique, Benzylpenicilline, Chloroforme, Cholestérol, Citrate de sodium, Eosine Y, Ethanol, Fructose, Glucose, Glycérol, HOECHST 33258, Méthanol, Methyl- β -cyclodextrine, Streptomycine sulfate, Tampon Phosphate (Phosphate Buffer Saline, PBS), Tris-(hydroxyméthylaminométhane), Vitamin E (α -tocophérol).

III.1.4 Consommables

Le principal consommable utilisé dans ce travail était : Paillettes de 0,25 ml (IMV, technologies), Cellule Makler®, Cellule Léja®, Cellule Malessez®, Poudre de bouchage pour les paillettes, Tubes en verre, Béchers en verre, Matériel pour la récolte du sperme épидидymaire (lame bistouri, seringue, ciseau, pince hémostatique), Tubes Epindorfs, Lames, Lamelles, Cuves pour le spectrophotomètre.

III.2 Méthodes

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

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

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

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

lumière. Le solvant a été ensuite évaporé sous vide par évaporation rotative et le résidu a été conservé dans un dessiccateur.

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

La solution de TTH est composée de(acide trichloracétique 15% (p/v) + acide thiobarbiturique 0,375% (p/v) dans l'acide chlorhydrique à 0,25N). La préparation de 100ml de l'acide chlorhydrique à 0,25 de normalité était comme suite : 2,053 ml de l'acide chlorhydrique 37%, (densité 1,2) ont été doucement rajoutés aux 25 ml de l'eau distillée, puis le volume a été complété avec l'eau distillée pour atteindre 100 ml. Pour préparer la solution de TTH, 100ml de HCl 0.25N ont été rajoutés aux 0,375g de l'acide thiobarbiturique et 0,15g de l'acide trichloracétique. La solution de TTH a été aliquotée (5ml/aliquote) et conservée à -20°C (Buege et Aust, 1978).

III.2.4 Récolte du sperme de l'épididyme

Vingt-quatre testicules ont été récupérés à partir de 12 béliers adultes (race berbère). Immédiatement après l'abattage, les testicules ont été transportés à température ambiante (22 ° C) au laboratoire de biotechnologies de reproduction à l'université de Bejaïa. Le sperme a été récolté par la méthode de rinçage rétrograde (**Figure n°23**) comme rapporté par Martinez-Pastor *et al.* (2006) dans 1:30 h après récupération des testicules. En bref, l'épididyme et le canal déférent ont été disséqués et séparés du testicule, puis, la queue de l'épididyme et le canal déférent ont été isolés de l'ensemble de l'épididyme. Les vaisseaux sanguins superficiels ont été ponctionnés et leur contenu éliminés par rinçage et essuyage. Le sperme a été récupéré dans un tube en faisant une incision, au moyen d'une lame stérile, près de la jonction des parties, distale et proximale de la queue épидидymaire. Ensuite, le canal déférent a été cathétérisé avec une aiguille 22G tranchante et rincée avec 1 ml du dilueur (**fraction A** : tris-acide citrique-fructose-eau distillée) chauffé (37 ° C), suivie d'une injection d'air pour récupérer une quantité maximale de sperme. Le volume, les mobilités (massale et individuelle) et la concentration du sperme collecté ont été évalués immédiatement après la collecte.

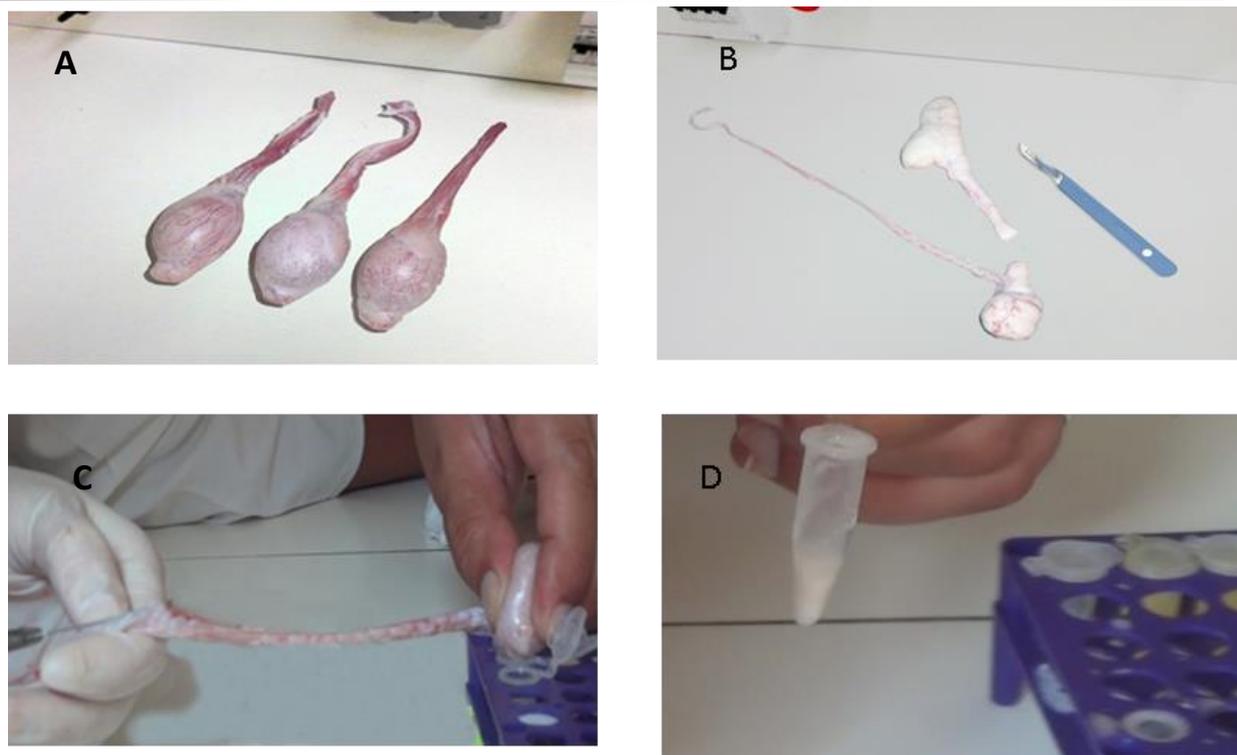


Figure 23 : Etapes de récolte du sperme épидидymaire par rinçage rétrograde : (A) testicules ovins, (B) épидидyme + canal déférent (C) injection de **fraction A** via le canal déférent + récupération du sperme à partir de l'incision au niveau de la queue de l'épididyme. (D) sperme épидидymaire. (Clichés personnels).

III.2.5 Récolte du sperme de l'électroéjaculation

La méthode d'électroéjaculation est une technique basée sur la stimulation à travers la muqueuse rectale, des nerfs hypogastriques responsables de l'émission, et des nerfs honteux internes et pelviens, responsables de l'érection et de l'éjaculation (Arnold, 2004)

Trente éjaculats du sperme ont été collectées de 5 béliers adultes de race Ouled Djella siégés à l'ITElv en utilisant un électroéjaculateur (**Figure n°24**). La fréquence des récoltes était une fois/semaine. La période de récolte était du mois de Mars au mois de Mai 2016. Pour l'électroéjaculation, un électroéjaculateur, Electrojac IV1 stimulator (Minitub Iberica SL, Reus, Espagne) a été utilisé avec une sonde rectale de 22 cm de long, 2,5 cm de diamètre menu de trois électrodes. La sonde rectale a été lubrifié et délicatement introduite dans le rectum, et orientée de telle sorte que les électrodes ont été positionnées ventralement. L'Electrojac IV1 a été utilisé dans le réglage automatique, stimulation pendant 2 secondes avec des intervalles de 2 secondes de repos. Le voltage de la stimulation était augmenté à chaque fois (stimulation). Le pénis a été prolapsus hors du prépuce, et le sperme a été collecté

dans un tube en verre gradué (Marco-Jiménez *et al.*, 2005). Le volume, les mobilités (massale et individuelle) et la concentration du sperme collecté ont été évalués immédiatement après la collecte.



Figure 24 : Récolte du sperme par électroéjaculation chez le bélier de race *Ouled Djellal*. (A) : bélier de race *Ouled Djellal*, (B) : l'électroéjaculateur, (C) : récolte du sperme par électroéjaculateur (D) sperme éjaculé du bélier de race *Ouled Djellal*. (Clichés personnels).

III.2.6 Evaluation du sperme récolté

Juste après la récolte du sperme, le volume, la mobilité massale, la mobilité individuelle et la concentration ont été évalués afin d'inclure les échantillons de qualité dans les expérimentations.

Le volume du sperme collecté a été enregistré à partir du tube de récolte gradué. La mobilité massale a été évaluée sur une goutte (10 μ l) de sperme déposée sur une lame chauffée à 37°C et observée à faible grossissement (x100). La mobilité massale a été évaluée en donnant une note sur une échelle de 0 à 5 (0 : absence de mobilité, 1 : les

spermatozoïdes bougent sans former de mouvement d'ensemble, **2** : les spermatozoïdes ébauchent des mouvements d'ensemble circulaire (début de formation des vagues), **3** : Les mouvements d'ensemble représentent des cercles centrés sur eux-mêmes (vagues nettes), **4** : mouvement des vague intenses (tourbillon), **5** : tourbillon intense et rapide (**Figure n°25**).

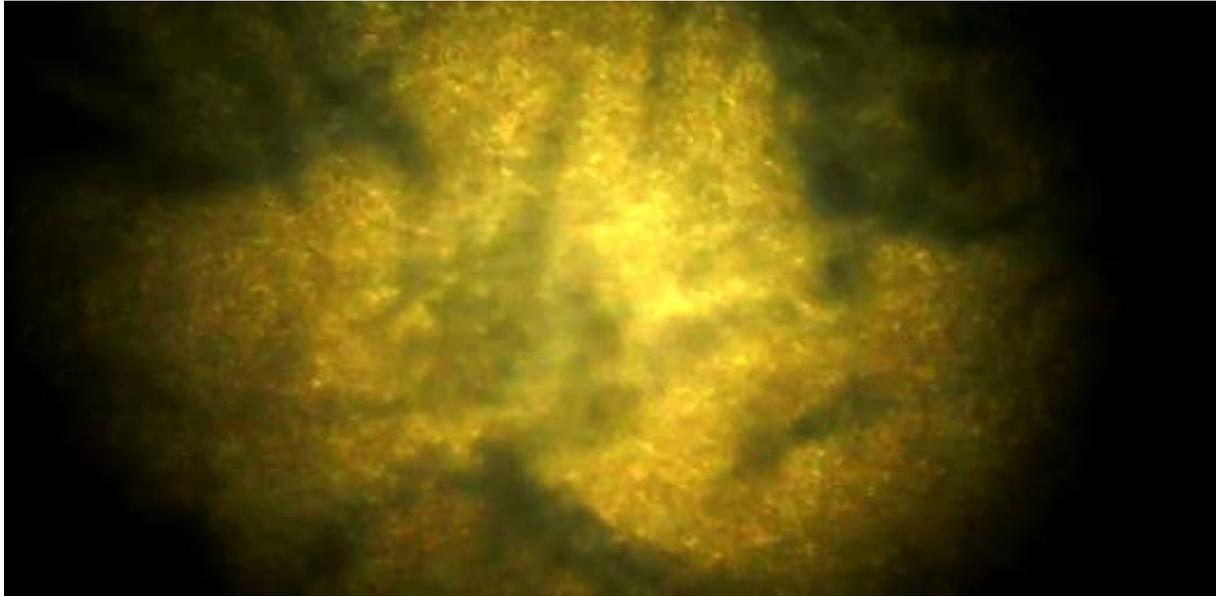


Figure 25 : Mobilité massale (x100) (note 5, tourbillon).(Clichés personnels).

La mobilité individuelle a été évalué à grossissement x 400, une goutte de sperme (10 μ l), préalablement diluée, a été déposée sur une lame (37°C) et recouverte d'une lamelle. La dilution a été effectué par la **fraction A**, 1/100^{ème} pour le sperme épидидymaire et 1/10^{ème} pour le sperme d'électroéjaculation. Le pourcentage despermatozoïdes mobiles a été évalué de façon subjective (Derivaux et Ectors, 1986).

La concentration du sperme d'électroéjaculation a été évaluée par un photomètre. Une goutte du sperme (10 μ l) a été mise sur une lame du photomètre. Ce dernier affiche automatiquement la concentration du sperme collecté. Cet appareil est disponible au niveau de l'ITElv. Cependant, la concentration du sperme épидидymaire a été évaluée au moyen d'un hématimètre (Chenoweth et Lorton, 2014) notamment la cellule Malassez (**Figure n°26**). Une dilution de 1/100^{ème} ou 1/200^{ème} au moyen de formol de 3,7% est nécessaire. cette solution de formol engendre la mort des spermatozoïdes sans provoquer leur lyse. Ainsi, les spermatozoïdes sont immobiles et le comptage est facilité. Après homogénéisation du

mélange, 10 μ l de la solution a été déposée à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité, sans bulle d'air, la chambre de la cellule Malassez. Les spermatozoïdes ont été laissés sédimenter pendant 5-10 minutes avant de procéder à leur comptage. Les spermatozoïdes ont été comptés sur 20 carrés au microscope au grossissement x400. L'équation pour calculer la concentration des Spz/ml = (nombre des Spz /20) x 2 x 10⁶ x taux de dilution.



Figure 26 : Comptage des spermatozoïdes issus de l'épididyme (présence des gouttelettes cytoplasmiques) par Cellule Malassez (x400).(Clichés personnels).

Les échantillons du sperme collectés présentant les caractéristiques suivantes : volume \geq 0,8 ml, mobilité massale \geq 3, mobilité individuelle \geq 70% et concentration \geq 2 x 10⁹ Spz/ml (sperme épидидymaire) et 0,8 x 10⁹ Spz/ml (sperme d'électroéjaculation) ont été inclus dans ce travail (Silva *et al.*, 2013)

III.2.7 Expérimentation 1 : Etude de l'impact du complexe cyclodextrine-vitamine E tout seul ou associé au complexe cyclodextrine-cholestérol (nouvelle approche) sur le sperme épидидymaire cryoconservé.

Le milieu de congélation du sperme épидидymaire était composé de deux fractions, la **fraction A**: 3,028 g de Tris (hydroxyméthylaminométhane) + 1,25 g de fructose + 1,70 g d'acide citrique + 800 U.I./ml de pénicilline G sodique + 1 mg/ml de sulfate de streptomycine dans 100 ml d'eau distillée; la **Fraction B**: **fraction A** + glycérol 10% (v/v) + jaune d'œuf 30%

(v/v). Chacune de 6 solutions de traitement (CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E et CD-CHL-Vit E) a été préparé en ajoutant le traitements correspondant à 10 ml de la **fraction A**. Les concentrations finales dans 1 ml de la fraction A étaient pour CD : 9,17mg, CHL : 0,83 mg, VitE : 1 mg, CD-CHL : 9,17-0,83mg, CD-Vit E : 3,02-1mg et CD-CHL-Vit E (CD-CHL (9,17-0,83mg) + CD-Vit E (3,02-1 mg)), respectivement. La solution de contrôle est composée de 10 ml de fraction A sans supplémentation.

Les échantillons du sperme collectés de chaque bélier (2 testicules) ont été regroupées et divisés en 7 aliquotes égales (0,1 ml / aliquote contenant $\approx 200 \times 10^6$ spz). Le contrôle a été dilué avec 0,4 ml de la **fraction A** (solution témoin). Les aliquotes restants ont été dilués avec 0,4 ml de solutions correspondantes de traitement (CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E et CD-CHL-Vit E, respectivement). Toutes les aliquotes ont été incubés à 22 ° C pendant 15 min, puis 500 μ l de la **fraction B** a été ajouté à chaque aliquote pour obtenir un volume final de 1 ml pour chaque aliquote. Les concentrations finales de glycérol et de jaune d'oeuf étaient de 5% et 15%, respectivement. Toutes les aliquotes ont été ensuite refroidis à 4°C pendant 2 heures, conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml et congelés horizontalement en suspension des paillettes 4 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 12 minutes, puis complètement immergées dans de l'azote liquide. Deux paillettes de chaque aliquote ont été décongelés dans un bain d'eau (37 ° C) pendant 30 secondes. La mobilité (évaluation CASA), le test de gonflement hypo-osmotique (HOST), la peroxydation lipidique membranaire et la capacité antioxydante totale ont été évalués immédiatement après la décongélation.

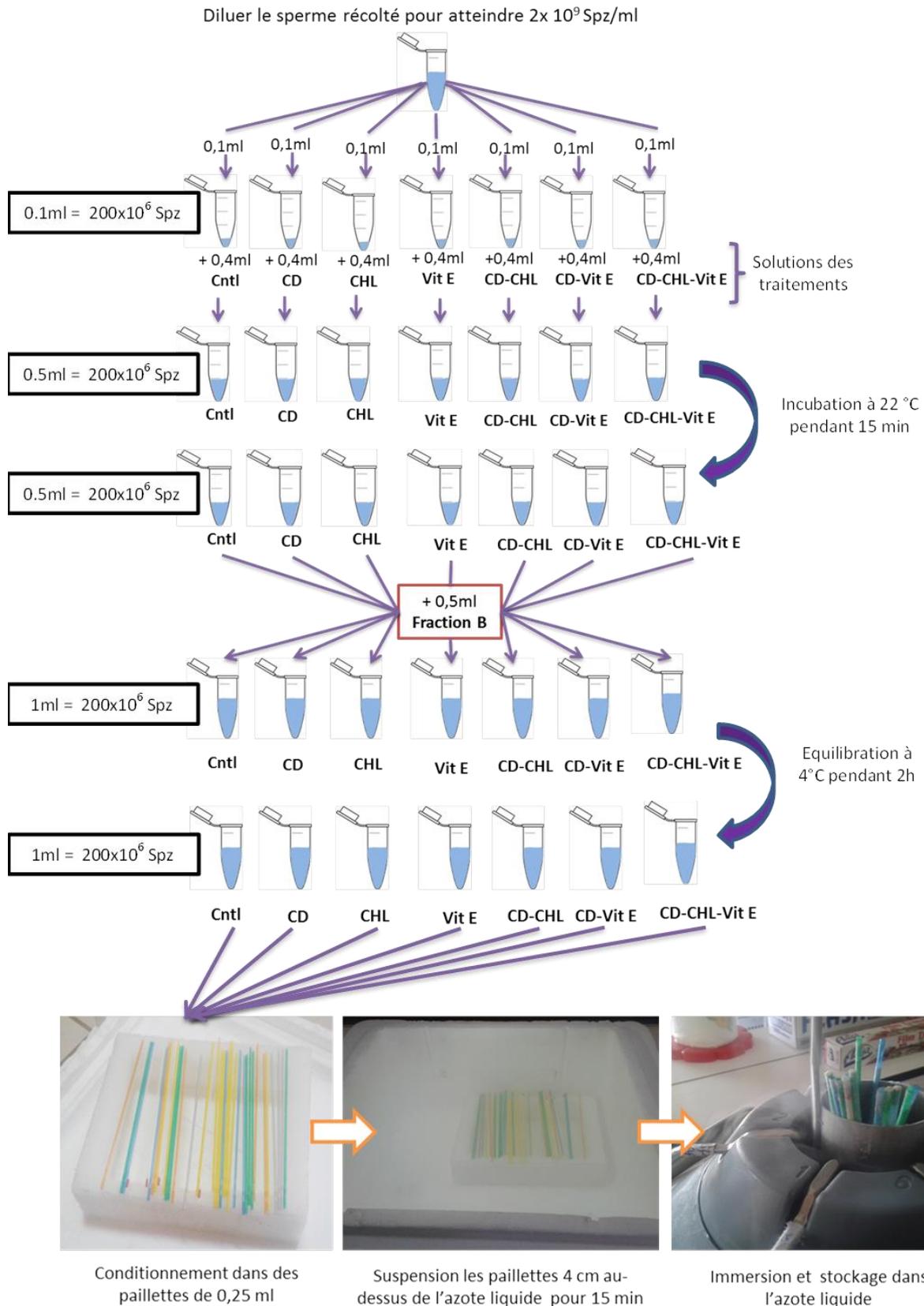


Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'expérience 1 (Etude de l'impact du complexe cyclodextrine-vitamine E tout seul ou associé au complexe cyclodextrine-cholestérol (nouvelle approche) sur le sperme épидидymaire cryoconservé).

III.2.8 Expérimentation 2 : Optimisation de la concentration du complexe cyclodextrine-Vitamine E associé au complexe cyclodextrine-cholestérol pour la cryoconservation du sperme d'électroéjaculation du bélier de la race *Ouled Djellal*

Le milieu de congélation du sperme d'électroéjaculation était composé de 4 fractions, la **fraction A**: 3,63 g de Tris (hydroxyméthylaminométhane) + 0,504 g de glucose + 1,70 g d'acide citrique dans 100 ml d'eau distillée (Vásquez *et al.*, 2013); la **fraction B** : **Fraction A**+ 50mg CD-CHL/ml; la **fraction C**: **Fraction A**+ 50mg CD-Vit E/ml; la **fraction D**: **fraction A** + glycérol 10% (v/v) + jaune d'œuf 30% (v/v).

Trois concentrations ont été testées sur le sperme : 2 mg (CD-Vit E_{2 mg}), 4mg (CD-Vit E_{4mg}) et 6 mg (CD-Vit E_{6 mg}). Le contrôle correspond à la concentration 0mg (CD-Vit E_{0mg}).

Les échantillons du sperme collectés de cinq béliers ont été regroupés. Le sperme a été aliquoté, 120 x 10⁶ Spz/aliquote, en formant 4 groupes, contrôle et 3 traitements. 40 µl (2mg CD-CHL) de **fraction B** ont été rajoutés à toutes les aliquotes, du contrôle et des 3 traitements, (2mg de CD-CH/120 x 10⁶ Spz). 40 µl (2mg CD-Vit E) de **fraction C** ont été rajouté aux aliquotes du premier traitement (CD-Vit E_{2 mg}:2mg/120 x 10⁶Spz). 80 µl (4mg CD-Vit E) de **fraction C** ont été rajouté aux aliquotes du deuxième traitement (CD-Vit E_{4 mg}:4mg/120 x 10⁶ Spz). 120 µl (6mg CD-Vit E) de **fraction C** ont été rajoutés aux aliquotes du troisième traitement (CD-Vit E_{6 mg}:6mg/120 x 10⁶ Spz). Les aliquotes du groupe de contrôle n'ont pas été supplémenté par la **fraction C** (CD-Vit E_{0mg}:0mg/120 x 10⁶ Spz). Après l'ajout de **fraction C** (CD-VitE), les volumes de toutes les aliquotes du contrôle (CD-Vit E_{0mg}) et des 3 traitements (CD-Vit E_{2mg}, CD-Vit E_{4mg} et CD-Vit E_{6mg}) ont été complétés par la **fraction A** pour atteindre le volume de 500 µl pour chacun. Juste après, toutes les aliquotes ont été incubés à 22 ° C pendant 15 min, puis 500µl de la **fraction D** ont été ajoutés à chaque aliquote pour obtenir un volume final de 1 ml pour chaque aliquote. Les concentrations finales de glycérol et de jaune d'œuf étaient de 5% et 15%, respectivement. Toutes les aliquotes ont été ensuite refroidis à 4°C pendant 2 heures, conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml et congelés par la vapeur d'azote en mettant les paillettes dans un appareil de congélation préalablement programmé de refroidir le sperme de 4°C à -5°C (4°C/min); de -5°C à -110°C (25°C/min); et de -110°C à -140°C (35°C/min). A la température de -140°C les paillettes ont été complètement immergées dans de l'azote liquide

pour le stockage. Les paillettes de chaque aliquote ont été décongelées dans un bain d'eau (37 ° C) pendant 30 secondes (Purdy *et al.*, 2010). La mobilité (évaluation CASA), le test de gonflement hypo-osmotique (HOST), la viabilité par l'éosine et HOCHST33258 et la peroxydation lipidique membranaire ont été évalués immédiatement après la décongélation.

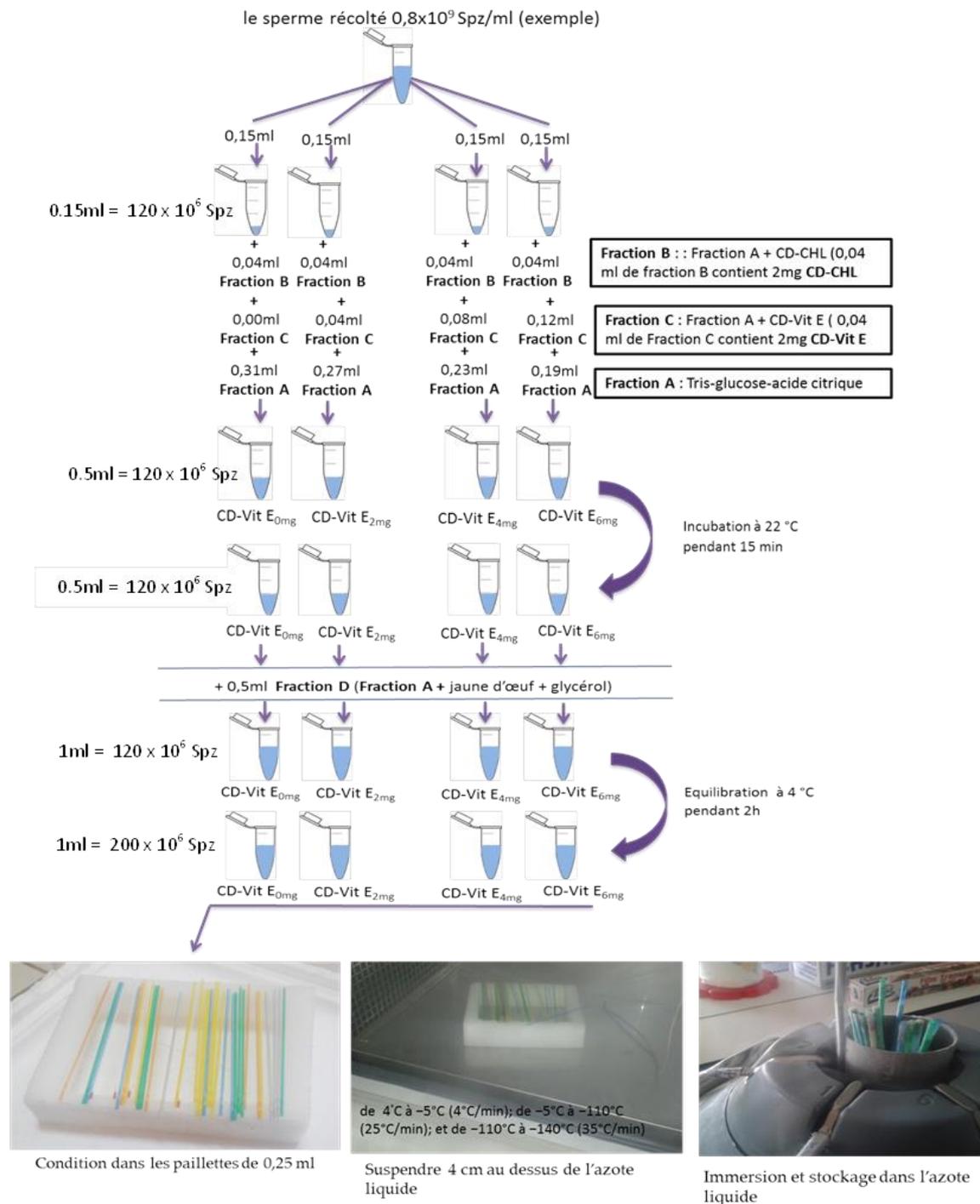


Figure 28 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 2 (Optimisation de la concentration du complexe cyclodextrine-Vitamine E associé au complexe cyclodextrine-cholestérol pour la cryoconservation du sperme d'électrojaculation du bélier de la race *Ouled Djellal*).

III.2.9 Evaluation de la qualité du sperme après la décongélation

III.2.9.1 Evaluation de la mobilité du sperme par le système CASA

Les différents paramètres de mobilité ont été évalués à l'aide d'un analyseur informatique du sperme (CASA : Computer Aided Sperm Analyser) (Sperm Class Analyser, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelone, Espagne)(**Figure n°29**). Pour faciliter la capture d'image, les échantillons ont été dilués par la **fraction A** pour atteindre une concentration de $10\text{-}20 \times 10^6$ Spz/ml. 10 μl de chaque échantillon a été placé dans la chambre Makler® (sperme épидидymaire) ou dans la cellule Léja®(sperme d'électroéjaculation) préalablement chauffées (37°C). Makler® ou Léja® a été placée sous microscope à contraste de phase (microscope Nikon E200®-LED) muni d'une plaque chauffée (37 °C) et les images ont été capturées à l'aide d'une caméra vidéo (appareil photo numérique Basler A312fc Allemagne) à un grossissement x100 (phase négative). Quatre séquences ont été numérisées et au moins 200 spermatozoïdes ont été analysés. Les réglages standards ont été fixés à 25 images /seconde, 20-90 μm^2 pour la surface de la tête et $\text{VCL} > 10 \mu\text{m} /\text{s}$ pour classer un spermatozoïde comme mobile (Tamayo-Canul *et al.*, 2011). Un spermatozoïde ayant VCL , entre 10 et 45 $\mu\text{m} /\text{s}$ est lent, entre 45 et 75 $\mu\text{m} /\text{s}$ est moyen, $> 75 \mu\text{m} /\text{s}$ est rapide. Les paramètres de mobilité mesurés sont: la mobilité totale (TM%) mobilité progressive (PM%), la linéarité (LIN%); rectitude (STR%); wobble (WOB%); vitesse curviligne (VCL $\mu\text{m}/\text{s}$); vitesse linéaire droite (VSL $\mu\text{m}/\text{s}$); vitesse de trajectoire moyenne (VAP $\mu\text{m}/\text{s}$); amplitude de mouvement latéral de la tête (ALH μm); fréquence de battement transversale (BCF Hertz). Mobilité totale (TM) a été défini comme étant le pourcentage de spermatozoïdes avec $\text{VCL} > 10 \mu\text{m}/\text{seconde}$, et la mobilité progressive (PM) est défini comme étant le pourcentage de spermatozoïdes avec $\text{VCL} > 25 \mu\text{m}/\text{seconde}$ et $\text{STR} > 80\%$ (Mortimer, 1997).

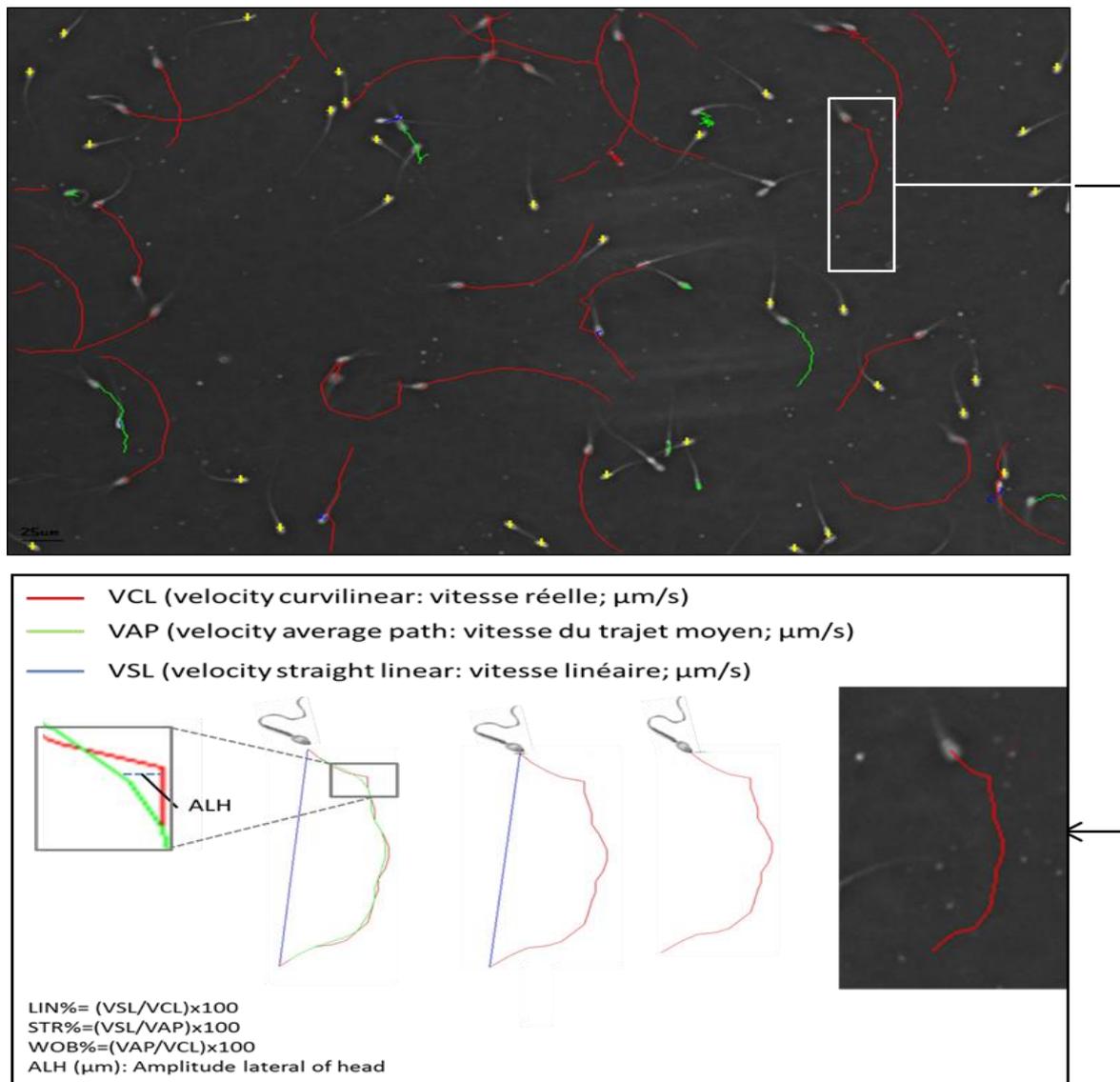


Figure 29 : Principaux paramètres de mobilité mesurés par l'analyseur informatique de la mobilité (CASA : Computer Aided Sperm Analyser).

III.2.9.2 Analyse de la fonctionnalité de la membrane des spermatozoïdes

L'intégrité fonctionnelle de la membrane du sperme a été évaluée en utilisant le test de gonflement hypo-osmotique (HOST) (**Figure n°30**). Bref, 20 μl de sperme ont été mises en incubation avec 200 μl d'une solution hypo-osmotique 100 mOsM pendant 60 minutes. La solution hypo-osmotique est préparée en mélangeant 9 g de fructose et 4,9 g de citrate de sodium, dilué dans 1 litre d'eau distillée à 37 °C. 10 Après l'incubation, 10 μl de semence ont été mis entre lame- lamelle puis, placé sous microscope optique à grossissement x400. Les spermatozoïdes possédant une queue enflée et enroulé étaient supposés avoir la

membrane fonctionnelle. Au moins 150 spermatozoïdes ont été pris en compte pour calculer le pourcentage de spermatozoïdes réagi (Bucak *et al.*, 2009).

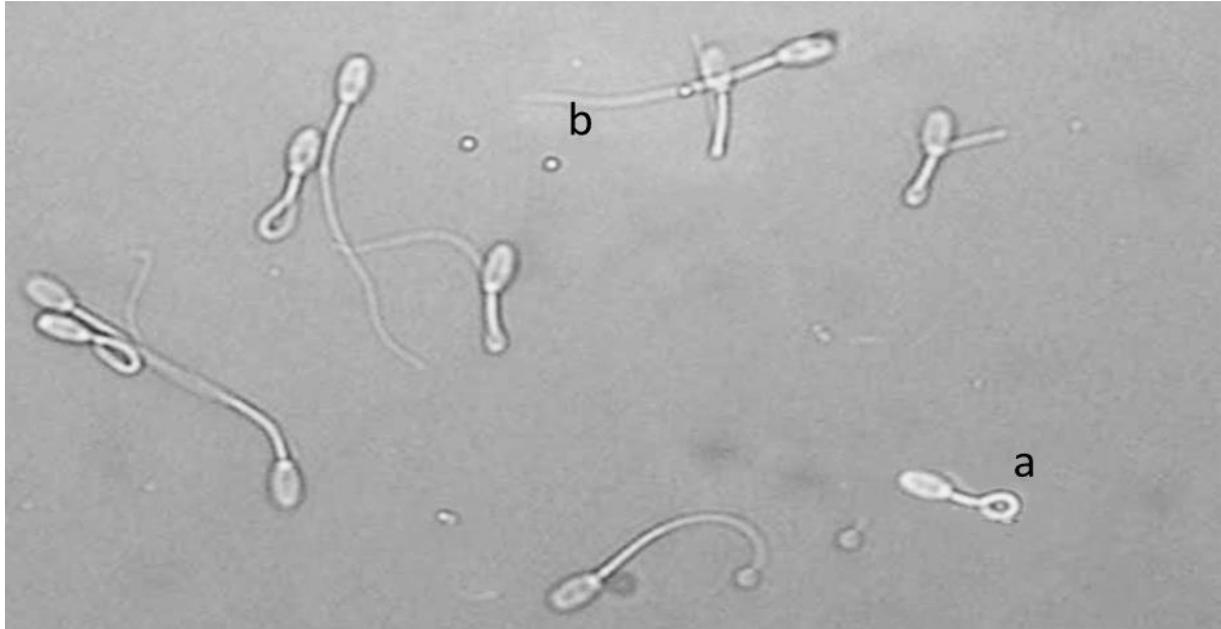


Figure 30: test du gonflement hypo-osmotique (HOST: hypo-osmotic swelling test). (a) spermatozoïde réagit (gonflé), (b) spermatozoïde non réagit (non gonflé) (x400). (Clichés personnels).

III.2.9.3 Evaluation de la viabilité par Eosine

Les spermatozoïdes ayant une membrane lésée sont considérés des cellules mortes. L'éosine, franchissant seulement les cellules possédant des membranes endommagées, permet de colorer et de quantifier la proportion de spermatozoïdes dont l'intégrité membranaire est perdue, notamment la tête (Bjorndahl *et al.*, 2003). Une goutte (10 μ l) de sperme et une goutte (10 μ l) d'éosine Y 0,5% (0,5g dans 100 ml de l'eau distillée) ont été mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui a été séché à l'air puis observé au microscope optique à grossissement x400 pour compter 200 Spz. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine (**Figure n°31**). Le pourcentage de viabilité est calculé sur 200 Spz comptés.

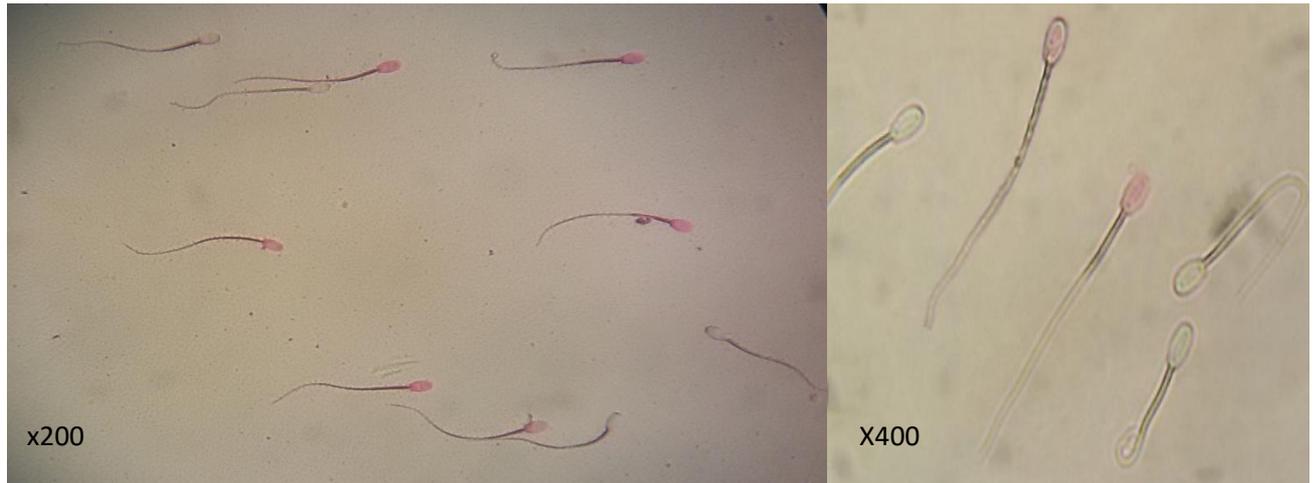


Figure 31 :Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes par éosine (spermatozoïdes colorés (roses) sont morts, non colorés sont vivants).(Clichés personnels).

III.2.9.4 Evaluation de la viabilité par HOECHST 33258

HOECHST 33258 est un marqueur fluorescent de l'ADN. Il ne pénètre pas la cellule intacte. Cependant, il franchit la membrane des cellules mortes pour se fixer sur l'ADN. Sa fixation sur l'ADN permet, suite à une excitation par une longueur d'onde bien déterminée de 365 nm, d'émettre une fluorescence bleue d'une longueur d'onde de 435 nm. Cette caractéristique d'émission d'une fluorescence permet, sur un champ microscopique, des compter seulement les cellules mortes au moyen de microscope à fluorescence en utilisant le mode fluorescence. Le mode lumière (non fluorescence) permet de compter toutes les cellules du champ microscopique, comprises les mortes et les vivantes. Les cellules vivantes est égale au nombre total des cellules du champ microscopique (mode non fluorescence) moins le nombre de cellules présentant une fluorescence sur le même champ en utilisant le mode fluorescence (Schatten, 2004).

Une solution de travail de 10 µg de HOECHST 33258/ 1ml de sodium citrate 2,9% (w/v) a été préparée en obscurité, puis aliquotée à des volumes de 100µl et stockée à -20°C. Après la décongélation, 100 µl de solution de travail ont été ajoutés à 100 ml du sperme d'électroéjaculation. Le mélange a été vortexé et incubé en obscurité à 37°C pendant 3 minutes. Juste après, 10 µl du sperme incubé ont été mis entre lame-lamelle préchauffée à 37°C, puis placé sous microscope à fluorescence (filtre bleu) à grossissement x600. La viabilité de chaque échantillon a été comptée sur 200 spermatozoïdes (**Figure n°32**).

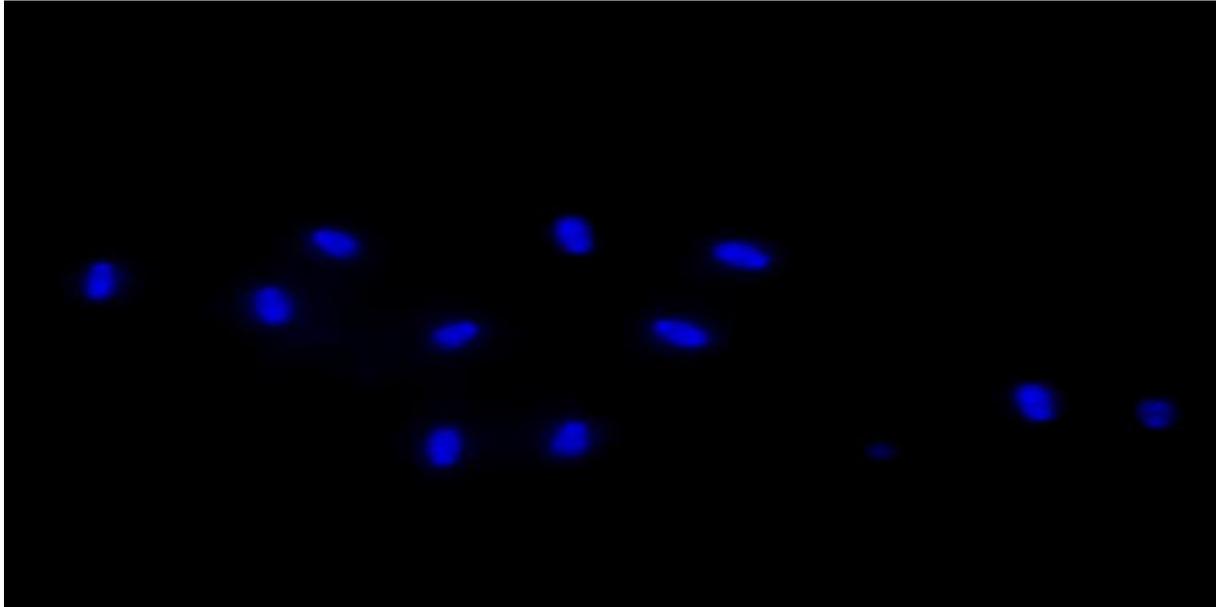


Figure 32 : Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes par HOECHST 33258 (produit de fluorescence) (x600), spermatozoïdes émissent une fluorescence bleue sont morts.

Il faut mettre mode lumière sur le même champ pour calculer le nombre total des spermatozoïdes (morts et vivants). Les spermatozoïdes vivant $s =$ le nombre total des spermatozoïdes - spermatozoïdes émissent une fluorescence. (Clichés personnels).

III.2.9.5 Essais biochimiques

III.2.9.5.1 Préparation des échantillons

Le contenu de deux paillettes (sperme épидидymaire, 500 μ l contenant 10^8 Spz) ou quatre paillettes (sperme d'électroéjaculation, 1000 μ l contenant 10^8 Spz) a été centrifugé immédiatement après décongélation à 1500 g pendant 10 minutes et le surnageant a été récupéré pour mesurer la capacité antioxydante totale du milieu de congélation. Le culot du sperme a été lavé trois fois par remise en suspension dans 1 ml de PBS centrifugeant de nouveau. Le sperme a ensuite été mis en suspension dans 500 μ l de PBS et soniqué avec une sonde en utilisant Sonics Vibra cellulaire VCX-750, à 20 kHz pour 15 secondes sur la glace. La procédure a été répétée six fois à des intervalles de 30 secondes. Le sperme soniqué a été utilisé pour mesurer la peroxydations des lipides membranaires (LPO).

III.2.9.5.2 Test de peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été mesurée sur la base de concentration du malondialdéhyde (MDA). Le MDA, un produit final de la peroxydation des lipides, a été

quantifié en utilisant le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode décrite par Buege et Aust (1978). Un millilitre de solution TTH (acide trichloracétique + acide thiobarbiturique 0,375% dans l'acide chlorhydrique 0,25N) a été ajouté au sperme soniqué (0,5ml). Le mélange a été bouilli pendant 60 minutes, puis refroidi dans un bain de glace. La réaction acide thiobarbiturique-MDA se manifeste par une couleur rose-orange. Après le refroidissement, la suspension a été centrifugée à 18 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite mis dans un tube en verre (**Figure n°33**). L'absorbance est mesurée à 532 nm à 25 ° C. Le coefficient d'extinction molaire pour MDA est de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en nmoles MDA / 10^8 Spz.

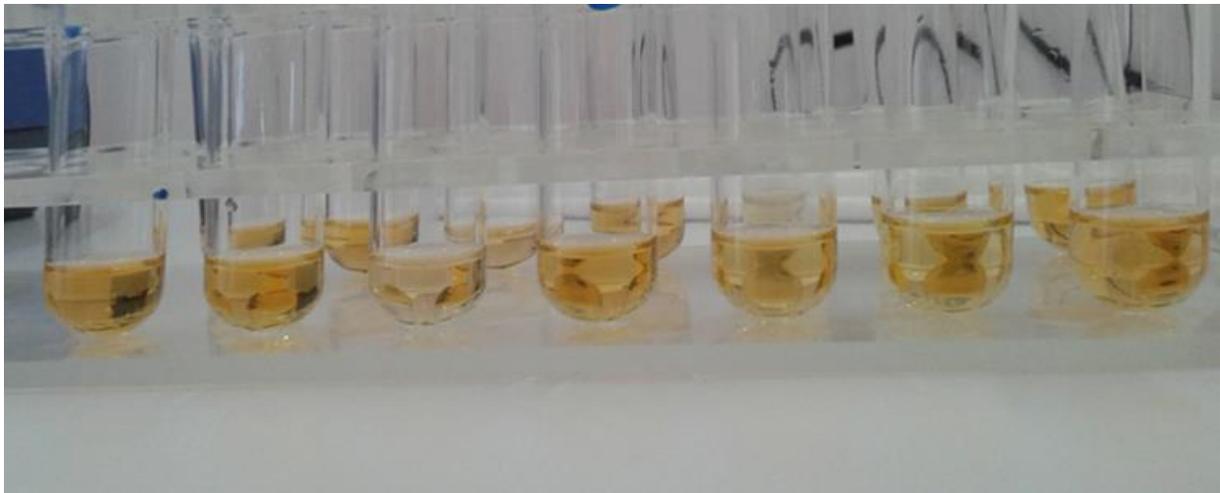


Figure 33 : Test de peroxydation des lipides,

Notez que, avant la mesure de l'absorbance, la couleur rose claire du troisième tube correspond au résultat du traitement cyclodextrine-cholestérol + cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-Vit E) indiquant une faible peroxydation lipidique par rapport aux autres traitements.(Clichés personnels).

III.2.9.5.3 Capacité Antioxydante Totale

Pour évaluer la capacité antioxydante totale (TAC) des spermatozoïdes, le surnageant de la première centrifugation de chaque échantillon a été récupéré et conservé à -80 ° C. Après la décongélation, la capacité du milieu de congélation à piéger l'ABTS^{*+} [2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline acide 6-sulfonique)], un radical cationique, a été comparé au standard de TAC du Trolox (Re *et al.*, 1999). L'ABTS^{*+}, un radical cation, a été généré en mélangeant 7mM de l'ABTS solution avec 2,45 mM de persulfate de potassium avec incubation du mélange pendant 12-16 h à la température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance de la solution d'ABTS^{*+} a été équilibrée à la valeur $0,700 \pm 0,020$ par une

dilution avec le PBS, puis 1980 µl de cette solution de l'ABTS^{*+} a été mélangé avec 20 µl du surnageant chauffé à 37 °C, suivie par la mesure de l'absorbance à 734 nm après 6 minutes d'incubation. Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{*+} Y (%) de milieu de congélation a été calculé comme suit: $Y (\%) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$ dans laquelle A_0 est l'absorbance de contrôle et A_s est l'absorbance de l'échantillon. A_0 était l'absorbance de l'incubation de 1980µl de l'ABTS^{*+} avec 20 µl de l'eau distillée. La capacité antioxydante totale (TAC) présent dans le milieu de congélation a été calculé sur la base de l'équation obtenue à partir de la régression linéaire de la courbe standard de Trolox, tocophérol analogue soluble dans l'eau, en utilisant l'équation $TAC (mM) = (Y (\%) + 7,7319) / 9,796$ (**Annexe n° 2**), dans laquelle (i) la TAC (mM) est la concentration de l'antioxydant relative à la concentration du standard, Trolox et (ii) Y (%) est la moyenne des pourcentages d'inhibition de l'ABTS^{*+} de chaque milieu de congélation.

III.2.9.6 Analyses statistiques

Pour l'expérimentation 1. Chaque analyse de chaque traitement (mobilité, viabilité, intégrité de la membrane, LPO et TAC) a été répétée au moins 4 fois (au minimum 800 spermatozoïdes ont été analysés/traitement). Pour l'expérimentation 2. Chaque analyse a été répétée au moins 9 fois (au minimum 1800 spermatozoïdes ont été analysés/traitement). Les Calculs des moyennes, des erreurs standards (ES) et les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statview 4.02 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Les valeurs de chaque analyse ont été exprimées en moyenne ± ES. Les variables utilisées à des fins de comparaison étaient les traitements utilisés (contrôle, CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E, CD- CHL-Vit E) pour l'expérimentation 1 et les concentrations du CD-Vit E (CD-Vit E_{0mg} (contrôle); CD-Vit E_{2mg}; CD-Vit E_{4mg}; CD-Vit E_{6mg}) pour l'expérimentation 2. Les différences entre les traitements ont été évaluées à l'aide d'une analyse de variance, ANOVA à un critère, suivie d'un test de *post hoc* Fisher. Les valeurs ont été considérées significatives lorsque $P < 0,05$.

IV. Résultats

IV.1 Expérimentation 1

IV.1.1 Pourcentages de mobilité totale, mobilité progressive et fonctionnalité de la membrane

La mobilité totale (TM) et la mobilité progressive (PM) de tous les échantillons analysés, après congélation/décongélation sont présentées dans la **Figure n°34**.

Concernant la mobilité totale, aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre les trois complexes testés (CD-CHL-Vit E = $71,48 \pm 2,58\%$, CD-CHL = $67,49 \pm 4,79\%$ et CD-Vit E = $64,04 \pm 0,32\%$). De même, qu'aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre les molécules utilisées seules (CD = $61,76 \pm 3,03\%$, Vit E = $53,78 \pm 2,25\%$, CHL = $52,51 \pm 2,58\%$). Cependant, les valeurs étaient significativement ($P < 0,05$) plus élevées dans les échantillons traités par les complexes par rapport aux molécules utilisées seules. Le groupe de contrôle a montré les valeurs les plus faibles de la mobilité totale.

En ce qui concerne la mobilité progressive, comme un paramètre de qualité du sperme, la différence entre tous les traitements n'étaient pas statistiquement significative, et la seule différence significative était enregistrée entre les complexes et le contrôle (CD-CHL-Vit E = $53,56 \pm 2,51\%$, CD-CHL = $51,72 \pm 0,73\%$, CD-Vit E = $48,23 \pm 7,82\%$ et Cntrl = $22,72 \pm 7,86\%$)

Le test de la fonctionnalité de la membrane (**Figure n°34**), a révélé que le complexe CD-CHL-Vit E ($58,85 \pm 0,02\%$) a significativement maintenu la fonctionnalité membranaire plus élevée ($P < 0,05$) que tous les traitements utilisés. En revanche, aucune différence significative n'a été remarquée dans les traitements suivants : CD, CHL, Vit E, CD-Vit E, CD-CHL et le contrôle excepté entre le CD-CHL et le contrôle.

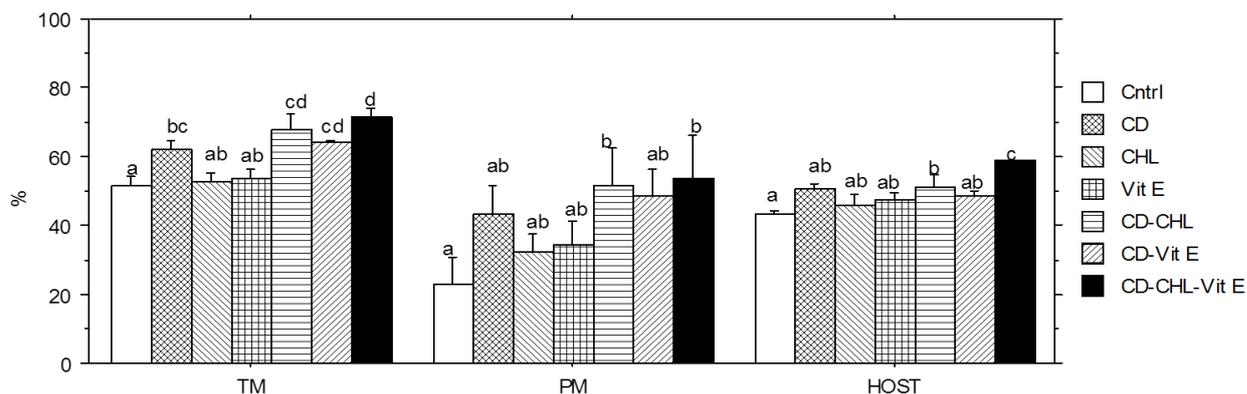


Figure 34 : Pourcentages (Moyenne \pm ES) de la mobilité totale (TM), mobilité progressive (PM) et test de gonflement hypo-osmotique (HOST) après la décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (Cntrl) et des groupes prétraités avec cyclodextrines (CD), cholestérol (CHL), vitamine E (Vit E), complexe cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL), cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E) et les deux complexes, cyclodextrine-cholestérol et cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-Vit E). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

IV.1.2 Paramètres cinématiques (VCL, VAP, VSL, LIN, ALH, BCF)

L'impact des effets des différents traitements sur les VCL, VSL, VAP et LIN est présenté dans la **Figure n°35**. La valeur la plus basse de VCL est observée dans le groupe de contrôle ($68,97 \pm 2,51 \mu\text{m/s}$). Parmi tous les traitements, le complexe CD-CHL-Vit E a montré la valeur la plus élevée ($110,47 \pm 1,91 \mu\text{m/s}$) suivi par le complexe CD-CHL ($104,35 \pm 2,17 \mu\text{m/s}$) et le complexe CD-Vit E ($88,82 \pm 2,21 \mu\text{m/s}$).

Concernant la VAP, les résultats sont similaires aux tendances exprimées par la VCL, sauf que le complexe CD-CHL-Vit E, a montré des valeurs ($82,21 \pm 1,75 \mu\text{m/s}$) significativement plus élevées par rapport aux autres traitements. En outre, la VAP des complexes CD-Vit E et CD-CHL, était significativement plus élevée ($P < 0,05$) que celle observée avec les traitements contenant la Vit E et le CHL. La VSL, traduisant l'aptitude des gamètes à présenter une vitesse rapide avec une progression linéaire, est, statistiquement plus élevée avec le complexe CD-CHL-Vit E par rapport à d'autres traitements.

La réduction de la LIN et l'augmentation de ALH et BCF sont considérées comme un groupe de paramètres indicateur de capacitation du sperme (Chamberland *et*

al.,2001; Mortimer et Maxwell, 1999). Dans les présents résultats, après la décongélation, la linéarité (LIN) du sperme traité avec CD-CHL-Vit E (58,99±1,22%), CD-CHL (49,94±1,43%) et CD-Vit E (46,03±1,49%) était significativement élevée (P < 0.05) comparativement aux autres traitements y compris le contrôle (39,83±1,69 %). La LIN était particulièrement plus élevée avec le complexe CD-CHL-Vit E par rapport aux autres traitements. Les principaux résultats ont, aussi, montré que les valeurs de ALH et BCF (Figure n°35) étaient significativement plus basses avec le complexe CD-CHL-VitE indiquant l'absence de capacitation précoce. Globalement, le résultat le plus marqué des figures n°34 et n°35 montre que le complexe CD-CHL-Vit E augmente tous les paramètres de mobilité et de fonctionnalité de la membrane du sperme décongelé par rapport aux autres traitements et contrôle.

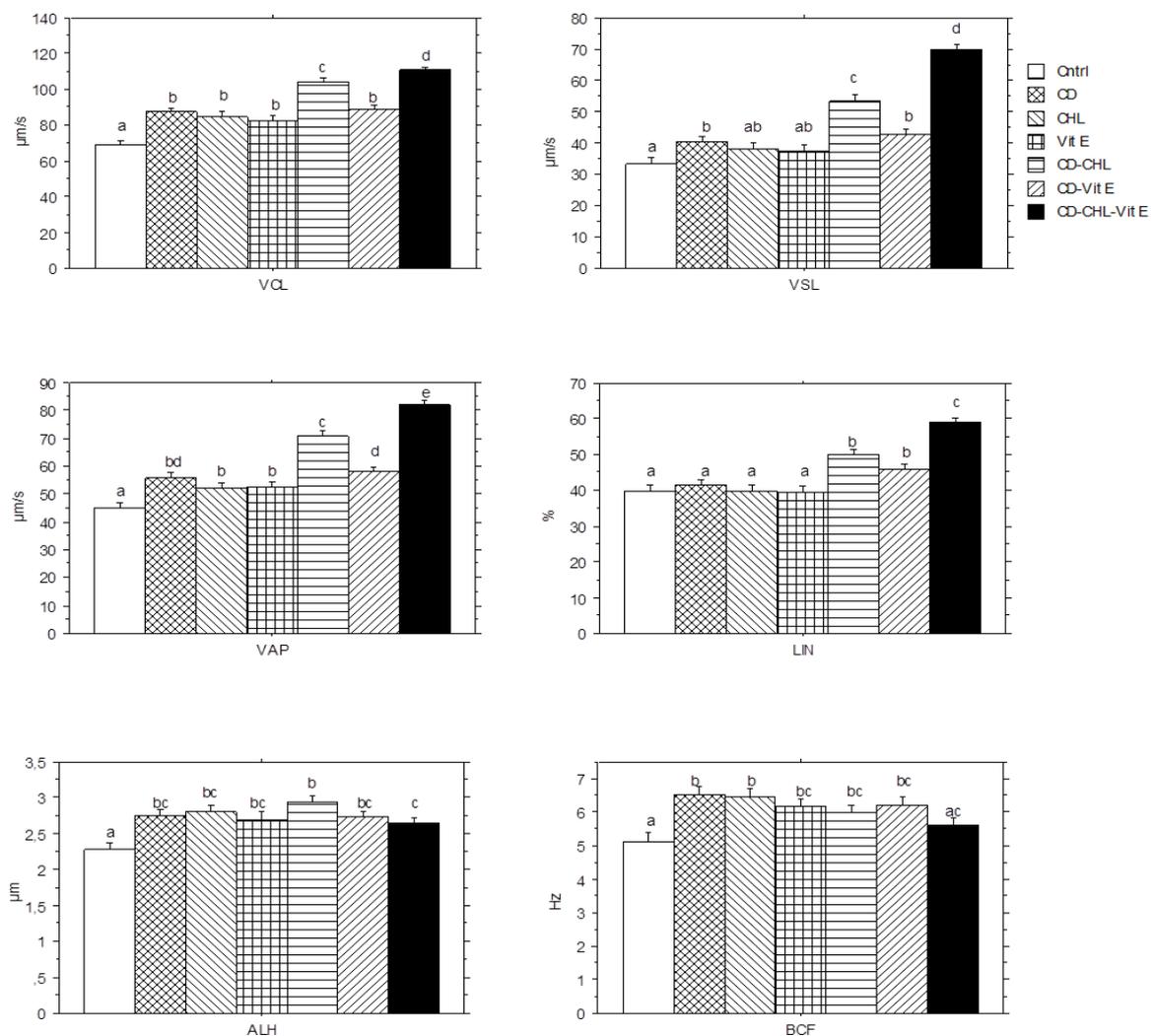


Figure 35 : Moyenne (± ES) de la vitesse de trajectoire (VCL), vitesse linéaire (VSL), la vitesse de trajet moyen (VAP), pourcentage de linéarité (LIN%), amplitude de déplacement

latéral de la tête (ALH) et la fréquence du battement de a tête (BCF) après la décongélation de la semence épидидymaire du bélier, dans le groupe contrôle (Cntrl) et dans les groupes prétraités avec cyclodextrines (CD), cholestérol (CHL), vitamine E (Vit E), complexe cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL), cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E) et les deux complexes, cyclodextrine-cholestérol et cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-Vit E). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

IV.1.3 Peroxydation des lipides

A partir des données observées dans la **Figure n° 36**, la concentration de MDA est significativement plus basse ($P < 0,05$) dans le sperme traité avec le complexe CD-CHL-Vit E ($0,682 \pm 0,092$ nmole/ 10^8 spz) par rapport aux autres traitements indiquant la protection des membranes des spermatozoïdes contre le dommage de la peroxydation des lipides. A un degré moindre, le complexe CD-Vit E montre le même effet de protection avec des valeurs significativement plus basses que celles d'autres traitements, particulièrement, la Vit E ($P < 0,05$). Les résultats issus des complexes CD, CHL et CD-CHL, comparés à ceux du contrôle, montrent un effet protecteur mais à un degré moindre que ceux des complexes CD-Vit E et CD-CHL-Vit E.

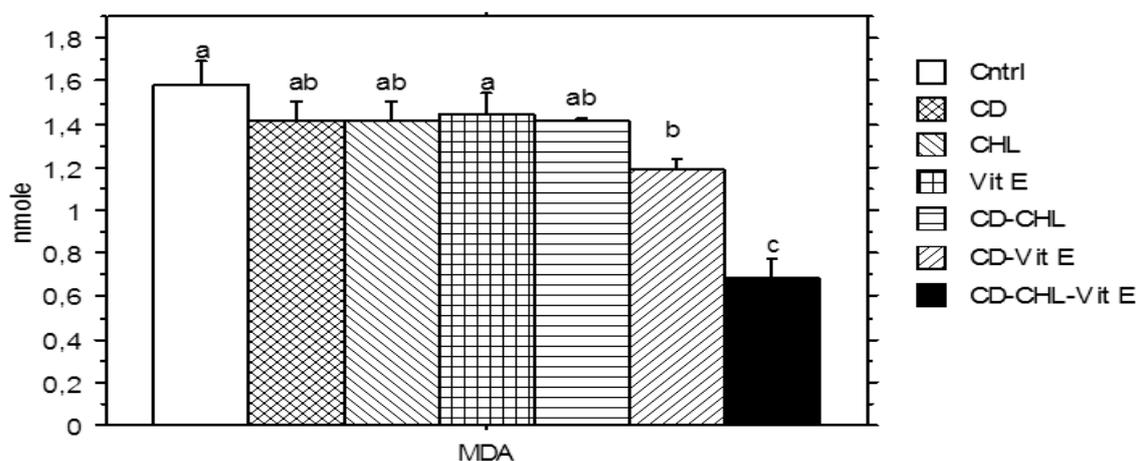


Figure 36 : Moyenne (\pm ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après la décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (Cntrl) et des groupes prétraités avec cyclodextrines (CD), cholestérol (CHL), vitamine E (Vit E), complexe cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL), cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E) et les deux complexes, cyclodextrine-cholestérol et cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-Vit E). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

IV.1.4 Capacité antioxydante totale

La Capacité antioxydante totale (TAC : Total antioxidant capacity) de chaque milieu de congélation est présenté dans la **Figure n°37**. A l'exception du milieu de congélation contenant CD-CH-Vit E ($12,77 \pm 1,54 \text{mM}$), aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre les milieux de congélation de CD ($8,67 \pm 1,100 \text{mM}$), CHL ($7,34 \pm 0,23 \text{mM}$), Vit E ($8,31 \pm 0,624 \text{mM}$), CD-CHL ($9,85 \pm 0,662 \text{mM}$), CD-Vit E ($8,77 \pm 0,709 \text{mM}$) et contrôle ($9,43 \pm 0,87 \text{mM}$). Le milieu de congélation de CD-CHL-Vit E était le seul traitement montrant des valeurs significativement ($P < 0,05$) supérieures à celles observées dans les autres milieux de congélation y compris le contrôle. .

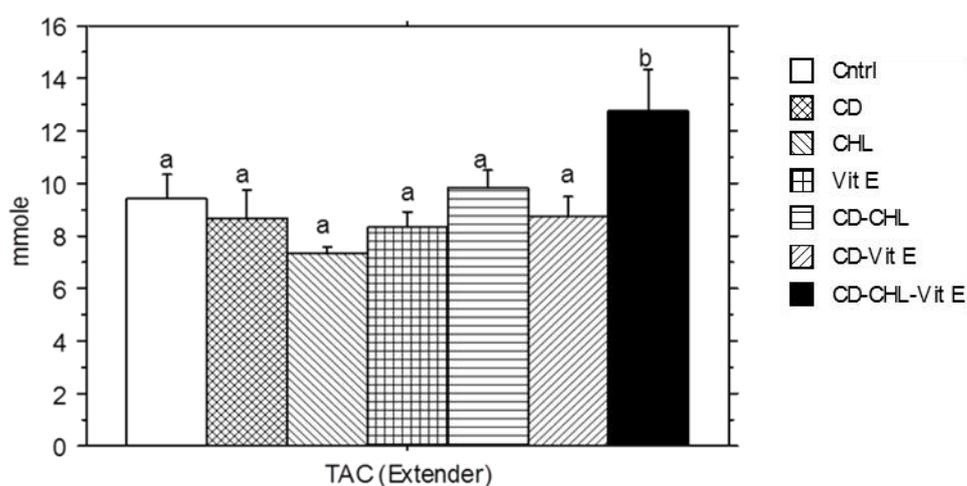


Figure 37 : Moyenne (\pm ES) de la capacité antioxydante totale (TAC) après la décongélation de la semence épидидymaire du bélier, du groupe contrôle (Cntrl) et des groupes prétraités avec cyclodextrines (CD), cholestérol (CHL), vitamine E (Vit E), complexe cyclodextrine-cholestérol (CD-CHL), cyclodextrine-vitamine E (CD-Vit E) et les deux complexes, cyclodextrine-cholestérol et cyclodextrine-vitamine E (CD-CHL-Vit E). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

IV.2 Expérimentation 2

IV.2.1 Paramètre de mobilité

La mobilité totale et la mobilité progressive du sperme post décongélation sont présentées dans la **Figure n°38**. Les résultats ont montré que la concentration 2 mg du CD-Vit E (CD-Vit E_{2mg}) améliore significativement ($P < 0,05$) la mobilité totale ($58,40 \pm 4,09$) par rapport au contrôle et aux autres concentrations de CD-Vit E. Contrairement à CD-Vit E_{2mg}, le traitement du sperme avec les concentrations 4 mg et 6mg de CD-Vit E (CD-Vit E_{4mg} : $31,54 \pm 2,99\%$; CD-Vit E_{6mg} : $15,05 \pm 2,09\%$) ont diminué significativement ($P < 0,05$) la mobilité totale du sperme en comparaison avec le contrôle ($46,98 \pm 3,24\%$). La Comparaison entre CD-Vit E_{4mg} et CD-Vit E_{6mg} a montré que CD-Vit E_{6mg} a eu un effet significativement ($P < 0,05$) plus néfaste sur la mobilité totale du sperme.

En ce qui concerne la mobilité progressive, le principal paramètre indicateur de la fertilité, les résultats étaient similaires à ceux de la mobilité totale : CD-Vit E_{2mg} ($42,78 \pm 4,11$) > CD-Vit E_{0mg} ($25,11 \pm 3,94$) > CD-Vit E_{4mg} ($17,68 \pm 2,16$) > CD-Vit E_{6mg} ($6,35 \pm 1,33$), sauf que l'altération de la mobilité progressive par CD-Vit E_{4mg} n'était pas significative par rapport au contrôle.

La comparaison des VCL, VAP, VSL, LIN%, ALH et BCF, entre différentes concentrations de CD-Vit E (0, 2, 4, et 6mg), n'a pas permis de détecter des différences statistiquement significatives. Cependant, la comparaison des taux des spermatozoïdes rapides, lents, moyens et statiques (**Tableau n°2**) a permis de démontrer l'effet de CD-Vit E à différentes concentrations. En effet, CD-Vit E_{2mg} a préservé un taux de spermatozoïdes rapides plus élevé et ce, significativement ($P < 0,05$) par rapport CD-Vit_{4mg} et CD-Vit E_{6mg} et non significativement ($P > 0,05$) par rapport au contrôle.

Globalement, les résultats de la mobilité ont montré que les concentrations de CD-Vit E de 2 mg, améliore significativement les paramètres de mobilité du spermatozoïde décongelé.

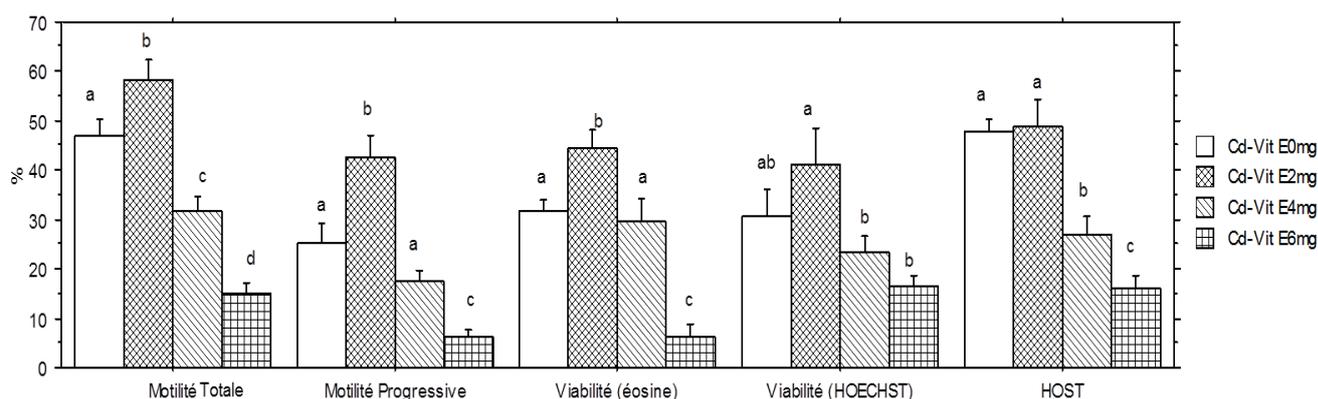


Figure 38: Pourcentages (Moyenne \pm ES) de la motilité totale (TM), motilité progressive (PM), viabilité (éosine), viabilité (HOECHST 33258), test de gonflement hypo-osmotique (HOST) après la décongélation de la semence du bélier de la race *Ouled Djellal*, du groupe contrôle (CD-Vit E₀mg) et des groupes prétraités avec les concentrations de CD-Vit E, 2mg (CD-Vit E₂mg), 4mg (CD-Vit E₄mg) et 6mg (CD-Vit E₆mg). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

Tableau 2 : pourcentages des spermatozoïdes rapides, Moyens, Lents et Statiques du sperme d'électroéjaculation du bélier de race *Ouled Djellal*

	Cd-Vit E ₀ mg	Cd-Vit E ₂ mg	Cd-Vit E ₄ mg	Cd-Vit E ₆ mg
Rapide	24,95 \pm 6,02 ^{ab}	34,91 \pm 3,68 ^a	14,2 \pm 3,1 ^{bc}	5,25 \pm 0,91 ^c
Moyen	13,18 \pm 2,32 ^a	14,54 \pm 2,22 ^a	8,84 \pm 2,24 ^{ab}	3,15 \pm 0,9 ^b
lent	8,85 \pm 1,81 ^a	8,92 \pm 1,49 ^a	11,56 \pm 2,05 ^a	6,65 \pm 7,79 ^a
Statique	53,02 \pm 3,24 ^a	41,6 \pm 4,09 ^b	66,46 \pm 1,96 ^c	84,95 \pm 2,09 ^d

IV.2.2 La Viabilité

La viabilité du sperme a été déterminée par la coloration Eosine Y et ainsi que par le produit fluorescent HOECHST 33258. Les résultats de la viabilité sont représentés dans la **Figure n°38**. L'éosine a révélé que le complexe CD-Vit E₂mg (44,40 \pm 3,70%) maintient significativement ($P < 0,05$) un taux de viabilité plus élevé par rapport aux CD-Vit E₄mg (29,35 \pm 4,89%) et CD-Vit E₆mg (6,32 \pm 2,34%). Comparativement au contrôle (31,55 \pm 2,40%), CD-Vit E₂mg a amélioré, certes, la viabilité de la semence post décongélation mais de façon non significativement ($P > 0,05$). Par ailleurs, aucune différence significative ($P > 0,05$) entre le CD-Vit E₄mg et le contrôle n'a été enregistrée. En revanche, le CD-Vit E₆mg a significativement ($P < 0,05$) détérioré la viabilité de la semence décongelée.

Quant à la viabilité évaluée par HOECHST 33258, les résultats étaient semblables à ceux enregistrés avec l'éosine. En effet, CD-Vit E_{2mg} (41,30±7,04%) a augmenté la viabilité de la semence décongelée, particulièrement, lorsqu'il était comparé avec CD-Vit E_{4mg} (23,45±3,31%) et CD-Vit E_{6mg} (16,50±1,96%). Ces derniers, comparativement au contrôle (30,68±5,49%), ont réduit, de façon non significative (P > 0,05), la viabilité de la semence.

IV.2.3 Fonctionnalité de la membrane du sperme

Après la décongélation, les résultats de la fonctionnalité de la membrane du sperme ont été obtenus grâce au test de gonflement hypo-osmotique (HOST) (**Figure n°38**). Les données de HOST n'ont indiqué aucune différence significative (P > 0,05), en termes de fonctionnalité de la membrane, entre CD-Vit E_{2mg} et CD-Vit E_{0mg} (Contrôle) (47,75±2,42% vs 48,91±5,57%). Ces derniers, ont protégé significativement (P < 0,05) la fonctionnalité de la membrane par rapport aux CD-Vit E_{4mg} (26,85±3,92%) et CD-Vit E_{6mg} (15,92±2,50%). En outre, parmi ces traitements, CD-Vit E_{6mg} a endommagé significativement la fonctionnalité de la membrane du sperme.

IV.2.4 Peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides des membranes des spermatozoïdes décongelés a été mesurée en quantifiant la malondialdéhydes (MDA). Les résultats de la quantification de MDA sont présentés dans la **Figure n°39**. CD-Vit E_{2mg} (1,02±0,037 nmole/120x10⁶Spz) a baissé MDA de la semence, significativement (P < 0,05) par rapport aux CD-Vit E_{0mg} (1,32±0,048 nmole/120x10⁶Spz) et CD-Vit E_{6mg} (1,29 ±0,107 nmole/120x10⁶Spz) et non significativement (P > 0,05) par rapport aux CD-Vit E_{4mg} (1,25±0,117 nmole/120x10⁶Spz), indiquant que CD-Vit E_{2mg} a protégé les membranes des spermatozoïdes contre la peroxydation des lipides durant la cryoconservation. En comparaison avec le contrôle, CD-Vit E_{4mg} a protégé significativement (P < 0,05) la membrane cellulaire contre LPO, tandis que CD-Vit E_{6mg} avait une protection mais de façon non significative.

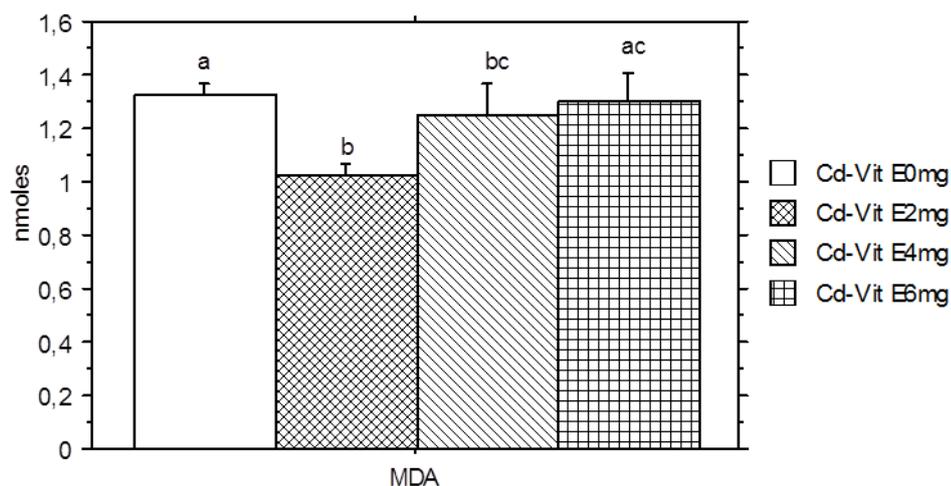


Figure 39: Moyenne (\pm ES) de la peroxydation des lipides (MDA) après la décongélation de la semence du bélier de la race *Ouled Djellal*, du groupe contrôle (CD-Vit E_{0mg}) et des groupes prétraités avec les concentrations de CD-Vit E, 2mg (CD-Vit E_{2mg}), 4mg (CD-Vit E_{4mg}) et 6mg (CD-Vit E_{6mg}). Des lettres différentes indiquent les différences significatives ($P < 0,05$).

V. Discussion

V.1 Expérimentation 1

L'objectif de l'expérimentation 1 était d'explorer une nouvelle alternative dans la préservation du sperme épидидymaire du bélier. L'approche expérimentale consistait en une protection simultanée contre le choc au froid et le stress oxydatif en utilisant le cholestérol et la vitamine E. Comme les deux molécules sont hydrophobes, leur solubilité dans le milieu de congélation était augmentée grâce à leur incorporation dans les cyclodextrines.

Il est bien établi que le cholestérol joue un rôle déterminant dans le maintien de la structure, de la fluidité et de la fonction de la membrane cellulaire dans l'intervalle des températures physiologiques (Aman et Pickett, 1987; Darin-Bennett et White, 1977). Au cours de la cryoconservation, la membrane du sperme est exposée aux dommages du choc au froid avec une déplétion significative du cholestérol affectant l'intégrité de la membrane cellulaire, la mobilité des gamètes et les résultats de fertilité. Il est bien établi, que la sensibilité du sperme des mammifères au choc au froid dépend de la proportion du rapport cholestérol / phospholipides dans la membrane cellulaire. Chez le bélier, ce rapport est plus

faible (0,38) comparé au sperme humain (0,99), ce qui explique la plus grande susceptibilité de la membrane du spermatozoïde du bélier au choc au froid (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Dans cette expérimentation, la supplémentation du milieu de congélation en cholestérol seul (CHL) a amélioré seulement les valeurs de VCL, VAP, ALH et BCF par rapport au contrôle. Ce qui a été rapporté, précédemment, décrivant le même effet minime contre les altérations du choc au froid (Graham et Foote, 1987). Ceci est en relation avec le caractère hydrophobe du cholestérol limitant sa solubilité dans les dilueurs du sperme. Lorsque le cholestérol était chargé dans les cyclodextrines (CD-CHL), toutes les vitesses et la linéarité étaient significativement plus élevées ($p < 0,05$) par rapport à tous les traitements utilisés, à l'exception du CD-CHL-Vit E (**Figure n°33**). La mobilité totale et la mobilité progressive ainsi que la viabilité (HOST) ont, également, été, significativement, améliorées, en particulier, par rapport au contrôle (**Figure n°32**). Ces résultats sont en accord avec les études antérieures rapportant les mêmes effets positifs des cyclodextrines chargées de cholestérol sur la mobilité des gamètes et/ou l'intégrité de la membrane chez le bélier (Morrier *et al.*, 2004), taureau (Mocé et Graham, 2006; , 2004) et l'étalon (Moore *et al.*, 2005, Pamornsakda *et al.*, 2011).

Les cyclodextrines agissent en augmentant le transfert de cholestérol dans la membrane du spermatozoïde (Moore *et al.*, 2005, Pamornsakda *et al.*, 2011) et, par conséquent, augmentent la résistance de la membrane plasmique au choc au froid. L'insertion du cholestérol dans la membrane augmente aussi la perméabilité cellulaire aux cryoprotecteurs tels que le glycérol (Glazar *et al.*, 2009; Mocé *et al.*, 2010). A cet égard, il a été montré, récemment, que le traitement du sperme de bélier avec des cyclodextrines chargées de cholestérol a réduit dans le milieu le taux de glycérol requis pour la cryoconservation de 5% à 3% (Awad, 2011; Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2014).

La mobilité totale et les vitesses des spermatozoïdes dans les échantillons traités avec des cyclodextrines seules (CD), avant la cryoconservation, étaient significativement plus élevées que celles du contrôle. Zeng et Terada (2000, 2001) et Madison *et al.* (2013) ont rapporté les mêmes effets bénéfiques que ceux des résultats actuels, ce qui suggère que la déplétion du cholestérol par les cyclodextrines, améliore la mobilité et les vitesses des spermatozoïdes après la décongélation. Le mécanisme par lequel les cyclodextrines protègent les spermatozoïdes contre les cryolésions n'est pas encore clair. Cependant, il a été démontré que la déplétion du cholestérol membranaire améliore la fluidité et la perméabilité de la

membrane (Cooper, 1986; Grunze et Deuticke, 1974) et peut, éventuellement, diminuer la formation des cristaux de glace intracellulaire létaux. Inversement, nos résultats contrastent avec le rapport de Mocé *et al.* (2010) sur le bélier. En effet, ces derniers ont montré qu'après la décongélation, les cyclodextrines diminuent la mobilité des spermatozoïdes en rendant le sperme plus sensible aux dommages du choc au froid. Des travaux ont mis en évidence que l'effet de CD sur la déplétion du cholestérol membranaire dépend du temps d'incubation avec les cyclodextrines et de la concentration de CD (Iborra *et al.*, 2000; Nagao *et al.*, 2010). Dans notre étude, le temps court d'incubation du sperme avec CD (15 min) et la possibilité de CD à se lier avec le cholestérol du jaune d'œuf peuvent réduire la sensibilité du sperme au choc au froid en limitant la déplétion du cholestérol membranaire ou en facilitant l'interaction du cholestérol du jaune d'œuf avec la membrane du sperme. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes biologiques spécifiques par lesquels la CD augmente la mobilité du sperme cryoconservé.

En raison de sa forte proportion en acides gras polyinsaturés, la membrane du spermatozoïde du bélier est la première cible des dommages causés par le stress oxydatif. Ainsi, la peroxydation lipidique est la principale lésion causée par les ERO dans la membrane du spermatozoïde, mais aussi dans d'autres composants cellulaires comme l'acrosome et le génome cellulaire (Peris *et al.*, 2007). La vitamine E dans la membrane cellulaire est la première molécule antioxydante luttant contre le stress oxydatif (Peris *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2001) en interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides et en piégeant les ERO (Niki *et al.*, 2004). En effet, La vitamine E protège les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque (Valk et Hornstra, 2000). Ce dernier constitue la majorité des AGPI chez le bélier. De plus, la vitamine E a été proposée comme composant structurel qui stabilise les membranes cellulaires contenant des lipides polyinsaturés (Diplock et Lucy, 1973; Fukuzawa *et al.*, 1977). Ceci est dû à sa localisation dans le noyau lipidique de la membrane et à sa liaison avec les phospholipides (Urano *et al.*, 1987, 1988). Néanmoins, une fois la vitamine E épuisée, la cellule devient vulnérable aux attaques des ERO, en particulier pendant le processus de congélation-décongélation (Peris *et al.*, 2007).

Dans le présent travail, la supplémentation du dilueur du sperme par la vitamine E seule (Vit E) a significativement augmenté VCL, VAP, ALH et BCF par rapport au contrôle. Ceci est en accord avec les rapports précédents où la vitamine E s'est révélée favorable à la mobilité du sperme et l'intégrité de la membrane (Breininger *et al.*, 2005, Hsu *et al.*, 1998,

Vasconcelos *et al.*, 2014, 2013). Cependant, ces effets positifs sur le sperme ne sont pas systématiquement observés chez le bélier (Da Silva *et al.*, 2009; Sarlós *et al.*, 2002; Upreti *et al.*, 1997). Ces résultats divergents pourraient être liés à la solubilité et aux concentrations de vitamine E utilisées dans ces expérimentations.

Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont été réalisés pour améliorer l'efficacité antioxydante des dilueurs du sperme des animaux. Ces études reposent en partie sur la substitution de la vitamine E par les antioxydants à base de plantes (Motlagh *et al.*, 2014), les antioxydants enzymatiques tel que le glutathion (Salmani *et al.*, 2013) et sur la combinaison entre la vitamine E et d'autres molécules antioxydantes (Hsu *et al.*, 1998, Krishnamoorthy *et al.*, 2007, Da Silva *et al.*, 2009). Cependant, à notre connaissance, aucun travail sur l'intérêt de la supplémentation des dilueurs de sperme avec le complexe, cyclodextrines-vitamine E n'a été réalisé. En revanche, des travaux dans le domaine de la chimie, ont montré que la complexation de la Vitamine E avec les CDs n'affecte pas l'activité antioxydante de la Vitamine E tout en augmentant sa stabilité contre la photodégradation (López-nicolás *et al.*, 2014). Comme la vitamine E partage le même caractère hydrophobe avec le cholestérol, il a été émis l'hypothèse que le chargement de la vitamine E dans les cyclodextrines pourrait augmenter sa solubilité avec un impact positif sur la membrane cellulaire. Nos résultats confirment bien que le CD-Vit E diminue la LPO de la membrane des spermatozoïdes et améliore les paramètres de mobilité (mobilité totale, paramètres CASA) par rapport au contrôle et à la Vit E seule. Ceci suggère que les cyclodextrines ont augmenté l'effet bénéfique de la vitamine E sur les spermatozoïdes probablement en l'insérant dans la membrane du spermatozoïde comme elles le font pour le cholestérol. D'autres études sont, cependant, nécessaires pour confirmer ce mécanisme.

Dans notre étude, nous avons testé une nouvelle approche qui consistait à utiliser, simultanément, la vitamine E et le cholestérol, complexés aux cyclodextrines (CD-CHL-Vit E). Nos résultats montrent une nette amélioration ($P < 0,05$) de la fonctionnalité de la membrane (HOST), de la capacité antioxydante du milieu de congélation (TAC) et de tous les paramètres de mobilité CASA par rapport aux autres traitements testés, particulièrement par rapport au contrôle en termes de mobilité progressive (53% vs 22%), de fonctionnalité membranaire (58% vs 43%) et de tous les paramètres de mobilité CASA. En outre, CD-CHL-Vit E était le traitement qui a diminué le plus significativement la peroxydation des lipides membranaire. En effet, la TAC élevée et la LPO faible indiquent que la combinaison entre le cholestérol et la vitamine E était une approche efficace pour combattre la peroxydation des

lipides et les attaques des ERO pendant la cryoconservation du sperme. Ceci est probablement dû aux effets de la vitamine E, comme un facteur antioxydant et stabilisant de la membrane (Urano *et al.*, 1987, 1988) et aussi aux effets du cholestérol comme un obstacle à la propagation des ERO (López-Revuelta *et al.*, 2007) et un protecteur contre le peroxyde d'hydrogène (Naseer *et al.*, 2015).

Au cours de la cryoconservation, les membranes des spermatozoïdes subissent des dommages, en particulier, en raison de la déplétion du cholestérol et du stress oxydatif, entraînant une capacitation précoce et une réaction acrosomiale qui peuvent compromettre la fertilité (GaArtiga *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1996). Le statut de la capacitation est caractérisé par des VCL, ALH et BCF élevés associés à des VSL et LIN faibles (Chamberland *et al.*, 2001; Mortimer et Maxwell, 1999; Verstegen *et al.*, 2002). Dans notre étude, de tels paramètres n'ont pas été observés suggérant que les complexes testés, en particulier, CD-CHL-Vit E, préservent non seulement l'intégrité de la membrane et la mobilité des spermatozoïdes, mais, aussi, protègent les gamètes contre une capacitation précoce.

En conclusion, les résultats de l'expérimentation 1 montrent que l'augmentation de la solubilité de la vitamine E avec les cyclodextrines améliore, significativement, la qualité de semence après décongélation ainsi que le statut antioxydant. Les résultats les plus pertinents ont été observés avec l'association des 2 complexes, CD-CHL et CD-Vit E, fournissant, ainsi, une protection supplémentaire, à la membrane cellulaire du spermatozoïde. Cette nouvelle approche ouvre des perspectives intéressantes dans la cryoconservation du sperme, en particulier chez les espèces à faible proportion de cholestérol/phospholipides.

V.2 Expérimentation 2

Dans l'expérimentation 1, une nouvelle approche de la cryoconservation de la semence épидидymaire du bélier a été étudiée. Cette approche était basée sur le traitement des spermatozoïdes avant le processus de congélation avec CD-CHL et CD-Vit E. Le traitement du sperme épидидymaire avec CD-CHL et CD-Vit E avait un impact positif net sur tous les paramètres de mobilité, la fonctionnalité de la membrane et la peroxydation des lipides de la membrane du sperme après la décongélation. La concentration de CD-CHL utilisée dans l'expérimentation 1 était 2 mg/120 x 10⁶Spz. cette concentration est conventionnelle chez le bélier (Awad, 2011 ; Mocé *et al.*, 2010b). Cependant, la concentration adéquate de CD-Vit E pour la cryoconservation du sperme du bélier n'est pas encore étudiée. De ce fait, l'objectif de l'expérimentation 2 était d'optimiser une concentration du complexe CD-Vit E associé au

complexe CD-CHL (2mg/120x10⁶Spz) pour la cryoconservation de la semence d'électroéjaculation du bélier de race *Ouled Djellal*.

Dans cette deuxième expérimentation, la nouvelle approche a été testée sur le sperme du bélier de race *Ouled Djellal* connue pour son excellente qualité viandeuse, sa laine et son GMQ (Gain moyen quotidien) de 200g/j donnant un poids adulte de 83 kg et 60 kg chez le mâle et la femelle, respectivement. De plus, cette race est la plus adaptée aux pâturages et aux variations climatiques de la steppe qui permet la minimisation des pertes de production durant les saisons de sécheresse pour les éleveurs (Institut techniques d'élevages, 2000).

L'optimisation de la cryoconservation de la semence du bélier pourrait augmenter sa fertilité et par conséquent la pratique de l'insémination artificielle au moyen de la semence cryoconservée.

Les différentes concentrations du complexe CD-Vit E utilisées pour l'optimisation de la cryoconservation de la semence du bélier de race *Ouled Djellal* étaient 0, 2, 4 et 6 mg/ml (CD-Vit E_{0mg} (contrôle), CD-Vit E_{2mg}, CD-Vit E_{4mg} et CD-Vit E_{6mg}). Ces concentrations de 0, 2, 4 et 6 mg de CD-Vit E contiennent 0, 0.5, 1, 1.5 mg de vitamine E, respectivement. Le choix de ces concentrations de vitamine E était basé sur des études précédentes sur la cryoconservation de la semence en utilisant la vitamine E toute seule chez différentes espèces y compris le bélier. Les concentrations de la vitamine E utilisées dans ces études étaient entre 0 et 2 mg (Hu *et al.*, 2011 ; Sarlos *et al.*, 2002). Dans notre étude la concentration de 2 mg n'est pas testée car le traitement de la semence du taureau par 2 mg/120x10⁶Spz de Vit E était toxique pour les spermatozoïdes (Hu *et al.*, 2011).

Les résultats de l'expérimentation 2 ont montré que le traitement du sperme du bélier de race *Ouled Djellal*, avec CD-Vit E_{2mg} (2mg/120x10⁶Spz) associé à CD-CHL (2mg/120x10⁶Spz) améliore les paramètres de mobilité, viabilité (éosine, HOECHST 33258) et de fonctionnalité de la membrane (HOST) par rapport au contrôle. Ces résultats confirment les résultats rapportés dans la première expérimentation sur la cryoconservation de la semence épидidymaire. L'amélioration de la qualité de sperme du bélier de race *Ouled Djellal* pourrait être tributaire de la vitamine E. Cette dernière est considérée comme un stabilisateur des membranes riches en acide gras polyinsaturés et comme un antioxydant puissant protégeant le sperme contre la peroxydation des lipides durant la cryoconservation (Niki *et al.*, 2004 ; Urano *et al.*, 1987, 1988). En effet, le test de peroxydation des lipides membranaire réalisé

dans notre travail a montré que le CD-Vit E, à une concentration de $2\text{mg}/120 \times 10^6 \text{Spz}$, a diminué significativement la peroxydation des lipides des spermatozoïdes par rapport au contrôle. Ce dernier résultat supporte l'hypothèse de la première expérimentation suggérant que l'impact positif de CD-Vit E pourrait être dû à l'incorporation de vitamine E dans la membrane cellulaire via la méthyl- β -cyclodextrine.

L'expérimentation 2 a aussi montré que CD-Vit E_{6mg} associé au CD-CHL ($2\text{mg}/120 \times 10^6 \text{Spz}$) a significativement diminué tous les paramètres de qualité du sperme étudié suivi par CD-Vit E_{4mg}. Les effets délétères de CD-Vit E_{6mg} et CD-Vit E_{4mg} sur la semence de bélier de race *Ouled Djellal* pourrait être expliqué par le fait que la CD-Vit E avec une concentration de 4 mg ou 6mg, contenant 1 et 1.5 mg de vitamine E, respectivement devient, toxique pour les spermatozoïdes. Ces concentrations sont plus faibles par rapport à la concentration toxique (2 mg de vitamine E) rapporté par Hu *et al* (2011). Ceci pourrait être lié à l'augmentation de la solubilité de la vitamine E via la méthyl- β -cyclodextrine dans notre étude. De plus, Dalvit *et al.* (1998) ont rapporté que l'augmentation de la concentration en vitamine E pourrait altérer les caractéristiques de la membrane plasmique, affectant ainsi sa fluidité. Ils ont supposé que le nouvel environnement lipidique causé par la forte concentration de vitamine E dans le sperme pourrait être associé à une augmentation des classes de phospholipides spécifiques qui ne sont pas entièrement protégés par l'activité antioxydante de la vitamine E, et la peroxydation lipidique pourrait être encore présentée. En outre, Cao et Cutler (1993) ont rapporté que l'effet de la vitamine E pouvait varier avec la concentration et agir comme un stimulateur d'oxydation à forte concentration. Dans notre étude, CD-Vit E_{4mg} et CD-Vit E_{6mg} n'ont pas stimulé l'oxydation même s'ils ont un impact positif minime sur la peroxydation des lipides membranaire. Ces résultats suggèrent que la toxicité de la vitamine E dans notre travail n'est pas tributaire de la stimulation de l'oxydation. D'autres études sont, cependant, requises pour déterminer le mécanisme de la toxicité de la vitamine E sur la cellule.

La conclusion principale de cette expérimentation 2 est que le traitement du sperme de bélier de la race *Ouled Djellal* avec 2mg de CD-Vit E / $120 \times 10^6 \text{Spz}$ associé à CD-CHL à la même concentration améliore sa qualité post décongélation.

Au terme de ce projet, les résultats principaux obtenus sont que le traitement du sperme par la cyclodextrine-cholestérol et la cyclodextrine-vitamine E est une approche efficace pour l'amélioration de la qualité de la semence cryoconservée du bélier. L'efficacité

de ce traitement pourrait être liée à la protection de la membrane contre le choc au froid et la peroxydation des lipides. De plus, la concentration optimale de la cyclodextrine-vitamine E pour la congélation du sperme du bélier de race *Ouled Djellal* est $2\text{mg}/120 \times 10^6$ Spz. D'autres études sont nécessaires pour tester la fertilité de la semence cryoconservée prétraitée avec les 2 complexes, CD-Vit E et CD-CHL.

VI. Recommandations et perspectives

En Algérie, en raison du manque d'études sur l'insémination artificielle et la cryoconservation du sperme chez les ovins, il est indispensable de mener d'autres projets de recherche qui traitent les biotechnologies du sperme, notamment, sa congélation.

Dans ce travail, le traitement du sperme par le complexe cyclodextrine-vitamine E a protégé la membrane du spermatozoïde contre la peroxydation des lipides. Ce résultat nous a permis de suggérer que la cyclodextrine pourrait incorporer la vitamine E dans la membrane du spermatozoïde. De ce fait, nous préconisons de mener d'autres études mesurant la quantité de vitamine E dans la membrane plasmique du spermatozoïde avant et après l'ajout de cyclodextrine-vitamine E.

Vu l'impact bénéfique de la combinaison entre les deux complexes, cyclodextrine-cholestérol et cyclodextrine-vitamine E dans le traitement du sperme ovin cryoconservé d'une part, et d'autre part, la sensibilité de la membrane au choc au froid et à la peroxydation des lipides pratiquement chez toutes les espèces, il serait intéressant de tester cette nouvelle approche sur les différentes espèces tels que les caprins et le lapin sources indéniables de protéines pour la population algérienne.

Il a été remarqué dans notre travail que la cyclodextrine seule a améliorée les paramètres de mobilité. Ce résultat est en accord avec celui d'autres études. Cependant, le mécanisme par lequel la cyclodextrine améliore la qualité de la semence reste inconnu. Il est recommandé de réaliser d'autres travaux pour élucider cet effet positif de cyclodextrine.

La nouvelle approche pratiquée dans notre étude a augmenté la qualité de la semence congelée. Cependant, l'efficacité de notre approche ne peut être confirmée que par l'étude de la fertilité après l'insémination artificielle.

la fertilité de cette semence n'a pas été testée en raison du manque de femelles et du temps imparti pour pratiquer l'insémination artificielle. Il est recommandé de confirmer l'efficacité de notre approche par l'IA.

VII. Références bibliographiques

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S., 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Mens. Health* 32, 1–17. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1
- Ahmad, E., Aksoy, M., Serin, İ., Küçük, N., Ceylan, A., Uçan, U., 2013. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Rumin. Res.* 115, 77–81. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.09.006
- Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A., 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57, 1801–1808. doi:10.1016/S0093-691X(02)00653-2
- Aitken, R.J., 1999. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.* 115, 1–7. doi: 10.1530/jrf.0.1150001.
- Aitken, R.J., 1999. Chapter 20 : Production and Effects of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*, edited by Gilbert and Colton. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York , pp 527–541, .
- Aitken, R.J., Baker, M.A., 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 16, 581-588.
- Aitken, R.J., Irvine, D.S., Wu, F.C., 1991. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164, 542–551. doi:10.1016/0020-7292(92)90986-S
- Aitken, R.J., Smith, T.B., Jobling, M.S., Baker, M.A., De Iuliis, G.N., 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16, 31–38. doi:10.4103/1008-682X.
- Alcivar, A., Hake, L., Millette, C., 1989. Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol.* 135, 263-271.
- Alvarez, J.G., Storey B.T., 1989. Rôle of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamète Res.* 23, 77-90.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco L., Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 8, 338-348.

- Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173. doi:10.1016/S0737-0806(87)80025-4
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani, M., 2016. The role of antioxidants in sperm freezing : a review. *Cell Tissue Bank.* doi:10.1007/s10561-016-9566-5
- Arnold, C., 2004. La reproduction du guépard et du lion. Thèse Méd. Vét., Alfort. 112p.
- Austin, C.R., 1951. Observations on the pénétration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res(B).*;4,581-596.
- Awad, M.M., 2011. Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Rumin. Res.* 100, 164–168. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.05.011
- B**ahr, G.F., Engler, W.F., 1970. Considerations of volume, mass, DNA, and arrangement of mitochondria in the midpiece of bull spermatozoa. *Exp Cell Res.* 160, 338-340.
- Bailey, J.L., 2010 Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med* 56, 334-48.
- Bakhach, J., Casoli, V., GUIMBERTEAU, J.C., 2007. The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary results of our own experiments. *Annales de chirurgie plastique esthétique* 52, 531–547
- Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S., 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet. Med. Int.* 2011, 1–7. doi:10.4061/2011/686137
- Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D., 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10, 49–62. doi:10.1007/s10561-008-9081-4
- Barry, J.F., Nick, L., Erica, E.B., 2004. Life in the frozen state. Edit, CRC Press USA. 673 pages.
- Baust, J.G., Baust, J.M., 2007. Advances in biopreservation. CRC press Taylor & Francis Group. 411 Pages.
- Beconi, M.T., Mora, C.R.F.N.G., Affranchino, M.A., 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40, 841–851. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90219-U](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(93)90219-U).
- Bell, M., Wang, R., Hellstrom, W.J, Sikka, S.C., 1993. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl.*; 14, 472-478.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D., 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70, 1478–1488. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.095

- Benhenia, K., Lamara, A., Fatmi, S., Iguer-Ouada, M., 2016. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Rumin. Res.* 141, 29–35. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.06.009
- Benkhalifa, M., Ferreira, Y.J., Chahine, H., Louanjli, N., Miron, P., Merviel, P., Copin, H., 2014. Mitochondria: Participation to infertility as source of energy and cause of senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 55, 60-641. doi:10.1016/j.biocel.2014.08.011
- Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A., Gagnon, C., 2000. Levels of antioxidant défenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 55, 282-288.
- Bjorndahl, L., Soderlund, I., Kvist, U., 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod.* 18, 813-816.
- Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., Mocé, E., 2012. Response of boar sperm to the treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 959–964. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.01999.x
- Borini, A., Coticchio, G., 2009. *Preservation of Human Oocytes*. Edit. Informa healthcare. 299 pages.
- Breiner, E., Beorlegui, N.B., O’Flaherty, C.M., Beconi, M.T., 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63, 2126–2135. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.016
- Brown, D. A., and London, E. 2000. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224
- Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Varişli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67, 1060–1067. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.12.004
- Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Yüce, A., 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin. Res.* 75, 128–134. doi:10.1016/j.smallrumres.2007.09.002
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariözkan, S., Ulutaş, P.A., 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rumin. Res.* 81, 13–17. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.10.003
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Buschmann, H.-J., Schollmeyer, E., 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J. Cosmet. Sci.* 53, 185–191. doi:10.1023/A:1011892600388
- Byrne, G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, a., Hanrahan, J.P., Boland, M.P., 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 265–275. doi:10.1016/S0378-4320(00)00121-4

- Cao., G., Cutler, R.G., 1993. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 17, 189–201.
- Cerolini, S., Zainiboni, L., Maldjian, A., Gliozzi, T., 2006. Effect of docosahex- aenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology* 66, 877–886
- Chaikin, P. M., Lubensky, T.C., 1995. Principles of condensed matter physics. Edit. Cambridge university press. 699 pages.
- Chamberland, A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M. A., Sullivan, R., Bailey, J.L., 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55, 823–835. doi:10.1016/S0093-691X(01)00446-0.
- Chang, M.C., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.*; 168,697-698.
- Chellig R. (1992). Les races ovines Algériennes. Office des Publications Universitaires .Alger. 1992, 1-80.
- Chemmam, M., (2007). Variation de l'ingestion et des performances chez la brebis « *Ouled Djellal* » sur pâturage : effet de la saison et de la complémentation. Thèse doctorat (Annaba) 167p.
- Chen H., Chow, P.H., Cheng, S.K., Cheung, A.L., Cheng, L.Y., O W.S., 2003. Maie génital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to préserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J Androl*; 24, 704-711.
- Chenoweth, P.J., Lorton, S.P., 2014. Animal andrology: theories and application. CAB international, pp 595.
- Chian., R.C.,Quinn, P., 2010. Fertility cryopreservation. Edit.Cambridge university press. 271 pages.
- Cooper, G.M., Haussman, R.E., 2006. The cell, A Molecular Approach, Fourth Edition.ASM Press Washington, D.C. ISBN-13: 978-0-87893-219-1 (Sinauer Associates: hardcover). 808 pages.
- Cooper, T.G., 1986.The epididymis, sperm maturation and fertilization. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. London Paris Tokyo, 291 pages. DOI: 10.1007/978-3-642-71471-9.
- Courbière, B., Baudot, A., Mazoyer, C., Salle, B., Lornage, J., 2009. La vitrification : technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne ? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37,803–813.
- Crini, G., 2014. Review : A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 114, 10940–10975. doi:10.1021/cr500081p
- Cross, N.L., 2003. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod.* 69, 529-534.

Cross., N.L., 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59, 7-11.

Da Silva Maia, M., Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Sicherle, C.C., de Sousa, D.B., Rodello, L., 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin. Res.* 85, 85–90. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.07.001.

Dalvit GC, Cetica PD and Beconi MT 1998. Effect of α -tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 49, 619–627.

Daniel, R., Brigitte, V., 2004. *Elements de biologie cellulaire 3ième édition.* Edit. doin Editeurs. 428 pages.

Darin-Bennett, A., Poulos A., White I.G., 1973. The effect of cold shock and freeze- thawing on release of phospholipids by mm, bull and boar spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 1409- 1420.

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

Darin-Bennett. A., Poulos, A., White. I.G., 1974. The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 41, 471-474.

Das, S.K., Rajabalaya, R., David, S., Gani, N., Khanam, J., Nanda, A., n.d. *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences Cyclodextrins-The Molecular Container* 4, 1694–1720.

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

Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324,1-18.

Derivaux, J., Ectors F., 1986. *Reproduction chez les animaux domestiques.* Troisième édition revue, CABAY Louvain la neuves, 1141 p.

Dessolle, L., De Larouzière, V., Ravel, C., Berthaut, I., Antoine, J.M., Mandelbaum, J., 2009. Congélation lente et vitrification des ovocytes humains matures et immatures. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, 712–719.

Diez-Sanchez, C., Ruiz-Pesini E, Montoya J, Perez-Martos A, Enriquez JA, Lopez-Perez, MJ. Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *Federation Eur Biochem Soc.* 2003;553:205-208.

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

Dodziuk, H., 2006. *Cyclodextrins and their complexes:chemistry, analytical methods, Applications.* Weinheim; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Du Plessis, S.S., Agarwal, A., Halabi, J., Tvrda, E., 2015a. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 509–520. doi:10.1007/s10815-014-0425-7
- Du Plessis, S.S., Agarwal, A., Mohanty, G., Linde, M. Van Der, 2015b. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? 230–235. doi:10.4103/1008-682X.135123
- E**astbuern, S.D., Tao, B.Y., 1994. Applications of modified cyclodextrins. *Biotech.Adv.* 12, 325-339..
- Eddy, E.M., 2006. The spermatozoon. In *physiology of reproduction, volume 1* (Knobli E., Neill J.D., Eds) pp 3-54, chapitre 1. 3ème édition. Elsevier Academic Press Publicatione st. louis.M.O., USA.
- Eddy, E.M., O'Brien, D.A., 1994. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction, vol 1, 2nd ed.* New York: Raven Press; 29-77 Ehrenwald
- Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., Niemann, H., 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 66, 2160–2164. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.003
- Ellouze, F., Ben Amar, N., Deratani, A., 2011. Les cyclodextrines a large cycle: synthse, purification et applications. *Comptes Rendus Chim.* 14, 967–971. doi:10.1016/j.crci.2011.02.006
- Ernster, L., Forsmark, P., Nordenbrand, K., 1992. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biofactors* 3, 241–248
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.* Butterworths, Sydney, 194 pp.
- F**ickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 81–89. doi:10.1007/s10344-007-0089-z
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013. *Anatomy and Physiology of Farm Animals.* Wiley Blackwell 536 pages.
- Fukuzawa, K., Hayashi, K., Suzuki, A., 1977. Effects of α -tocopherol analogs on lysosome membranes and fatty acid monolayers. *Chem Phys Lipids* 18, 39–48
- Fuller, B., Paynter, S., 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 680-691.
- G**aArtiga, C., Gutierrez, A., Garde, J., Pintado, B., Vazquez, I., 1993. Physiological changes of fresh or frozen ram spermatozoa during capacitation “ IN VITRO .” *Theriogenology* 1993. doi:10.1016/0093-691X(93)90037-6

- Gadella, B.M., Luna, C., 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* 81, 74–84. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.005
- Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actual. Chim.* Novembre, 91–96.
- Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C.M., Shoham, Z., 2009. Textbook of assisted reproductive technologies laboratory and clinical perspectives, third edition Edit. Informa Healthcare UK. 912 pages.
- Garner, D., Hafez, E., 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reprod. Farm Anim.* 7th ... 96–109. doi:10.1002/9781119265306.ch7
- Gazo, I., Shaliutina-Kolešová, A., Dietrich, M. a., Linhartová, P., Shaliutina, O., Cosson, J., 2014. The effect of reactive oxygen species on motility parameters, DNA integrity, tyrosine phosphorylation and phosphatase activity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 57, n/a-n/a. doi:10.1002/mrd.22442
- Gil, J., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 54, 93–108. doi:10.1016/S0093-691X(00)00328-9
- Glazar, A.I., Mullen, S.F., Liu, J., Benson, J.D., Critser, J.K., Squires, E.L., Graham, J.K., 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59, 201–206. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.07.009
- Graham, J.K., Foote, R.H., 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24, 42–52. doi:10.1016/0011-2240(87)90005-8
- Grunze, M., Deutick, B., 1974. Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 356, 125-130. doi:10.1016/0005-2736(74)90300-9
- Guthrie, H.D., Welch, G.R., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78, 1700–1708. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.002
- H**ammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73–88. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
- Herman, H.A., Mitchell, J.R., Gordon, A.D., 1994. Extenders and extension of semen. In: *Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle: A Handbook and Laboratory Manual.* Danville, IL: Interstate Publishers, 101-116.
- Holt, W. V., North, R.D., 1984. Partially Irreversible Cold-Induced Lipid Phase Transitions in Mammalian Sperm Plasma Membrane Domains : Freeze-Fract u re Study 483, 473–483.

- Holt, W. V, North, R.D., 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, 414–424. doi:10.1095/biolreprod51.3.414
- Holt, W.V., North, R.D., 1985. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 73, 285-294.
- Hsu, P.C., Liu, M.Y., Hsu, C.C., Chen, L.Y., Guo, Y.L., 1998. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lipid toxicity in the rat sperm. *Toxicology* 128, 169–179. doi:10.1016/s0300-483x(98)00068-7
- Hu, J.H., Jiang, Z.L., Lv, R.K., Li, Q.W., Zhang, S.S., Zan, L. Sen, Li, Y.K., Li, X., 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62, 83–87. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.12.007
- Hu, J.-H., Zhao, X.-L., Tian, W.-Q., Zan, L.-S., Li, Q.-W., 2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. *Animal* 5, 107–112. doi:10.1017/S1751731110001679
- Huang, D., Ou, B., Woodill, M. H., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K., 2002. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1815–1821
- Hublot, P., 1999. Colloque Scientifique : Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments, première session : Utilisation de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire en France, leur impact sur la limitation des problèmes sanitaires. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Paris, le 29 septembre 1999.
- I**borra, a, Companyó, M., Martínez, P., Morros, A, 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 62, 378–383. doi:10.1095/biolreprod62.2.378
- Institut technique d'élevage. (2000). In : DEGHNOCHE KAHRAMEN. (2011). Étude de certains paramètres zootechniques et du métabolisme énergétique de la brebis dans les régions arides (Biskra). Thèse de doctorat, Institut Des Sciences Veterinaires Et Des Sciences Agronomiques (Batna), 271 pages.
- J**acquet, R., 2006. Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énanti sélective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. Université d'Orléans, 2006. Français.
- Jin, Q., Bethke, C., 2002. Kinetics of Electron Transfer through the Respiratory Chain. *Biophys J.* 83, 1797–1808.
- Jin, Z.Y., 1988. *Cyclodextrin Chemistry: Preparation and Application*. World scientific Publishing, 269.

Jones, R., Mann, T., 1977b. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fertil.* 50, 261–268. doi: 10.1530/jrf.0.0500261.

Kanwar, J.R., Long, B.M., Kanwar, R.K., 2011. The use of cyclodextrins nanoparticles for oral delivery. *Curr. Med. Chem.* 18, 2079–2085. doi:10.2174/092986711795656243

Karow, A.M., 2001. Cryobiology for mammalian embryologists. Cité par Sailley, F., 2008. Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation. Ecole nationale vétérinaire de Lyon. Thèse 07. 147 pages

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

Kasai, M., 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science* 42, 67-75.

Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K., de Kretser D. M., 2006. Chapter 18: Cytology of the Testis and Intrinsic: Control Mechanisms. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 3rd ed. New York: Raven Press; 828-920 Ehrenwald

Konyali, C., Tomás, C., Blanch, E., Gómez, E. a., Graham, J.K., Mocé, E., 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* 67, 124–131. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.06.001

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

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, a., Vignesh, R.C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod. Toxicol.* 23, 239–245. doi:10.1016/j.reprotox.2006.12.004

Kulan, J., Shivaji, K., 2001. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia.*, 33:95-104.

Kumar, S., Millar, J.D., Watson, P.F., 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246–253. doi:10.1016/S0011-2240(03)00040-3

Lamirande, E. De, Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology 2, 48–54.

Laza-Knoerr, a L., Gref, R., Couvreur, P., 2010. Cyclodextrins for drug delivery. *J. Drug Target.* 18, 645–656. doi:10.3109/10611861003622552

- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 62, 113–141.
- Leibo, S.P., 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 69, 37–47.
- Li, T.K., 1975. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol Reprod.* 12, 641-646.
- Litscher, E.S., 2007. Wassarman PM. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol.* 22,337-347.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85, 1017–1025. doi:10.1021/js950534b
- López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F., 2014. Cyclodextrins and Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 251-76. doi:10.1080/10408398.2011.582544
- López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., García-Montero, A.C., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M., 2007. Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1106–1118. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.010
- M**adison, R.J., Evans, L.E., Youngs, C.R., 2013. The effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. *J. Eq. Vet. Sci.* 33, 272-278. doi:10.1016/j.jevs.2012.07.021
- Manafi, M., 2011. Artificial insemination in farm animals. In *Tech Janeza Trdine 9*, 51000 Rijeka, Croatia, 312 pages. ISBN:978-953-307-312-5.
- Mantsch H.H., McElhaney, R.N., 1991. Phospholipid phase transition in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57, 213-226.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S., Viudes-De-Castro, M.P., 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1756–1765. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.006
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., Paz, P. De, Anel, L., 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471–485. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.045
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 55-65.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14, 251–272. doi:10.1016/0011-2240(77)90175-4
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327–344

- Meryman, H.T., 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47:935-945.
- Mitchell P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 191,144-148.
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 57–66. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x
- Mocé, E., Graham, J.K., 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84, 826–33. doi:/2006.844826x.
- Mocé, E., Purdy, P.H., Graham, J.K., 2010b. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 236–247. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.013
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241–249. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.004
- Morrier, A., Thériault, M., Castonguay, F., Bailey, J., 2004. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. *Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, July 31–August 4, 2004*, 239 (Abstract 636).
- Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals 3, 403–439. doi: 10.1093/humupd/3.5.403
- Mortimer, S.T., Maxwell, W.M., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev.* 11, 25-30. doi: 10.1071/RD99019
- Motamedi-Mojdehi, R., Roostaei-Ali Mehr, M., Rajabi-Toustani, R., 2014. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 65–70. doi:10.1111/rda.12225
- Motlagh, M.K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., Zeinoaldini, S., 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology* 69, 217–222. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.007
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 18–31. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x
- Mukaida T., TAKAHASHI, K., KAISI, M., 2002. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reproductive BioMedicine Online.* 6 , 221-226.

- N**agao, Y., Ohta, Y., Murakami, H., Kato, Y., 2010. The effects of methyl- β -cyclodextrin on in vitro fertilization and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote* 18, 323–330. doi:10.1017/S0967199409990396
- Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, I., Ceylan, A., Boyacıoğlu, M., Kum, C., 2015. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology* 71, 18–23. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.06.007
- Nichi, M., Goovaerts, I.G.F., Cortada, C.N.M., Barnabe, V.H., De Clercq, J.B.P., Bols, P.E.J., 2007. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 67, 334–340. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.08.002
- Niki, E., Noguchi, N., Niki, E., Noguchi, N., 2004. Dynamics of Antioxidant Action of Vitamin E. *Acc. Chem. Res.* 37, 45–51. doi:10.1021/ar030069m
- Noblanc, A., 2013. Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : Apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal- Clermont-Ferrand II. Français.
- Nolan, J.P., Hammerstedt, R.H., 1997. Régulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 11, 670–682.
- O**dagescu, V.M., 2005. Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Université Joseph-Fourier – Grenoble. Thèse, 102 pages.
- P**alasz, A.T., Mapletoft, R.J., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 127–149.
- Pamornsakda, T., Pojprasath, T., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., 2011. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology* 63, 90–95. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.05.006
- Pérez, L.J., Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D., Baldasarre H., 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131–141. doi:10.1016/0093-691X(96)00148-3.
- Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L., 2007. Impact of cryo-preservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74, 878–892. doi: 10.1002/mrd.20686
- Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M., Bailey, J.L., 2004. Cryopreservation of Ram Semen Facilitates Sperm DNA Damage: Relationship Between Sperm Andrological Parameters and the Sperm Chromatin Structure Assay 25, 224–233.
- Pesch, S., Bergmann, M., 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37, 597–612. doi:10.1016/j.micron.2006.02.006

- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M., 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268–279. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.08.001
- Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 63, 215–225. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.015
- Purdy, P.H., 2006. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 114–123. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.07.002
- Purdy, P.H., Graham, J.K., 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm q 48, 36–45. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.12.001
- Purdy, P.H., Mocé, E., Stobart, R., Murdoch, W.J., Moss, G.E., Larson, B., Ramsey, S., Graham, J.K., Blackburn, H.D., 2010. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 231–235. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.014
- Re**, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Reed, B.M., 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Edit. Springer Science+Business Media, LLC. 513 pages.
- Regiert, M., 2005. Light-stable vitamin E by inclusion in gamma cyclodextrin. *SOEFW Int J Appl Sci* 131, 10-18.
- Rejraji, H., Saez, F., Drevet, R., 2009. Évolution de la composante lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant la maturation épидидymaire *Androl.* 19, 17-28. doi:10.1007/s12610-008-0006-7
- Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M-C., 2006. Chapter 22: epididymis. . In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 3rd ed. New York: Raven Press; 828-920 Ehrenwald.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155–171. doi:10.1016/S0921-4488(03)00038-5
- S**aake, R.G and Almquist, J.O., 1964a. Ultrastructure of bovine spermatozoa, I. The Head normal, Ejaculated sperm. *AM.J.ANAT*, 115, 143-161. DOI: 10.1002/aja.1001150109
- Saake, R.G and Almquist, J.O., 1964b. Ultrastructure of bovine spermatozoa, II. The neck and Tail normal, Ejaculated sperm. *AM.J.ANAT*, 115, 163-83.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen I . Processing , freezing , thawing and fertility after cervical insemination 37, 185–249.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 77-111.

- Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A.Z., Zhandi, M., 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin. Res.* 112, 123–127. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.12.015
- Sanocka, D., Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 12. doi:10.1186/1477-7827-2-12
- Sarlós, P., Molnár, a, Kókai, M., Gábor, G., Rátky, J., 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.* 50, 235–245. doi:10.1556/AVet.50.2002.2.13
- Schatten, H., 2004 . *Methods in molecular biology* , volume 253: Germ Cell, Volume 1 : Sperm and Oocyte. humana, 316p.
- Sies, B.H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed* 25, 1058-1071. doi:10.1002/anie.198610581
- Silva, S.V., Soares, A.T., Batista, A.M., Almeida, F.C., Nunes, J.F., Peixoto, C.A., Guerra, M.M.P., 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 137, 37–44. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.12.002
- Singer, S. J., Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* 175, 720-731.
- Spungin B, Margalit I, Breitbart H., 1995. A 70 kDa protein is transferred from the outer acrosomal to the plasma membrane during capacitation. *FEBS Lett.* 357, 98-102.
- Sue CM, Schon EA. Mitochondrial respiratory chain diseases and mutations in nuclear DNA: a promising start? *Brain Path.* 2000;10:442-450.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J, Frenette, G., 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.* 35, 1–10.
- Surai, P., Fujihara, N., Speake, B., Brillard, J., Wishart, G., Sparks, N., 2001. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen -review-. *Asian.Aust. J. Anim. Sci.* 14, 1024-1050.
- Surai,P.,Kostjuk, I,Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., Ionov, I.,Kutz, E., 1998. Effect ofVitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 64 (1–3), 119–132
- Szejtli, J., 1998. Introduction and general overview of cyclodextrinchemistry. *Chemical Review*, 98, 1743–1753.
- T**amayo-Canul, J., Alvarez, M., López-Urueña, E., Nicolas, M., Martinez-Pastor, F., Anel, E., Anel, L., De Paz, P., 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 76–82. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.04.011

- Thomson, L.K., Fleming, S.D., Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A., Clark, A.M., 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum. Reprod.* 24, 2061–2070. doi:10.1093/humrep/dep214
- Traber, M.G., Serbinovat, E.A., Packer, L., 1999. Chapter 4: Biological Activities of tocotrienols and tocopherols. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, 55-99.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., Panfili, E., 1998. Antioxidant Systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 59, 753-758.
- Tucker, M.J., Liebermann, J., 2007. *Vitrification in Assisted Reproduction*. Edit, Informa healthcare UK Ltd. 322 pages.
- Tulsani, D., 2003. *Introduction to mammalian reproduction*. Springer-science. 1ère édition, pp 403.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 269–278. doi:10.1016/S0378-4320(97)00054-7
- Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 146, 1413–1418
- Urano, S., Yano, K., Matsuo, M., 1988. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α -tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 469–475
- Valk, E.E., Hornstra, G., 2000. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 31-42.
- Valle, E.M.M. Del, 2004. Cyclodextrins and their uses: a review 39, 1033–1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., Bordet, R., 2004. Key players in oxidative stress 18, 16-23.
- Vanderzwalmen, P., Zech, N., Greindl, A.J., Ectors, F., Lejeune, B., 2006. Cryopréservation des embryons humains par vitrification. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34,760–769.
- Vanderzwalmen, P., Zech, N., Lejeune, B., Wirtleitner, B., Zech, M., Ectors, F., 2010. Vitrification et utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs: ceci justifie-t-il de préférer la congélation lente? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 38,536-540.
- Vasconcelos Franco, J.S., Chaveiro, A., Góis, A., Moreira da Silva, F., 2013. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 787–793. doi:10.1016/j.jevs.2012.12.012

- Vasconcelos Franco, J.S., Chaveiro, A., Moreira, F., 2014. Journal of Equine Veterinary Science Effect of Freezing Rates and Supplementation of a -Tocopherol in the Freezing Extender in Equine Sperm Cryosurvival. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 992–997. doi:10.1016/j.jevs.2014.05.007
- Vásquez, J.H., Núñez, V.H., Florentini, E. a., Gonzales, J.M., Camargo, L. a., Valdivia, M.E., 2013. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. *Livest. Sci.* 152, 94–99. doi:10.1016/j.livsci.2012.12.011
- Veck, L.L., 2003. Does the developmental stage at freez impact on clinical results postthaw? *Reproduction biomedicine online*, 6. 367-374.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1
- Vishwanath, R., 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theri- ogenology* 59, 571–584.
- Vishwanath, R., Shannon, P., 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62, 23-52.
- Voet, D., Voet, J.G., 2005. *Biochimie*. 2^{ème} édition. De boeck. France, 1600 pages.
- W**atson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 481–492. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3
- White, I. G., 1974. In *Reproduction in Farm Animals* (E. S. E. Hafez, Ed.), pp. 101-122. Lea & Febiger, Philadelphia.
- White, I.G., 1993. Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation : a Review. *Reprod Fertil. Dev.* 5, 639-58
- Y**anagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd.; 189-317.
- Yu, B.P., 1994. Cellular défenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:139-162.
- Z**eng, W.X., Terada, T., 2000. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reprod Fertil Dev.* 12, 223-8. doi: 10.1071/RD00058
- Zeng, W.X., Terada, T., 2001. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *J. Androl.* 22, 111–118. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb02160.x
- Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F. a., Tirmenstein, M. a., Fariss, M.W., 2001. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem. Biol. Interact.* 138, 267–284. doi:10.1016/S0009-2797(01)00278-2

- Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 1311–1324. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.026
- Zin, A., Agarwal, A., 2011. *Sperm Chromatin : Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction.* Springer New York Dordrecht Heidelberg London. DOI 10.1007/978-1-4419-6857-9
- Zini, A., San Gabriel, M., Baazeem, A., 2009. Antioxidants and sperm DNA damage: A clinical perspective. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26, 427–432. doi:10.1007/s10815-009-9343-5

VIII. Annexes

Annexe 1 : Morphométrie de la tête du spermatozoïde du bélier de race *Ouled Djellal*Tableau 1 : Morphométrie de la tête du spermatozoïde du bélier de race *Ouled Djellal* (4 béliers) (Spermbblue)

	Moy.	Dév. Std	Erreur Std	Nombre	Minimum	Maximum
Longueur (μm)	9,033	0,598	0,042	207	1,768	9,842
Largeur (μm)	4,909	0,295	0,021	207	1,551	5,441
Aire (μm^2)	38,507	3,348	0,233	207	2,980	45,188
Perimètre (μm)	20,371	1,359	0,094	207	5,349	22,549
Elongation	0,295	0,024	0,002	207	0,065	0,363
Ellipticité	1,839	0,088	0,006	207	1,140	2,141
Regularité	0,907	0,028	0,002	207	0,723	0,983
Rugosité	1,167	0,086	0,006	207	0,944	1,374
Acrosome (%)	56,170	2,064	0,143	207	49,855	63,655

Figure 1 : Spermatozoïde coloré par *spermbblue* grossissement x60 (avant l'analyse)

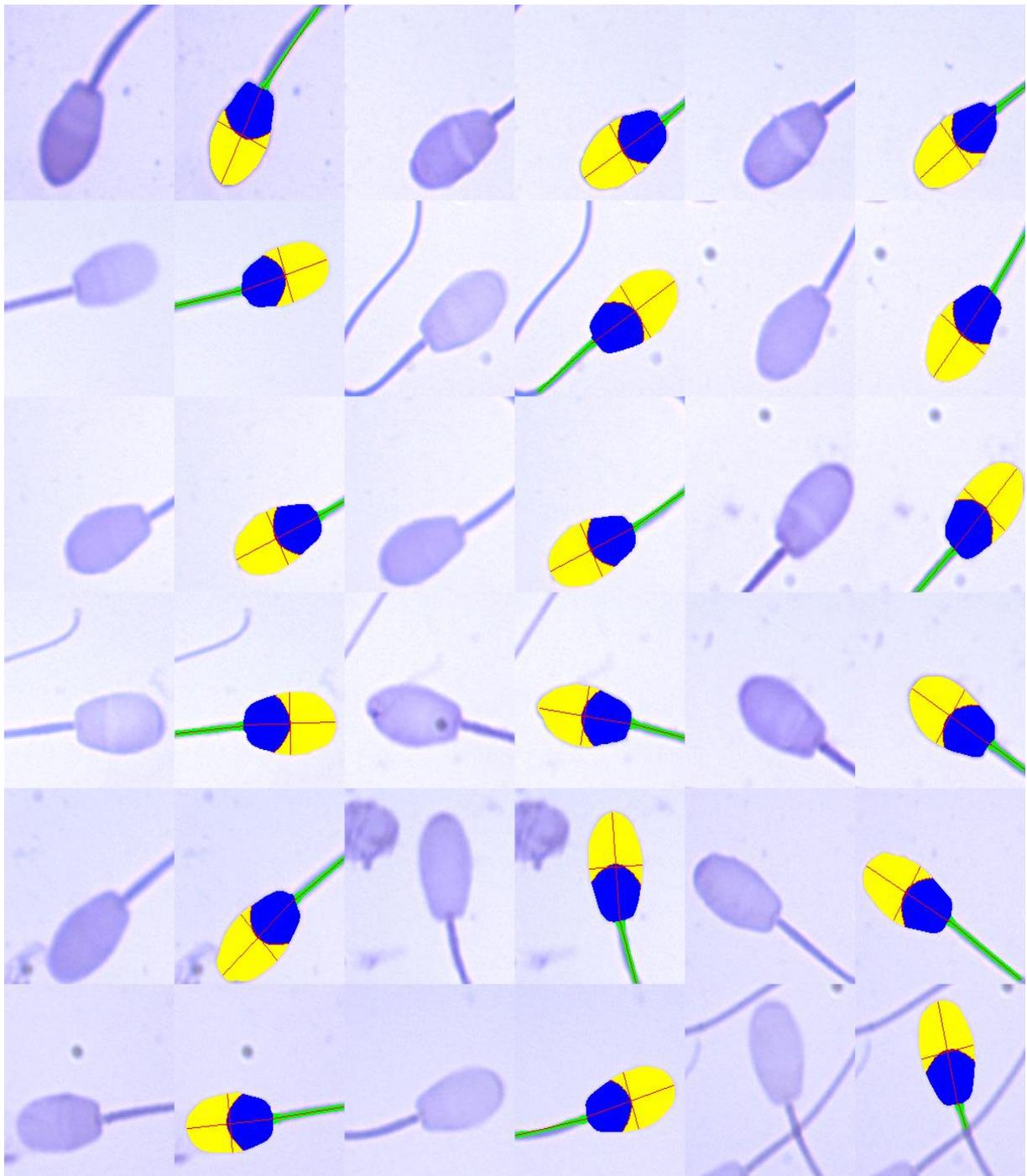
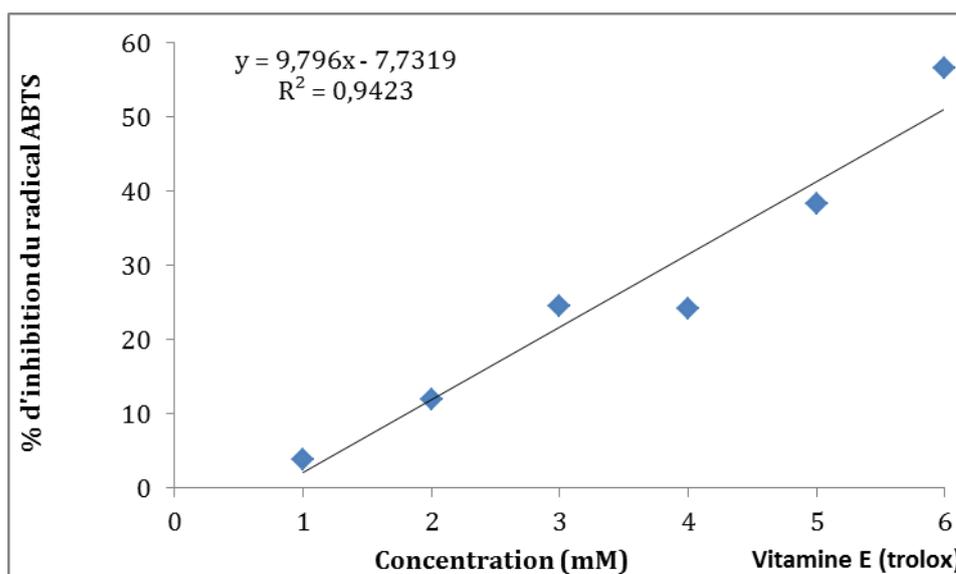


Figure2 : Image des spermatozoïdes colorés par *spermblue* analysés par CASA

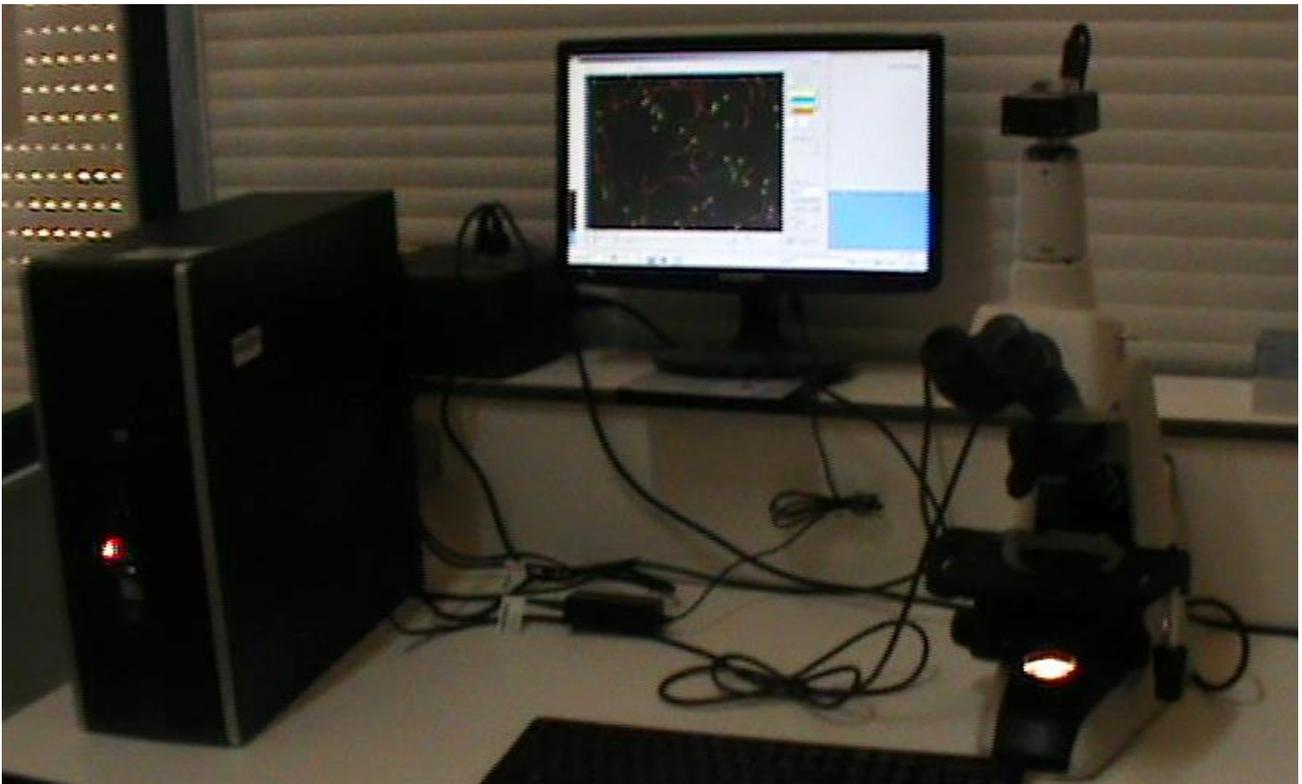


Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour la vitamine E (trolox)

Annexe 3 Lexique des principaux termes utilisés pour la cryoconservation

Congélation:	C'est le changement d'état entre les phases liquides et solides d'un corps, ici l'eau.
Choc au froid	Ensemble des changements (lésions) au niveau de la cellule survient entre la température du corps et celle proche du point de congélation.
Cristallisation :	Processus de changement d'état dans un milieu liquide conduisant à la formation de cristaux, par nucléation puis croissance cristalline.
Cryobiologie :	est la science qui étudie les événements cellulaires qui se produisent à des Températures négatives.
Recristallisation :	Phénomène physique qui se manifeste au réchauffement, et au cours duquel des petits cristaux formés se regroupent pour former des cristaux de plus grosse taille.
Surfusion:	État d'une substance qui demeure en phase liquide alors que sa température est inférieure à sa température de solidification (congélation dans le cas d'une solution aqueuse). Il apparaît lors du refroidissement d'un liquide si, par exemple, sa viscosité est très importante ou le refroidissement très rapide. C'est un état métastable, c'est-à-dire qu'une petite perturbation peut suffire pour déclencher abruptement la cristallisation.
Stress oxydatif :	Un excès de génération des oxydants par le sperme communément appelés « les espèces réactives de l'oxygène, ERO» associé à une défaillance de son système antioxydant
Vitrification:	C'est un processus de congélation caractérisée par l'absence des cristaux de glace, c'est

l'état vitreux. Ceci est résulté d'une vitesse de refroidissement très rapide par l'immersion dans l'azote liquide, d'un milieu dont la viscosité est élevée (une concentration élevée de cryoprotecteurs), ce dernier se solidifie si rapidement que les molécules d'eau n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline, ce qui induit la formation d'un état amorphe ou vitreux intracellulaire.



Annexe 4 : Computer Aided Sperm Analysis (CASA)



Annexe 5 :Sonicateur (SONICS Vibra-Cell®)



Annexe 6 : Centrifugeuse (Sigma)



Annexe 7 : Appareil de congélation programmable CryoMed (Thermo-science)



Annexe 8 : Spectrophotomètre (Thermo-science)



Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen

Karim Benhenia^{a,b,*}, Ali Lamara^a, Sofiane Fatmi^c, Mokrane Iguer-Ouada^d

^a High National Veterinary School, 16270, Street Issad Abbes, Oued Smar, Algiers, Algeria

^b National Center for Biotechnology Research (CRBt), Ali Mendjli Nouvelle Ville UV 03 BP E73, Constantine, Algeria

^c Pharmaceutical Laboratory, Department of Engineering Processes, Abderrahmane-Mira-University, Route de Targua Ouzemmour, 06000 Bejaia, Algeria

^d Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Department of Biological Sciences of the Environment, Faculty of Nature and Life Sciences, Abderrahmane-Mira-University, Route de Targua Ouzemmour, 06000 Bejaia, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form 19 June 2016

Accepted 20 June 2016

Available online 21 June 2016

Keywords:

Cold shock

HOST

Lipid peroxidation

Motility

Oxidative stress

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the potential benefit of vitamin E and cholesterol when preloaded in cyclodextrins, alone or in association to protect ram epididymal sperm during the freezing-thawing process. Epididymal sperm were collected from Twenty four testes; sperm from the two testicles of each ram was pooled and divided in 7 aliquots. The control aliquot was diluted with Fraction A (Tris-citric acid-fructose) without further supplementation. The Six (6) other aliquots were diluted with fractions A containing cyclodextrins (CD), cholesterol (CHL), vitamin E (Vit E), cholesterol-loaded cyclodextrins (CD-CHL), vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-Vit E) and CD-CHL and CD-Vit E (CD-CHL-Vit E), respectively. After incubation at 22 °C for 15 min and addition of Fraction B (Fraction A-egg yolk-glycerol), all aliquots were equilibrated at 4 °C for 2 h and then frozen in liquid nitrogen. A Computer Aided Semen Analysis (CASA) was used to investigate the impact on different motility parameters and the hypo-osmotic swelling test (HOST) to quantify membrane functionality. The Oxidative stress impact on sperm membrane was investigated through lipid peroxidation (LPO) measurement. After thawing, CD-Vit E and CD-CHL treatments improved significantly ($P < 0.05$) the total motility, VAP and linearity (LIN), compared to the control, Vit E and CHL samples. However, the association of CD-CHL and CD-Vit E (CD-CHL-Vit E) exhibited a significant effect on total motility, progressive motility, membrane functionality, sperm velocities (VCL, VSL and VAP) and LIN ($P < 0.05$). Membrane lipid peroxidation was significantly lower in semen pretreated with CD-Vit E than in control and Vit E alone. Among all treatments, the association of CD-CHL and CD-Vit E (CD-CHL-Vit E) showed the highest protection against LPO ($P < 0.05$). The present results revealed that the significant impact was observed when vitamin E, cholesterol and cyclodextrins are all used in the same treatment, thus demonstrating the complementary effect of solubilized vitamin E and cholesterol in protecting concomitantly spermatozoa against cold shock and oxidative stress.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cryopreservation of epididymal sperm remains a useful method to create germplasm bank, particularly concerning dead elite animals and endangered wild species (Ehling et al., 2006; Fickel et al., 2007). Collecting epididymal sperm from slaughtered animal is also an interesting alternative in the experimentation context with an ease access to semen compared to collection from lived animals (Nichi et al., 2007). In the present study, ram epididymal sperm

was used to investigate a new approach to optimize semen freezing by testing concomitantly three molecules: cholesterol, vitamin E and cyclodextrins.

The cryopreserved sperm from most species yield unsatisfactory fertility after artificial insemination compared to fresh sperm (Watson, 2000). Cell cryodamage caused by intracellular ice formation (Mazur, 1977), osmotic shock (Holt and North, 1994), cold shock (Darin-Bennett and White, 1977) and oxidative stress (Agarwal et al., 2014; Aitken et al., 1991) alter normal sperm structure and decrease motility, viability and fertilizing potential (Hammerstedt et al., 1990).

Different strategies have been explored to reduce spermatozoa injuries during the freezing thawing process; in this respect,

* Corresponding author at: High National Veterinary School, Algiers, Algeria.
E-mail addresses: karimdoct@gmail.com, k.benhenia@crbt.dz (K. Benhenia).

cholesterol was particularly reported as a key factor to combat cold shock. Nevertheless, related to cholesterol lipophilicity, only little positive impacts have been observed in cholesterol supplemented extenders (Graham and Foote, 1987), more significant effects are reported when the solubility of this molecule is increased. In fact, cholesterol-loaded cyclodextrins increases significantly cryosurvival of epididymal stallion semen (Pamornsakda et al., 2011) and ejaculated sperm of different animal species, including boar, goat, bull and stallion (Blanch et al., 2012; Konyali et al., 2013; Moore et al., 2005; Purdy and Graham, 2004). In Ram particularly, cyclodextrins-cholesterol complex has been reported to improve motility, viability and membrane integrity (Ahmad et al., 2013; Awad, 2011; Mocé et al., 2010b; Motamedi-Mojdehi et al., 2014). Cyclodextrins are oligosaccharides with an internal hydrophobic cavity which forms inclusion complexes with various hydrophobic guest molecules, including cholesterol and lipophilic vitamins, and an external hydrophilic face increasing their solubility in semen extenders (Dodziuk, 2006; López-Nicolás et al., 2012).

Oxidative stress occurring during the freezing thawing process, is also one of the major factors affecting gametes integrity and functionality (Agarwal et al., 2014; Aitken et al., 1991). Oxidative stress is established as an excess production of reactive oxygen species (ROS) with a failing of sperm antioxidant molecules (Sies, 1986). The main target of ROS is cell membrane causing lipid peroxidation which then alters membrane fluidity and permeability (Jones and Mann, 1977; Aitken, 1999). Vitamin E, a lipophilic molecule present in cell membrane, is considered as both a membrane-stabilizer and a potent antioxidant molecule protecting cell membrane against lipid peroxidation and ROS attacks (Urano et al., 1987, 1988; Niki and Noguchi, 2004). During cryopreservation, vitamin E is not synthesized by spermatozoa once consumed (Zhang et al., 2001). Consequently, in ram and other animal species, semen extenders supplemented with vitamin E reduce significantly lipid peroxidation and improve post-thawed semen quality (Beconi et al., 1993; Hu et al., 2011; Silva et al., 2013). Nevertheless, we hypothesized that the positive impacts could be significantly improved by increasing vitamin E solubility through cyclodextrins complexation. This has been successfully used in different domains including food and cosmetic industries (Koontz et al., 2009; Regiert, 2005). In our knowledge, the impact on cryopreserved sperm had never been reported, whatever the animal species.

Based on the presented background, the aim of this study was to investigate the impact of vitamin E-loaded cyclodextrins on ram epididymal semen after freezing–thawing process. A new approach was also investigated by combining a complementary protection against cold shock and oxidative stress using simultaneously vitamin E-loaded cyclodextrins and cholesterol-loaded cyclodextrins in semen extender.

2. Materiel and methods

2.1. Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma–Aldrich Company groups (St. Louis, MO): Benzylpenicillin (Cat.P3032), Chloroform (Cat.C2432), Cholesterol (Cat.C8503), Citric acid (Cat.C2404), Ethanol (Cat.24103), Fructose (Cat.F3510), Glycerol (Cat.G15523), Hydrochloride acid 37% (Cat.258148), Methanol (Cat.24229), Methyl- β -cyclodextrin (Cat.C4555), Phosphate buffer saline (PBS; Cat.79378), Sodium citrate (Cat.24216), Streptomycin sulfate (Cat.S6501), Thiobarbituric acid (Cat.T5500), Trichloroacetic acid (Cat. 27242), Tris-(hydroxymethylaminomethane) (Cat. 93352), Vitamin E (α -tocopherol; Cat.T3251).

2.2. Preparation of methyl- β -cyclodextrin-vitamin E complex

Methyl- β -cyclodextrin-vitamin E complex (CD-Vit E) was prepared in 1:1 molar ratios (α -tocopherol: methyl- β -cyclodextrin) by co-evaporation method. The methyl- β -cyclodextrin (309.11 mg) and α -tocopherol (100 mg) were dissolved in 50 ml of ethanol. The obtained mixture was maintained under stirring for 24 h at room temperature and shielded from light. The solvent was then evaporated under vacuum by rotary evaporation and the residue was kept in desiccator (Koontz et al., 2009).

2.3. Preparation of methyl- β -cyclodextrin-cholesterol complex

Methyl- β -cyclodextrin-cholesterol complex (CD-CHL) was prepared as described previously by Purdy and Graham (2004). In a glass test tube, 1 g of methyl- β -cyclodextrin was dissolved in 2 ml of methanol. In a second glass test tube, 200 mg of cholesterol was dissolved in 1 ml of chloroform. A 0.45 ml portion of the cholesterol solution was added to the cyclodextrin solution and mixed. The obtained mixture was maintained under stirring for 24 h at room temperature and shielded from light. The solvent was then evaporated under vacuum by rotary evaporation and the residue was kept in a desiccator.

2.4. Post mortem sperm recovery

Twenty four testes were collected from 12 adult rams (Berber breed). Immediately after slaughtering, testes were transported at room temperature (22 °C) to the laboratory. The sperm was collected by retrograde flushing method as reported by Martinez-Pastor et al. (2006) within 1:30 h from testes recovery. Briefly, the epididymis and vas deferens were dissected and separated from the testis and both cauda epididymis and vas deferens were isolated from the whole epididymis. Superficial blood vessels were cut and their contents removed by rinsing and wiping. The sperm was recovered in glass tube by making a cut near the junction of the corpus and the proximal cauda. Then, the vas deferens was catheterized with a blunted 22 G needle and flushed with 1 ml of warmed extender (**Fraction A**) (37 °C) followed by air injection to recover a maximum amount of sperm.

2.5. Semen dilution, freezing and thawing

The freezing extender was composed of two fractions, **Fraction A**: Tris (hydroxymethylaminomethane) 3.028 g + fructose 1.25 g + citric acid 1.70 g + penicillin G sodium 800 i.u./ml + streptomycin sulphate 1 mg/ml in 100 ml of distilled water; **Fraction B**: fraction A + glycerol 10% (v/v) + egg-yolk 30% (v/v). Each one of the 6 treatment solutions (CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E and CD-CHL-Vit E) was prepared by adding corresponding complexes to 10 ml of fraction A. The final concentrations in 1 ml of fraction A were for CD: 9.17 mg, CHL: 0.83 mg, VitE: 1 mg, CD-CHL: 9.17–0.83 mg, CD-Vit E: 3.02–1 mg and CD-CHL-Vit E (CD-CHL (9.17–0.83 mg) + CD-Vit E (3.02–1 mg)), respectively. The control solution consisted of 10 ml of fraction A without any supplementation.

The epididymal sperm concentration was determined by a haemocytometer and a CASA system. Collected samples presenting the following characteristics: volume ≥ 0.8 ml, massal motility ≥ 3 , individual motility $\geq 70\%$ and sperm concentration $\geq 2 \times 10^9$ (Silva et al., 2013) were included in the experimentation. Semen samples collected from each ram (2 testes) were pooled and divided into 7 equal aliquots (0.1 ml/aliquot containing $\approx 200 \times 10^6$ spz). The control was diluted with 0.4 ml of Fraction A (control solution). The remaining aliquots were diluted with 0.4 ml of corresponding treatment solutions (CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E and CD-CHL-Vit

E, respectively). All samples were incubated at 22 °C for 15 min and then 0.5 ml of Fraction B was added to each aliquot to give 1 ml as a final volume for each aliquot. The final concentrations of glycerol and egg-yolk were 5% and 15%, respectively. All aliquots were then cooled to 4 °C for 2 h, packaged into 0.25 straws and frozen horizontally suspending straws 4 cm above the liquid nitrogen for 12 min, and then completely immersed into nitrogen liquid. Two straws of each aliquot were thawed in water bath (37 °C) for 30 s. Motility (CASA assessment), hypo-osmotic swelling test (HOST) and membrane lipid peroxidation were evaluated immediately after thawing.

2.6. CASA assessment

Motility was assessed using a computer-assisted sperm analyzer (CASA) (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain). To facilitate the image capture, the samples were diluted ($10\text{--}20 \times 10^6$ Spermatozoa/ml) by fraction A. 10 μl of each sample was placed in Makler® chamber (10 μm depth; Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previously heated (37 °C). The chamber was placed under phase contrast microscope (Nikon E200®-LED microscope) with a warmed stage (37 °C) and images were captured using a video camera (Caméra Digital Basler A312 fc Germany) at magnification $\times 10$. Four sequences were scanned and at least 200 spermatozoa were analyzed. The standard settings were set at 25 frames/s, 20–90 μm^2 for head area and VCL > 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ to classify a spermatozoa as motile (Tamayo-Canul et al., 2011). Measured kinetic parameters were: total motility (TM%) progressive motility (PM%), linearity (LIN%); straightness (STR%); wobble (WOB%); curvilinear velocity (VCL $\mu\text{m}/\text{s}$); straight linear velocity (VSL $\mu\text{m}/\text{s}$); average path velocity (VAP $\mu\text{m}/\text{s}$); amplitude of lateral movement of the head (ALH μm); beat cross frequency (BCF Hertz). Total motility (TM) was defined as the percentage of spermatozoa with VCL > 10 $\mu\text{m}/\text{s}$, and progressive motility (PM) was defined as the percentage of spermatozoa with VCL > 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ and STR > 80% (Mortimer, 1997).

2.7. Analysis of sperm membrane functionality

Functional integrity of sperm membrane was evaluated using the hypo-osmotic swelling test (HOST). Briefly, 20 μl of sperm was incubated with 200 μl of 100 mOsm hypo-osmotic solution for 60 min. Hypo-osmotic solution was prepared by mixing 9 g of fructose and 4.9 g of sodium citrate diluted in 1 l of distilled water at 37 °C. The spermatozoa possessing a swollen and coiled tail were assumed to have functional membrane. At least 150 spermatozoa were taken into account to calculate the percentage of reacted spermatozoa (Bucak et al., 2009).

2.8. Lipid peroxidation test (LPO)

The content of two straws (500 μl containing 10^8 Spz) was centrifuged immediately after thawing at 1500g for 10 min and the supernatant was eliminated. The sperm pellets were washed three times by resuspending in 1 ml of PBS and recentrifuging. Sperm was then suspended in 500 μl of PBS and sonicated with a probe using Sonics Vibra Cell VCX-750, at 20 kHz for 15 s on ice. The procedure was repeated six times at intervals of 30 s. The sonicated sperm were used to measure LPO.

Lipid peroxidation was measured based on the malondialdehyde (MDA) concentration. The MDA, an end product of lipid peroxidation, was quantified using the thiobarbituric acid (TBA) assay according to the method described by Buege and Aust (1978). One milliliter of TTH solution (trichloroacetic acid 15%, w/v, thiobarbituric acid 0.375%, w/v in hydrochloric acid 0.25N) was added to the sonicated sperm. The mixture was boiled for 60 min and then cooled in an ice bath. After cooling, the suspension was centrifuged at 18,000g for 15 min. The supernatant was then separated, kept in an ice bath, and the absorbance measured at 532 nm at 25 °C. The molar extinction coefficient for MDA is $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results were expressed as nmoles MDA/ 10^8 SPZ.

2.9. Statistical analyses

Calculation of means, SEM, and statistical analysis were performed using Statview 4.02 software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Values of each parameter were expressed as the mean \pm SEM. Variables used for comparison purposes were the used treatments (Control, CD, CHL, Vit E, CD-CHL, CD-Vit E, CD-CHL-Vit E). Differences between treatments were assessed using a one-way ANOVA, followed by posthoc Fisher's test. Values were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Percentages of total motility, progressive motility and membrane functionality

The total motility (TM), progressive motility (PM), and membrane functionality (MF) of all analyzed samples, after the freezing-thawing process, are presented in Fig. 1.

Concerning TM, no significant difference ($P > 0.05$) was observed between the three tested complexes (CD-CHL-Vit E = $71.48 \pm 2.58\%$, CD-CHL = $67.49 \pm 4.79\%$ and CD-Vit E = $64.04 \pm 0.32\%$). Also, no significant difference ($P > 0.05$) was observed between the individual molecules (CD = $61.76 \pm 3.03\%$, Vit E = $53.78 \pm 2.25\%$, CHL = $52.51 \pm 2.58\%$). However, the values were significantly ($P < 0.05$) higher in complexes treated samples compared to the

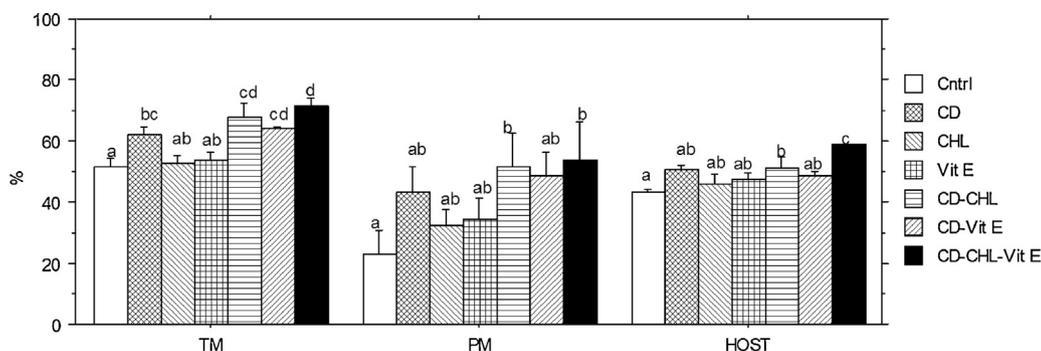


Fig. 1. Percentages (Mean \pm S.E.M.) of total motility (TM), progressively motility (PM) and hypo-osmotic swelling test (HOST) after cryopreservation of epididymal ram semen in the control (Cntrl) group and groups pretreated with cyclodextrins (CD), cholesterol (CHL), vitamin E (Vit E), cholesterol-loaded cyclodextrins (CD-CHL), vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-Vit E) and cholesterol-loaded cyclodextrins with vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-CHL-Vit E). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

individual molecules. The control group showed the lowest total motility values. Concerning the progressive motility (PM), as a semen quality parameter, the differences between treatments were not statistically significant at all, and the only significance was when comparing the complexes to control (CD-CHL-Vit E = $53.56 \pm 2.51\%$, CD-CHL = $51.72 \pm 0.73\%$, CD-Vit E = $48.23 \pm 7.82\%$ and Cntrl = $22.72 \pm 7.86\%$)

Membrane functionality test (Fig. 1), revealed that CD-CHL-Vit E complex ($58.85 \pm 0.02\%$) maintained membrane functionality significantly higher ($P < 0.05$) than all used treatments.

3.2. Kinematic parameters (VCL, VAP, VSL, LIN, ALH, BCF)

The impact of investigated treatments on VCL, VSL, VAP and LIN are presented in Fig. 2. The lowest value of VCL was observed in the control group ($68.97 \pm 2.51 \mu\text{m/s}$). Among all treatments, CD-CHL-Vit E showed the highest value ($110.47 \pm 1.91 \mu\text{m/s}$) followed by CD-CHL ($104.35 \pm 2.17 \mu\text{m/s}$) and CD-Vit E ($88.82 \pm 2.21 \mu\text{m/s}$).

Regarding VAP, results were similar to tendencies expressed by VCL, except that CD-CHL-Vit E complex, showed values ($82.21 \pm 1.75 \mu\text{m/s}$) significantly higher to all other treatments. In addition, VAP in CD-Vit E and CD-CHL complexes was significantly higher ($P < 0.05$) than those observed in Vit E and CHL alone. Concerning VSL, expressing not only the aptitude of the gametes to

present high speeds, but also the aptitude to progress in a straight line manner, the results demonstrated that CD-CHL-Vit E complex expressed the highest values statistically different from all treatments.

LIN reduction in addition to ALH and BCF increase are considered as a group of parameters indicating sperm capacitation (Chamberland et al., 2001; Mortimer and Maxwell, 1999). In the present results, after thawing, the linearity (LIN) of sperm treated with CD-CHL-Vit E ($58.99 \pm 1.22\%$), CD-CHL ($49.94 \pm 1.43\%$) and CD-Vit E ($46.03 \pm 1.49\%$) was significantly augmented ($P < 0.05$) compared to all treatments including the control ($39.83 \pm 1.69\%$). LIN was particularly higher in CD-CHL-VitE complex compared to all treatments. The main results showed also that ALH and BCF values (Fig. 2) were significantly lower in CD-CHL-VitE indicating the absence of premature capacitation. Finally, the marked result drawn from Figs. 1 and 2 was that CD-CHL-Vit E increased all mobility parameters and membrane functionality of thawed sperm compared to all investigated treatments.

3.3. Lipid peroxidation

From the data shown in Fig. 3, the MDA concentration was significantly lower ($P < 0.05$) in sperm pretreated with the CD-CHL-Vit E complex ($0.682 \pm 0/092 \text{ nmole}/10^8\text{spz}$) compared to

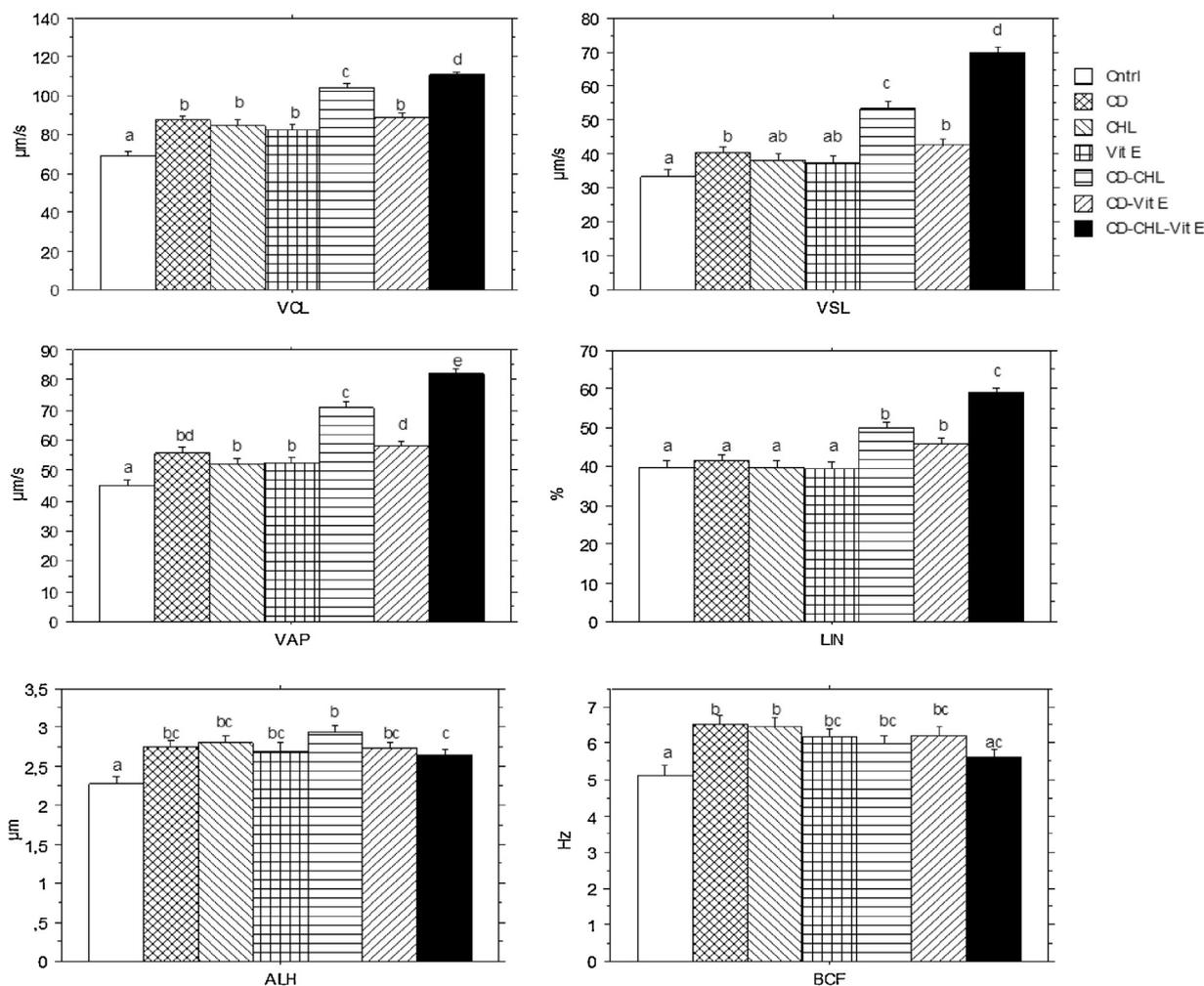


Fig. 2. Mean (\pm S.E.M) of curvilinear velocity (VCL), straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity percentage (LIN%), amplitude of lateral movement of the head (ALH) and beat cross frequency (BCF) after cryopreservation of epididymal ram semen in the control (Cntrl) group and groups pretreated with cyclodextrins (CD), cholesterol (CHL), vitamin E (Vit E), cholesterol-loaded cyclodextrins (CD-CHL), vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-Vit E) and cholesterol-loaded cyclodextrins with vitamin E (CD-CHL-Vit E). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

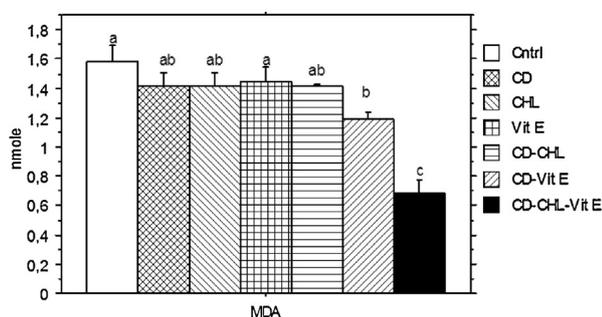


Fig. 3. Mean (\pm S.E.M.) of lipid peroxidation (MDA) after cryopreservation of epididymal ram semen in the control group (Cntrl) and groups pretreated with cyclodextrins (CD), cholesterol (CHL), vitamin E (Vit E), cholesterol-loaded cyclodextrins (CD-CHL), vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-Vit E) and cholesterol-loaded cyclodextrins with vitamin E-loaded cyclodextrins (CD-CHL-Vit E). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

all tested treatment indicating cell membrane protection against lipid peroxidation damages. At lesser degree, CD-Vit E showed the same protective effect with values significantly lower than those observed in the other treatments, especially in Vit E alone ($P < 0.05$). CD, CHL and CD-CHL, when compared to the control, showed a protection effect but not at the same extent as CD-Vit E and CD-CHL-Vit E.

4. Discussion

The objective of the present study was to explore a new alternative in the preservation of epididymal ram semen. The experimental approach consisted on a simultaneous protection against cold shock and oxidative stress using cholesterol and vitamin E. As the two molecules present a limited solubility in semen extenders, their solubility was increased through preloading in cyclodextrins.

It is well established that cholesterol plays a determinant role in maintaining cell membrane structure, fluidity and function over the range of physiological temperatures (Amann and Pickett, 1987; Darin-Bennett and White, 1977). During cryopreservation, sperm membrane is exposed to cold shock damages with significant cholesterol depletion affecting cell membrane integrity, gametes motility and fertility outcomes. The susceptibility of mammalian sperm to cold shock depends on the proportion of cholesterol/phospholipids ratio in cell membrane. In ram, this ratio is lower compared to bull and human sperm, explaining the highest susceptibility of ram sperm membrane to cold shock (Muiño-Blanco et al., 2008).

In the current study, supplementation of freezing extender with cholesterol alone (CHL), improved only VCL, VAP, ALH and BCF values when compared to the control. This effect against cold shock injury has been previously reported describing the same little effect against cold shock injuries (Graham and Foote, 1987). This is in relation to the hydrophobic characteristic of cholesterol limiting its solubility in semen extenders. When cholesterol was preloaded in cyclodextrins (CD-CHL), all velocities and linearity were significantly higher ($p < 0.05$) compared to all used treatments except CD-CHL-Vit E (Fig. 2). The total and progressive motility as well as viability (HOST) were also significantly improved, particularly, when compared to the control (Fig. 1). The present results are in accordance with the previous studies reporting the same positive effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on gametes motility and/or membrane integrity in ram (Morrier et al., 2004), bull (Mocé and Graham, 2006; Purdy and Graham, 2004) and stallion (Moore et al., 2005; Pamornsakda et al., 2011).

Cyclodextrins act by increasing the transfer of cholesterol into spermatozoa membrane (Moore et al., 2005; Pamornsakda et al.,

2011) and consequently enhance the cell permeability to cryoprotectants such as glycerol (Glazar et al., 2009; Mocé et al., 2010a). In this respect, it is shown recently that treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins reduced the level of glycerol required for cryopreservation from 5% to 3% (Awad, 2011; Motamedi-Mojdehi et al., 2014).

In the present study, the total motility and the sperm velocities in samples treated with cyclodextrins alone, prior to cryopreservation, were significantly higher than those of the control. Zeng and Terada (2000, 2001) and Madison et al. (2013) reported the same beneficial effects as those of the current results, suggesting that further depletion of cholesterol by cyclodextrins, enhances post-thawed sperm motility and velocities. The mechanism by which cyclodextrins protect sperm against cryoinjury is unclear. However, it is shown that depleting membrane cholesterol enhances membrane fluidity and permeability (Cooper, 1986; Grunze and Deutick, 1974) and then possibly decreases intracellular lethal ice formation. Conversely, our results are in contrast to the report by Mocé et al. (2010b) in ram, they showed that after thawing, the cyclodextrins decrease spermatozoa motility by making the sperm more sensitive to cold shock damage. The effect of CD on membrane cholesterol depletion is dependent to the incubation time with cyclodextrins and the concentration of CD (Iborra et al., 2000; Nagao et al., 2010). In our study, the short time of incubation of sperm with CD (15 min) and the possibility of CD to bind with cholesterol of egg yolk may limit the sensitivity of sperm to cold shock by restricting membrane cholesterol depletion or by facilitating the interaction of egg yolk cholesterol with sperm membrane. Nevertheless, further studies are required to elucidate the specific biological mechanisms through which prefreezing treatment with CD enhances sperm motility after thawing.

Sperm membrane in ram is the first target of damages caused by oxidative stress due to its high proportion on unsaturated fatty acids. Thus, lipid peroxidation is the major injury caused by ROS in sperm membrane but also in other cell components such as acrosome and cell genome (Peris et al., 2007). Vitamin E in cell membrane is the first antioxidant molecule combating the oxidative stress (Peris et al., 2007; Zhang et al., 2001) by interrupting the chain reaction of LPO and scavenging the ROS (Niki and Noguchi, 2004). Moreover, Vitamin E has been proposed to act as a structural component which stabilizes cell membranes containing polyunsaturated lipids (Diplock and Lucy, 1973; Fukuzawa et al., 1977). This is due to its localization in the lipid core of membrane and its binding with phospholipids (Urano et al., 1987, 1988). Nevertheless, once vitamin E is exhausted, the cell becomes vulnerable to the attacks of ROS, especially during the freezing-thawing process (Peris et al., 2007; Zhang et al., 2001).

In the present work, the supplementation of sperm extender by vitamin E alone (Vit E) had increased significantly VCL, VAP, ALH and BCF when compared to the control. This is in accordance with the previous reports where vitamin E was found to increase sperm motility and membrane integrity (Breininger et al., 2005; Hsu et al., 1998; Silva et al., 2013; Vasconcelos Franco et al., 2014, 2013). However, such positive effects are not systematically observed in ram sperm (Da Silva Maia et al., 2009; Sarlós et al., 2002; Upreti et al., 1997). These divergent results could be related to the solubility and to the concentrations of vitamin E used in these experimentations.

Over the last years, several works have been carried out to improve the antioxidant efficiency of animal semen extenders. These studies were based, in part, on the substitution of the vitamin E by herbal antioxidants (Motlagh et al., 2014), antioxidant enzymes such as glutathione (Salmani et al., 2013) and on combination between vitamin E and other antioxidant molecules (Hsu et al., 1998; Krishnamoorthy et al., 2007; Da Silva Maia et al., 2009). However, in our knowledge, no study has investigated the interest of vitamin E-loaded cyclodextrins in semen extenders supplement-

tation. As vitamin E shares the same hydrophobic characteristic with cholesterol, it had been hypothesized that preloading vitamin E in cyclodextrins could increase its solubility with a positive impact on cell membrane. In fact, the obtained results showed that CD-Vit E decreased LPO of sperm membrane and enhanced motility parameters (total motility, CASA parameters) when compared to control and Vitamin E alone. These results suggest that cyclodextrins enhanced the beneficial effect of Vitamin E on sperm probably by inserting vitamin E as it does for cholesterol in sperm membrane. However, further studies are required to determine if preloading vitamin E in cyclodextrins enhances vitamin E level in cell membrane.

The most relevant results had been obtained when using simultaneously vitamin E and cholesterol, both preloaded in cyclodextrins (CD-CHL-Vit E). This treatment had improved significantly the membrane functionality (HOST) and all CASA motility parameters compared to all other tested treatments. When compared to the control, CD-CHL-Vit E complex enhanced significantly the total (71% vs 51%) the progressive motility (53% vs 22%), membrane functionality (58% vs 43%) and all CASA motility parameters. In addition, CD-CHL-Vit E was the most treatment that decreased significantly membrane lipid peroxidation. This is probably due to the effects of both Vitamin E, as antioxidant and membrane stabilizer (Urano et al., 1987, 1988) and cholesterol as a hindrance to ROS propagation (López-Revuelta et al., 2007) and protector against peroxide radical (Naseer et al., 2015).

During cryopreservation, membrane damage, particularly due to the depletion of cholesterol and oxidative stress, causes premature capacitation and acrosome reaction which may compromise fertility (GaArtiga et al., 1993; Pérez et al., 1996). The capacitation status is characterized by high VCL, ALH and BCF with low VSL and LIN (Chamberland et al., 2001; Mortimer and Maxwell, 1999; Versteegen et al., 2002). In the current results, such observations had not been found suggesting that the tested complexes, particularly CD-CHL-Vit E, protected the gametes against premature capacitation. In our study, lipid peroxidation was negatively correlated ($P > 0.05$) with VCL, VSL, LIN and membrane functionality. This result showed that protection against LPO could explain in part the beneficial effects of complexes on sperm motility, membrane functionality and preventing premature capacitation.

In conclusion, the present results demonstrated that increasing vitamin E solubility with cyclodextrins improved significantly both post-thawed sperm parameters and antioxidant status. The most relevant results were observed when the solubility of both vitamin E and cholesterol was improved and when a complementary protection was provided, cholesterol to reinforce the cell membrane and vitamin E to combat ROS. This new approach opens interesting perspectives in the semen cryopreservation, particularly in species with low cholesterol: phospholipids ratio.

Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

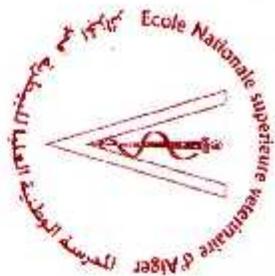
Acknowledgment

The authors thank Salah Adrar, responsible of slaughterhouse in Bejaia (Algeria), for providing the testes of slaughter rams.

References

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S., 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Mens Health* 32, 1–17, <http://dx.doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>.
- Ahmad, E., Aksoy, M., Serin, İ., Küçük, N., Ceylan, A., Uçan, U., 2013. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction *in vitro*. *Small Rumin. Res.* 115, 77–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.09.006>.
- Aitken, R.J., Irvine, D.S., Wu, F.C., 1991. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164, 542–551, [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7292\(92\)90986-S](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7292(92)90986-S).
- Aitken, R.J., 1999. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J. Reprod. Fert.* 115, 1–7, <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1150001>.
- Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173, [http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
- Awad, M.M., 2011. Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Rumin. Res.* 100, 164–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.011>.
- Beconi, M.T., Mora, C.R.F.N.G., Affranchino, M.A., 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40, 841–851, [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90219-U](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(93)90219-U).
- Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., Mócé, E., 2012. Response of boar sperm to the treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 959–964, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01999.x>.
- Breining, E., Beorlegui, N.B., O'Flaherty, C.M., Beconi, M.T., 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63, 2126–2135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.016>.
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariözkan, S., Ulutaş, P.A., 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rumin. Res.* 81, 13–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.10.003>.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Chamberland, A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M.A., Sullivan, R., Bailey, J.L., 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55, 823–835, [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00446-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00446-0).
- Cooper, T.G., 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Da Silva Maia, M., Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Sicherle, C.C., de Sousa, D.B., Rodello, L., 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin. Res.* 85, 85–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.07.001>.
- Darin-Bennett, A., White, I.G., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466–470, [http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6).
- Diplock, A.T., Lucy, J.A., 1973. The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: a hypothesis. *FEBS Lett.* 29, 205–210, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80020-1](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(73)80020-1).
- Dodziuk, H., 2006. *Cyclodextrins and Their Complexes: chemistry, Analytical Methods, Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., Niemann, H., 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 66, 2160–2164, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.003>.
- Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 81–89, <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-007-0089-z>.
- Fukuzawa, K., Hayashi, K., Suzuki, A., 1977. Effects of α -tocopherol analogs on lysosomal membranes and fatty acid monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 18, 39–48.
- GaArtiga, C., Gutierrez, A., Garde, J., Pintado, B., Vazquez, I., 1993. Physiological changes of fresh or frozen ram spermatozoa during capacitation *IN VITRO*. *Theriogenology* 1993, [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90037-6](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(93)90037-6).
- Glazar, A.I., Mullen, S.F., Liu, J., Benson, J.D., Critser, J.K., Squires, E.L., Graham, J.K., 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59, 201–206, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.009>.
- Graham, J.K., Foote, R.H., 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24, 42–52, [http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90005-8](http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240(87)90005-8).
- Grunze, M., Deutick, B., 1974. Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 125–130, [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(74\)90300-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(74)90300-9).
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73–88, <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>.
- Holt, W.V., North, R.D., 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, 414–424, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod51.3.414>.
- Hsu, P.C., Liu, M.Y., Hsu, C.C., Chen, L.Y., Guo, Y.L., 1998. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology* 128, 169–179, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00068-7).
- Hu, J.-H., Zhao, X.-L., Tian, W.-Q., Zan, L.-S., Li, Q.-W., 2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen

- preservation. *Animal* 5, 107–112, <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110001679>.
- Iborra, a., Companyó, M., Martínez, P., Morros, A., 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 62, 378–383, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod62.2.378>.
- Jones, R., Mann, T., 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fertil.* 50, 261–268, <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0500261>.
- Konyali, C., Tomás, C., Blanch, E., Gómez, E.a., Graham, J.K., Mocé, E., 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* 67, 124–131, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>.
- Koontz, J.L., Marcy, J.E., O'Keefe, S.F., Duncan, S.E., 2009. Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants alpha-tocopherol and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1162–1171, <http://dx.doi.org/10.1021/jf802823q>.
- Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, a., Vignesh, R.C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2007. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod. Toxicol.* 23, 239–245, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.12.004>.
- López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F., 2012. Cyclodextrins and antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 251–276, <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.582544>.
- López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., García-Montero, A.C., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M., 2007. Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1106–1118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.010>.
- Madison, R.J., Evans, L.E., Youngs, C.R., 2013. The effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 272–278, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.07.021>.
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraes, P., De Paz, P., Anel, L., 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471–485, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenol.2005.05.045>.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14, 251–272, [http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4).
- Mocé, E., Graham, J.K., 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84, 826–833.
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 57–66, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x>.
- Mocé, E., Purdy, P.H., Graham, J.K., 2010b. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 236–247, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.013>.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241–249, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.004>.
- Morrier, A., Thériault, M., Castonguay, F., Bailey, J., 2004. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. In: *Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, July 31–August 4, 2004*, p. 239 (Abstract 636).
- Mortimer, S.T., Maxwell, W.M., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 25–30, <http://dx.doi.org/10.1071/RD99019>.
- Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 3, 403–439, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>.
- Motamedi-Mojdehi, R., Roostaei-Ali Mehr, M., Rajabi-Toustani, R., 2014. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 65–70, <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12225>.
- Motlagh, M.K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., Zeinoaldini, S., 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology* 69, 217–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>.
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrían-Pérez, J.A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 18–31, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>.
- Nagao, Y., Ohta, Y., Murakami, H., Kato, Y., 2010. The effects of methyl- β -cyclodextrin on *in vitro* fertilization and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote* 18, 323–330, <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199409990396>.
- Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, I., Ceylan, A., Boyacıoğlu, M., Kum, C., 2015. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology* 71, 18–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.06.007>.
- Nichi, M., Goovaerts, I.G.F., Cortada, C.N.M., Barnabe, V.H., De Clercq, J.B.P., Bols, P.E.J., 2007. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 67, 334–340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenol.2006.08.002>.
- Niki, E., Noguchi, N., 2004. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Res.* 37, 45–51, <http://dx.doi.org/10.1021/ar030069m>.
- Pérez, L.J., Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D., Baldassarre, H., 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131–141, [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00148-3](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(96)00148-3).
- Pamornsakda, T., Pojprasath, T., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., 2011. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology* 63, 90–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.05.006>.
- Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., Bailey, J.L., 2007. Impact of cryo-preservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 878–892, <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20686>.
- Purdy, P.H., Graham, J.K., 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.12.001>.
- Regiert, M., 2005. Light-stable vitamin E by inclusion in gamma cyclodextrin. *SOEFW Int. J. Appl. Sci.* 131, 10–18.
- Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A.Z., Zhandi, M., 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin. Res.* 112, 123–127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.015>.
- Sarlós, P., Molnár, a, Kókai, M., Gábor, G., Rátty, J., 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.* 50, 235–245, <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.50.2002.2.13>.
- Sies, B.H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 25, 1058–1071, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.198610581>.
- Silva, S.V., Soares, A.T., Batista, A.M., Almeida, F.C., Nunes, J.F., Peixoto, C.A., Guerra, M.M.P., 2013. Vitamin E (trolox) addition to tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoan structure and kinematics after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 137, 37–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.002>.
- Tamayo-Canul, J., Alvarez, M., López-Urueña, E., Nicolas, M., Martínez-Pastor, F., Anel, E., Anel, L., De Paz, P., 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymides. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 76–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.011>.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 269–278, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00054-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00054-7).
- Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E: interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 1413–1418.
- Urano, S., Yano, K., Matsuo, M., 1988. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α -tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 469–475.
- Vasconcelos Franco, J.S., Chaveiro, A., Góis, A., Moreira da Silva, F., 2013. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 787–793, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.12.012>.
- Vasconcelos Franco, J.S., Chaveiro, A., Moreira, F., 2014. Effect of freezing rates and supplementation of α -tocopherol in the freezing extender in equine sperm cryosurvival. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 992–997, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.05.007>.
- Verstegen, J., Guier-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149–179, [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 481–492, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- Zeng, W.X., Terada, T., 2000. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 223–228, <http://dx.doi.org/10.1071/RD00058>.
- Zeng, W.X., Terada, T., 2001. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *J. Androl.* 22, 111–118, <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02160.x>.
- Zhang, J.G., Nicholls-Grzemski, F. a., Tirmenstein, M. a., Fariss, M.W., 2001. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem. Biol. Interact.* 138, 267–284, [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00278-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00278-2).



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Attestation de Communication

Mr. Benhenia K.

a participé aux **11^{èmes} Journées Internationales des Sciences Vétérinaires**,
ayant pour thème: « **Ressources Génétique Animales en Algérie**»,
organisées à l'ENSV d'Alger, les 30 novembre & 01 décembre 2013,
par une **communication affichée**, intitulée :

« La vitamine E additionnée au milieu de congélation de base (Tris) améliore
les paramètres de mobilité de la semence épидидymaire du bélier après décongélation »

Co-auteurs: Fatmi S., Iguer-Ouada M., Idres T., Boudjenah A., **Fatmi S. & Lamara A.**

Alger. Le 01 décembre 2013.



مدير المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

الأستاذ: حمدي باشا يوسف