

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 conservation du sperme de lapin : congélation et réfrigération

Présentée par : Dr. NABI Ibrahim

Les membres du jury :

Mme TEMIM Soreya	Pr	Présidente	ENSV
Mr GHOZLANE Faycel	Pr	Examineur	INSA
Mr LAMARA Ali	MCA	Examineur	ENSV
Mme BOUMAHDHI Zoubida	MCA	Examinatrice	Univ de Blida 2
Mr. IGUER-OUADA Mokrane	Pr	Encadreur	Univ de Bejaia
Mme ZERROUKI Nacéra	Pr	Co-Encadreur	Univ de Tizi-Ouzou

Année universitaire : 2018./2019

Tout d'abord, **louange à ALLAH**, seigneur de l'univers ; comme il se doit, pour la majesté de ta force et l'immensité de ton pouvoir.

Nous exprimons notre reconnaissance totale à **Allah** de nous avoir donné les forces, la volonté et le courage pour accomplir ce travail modeste et de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

J'adresse le grand remerciement à mon encadreur, **Docteur IGUER-OUADA Mokrane**, Pr à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, non seulement car il a aimablement instauré le concept, guidé les applications expérimentales et animé le débat scientifique de cette thèse.

Mais plutôt, pour son dévouement et sa loyauté pour une cause noble ; celle de faire éduquer les esprits de ses étudiants par les bonne mœurs et cultiver leurs cerveaux par des essences de réflexion scientifique.

Il essaye de toutes forces au point d'asthénie -sans demander un sceau de retour- de façonner des statures d'hommes... libres dans leurs pensées, responsables de leurs décisions, courageux dans leurs aventures et fiers de leurs accomplissements.

Il transmettait -par son quotidien- ça croyance ; « que la brillance des titres scientifiques sans être accompagnée de décences morales étouffera l'apprentissage scientifique et constituera une pire ignorance ».

Je ne possède aucune manières ni moyens de vous rembourser -cher Mr- ; Or je me contente de mes prières... que dieu vous placera parmi les plus haut placés parmi les plus rapprochés.

J'adresse aussi mes remerciements à Mme ZERROUKI Nacera, ma Co-encadreur pour le bon usage, l'initiation au monde lapin et au chagrin qu'elle porte à la filière cunicole.

*Je tiens également à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance : Pr **TEMMIM S** de l'ENSV , Pr **GHOZLANE F** de l'INSA ; Dr **LAMARA A** de l'ENSV et Dr **BOUMAHDI Z** de l'université de Blida.*

Aussi, je ne peux oublier à remercier profondément toute personne qui a contribué à l'instauration de cette étude. Sans leur travail, orientations, coups de pouce et enthousiasme, cet achèvement n'aura pas vu le jour.

*En particulier, mon amis et mon frère **sofiane FATMI** 'le pilier' de toute formulation de cyclodextrines, quelle esprit positif que tu a, tu en charge le travail comme ton CLC. Aussi, le 'barbeau' de l'équipe, **Boubeker**, un vrai homme. **Lakhhal TOUAZI** notre bienveillant et bien aimé.*

*Je remercie solennellement l'équipe de l'institut vétérinaire de l'université de Blida pour leur accueil durant l'année expérimentale de 2017, je remercie son directeur Pr. **LAFRI** et l'équipe du laboratoire du LBRA, Pr. **KAIDI**, Dr. **BELALA** et Dr. **DJALLAL**. Je reflète ici aussi ma reconnaissance à Mme à **BOUMAHDI Z** pour son soutien et aide non estimable et à l'équipe de la station d'animalerie de l'université de blida, en particulier Dr. **TARZALI** et Dr. **Yahia**.*

Mes reconnaissances à mes amis BENHNIA Karim, ACHEK Rachid, AOUANE Nedjma et le plus rapproché à « moi » ALOUANE Ismail.

Je dédie ma présente thèse

- à l'ensemble des membres de ma famille, qui voient en moi leurs succès, ressentis à différentes arômes.

- a mon frangin le défunt Mohammed, que je l'aime beaucoup, que dieu m'offre sa rencontre au paradis.

- aux étudiants...

Résumé :

Le procédé de réfrigération et de congélation altère la qualité du sperme du lapin et compromet son utilisation à grande échelle. L'optimisation des milieux de conservation (dilueurs) qui peuvent protéger efficacement les spermatozoïdes reste ainsi d'une importance capitale. Ainsi, l'objectif de la présente thèse est d'explorer les effets du cholestérol et de la vitamine, les deux solubilisés dans les cyclodextrine, **Cholesterol-Laoded-Cyclodextrins (CLC)**, **α -Tocophérol-Laoded-Cyclodextrins (TLC)**, respectivement, et la **Vitamine C (VitC)**, et ceci aussi bien dans la conservation par réfrigération à 4°C que dans la congélation à -196°C dans l'azote liquide. Le sperme a été traité à 4°C avec 2.5mg **CLC**, 0.625mg **TLC** et 0.125mg **VitC** et par différentes combinaisons (**CLC+TLC**, **CLC+VitC**, **TLC+VitC** et **CLC+TLC+VitC**)/80-100million SPZ. Le sperme congelé a été traité avec 0.35mg de β -cyclodextrins (**Cdx**), 2mg de Cholestérol (**Chl**), 0.06mg d' α -tocophérol (**Toc**), 5.4mg **CLC**, 0.46mg **TLC** et 2.7+0.23mg **CLC+TLC**/80-100million SPZ. Nous avons ensuite analysé la mobilité par un Système CASA (Computer assisted semen analysis) et nous avons mesuré le statut oxydatif du sperme réfrigéré par mesure de la peroxydation lipidique (TBARS), le pouvoir réducteur du radical ABTS et le pouvoir scavenger à l'égard du H₂O₂. Les résultats ont montré que le CLC et TLC améliorent de manière significative (p <0,05) les paramètres de motilité après 24h de conservation à 4°C et en post-décongélation. La VCL et la VAP du **TLC** (**55.2±21.1**, **31.2±13.3** $\mu\text{m/s}$) sont significativement plus élevées après 24h à 4°C en comparaison avec le contrôle (VCL **48.5±19.6**, VAP **26.4±12.3** $\mu\text{m/s}$) et la VAP de 48h (**25.5±10.5** $\mu\text{m/s}$) est également supérieure à celle du contrôle (**20.9±10** $\mu\text{m/s}$). Pour la congélation (-196°C), le **TLC** augmente significativement la VCL et la VAP comparativement au contrôle (**31.1±0.9**, **13.5±0.5** $\mu\text{m/s}$ vs **23.2±0.8**, **10.1±0.5** $\mu\text{m/s}$). En ce qui concerne le statut oxydative du sperme réfrigéré, aucune différence significative n'a été notée pour l'inhibition de l'ABTS et du H₂O₂, alors que CLC a enregistré au test TBARS (**1.7±0.7** nmol/ml) des valeurs significativement plus élevées que le contrôle (**1.12±0.3** nmol/ml), VitC (**0.9±0.2** nmol/ml) et TLC. En conclusion, nous pouvons retenir que les molécules actives complexées aux cyclodextrines ont amélioré la qualité du sperme aussi bien en réfrigération qu'en congélation, en augmentant essentiellement leur solubilité.

Abstract:

The process of refrigeration and freezing deteriorate the quality of rabbit semen and limit its industrial usage. The optimization of extenders which can protect the spermatozoa is of capital importance. In this context, The objective of the present thesis was conducted to explore the effects of **Cholesterol-Laoded-Cyclodextrins (CLC)**, **α -Tocophérol-Laoded-Cyclodextrins (TLC)** and **Vitamine C (VitC)** on the quality of rabbit semen preserved at 4°C for 48h or cryopreserved at -196°C in liquid nitrogen. Rabbit semen was treated at 4°C by 2.5mg CLC, 0.625mg TLC et 0.125mg VitC and by different respective duals (CLC+TLC, CLC+VitC, TLC+VitC et CLC+TLC+VitC) for 80-100 million spz/ml. the cryopreserved rabbit semen was treated while equilibration by 0.35mg de β -cyclodextrins (Cdx), 2mg de Cholestérol (Chl), 0.06mg d' α -tocophérol (Toc), 5.4mg CLC, 0.46mg TLC et 2.7+0.23mg CLC+TLC/80-100million SPZ/ml. We analyzed motility by Computer assisted semen analysis (CASA); and we analyzed oxidative status of refrigerated semen by measuring lipid peroxidation (TBARS), reduction capacity of ABTS radical and scavenger capacity towards H₂O₂. The results showed that both CLC and TLC improved significantly ($p < 0.05$) the kinematic parameters after 24h of 4°C conservation and after post-thaw. For example, VCL and VAP of TLC (55.2±21.1, 31.2±13.3 $\mu\text{m/s}$) were significantly higher after 24h at 4°C comparing with control (VCL 48.5±19.6, VAP 26.4±12.3 $\mu\text{m/s}$); while VAP of 48h (25.5±10.5 $\mu\text{m/s}$) was higher than control (20.9±10 $\mu\text{m/s}$). In cryopreservation, TLC significantly raise up post-thaw VCL and VAP (31.1±0.9, 13.5±0.5 $\mu\text{m/s}$ vs 23.2±0.8, 10.1±0.5 $\mu\text{m/s}$). which concern oxidative status of refrigerated semen, no significant difference was noted concerning ABTS or H₂O₂; however CLC showed TBARS (1.7±0.7 nmol/ml) significantly higher compared to control (1.12±0.3 nmol/ml), VitC (0.9±0.2 nmol/ml) et TLC. for 48h, TLC (1.6±0.7 nmol/ml) and CLC-TLC-VitC (1.56±0.13 nmol/ml) showed higher MDA concentrations but without significant effect. In conclusion, we observed that cyclodextrins ameliorate the quality of preserved semen either in refrigeration or cryopreservation; it would be attributed for higher solubility of cholesterol and α -tocopherol for trigger actif molecules against membrane deterioration caused by low temperature chock.

ملخص

إن عمليتا التبريد و التجميد تتلف من جودة مني الأرنب و تقيض من استعمالاته الصناعية , مما يشيد بتحسين المواد التي تحمي الحيوانات المنوية و يكسيها أهمية بالغة. لتحقيق هذا الهدف, انقادت الأعمال المنوطة بهذه الرسالة لاستكشاف أثر الكولسترول المحمل في السيكلودكسترين, ألفا-توكوفيرول المحمل في السيكلودكسترين, و فيتامين س على جودة مني الأرنب بعد حفظه في درجة 4° لمدة 48 ساعة أو بعد تجميده في النيتروجين السائل على درجة 196°-. عولج مني الارنب المبرد (4°) ب 2.5 مغ (CLC), 0.625 مغ (TLC) و 0.125 مغ (VitC) و كذا بمختلف ثنائيات (CLC+TLC, CLC+VitC, TLC+VitC et CLC+TLC+VitC) لكل 80-100 مليون حوين/مل. عولج مني الارنب المجمد (196°-) ب: 0.35 مع سيكلودكسترين (Cdx), 2 مع كولستيرول (Chl) , 0.06 مع توكوفيرول (Toc) , 5,4 مغ CLC, 0,46 مغ TLC, و 0,23+2,7 مغ CLC+TLC لكل 80-100 مليون حوين/مل. قمنا بتقييم حركية الحيوانات المنوية بنظام تقييم مساعد مقيد بالكمبيوتر (CASA) و كذا قيمنا مستوى الأوكسدة للمني المبرد بحساب درجة تأكسد الدهون (TBARS), قدرة إرجاع جذر ABTS, و قدرة ثبط ثنائي أكسيد الأوكسجين H₂O₂. بينت نتائج بحثنا أن CLC و TLC قد حسنا و بشكل بليغ مختلف بيانات الحركة بعد 24 ساعة من الحفظ البارد و كذا إثر الإذابة بعد التجميد. على سبيل المثال لا الحصر, تبين أن مؤشرات VCL و VAP ل TLC (31.2±13.3, 55.2±21.1 µm/s) ارتفعت بشكل بليغ بعد 24 ساعة من الحفظ في درجة 4° مقارنة بالشاهد (VCL 48.5±19.6, VAP 26.4±12.3 µm/s), في حين أشار مؤشر VAP بعد 48 ساعة (25.5±10.5 µm/s) بمعدل أعلى مقارنة بالشاهد (20.9±10 µm/s). فيما يخص التجميد, أشار TLC إلى مؤشرات أعلى لكل من VCL, VAP بعد الإذابة (31.1±0.9, 13.5±0.5 µm/s vs 23.2±0.8, 10.1±0.5 µm/s). في ما يخص مستوى الأوكسدة للمني المبرد 4°, لم تحصل على أي أثر بليغ بشأن H₂O₂, ABTS, لكنه يجدر بالذكر أن CLC اتسم بمستوى TBARS (1.7±0.7 nmol/ml) أعلى بشكل بليغ مقارنة بالشاهد (1.12±0.3 nmol/ml), فيتامين س (0.9±0.2 nmol/ml) و TLC, و أن TLC بعد 48 ساعة من الحفظ (1.6±0.7 nmol/ml) و (1.56±0.13 nmol/ml) CLC-TLC-VitC يشيرون بمعدلات أعلى بدون أثر بليغ. في الختام, تبين لنا أن السيكلودكسترين المركب قد حسن من جودة مني المحفوظ في جو بارد أو مجمد, قد يرجع هذا الأثر إلى الإذابة الناجمة للكولسترول و الألفا توكوفيرول لمنح هذه الجزئات الفعالة ضد التلف الناجم عن صدمات درجات الحرارة الدنيا.

Liste des abréviations

AAPH : 2,2,0 Azobis(2-Amidino-Propane)

ABTS : 2,2 Azino bis 3-Ethyl benzo thiazoline -6- Sulpho,iqne

AGPI : Acide Gras Poly Insaturés

ALH : Amplitude of Lateral Head

AMVN : 2,2'-Azobis-2,4-di-Methyl-Valero-Nitrile

BCF : Beat Cross Frequency

BSA : Bovine Serum Albumine

CASA : Computer Assisted Sperm Analyser

CAT : Catalase

CDx : les Cyclodextrines

Chl : Cholesterol

CLC: Cholesterol Loaded Cyclodextrine

Cntr : Control

Conc : Concentration

CPA : CryoProtective Agent

D.S. : Degré de Substitution

DMSO : Di Methyl Sulfo Oxyde

DMPO : 5-5 dimethyl Pyrroline N- Oxide

GSH : Gluthathione

GSH-Px : Gluthathione-Peroxydase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HO[•] : Radical Hydroxyle

HOS : Hypo-Osmotic-Swelling test

HP : Hydroxypropyle

Hz : Hertz

IA : Insémination artificielle

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IP: Iodide Propodoum

IVF : Invitro –Fecondation

LBRA : Laboratoire des Biotechnologie de Reproduction Animale

LIN : Linearity

L• : Radical Lipidique

LOO• : Radical peroxyde

LOOH : Hydroxyperoxyde

LNV : Liquide Nitrogen Vopor

LPC : lysophosphatidylcholine

MDA : MalanDiAldehyde

Meb- : carboxymethyl

Mi : Motilité individuelle

Mm : Motilité massale

MOT : Motilité

MP : Membrane plasmique

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phospahate

NMR : Résonance Magnétique Nucléaire

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH : Hydroxyles

ORAC-EPR : Oxyden Radical Absorbance Capacity by Electron Paramagnetic resonance

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PC : phosphatidyl-choline

PE : phosphatidyl-ethanolamine

PI : phosphatidyl-inositole

PL : Phospholipides

PLA₂ : Phospholipase A2
PMOT : Motilité Progressives
PS : phosphatidyl-serine
RA : Réaction Acrosomique
RE : Réticulum Endoplasmique
ROO[•] : Radical Peroxyle
RO[•] : Radical Alkoxye
RO[•] : Radical oxygène
ROS : Radicaux réactifs oxygénés /
Radical oxygen species
SBE : sulfopropyl
SCA : Sperm Class Analyser
SEM : Scannig Electronic Microscopy
SM: sphingomieline

SOD : Super-Oxyde-Dismutase
spz : spermatozoide(s)
STR: Straighness
TBARS : Thiobarbituric Acid Reactif
Substances
TEM : Transmission Elecron Microscopy
TLC : Tocopherol Loaded Cyclodextrine
Toc : Tocopherol
VAP: Velocity Average Path
VCL: Velocity CurviLinear
VSL: Velocity Straight Line
Vit-E : Vitamine E
Vit- C: Vitamine C
X[•] : Radical Libre

Liste des figures :

- Figure I.1 :** L'appareil reproducteur du lapin mâle. (A) : dissection vue dorsale ; (B) : plan sagittale.....Page 05
- Figure I.2 :** Le spermatozoïde du lapin : (A), SEM vue globale (x 2600) ; (B), SEM la tête (x 10000) ; (C) TEM section longitudinale (x 10.600).....Page 07
- Figure I.3 :** Diagramme d'interaction de taux de refroidissement, l'effet de solution, et la formation de cristaux intra cellulaire.....Page 11
- Figure I.4 :** Le taux de réfrigération adéquat selon la concentration du CPA de 0 à 60% W/W.....Page 12
- Figure II.1 :** Production des ROS et RNS.....Page 17
- Figure II.2 :** diagramme de la peroxydation lipidique.....Page 19
- Figure II.3 :** Implication d'OXPPOS dans la production des ROS.....Page 20
- Figure III.1 :** La structure des cyclodextrines.....Page 25
- Figure III.2 :** comparaison de l'activité anti-oxydante par chimiluminescence de α -tocophérol et α -tocotrienol dans un model de liposome.Page 33
- Figure III.3 :** a.) 2D NMR spectre à 29°C, $[\alpha\text{-tocopherol}] = 10 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\beta\text{Methyl-CDx}] = 10.3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. b.) La structure plausible du complexes $\beta\text{-CDx-toc}$Page 34
- Figure IV.1 :** Diagramme de l'étude expérimentale.....Page 41
- Figure IV.2 :** Graphique du trajet spermatique et motilités analysées par CASA...Page 46
- Figure IV.2 :** Principe du dosage du malondialdéhyde.....Page 49
- Figure V.1.a :** L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Motilité totale (MOT) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 52
- Figure V.1.b :** L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Motilité Progressive (PMOT) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 53

Figure V.1.2.a :L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vitesse Curvilinéaire (VCL) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C....Page 54

Figure V.1.2.b :L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vitesse Averege Path (VAP) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 54

Figure V.1.2.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vitesse Straight Line (VSL) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 55

Figure V.1.2.d : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le Pourcentage de Linéarité (LIN) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 56

Figure V.1.2.e : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le pourcentage de Rectitude (STR) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 56

Figure V.1.2.f : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur l'Amplitude latérelle de la tête (ALH) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 57

Figure V.1.2.g : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Fréquence de Battement (BCF) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 58

Figure V.1.3 : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité à L'Eosine-Nigrosine du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 59

Figure V.1.4.a : micrographiques de l'intégrité acrosomique par Le Trypan-Blue.....Page 60

Figure V.1.4.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité et l'intégrité acrosomique par Trypan-Blue après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 61

Figure V.1.4.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité et l'intégrité acrosomique par Trypan-Blue après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 62

Figure V.1.5.a : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le pourcentage de l'inhibition du radical ABTS après 48 heures de réfrigération à 4°C.....Page 63

Figure V.1.5.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur l'activité de l'enzyme Catalase (degré de H₂O₂ consommé par minute) durant 48 heures à 4°C.....Page 64

Figure V.1.5.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le degré de la peroxydation lipidique (TBARS) durant 48 heures à 4°C.....Page 65

Liste des Tableaux :

Tableau I.1 : caractéristique de la semence de lapins.....	Page 07
Tableau I.2 : les résultats de la réfrigération du sperme du lapin	Page 13
Tableau I.3 : les résultats de quelques protocoles de congélation du sperme du lapin.....	Page 15
Tableau III.1. Quelques propriétés chimiques des cyclodextrines.....	Page 25
Tableau III.2. Caractéristiques de quelques cyclodextrines modifiés.....	Page 26
Tableau III.3. : Exemples de déplétion de cholestérol libre par Méthyle- β -CDx.....	Page 31
Tableau III.4. Structure de la vitamine E : tocophérol et tocorienol.....	Page 32
Tableau III.5 : Les potentiels du piégeage du radical RO \cdot des différents complexes des analogues de la Vit-E en terme de constants “k” par ORAC-EPR.....	Page 35
Tableau III.6 : L’effet de CLC sur la qualité spermatique préservée en réfrigération.....	Page 38
Tableau III.7 : l’effet du traitement CLC sur la qualité spermatique du sperme cryo-conservé.....	Page 39
Table V.1.a : La qualité du sperme frais utilisé dans l’expérimentation I (sans vitamine C) (4°C).....	Page 51.
Tableau V.1.b : Les moyennes \pm SEM des paramètres cinématiques du sperme frais utilisé dans l’expérimentation I (sans vitamine C) (4°C).....	Page 51
Table V.2.1 : Les moyennes \pm SEM des paramètres du sperme frais utilisé en expérience II.....	Page 66
Table V.2.2 Les moyennes \pm SEM de l’effet du cholestérol et du l’ α -tocopherol sur les paramètres de motilité en post-dégel.....	Page 66

Remerciements et Dédicaces	ii
Résumés (FR, EN et AR)	v
Liste des abréviations	viii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xiii
Table des Matières	xiv

SOMMAIRE

A. Synthèse Bibliographique

Introduction	1
Chapitre I : La conservation spermatique chez le lapin	4
I.1. Rappel sur la physiologie de la production spermatique	4
I.1.1. L'appareil reproducteur du lapin mâle.....	4
I.1.2. La spermatogénèse chez le lapin.....	5
I.1.3. Le sperme du lapin	6
I.1.3.1. Normes et caractéristiques	6
I.1.3.2. Morphométrie du spermatozoïde lapin	7
I.1.3.3. Caractéristiques lipidiques du sperme et du spermatozoïde lapin..	8
I.2. Les techniques de conservation de la semence	9
I.2.1. La conservation par réfrigération	9
I.2.2. La congélation	10
I.2.1.1. Principe	10
I.2.2.2. Agents cryo-protecteurs	11
I.2.2.3. La vitrification.....	12
I.3. La conservation spermatique chez le lapin	13
I.3.1. La réfrigération du sperme lapin.....	13
I.3.2. La congélation du sperme lapin.....	14
Chapitre II. Le stress oxydatif associé à la préservation spermatique.....	16
II.1. Le stress oxydatif.....	16
II.1.1. Préambule et définitions.....	16
II.1.2. Origine des ROS.....	16
II.1.3. Les effets sur la membrane « la peroxydation lipidique ».....	18
II.2. Le stress oxydatif chez le spermatozoïde.....	19
II.3. Le stress oxydatif lié à la conservation du sperme.....	21

II.4. L'utilisation des antioxydants pour la préservation du sperme.....	22
II.4.1. Les anti-oxydants non-enzymatique.....	22
II.1.4.1. Les anti-oxydants enzymatiques.....	23
<hr/>	
Chapitre III. La Cyclodextrine.....	24
III.1. Structure et propriétés des cyclodextrines.....	24
III.2. Les Complexes d'inclusion à la cyclodextrine.....	27
III.3. Aperçue sur les domaines d'application des cyclodextrines.....	28
III.3.1. Les interactions cyclodextrines - membrane plasmique.....	30
III.3.1.1. La manipulation du cholestérol membranaire.....	30
III.3.2. Les complexes cyclodextrines – tocophérols.....	32
III.3.2.1. Structure et propriété des tocophérols.....	32
III.3.2.2. Le complexe cyclodextrines-tocophérols.....	34
III.4. Les Application des cyclodextrines dans la biotechnologie spermatique....	36
III.4.1. La CDx pour moduler la capacitation et la fertilisation in-vitro.....	36
III.4.2. L'utilisation des CDx dans la congélation spermatique.....	37
A). <i>L'utilisation des cyclodextrines non complexées</i>	37
B). <i>L'utilisation du Cholestérol-loaded-Cyclodextrins (CLC)</i>	37

B. Partie expérimentale

Chapitre IV. Matériels Et Méthodes	40
IV.1. Cadre et concept de l'étude	40
IV.2. Le plan expérimental.....	40
IV.2.a Essai de congélation à – 196°C	40
IV.2.b Essai de réfrigération à 4°C	40
IV.3. Animaux	42
IV.4. Réactifs et préparation de complexes	42
I.V.4.1. Préparation de Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin (CLC)	42
I.V.4.2. Préparation de α -Tocopherol-Loaded-Cyclodextrin (TLC)	42
IV.5. Collecte et évaluation initiale de sperme.....	43
IV.6. Traitements et dilueurs de conservation.....	44
IV.7. Méthodes de conservation	45
IV.7.1. La réfrigération à 4°C	45
IV.7.2. La congélation à l'azote liquide (-196°C)	45
IV.8. Paramètres analysés.....	46
IV.8.1. Evaluation des paramètres kinématiques par CASA.....	46

IV.8.2. Evaluation de viabilité par coloration Eosine Nigrosine.....	47
IV.8.3. Evaluation du statut acrosomique par coloration Trypan Blue.....	47
IV.8.4. Evaluation du statut oxydatif totale à l'égard du radical ABTS ^{o+}	48
IV.8.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase.....	48
IV.8.6. Détermination du taux d'oxydation lipidique par mesure de TBARS...	49
IV.8. Analyse statistique	50
<hr/>	
Chapitre V. Résultats et discussion	51
V.1. Résultats de la réfrigération (4°C).....	51
V.1.1 L'évaluation de l'effet des traitements sur (MOT) et (PMOT).....	52
V.1.2 L'évaluation de l'effet des traitements sur les paramètres CASA.....	53
V.1.3 L'estimation de la viabilité par Eosine-Nigrosine.....	58
V.1.4 L'estimation de l'intégrité acrosomique par Trypan Blue.....	59
V.1.5 L'évaluation du stress oxydatif.....	63
V.1.5.a Le statut oxydatif total du pouvoir Scavenger radical ABTS ^{o+}	63
V.1.5.b Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase.....	63
V.1.5.C La détermination de la peroxydation lipidique par TBARS.....	64
V.2. Résultats de la congélation (-196°C).....	66
V.3. Discussion.....	68
V.3.1. En Général.....	68
V.3.2. Le cholestérol, L'intérêt de traiter le sperme lapin avec du CLC.....	71
V.3.3. La Vitamine E, le principal antioxydant membranaire.....	74
V.3.4. L'effets synergique Cholestérol-Antioxydant.....	76
<hr/>	
Conclusion Générale.....	77
<hr/>	
Références bibliographiques	
Annexes	
<hr/>	

Introduction

La **conservation du sperme** à basses températures (4°, -196°C) joue un rôle crucial dans le développement des biotechnologies de reproduction chez les animaux de rente. La réfrigération ou la cryo-préservation accroît l'avantage de distribuer un potentiel génétique économiquement favorable par l'insémination artificielle ; comme elles facilitent le transport sur de longues distances et la distribution subséquente d'un géniteur de choix, parfois même après ça mort (Baily et al., 2000).

Ce potentiel a été observé essentiellement chez les bovins, où l'insémination artificielle (IA) a connu un succès et un grand élan d'application ; à titre d'exemple, 253 millions de doses de sperme bovin congelé sont produites chaque année dans le monde (Thibier & Wagner. 2002) et plus de 80% du secteur laitier nord-américain utilise des doses d'IA réfrigérées ou congelées (Colazo & Mapletoft 2014) et 90% des vaches finlandaises sont inséminées par du sperme congelé (Alm-Packalén 2009).

La fertilité du sperme congelé chez le bovin est considéré maintenant comme satisfaisante et varie entre 65% et 72,6 % (Briand-Amirat et al., 2013). Chez d'autres animaux d'élevage, la cryo-préservation est loin d'être une réalité de terrain ; le sperme frais ou réfrigéré (pour une courte durée) reste le plus adéquat et le plus utilisé. Le sperme cryo-présumé présente -chez plusieurs espèces- une faible fertilité ; le taux de conception est de 20% chez le mouton (Maxwell et al., 1993), 17-24 % chez la poule (long & Kulkarni. 2004) et 3,7-9,5 % chez la dinde (Long et al., 2014).

Chez le **lapin domestique** (*oryctolagus cuniculis*), l'insémination artificielle a permis un progrès génétique et de transformer la gestion de l'élevage d'une conduite individuelle à une conduite en bande. L'ovulation provoquée et l'IA ont permis la synchronisation et la gestion de la production chez la lapine sur un cycle semi-intensif de 42 jours (Gidenne., 2015).

Actuellement, l'IA chez le lapin à l'échelle industrielle est très réussie en Europe, et elle se limite à la semence fraîche ou réfrigérée avec une fertilité (79-85%) et prolificité (7 lapereaux/lapine) satisfaisantes (Roca *et al.*, 2000 ; Martinéz-Paramo *et al.*, 2012). La cryo-préservation du sperme du lapin est limitée essentiellement à des objectifs expérimentaux ; l'industrie de l'élevage n'a pas exploité le potentiel du sperme congelé à cause de la faible fertilité (entre 12 et 70 %) avec une faible prolificité (4,5-5,7 lapereaux/lapine) comparativement à la saillie naturelle (Mocé & Vicente, 2009). En Algérie, l'utilisation de l'IA est très faible, les élevages algériens (à caractères traditionnels) utilisent principalement de la saillie naturelle. Quelques tentatives d'essais d'IA –seulement par le sperme frais- ont été réalisées par des éleveurs passionnés de lapin pour fin d'augmenter leur production. A notre connaissance, il n'y a aucune étude qui a exploré l'application de la réfrigération ou la congélation sur le sperme du lapin produit localement.

D'une manière générale, abaisser la température afin de conserver à long terme la cellule « spermatozoïde » représente un choc avec une atteinte fonctionnelle et modifie négativement différents paramètres de mobilité, viabilité, morphologie et de fécondité. La réfrigération affecte l'activité métabolique (Rodriguez-Gil *et al.*, 2015), désorganise les composants structurels de la membrane plasmique (MP) et réduit la motilité progressive à moins de 60% sur seulement 48 heures (h) de stockage (Gączarzewicz *et al.*, 2015).

Par ailleurs, La congélation altère la survie des spermatozoïdes lorsque les constituants membranaires passent à des degrés variables vers une phase solide (Maderious *et al.*, 2002). Les cristaux de glace formés en milieu interne peuvent lacérer la membrane, et ceux du milieu externe sont responsables d'un stress hyper-osmotique important (Walters *et al.*, 2009). Les cryo-protecteurs réduisent l'effet néfaste de ces cristaux mais restent potentiellement toxiques (Maderious *et al.*, 2002). Aussi, un stress oxydatif se propage suite à des attaques de radicaux réactifs oxygénés (ROS) en surproduction dans ces conditions de stockage (Burnaugh *et al.*, 2010) ; Ceci est encore plus aggravé lorsque on sait que le spermatozoïde a un manque en antioxydants cytoplasmiques suite à sa différenciation durant la spermatogénèse (Watson *et al.*, 2000).

Différentes stratégies sont adoptées pour l'amélioration de la qualité du sperme du lapin par l'optimisation de l'environnement de conservation, en exploitant différents constituants du dilueur (jaune d'œuf, gélatine, lait) ([Mocé et al., 2003, 2005](#) ; [Alvarèz et al., 2004](#)), en choisissant différents cryo-protecteurs perméables ou non à différentes concentrations ([Rosato et al., 2013](#)) ou en ajustant les protocoles et les vitesses de refroidissement respectives ([Chen et al., 1994](#) ; [Salvetti et al., 2005](#)).

D'autres approches s'orientent sur la modification constitutive des éléments cellulaires et l'apport -d'une manière directe- à la cellule « spermatozoïde » d'éléments qui consolident sa survie, à l'image du cholestérol et l'intégration de molécules actives contre le stress oxydatif.

Justement, **l'objectif de la présente étude** est d'étudier l'intérêt de supplémenter le dilueur de conservation par du cholestérol, comme moyen de renforcement de la membrane cytoplasmique, de l'acide ascorbique (vitamine C) et de l' α -tocophérol (vitamine E) comme molécules actives contre le stress oxydatif aussi bien dans la conservation du sperme du lapin en réfrigération (4°C) qu'en congélation (-196°C).

Les **Cyclodextrines** ont été proposées pour solubiliser et améliorer la biodisponibilité du Cholestérol, de l' α -**tocophérol** et des molécules hydrophobes en général. Dans le présent travail justement, nous allons exploiter cette caractéristique des cyclodextrines pour solubiliser le Cholestérol et l' α -tocophérol afin d'optimiser leur effet protecteur. L'approche expérimentale adoptée est conçue afin d'assurer une protection complémentaire de la cellule spermatique, un renforcement de la membrane cytoplasmique via le cholestérol et une lutte contre le stress oxydatif via les vitamines E et C.

Chapitre I

La Conservation Spermatique Chez le lapin

Chapitre 01 : La conservation spermatique chez le lapin

Le **lapin domestique** (*Oryctolagus cuniculus*) est un mammifère lagomorphe de la famille des *liporidae*. Il est monogastrique herbivore, caecotrophe et présente un caractère polytoque (portée de 3 à 10 lapereaux) à ovulation provoquée par accouplement (Garreau et al., 2015).

I.1. Rappel sur la physiologie de la production spermatique :

I.1.1. L'appareil reproducteur du lapin mâle :

L'appareil reproducteur du mâle est analogue à celui d'un mammifère ; Il inclut deux testicules, glandes accessoires, conduits et organe copulateur externe (**Figure I.1**). Les testicules (chaque une dans un scrotum) sont le siège de la spermatogénèse ; de structure ovoïde de 30-35 x 10-15 millimètres (mm) et pèsent 1,5-2 grams (g). **L'épididyme**, est un conduit qui recouvre chaque testicule ; Il est formé de trois parties : la tête, le corps et la queue qui sont le siège de transport et de maturation des spermatozoïdes (spz). Il se poursuit par le **canal déférent** qui traverse un renflement fusiforme « **ampoule différentielle** », positionné au-dessus de la vessie (Garreau et al., 2015).

Les glandes annexes sécrètent les constituants du plasma séminal au moment de l'éjaculation ; la **vésicule séminale** bilobée, est placée entre le rectum et la vessie, dont la partie terminale fusionne avec les ampoules différentielles pour former le **canal éjaculateur** qui s'ouvre dorsalement dans l'urètre. La **glande vésiculaire** s'ouvre dans l'urètre par deux canaux excréteurs. La **prostate**, oblongue et volumineuse, est située sous la glande vésiculaire. Les glandes para-prostatiques recouvrent en partie les ampoules différentielles et, parfois, la vésicule séminale. Enfin, la **glande de Cowper**, bilobée, est située postérieurement à la prostate. Le **pénis**, dépourvu de gland, est enfermé dans un repli tégumentaire, le fourreau. Il mesure de 3 à 5 cm. Deux **glandes préputiales**, sécrétant une substance très odorante, sont situées en arrière du pénis. Elles jouent un rôle dans le déclenchement de l'ovulation de la femelle en stimulant le réflexe ovulatoire (Garreau et al., 2015).

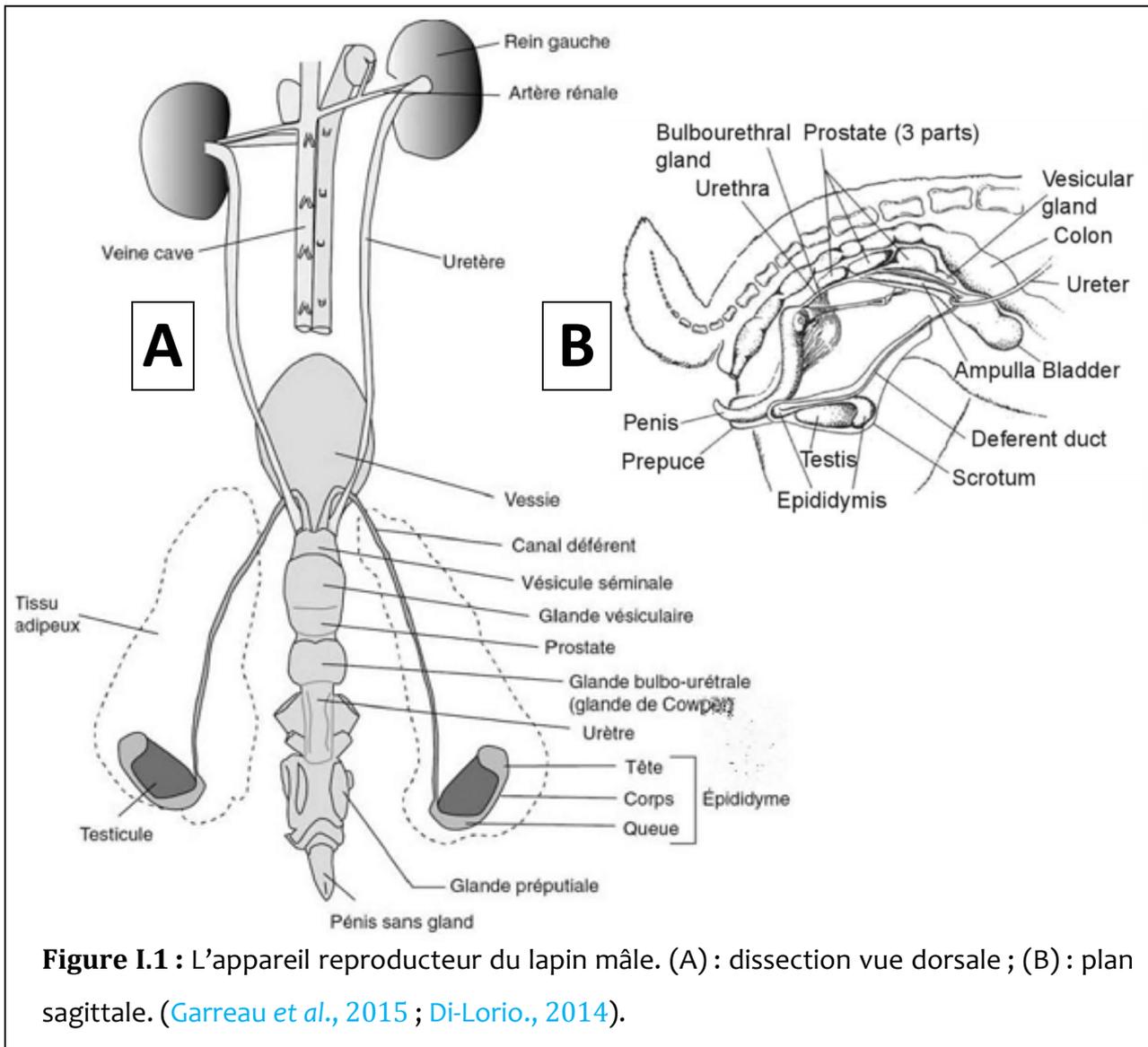


Figure I.1 : L'appareil reproducteur du lapin mâle. (A) : dissection vue dorsale ; (B) : plan sagittale. (Garreau *et al.*, 2015 ; Di-Lorio., 2014).

I.1.2. La spermatogénèse chez le lapin:

La spermatogénèse désigne l'ensemble des divisions et des différenciations cellulaires qui conduisent, à partir d'une cellule sexuelle de base (**spermatogonie**), à produire des cellules haploïdes nommées **spermatozoïdes**. Chez le lapin, la spermatogénèse dure 53 jours (Sweirsta *et al.*, 1965). Les spermatogonies (1^{er} ordre) se divisent par mitose pour produire des spermatogonies (2^{ème} ordre) et se transforment en **spermatocytes I** (2n). Ces dernières entrent en suite en méiose (I : réductionnel) pour produire les **spermatocytes II** (n chromosome); la méiose (II : équationnel) va produire les **spermatides**. La spermiogénèse est une différenciation aidée par la cellule de Sertoli pour transformer chaque spermatide en un spermatozoïde (Fortun-Lamothe *et al.*, 2015).

Le spermatozoïde va transiter à travers l'épididyme pour acquérir une **maturation** marquée par la condensation finale du noyau, une modification de la forme de l'acrosome, un remaniement de la membrane plasmique, l'obtention d'une motilité progressive et une capacité fertilisante. Les spermatozoïdes prélevés directement des tubes séminifères sont pratiquement immobiles, alors que les spermatozoïdes présents dans la queue de l'épididyme sont susceptibles d'être féconds à ~ 90 %. Chez le lapin, la durée de la maturation épидидymaire varie de 8 à 11 jours. Cependant, une nouvelle population de spermatozoïdes est projetée chaque 50-54 jours (Sweirsta et al., 1965) ; alors que la queue de l'épididyme peut stocker la semence pendant plusieurs semaines.

I.1.3. Le sperme du lapin :

I.1.3.1. Normes et caractéristiques :

Le sperme est un mélange de spermatozoïdes et de plasma séminal (sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes) qui est émis au moment de l'éjaculation. Le **tableau I.1** présente les caractéristiques de la production spermatique selon plusieurs études.

Chez le lapin, la maturité sexuelle est observée généralement vers 5 mois, alors que la production et la qualité de la semence augmentent durant la 1^{er} année et diminuent à partir de la fin de la 2^{ème} année. Ainsi, de 23 à 43 semaines, le nombre de spermatozoïdes motiles par éjaculat augmente régulièrement de 193 à 300 x 10⁶ (Fortun-Lamothe et al., 2015).

Le génotype des mâles influence la production spermatique et les caractéristiques de la semence. Des mâles d'origine néo-zélandaise et californienne montrent des différences très importantes sur les plans quantitatifs et qualitatifs. La grande variabilité conduit à une faible répétabilité (performances successives d'un mâle) des performances, et une difficulté de présélection en début de carrière. Un test pendant 3 à 4 semaines sur l'aptitude à donner de la bonne semence est essentielle pour écarter ceux qui expriment une faible production (Fortun-Lamothe et al., 2015).

Tableau I.1 : caractéristiques de la semence du lapin

Génotype/population	Caractéristiques				
	Volume (ml)	pH	Motilité (%/1-9)	Viabilité (%)	Concentration (spz million/ml)
NZ INRA-1077 (Bencheikh, 1993)	0,7	6,9	7,4 (1-9)	83	575
CAL INRA A1066 (Bencheikh, 1993)	0,6	7	6,7 (1-9)	73	394
NZ Ligné V (Vicente <i>et al.</i> , 2000)	0,9	-	81%	-	338
NZ Ligné R (Vicente <i>et al.</i> , 2000)	0,6	-	73%	-	230
Baladi Egypte (Hassanien <i>et al.</i> , 2011)	0,56	-	55%	-	423
Pop Local DZ (Boulbina, 2011)	0,86	-	7,68 (1-9)	-	734,9
Pop Locale DZ (Nabi, 2012)	0.68	-	5,1 (59%)	-	428,kj9

I.1.3.2. Morphométrie du spermatozoïde du lapin :

Le spermatozoïde du lapin (**Figure I.2**) mesure **50-60** micromètres (μm) de longueur et présente une forme commune aux mammifères : une tête large et longue de forme ovoïde aplatie ($7 \times 4 \times 0,5 \mu\text{m}$) qui contient le noyau et l'acrosome ; et un segment cylindrique fin composé d'une pièce intermédiaire ($8,8 \mu\text{m}$) qui abrite les mitochondries et un flagelle (45 à $55 \mu\text{m}$) qui est responsable du mouvement (Fortun-Lamothe *et al.*, 2015). L'acrosome est une grande vacuole qui coiffe et borne les deux tiers de la tête en avant du segment équatorial ; Il est délimité par une membrane tri-laminaire, et le reste de la façade de la tête est couvert par une structure supplémentaire de nature protéique sulfuro-fibreuse pour conférer une grande résistance. (Di-Lorio., 2014). Chez le lapin, l'acrosome présente un épaississement en bourrelet sur l'étendue de l'épaisseur de la tête.

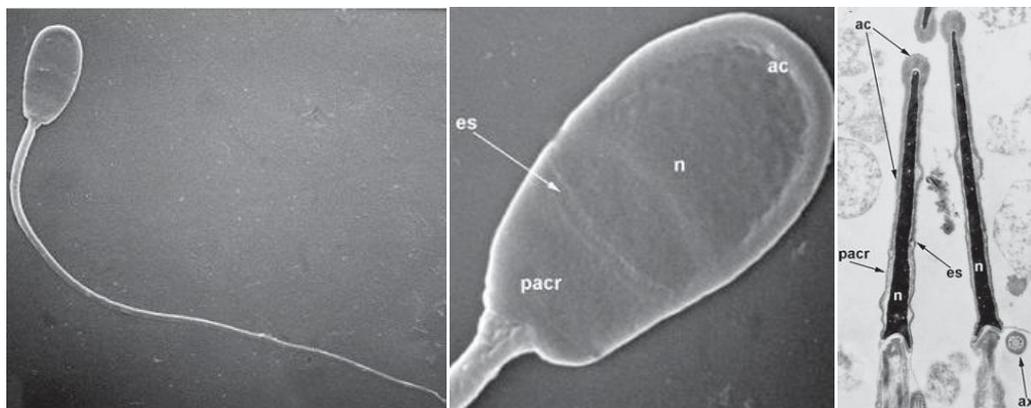


Figure I.2 : Le spermatozoïde du lapin : (A), SEM vue globale (x 2600) ; (B), SEM la tête (x 10000) ; (C) TEM section longitudinale (x 10.600). (Boiti *et al.*, 2005).

I.1.3.3. Caractéristiques lipidiques du sperme et du spermatozoïde du lapin :

La composition lipidique du sperme est d'une importance cruciale car sa modification est impliquée dans l'hyperactivation, la capacitation et la réaction acrosomique (RA). Le sperme du lapin contient plusieurs fractions (spermatozoïdes, plasma, gouttelettes et vésicules) avec un profil lipidique très variable. Les vésicules (9,5 µg/g de sperme) sont obtenues par ultracentrifugation et les gouttelettes (482 10⁶/ml ; 13,3µm² ; Ø=4µm) par un gradient de densité Percoll[®] ou par Swip-Up (Castellini *et al.*, 2006).

Les spz représentent la grande partie des phospholipides (PL) totaux (%) (33-38,8%) (499 µg/10⁹) alors que le plasma séminale, les gouttelettes et les vésicules représentent 48,8%. La concentration de PL total et les types de PL varient selon les procédures de séparation utilisées ; les principaux étant phosphatidyl-choline (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidyl-ethanolamine (PE), phosphatidyl-serine (PS), sphingomyéline (SM) et phosphatidyl-inositol (PI). Le cholestérol contenu dans le sperme brut est de 811µg/10⁹ dont seulement 21 à 23% retrouvés dans les spz (495 µg/10⁹ spz_{centrifugé} ; 178 µg/10⁹ spz_{percoll}). Le rapport PL/CHOL est élevé dans la fraction spz_{centrifugé} (1,13), spz_{percoll} (1,42) et faible dans les gouttelettes (0,64) et les vésicules (0,35) (Castellini *et al.*, 2006) ; ceci indique la richesse des particules en cholestérol, qui probablement agit comme donneur de stérols pour protéger le spz contre les différents chocs et la RA prématuré.

En effet et à titre d'exemple, le ratio élevé des LPC/PC chez les spz_{percoll} est associé avec un taux élevé d'AR spontanée. Cette altération n'a pas réduit le taux de viabilité mais elle a diminué la réponse à HOST dans cette classe de spz et leurs sensibilité à la capacitation in-vitro (Castellini *et al.*, 2006). Aussi Mourvaki *et al.* (2010) a démontré que les granules prostatiques se caractérisent par la présence d'un autre composé de stérols, à savoir le desmostérol, qui est le précurseur immédiat du cholestérol. Il existe également un transfert immédiat de composés de stérols ou de composés lipophiles comme la vitamine E de ces granules aux spermatozoïdes. Après 30 min d'incubation, Castellini *et al.* (2012) et Collodel *et al.* (2012) ont pu réduire significativement la capacitation et la RA induites par l'ajout de la fraction prostatique (granules) aux spz isolés par Percoll[®].

I.2. Les techniques de conservation de la semence :

La conservation par réfrigération ou la congélation fournit des avantages économiques tels que la réduction des frais de transport et d'hébergement des animaux, l'augmentation du gain génétique ainsi qu'une maîtrise de la gestion de la reproduction (Batellier *et al.*, 2001).

I.2.1. La conservation par réfrigération :

Prolonger la durée de vie du sperme à l'état liquide sans impacts sévères en comparaison avec la congélation est possible par la diminution de la température du milieu de conservation à 15-18°C ou à 4-5°C. Ceci est obtenu suite à la diminution de l'activité métabolique tout en préservant la fertilité (Rodriguez-Gil *et al.*, 2006).

Plusieurs auteurs ont signalé qu'une basse température décroît le pourcentage des spz progressifs (PMOT) au dessous de la barre de 60%. Gączarzewicz *et al.* (2015) indiquent que PMOT < 60% est observé au 6^{ème} jour à 16°C et au 2^{ème} jour à 4°C sans être accompagné de différences pour les paramètres de la membrane plasmique (par SYBR-14/PI ou par HOS) ce qui indique que la basse température n'a pas d'effet importants sur la composition ou l'organisation des composants lipidiques de la membrane.

Parallèlement, la faiblesse de la capacité mitochondriale pendant le stockage à différentes températures est reflétée par une augmentation de la proportion de spermatozoïdes présentant un potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) faible ; ce qui indique des altérations dans les processus métaboliques dépendants ou régulés par les spermatozoïdes (Rodriguez-Gil *et al.*, 2015).

Freitas-Dell' Aqua *et al.* (2013) ont indiqué chez le cheval que la conservation à 15°C ou à 4°C pendant 24H présente les mêmes indices d'apoptose que celui de la semence fraîche. Après 48 heures, une diminution significative de la qualité apoptotique du sperme peut déjà être observée, ce qui pourrait être l'un des facteurs contribuant à la diminution de la fertilité associée au sperme réfrigéré.

I.2.2. La congélation:

I.2.2.1. Principe :

Le processus de congélation inclut des étapes de réduction de température, une déshydratation cellulaire, la congélation et en fin la décongélation.

Durant la première étape, à basses températures, le spz peut avoir des dysfonctionnements membranaires; en effet chaque élément phospholipidique (PL) possède son propre degré de transition, et en conséquence de la diminution de la température, les PL se séparent, migrent et se réarrangent en formant des domaines d'une membrane morcelée ([Maderious et al., 2002](#)).

À des degrés de températures négatives, le spz va engendrer un stress mécanique par la formation de la glace et un stress de déshydratation. En effet, jusqu'à -5°C, l'eau intra/extra cellulaire n'est pas congelé mais est plutôt super réfrigéré, cependant à des degrés de températures plus négatives, l'eau pure est précipitée vers le milieu extracellulaires sous forme de glace entre -5° à -10°C.

La vitesse de refroidissement est d'une importance cruciale. À des vitesses lentes, le spz perd l'eau et se déshydrate, mais lorsque les vitesses sont trop rapides, l'eau ne peut quitter la cellule avec des risques d'observer des cristaux de glace intracellulaires qui déchireront la membrane. Concomitamment à la formation des cristaux en milieu externe, l'osmolarité du liquide restant s'accroît excessivement en fait et mesure que la température décroît. Le spz maintient partiellement l'équilibre de ce stress déshydratant mais avec une dénaturation des macromolécules, un extrême rétrécissement et parfois on observe une rupture membranaire irréversible ([Walters et al., 2009](#)).

Le taux de congélation le plus adéquat doit à la fois être assez rapide pour permettre une congélation sans exposer la cellule à des conditions hyper-osmotiques extrêmes, et assez long pour déshydrater la cellule sans la formation des cristaux intracellulaires (Figure I.3) ([Benson et al., 2012](#)).

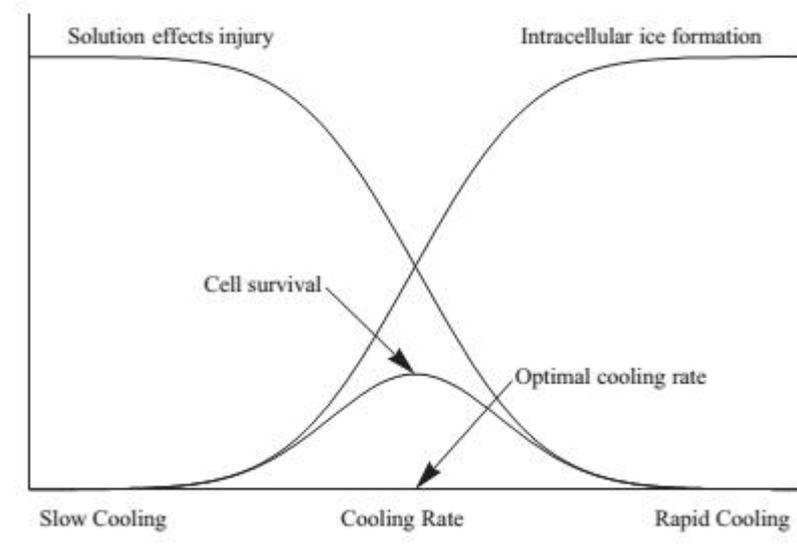


Figure I.3 : Diagramme d'interaction du taux de refroidissement, de l'effet de solution, et la formation de cristaux intra cellulaires (Benson *et al.*, 2012).

I.2.2.2. Agents cryo-protecteurs :

Les agents cryoprotecteurs (CPA) sont utilisés pour éviter de former des cristaux intracellulaires en exerçant un stimulus osmotique afin de réduire le volume intracellulaire à congélation mais aussi en remplaçant l'eau du milieu interne avec un décroissement de son point de congélation. Les CPA sont classés comme perméables (Glycérol, éthylène propylène glycol, DMSO) et non perméable (sucrose, trehalose) ; le plus utilisé est le glycérol et qui exerce une stimulation osmotique extracellulaire pour décroître le volume d'eau intracellulaire. Il remplace également les molécules d'eau, pour réduire le point de congélation (Maderious *et al.*, 2002).

Cependant, les CPA restent toxiques et provoquent une altération membranaire. Le sperme bovin est congelé en utilisant une concentration de glycérol de 4-8%, mais d'autres espèces ne tolèrent pas ces niveaux à l'image du sperme du porc qui s'altère à 3% et la souris à 1,75% (Holts, 2000). Les interactions moléculaires du glycérol altèrent la fluidité des membranes en s'intercalant entre les lipides de la bicouche lipidique avec un changement de la viscosité du cytoplasme en affectant toutes les réactions métaboliques et la destruction des liaisons du cytosquelette avec la membrane (Hammerstedt and Graham, 1992).

I.2.2.3. La vitrification :

La vitrification est un procédé où on utilise des vitesses de refroidissement très importantes ($>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en comparaison avec les protocoles standards ($1-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Le milieu extracellulaire ne se cristallise pas, mais il forme plutôt une glace amorphe comme un « vitre », d'où l'appellation de vitrification. Le taux de refroidissement nécessaire pour vitrifier les solution isotonique est très élevé ($10^5-10^6^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ; alors que les solutions additionnées de glycérol ou de propylène glycol à de fortes concentration (4-5 Mol) sont vitrifiables à $10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (Walters *et al.*, 2009).

Parmi les inconvénients de la vitrification est que ces taux de réfrigération élevés sont difficiles à obtenir en plus de la tolérance osmotique face à des concentrations excessives en CPA (Fahy & Rall. 2007). C'est pour cela qu'il est recherché d'une part à augmenter le ratio de la surface sur le volume de la suspension cellulaire avec l'utilisation des « cryo-loop » pour obtenir un mince film de solution exposé à l'azote liquide ; et d'autre part à séquencer l'ajout de CPA à des doses croissantes. Ainsi, pour atteindre 4M de glycérol on utilise 8 paliers de concentrations dans environ 30 secondes (Walters *et al.*, 2009). Le taux de réfrigération adéquat en relation avec la concentration du CPA est illustré sur la **figure I.4**.

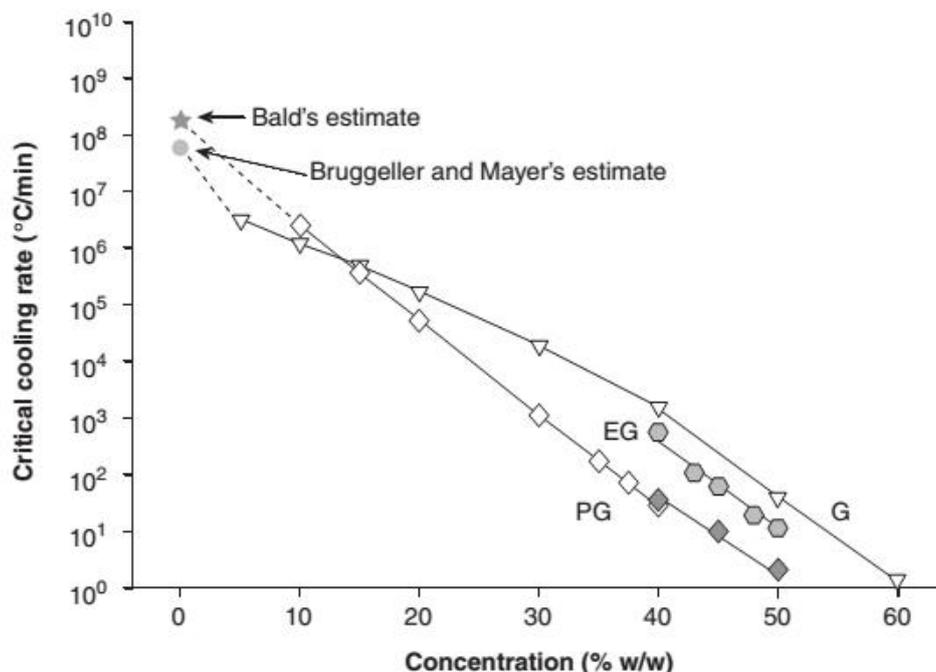


Figure I.4 : Le taux de réfrigération adéquat selon la concentration du CPA de 0 à 60% W/W (Fahy & Rall. 2007).

I.3. La conservation du sperme chez le lapin:

I.3.1. La réfrigération du sperme lapin :

Plusieurs approches pour améliorer la réfrigération du sperme du lapin ont été explorées par plusieurs auteurs. Le **tableau I.2** met en revue les études les plus citées. Il est à noter –quelque soit la stratégie adaptée- que la qualité spermatique en terme de motilité, viabilité ou d'intégrité acrosomique ou membranaire est fortement affectée au delà de 48h de conservation. En effet, [Gogol \(2013\)](#) a montré que la conservation du sperme du lapin à 15°C par un dilueur commercial (Galap) présente une diminution de tous les paramètres de motilité au bout de 3 jours avec une diminution de la mobilité (MOT) (de **62,0** à j1 à **36,2** à j3) et de la vitesse VAP (de **71,1** µm/s en j1 à **52,9** µm/s en j3). Il est observé également une diminution conséquente en contenu d'ATP de **86,5** pmol/10⁶ spz en j1 à **66,6** pmol/10⁶ spz en j3 et qui reste positivement corrélée avec les paramètres de motilité suscités ($r = 0,6$ et $0,37$, respectivement).

Tableau I.2 : les résultats de la réfrigération du sperme du lapin

Auteurs	Le dilueur	T°	Durée	MOT (%)	PMOT	Viabilité (%)	intégrité (%)	NAR (%)
Roca et al. 2000	Tris Citric acid Glucose	15°C	24h	80	3,5/5	-	85	87
			48h	75	3,5/5	-	83	83
			72h	70	3,25/5	-	78	78
			96h	55	2,5/5	-	70	70
Rosato et al., 2011	Gelatine (Cunigel)	5°C	0h	89,2	75,8	85,4	86,7	92,4
			48h	52,5	31,7	64,9	43,0	50,8
			120h	35	20	59,3	28,6	34,8
			192h	25,8	7,5	36,5	13,3	23,6
Dilorio et al., 2014	Lepus	5°C	24h	45	35	45	40	80
			48h	29	20	35	25	75
			72h	20	11	28	20	53
	Cotarlap	5°C	24h	65	55	68	57	85
			48h	50	37	50	42	82
			72h	30	24	43	32	65
	TCG	5°C	24h	40	22	33	25	70
			48h	31	12	22	19	65
72h			12	9	20	15	40	
Castellini et al., 2000	Vitamines E+C	5°C 24h	Cntr	58,3	(VSL) 29,54	58,30	-	-
			Vit-E	64,12	31,14	64,12	-	-
			Vit-C	48,10	19,16	48,10	-	-
			E+C	71,52	28,87	71,52	-	-
Mangialli et al., 2012	Lycopène	5°C 24h	Cntr	20,6	0,7	46,3	-	-
			0.1g/l	26,8	0,8	48,7	-	-
			0.2g/l	37	1,14	56,5	-	-

I.3.2. La congélation du sperme lapin :

La congélation du sperme du lapin a connue depuis les premiers rapports ([Hoagland & Pincus, 1942](#)) à ce jour une faible utilisation commerciale à cause d'une mauvaise qualité de la motilité (<40%) (**Tableau I.3**) et un résultat moyen de fertilité et/ou de prolificités ([Mocé et al., 2009](#)).

Les protocoles de cryo-préservation chez le lapin varient d'une manière importante entre les différentes études. Cependant, d'une manière générale, le sperme est dilué à température ambiante avec un dilueur à jaune d'œuf à des taux fixe (1:1 à 1:10) avec un CPA approprié, l'échantillon est ensuite réfrigéré jusqu'à 5°C (pendant 1,5h à 2h) pour équilibration. Les paillettes conditionnées sont ensuite posées 2 à 10cm au-dessus du niveau de l'azote liquide pour environ de 10min puis plongées dans l'azote liquide pour stockage ([Mocé et al., 2009](#)).

Malgré que le spz du lapin est classé dans la catégorie « cold-shock résistant » car il possède un ratio cholestérol-phospholipide élevé, il est observé une perte de la viabilité après congélation qui plus associée à la toxicité des cryo-protecteurs qu'au au choc thermique. Les spz du lapin peuvent fertiliser des oocystes après conservation rapide ([Mocé & Vicente, 2002](#)) ou lente ([Parrish & Foot, 1986](#)) à 5°C.

Le glycérol reste non adapté pour la conservation du sperme du lapin même à de faibles concentrations ([Polge et al., 1949](#) dans [Mocé et al., 2009](#)). En effet, le spz du lapin présente un coefficient de perméabilité très faible ([Curry et al., 1995](#)) ce qui incite à utiliser des CPA à faible poids moléculaire avec une haute perméabilité comme le DMSO.

Récemment, [Rosato et al., \(2013\)](#) ont comparé plusieurs CPA, l'albumine, et des protecteurs osmotiques (sucrose vs trehalose) sur la cryo-préservation et la vitrification du sperme du lapin. Les résultats obtenus ont montré que le diméthyl-acetamide (5%) et le DMSO (5 et 10%) présentent les meilleures motilités et les plus importantes intégrités membranaires. De même l'ajout du BSA et du sucrose (0,1 et 0,25M) améliore significativement la motilité et l'intégrité de l'ADN.

Tableau I.3 : Les résultats de quelques protocoles de congélation du sperme chez le lapin

Auteurs	Protocole	Motilité			Statut membranaire		Fertilité
		MOT	VCL	VAP	NAR	Intégrité	
Mocé et al., 2003 (DMSO 3,5M + Sucrose 0,1M)	-30°C/50°C	54	-	-	64	-	32
	LNV : 5°C 45'→LNV 10'/50	37	-	-	42	-	70
	-30°C /70°C	45	-	-	56	-	42
	LNV: 5°C 45'→LNV 10'/70°C	37	-	-	46	-	77
Viudes de Castro et al., 2005 (DMSO 3,5M + Sucrose 0,1M)	Fresh	55	78	49	87	-	70,6
	-30°C (30min)	40	35	23	45	-	21,7
	LNV: (5°C 45'→LNV 10'→LN)	35	46	27	33	-	64,2
Rosato et al., 2012 (DMSO 1,75M + Sucrose 0,05M)	Fresh	91	-	-	92	68	-
	LNV: (5°C 45'→LNV 10'→LN)	27	-	-	51	32	-
Rosato et al., 2013 (Différent CPA) LNV (5°C 90'→ 1:1 45'→LNV 10'→LN) Vitrification : plongée directe	Fresh	95	-	-	-	-	84
	LNV : DMA 5%	22	-	-	-	28	-
	DMSO 10%	35	-	-	-	38	-
	DMSO+BSA+Sucrose	42	-	-	-	38	77
	Vitr : DMSO+BSA+Sucrose	2,5	-	-	-	6	12

La qualité du sperme pourrait également être améliorée si le processus de congélation comprend une étape de « seeding » pour éviter le super refroidissement. Le seeding induit une déshydratation des cellules, ce qui réduit significativement la formation de la glace intracellulaire. Chez le lapin, jusqu'à 66% de spermatozoïdes mobiles peuvent être obtenus après décongélation si le seeding mécanique est effectué à -6 °C par rapport aux échantillons contrôles (47%). En outre, le seeding pourrait provoquer moins de choc osmotique et thermique ([Chen, 1994](#)).

Chapitre II

Le Stress Oxydatif associé à la préservation spermatique

Chapitre 02 : Le stress oxydatif associé à la préservation spermatique

II.1. Le stress oxydatif :

II.1.1. Préambule et définitions :

Le **stress oxydatif** est un déséquilibre entre la genèse des radicaux oxydants ROS « Reactive Oxygen Species » et la capacité de la protection anti-oxydante des systèmes biologiques (Pisoschi & Pop. 2015). La production excessive et rapide des ROS et/ou une faiblesse de protection entraînent des dommages délétères sur tous les composants cellulaires (lipide, protéine et ADN) et exercent une influence négative sur la physiopathologie de plus de 100 maladies différentes (Cardiopathies, Cancers, Alzheimer, diabète...) (Pisoschi & Pop. 2015).

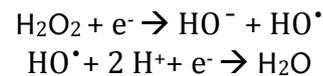
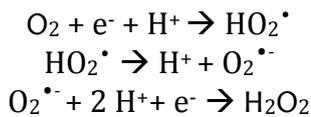
Les **radicaux libres** sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons libres (électrons non appariés) sur leur orbite externe (Guthrie & Welch 2012). Les radicaux libres induisent leur effet délétère lorsque ils partagent l'électron libre avec une molécule avoisinante en provoquant son oxydation (Guthrie & Welch 2012).

Parmi les ROS, on reconnaît ceux qui sont des radicaux libres, comme, l'**anion superoxyde** ($O_2^{\bullet -}$), le radical **hydroxyle** (HO^{\bullet}), le **peroxyde** (ROO^{\bullet}) et l'**alkoxyde** (RO^{\bullet}), et les autres ROS **non radicalaires** (non libre) qui sont représentés par le **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) et l'**oxygène singulet** ($\frac{1}{2} O_2$). Le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) est une espèce hautement agressive, et reconnu pour son pouvoir oxydant extrême. Le peroxyde d'hydrogène est capable d'inactiver les enzymes, oxyder l'ADN et les lipides et produire d'autres radicaux (HO^{\bullet}) en interaction avec les ions métalliques (Pisoschi & Pop. 2015).

II.1.2. Origine des ROS :

Les radicaux libres peuvent avoir plusieurs origines comme lors des réactions de détoxification (P450), dans la chaîne mitochondriale, lors de l'activité de NADPH oxydase ou Xanthine Oxydase (Figure II.1).

Dans le processus d'aérobie, l'oxygène est utilisé pour oxyder le carbone et l'hydrogène des molécules organiques afin de produire l'énergie chimique ; l'oxygène est alors réduit par une série d'étapes en formant des ROS intermédiaires. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est le point axial de cette réaction, il peut être produit au cours de la phosphorylation oxydative de la chaîne de transport d'électrons mitochondriaux, comme aussi par les différentes enzymes oxydases (dihydro-nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate Oxydase, xanthine Oxydase, cyclooxygenase) (Pisoschi & Pop. 2015).



L'anion super-oxyde prend origine aussi du radical **hydroperoxyl** (HO_2^{\cdot}) instable qui se dissocie à pH physiologique pour donner $O_2^{\cdot-}$. L'anion super-oxyde est un radical nucléophile active capable d'attaquer les éléments chargés positivement et interagit avec les donneurs d'hydrogène comme les lipides (Pisoschi & Pop. 2015).

Le H_2O_2 peut être généré par n'importe quel système qui génère l' $O_2^{\cdot-}$ car l'anion se dismute facilement. Une présence d'oxydase (Glucose oxydase, D-animoacid oxydase.) peut générer directement du H_2O_2 ou l' $O_2^{\cdot-}$.

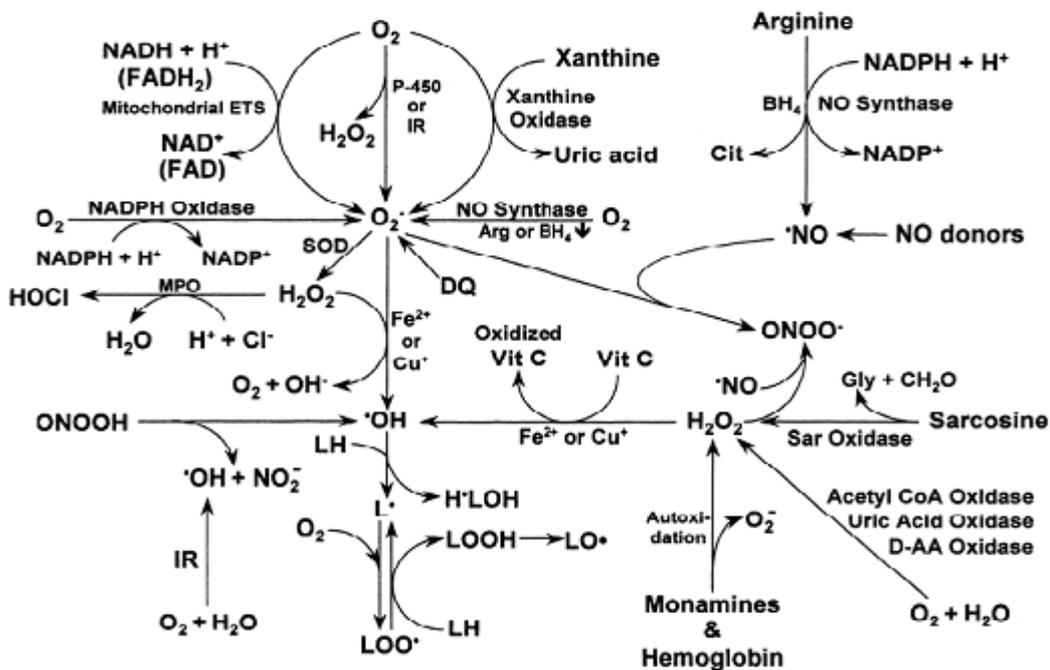


Figure II.1 : Production des ROS et RNS (Fang *et al.*, 2002)

II.1.3. Les effets sur la membrane « la peroxydation lipidique »:

La membrane plasmique n'est qu'une bicouche de phospholipides conçue à partir d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Les AGPI interagissent avec l'oxygène pour former des peroxydes, d'où le nom « peroxydation lipidique ». Une peroxydation est une réaction en chaîne, dont le non contrôle, peut mener à la destruction de la structure membranaire (Shahidi & Zhong 2005).

La peroxydation lipidique est subdivisée en trois étapes : **l'initiation**, la **propagation** et la **terminaison**.

L'initiation démarre avec un radical libre ($X\bullet$) qui génère à partir d'un substrat lipidique (LH) un radical lipidique ($L\bullet$). La réaction est instruite par une abstraction d'hydrogène faiblement attaché par un oxydant fort. Le radical alkyl ($L\bullet$) induit la formation de diènes conjugués des lipides (Albert & Gerotti. 1985 ; Shahidi & Zhong 2005).

La **propagation** s'engage en présence d' O_2 pour former des radicaux peroxydes ($LOO\bullet$) et d'autres dérivés oxygénés (radicaux alkoxyles, endoperoxydes, époxydes) ; Ces derniers ($LOO\bullet$) vont réagir avec d'autre AGPI pour abstraire d'autres hydrogènes en formant des hydroxyperoxydes ($LOOH$) et des radicaux lipidiques ($L\bullet$) d'une manière cyclique (Albert & Gerotti. 1985 ; Shahidi & Zhong 2005).

La **terminaison** survient par épuisement du substrat, la formation de dérivés stables (alkanes, alcools, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques) en exploitant deux alkyles / deux peroxydes, Ou par la réaction avec d'autres substrats antioxydants (Tocophérol, Ascorbate, glutathione, phénols) (Albert & Gerotti. 1985 ; Shahidi & Zhong 2005).

La dégradation finale suite à la peroxydation lipidique résulte à la formation d'un aldéhyde de 3 carbon le Malondialdéhyde (**MDA**). Le MDA est généré dans les réactions horizontales lors de la phase de propagation, ce qui implique la conversion transitoire du lipide peroxyde ($LOO\bullet$) en peroxyde cyclique (ressemblant à la prostaglandine) pour donner le MDA et le dieoic hydroperoxyde (Figure II.2) (Albert & Gerotti. 1985 ; Shahidi & Zhong 2005).

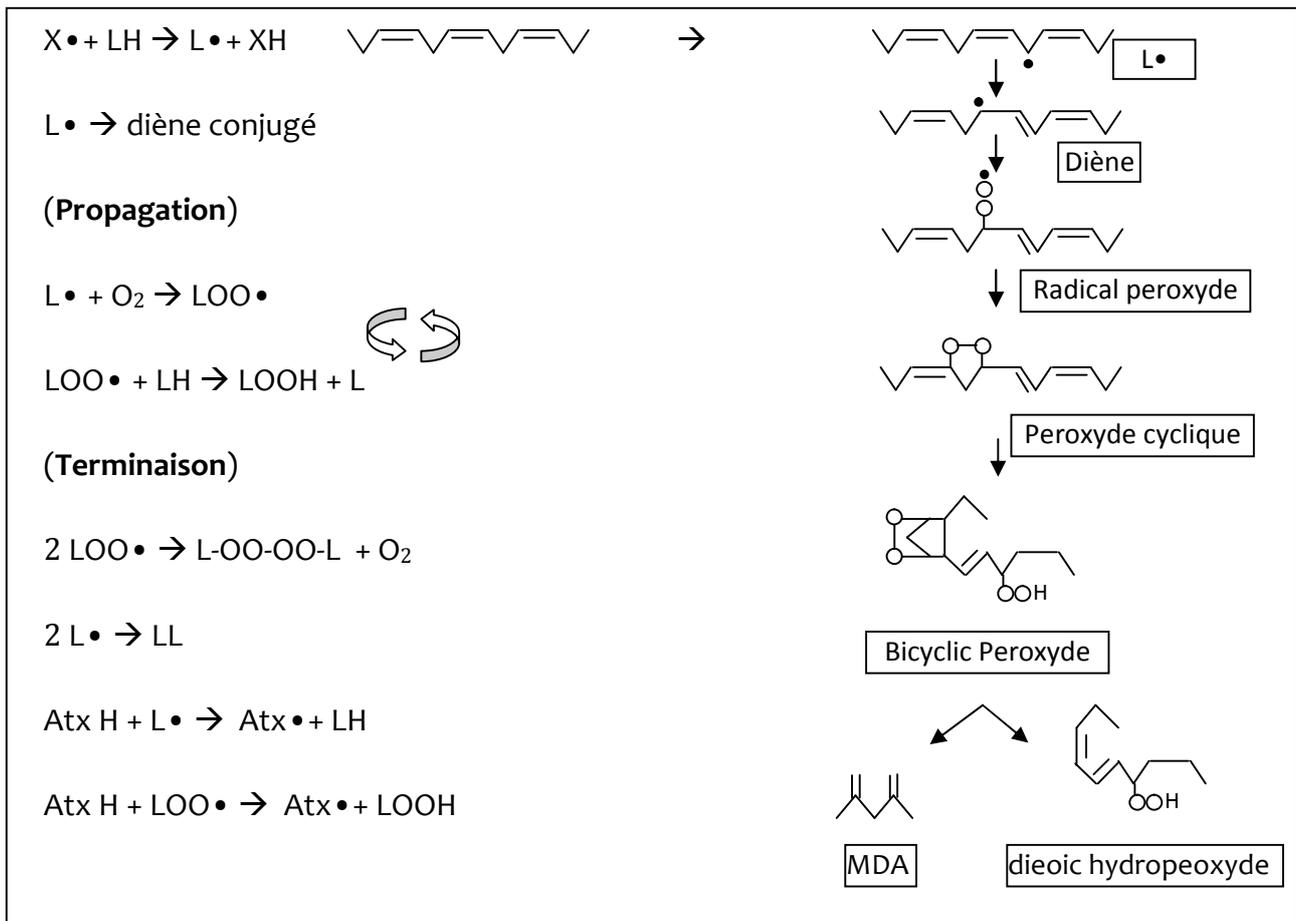


Figure II.2 : diagramme de la peroxydation lipidique (Albert & Gerotti. 1985).

II.2. Le stress oxydatif chez le spermatozoïde:

Le spermatozoïde est une cellule spécialisée conçue pour subir un remodelage membranaire extrême et une hyper-activation de la mobilité hautement dépendante de l'énergie. D'ailleurs, l'élimination de toutes les organelles (RE, Ribosome, Golgi) et l'absence de toutes réserves énergétiques (gouttelettes lipidiques, glycogène) rend le spz hautement dépendant de l'environnement externe en substrats, enzymes et antioxydants.

Le spz répond au grand besoin d'énergie par la métabolisation immédiate du substrat externe sous deux voies : **glycolyse** et **phosphorylation oxydative** (OXPHOS). Le spz exploite les transporteurs « GLUTs » pour faire rentrer le glucose au milieu

intracellulaire, ces GLUTs sont localisés sur le flagelle et l'acrosome et changent de distribution à la réponse au statut de capacitation pour apporter de l'énergie aux sites des grandes modifications membranaires (Bucci *et al.*, 2010). L'inhibition de la voie OXPPOS provoque un déclin drastique de la mobilité et du contenu en d'ATP (Gibb *et al.*, 2014 ; Gibb & Aitken. 2016).

Chez le spermatozoïde, les ROS peuvent être générés par deux systèmes ; une NADH oxydase au niveau membranaire et une Oxydo-reductase mitochondriale NADH-dépendant de la voie OXPPOS (Bansal & Bilaspuri. 2011). Des évidences montrent que la voie OXPPOS a un lien direct avec la génération des ROS, 1-3% de l'oxygène réduit se transforme en radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) (Halliwell & Gutteridge. 2003). Chez les spz fertiles, une forte activité OXPPOS est associée à une vélocité élevée, cependant après conservation, il est observé une faiblesse d'activité avec un niveau élevé en ROS et en peroxydation (Gibb & Aitken. 2016) . Les radicaux libres engendrés par un stress oxydatif vont compromettre les fonctions du spz (Figure II.1) aussi bien sur le plan membranaire (peroxydation lipidique) que sur le compartiment nucléaire (Gibb & Aitken. 2016).

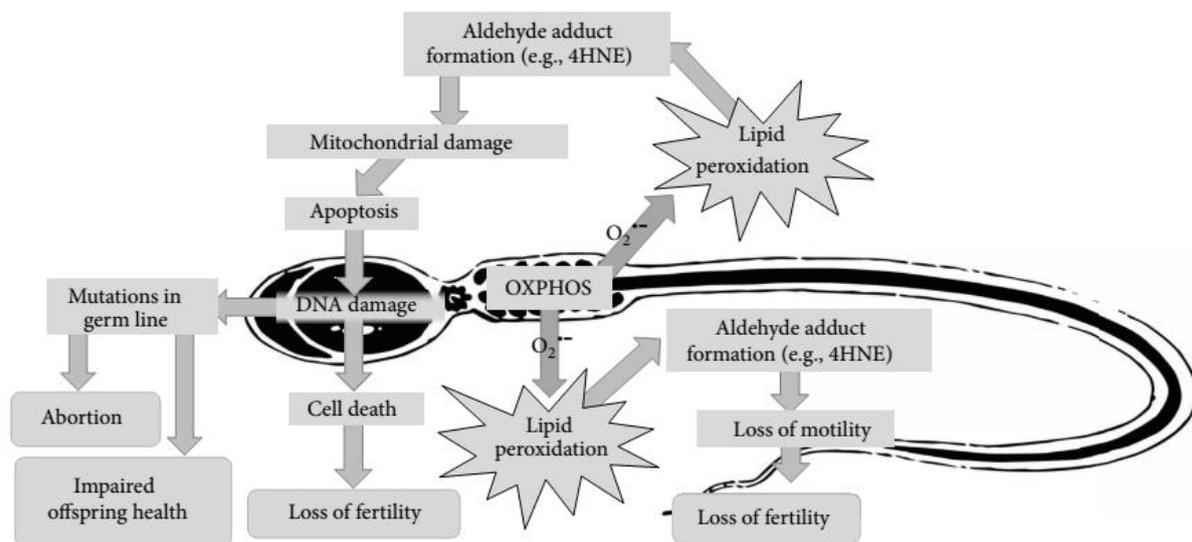


Figure II.3 : Implication d'OXPPOS dans la production des ROS (Gibb & Aitken. 2016).

II.3. Le stress oxydatif lié à la conservation du sperme:

Le stress oxydatif durant la congélation peut être généré par différents mécanismes. Chez les cellules somatique préservées à basse température, la production des ROS est associée à l'activation du NADPH, la cellule en réponse à un stress thermique va recruter un système de sauvetage « cell rescue system (heat choc protein)» et exploiter une voie énergétique subséquente d'un stress oxydatif (Tatone *et al.*, 2010).

Chez le spz, la viabilité et la motilité des spz sont affectées durant la procédure de congélation par des altérations physiques (cristaux de glace) et chimiques (CPA), cependant la production en excès des ROS amplifie la peroxydation lipidique notamment au niveau de la pièce intermédiaire du spz ce qui indique une source mitochondriale des ROS (Brouwers *et al.*, 2005); parallèlement est observé un niveau bas de la GSH (Stradaoli *et al.*, 2007).

Les étapes congélation-décongélation lors de la conservation du sperme engagent le spz à s'adapter aux deux extrêmes d'osmolarité (chapitre I.2), Burnaugh *et al.* (2010) ont montré que ce stress osmotique provoque une augmentation de la production de O_2^- dans des deux conditions hyper et hypo osmotique; ils montrent aussi que cet excès en O_2^- est accompagné par une augmentation dans l'expression de la phosphorylation tyrosine indicatrice de capacitation.

Les mécanismes de régulation entre le changement de volume et le stress oxydatif est attribué à un « cross talk » exploitant les phospholipase A2 (PLA₂) qui s'expriment spécifiquement par le « gonflement » des cellules (Lehtenen & Kinnunen *et al.*, 1995). Ces PLA₂ pourrait activer la NADPH oxydase concomitamment avec l'augmentation de la génération de l'anion super oxyde O_2^- (Aitken *et al.*, 2006). Ainsi, la voie de signalisation de MAP kinase/p38 est associée au gonflement cellulaire; Burnaugh *et al.* (2010) ont observé une diminution de la génération de l'anion superoxide lorsque des spz du cheval sont incubés avec un inhibiteur de la voie MAP kinase avant la cryo6préservation.

II.4. L'utilisation des antioxydants pour la préservation du sperme:

Plusieurs auteurs ont montré l'intérêt de l'utilisation des antioxydants pour la conservation du sperme (revue de [Tariq et al., 2015](#) ; [Amidi et al., 2016](#)). Les stratégies diffèrent entre auteurs selon le type d'antioxydants exploités (enzymatique vs non-enzymatique) et la voie d'administration (per-os ou mélangé au dilueurs).

II.4.1. Les anti-oxydants non-enzymatique :

La vitamine E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) sont deux antioxydants non-enzymatiques utilisés le plus souvent de façon conjointe. La Vit-E (lipo-soluble) permet de neutraliser la peroxydation lipidique *in-situ* des membranes biologiques, alors que le Vit-C (hydrosoluble) a de grande capacité de piéger les ROS et de renouveler la forme inactive de la Vit-E ([Tappel et al., 2011](#)).

Chez l'homme, l'administration per-os de Vit-E (200mg/3mois) est indiqué comme médication des infertilités ([Geva et al., 1996](#)). Chez les mammifères, plusieurs auteurs ont démontré l'effet positive de la Vit-E sur la qualité post-congélation chez différentes espèces, notamment le bovin ([O'Flaherty et al., 1997](#)), le porc ([Breininger et al., 2005](#) ; [Satorre et al., 2007, 2012](#)) et bouc ([Ansari et al., 2012](#)).

La supplémentation du dilueur en Vit-C améliore la motilité, l'intégrité acrosomique et membranaire du sperme chez l'humain ([Branco et al., 2010](#)), bovin ([Dalvit et al., 1998](#) ; [Hu et al., 2010](#)) et le loup de mer ([Martinèz-paramo et al., 2012](#)).

A cause de son hydrophobicité, l'ajout direct dans le dilueur de l' α -tocophérol est remplacé par un analogue plus hydrosoluble « **TROLOX** » (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) qui a un pouvoir élevé de capture des ROS. En conservation spermatique, le TROLOX à concentrations faibles (0,1-1 mM) a été utilisé pour son effet protecteur chez plusieurs espèces animales ([Amidi et al., 2016](#)).

Les concentrations plus élevées (40-200 mM) ont un effet dose dépendant ; Chez l'homme, l'ajout de 40 mM avant la congélation améliore la paramètres kinématiques en post-congélation du sperme ([Minaei et al., 2012](#)); 100-200 mM de TROLOX affecte positivement la qualité membranaire, l'activité mitochondriale et la viabilité du sperme du porc ([Pena et al., 2003](#)).

D'autres antioxydants non-enzymatiques sont utilisés pour palier au stress oxydant lors de la cryo-préservation comme le glutathione (GSH), L-Cystéine ; Ergothionine et sélénium. Le **glutathione** (GSH) est un thiol impliqué directement dans la neutralisation des ROS ; le glutathione-peroxydase (GSH-Px) utilise le GSH pour réduire le H_2O_2 en H_2O . la supplémentation de dilueurs en GSH améliore le niveau des ROS (Gadea *et al.*, 2011) ; l'intégrité du ADN (Varghese *et al.*, 2005) et de l'acrosome (Silva *et al.*, 2011) mais est sans effet sur la peroxydation et la viabilité des gamètes.

La **L-Cystéine** est un acide aminé contenant un groupe thiol qui peut pénétrer facilement la membrane et participe dans la biosynthèse du GSH. Son rôle antioxydant est alors un piégeage indirect, il permet aussi la stabilisation de la membrane et inhibiteur de la capacitation (Coyan *et al.*, 2011). La L-Cystéine améliore la qualité en post-décongélation chez le bovin (Biloudou *et al.*, 2001), le mouton (Andreea & Stela, 2010), et le bouc (Bucak & Uysal, 2008) ainsi que la viabilité cellulaire et la structure chromatique chez le porc (Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2003).

II.1.4.1. Les anti-oxydants enzymatiques :

La **Super-Oxide-Dismutase** (SOD) et la **Catalase** (CAT) sont deux enzymes majeurs impliquées dans la défense anti-radicalaire. La SOD va convertir l' O_2^- en H_2O_2 et le CAT transforme le H_2O_2 en H_2O et O_2 . La source majeure en SOD et CAT est le plasma séminal mais à cause de sa dilution l'ajout du SOD et CAT dans le dilueur va enregistrer une amélioration dans la motilité et la viabilité du sperme décongelé, notamment chez le porc (Roca *et al.*, 2003).

Le **Glutathione peroxydase** (GSH-Px) est une enzyme contenant du sélénium qui agit comme un catalyseur ; Le GSH-Px a une bonne activité protectrice sur la motilité et l'intégrité acrosomique chez le bouc (Roca *et al.*, 2003).

Chapitre III

La Cyclodextrine

Chapitre 03 : La Cyclodextrine

III.1. Structure et propriétés des cyclodextrines :

Les cyclodextrines (CDx) sont des oligosaccharides macrocycliques issus de la dégradation enzymatique de l'amidon ; ils sont composés de polymères cycliques d'unité de glucoside. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose (en conformation 4C_1) et dénommées respectivement α -, β - ou γ -cyclodextrine (**Figure III.1**).

Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur et cavitaire à l'intérieur ; ce cône présente une partie étroite « face primaire » et une base large « face secondaire » (**Figure III.1**). Une telle disposition est liée aux emplacements des hydroxyles (OH) portés sur différents atomes de carbone dénommés primaires ou secondaires selon leurs orientations vers la partie étroite (OH primaires) ou large (OH secondaires). Les OH primaires sont portés par le carbone C6 qui se trouve du côté le plus étroit (face primaire) tandis que les OH secondaires sont portés par C2 et C3 sur le côté le plus large (face secondaire) ([Dodziuk, 2006](#) ; [Castang, 2010](#)).

L'orientation des hydroxyles C2, C3 et C6 confère à la surface extérieur une propriété hautement hydrophile. La rotation des hydroxyles primaires en C6 diminue le diamètre effectif de la cavité du côté étroit du cône, alors que les hydroxyles secondaires sont en position plus figée. L'intérieur de la cavité est délimitée par des atomes d'hydrogène portés par les carbones C3 et C5 ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique ce qui lui confère un caractère apolaire hydrophobe. ([Castang, 2010](#)).

Le tableau III.1 présente quelques caractéristiques des CDx naturelles. Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens : β - < α - < γ -CD. Les CDx sont des molécules excipients (conteneur) qui pourraient abriter dans leurs cavités différents composés organiques et inorganiques de différentes charges (+, -, neutre) ou même radicales. Elles sont largement utilisées pour solubiliser les molécules hydrophobes dans des solutions aqueuses. Les molécules à contenir sont en relation avec le diamètre de la cavité.

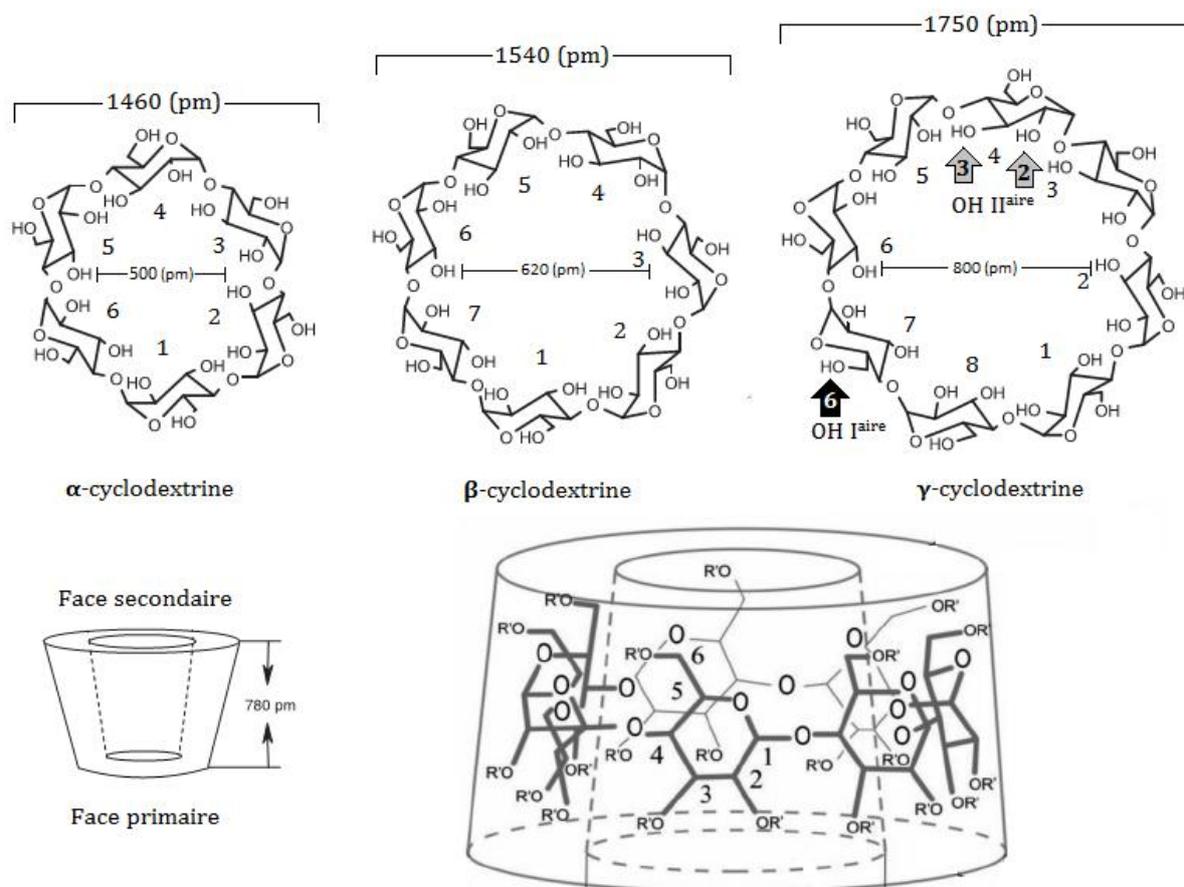


Figure III.1 : Structure des cyclodextrines (adapté de [Dodziuk, 2006](#)).

Tableau III.1. Quelques propriétés chimiques des cyclodextrines ([Dodziuk, 2a006](#))

	α -CDx	β -CDx	γ -CDx
Nombre d'unité glucose	6	7	8
Poids moléculaire	972	1134	1296
Diamètre de la cavité intérieur (pm)	500	620	800
Diamètre extérieur (pm)	1460	1540	1750
Volume de la cavité (10^6 pm^3)	174	262	427
Solubilité dans l'eau ($t^\circ 25^\circ\text{C}$, g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Tension de la surface (MN/m)	71	71	71
Marges de Température de fusion	255-260	255-265	240-245
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6	11	17

Les cyclodextrines peuvent être modifiées afin d'améliorer leurs propriétés de complexation ce qui les rend plus appropriées à différentes applications, particulièrement l'augmentation de la solubilité et d'atteindre une grande sélectivité. Les dérivés de synthèse des CDx sont obtenus suite à la substitution des groupes hydroxyles (OH) par d'autres groupes hydroxypropyle (HP- ; R= [CH₂-CH(CH₃)-O]_n-H), sulfopropyl (SBE- ; R= [CH₂]₄-O-SO₃Na) et carboxyméthyl-cyclodextrines (Meb- ; R= CH₃) (Hattori & Ikeda, 2006).

Le greffage de ces substituant sur les OH réactionnels (respectivement (α-) 18, (β) 21 et (γ) 24) peut être aléatoire ou bien ciblé. Il est caractérisé par un degré de substitution (D.S.) moyen qui s'applique sur un seul OH (mono-modification en C6, C2 ou C3), ou à une substitution des trois groupes OH, appelée la "per-modification". En effet, le C6-OH est basique et le plus nucléophile, le C2-OH est acide alors que le C3-OH est le plus inaccessible à la substitution (Hattori & Ikeda, 2006).

Les CDx modifiées sont synthétisées pour obtenir une solubilité aqueuse supérieure à celle des composés parents, surtout dans le cas de la β-CDx (faiblement soluble), où l'augmentation du degré de méthylation favorise la solubilisation jusqu'à ce que 2/3 de tous les groupements hydroxyles soient substitués (Tableau III.2). On observe à titre d'exemple une nette amélioration de la solubilité de 1,85g/100mL (β-CDX naturelle) à 57g/100mL (Dimeb-β-CDx), ce qui représente un gain de plus de 3000%.

Tableau III.2. Caractéristiques de quelques cyclodextrines modifiées (Castang, 2010)

Cyclodextrine	DS	Masse moléculaire	Solubilité à 25°C (g/100mL)
Dimeb- β-CD	2	1331	57 ^a
Trimeb- β-CD	3	1429	31 ^a
Rameb- β-CD	1,8	1312	>50 ^b
Crysmeb- β-CD	0,57	1191	22 ^c
HP- β-CD	0,65	1400	>60 ^b
SBE- β-CD	0,9	2163	>50 ^b
HP-γ-CD	0,6	1676	>50 ^b

^a(Mosher & Thompson, 2000), ^b(Loftsson & Duchene, 2007), ^c(Roquette Frères, 2006) In : (Castang, 2010)

III.2. Les Complexes d'inclusion à la cyclodextrine :

Le fait que les cyclodextrines possèdent une structure particulière et une double polarité, elles ont permis à des molécules “d'intérêt ” lipophiles d'être encapsulées – totalement ou partiellement- dans les cavités hydrophobes des CDx. En effet, utiliser les CDx comme “conteneurs” est une technologie particulière pour augmenter la solubilité aqueuse des composés lipophiles et un moyen intéressant qui présente un vaste éventail d'applications.

Une CDx non complexée ne présente pas une cavité vide, quand elle ne contient aucune molécule « abritée », il y a au moins une molécule du solvant à l'intérieur de cette cavité. Dans le solvant “Eau”, Le processus d'inclusion se met en place par remplacement, dans la cavité des molécules d'eau par des molécules hydrophobes. Malgré que la compréhension de la force qui dérive la complexation n'est pas totalement cernée, on sais qu'il n'y a aucun lien covalent formé ou rompu durant le processus ; la seule force qui stabilise le système sont des associations attractives apolaires-apolaires de “**Van der Waals**” entre molécule « abritée » et la paroi cavitaire de CDx (Del Valle, 2004). Le processus de complexation est réversible, les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution qui peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité.

On parle de complexe 1:1 lorsqu'une molécule invitée interagit avec une molécule de cyclodextrine. Un complexe 1:2 voire 1:3 est formé si la molécule invitée est de grande taille et si plusieurs molécules de cyclodextrines peuvent interagir avec elle. Par contre, un rapport 2:1 est obtenu dans le cas où la cavité de la cyclodextrine est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules. La taille de la cavité et de la molécule invitée ainsi que leurs caractéristiques jouent un rôle important dans le processus de complexation (Szejtli, 1988).

III.3. Aperçu sur les domaines d'applications des cyclodextrines :

Parce que on peut varier les substances “d'intérêt” et leurs conteneurs appropriés, les cyclodextrines et leurs complexes présentent d'innombrables formes d'applications en pharmacologie, cosmétique, industrie alimentaire, chimie, nanotechnologie, culture cellulaire et autres.

Dans ce sous chapitre, nous exposerons brièvement quelques exemples d'applications de cyclodextrines. Mais surtout, nous nous focaliserons sur les complexes de deux substances utilisées dans notre travail, le cholestérol et la vitamine E.

Cette technologie peut être utilisée pour différentes stratégies : afin de stabiliser des substances sensibles à l'oxydation ou à la lumière ; modifier la réactivité chimique d'une substance désirée ; améliorer la solubilité ; modifier la texture des liquides et solides ; protéger contre la dégradation microbienne ; masquer les pigments, couleurs et odeurs non tolérées et constituer un microenvironnement catalyseur d'une réaction enzymatique ([Hattori & Ikeda, 2006](#)).

En **formulations médicamenteuses**, les dérivés de CDx sont applicables comme des conteneurs fonctionnels à propriétés multiples ; puisque les CDx sont bien tolérables par la voie orale, faiblement toxiques et résistent à l'acidité gastrique, les CDx améliorent la solubilité, la stabilité et biodisponibilité des molécules médicamenteuses et servent à contrôler la cinétique de libération du médicament. A titre d'exemple, les β -CDx méthylées ont été utilisées pour augmenter la biodisponibilité orale de l'**Itraconazole**, **Tacrolimus**, **Closporine** et l'**Insuline**. Elles peuvent réduire l'irritation gastrique du **Piroxicam**, et le complexe d'inclusion **Degoxine-CDx** supprime son hydrolyse acide dans l'estomac. Les CDx sont aussi utilisées pour masquer le goût bitter de quelques anti-histaminiques (**Diphenhydramine**, **Cetirizine**, **Epinastine**), ou ralentir la photo-decarboxylation du **Benoxaprofen** en constituant un microenvironnement alcalin. En forme solide, les CDx hydroxy-propylées et méthylées inhibent la dégradation thermique des substances huileuses comme la **Prostaglandine-E** suite à une faible conductivité thermique ([Uekama et al., 2006](#)).

Pour **contrôler la libération** du médicament, plusieurs dérivés des CDx ont été utilisés pour différents objectifs. Le contrôle du profilé “taux plasmatique/temps” après une administration orale est classé en : 1) libération **immédiate**, 2) **retard** et 3) **prolongée**. Par exemples, les CDx hydrophyles améliorent la libération immédiate des substances faiblement hydrosolubles comme les prostaglandines, stéroïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antidiabétiques et les vitamines liposolubles (Uekama *et al.*, 2006). On utilise les CDx hydrophobes (éthylées) pour favoriser la libération lente d’une substance soluble avec une faible demi-vie, la libération **d’Isosorbide** complexé en film cutané est ainsi prolongée pour 10h (Hirayama *et al.*, 2001); le complexe **Metroprolol/β-CDx/Ethylcellulose** réduit la posologie à une prise/24h suite à une formulation d’un gel visqueux dans des tablettes micro-poreuses (Uekama *et al.*, 2006).

Les CDx permettent aussi des formules plus innovantes avec les liposomes en constituant des micro-ou nano-sphères polymériques ; le concept “ **Drug-in-CDx-in-Liposome**” augmente la quantité du principe actif encapsulé dans la partie aqueuse des liposomes (Singh *et al.*, 2002). Les CDx se présentent aussi dans un système dispersé de billes semi-solides (0.3 à 8 mm) composées de CDx, eau, et huile de soja pour libérer efficacement les principes actifs lipophiles (Castang, 2010).

Par ailleurs, les cyclodextrines non complexées sont utilisées comme **promoteurs de pénétration** (Matilainen *et al.*, 2008). Les CDx méthylées vont altérer les propriétés de barrière des membranes biologiques par l’extraction de composés lipidiques ou par leur fluidification, ce qui favorise le passage de substances actives. Leur mécanisme d’action comme promoteurs d’absorption (à travers l’épithélium respiratoire par exemple) pourrait également s’expliquer par leur capacité à ouvrir ou perturber transitoirement les jonctions serrées et donc le passage para-cellulaire (Belhadj Salem *et al.*, 2009).

III.3.1 Les interactions cyclodextrines - membrane plasmique :

L'affinité des cyclodextrines aux substances lipidiques a permis de les utiliser pour manipuler les constituants lipidiques de la membrane plasmique sur différents modèles cellulaires. Parmi les éléments de la bicouche, le cholestérol a été ciblé à cause de son importance sur la fluidité et sur le fonctionnement des radeaux lipidique « rafts » et les voies de signalisation qu'ils assurent. La déplétion de la membrane de son cholestérol « **Cholesterol Efflux** » ou bien son enrichissement sont les deux principales applications des CDx ; les cyclodextrines peuvent aussi interagir avec les autres constituants phospholipidiques ou protéiques.

III.3.1.1. La manipulation du cholestérol membranaire :

L'utilisation des CDx comme un système accepteur de stérols a été étudié depuis les années 90 (Kilsdonk *et al.*, 1995). En particulier, la β -cyclodextrine apparaît plus efficace pour accepter les stérols à cause de son diamètre approprié. La déplétion est en fonction du type de CDx, sa concentration, le temps d'incubation, la température et le type cellulaire. Les Méthyl- β -CDx apparaissent plus efficaces que celles hydroxypropyl- β -CDx, carboxyméthyl β -CDx, et les sulfates- β -CDx. En effet, après 8 heures d'incubation avec une dose élevée de méthyl- β -CDx (5-10 mM) on provoque une déplétion de 80-90% du cholestérol des fibroblastes murins, contre environ 50% pour hydroxypropyl- β -CDx (Kilsdonk *et al.*, 1995); Les cellules vont ainsi perdre leur morphologie, et dans les cas extrêmes vont être non viables.

Le degré de déplétion en cholestérol peut être différent entre les types cellulaires utilisés. Le tableau III.3 montre une grande variabilité malgré l'utilisation d'une dose et une incubation comparable. La majeure partie du cholestérol est libérée durant les deux premières heures d'incubation, puis, un équilibre est atteint.

Dans certaines conditions, une incubation courte (30 min) à faible concentration (0,5mM) provoque une augmentation en cholestérol cellulaire chez les lymphocyte T et le fait d'augmenter la durée d'incubation à 60 min inversera le phénomène (Zidovetzki *et al* 2007).

Tableau III.3. : Exemples de déplétion de cholestérol libre par Méthyle- β -CDx

[M β -CDx]/temps	Type cellulaire	Déplétion	Auteurs
20 mM/8 h	Mouse fibroblast	~100%	Kilsdonk <i>et al.</i> , 1995
10 mM/2 h	Rod disk membrane	~65%	Niu <i>et al.</i> , 2002
10 mM/1h	Mast cells	~60%	Sheets <i>et al.</i> , 1999
10mM/1h	Arterial rings	~20%	Dreja <i>et al.</i> , 2002
5 mM/8h	Mouse fibroblast	~80%	Kilsdonk <i>et al.</i> , 1995
5 mM/2h	Aortic endothelium	~90%	Levitin <i>et al.</i> , 2000
2,5 mM/2h	Rat hepatoma	~70%	Christian <i>et al.</i> , 1997
0,5 mM/0,3h	Lymphocyte T	2 fois +	Fulop <i>et al.</i> , 2001
0,5 mM/1h	Lymphocyte T	~30%	Fulop <i>et al.</i> , 2001

Adapté de [Zidovetzki et al., 2007](#)

La β -CDx se comporte aussi comme un « donneur » de cholestérol où la M β -CD s'est avérée meilleur que le dérivé hydroxy-propylé ([Christian et al., 1997](#)). Les complexes synthétisés *in-vitro* de cholestérol:cyclodextrines permettent d'enrichir les membranes en cholestérol ([Yancey et al. 1996](#)).

Les β -cyclodextrines seraient capables d'appauvrir en cholestérol des fractions de membranes correspondant aux radeaux lipidiques (« raft fractions ») ou non (« non-raft fractions»). L'extraction du cholestérol par les cyclodextrines perturbe l'organisation de ces microdomaines et interfère avec leur fonctionnalité ([Zidovetzki et al., 2007](#)).

L'extraction du cholestérol par les CDx est exploitée pour étudier la fonction des radeaux lipidiques et des cavéoles membranaires. Ces micro domaines hétérogènes riches en sphingolipides et cholestérol, auxquels sont également associées des molécules spécifiques telles que les récepteurs à activité tyrosine kinase ([Anderson and Jacobson, 2002](#)), sont impliqués dans la transduction des signaux cellulaires ([Pike, 2006](#) ; [Zidovetzki et al., 2007](#)) et jouent de plus un rôle essentiel dans divers processus biologiques comme l'apoptose, l'adhésion et la migration cellulaire, les transmissions synaptiques, l'organisation du cytosquelette ([Castagn. 2010](#)).

III.3.2 Les complexes cyclodextrines - tocophérols :

III.3.2.1. Structure et propriété des tocophérols :

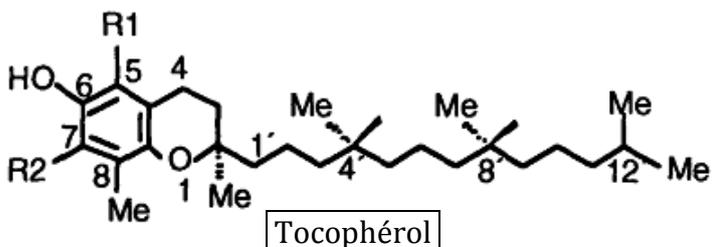
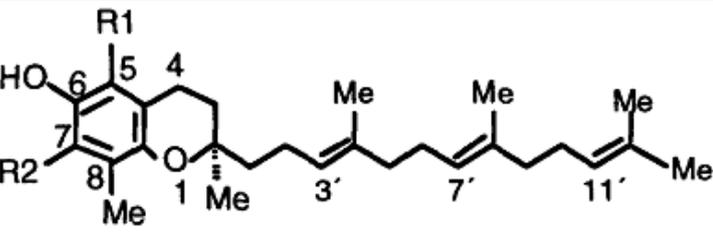
La vitamine E (Vit-E) a été découverte suite aux travaux d'Evans et Bishop. (1922) comme un facteur (X) essentiel pour la reproduction ; ensuite, la nomenclature octroyée est « toco,phér,ol » pour “tokos” (naissance) et “phorein” (avoir quatre) ; le suffixe “ol” indique sa nature phénolique (Kamel-Eldin et Appelvist, 1996).

La Vit-E possède deux formes essentielles, tocophérol et tocotrienol qui se compose structurellement d'un noyau chromanol (avec deux anneaux, phénolique et hétérocyclique) nommé α , β , γ ou δ selon le nombre de substitution en méthyle sur le noyau phénolique et une chaîne latérale de 16 atomes de carbone.

Le tocophérol possède une chaîne saturée et le tocotrienol possède un noyau chromanol identique mais une chaîne insaturée dans trois positions (**tableau III.4**).

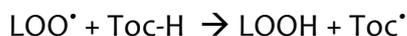
La vitamine E se caractérise par un caractère lipophile et un potentiel antioxydant ; elle représente un inhibiteur efficace de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques.

Tableau III.4. Structure de la vitamine E : tocophérol et tocotrienol

 <p style="text-align: center;">Tocophérol</p>	R1	R2	Nomenclature
	CH ₃	CH ₃	α -tocophérol
	CH ₃	H	β -tocophérol
	H	CH ₃	γ -tocophérol
	H	H	δ -tocophérol
 <p style="text-align: center;">Tocotrienol</p>	R1	R2	Nomenclature
	CH ₃	CH ₃	α -tocotrienol
	CH ₃	H	β -tocotrienol
	H	CH ₃	γ -tocotrienol
	H	H	δ -tocotrienol

Adapté de (Kamel-Eldin et Appelvist, 1996)

Le caractère antioxydant des tocophérols (Toc) a été relié au transfert de proton d'hydrogène du groupe "OH" du Toc-H par un radical peroxy (LOO[•]); le transfert produira un radical Toc[•], qui se combine avec un autre radical peroxy pour avoir un produit final non réactif (Mukai *et al.*, 1992).



En utilisant la chimiluminescence du luminol (éclat bleu) induit par un générateur de radical peroxy (ROO[•]) AMVN (2,2'-Azobis-2,4-di-Méthyl-Valero-Nitrile), Susuki *et al.* (1993) ont démontré le potentiel antioxydant de l' α -tocophérol et α -tocotrienol dans un modèle de liposome. Ces molécules sont capables de désactiver la chimiluminescence induit par l'AMVN par des concentrations respectives de 50 nM (α -tocophérol) et 15 nM (α -tocotrienol). Ils indiquent aussi que les α -tocotrienols sont plus efficaces sur le potentiel de piégeage des ROO[•] que ceux des l' α -tocophérols (Figure III.2).

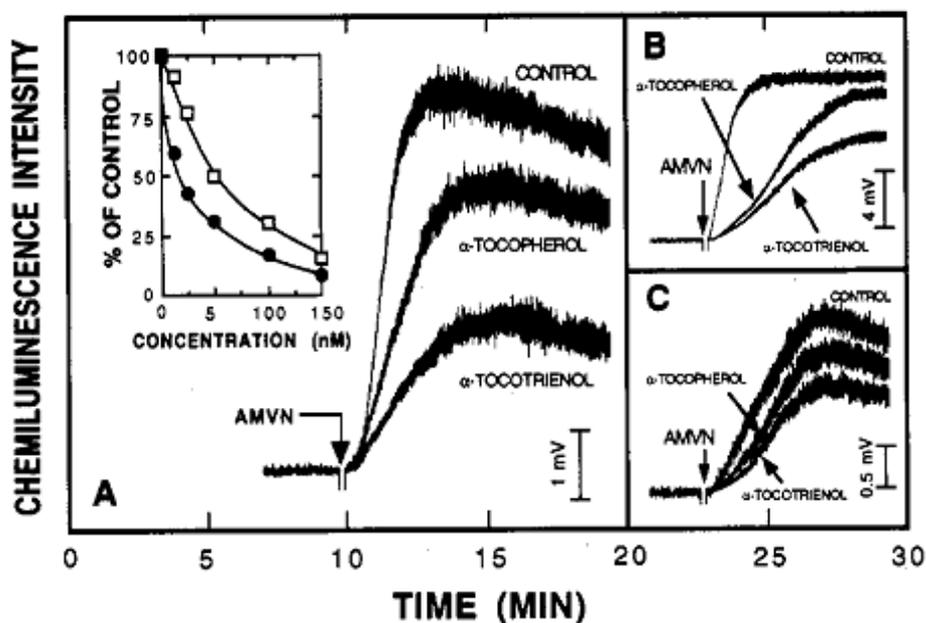


Figure III.2 : comparaison de l'activité anti-oxydante par chimiluminescence de α -tocophérol et α -tocotrienol dans un modèle de liposome. Le générateur de radical peroxy ROO[•] est AMVN (2,5mM); luminol (150 μ m). **a.**) 40°C [Vit-E]=25 nM ; **b.**) 50°C [Vit-E]= 200 nM ; **c.**) 30°C [Vit-E]=5 nM. (Susuki *et al.* 1993).

III.3.2.2. Le complexe cyclodextrines-tocophérols :

La cyclodextrine est une molécule utile pour solubiliser la Vit-E pour augmenter sa biodisponibilité, mais aussi, pour évaluer le potentiel de piégeage “scavenger” de celle-ci dans les conditions des milieux aqueux. Sur un plan structurel, [Sueishi et al. \(2012\)](#) ont suggéré par des mesures de résonance magnétique nucléaire (NMR) que le complexe d'inclusion du di-méthyl- β -cyclodextrine avec les différents analogues de la Vit-E abrite la chaîne latérale de cette dernière dans la cavité de la CDx ; ceci indique que l'effet de la complexation est négligeable sur le potentiel antioxydant du noyau chromanol réactif (**Figure III.3**).

L'évaluation du potentiel scavenger du complexe di-méthyl- β -CDx-VitE dans le milieu aqueux à l'égard du radical oxygène (RO^{\bullet}) par une méthode spectrométrique **ORAC-EPR** (Oxygen Radical Absorbance Capacity by Electron Paramagnetic Resonance) (dont le RO^{\bullet} est mesuré directement par spin-trap) a démontré un potentiel antioxydant sous le même ordre de $\alpha > \beta \approx \gamma > \delta$ -tocophérols que celui des tocophérols non complexés. Le potentiel de piégeage des complexes β -CDx tocophérol est comparable aux complexes avec les tocotrienols ([Sueishi et al., 2012](#)) (**Tableau III.5**).

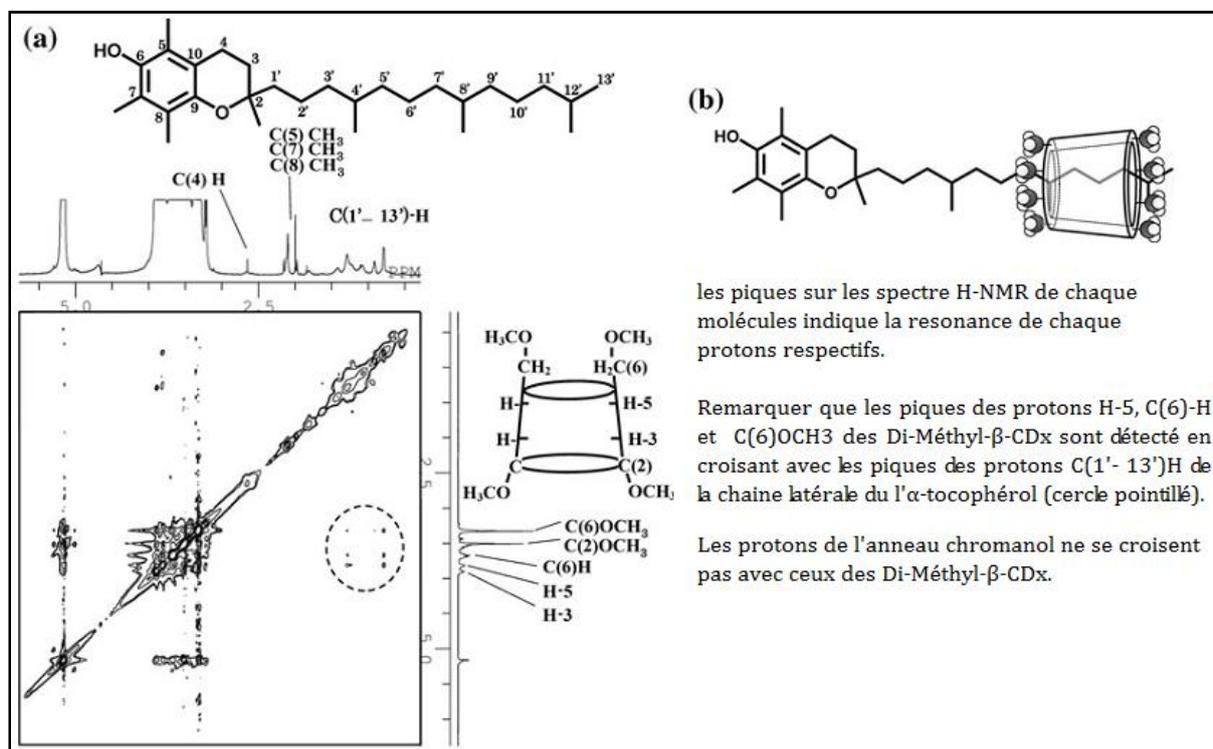


Figure III.3 : a.) 2D NMR spectre à 29°C, [α -tocopherol] = 10×10^{-3} mol dm⁻³, [β Methyl-CDx] = 10.3×10^{-3} mol dm⁻³. b.) La structure plausible du complexes β -CDx-toc.

Tableau III.5 : Les potentiels du piégeage du radical RO' des différents complexes des analogues de la Vit-E en terme de constants "k" par ORAC-EPR (Sueishi et al., 2012).

Dérivés de VitE/D-Methyl-β-CDx	k_{AOx}/k_{DMPO}	$k/k_{\alpha\text{-Tocophérol}}$
α-Tocophérol:CD	7,32 ± 0,30	1,0
β-Tocophérol:CD	4,14 ± 0,25	0,57
γ-Tocophérol:CD	4,96 ± 0,42	0,68
δ-Tocophérol:CD	2,99 ± 0,11	0,41
α-Tocotrienol:CD	8,46 ± 0,09	1,16
γ-Tocotrienol:CD	3,49 ± 0,10	0,48
δ-Tocotrienol:CD	2,96 ± 0,10	0,40

k_{AOx} = constant de piégeage du RO' de l'antioxydant en complexe avec CDx ; k_{DMPO} = constant de piégeage d'un spin-trap DMPO (5,5-diméthyl-pyrroline N-oxide) en complexe avec CDx ; k_{AOx}/k_{DMPO} = le rapport de compétition entre AOx et DMPO ; $k/k_{\alpha\text{-Tocophérol}}$ = rapport entre le potentiel de piégeage des différents complexes sur le potentiel de l'α-tocophérol non complexé. Le générateur du radical RO' est AAPH (2,2'-Azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride) par une irradiation à UV.

En milieu aqueux, et par le biais des complexes à cyclodextrines, les tocophérols et tocotrienols semblent avoir des potentiels antioxydants comparables. Susuki et al. (1993) suggèrent sur un modèle de liposome que les tocotrienols exhiberaient un potentiel de piégeage significativement plus élevé que les tocophérols. Néanmoins, selon Sueishi et al., (2012), la comparaison avec l'α-Tocophérol naturel montre que le complexe avec les CDx n'atténue pas le potentiel anti-oxydant en faveur des dérivés α-phérol et α-trienol.

III.4. Les applications des cyclodextrines dans la biotechnologie spermatique :

III.4.1. La CDx pour moduler la capacitation et la fertilisation *in-vitro*:

En biotechnologie spermatique, les cyclodextrines sont utilisées pour moduler la capacitation et la réaction acrosomique (AR) *in-vitro*, lesquelles sont étroitement liées avec la déplétion du cholestérol “cholestérol efflux” (Iborra *et al.*, 2000). L'utilisation des CDx présente l'avantage d'étudier *spécifiquement* la dynamique du cholestérol-efflux sur ces phénomènes, contrairement à l'utilisation classique du fluide utérin ou folliculaire qui présentent différents voies promotrices de capacitation et d'AR, dont les principaux sont l'albumine, L'HDL et la progestérone. De même, l'utilisation *in-vitro* de l'albumine issu du sérum sanguin bovin (BSA) présente des impuretés lipidiques et la présence d'autres activateurs d'AR qui peut expliquer des résultats controversés des différentes études (38% sur 2h (Langlais *et al.*, 1988) ; 5 % sur de 5 h (Sugkraroek *et al.*, 1991) ; 15 % sur 15 h (Benoff *et al.*, 1993). Aussi, l'utilisation de l'héparine ne trouve que peu d'intérêt pour initier la capacitation sur les spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires (qui ne présentent pas les protéines manteaux réactives à l'héparine), alors qu'on peut explorer par le biais des CDx la capacitation et l'AR dans cette classe.

Iborra *et al.* (2000) ont montré chez le spz du mouton que le Chl-efflux par β -CDx est plus rapide ($t_{1/2} \approx 10$ min) comparé à celui du fluide folliculaire ($t_{1/2} > 1$ h), la déplétion est dose dépendante (30% à 2 mM β -CDx ; 50 % à 4 mM β -CDx) mais seulement un efflux de 50 à 65 % est capable d'induire la réaction acrosomique ; le fait d'utiliser plus 8 mM β -CDx n'a aucun effet notable sur le Chl-efflux ni sur l'AR.

Dans la fécondation *in-vitro* (IVF), la β -CDx (1,5 mM) augmente significativement le taux de fertilisation des oocyte (66% Takeo *et al.*, 2008 ; 70% Kato *et al.*, 2010 ; 80% Nagao *et al.*, 2010) et la capacité d'attachement à la zone pellucide (Parinaud *et al.*, 2000). Le traitement des spz par CDx s'applique aussi dans l'Intra-Cytoplasmic-Sperm-Injection (ICSI). En effet, le fait de l'intromission forcée de la membrane et du contenu acrosomique (enzymes) d'un spz non capacité dans l'ooplasme du zygote provoquerait des aberrations chromosomiques chez les embryons. Les $M\beta$ -CDx (1 mM) réduisent significativement les taux de ces aberrations de 10,8 % à 4,5 % (Tateno, 2010) et augmentent la réussite de ICSI (Aguila *et al.*, 2017).

III.4.2. L'utilisation des CDx dans la congélation spermatique :

A). L'utilisation des cyclodextrines non complexées :

Le potentiel des CDx “non chargées” sur la conservation du sperme est peu étudié. Cependant, [Zeng et Terada. \(2000, 2001\)](#) ont montré qu'exposer le sperme du **porc** aux hydroxypropyle- β -CDx ou Méthyle- β -CDx durant la phase d'équilibration (3h) à 5°C augmente significativement les paramètres en post-décongélation avec des effets sur : **1).** L'intégrité acrosomique de l'ordre de **40~60%** pour **20-40mM** H β CD/M β CD, **2).** La motilité à 37°C pendant 2h d'incubation (**~44%** pour **20mM** H β CD/M β CD, **13-16%** control), et **3).** Les paramètres CASA (VSL : **28 vs 23** μ m/s, LIN : **60 vs 53%**, STR : **80 vs 74%**). Les deux études ([Zeng et Terada. 2000, 2001](#)) ont noté aussi que le fait d'ajouter le cholestérol (**10mM**) aux H β CDx/M β CD annule l'effet protecteur que les formes non complexées ont fournit (L'IA s'est diminuée à **20%**, la motilité à **5~14%**, VSL à **13** μ m/s, LIN à **47%** et STR à **62%**).

Dans le même sens, [Partyka et al. \(2016\)](#) ont observé chez le **coq**, que Le traitement avec **2mg** d'HBCD a amélioré –en comparaison avec le CLC (**2mg**)- (Tableau III.6) le pourcentage de viabilité (**53,5% vs 43,1%**), motilité (**23,5% vs 19%**), VCL (**78,9% vs 59,5%**), VSL (**29,56% vs 19,8%**), VAP (**39,6% vs 26,4%**) et LIN (**37% vs 26.4%**) après décongélation. Cependant chez le **bovin**, [Lee et al., \(2016\)](#) ont montré des résultats controversés et ils ont noté que le traitement du sperme sexé par M β CD a significativement réduit la viabilité (< **20%**) et a augmenté les dommages acrosomiques (entre **20%** et **40%**) avec plus de vulnérabilité des spermatozoïdes Y.

B). L'utilisation du Cholestérol-loaded-Cyclodextrins (CLC) :

Les Cdx –“**conteneur**”– offrent plusieurs intérêts d'application pour enrichir la membrane spermatique par du Cholestérol (Chl). Le Chl s'interagit avec les chaînes gras des phospholipides (PL) et permet de moduler la fluidité et le maintien d'un arrangement lamellaire aléatoire, et le fait d'augmenter le ratio Chl/PL élargit la phase de transition et réduit la perte membranaire lorsque la température décroît ([Amann et Pickett, 1987 ; Drobnis et al. 1993](#)).

Pour cette raison, le concept de traiter le sperme par du Cholesterol-Loaded-Cyclodextrins (CLC) pourrait préserver l'intégrité structurale des spermatozoïdes et améliorer leur tolérance aux dommages de la congélation.

Le traitement du sperme par le CLC a été étudié chez plusieurs espèces animales en utilisant différents types de Cdx et à des concentrations diverses. A température ambiante ou à 37 °C, le CLC améliore la tolérance osmotique et inhibe la réaction acrosomique précoce (Aksoy *et al.*, 2010 ; Serin *et al.*, 2011; Glazar *et al.*, 2000). Chez le cheval, le traitement CLC améliore la durée de réfrigération en préservant une bonne qualité de motilité et de viabilité (tableau III.6), et réduit le taux de la réaction acrosomique incité par le calcium ionophore pour le sperme frais (44 vs 55%) ou réfrigéré à 4°C (47 vs 68 %) (Hartwig *et al.*, 2014).

En Cryopreservation, plusieurs études (revue par Mocé *et al.*, 2010a) ont montré que le traitement CLC augmente la teneur en cholestérol des spermatozoïdes de 2 à 3 fois chez le taureau, et le bélier (Purdy & Graham. 2004b ; Mocé *et al.*, 2010b). L'effet du CLC sur la motilité, viabilité, et la réaction acrosomique (Tableau III.7) est variable selon les espèces ; cependant, la plupart des études rapportent une augmentation des taux de viabilité de 10 à 20 %.

Tableau III.6 : L'effet de CLC sur la qualité du sperme conservé en réfrigération

Paramètres	La durée de conservation				Auteurs (mg / 120 x 10 ⁶ spz)	
	6 h	24h	48h	72h		
MOT (%)	----	56 vs 50	58 vs 22	39 vs 15	Torres <i>et al.</i> , 2006 (2.5mg)	
	78 vs 76	66 vs 59	51 vs 41	----	Crispillo <i>et al.</i> , 2011 (3mg)	
	----	72 vs 55	65 vs 39	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (1.5mg)	
PMOT (%)	----	33 vs 18	22 vs 15	15 vs 5	Torres <i>et al.</i> , 2006 (2.5mg)	
	31,8 vs 31,6	23,3 vs 21,3	15,4 vs 12	----	Crispillo <i>et al.</i> , 2013 (3mg)	
	----	43 vs 28	36 vs 18	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (1.5mg)	
Paramètres CASA	VCL VAP VSL (µm/s)	----	214 vs 199	216 vs 191	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (1.5mg)
		86.3 vs 85.7	75,4 vs 72,4	67,3 vs 61,4	----	Crispillo <i>et al.</i> , 2013 (3mg)
			118 vs 105	115 vs 98	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (1.5mg)
		----	96 vs 83	90 vs 75	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (1.5mg)
Viabilité (%)	----	51 vs 39	43 vs 21	30 vs 13	Torres <i>et al.</i> , 2006 (HOST)	
	64.1 vs 61.1	57,9 vs 52,4	48,7 vs 40	----	Crispillo <i>et al.</i> , 2013 (FITC-PNA)	
	----	68 vs 58	64 vs 50	----	Hartwig <i>et al.</i> , 2014 (IP)	

Le traitement des spermatozoïdes avec le CLC modifie les caractéristiques de perméabilité de la membrane et celles-ci élargissent à leur tour les limites de tolérance osmotique des spermatozoïdes de toutes les espèces étudiées que les spermatozoïdes soient soumis à des conditions hypertoniques ou hypotoniques (revue de [Mocé et al., 2010a](#)) ce qui explique partiellement la meilleur viabilité.

Chez le **porc**, le traitement à 12,5Mg/500 x 10⁶ spz ne réduit pas significativement les valeurs des différents vitesses des gamètes (VCL : 66 vs 75 µm/S) ([Tomàs et al., 2014](#)). Chez le **lapin**, le CLC (3mg) améliore significativement la VCL (86,9 vs 72,1 µm/S) et diminue la LIN (54,6 vs 63,7) ([Nishigima et al., 2014](#)).

Tableau III.7 : l'effet du traitement CLC sur la qualité du sperme congelé

L'espèce	Auteurs (mg CLC / 120x10 ⁶)	MOT (%)	Intégrité (%)	(%) AR ¹ or Capacitation ²
Taureau	Moreas et al., 2010 (1.5mg)	56 vs 32	----	----
	Purdy et Graham. 2004a (1.5mg)	60 vs 42	55 vs 46	----
	Mocé et al., 2014 (2mg) slow freez	78 vs 75	74 vs 62	----
	Mocé et al., 2014 (2mg) rapid freez	58 vs 34	70 vs 34	----
Buffallo	Longobardi et al., 2016 (1.5mg)	68 vs 66	87 vs 86	37.8 vs 69.6 ⁽²⁾
	Rajoriya et al., 2016 (3mg)	----	64 vs 45	33 vs 55 ⁽¹⁾
	Lone et al., 2016 (3mg)	54 vs 50	60 vs 56	----
Etalon	Olivieira et al., 2010 (1,5mg)	Similaire	34 vs 20	9 vs 18
	Pamornsakda et al., 2011 (1.5mg)	72 vs 65	82 vs 74	63 vs 51 (acrosome intact)
	Moraes et al., 2015 (1.5mg) HβCD	69 vs 55	47 vs 28	----
Bouc	Mocé et al., 2014 (2mg) slow freez	73 vs 65	46,7 vs 35,4	----
	Mocé et al., 2014 (2mg) rapid freez	33 vs 8.8	15 vs 3.3	----
	Konyali et al., 2015 (1mg)	67 vs 59	57 vs 44	----
	Salmon et al., 2016 (3mg)	60 vs 40	50 vs 21	----
Bélier	Mocé et al., 2010b (2mg)	45 vs 28	47 vs 24	----
	Purdy et Graham. 2010 (2mg)	44 vs 31	15,4 vs 10,9	----
	Naseer et al., 2015 (3mg)	38 vs 36	49 vs 41	25 vs 75 ⁽¹⁾ ; 35 vs 65 ⁽²⁾
Porc	Lee et al., 2015 (1.5mg)	-----	75 vs 59	10 vs 20 ⁽¹⁾ ; 35 vs 65 ⁽²⁾
Lapin	Mocé et Graham. 2005 (5mg)	17 vs 14	31 vs 33	----
	Nishigima et Al., 2014 (3mg)	29 vs 21	----	----
Coq	Partyka et al., 2016 (HBCD 2mg)	23,5 vs 21	53 vs 43	----
	Partyka et al., 2016 (1mg)	18 vs 21	40,6 vs 42,9	----
	Partyka et al., 2016 (2mg)	19 vs 21	43 vs 43	----

Chapitre IV

Matériels & Méthodes

Chapitre 4 : Matériel et Méthodes

IV.1. Cadre et concept de l'étude :

Notre étude a eu comme objectif d'évaluer l'intérêt de conserver à basse température la semence du lapin lorsqu'on supplémente le dilueur de base (TRIS) par différents traitements (**Cholestérol**, **α -Tocophérol** et **acide ascorbique**). Le cholestérol et la vitamine E sont présentés sous une forme complexée avec la **cyclodextrine** nommée **CLC** (Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin) et **TLC** (α -Tocopherol-Loaded-Cyclodextrin).

Le choix de la cyclodextrine est lié à son potentiel solubilisant dans les milieux aqueux afin de rendre le cholestérol et l' α -Tocophérol (faiblement solubles) plus disponibles pour la cellule « spermatozoïde ». Notre hypothèse est que ces complexes excipients apporteront au spermatozoïde une stabilité membranaire et des éléments de protection anti-oxydants pour contrecarrer les dommages liés à la conservation à basse température.

IV.2. Le plan expérimental :

Nous avons effectué deux essais expérimentaux (Figure **IV.1**) :

IV.2.a Essai de congélation à - 196°C :

Cet essai été réalisé au laboratoire de reproduction animale, université Abderrahmane Mira Bejaia et au Laboratoire de Biotechnologie sur une période allant de Mars-Avril 2013. Nous avons testé l'effet de la cyclodextrine (**Cdx**), du cholestérol (**Chl**) et de l' α -Tocophérol (**Toc**) seuls et en association avec les cyclodextrines à savoir **CLC**, **TLC** séparément ou ensemble (**CLC/TLC**).

IV.2.b Essai de réfrigération à 4°C :

Cet essai été réalisé au Laboratoire de Biotechnologie et de Reproduction Animale (LBRA) de l'institut vétérinaire à l'Université de Blida 2, et la laboratoire de l'université de Médéa ; sur une période allant de Janvier-Juin 2017. Nous avons exploré à 4°C l'effet synergique de l'acide ascorbique (vitamine C : **VitC**) et des complexes susmentionnés **CLC/VitC**, **TLC/VitC** et **CLC/TLC/VitC** (Figure **IV.1**).

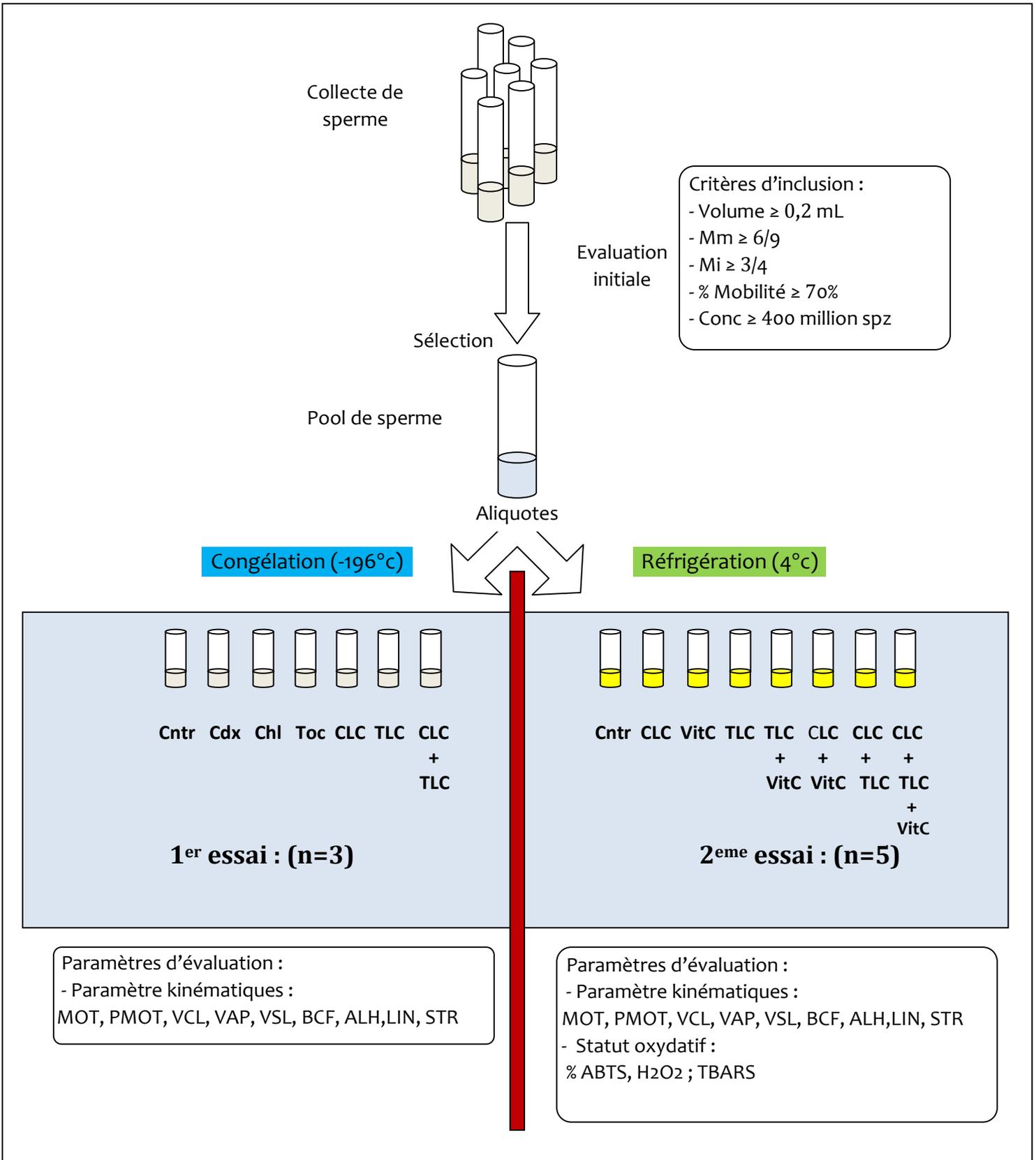


Figure IV.1 : Diagramme de l'étude expérimentale.

Mm: Motilité massale; Mi: Motilité individuelle ; VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); VAP: average path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: straight-line (rectilinear) velocity ($\mu\text{m/s}$); BCF: beat cross frequency (HZ) : average at which curvilinear path crosses the average path. ALH: amplitude of lateral head displacement (μm); LIN: linearity (VSL/VCL); STR: straightness (VSL/VAP) ;

IV.3. Animaux :

Les animaux que nous avons utilisés dans cette étude sont des reproducteurs mâles de la population blanche locale. Ils ont été choisis sur la base de leurs âges et leurs historiques de fertilité prouvée auprès des éleveurs respectifs. Nous avons utilisé un total de 17 lapins mâles. Tous les sujets sont sexuellement matures et âgés entre 6 et 12 mois.

IV.4. Réactifs et préparation de complexes :

Tous les réactifs utilisés sont obtenus auprès de la compagnie SIGMA-ALDRICH® (PROCHIMA- SIGMA – Tlemcen, Algérie).

I.V.4.1. Préparation du Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin (CLC) :

Le complexe du cholestérol avec la méthyl- β -cyclodextine, nommé CLC (cholesterol-loaded-cyclodextrins) est préparé selon la méthode décrite par Purdy & Graham, 2004a. Dans un tube de verre, 1g de méthyl- β -cyclodextine est dissout dans 2mL de méthanol. Dans un deuxième tube de verre, 200mg de cholestérol sont dissouts dans 1mL de chloroforme. Un volume de 0,45mL de la solution de cholestérol est ajouté et mixé à la solution de cyclodextrine. Le mélange obtenu est maintenu en agitation durant 24h à température ambiante à l'abri de la lumière. Le solvant est évaporé sous vacuum par rotation. Un résidu sous forme de poudre cristalline est obtenu et conservé jusqu'au jour d'utilisation.

I.V.4.2. Préparation de α -Tocopherol-Loaded-Cyclodextrin (TLC) :

Le complexe d' α -Tocopherol avec la méthyl- β -cyclodextine, nommé TLC (Tocopherol-loaded-cyclodextrins), est préparé avec un ratio molaire 1:1 selon la méthode de co-évaporation décrite par Koontz et al., 2009. La méthyl- β -cyclodextine (309,11mg) et l' α -Tocopherol (100mg) sont dissouts dans 50mL d'éthanol. Le mélange obtenu est maintenu sous agitation durant 24h à température ambiante à l'abri de la lumière. Le solvant est évaporé sous vacuome par rotation, un résidu sous forme de poudre cristalline est obtenu et conservé jusqu'au jour de manipulation.

IV.5. Collecte et évaluation initiale du sperme :

La collecte du sperme est effectuée par le biais d'un vagin artificiel (IMV, France®). Brièvement, on introduit une femelle immobilisée bout en train dans la cage du mâle, et lorsque ce dernier exprime un comportement sexuel (chevauchement), le vagin artificiel (préalablement chauffé à 50°C) est orienté (sous son abdomen) pour faciliter l'intromission du pénis. Les éjaculats qui présentent de l'urine ou du sang sont écartés et toute présence de gel est éliminée.

Chaque éjaculat est initialement examiné pour son inclusion dans l'étape de conservation. La motilité massale (**Mm**) est examinée selon une grille de notation (de 0 à 9) décrite par Boussit, (1989) et Brun *et al.*, (2002); Une goutte de sperme (sans étalement) est observée sous microscope au grossissement x100, la notation (annexes) est basée sur le critère de l'intensité des vagues observées. La motilité individuelle (**Mi**) est évaluée sur une échelle de (de 0 à 4) selon Boussit, (1989) par une observation au grossissement X400 d'une goutte de semence diluée (1:5, diluer TRIS) et mise entre lame et lamelle; la grille de notation (annexes) de la **Mi** est basée sur l'estimation visuelle de type de mouvement des spermatozoïdes; un pourcentage de motilité est alors subjectivement attribué.

La concentration (**Conc**) est estimée (million de spz/mL) en utilisant un comptage sur la chambre hématimètre de THOMA-Zeiss. Nous avons utilisé les directives du protocole de travail de SAGA.INRA (annexes) et le manuel de WHO, 1999. Un volume de 20µl de semence est utilisé à une dilution finale de 1:200 dans une solution de fixation de formol à 3,5% (10ml de formol 35% dilué dans un litre de solution NaCl 0,9%); après homogénéisation, chaque grille de la chambre est remplie de 10µl de la semence diluée, une lamelle (24x24mm) est déposée ensuite sur l'hématimètre; après 10min la numération est réalisée (au grossissement x100) en duplicata sur les deux grilles et le comptage (pour chaque grille) est effectué sur les deux colonnes centrales; ne sont comptées que les têtes de spermatozoïdes (face ou profile) qui touchent les lignes inférieures et droites du quadrillage des grands et petits carreaux de la chambre de THOMA.

Seuls les éjaculats qui présentent une Mm $\geq 6/9$, Mi $\geq 3/9$ et un pourcentage de motilité $\geq 60\%$) sont admis à l'étape de conservation.

IV.6. Traitements et dilueur de conservation :

Les traitements sont préparés en dissolvant la cyclodextrine, le cholestérol, α -tocopherole, l'acide ascorbique ou les complexes CLC et TLC dans un dilueur de base « TRIS » (Roca *et al.*, 2000); ce dernier est composé de Tris (hydroxy-méthyl-amino-methane) (3,025g), d'acide citrique (1,7g), glucose (1,25g), Penicilline G (0,1g), di-hydro-streptomycine (0,1g), et Eau distillé (QS 100ml).

Le dilueur Tris est considéré comme le control. Toutes les solutions de traitement ont été préparées préalablement et filtrées par des filtres seringues (0,45 μ m) et conservées avant usage. Le dilueur de congélation est obtenu par l'ajout le di-méthyl-sulfo-oxide (DMSO) à un taux de 20%.

❖ Dans la conservation par réfrigération (4°C) et congélation (-196°C), nous avons utilisé sept traitements:

1). Le control (Tris) (**Cntr**) ; 2). β -cyclodextrins (**Cdx**) (0,71mg/ml) ; 3). Cholestérol (**Chl**) (4mg/ml) ; 4). α -tocopherol (**Toc**) (0,12mg/ml) ; 5). cholesterol-loaded cyclodextrins (**CLC**) (10.86 mg/ml) ; 6). α -tocopherol-loaded cyclodextrins (**TLC**) (0,92mg/ml) et 7). **CLC+TLC** avec une proportion équivalente (v/v).

❖ Dans le deuxième partie, où la vitamine C est considérée, nous avons utilisé huit traitements:

1). Le control (Tris) (**Cntr**) ; 2). **CLC** (5mg/ml) ; 3). vitamin C (**VitC**) (0,25mg/ml) ; 4). **TLC** (1,25mg/ml) ; 5). **TLC+VitC** (1,25mg + 0,25mg/ml) ; 6). **CLC+VitC** (5mg + 0,25mg/ml) ; 7). **CLC+TLC** (5mg + 1,25mg/ml) et 8). **CLC+TLC+VitC** (5mg + 1,25mg + 0,25mg/ml).

IV.7. Méthodes de conservation :

IV.7.1. La réfrigération à 4°C :

Le protocole de conservation par réfrigération consiste à mettre les semences traitées dans un réfrigérateur à 4°C. Initialement, le pool de sperme est dilué à température ambiante par le diluer TRIS à un ratio de 1:5 pour arriver à une concentration de 80-100 million spz/ml, le pool dilué est ensuite aliquoté (1ml) dans des tubes à essai pour les traitements respectifs. Chaque aliquote est dilué à un ratio 1:1 (v/v) à raison de 80-100 millions spz /traitement.

Les concentrations respectives pour **Cdx**, **Chl**, **Toc**, **CLC**, **TLC** et **CLC+TLC** sont de : 0,35 ; 4 ; 0,06 ; 5,4 ; 0,46 et 2,7+0,23mg/80-100·10⁶ spz.

Les concentrations respectives en présence de la vitamine C pour **CLC**, **VitC**, **TLC**, **TLC+VitC**, **CLC+VitC**, **CLC+TLC** et **CLC+TLC+VitC** sont de: 2,5 ; 0,125 ; 0,625 ; 0,625+0,125 ; 2,5+0,125 ; 2,5+0,625 ; et 2,5+0,625+0,125mg/80-100·10⁶ spz.

IV.7.2. La congélation à l'azote liquide (-196°C) :

Le protocole de congélation à l'azote liquide (-196°C) a été établi selon la méthode décrite par Rosato & Iaffaldano, (2013). Le pool de sperme est réfrigéré initialement durant 90 min pour éviter un choc thermique. Ensuite, le pool est dilué à un ratio de 1:5 avec un dilueur de congélation contenant 20% de DMSO et placé à 4°C pendant 45min pour équilibrer. Le pool dilué est ensuite aliquoté sur sept tube et dilué à un ratio 1:1 (v/v) avec respectivement 1). Le control Tris (**Cntr**), 2). **Cdx** ; 3). **Chl** ; 4). **Toc** ; 5). **CLC** ; 6). **TLC** et 7). **CLC+TLC**. Les aliquotes traités sont mis dans des paillettes de congélation de 250µl (IMV, France ®) et exposés à la vapeur de l'azote liquide (5cm au-dessus de la surface de l'azote liquide) pendant 10min. les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide à -196°C. La décongélation est réalisée par immersion des paillettes congelées dans un bain marie de 50°C durant 10 secondes et la semence est analysée.

IV.8. Paramètres analysés:

IV.8.1. Evaluation des paramètres cinématiques par l'analyse assistée par ordinateur (CASA) :

Le principe de fonctionnement du CASA (Computer Assisted Sperm Analyser) est basé sur un microscope couplé à une caméra vidéo à haute résolution. Sur une séquence vidéo (25 images/s), le logiciel va suivre le trajet (traking) du spermatozoïde en mouvement et mesurer différentes vitesses (**Figure IV.2**)

Nous avons utilisé un CASA SCA (Sperm Class analyser) 4.0 (Microptic ®, Espagne) (voir annexes) en suivant les directives de [Castellini & Iattaioli, \(1999\)](#). Brièvement, 10 μ l de semence (dilution finale 1:20-30) sont placés sur une chambre Makler pré-chauffée et une mise au point est réalisée sous un objectif x10 à contraste de phase ; plusieurs champs (3-5) d'observation sont ensuite analysés par le logiciel pour obtenir un minimum de 200 spz par traitement. Le logiciel est paramétré pour un rythme de séquences à 16-25/s ; la taille de la cellule de 10,5-24 μ m ; une VAP minimum de 20 μ m/s ; une VAP moyenne de 40 μ m/s ; un minimum de 8 points captés sur le trajet du spermatozoïde et un seuil de linéarité de 70%. Les paramètres mesurés sont : curvilinear velocity (VCL, μ m/s) ; straight line velocity (VSL, μ m/s) ; average path velocity (VAP, μ m/s) ; amplitude of lateral movement of the head (ALH, μ m) and beat cross frequency (BCF, Hertz). Le pourcentage de mobilité totale (MOT) et le pourcentage de mobilité progressive (PMOT) spermatozoïdes qui enregistrent une VAP > 50 μ m/s et une linéarité >75%.

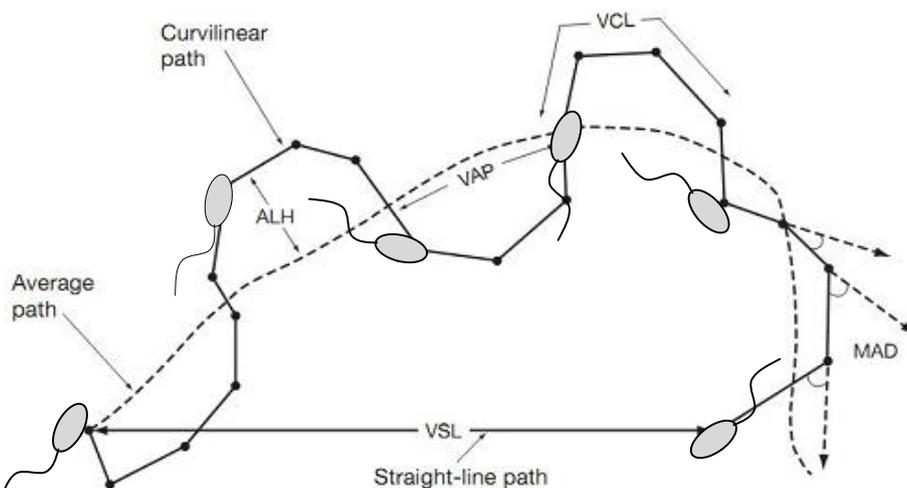


Figure IV.2 : Graphique du trajet spermatique et motilités analysées par CASA.

IV.8.2. Evaluation de la viabilité par coloration Eosine Nigrosine :

L'appréciation de la viabilité est établie à l'aide de la coloration classique Eosine/Nigrosine (Bamba, 1988). La notion de viabilité (spermatozoïde vivant ou mort), été basée sur l'intégrité membranaire qui dans le cas où elle laisse pénétrer le colorant (Eosine) à l'intérieur de la cellule cela signifie que la cellule est morte. Ainsi, le spermatozoïde non viable prend la coloration de l'éosine (rose) et les cellules vivantes restent incolores, la Nigrosine (bleu-violet) constitue le fond de visualisation. Un échantillon de 10µl de semence est déposé sur une lame et qui sera mélangé avec 10µl de l'éosine et 10µl de Nigrosine. Un frottis est réalisé et séché à l'aire libre. L'observation de la lame est faite sous microscope au grossissement x1000 par l'huile d'immersion. La mesure de la viabilité est réalisée uniquement dans le deuxième essai où l'effet de la vitamine C est exploré.

IV.8.3. Evaluation du statut acrosomique par la coloration Trypan Blue :

L'évaluation du statut de l'intégrité acrosomique est établie selon la méthode de Kovács & Foote, (1992) décrite par Polgar *et al.*, 2004. 10 µl de semence sont mélangés avec 10µl d'une solution de Blue de Trypan à 0,2% et étalés en frottis. Après un séchage à l'air libre, les frottis sont fixés par une solution de fixation (86ml de HCL à 1N ; 14ml de formaldéhyde à 37% et 0,2g de rouge neutre). Les frottis sont ensuite colorés par Giemsa à 7,5% pendant 3,5h à 37°C ; un rinçage à l'eau courante et à l'eau distillée pendant deux minutes est ensuite réalisé. Un minimum de 200 spz est analysé au grossissement x1000 avec huile d'immersion. L'observation évalue chaque spermatozoïde pour le classer : 1.) spz vivant avec un acrosome intacte ; 2.) spz vivant avec un acrosome endommagé ; 3.) spz mort avec un acrosome intacte et 4.) spz mort avec un acrosome endommagé.

Les spz vivants montrent une région post-acrosomique transparente, alors que les morts se colorent en bleu foncé. L'acrosome intacte se caractérise par une tête (région en avant du segment équatorial) colorée en rose avec une coiffe en croissant pourpre ; l'acrosome endommagé se colore en noir/bleu foncé (voir annexes).

IV.8.4. Evaluation du statut oxydatif totale à l'égard du radical ABTS^{o+} :

L'activité anti-oxydante totale des semences est évaluée par la mesure du degré de piégeage « scavenger » à l'égard du radical ABTS^{o+} on se basant sur la méthode de [Re et al., \(1999\)](#). L'ABTS est solubilisée dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. Le radical cation (ABTS^{o+}) est produit en faisant réagir la solution d'ABTS avec du persulfate de potassium à une concentration finale de 2,45 mM. Le mélange est laissé au repos à l'obscurité et à température ambiante pendant 12-16h avant utilisation. La solution ABTS^{o+} est ensuite diluée avec de l'eau distillée à une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. Après ajout de 1 ml de la solution ABTS^{o+} à 10 µl de chaque sperme, la lecture est réalisée 6 minutes exactement après le mélange initial.

Le pourcentage d'inhibition à 734 nm est calculé comme suit :

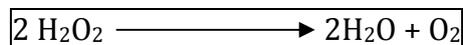
$$\% \text{ scavenger de l'ABTS} = \frac{(AT - AE)}{AT} \times 100$$

AT : Absorbance du témoin

AE : Absorbance de l'échantillon

IV.8.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase :

L'évaluation de l'activité de la catalase qui est l'un des systèmes enzymatiques de protection permet l'analyse du statut oxydatif intracellulaire du spermatozoïde. La mesure est réalisée selon la méthode de ([Aebi, 1984](#)) basée sur la disparition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique (catalase) à 25°C.



Brièvement, 20µL du sperme sont additionnés de 1255µl d'un tampon phosphate avec ajout de 765µl de H₂O₂ (54 mM). Le blanc contient 20µl de sperme et 1980µl d'un tampon phosphate (50 mM, pH 7.0). La diminution de l'H₂O₂ est enregistrée à 240 nm à 25°C pendant 60s. Une unité de l'activité de la catalase est définie comme l'activité nécessaire à la dégradation de 1 µmol de peroxyde d'hydrogène pendant 60s. L'activité de la catalase est exprimée en termes de µmoles de H₂O₂ consommés/min/ml.

IV.8.6. Détermination du taux d'oxydation lipidique par mesure de TBARS :

Les aldéhydes sont des produits secondaires issus de la décomposition des hydroperoxydes. La mesure des aldéhydes est réalisée par réaction avec l'acide thiobarbiturique sous le nom de "Thiobarbituric Acid Reactif Substances" (TBARS) selon le principe suivant :

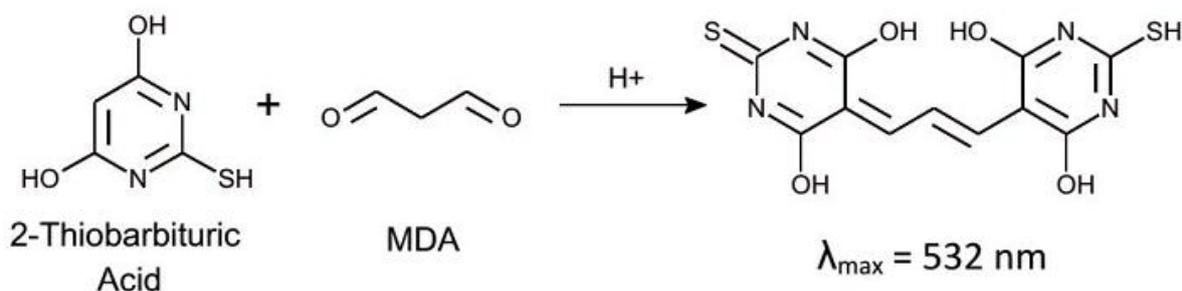


Figure IV.2 : Principe du dosage du malondialdéhyde

La mesure du MDA est exprimée en TBARS et établie selon la méthode de [Buege, \(1978\)](#). Brièvement, après avoir préparé une solution de TCA-TBA-HCL à 15% w/v acide trichloroacétique, 0,375% w/v acide thiobarbiturique et 0,25N acide hydrochloride, on mélange dans un tube eppendorf 0,5mL de sperme avec 1mL de TCATBA-HCL. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 30min et une coloration rose est obtenue. Juste après, les échantillons sont refroidis dans un bain de glace pour stopper la réaction entre TBA et MDA. On réalise ensuite une centrifugation à 1000xg pendant 10min. L'absorbance du surnageant est mesurée à une longueur d'onde de $\lambda = 532\text{nm}$.

La concentration de TBARS (MDA) est calculée en utilisant le coefficient d'extinction d'MDA selon l'équation suivante :

$$\text{TBARS [MDA] nmol} = \text{Absorbance} / 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

IV.8. Analyse statistique :

L'analyse statistique des données collectées est effectuée en utilisant le logiciel STATVIEW[®] (version 5.0) pour Windows[™] ; les données analysées sont exprimées en moyenne \pm Ecart-type.

Pour comparer les groupes expérimentaux **Chl**, **Toc**, **CLC** et **TLC** et avec le control **Cntr** ; les données sont analysées statistiquement par « one-way ANOVA ».

Les groupes **Chl**, **Toc**, **CLC** et **TLC** et **Cntr** sont groupés en une variable nominale et utilisée comme la variable « d'effet » indépendante. L'analyse ANOVA est suivie par un test à posteriori PLSD de Fisher afin d'examiner les valeurs des moyennes des variables dépendantes (**PMOT**, **VAP**, **VCL**, **VSL**, **BCF**, **ALH**, **% ABTS**, **TBARS**). Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme une différence statistiquement significative ; « * = $p < 0.05$ », « ** = $p < 0.01$ » et « *** = $p < 0.001$ ».

Chapitre V

Résultats & Discussion

Chapitre 5 : Résultats et Discussion

V.1. Résultats de la réfrigération (4°C) :

Le **tableau V.1.a** et **V.1.b** représente respectivement les caractéristiques initiales et les paramètres cinématiques du sperme frais (pool) utilisé dans l'expérience I (sans vitamine C) avant la réfrigération à 4°C.

La concentration et la qualité visuelle de la mobilité (MOT) du sperme frais ont montré des résultats satisfaisants proches des valeurs théoriques indiquées par [Brun et al. \(2002\)](#) pour la même classe de Mm avec une concentration de $716 \cdot 10^6$ spz/ml et une MOT de 77,4%.

Les paramètres cinématiques du sperme frais ont montré des valeurs moyennes avec 24% de spz progressifs, une VCL et une VAP de 59,3 et 41,4 $\mu\text{m/s}$. Les valeurs cinématiques des échantillons sont similaires aux valeurs de la semence fraîche de l'élevage industriel (2765 doses) rapportées par [Lavara et al. \(2005\)](#) ; en terme de MOT (80,5%), VCL (54,8 $\mu\text{m/s}$), VAP (36,0 $\mu\text{m/s}$), et VSL (26,1 $\mu\text{m/s}$).

Tableau V.1.a :

La qualité du sperme frais utilisé dans l'expérimentation I (sans vitamine C) (4°C).

Volume (ml)	Mm	Mi	Cn(X10 ⁶)
>4.8 (pool)	6-8	3-5	683,42

Mm : motilité massale; Mi : motilité individuelle ; %Mot : pourcentage de motilité; Cn: concentration

Tableau V.1.b :

Les moyennes \pm SEM des paramètres cinématiques du sperme frais utilisé dans l'expérimentation I (sans vitamine C) (4°C).

MOT(%)	PMOT(%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
67,62	24,2	59,3 \pm 0,8	41,4 \pm 0,6	27,1 \pm 0,6	49,5 \pm 1,1	63,7 \pm 1

V.1.1 L'évaluation de l'effet des traitements sur les motilités totale (MOT) et progressive (PMOT).

Les **Figures V.1.a** et **V.1.b** représentent respectivement les pourcentages de motilité totale (MOT) et motilité progressive (PMOT) des différents traitements et à différents temps de réfrigération.

Nous pouvons constater la diminution de la motilité durant la conservation à 4°C et ceci d'une manière significative entre 0h et 48h dans la plupart des traitements. En comparaison avec le contrôle on observe une augmentation sans qu'elle ne soit statistiquement significative pour la motilité totale (MOT) entre 0h et 48h. A la différence, le cholestérol-vitamine C améliore le pourcentage de MOT à 48h d'une manière significative ($P < 0.05$) pour arriver à **56,5% (CLC-Vit-C)** vs **22,7% (Contrôle)**.

Le pourcentage de motilité progressive (PMOT) n'a pas été significativement affecté par les traitements à l'exception du CLC qui a enregistré une PMOT significativement ($P < 0.05$) plus élevé.

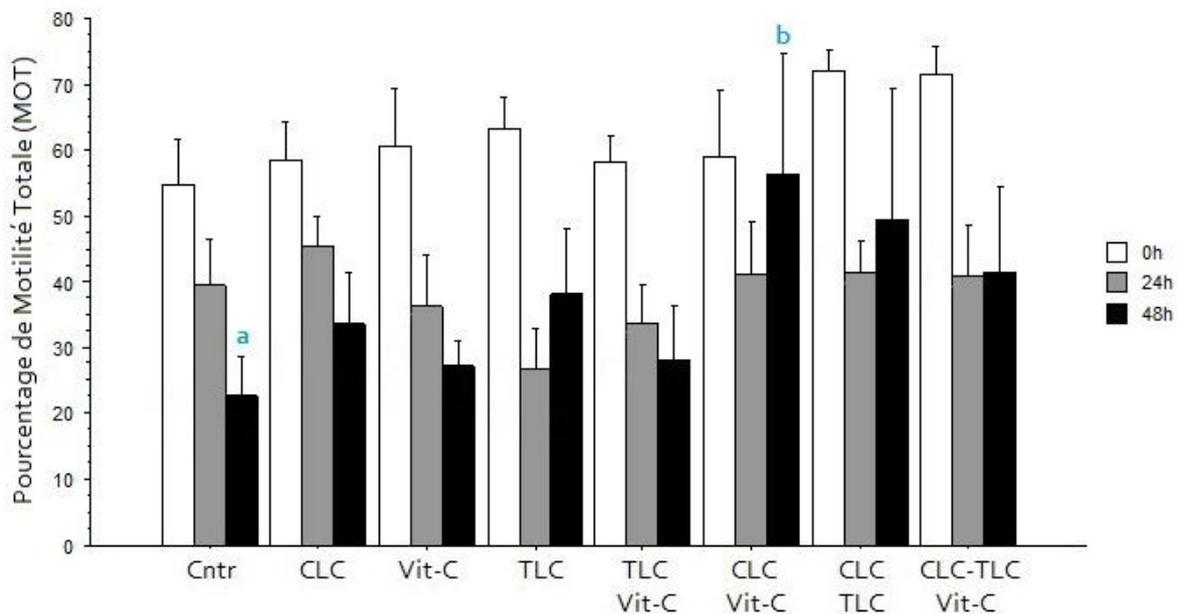


Figure V.1.a : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Motilité totale (MOT) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différentes lettres indiquent une différence significative " $p < 0.05$ " entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

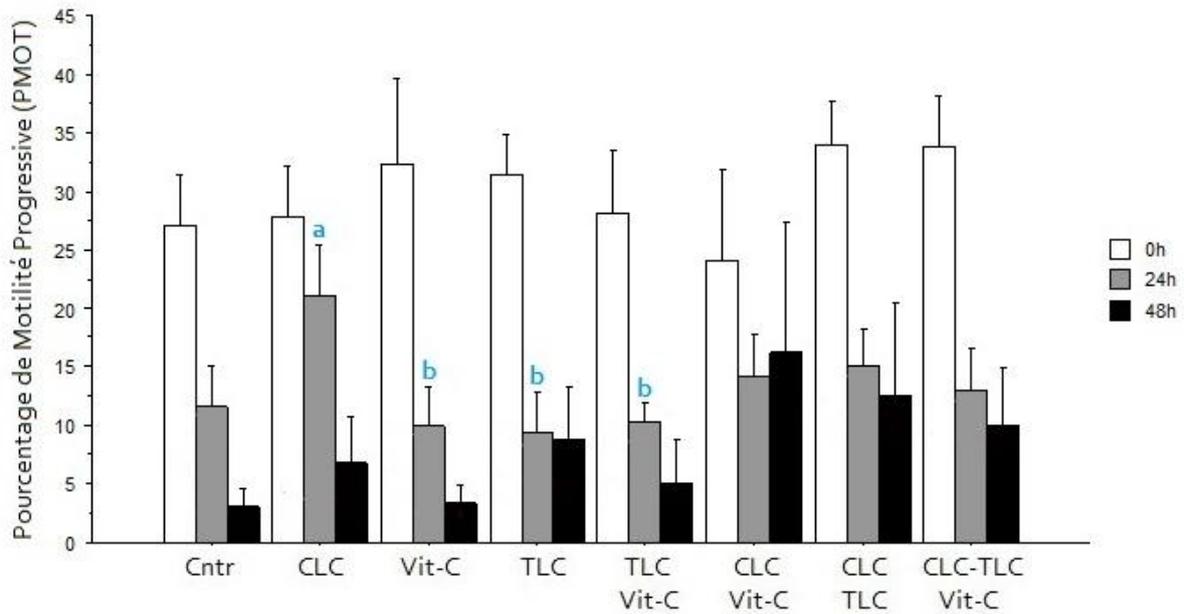


Figure V.1.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Motilité Progressive (PMOT) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différentes lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

V.1.2 L'évaluation de l'effet des traitements sur les différents paramètres cinématiques mesurés par CASA :

Les paramètres cinématiques CASA sont représentés sur les figures **V.1.2.(a-g)** pour VCL, VAP, VSL, LIN, STR, ALH et BCF. Les degrés de comparaisons entre les différents traitements et les temps sont présentés dans les tableaux en annexes

En terme de vélocité curvilinéaire (VCL) et average-path (VAP) -qui révèlent les trajets (propre et moyen) parcourus par les spz-, nous pouvons observer qu'au bout de **24h** de réfrigération, une amélioration significative est observée (P<0.001) dans les traitements **TLC** (VCL **55,2 \pm 21,1** ; VAP **31,2 \pm 13,3** μ m/s) et **CLC-TLC** (VCL **54,9 \pm 20,3** ; VAP **33,9 \pm 14,4** μ m/s) en comparaison avec le contrôle (VCL **48,5 \pm 19,6** ; VAP **26,4 \pm 12,3** μ m/s).

Après **48h** de conservation à 4°C, la **VCL** ne présente aucune différence significative, mais la **VAP** montre des valeurs moyennes significativement (P<0.001) plus élevées dans **TLC** (**25,5 \pm 10,5** μ m/s), **CLC-VitC** (**26,6 \pm 10,5** μ m/s) et **CLC-TLC** (**26 \pm 11,8** μ m/s) en comparaison avec le contrôle (**20,9 \pm 10** μ m/s).

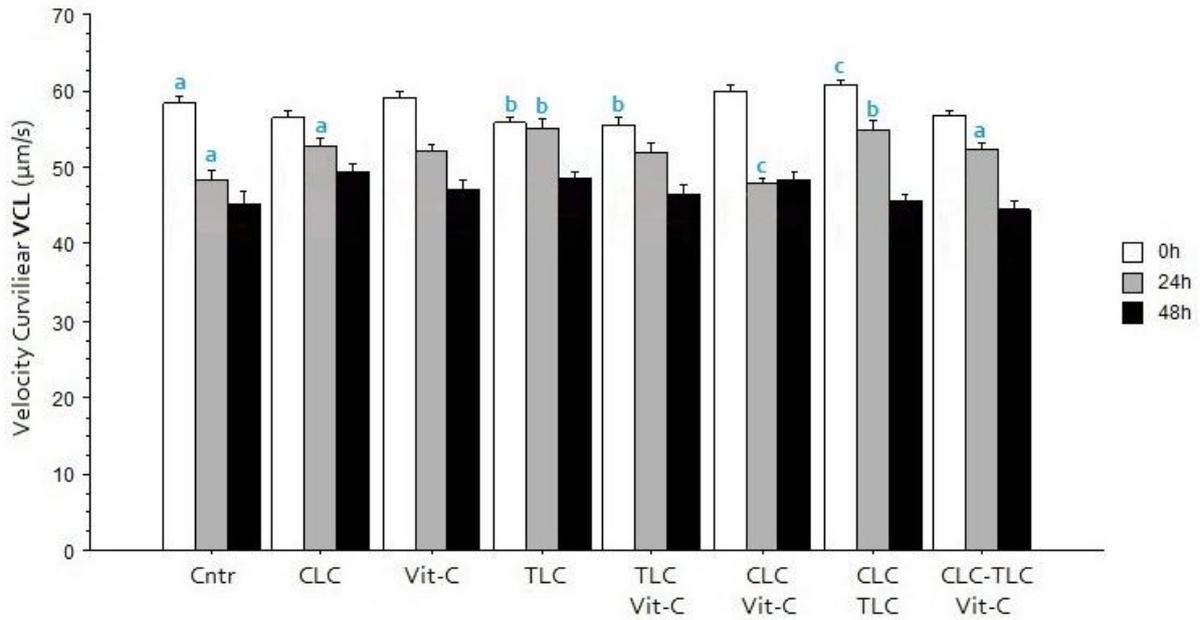


Figure V.1.2.a : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vitesse Curvilinéaire (VCL) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différents lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

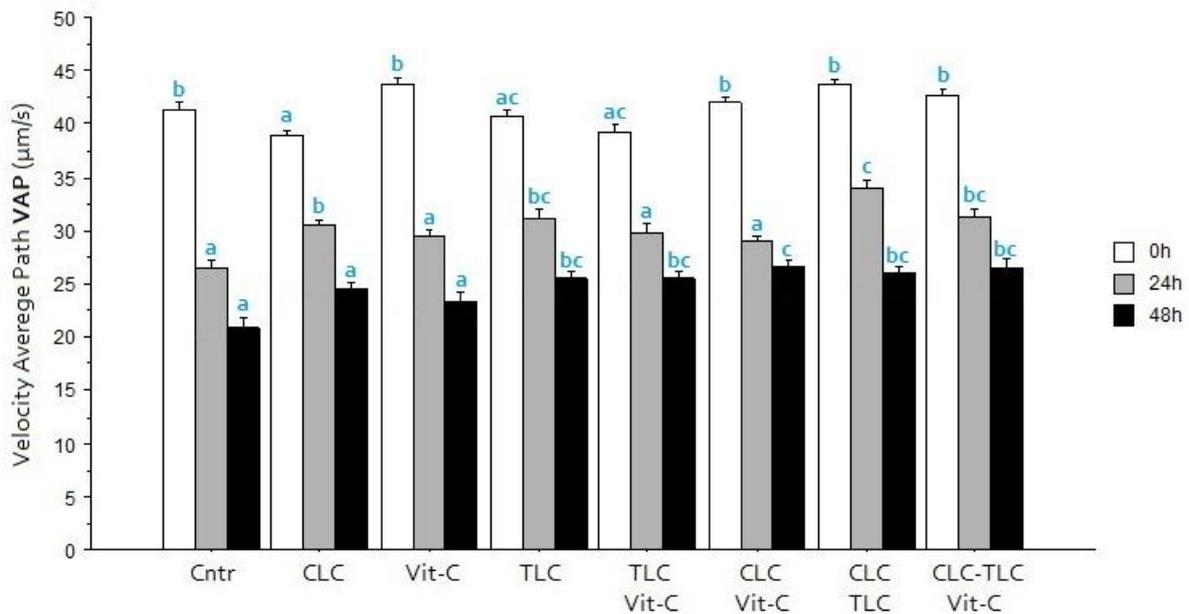


Figure V.1.2.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vitesse Averege Path (VAP) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différents lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

En terme de vélocité Straight line (VSL) -qui révèle le trajet rectiligne (entres points de départ et d'arrivé), nous pouvons observer que **VitC** et **CLC-TLC-VitC** ont significativement ($P<0.001$) amélioré la **VSL** déjà à **0h**. Après **24h** de stockage à 4°C , tous les traitements ont significativement ($P<0.001$) amélioré la VSL comparativement au contrôle. Les traitements qui ont le plus d'effets sont **CLC-TLC**, **CLC-TLC-VitC**, **CLC**, et **TLC** ($21,8\pm 12,7$; $21,16\pm 11,9$; $20,8\pm 11,4$; $19,5\pm 11,8$ $\mu\text{m/s}$ comparativement au **contrôle** $16,1\pm 9,7$ $\mu\text{m/s}$). A **48h**, la **VSL** du contrôle est significativement ($P<0.001$) plus faible ($12,4\pm 8,1$ $\mu\text{m/s}$) en comparaison avec **TLC**, **TLC-VitC**, **CLC-VitC**, **CLC-TLC** et **CLC-TLC-VitC** ($\approx 16-19$ $\mu\text{m/s}$).

La linéarité (**LIN**) et la rectitude (**STR**) -rapports respectifs du **VSL** sur **VCL** et **VAP** - sont de bons indicateurs de la mobilité progressive. Les résultats de **LIN** montrent la même tendance avec la **VSL**, où la **VitC** seule en association avec **CLC** améliore significativement ($P<0.05$) la **LIN** à **0h**, **24h** et **48h**, tous les traitements en association (**TLC-VitC**, **CLC-VitC**, **CLC-TLC** et **CLC-TLC-VitC**) améliorent significativement la **LIN** ($P<0.01$). Concernant la progressivité, les traitements ont amélioré le **STR** à **24h** et **48h** comparativement au contrôle. Nous pouvons observer aussi que les traitements en association (**TLC-VitC**, **CLC-VitC**, **CLC-TLC** et **CLC-TLC-VitC**) donnent des différences significatives ($P<0.05$) pour la **STR** à **24h** et **48h**.

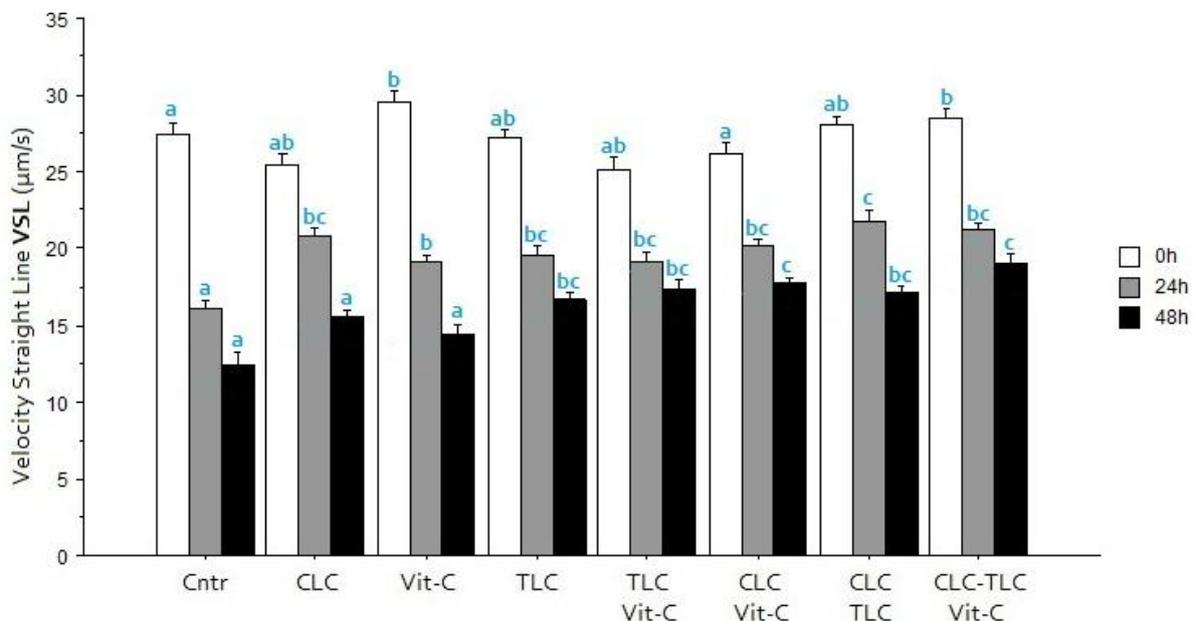


Figure V.1.2.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Vélocité Straight Line (VSL) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différentes lettres indiquent une différence significative " $p<0.05$ " entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

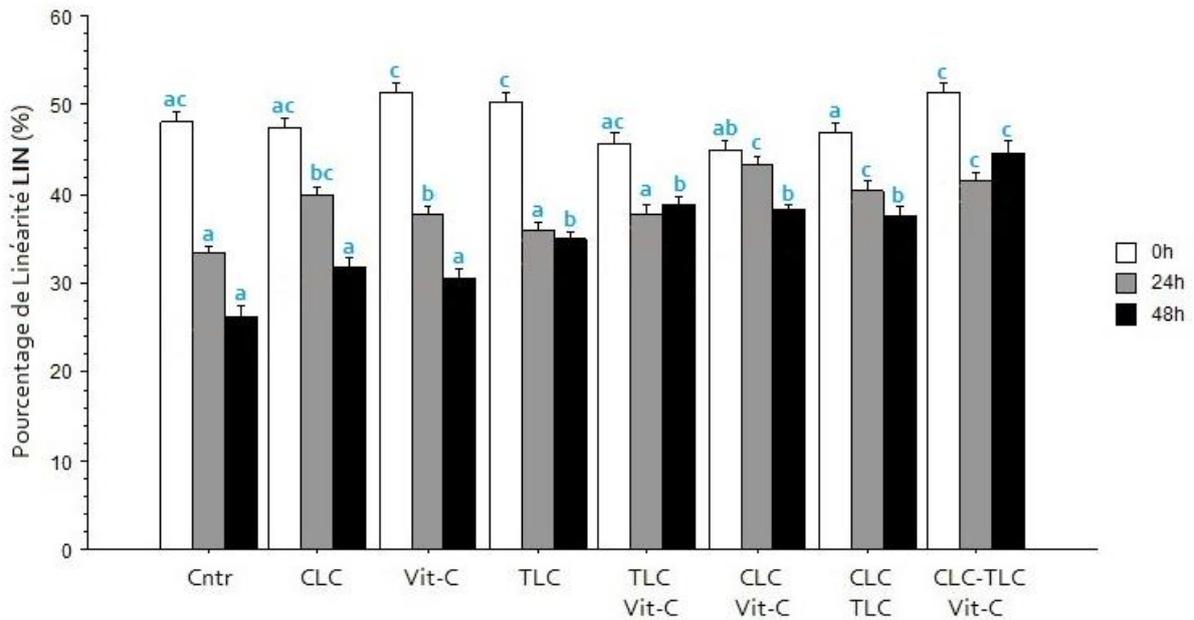


Figure V.1.2.d : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le Pourcentage de Linéarité (LIN) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C : Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différents lettres indiquent une différence significative " $p < 0.05$ " entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

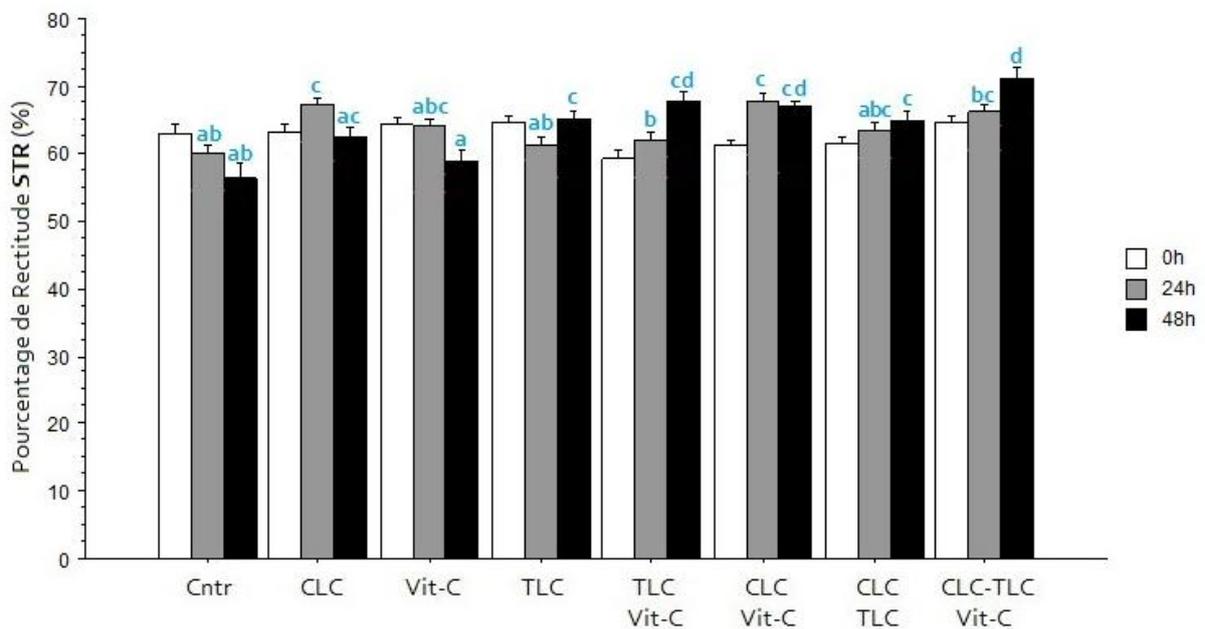


Figure V.1.2.e : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le pourcentage de Rectitude (STR) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C : Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différents lettres indiquent une différence significative " $p < 0.05$ " entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

En termes de d'ALH et BCF, nous pouvons observé que les traitements vitaminiques (**VitC**, **TLC** et **TLC-VitC**) ont réduit significativement les valeurs ALH au début de la réfrigération ($1,8\pm0,9$; $1,8\pm0,8$; $1,8\pm0,8$ μm respectivement vs **contrôle** $1,9\pm0,9$ μm). Après 24h, les traitements **CLC** et **TLC** augmentent les valeurs de la ALH ($2,3\pm0,9$ vs **contrôle** $2,0\pm0,8$ μm) d'une manière significative et ceci par rapport à la plus part des traitements ; la valeur moyenne du traitement **CLC-VitC** ($2,0\pm0,8$ μm) est diminuée d'une manière similaire au contrôle. Par ailleurs, la conservation jusqu'à 48h montre une augmentation des valeurs ALH par rapport à 0h dans la majorité des traitements utilisés ; à ce moment on remarque que le traitement **CLC** est significativement plus important ($2,24\pm0,8$ μm) que le contrôle ($1,98\pm0,6$ μm).

Les valeurs de BCF n'affichent aucune différence significative à 0h. Cependant, les traitements **CLC** et **CLC-TLC** augmentent le taux de **BCF** à 24h de conservation ($13,3\pm4,4$; $13,6\pm4,2$ vs **contrôle** $12,2\pm4,7$ hz) d'une manière significative. A 48 h on remarque que les traitements **CLC-VitC** et **CLC-TLC** augmentent significativement la BCF en comparaison avec le contrôle à 0h et 24 h.

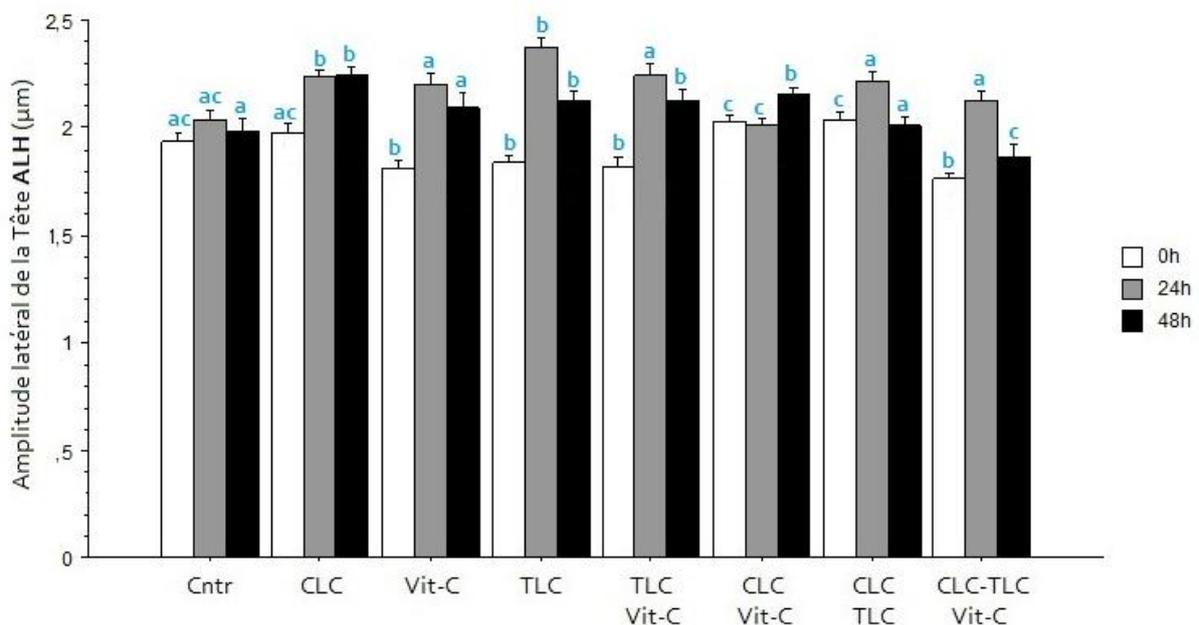


Figure V.1.2.f : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur l'Amplitude latérale de la tête (ALH) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différentes lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

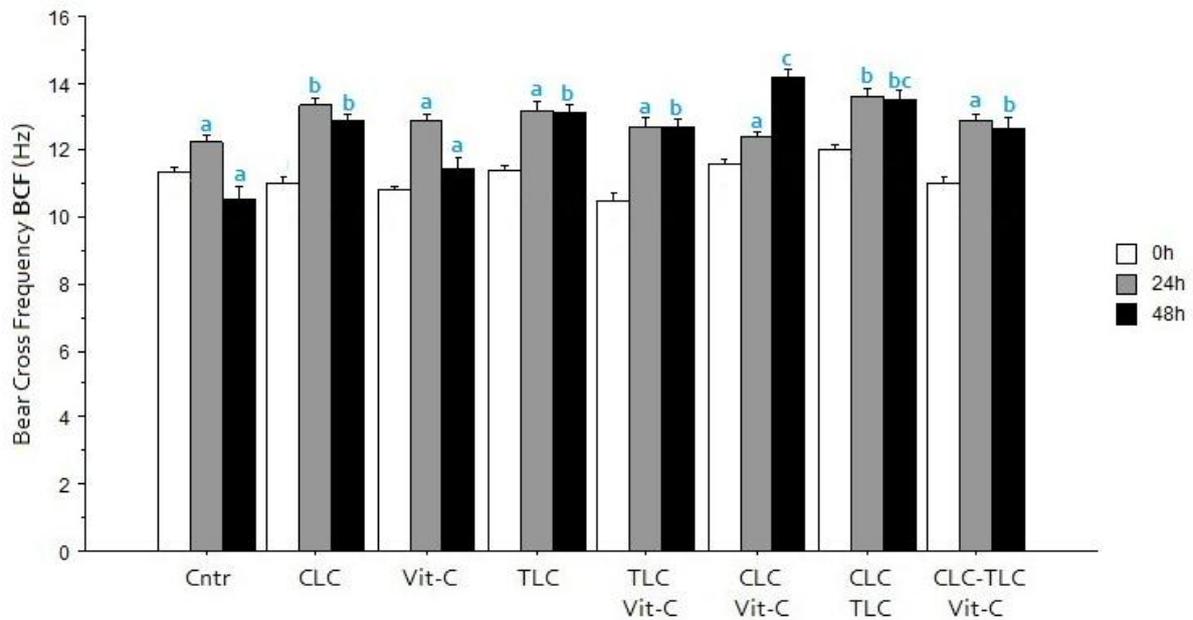


Figure V.1.2.g : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Fréquence de Battement (BCF) du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différentes lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

V.1.3 L'estimation de la viabilité par Eosine-Nigrosine :

La **Figure V.1.2** montre le pourcentage de viabilité estimée par la coloration Eosine-Nigrosine des spermatozoïdes conservés par réfrigération pendant 48h à 4°C. La viabilité totale est estimée à **79,8 \pm 8,3%** (0h), **76,2 \pm 12,8%** (24h) et **77,2 \pm 9,9%** (48h). L'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les traitements avec des complexes à la cyclodextrines (CLC, TLC) et par la vitamine C (Vit-C) et ceci sur les différentes périodes de conservation.

Malgré l'absence de signification statistique, on peut noter que l'association entre la vitamine C et le cholestérol et l' α -tocophérol (TLC/Vit-C ; CLC/Vit-C) montre -surtout à 48h- une diminution de viabilité par rapport au control. On observe aussi une légère amélioration de la viabilité avec le temps concernant les traitements CLC et TLC allant de **73,2%** (24h) à **81,4%** (48h) et de **74,7%** (24h) à **81,4%** (48h), respectivement.

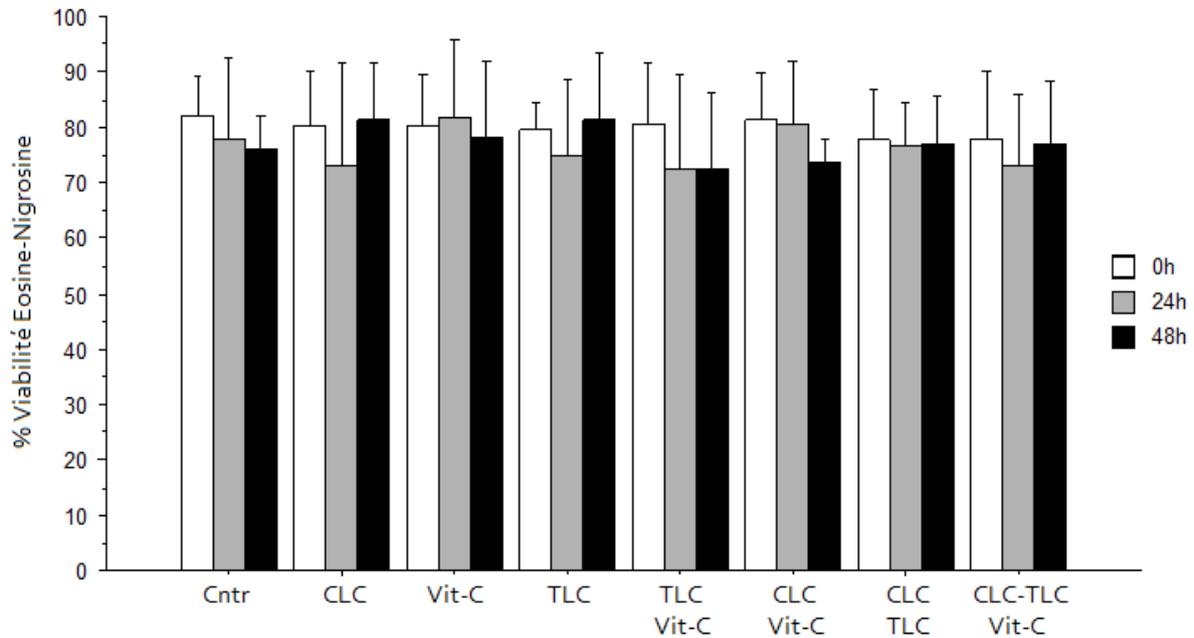


Figure V.1.3 : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité à L'Eosine-Nigrosine du sperme du lapin après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE).

V.1.4 L'estimation de l'intégrité acrosomique par Trypan Blue :

La **Figure V.1.3.a** montre des images micrographiques de l'évaluation de l'intégrité acrosomique par la méthode Trypan blue. Le spermatozoïde vivant (**Live**) montre une région post-équatoriale non colorée (transparente), et lorsqu'il est coloré en blue foncé, le SPZ est considéré mort (**Dead**). L'acrosome intègre se démarque en un croissant rose, un acrosome endommagé en couleur lavande ; la perte de l'acrosome donne une nuance grise à la région pré-équatoriale de la tête.

Les résultats du Trypan-blue ont montré que les SPZ du lapin préservent leur intégrité acrosomique durant les 48h de conservation à 4°C. Le pourcentage total des spz **Live-Intact** est de **70,9 \pm 4,5%** (0h) ; **74,8 \pm 8,9%** (24h) et **72,2 \pm 8,9%** (48h) ; cependant aucun effet significatif des différents traitements n'a été observé (Fig. **V.1.3.b**). La sous population **Live-Damaged** et **Live-Missed** n'a affichée qu'un faible pourcentage.

La Figure V.1.3.c montre que les spz morts n'ont pas une tendance à préserver l'intégrité de leurs acrosome. La majorité des spz morts se caractérise par un **acrosome Missed** ($18,5\pm 5,9\%$). Les spz **dead-intact** ne représentent qu'un faible pourcentage ($1,7\pm 2,4\%$), et qui est significativement élevé dans le traitement CLC/TLC à 24h. D'autre part, le traitement TLC/Vit-C à 0h présente significativement un faible pourcentage ($15,8\pm 3,7\%$) en comparaison avec Vit-C ($26,3\pm 2,5\%$), CLC/Vit-C ($24,3\pm 3,2\%$), CLC/TLC ($23,4\pm 2,9\%$) et CLC/TLC/Vit-C ($24,1\pm 8,8\%$).



Figure V.1.4.a : micrographies de l'intégrité acrosomique par Le Trypan-Blue.

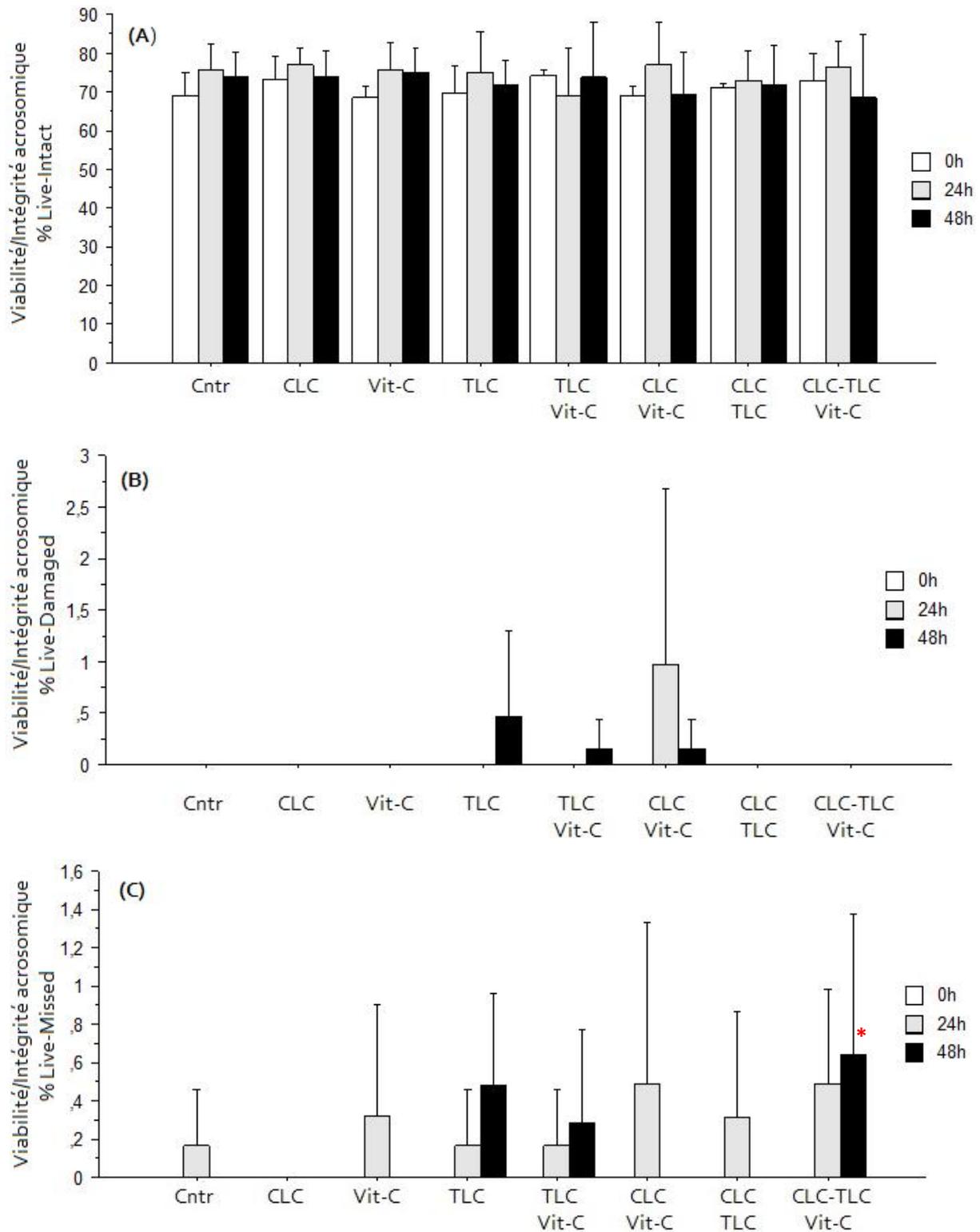


Figure V.1.4.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité et l'intégrité acrosomique par Trypan-Blue après 48 heures de réfrigération à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE)

(A) Live-Intact ; (B) Live-Damaged ; (C) Live-Missed

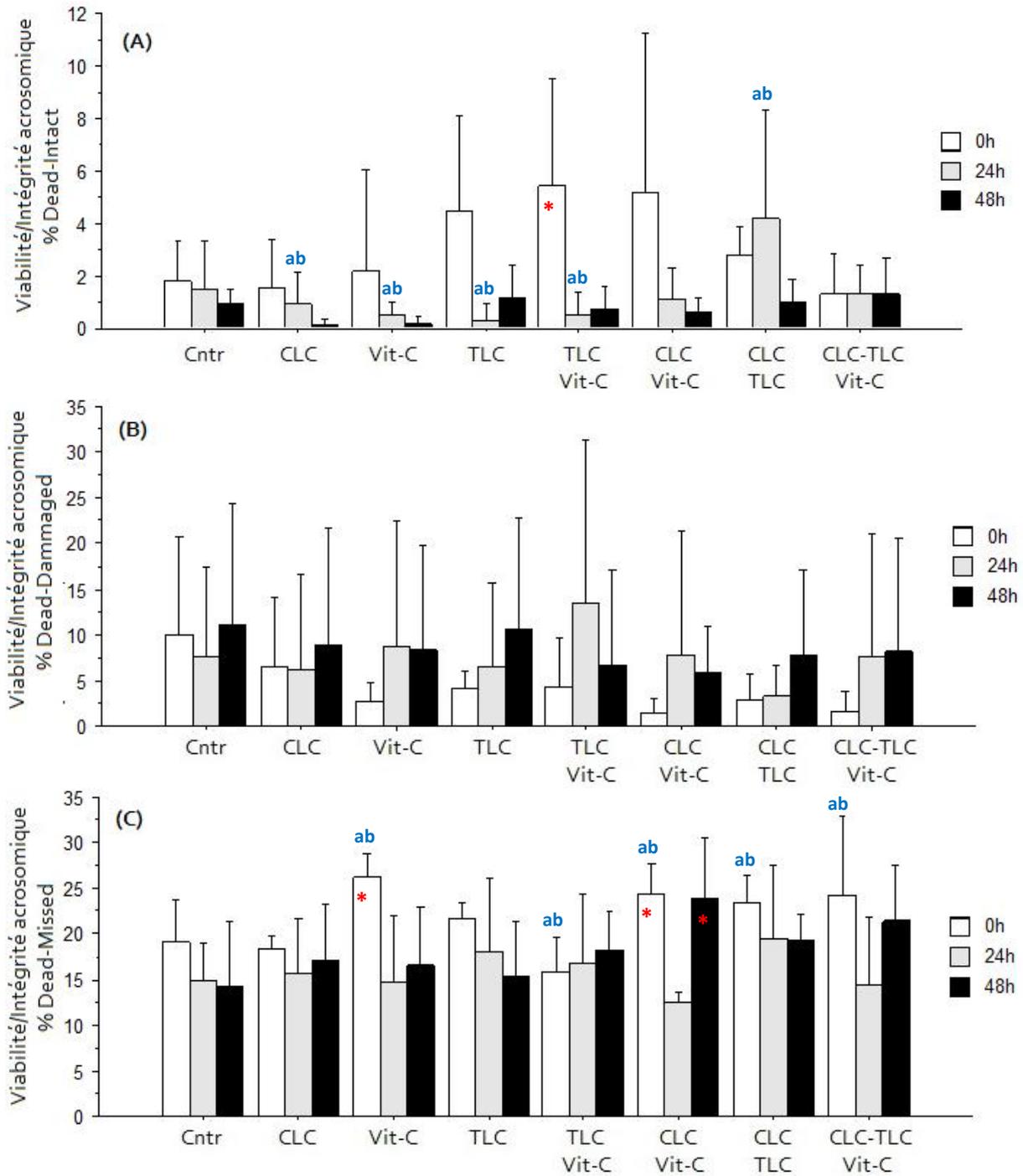


Figure V.1.4.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur la Viabilité et l'intégrité acrosomique par Trypan-Blue après 48 heures de réfrigération à 4°C : Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy±SE).
(A) Dead-Intact ; (B) Dead-Damaged ; (C) Dead-Missed
 (abc = différence entre traitements) (* = différence entre 0h, 24h, 48h)

V.1.5 L'évaluation du stress oxydatif :

V.1.5.a Le statut oxydatif total par mesure du pouvoir d'inhibition à l'égard du radical ABTS^{•+}:

La **Figure V.1.5.a** démontre une augmentation du pouvoir inhibiteur (scavenger) à l'égard du radical ABTS au cours de la conservation du sperme. Aucune différence significative n'a été notée entre 0, 24 ou 48h de conservation. Par rapport à la comparaison entre traitement, on note une amélioration du pouvoir inhibiteur en comparaison avec le control.

V.1.5.b Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase :

La **Figure V.1.5.b** montre une évaluation relative de l'activité de l'enzyme catalase évaluée par la mesure du H₂O₂ consommé sur une minute. Les résultats montrent une surproduction d'H₂O₂ dans les traitements **VitC**, **TLC** et **TLC-VitC** après 24h de conservation. Après 48h, les traitements vitaminiques surtout **CLC-VitC** augmentent l'activité de la Catalase par rapport au contrôle. Cependant, l'analyse statistique ne démontre aucun effet significatif.

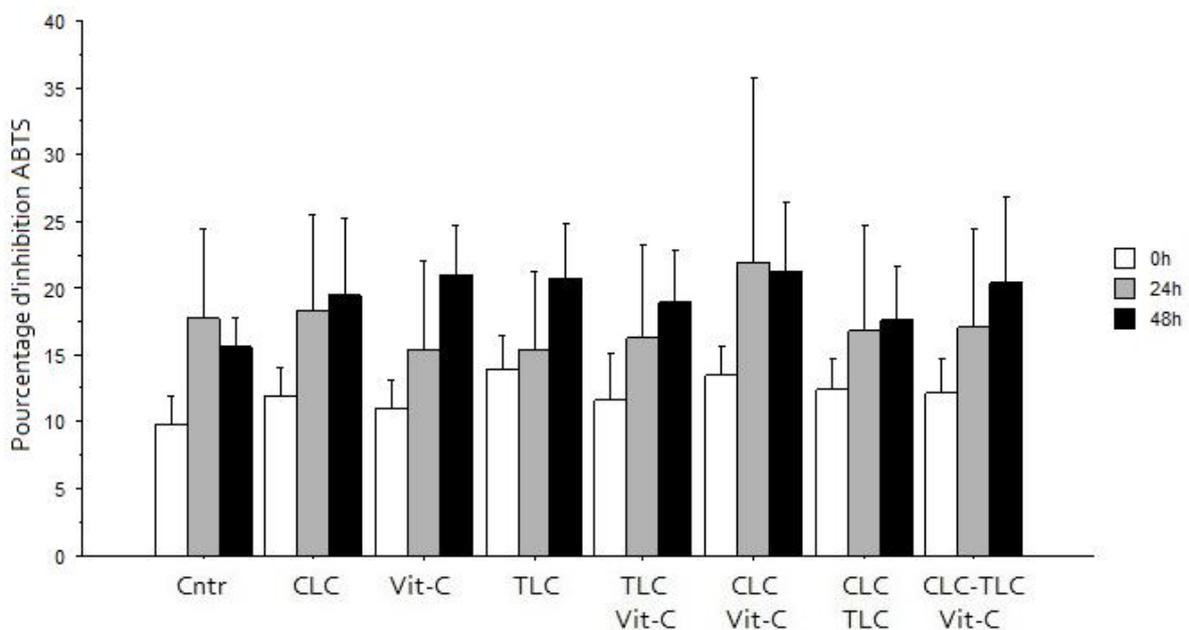


Figure V.1.5.a : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le pourcentage de l'inhibition du radical ABTS après 48 heures de réfrigération à 4°C : Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE).

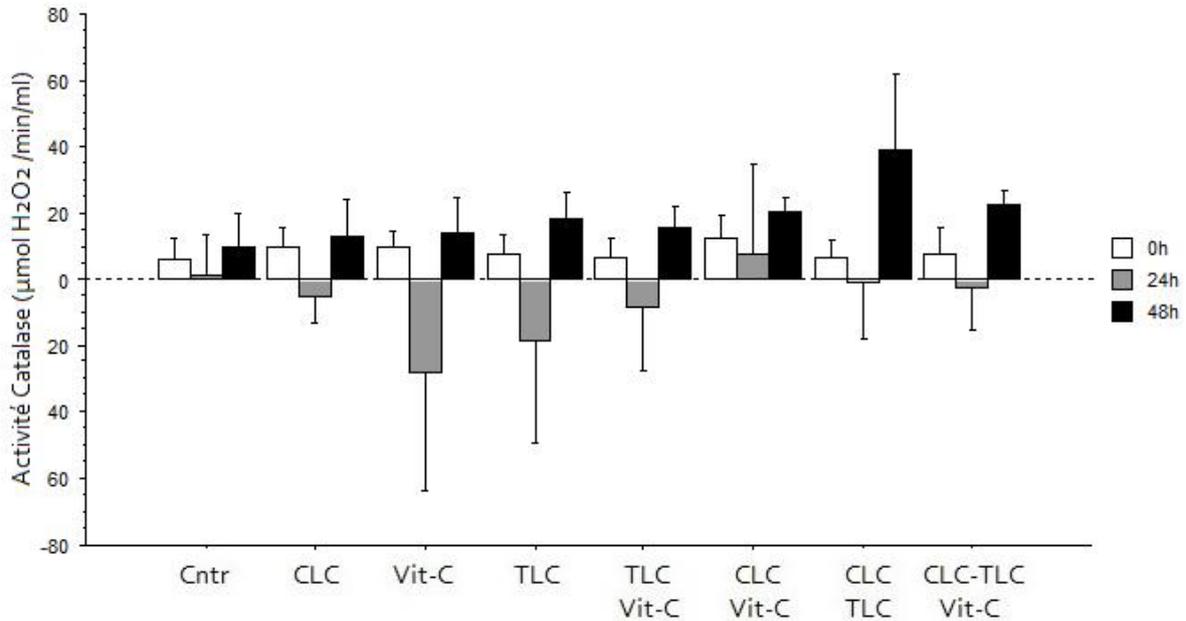


Figure V.1.5.b : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur l'activité de l'enzyme Catalase (degré de H₂O₂ consommé par minute) durant 48 heures à 4°C : Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE).

V.1.5.C La détermination de la peroxydation lipidique par mesure du TBARS :

La **Figure V.1.5.c** montre la concentration du produit de peroxydation lipidique MDA, mesuré par TBARS. Au début de la conservation (0h), les résultats montrent que les différents traitements ont des niveaux de peroxydation lipidique semblables. A 24h de conservation, le traitement CLC enregistre un niveau de peroxydation ($1,7\pm 0,7$ nmol/ml) lipidique significativement plus élevé en comparaison avec le contrôle ($1,12\pm 0,3$ nmol/ml), VitC ($0,9\pm 0,2$ nmol/ml) et TLC. Cependant, à 48h, les traitements TLC ($1,6\pm 0,7$ nmol/ml) et CLC-TLC-VitC ($1,56\pm 0,13$ nmol/ml) enregistrent les concentrations en MDA les plus élevées même si elles sont statistiquement non-significatives.

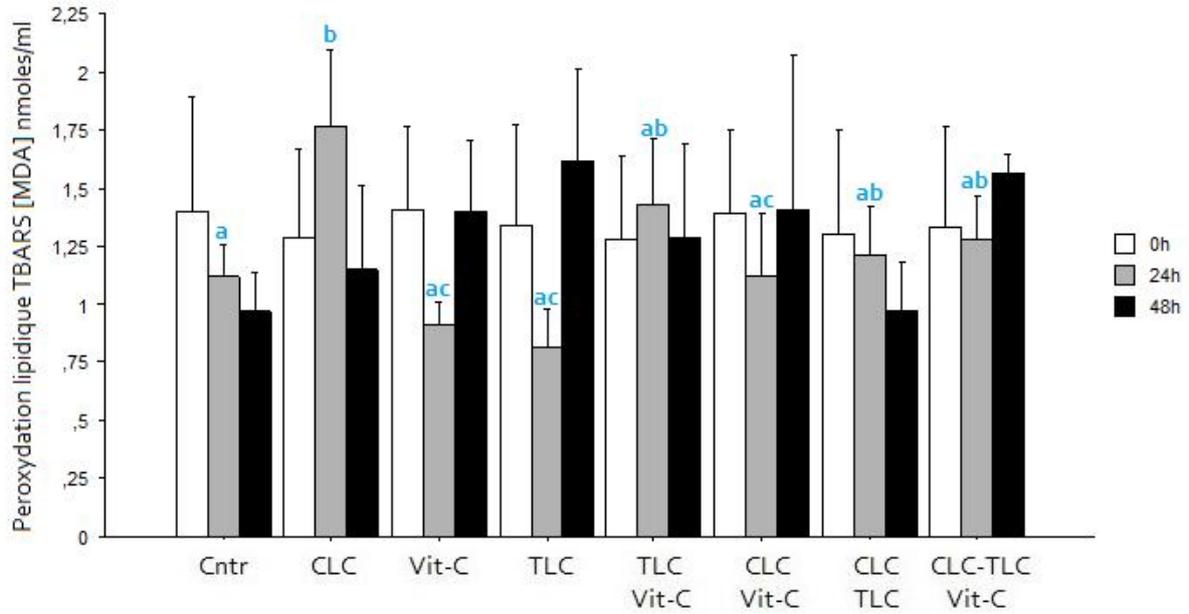


Figure V.1.5.c : L'effet du cholestérol, α -tocophérol et Vitamine C sur le degré de la peroxydation lipidique (TBARS) durant 48 heures à 4°C :

Contrôle (Cntr), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC), Vitamine C (Vit-C) et les associations CLC, TLC et Vitamine C ; (Moy \pm SE). (abc = différents lettres indiquent une différence significative "p<0.05" entre traitements pour la durée de conservation appliquée)

V.2. Résultats de la congélation (-196°C) :

Le **tableau V.2.1** représente les caractéristiques initiales du sperme frais utilisé dans l'expérience II. Les valeurs moyennes pour le volume et la concentration étaient inférieures aux valeurs observées par [Brun et al. \(2002\)](#) mais dans la même gamme de motilité de masse ($Mm \geq 6$), (volume (0,67), concentration ($716 \cdot 10^6$ spz) respectivement). La motilité du sperme utilisé (Mm et Mi) a montré un score moyen (6,7 et 2,9) avec des pourcentages de motilité acceptables.

Table V.2.1 :

Les moyennes \pm SEM des paramètres du sperme frais utilisé en expérience II.

(n=5)	Volume	Mm	Mi	% Mot	Cn(X10 ⁶)
	0.42 \pm 0.49	6.7 \pm 0.2	2.95 \pm 0.16	78.3 \pm 2.78	468.98 \pm 27.77

Mm : motilité massale; Mi : motilité individuelle ; %Mot : pourcentage de motilité; Cn: concentration

Les effets du cholestérol et de l' α -tocophérol sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) en post-décongélation sont présentés dans le **tableau V.2.2** et dans la **figure V.2.1**. En Comparaison au contrôle, les résultats ont montré que la complexation du cholestérol et de l' α -tocophérol avec la β -cyclodextrine (CLC et TLC) présentent des valeurs plus élevées mais non significatives pour la MOT et la PMOT. La même tendance a été observée en comparant le CLC et la TLC au cholestérol (Chl) ou à l' α -tocophérol (Toc) non complexée. En revanche, le Chl et Toc ne présentaient aucun effet observable comparativement au contrôle.

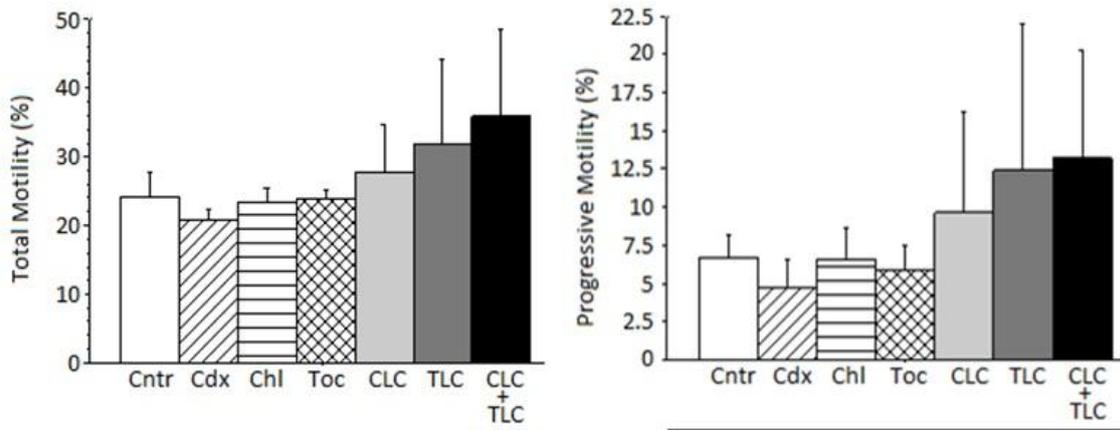


Figure V.2.1 : L'effet du cholestérol et l' α -tocophérol sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin après décongélation :

contrôle (Cntr), β -cyclodextrines (Cdx), cholestérol (Chl), α -tocophérol (Toc), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC) et l'association CLC & TLC (CLC+TLC) ; (Moy \pm SEM).

Les effets du cholestérol et de l' α -tocophérol sur les paramètres cinématiques après décongélation sont présentés sur le **tableau V.2.2** et dans la **figure V.2.2**. Les vitesses curviligne (VCL), vitesse moyenne du trajet (VAP) et vitesse linéaire (VSL) des spz ont été significativement améliorées ($p < 0,05$) par CLC en comparaison avec le contrôle. De plus, les cyclodextrines chargées en α -tocophérol (TLC) ont augmenté de manière significative les différents paramètres ($p < 0,05$), y compris VCL, VAP et VSL. L'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) et de la fréquence du battement croisé (BCF), sont significativement plus élevées ($p < 0,05$) pour CLC et TLC par rapport au témoin. Aucun

Table 2

Les moyennes \pm SEM de l'effet du cholestérol et du l' α -tocopherol sur les paramètres de motilité en post-dégel.

Parameter	Cntr	Cdx	Chl	Toc	CLC	TLC	CLC+TLC
TM (%)	24,2 \pm 3,3	20,6 \pm 1,5	23,4 \pm 1,9	23,7 \pm 1,2	27,5 \pm 7,1	31,7 \pm 12,5	35,8 \pm 12,7
PM (%)	6,6 \pm 1,5	4,7 \pm 1,8	6,5 \pm 2,1	5,8 \pm 1,6	9,6 \pm 6,5	12,4 \pm 9,5	13,1 \pm 7
VCL (μ m/s)	23,2 \pm 0,8 ^a	23,2 \pm 1,0 ^a	24,1 \pm 0,9 ^a	24 \pm 1,0 ^a	30,8 \pm 1,2 ^b	31,1 \pm 0,9 ^b	31,8 \pm 0,9 ^b
VAP (μ m/s)	10,1 \pm 0,5 ^a	10,2 \pm 0,7 ^a	10,3 \pm 0,6 ^a	10,3 \pm 0,6 ^a	13 \pm 0,6 ^b	13,5 \pm 0,5 ^{bc}	14,6 \pm 0,5 ^c
VSL (μ m/s)	5,3 \pm 0,4 ^a	5,7 \pm 0,6 ^{ac}	5,5 \pm 0,5 ^a	5,6 \pm 0,5 ^a	7,3 \pm 0,4 ^b	7,1 \pm 0,3 ^{bc}	7,8 \pm 0,4 ^b
ALH (μ m)	1,3 \pm 0,04 ^a	1,3 \pm 0,05 ^a	1,4 \pm 0,04 ^a	1,4 \pm 0,04 ^a	1,7 \pm 0,05 ^b	1,8 \pm 0,04 ^{bc}	1,8 \pm 0,04 ^c
BCF (Hz)	1,6 \pm 0,10 ^a	1,3 \pm 0,09 ^a	1,8 \pm 0,12 ^a	1,5 \pm 0,11 ^b	2,4 \pm 0,13 ^b	2,5 \pm 0,10 ^b	2,7 \pm 0,10 ^b

^{abc}Les valeurs avec des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives ($P < 0,05$). TM: totalmotility; PM: progressivemotility; VCL, curvilinear velocity; VAP, average path velocity; VSL, straight-line velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat-cross frequency.

effet significatif n'a été enregistré lorsque le cholestérol (Chl) et l' α -tocophérol (Toc) sont utilisés sans complexation. Lorsque CLC ou TLC sont simultanément ajoutés au sperme (CLC + TLC), une amélioration des paramètres cinématiques est observée avec cependant aucune différence significative ($P < 0,05$) pour VCL, VAP, VSL, ALH et BCF.

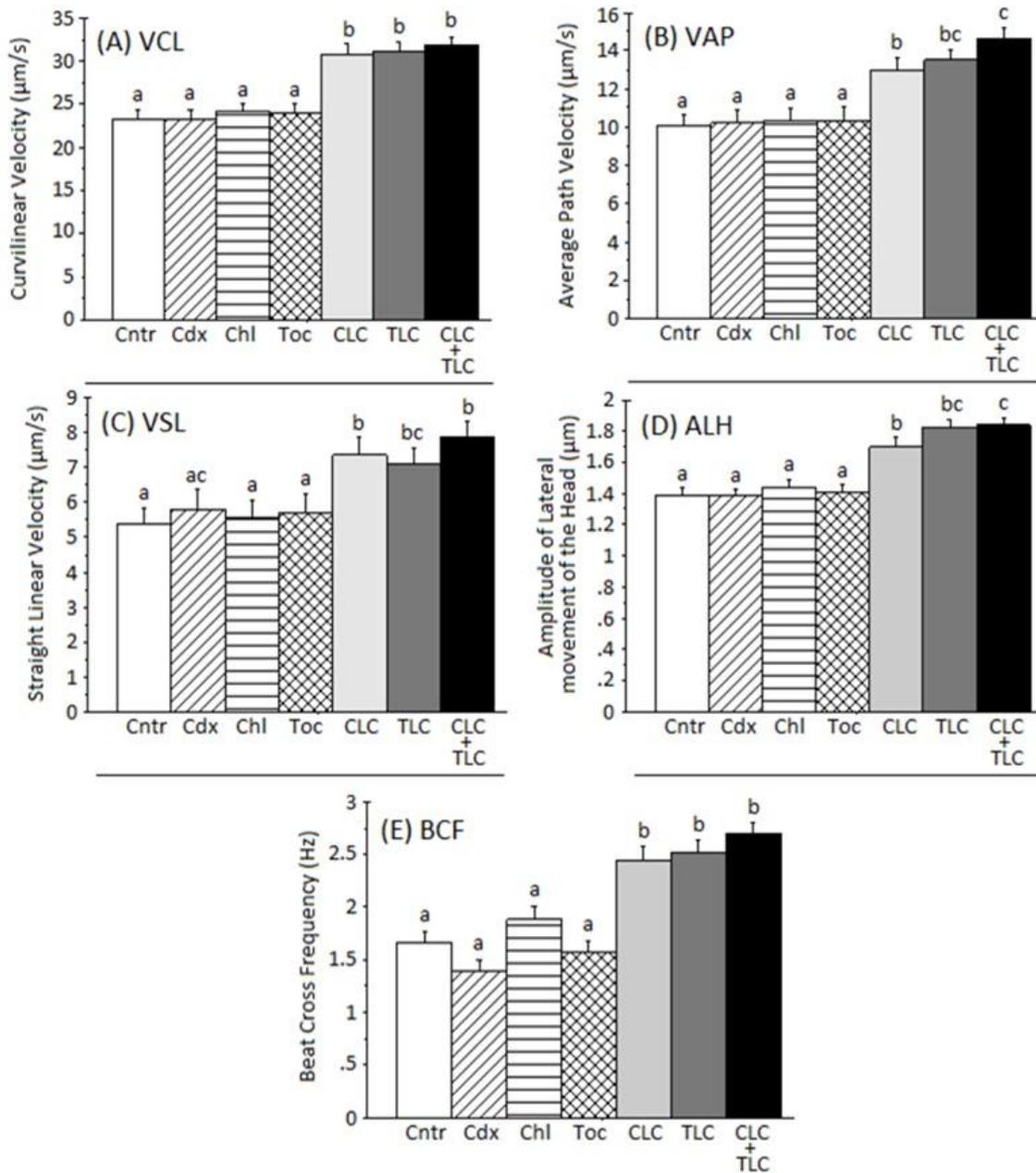


Figure V.2.1 : L'effet du cholestérol et l' α -tocophérol sur curvilinear velocity (VCL) ; straight line velocity (VSL) ; average path velocity (VAP); amplitude of lateral movement of the head (ALH) and beat cross frequency (BCF) du sperme du lapin après décongélation :

contrôle (Cntr), β -cyclodextrines (Cdx), cholestérol (Chl), α -tocophérol (Toc), cholesterol-loaded-cyclodextrins (CLC), α -tocophérol-loaded-cyclodextrins (TLC) et l'association CLC & TLC (CLC+TLC) ; (Moy \pm SEM).

V.3. Discussion :

V.3.1. En Général :

La conservation du sperme à basses températures offre plusieurs avantages à la filière de la production animale. La réfrigération (15 à 04°C) et la congélation (-196°C) répondent à des objectifs respectifs d'un stockage du sperme à moyen terme (48h à 96h) et à long terme (plusieurs années). L'utilisation différée du sperme –avec succès- accroît le gain commercial notamment des lignées à fort potentiel génétique.

Les basses températures représentent cependant un choc thermique qui va nuire à la structure, viabilité et fécondité des spermatozoïdes. Ainsi, l'utilisation d'un tel procédé à grande échelle –chez plusieurs espèces domestiques- représente un enjeu industriel majeur.

Chez le lapin, le sperme frais pour l'insémination artificielle doit être réalisé dans les meilleurs délais après la récolte ; il est connu que l'incubation du sperme du lapin à 37°C engendre une déplétion rapide de la motilité allant de 80 à 20 % seulement au bout de 4 heures (Dilorio *et al.* 2014). **La réfrigération** (15 et 04°C), elle, permet de préserver une bonne qualité et fertilité mais seulement pour 24 h (Roca *et al.* 2000 ; Echegaray-Torres *et al.* 2004). Le sperme du lapin est considéré par plusieurs auteurs comme « cold-choc-Resistant » (résistant au choc thermique) mais l'allongement de la réfrigération pour plus de 72h reste problématique avec une diminution significative de la motilité (<40%) et de l'intégrité du spermatozoïde (<50%) (Rosato *et al.* 2011).

D'autre part, **la congélation chez le lapin** est caractérisée par des résultats modérés en termes de fertilité et/ou de prolificités (Mocé *et al.*, 2009) et une nette détérioration de la qualité cinématique (ex : VCL 46 vs 78 µm/s) (Viudes de Castro *et al.*, 2005) après décongélation notamment après incubation subséquente à 37°C (Dilorio *et al.*, 2014) ce qui implique l'usage du sperme le plus vite possible après décongélation.

Il est aussi admis que le **choc thermique** provoque des altérations à la membrane plasmique. Amener le sperme à 4°C expose le spermatozoïde à une désorganisation structurale de la bicouche de phospholipides (Maderious *et al.*, 2002). Le traitement et le passage à -196°C expose aussi le spz à la toxicité des CPA (agents cryoprotectants). Le choc mécanique, due à la formation des cristaux de glace, reste aussi un événement à tolérer en raison du passage par des extrêmes osmotiques (hyper/hypo) liés à la congélation-décongélation (Benson *et al.*, 2012).

Durant le processus de conservation, le spz produit de la chaleur conséquemment à l'utilisation de l'ATP ce qui génère une surproduction d'espèces oxydantes (ROS) et qui aggrave le statut vital du spz par la peroxydation des lipides membranaires et des altérations nucléaires sévères (Tatone *et al.*, 2010).

Parmi les différentes **stratégies** retenues pour améliorer la qualité du sperme réfrigéré ou congelé, nous avons retenu dans la présente thèse d'apporter directement au spz des éléments réactifs nécessaires à sa membrane plasmique à savoir le **cholestérol** et les antioxydants (**α-tocophérol** et **acide ascorbique**) ; ceci permettra d'une part de consolider sa structure (cholestérol) et d'autre part, la protéger simultanément contre les attaques oxydatives des ROS.

Nous avons utilisé un procédé de complexation pour le cholestérol et l'α-tocophérol avec une molécule cage bipolaire « la **Méthyl-β-Cyclodextrines** », et ceci afin de solubiliser le cholestérol et l'α-tocophérol (hydrophobes) dans le dilueur de base de conservation.

Notre **hypothèse** stipule que ces complexes, **CLC** (cholesterol-loaded-Cyclodextrin) et **TLC** (Tocopherol-loaded-Cyclodextrin) vont libérer au contact de la membrane- leurs contenues « actifs », et les insérer dans la bicouche phospholipidique. Les traitements vont alors renforcer la membrane, par l'ajout du cholestérol, et la préserver du stress oxydatif par le tocophérol.

V.3.2. Le cholestérol, et l'intérêt du CLC pour le sperme lapin:

Le **cholestérol** est un composant important de la membrane plasmique. Le ratio cholestérol: phospholipides conditionne la capacité des spermatozoïdes -de différentes espèces- à résister au choc thermique. Les espèces à ratio faible (taureau, bélier, porc et cheval) sont considérées comme « cold chock sensibles » (sensibles au choc thermique), alors que celles au ratio élevé (lapin, homme, chien) sont dites « cold-chock-résistants » (sensibles au choc thermique) ([Mocé et al., 2010a](#)). Ainsi, plusieurs études ont montré que le traitement du sperme de différentes espèces par le cholestérol, particulièrement complexé à la cyclodextrine **CLC**, apporte une amélioration de la viabilité et de la motilité des gamètes ([Purdy et Graham. 2010](#) ; [Crispillo et al., 2013](#) ; [Hartwig et al., 2014](#) ; [Mocé et al., 2014](#) ; [Salmon et al., 2016](#)).

Les **spermatozoïdes du lapin** présentent un ratio cholestérol : phospholipides élevé (0,88) ([Watson. 1981](#)). Ainsi, selon [Mocé et al., \(2005\)](#), traiter un sperme initialement riche en cholestérol n'apportera aucun effet sur sa qualité après conservation. Cependant, **la présente étude** -dans sa partie réfrigération- montre que le CLC a amélioré significativement la motilité progressive PMOT, VAP et LIN après 24h par rapport au control.

D'une manière similaire, plusieurs auteurs indiquent l'intérêt du CLC à 4°C chez plusieurs espèces. Le travail de [Aksoy et al., \(2010\)](#) montre –chez le lapin– que le CLC augmente la tolérance osmotique du sperme frais, mais aussi il apporte une protection à 4°C et inhibe la réaction acrosomique prématurée. [Torres et al., 2006](#) et [Crispillo et al., 2013](#) montrent également que le CLC augmente la motilité et la viabilité après 24 et 48 h. Cependant, il n'a aucun effet sur la viabilité, l'intégrité de l'acrosome ou le pouvoir scavenger de la catalase (envers H₂O₂). Seule la peroxydation lipidique est améliorée après 24 h de conservation à 4°C.

Le CLC à 4°C a été surtout étudié chez le cheval; [Glazzar et al., 2009](#) montrent que le CLC augmente la perméabilité membranaire et [Torres et al., 2006](#), [Cresppillo et al., 2013](#) et [Hartwig et al., 2014](#) indiquent que les sperme du cheval traité par le CLC protège la mobilité totale et progressive, et la viabilité est plus élevée après 24 et 48 h à 4°C. Cependant, peu d'études ont analysé l'effet du CLC sur le statut oxydatif, à l'exception de [Naseer et al., 2015](#) chez le mouton.

En **congélation**, malgré la richesse initiale du sperme du lapin en cholestérol cela ne le protège pas contre les effets délétères. Ceci été particulièrement documenté [Mocé & Vicente \(2009\)](#). De même, le sperme humain congelé enregistre des très faibles résultats [Mocé & Vicente \(2009\)](#) malgré la présence du caractère cold-choc résistant et un ratio cholestérol : phospholipide élevé similaire à celui du lapine.

Le sperme du lapin présente un faible ratio de phospholipides polyinsaturés : saturés ([Gliozzi et al., 2009](#)) ce qui lui confère une perméabilité intermédiaire et nécessite plus de temps pour l'étape d'équilibration avec les cryoprotectants (CPA) ce qui pourrait expliquer sa vulnérabilité.

Durant la congélation, nous avons observé une amélioration des paramètres cinématiques sans améliorer le pourcentage de MOT et PMOT, ceci est similaire aux résultats de [Aksoy et al., \(2010\)](#) qui montrent une augmentation de la tolérance osmotique chez le lapin par CLC. [Flan et al., 2000](#) indiquent qu'il y a une relation étroite entre la tolérance osmotique et la survie des gamètes après congélation. La congélation du sperme du chien (riche en cholestérol) par le CLC, n'a pas amélioré aussi les MOT et PMOT mais avec plutôt un effet positif sur les paramètres cinématiques ([Belala et al., 2016](#)).

Il semble que le cholestérol inséré dans la membrane plasmique par complexation avec les cyclodextrines permet une diminution de la fluidité suite à la sur-charge en cholestérol avec en conséquence une moindre perte en phospholipides. Dans ce sens, [Dilorio et al. \(2014\)](#) indiquent que la perte en phospholipides explique directement la perte de la viabilité. [Dilorio et al. \(2014\)](#) estiment que le traitement LDL pourrait remplacer les phospholipides lors de la rupture durant la congélation.

Les effets du cholestérol sur un spermatozoïde riche en cette molécule n'a pas été largement étudié en intégrant les ratio des phospholipides. D'autres perspectives s'ouvrent ainsi à l'horizon notamment par le fait que l'usage des **cyclodextrines seules** reste inefficace pour améliorer les paramètres de motilité après congélation. Le pouvoir « cholestérol-efflux » (arrachage du cholestérol de la membrane) des cyclodextrines sur les spermatozoïdes de lapin semble amoindri par sa richesse en cholestérol. Ces observations concordent avec celles rapportées par [Mocé et al. \(2005\)](#) qui montrant que les spz de lapin traités par les cyclodextrines seules ne présentent pas des taux de survie diminués après congélation. Ces observations pourraient être liées au caractère riche de la membrane en cholestérol ou aussi à la présence de granules prostatique riche en stérol naturelles connus sous le nom de modulateur du cholestérol efflux ([Castellini et al., 2012](#) ; [Collodel et al., 2012](#)).

V.3.3. La Vitamine E, le principal antioxydant membranaire :

Etant donné que les spermatozoïdes perdent la majorité des antioxydants cytoplasmiques au cours des stades de spermiogenèse, la vitamine E (Tocophérols) reste le système intégré le plus important dans la membrane contre les dommages peroxydatifs. Supplémenter l' α -tocophérol aux dilueurs de sperme pourrait ainsi être une solution efficace contre les ROS.

Dans notre étude, nous avons proposé les cyclodextrines pour solubiliser l' α -tocophérol dans le dilueur de base dans le but d'optimiser l'effet antioxydant de l' α -tocophérol. Le traitement par la vitamine E est réalisé par des formes de tocophérols direct ou d'analogues « Trolox, à notre connaissance l'utilisation de la complexée d' α -tocophérol « TLC » n'a jamais été étudiée auparavant dans les diluants de sperme mammifères. L'inclusion de l' α -tocophérol dans les cyclodextrines assurerait une insertion progressive de l' α -tocophérol dans la membrane et constituerait une alternative à la supplémentation nutritionnelle.

L'ajout aux dilueurs de la vitamine E a été exploré chez plusieurs espèces animales notamment en **congélation** du sperme du porc. L'équipe de l'école vétérinaire de Buenos Aires, d'Argentine ont montré l'effet bénéfique dans plusieurs rapports ; [Breininger et al., \(2009\)](#) et [Sattore et al., \(2007, 2012\)](#), indiquent que la vitamine E à 200 μ g/ml protège le sperme de la peroxydation après 2h d'incubation à 37°C post-décongélation ; elle augmente la motilité et diminue le profile de phosphorylation tyrosine associé à la capacitation. Chez le bovin, [Mutha Rao et al., 2012](#) rapportent une motilité élevée et une peroxydation faible chez les groupes traité par 0.3mg/ml de Vitamine E.

Chez le cheval, [Almeida et Ball. \(2005\)](#) concluent que les succinates de l' α -tocophérol sont plus efficaces que l' α -tocophérol sur la conservation de la motilité à 37°C. [Mendez et al., 2012](#) indiquent que l'ajout de 400 μ g/ml de vitamine E augmente la motilité et réduit la production du MDA dans le sperme du porc durant 72h de conservation à 15°C.

Dans la présente étude, Nous avons observé que l' α -tocophérol préchargé dans les β -cyclodextrines augmente la motilité des paramètres cinématiques après 24h à de conservation à 4°C et améliore la VAP après 48h. De même, dans la congélation, ce complexe a amélioré les paramètres de motilité vraisemblablement dû à la préservation des biomembranes de la peroxydation lipidique. Cependant les concentrations en MDA sont plus élevées dans le traitement de vitamine E sans ça soit statistiquement significatif.

Chez le lapin, l'effet de l' α -tocophérol (Vitamine E) sur le sperme a été exploré exclusivement via une complémentation nutritionnelle ([Castellini et al. 2000](#)); les auteurs ont augmenté de 1,9 fois la quantité de vitamine E dans le sperme frais et de 2,19 fois dans le sperme stocké à 5 ° C par une supplémentation alimentaire en α -tocophérol. Cependant, cet enrichissement n'a pas amélioré les caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes mais a réduit seulement l'oxydation des lipides membranaires pendant le stockage.

V.3.4. L'effets synergique Cholestérol-Antioxydant :

Nous avons dans ce travail testé l'association du cholestérol avec des antioxydants. Nous avons utilisé individuellement la vitamine C dans la conservation à 4°C et les résultats montrent une amélioration de quelques paramètres cinématiques, particulièrement la VSL avec une réduction de la ALH après 24h et 48h. Nous avons aussi associé la vitamine C et/ou Vitamine E avec le cholestérol, et nous avons observé pour quelques paramètres un effet synergique, notamment pour le **CLC-TLC-VitC** dans les paramètres cinématiques et le **CLC-VitC** dans le pourcentage de la mobilité globale.

Cependant, nous n'avons retrouvé aucune amélioration par l'association des deux vitamine TLC et VitC. Ceci est en désaccord avec des résultats antérieurs qui indiquent l'effet synergique de la combinaison Vitamine E-Vitamine C ([Martinez-Paramo et al. 2012](#) (poisson)), ([Castellini et al. 2000](#), [Youcef et al.](#), [Najjar et al., 2013](#) (Lapin)). [Lafalsi et al. \(2011\)](#) indiquent que la combinaison des différents antioxydants n'apparaît pas comme plus efficace que l'utilisation individuelle, avec même une réduction significative du pourcentage de viabilité.

En **congélation**, nous avons observé la même synergie entre le cholestérol et les antioxydants. Lorsque les spermatozoïdes sont traités simultanément avec **CLC et TLC**, un effet additif était observé indiquant probablement une double protection contre les dommages membranaires et les lésions oxydatives durant la cryoconservation.

Conclusion

Conclusion générale :

Le présent vise à explorer de nouvelles voies d'amélioration de la conservation du sperme du lapin aussi bien à court terme à 4°C, qu'à long terme par congélation à -196°C. Quatre molécules ont été utilisées, les **méthyle-β-Cyclodextrines** pour solubiliser les molécules actives lipophiles, « **le cholestérol** » composé essentiel à l'intégrité de la membrane cytoplasmique et les vitamines E et C connues pour leur rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydatif.

Les cyclodextrines sont apparues comme efficaces dans l'amélioration de la solubilité du cholestérol et de l'α-tocophérol exprimé par une meilleure protection des de la mobilité des spermatozoïdes par les complexes utilisés. Les cyclodextrines permettent de délivrer les molécules actives directement à la membrane plasmique par une meilleure miscibilité dans les dilueurs de conservation usuellement utilisés. Ceci permet une amélioration des qualités cinématiques et structurelles du sperme aussi bien en réfrigération qu'en congélation.

Les résultats ont montré que le CLC et TLC améliorent de manière significative ($p < 0,05$) les paramètres de motilité après 24h de conservation à 4°C et en post-décongélation. La VCL et la VAP du **TLC** sont significativement plus élevées après 24h à 4°C en comparaison avec le contrôle ; de même, la VAP de 48h est également supérieure. Pour la congélation (-196°C), le **TLC** et **TLC/CLC** augmentent aussi significativement les paramètres cinématiques en poste-congélation.

En ce qui concerne le statut oxydative du sperme réfrigéré, aucune différence significative n'a été notée pour l'inhibition de l'ABTS et du H₂O₂, alors que les traitements TLC ou TLC/Vit-C enregistrent des taux de TBARS significativement les plus bas.

Plusieurs perspectives intéressantes s'ouvrent à l'horizon pour mieux expliquer les observations du présent travail. Ainsi, il serait judicieux d'étudier la capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes conservés de la sorte, tout en explorant plus profondément le le profile antioxydant par une analyse plus profonde en intégrant : la SOD, la Gluthaion peroxydase et le potentiel mitochondrial, en intégrant les marqueurs liés à l'apoptose.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet du CLC et TLC sur plusieurs variantes de protocoles de conservation en intégrant l'effet des différentes concentrations, différentes périodes de conservation, synergie avec d'autres molécules (jaune d'œuf, LDL, liposome) ou d'autres procédés incluant l'usage de la centrifugation, du Percoll gradient et du Swimming-up. En fin, à des études fertilité in-vivo et in-vitro permettront de statuer sur l'apport réel de ces procédés de conservation dans l'amélioration des productions.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. Aebi, H.: Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 1984, 105, 121–126.
2. Águila L., Zambrano F., Arias M.E., Felmer R. : Sperm capacitation pretreatment positively impacts bovine intracytoplasmic sperm injection. *Molecular Reproduction & Development*, 2017, 84(7), 649-659.
3. Aitken R.J., Wingate J.K., De-Iuliis G.N., Koppers A.J., McLaughlin E.A.: Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, 91, 4154–4163.
4. Aksoy M., Akman O., Lehimcioğlu N.C., Erdem H.: Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, 120, 166-172.
5. Albert W. Girotti. : Mechanismes of lipid piroxydation., *journal of free radicals in biology & medicine*. 1985, 1, 87-95.
6. Alm-packalen, K.: Semen quality and fertility after artificial insemination in dairy cattle and pigs. 2009, PhD Dissertation, University of Helsinki.
7. Almeida J., Ball B.A.: Effect of-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005, 87, 321–337.
8. Amann R.P., Pickett. B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*., 1987, 7, 145-173.
9. Amidi F., Pazhohan A., Shabani Nashtaei M., Khodarahmian M., Nekoonam S.: The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*., 2016, DOI 10.1007/s10561-016-9566-5
10. Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 2002; 296:1821– 1825.
11. Andrea A., Stela Z. : Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Rom Biotechnol Lett.*, 2010, 15, 33–41.

12. Ansari M., Towhidi A., Moradi Shahrababak M., Bahreini M. : Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Slovak J. Anim. Sci.*, 2012, 45 (1), 7-13.

B

13. Bailey J.L., Bilodeau J-F., Cormier N.: Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. MiniReview. *Journal of Andrology.*, 2000, 21, 1-7.
14. Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology.* 29: 1245-1251.
15. Bansal A.K., Bilaspuri G.S.: Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International.*, 2011, ID 686137, 7pages.
16. Batellier F., Vidamen M., Fauquant J., Duchamp G., Arnaud G., Yvon J.M. Magistrini M., 2001.: Advances in cooled semen technology *Anim. Reprod. Sci.* Vol 68. pp 181-190
17. Belala r., Fatmi S., Kaidi R., Iguer-ouada M.: Benefis of cholesterol and α -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Revue Méd. Vét.*, 2016, 167, 1-2, 22-27.
18. Belhadj Salem L., Bosquillon C., Dailey L.A., Delattre L., Martin G.P., Evrard B., Forbes B.: Sparing methylation of β -cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *Journal of Controlled Release.*, 2009, 136, 110-116.
19. Bencheikh N. : Production de sperme et fertilité du lapin mâle. *Oryctolagus cuniculus*. effets de la fréquence de collecte et du type génétique. Thèse d'état. Ecole nationale agronomique de toulouse, 1993.
20. Benoff S., Hurley I., Cooper GW., Mandel F.S., Rosenfeld D.L., Hershlag A.: Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod.*, 1993, 8, 2141-2154.
21. Benson J.D., Woods E.J., Walters E.M., Critser J.K. : The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology.*, 2012, 78, 1682-1699.

22. Bilodeau J.F., Blanchette S., Gagnon C., Sirard M.A. : Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 2001, 56, 275–286.
23. Boiti C.: GUIDELINES FOR THE HANDLING OF RABBIT BUCKS AND SEMEN. *World Rabbit Sci.*, 2005, 13, 71 – 91.
24. Boulbina I.: caractéristique de la semence du lapin de population locale (*Oryctolagus cuniculus*). Thèse de magistère. Ecole nationale supérieure D'Alger, 2011.
25. Boussit D.: Reproduction et insémination artificielle en cuniculture, 234 pages, Association Française de Cuniculture, INRA, Lempdes, France, 1989
26. Branco CS., Garcez M.E., Pasqualotto F.F, Erdtman B., Salvador M.: Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 2010, 60, 235–237.
27. Breininger E., Beorlegui N.B., O'Flaherty C.M., Beconi M.T. : Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 2005, 63, 2126–2135.
28. Briand-Amirat L., Bencharif D., Pineau S., Tainturier D. : Fertility Results After Artificial Insemination with Bull Semen Frozen with Low Density Lipoprotein Extender. 2013, Chapitre 04 In : Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed. INTECH (Ed).
29. Brouwers J.F., Silvaa P.F.N., Gadella B.M.: New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. *Theriogenology*, 2005, 63, 458–469.
30. Brun J.M., Theau-Clément M., Bolet G.: The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002, 70, 139-149.
31. Bucak MN., Uysal O.: The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. *Indian Vet J.*, 2008, 85, 148–150.
32. Bucci D., ISANI G., SPINACI M.: Comparative immunolo- calization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, 45 (2), 315–322.
33. Buege, J.A.; Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52: 302–310.

34. Burnaugh L., Ball B.A., Sabeur K., Thomas A.D., Meyers S.A.: Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science.*, 2010, 117 (3-4), 249–260.

C

35. Castagne D.: ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES CYCLODEXTRINES ET LES MEMBRANES LIPOSOMALES OU BIOLOGIQUES. Thèse docteur en pharmacie, Faculté de médecine, Université de liège, 2010.
36. Castellini C., Lattaioli P.: Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 1999, 57, 111-120.
37. Castellini C., Lattaioli P., Bernardini M., Dal Bosco A. : EFFECT OF DIETARY α -TOCOPHERYL ACETATE AND ASCORBIC ACID ON RABBIT SEMEN STORED AT 5° C. *Theriogenology.*, 2000, 54, 523-533.
38. Castellini C., Cardinali R., Dal Bosco A., Minelli A., Camici O.: Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology.*, 2006, 65, 703–712.
39. Castellini C., Mourvaki E., Cardinali R., Collodel G., Lasagna E., Del Vecchio M.T., Dal Bosco A.: Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. *Theriogenology*, 2012, 78, 715-723.
40. Chen, Y., Foote, R.H.: Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim.Reprod. Sci.*, 1994, 35, 131–143.
41. Christian A.E., Haynes M.P., Phillips M.C., Rothblat G.H.: Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, 1997, 38, 2264–2272.
42. Colazo M.G., Mapletoft R.J.: A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal.*, 2014, 55, 772-780.
43. Collodel G., Cardinalic R., Morettia E., Mattiolic S., Ruggeric S., Castellinic C. : Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriogenology.*, 2012, 77, 1021–1026.
44. Cuyan K., Baspınar N., Bucak M.N., Akalın P.P. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology.*, : 2011, 63,1–6.

45. Crespilho A.M., Sprizziri B.E., Meyers M., Graham J.K. : The effect of cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5°C. *Equine veterinary Sci.*, 2013, 33, 663-666.
46. Curry M.R., Redding B.J., Watson P.F. : Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiologie.*, 1995, 32, 175-181.

D

47. Dalvit G.C., Cetica P.D., Beconi M.T. : EFFECT OF α -TOCOPHEROL AND ASCORBIC ACID ON BOVINE IN VITRO FERTILIZATION. *Theriogenology.*, 1998, 49, 619-627.
48. Del-Valle E.M.M.: Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry.*, 2004, 39(9), 1033-1046.
49. Dilorio M.: Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. PhD thesis, Université of Molise, 2014.
50. Dodziuk H. : Molecules with holes – Cyclodextrines. In: WILEY-VCH Verlag GmbH (Ed): *Cyclodextrins and Their Complexes*, Weinheim, 2006, 1-30.
51. Drobnis E.Z, Crowe L.M, Berger T., Anchozdoguy T.J, Overstreet J.W., Crowe J.H.: Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool.*, 1993, 265, 432-437.

E

52. EcheGARAY-Torres., Olvera-Carmona J.A., Salcedo-Baca R., Mendoza-Alvarez B.: Quality and fertility of preserved rabbit semen at 15°C, In *Gelatin supplemented extender*. 8th world Rabbit Congress, 2004, September 7-10, Puebla, Mexico.
53. Evans H.M., Bishop K.S.: On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science.*, 1922, 56, 650-651.

F

54. Fahy G.M., Rall W.F.: *Vitrification: an overview.*, 2007, In *Vitrification in assisted reproduction*, Ed Informa health care UK Ltd.

55. Fang Y-Z., Yang S., Wu G.: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002, 18, 872-879.
56. Fortun-Lamothe L., Theau-Clément M., Combes S., Allain D., Lebas F., Le-Normand B., Gidenne T. : Physiologie. *In* : Quae (Ed.) : Le Lapin, de la biologie à l'élevage, Gidenne T & Huyghe C, 2015, 33-76.
57. Freitas-Dell'Aqua C-P., Monteiro G.A., Dell'Aqua J.A., Papa F.O. : The Effects of Refrigeration Temperature and Storage Time on Apoptotic Markers in Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2013, 33, 27-30.

G

58. Gadea J., Molla M., Selles E., Marco M., Garcia-Vazquez F., Gardon J.: Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 2011, 62, 40-46.
59. Gączarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczyk B., Stankiewicz T. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turk J Biol*, 2015, 39, 582-594.
60. Garreau H., Theau-Clément M., Gidenne T. : Anatomie, taxonomie, origine, évolution et domestication. *In* : Quae (Ed.) : Le Lapin, de la biologie à l'élevage, Gidenne T & Huyghe C, 2015, 13-32.
61. Gerrotti A.W. : Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology and medicine*, 1985, 1, 87-95.
62. Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N., Lessing J.B., Lerner-Geva L., Amit A. : The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril*, 1996, 66, 430-434.
63. Gogol P.: Motility parameters and intracellular ATP content of Rabbit spermatozoa stored for 3 days at 15°C. *Folia Biologica*, 2013, 61, 1-2, 87-91.
64. Gibb Z., Lambourne S. R., Aitken R. J.: The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction*, 2014, 91 (3), article 77.

65. Gibb Z., Aitken R.J.: The Impact of Sperm Metabolism during *In Vitro* Storage: The Stallion as a Model. BioMed Research International., 2016, ID 9380609, 8 pages.
66. Gidenne T.;, Le Lapin, de la biologie à l'élevage. 2015, Quae (Ed)
67. Glazar A.I., Mullen S.F., Liu J., Benson J.D., Critser J.K., Squires E.L., Graham J.K. : Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. Cryobiology., 2009, 59, 201–206.
68. Gliozzi T.M., Zaniboni L., Maldjian A., Luzi F., Maertens L., Cerolini S.. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. Theriogenology., 2009, 71, 910-919.
69. Guthrie H.D., Welch G.R. : Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology., 2012, 78, 1700-1708.

H

70. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine. In : Oxford University Press (Ed), Oxford, UK, 2003.
71. Hammerstedt RI-I, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology., 1992, 29, 26-38.
72. Hartwig F.P., Lisboa F.P., Hartwig F.P., Freitas-DellAqua C.P., Carneiro J.A.M., Alvarenga M.A, Papa F.O., DellAqua Junior J.A.: Influence of cholesterol-loaded cyclodextrin incorporation on the acrosome reaction of cooled equine spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science., 2014, 34, (abstract).
73. Hassanien H.H.M., Baiomy A.A.: Effect of breed and parity on growth performance, litter size, litter weight, conception rate and semen characteristics of medium size rabbits in hot climates. EPSA, V 31, N°1. 2011.
74. Hirayama F., Zaoh K., Harata K., Saenger W., Uekama K., Chem. Lett., 2001, 636–637.
75. Hittori K., Ikeda H., : Modification reactions of cyclodextrins and the chemistry of modified cyclodextrins. In: WILEY-VCH Verlag GmbH (Ed): Cyclodextrins and Their Complexes, Weinheim, 2006, 31-64.
76. Hoagland, H., Pincus, G.: Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. J. Gen. Physiol., 1942, 25, 337–344.

77. Holt W.V.: FUNDAMENTAL ASPECTS OF SPERM CRYOBIOLOGY: THE IMPORTANCE OF SPECIES AND INDIVIDUAL DIFFERENCES. *Theriogenology*, 2000, 53, 47–58.
78. Hu J.H., Tian W.Q., Zhao X.L., Zan L.S., Wang H., Li Q.W., Xin Y.P. : The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim Reprod Sci.*, 2010, 121, 72–77.

I

79. Iborra A., Companyo M., Martinez P., Morros A. : Cholesterol Efflux Promotes Acrosome Reaction in Goat Spermatozoa. *Biology of reproduction.*, 2000, 62, 378-383.

K

80. Kamal-Eldin A., Keappelqvist L.: The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids.*, 1996, 37(7), 671-701.
81. Kato Y., Shoei S., Nagao Y.: Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- β -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. *Zygote.*, 2010, 19, 21–30.
82. Kilsdonk E.P., Yancey P.G., Stoudt G.W., Bangerter F.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H.: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry.*, 1995, 270, 17250-17256.
83. Koontz J.L., Marcy J.E., O'Keefe S.F., Duncan S.E.: Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants α -Tocopherol and Quercetin. *J. Agr. Food. Chem.*, 2009, 57, 1162–1171.
84. Konyali C., Tomas C., Blanch E., Gomez E.A., Graham J.K., Mocé E. ; : Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology.*, 2013, 67, 124-131.
85. Kovacs A., Foote R.H.: Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem.*, 1992, 67, 119-124.

L

86. La Falci V.S.N., Yrjö-Koskinen A.E., Fazeli A., Holt W.V., Watson P.F.: Antioxidant combinations are no more beneficial than individual

- components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5 °C. *Animal Reproduction Science*, 2011, 129, 180–187.
87. Langlais J., Jan F.W.K., Granger L., Raymond L., Bleau G., Roberts K.D. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.*, 1988. 20, 185–201.
 88. Lavara R., Moce E., Lavara F., Viudes de Castro M.P., Vicente S.J. : Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits?. *Theriogenology.*, 2005, 64, 1130–1141.
 89. Lee Y.S., Lee S., Lee SH., Yang B.K., Park C.K. : Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Anim reprod Sci.*, 2015, 159, 124-130.
 90. Lee S., Lee Y.S., Hee-Lee S., Yang B.K., Park C.K.: Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the viability and acrosome damage of sex-sorted sperm in frozen-thawed bovine semen. *Biological Research Thessaloniki.*, 2016, 23(5), 7 pages.
 91. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K.: Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys. J.*, 1995, 68, 1888–1894.
 92. Lone S.A., Prasa J.K., Ghosh S.K., Das G.K., Balamurugan B., Katiyar R., Verma M.R.: Effect of incubation on freezability of cholesterol-loaded cyclodextrine treated buffalo (*bulbalus bulbalis*) spermatozoa. *Veterinary World.*, 2016, 9, 182-185.
 93. Long J.A., Kulkarni G.: An Effective Method for Improving the Fertility of Glycerol-Exposed Poultry Semen. *Poultry Science.*, 2004, 83, 1594–1601.
 94. Long J, Purdy P.H., Zuidberg K., Hiemstra S.J., Velleman S.G., Woelders H.: Cryopreservation of turkey semen: effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. *Cryobiology.*, 2014,8(3),371-378.
 95. Longobari V., albero G., De Canditiis C., Salzano A., Natale A., Balestrieri A., Neglia G., Campanile G., Gasparrini B. : Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology.*, 2016, 89, 359-364.

M

96. Mangiagalli M.G., Cesari V., Cerolini S., Luzi F., Toschi I. : EFFECT OF LYCOPENE SUPPLEMENTATION ON SEMEN QUALITY AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN RABBIT. *World. Rabbit. Science.*, 2012, 20, 141 - 148 .
97. Martínez-Páramoa S., Diogoa P., Dinisa M.T., Herráezb M.P., Sarasquetec C., Cabritac E.: Incorporation of ascorbic acid and -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology.*, 2012, 77, 1129–1136.
98. Matilainen L., Toropainen T., Vihola H., Hirvonen J., Jarvinen T., Jarho P., Jarvinen K.: In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release.*, 2008,126, 10-16.
99. Maxwell E.J.: Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix., *Wool Technol Sheep Breeding.*v 1993, 41, 291–302.
100. Medeiros C.M., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. : Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?., *Theriogenology.*, 2002, 57(1), 327-344.
101. Mendez M. F. B., Zangeronimo M. G. Rocha L. G. P., Faria B. G., Pereira, B. A. C. D. Fernandes, Chaves B. R., Murgas L. D. S.. Sousa R. V. : Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal* 2013, 7:5, 793–798.
102. Minaei MB : Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iran J Reprod Med*, 2012, 10:99.
103. Mocé E., Vicente J.S., 2002. : Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 189–196.
104. Mocé E., Vicente J.S., Lavara R. : Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology.*, 2003, 60, 115-123.
105. Mocé E., Vicente J.S. : Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science* 2009, 110, 1–24.
106. Mocé E., Graham J.K.: Effect of egg yolk, cooling / thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm. In: *The American Society of Andrology (éd.): 30th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Seattle, WA, USA. J. Androl. Suppl.*, MarchApril, 2005, 79, abstract 121.

107. Mocé E., Blanch E., Tomas C., Graham J.K. : Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod. Domes. Anim.*, 2010a, 45, 57-66.
108. Mocé E., Purdy P.H., Graham J.K.: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010b, 118, 236-247.
109. Mocé E., Tomas C., Blanch E., Graham J.K. : Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. *Animal.*, 2014, 8 (5), 771-776.
110. Moraes E.A., Graham J.K., Torres C.C.A., Meyers M., Spizziri B. : Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci.*, 2010, 118, 148-154.
111. Moraes E.A., Matos W.C.G., Graham J.K., Ferrari JR W.D.: cholestanol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Anim Reprod Sci.*, 2015, 158, 19-24.
112. Mourvaki E., Cardinali R., Dal-Bosco A., Castellini C.: *In vitro* antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. *Reproductive Biology and Endocrinology.*, 2010, 8:16, 1-7.
113. Mukai K., Uemoto Y., Fukuhara M., Nagaoka S., Ishizu K.: ENDOR study of the cation radicals of vitamin E derivatives; relation between antioxidant activity and molecular structure. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1992, 65, 2016-2020.
114. Mutha Rao M., Pawan Kumar Verma., Muzafer Ahmed Bhat, Pandey A.K., R.Raina.: Effect Of Anti-Oxidant Supplementation On Post Thaw Sperm Characteristics, Cellular Enzyme Leakage And Lipid Peroxidation In Bull Semen. *Indian Journal of Animal Reproduction* 2012, 33 (1), 29-32.

N

115. Nabi I. : PERFORMANCES DE REPRODUCTION DU LAPIN (*Oryctolagus cuniculus*) DE POPULAION BLANCHE : Production spermatique des mâles et fertilité des femelles Conduites en insémination artificielle. Thèse de magistère. Ecole nationale supérieure D'Alger, 2012.

116. Nagao Y., Ohta Y., Murakami H., Kato Y.: The effects of methyl- β -cyclodextrin on in vitro fertilization and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote*, 2010, 18, 323–330.
117. Najjar A. BeN Saïd S., Najjar T., Kalamou NS., BeN Khalifa N., BeNaïcha E., BeN mrad M: Influence of VitaminS c and e on Sperm motility of rabbit buck. *World Rabbit Sci.* 2013, 21: 45-48
118. Naseer Z., Ahmed E., Aksoy M., Kuçuk N., Serin I., Ceylan A., Boyacioglu M., Kum C. : Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology.*, 2015, 71, 18-23.
119. Nishijima K., Yamaguchi S., Tanaka M., Sakai Y., Koshimoto C., Morimoto M., Watanabe T., Fan J., Kitajima S. : Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. *Exp. Anim.*, 2014, 63(2), 149-154.

O

120. O'Flaherty C., Beconi M., Beorlegui N.: Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia.*, 1997, 29, 269–275.
121. Oliveira C.H., Vasconcelos A.B., Souza F.A., Martins-Filho O.A., Silva M.X., Varaso F.C., LARGARES M.A. : Cholesterol addition protects membranes intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci.*, 2010, 118, 194-200.

P

122. Pamornsakada T., Pojprasath T., Suwimonteerabutr J., Tharasanit T. : Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology.*, 2011, 63, 90-95.
123. Parrish J.J., Foote R.H.: Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *BinI Reprod.*, 1986, 35, 253-255.
124. Parinaud J., Vieitez G., Vieu C., Collet X., Perret B. : Enhancement of zona binding using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Human Reproduction*, 2000, 15 (5), 1120-2000.

125. Partyka A., Bonarska-Kujawa D., Sporniak M., Strojecki M., Nizanski W.: Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics. *Zygote*, 2016, 1-10.
126. Pena F., Johannisson A., Wallgren M., Martinez H.R.: Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.*, 2003, 78, 85–98.
127. Pike L.J.: Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.*, 2006, 47, 1597–1598.
128. Pisoschi A.M., Pop A. : The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 2015, 97, 55-74.
129. Polgar Z.S., Virag G.Y., Baranyai B., Bodo Sz., Kovacs A., Gocza E.: Evaluation of effects of cryopreservation on rabbit spermatozoa membranes with Trypan Blue-GIEMSA staining. 8th world Rabbit Congress, 2004, September 7-10, Puebla, Mexico.
130. Polge C, Smith AU, Parkes AS, 1949: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
131. Purdy P.H., Graham J.K.: Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 2004a, 48, 36-45.
132. Purdy P.H., Graham J.K. : Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reprod.*, 2004b., 71, 522-527.
133. Purdy P.H, Moce´ E., Stobart R., Murdoch W.J., Moss G.E, Larson B., Ramsey S., Graham J.K., Blackburn H.D.: The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation., *Anim Reprod Sci*, 2010, 118, 231–235.

R

134. Rajoriya J.S., Prasad J.K., Ramteke S.S., Perumal P., Ghosh S.K., Singh M., Pande M., Strivastava N. : Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, 2016, 164, 72-81.

135. 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 Radical Biology and Medicine*. 26: 1231–1237.
136. Roca J., Martinez S., Vazquez J.M., Lucas X., Parrilla I., Martinez E.A. : Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 64, 103-112.
137. Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vazquez J.M., Martinez E.A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine: insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology.*, 2003, 60, 77–87.
138. Rodríguez-Gil J. E.: Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod.Domest. Anim.*, 2006, 41(2), 11-20.
139. Rodriguez-Gil J.E. : Energy Management of Mature Mammalian Spermatozoa. *In : INTECH (Ed) : Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*, 2015.
140. Rosato MP., Laffaldano N. : Effect of Chilling Temperature on the Long-Term Survival of Rabbit Spermatozoa held Either in a Tris-Based or a Jellified Extender. *Reprod. Domest. Anim.*, 2011, 46, 304-311.
141. Rosato M.P., Di-Iorio M., Manchisi A., Gambacorta M., Petrosino G., Centoducati G., Santacroce M.P., Iaffaldano N. : *In vitro* survival and lipid peroxidation status of rabbit spermatozoa after both chilled and frozen storage in lycopene enriched extenders. *Livestock. Science.*, 2012, 146, 199-202.
142. Rosato M.P., Laffaldano N. : Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrificatio., 2013, 79 (3), 508-516.

S

143. Salmon V.M., Leclerc P., Baily J.L. : Cholesterol-loaded cyclodextrine increases the cholesterol content of Goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation. *Biology of Reproduction.*, 2016, 94 (4), 1-12.

144. Salvetti P., Baudot A., Joly T.: Congélation de la semence de lapin : approche calorimétrique. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, 29-30 novembre 2005, Paris. 91-94.
145. Satorre M.M., Breininger E., Beconi M.T., Beorlegui N.B. : α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 2007, 68, 958–965.
146. Satorre M.M., Breininger E., Beconi M.T.: Cryopreservation with α -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 2012, 78, 1548–1556.
147. Serin I., Aksoy M., Ceylan A.: Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2011, 23, 106–111.
148. Shahidi F., Zhong Y.: Lipid Oxidation, Measurement Methods., 2005, *In Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set*. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.
149. Silva S., Soares A., Batista A., Almeida F., Nunes J., Peixoto C., Guerra M. : *In vitro* and *in vivo* evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46, 874–881.
150. Singh M., Sharma R., Banerjee U.C.: Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 2002, 20, 341-359.
151. Stradaoli G., Noro T., Sylla L., Monaci M.: Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, 2007, 7, 1249–1255.
152. Sueishi Y., Hori M., Inazumi N. : Characterization of inclusion complex of vitamin E compound with 2,6-di-*O*-methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer and its kinetic determination for radical scavenging ability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2012, 72, 467–472.
153. Sugkraroek P., Kates M., Leader A., Tanphaichitr N.: Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll gradient pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil Steril*, 1991, 55, 820–827.

154. Suzuki Y.J., Tsuchiya M., Wassal S.R., Choo Y.M., Govil G., Kagan V.E., Packer L.; Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -Tocotrienol : Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry.*, 1993, 32, 10692-10699.
155. Swierstra E.E., Foote R.H.: Duration of Spermatogenesis and Spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *Am. J. Anat*, 1965, 116, 401-412.
156. Szejtli J.: Cyclodextrin Technology. In : Kluwer Academic (Ed.), Dordrecht, 1988.
157. Szczesniak-Fabianczyk B., Bochenek M., Smorag Z., Ryszka F.: Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol.*, 2003, 3, 81–87.

T

158. Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura K., Irie T., Nakagata N.: Methyl-Beta-Cyclodextrin Improves Fertilizing Ability of C57BL/6 Mouse Sperm after Freezing and Thawing by Facilitating Cholesterol Efflux from the Cells. *BIOLOGY OF REPRODUCTION.*, 2008, 78, 546–551.
159. Tappel A.L. : Vitamin E. Chapter7, Part II, considering the individual vitamins, In: Elsevier (Ed) : *The Vitamins*, 2012, DOI: 10.1016/B978-0-12-381980-2.00007-4.
160. Tariq M., Khan M., Shah M.G, Nisha A.R., Umer M., Hasan S.M., Rahman A., Rabbani I.: Exogenous antioxidants inclusion during semen cryopreservation of farm animals. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.*, 2015, 7(3), 2273-2280.

161. Tateno H.: Chromosome analysis of mouse zygotes produced by intracytoplasmic injection of spermatozoa exposed to acrosome reaction inducing agents methyl- β -cyclodextrin and calcium ionophore A23187. Assisted reproduction., 2010, 27, 41-47.
162. Tatone C., Di-Emidio G., Vento M., Ciriminna R., Artini P.G.: Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. Gynecological Endocrinology., 2010, 26(8), 563–567.
163. Thibier M., Wagner H.G.: World statistics for artificial insemination in cattle. Livestock Prod Sci., 2002, 74, 203-212.
164. Tomas C., Gomez-Fernandez J., gomez-Izquierdo E., Mocé E., de Mercado E. : Addition of cholesterol-loaded-Cyclodextrins to the thawing extender : effects on boar sperm quality. Reprod Domest Anim., 2014, 49, 427-432.
165. Torres P., Serres C., Gomez-Cuetara C., Santiago I., Mateos E., Alvarez A.L. : Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. Anim Reprod Sci., 2006, 94, 148-151.

U

166. Uekema K., Hirayama F., Arima H.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. In: WILEY-VCH Verlag GmbH (Ed): Cyclodextrins and Their Complexes, Weinheim, 2006, 381-422.

V

167. Varghese A., Das S., Bhattacharya A., Bhattacharya S., Mandal M., Agarwal A. : Effect of cryoprotective additives-reduced glutathione, acetyl-L-carnitine on sperm membrane lipid peroxidation, DNA integrity and recovery of motile human sperm. Fertil Steril., 2005, 84, S410–S411.
168. Vicente J.S., Viudes de Castro M.P., Lavara R., Lavara F. 2000. : Effect of male line on prolificacy from does insemination with low sperm doses. *7th world Rabbit Congress*, 4-7 juillet, Valencia. Spain.
169. Viudes-de-Castro M.P., Mocé E., Vicente J.S., Marco-Jiménez F., Lavara R. : *In vitro* Evaluation of *in vivo* Fertilizing Ability of Frozen Rabbit Semen. Reprod.Domes.Anim., 2005, 40, 136-140.

W

170. Walters E.M., Benson J.D., Woods E.J., Critser J.K. : The history of sperm cryopreservation. *In* : Cambridge University press (Ed) : Sperm Banking: Theory and Practice, Allan A. Pacey and Mathew J. Tomlinson, 2009, 1-10.
171. Watson P.F.: The effects of cold shock on sperm cell membranes. *In*: G.J. MORRIS, A. CLARKE (éd.): Effects of Low Temperatures on Biological Membranes, Academic Press, London, 1981, 189-218.
172. Watson P.F: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60–61, 481–492.
173. WHO, 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. World Health Organisation. Fourth edition.

Y

174. Yancey P.G., Rodriguez W.V., Kilsdonk E.P., Stoudt G.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H.: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 16026– 16034.
175. Yousef M.I., Abdallah G.A., Kamel K.I.: Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 2003, 76, 99–111.

Z

176. Zeng W.X., Terada T.: Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl beta-cyclodextrin. *Animal Reproduction Science.*, 2000, 55, 615-627.
177. Zeng W.X., Terada T.: Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *Andrology.*, 2001, 22(1), 111-118.
178. Zidovetzki R., Levitan I.: Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2007, 1768, 1311–1324.

Annexes

Caractéristiques spermatiques des différents types génériques

Auteurs	Circonstances De l'étude	Génétiques	Caractéristiques de semence							
			Ph	Volume	Mm	Mi	Cn	TSE	MSE	Anom
Crimella <i>et al.</i> (1992)		New zeal.and	7,52	0,66	1,84	-	-	-	-	-
		Californien	7,37	0,65	1,87	-	-	-	-	-
		Burgandy	7,45	0,78	1,73	-	-	-	-	-
		Carmagnola	7,33	0,67	1,52	-	-	-	-	-
Faible différence $p \geq 0,05$										
Virag <i>et al.</i> (1992)	Collecte/sem +2 SN Cn = densité (1-5) Mi en % , P= 0,01	NZ (f)	-	1,12 ^{g,h,k}	-	47,63 ^{g,h,k}	3,26 ^{g,h,k}	-	-	10,77 ^g
		NZ (g)	-	0,89 ^{fk}	-	50,89 ^{fh,k}	2,32 ^{h,fk}	-	-	14,69 ^{fh,k}
		NZ (h)	-	0,88 ^{fk}	-	56,71 ^{fg,k}	2,78 ^{g,k,f}	-	-	11,39 ^g
		Californien(k)	-	1,29 ^{h,g,f}	-	52,85 ^{fg,h}	2,97 ^{fg}	-	-	9,69 ^g
Bencheikh, (1993)	Collecte 2 ejc/sem P<0,01	A1077	6,9	0,71	7,37	3,88	574	378	-	-
		A2066	7,04	0,59	6,68	3,64	394	229	-	-
** ** ** ** **										
Al.varino, (2000)	M en % Différences considérées à la variabilité individuelle,	Black & Tan	-	0,68	-	54	97,6	-	-	19
		NZ white	-	0,97	-	66	309,6	-	-	11
		NZ red	-	0,83	-	49	221,7	-	-	27
		German pied giant	-	1,51	-	71	502,5	-	-	14
Vicente <i>et al.</i> (2000)	Collecte 2 ejc/sem Mi en % (SCA) P<0,05	Lignée V	-	0,9 ^a	-	81 ^a	338 ^a	302 ^a	-	1 ^a
		Lignée A	-	0,9 ^a	-	82 ^a	257 ^b	231 ^b	-	1 ^a
		Lignée H	-	0,9 ^a	-	80 ^a	381 ^a	327 ^a	-	4 ^b
		Lignée R	-	0,6 ^b	-	73 ^b	230 ^b	140 ^c	-	4 ^b
Brun <i>et al.</i> (2002)	Collecte 2 ejc/sem Souches INRA Mm = % ej avec Mm élevée Mi en %	1601(A)	7,23 ^b	0,68 ^a	32,5 ^b	72,1 ^b	441 ^b	298 ^{bc}	217 ^{bc}	-
		2066 (B)	7,38 ^a	0,67 ^a	23,9 ^b	66,6 ^d	412 ^b	265 ^c	182 ^c	-
		(AB)	7,25 ^b	0,61 ^b	25,9 ^b	69,5 ^c	524 ^a	338 ^b	234 ^b	-
		(BA)	7,19 ^b	0,71 ^a	51,5 ^b	75 ^a	554 ^a	394 ^a	296 ^a	-
García-Thomás <i>et al.</i> (2006b)	Collecte 2 ejc/sem Mm 1-5 ; Mi 0-5 P<0,05	Lignée C	7,8 ^a	-	3,2	3,2	-	-	-	14,4 ^b
		CR	7,8 ^a	-	3,2	3,2	-	-	-	10,8 ^a
		RC	7,8 ^a	-	3,3	3,1	-	-	-	14,3 ^b
		Lignée R	7,4 ^b	-	2,9	3,3	-	-	-	8,9 ^a
Brun <i>et al.</i> (2006)	Collecte 2 ejc/sem Mi en % ** <0,01, ***<0,001	Ligné L	6,94	0,6	6,78	76,3	634	368	302	-
		Lignée H	6,93	0,46	6,46	75,8	738	336	290	-
** ** ** **										
Hassanien <i>et al.</i> (2011)	Collecte 2 ejc/sem Mi en % P<0,05	Rex	-	0,54 ^b	-	51,91 ^b	415,1 ^b	224,1 ^b	116,3 ^c	24,3 ^a
		New zeal.and	-	0,57 ^b	-	54,55 ^b	416,7 ^b	237,5 ^b	129,5 ^b	21,3 ^b
		Californien	-	0,62 ^a	-	59,89 ^a	454,1 ^a	281,5 ^a	168,6 ^a	19,5 ^b
		Bal.adi red	-	0,56 ^b	-	55,41 ^b	423,3 ^b	237 ^b	131,3 ^b	20,2 ^b

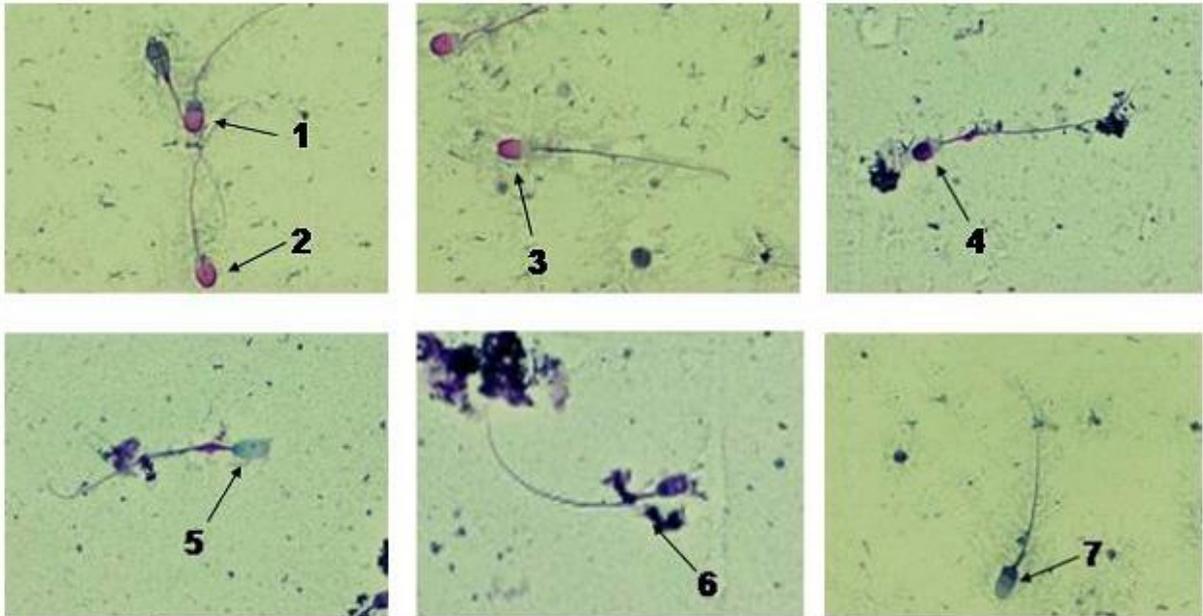


Figure : Evaluation de frottis par coloration de Bleu de Trypan [Polgar et al., 2004](#)

1. Mort avec acrosome intacte ; 2. Vivant avec acrosome intacte ; 3. Vivant, acrosome intacte mais flagelle endommagé ; 4. Vivant avec acrosome endommagé ; 5. Vivant mais absence d'acrosome ; 6. Mort avec acrosome endommagé ; 7. Mort mais absence d'acrosome

Test PLSD de Fisher pour VCL

Effet : Milieu

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Temps de Refrédération

Céllule : 0h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLIC	1,836	2,142	,0929	
1.CNTR, 3.VitC	-,717	2,073	,4980	
1.CNTR, 4.TLC	2,554	2,106	,0174	S
1.CNTR, 5.TLC+VitC	2,840	2,101	,0081	S
1.CNTR, 6.CLIC+VitC	-,441	2,074	,1734	
1.CNTR, 7.CLIC+TLC	-,291	2,042	,0355	S
1.CNTR, 8.CLIC+TLC+VitC	1,629	1,987	,1081	
2.CLIC, 3.VitC	-,253	2,044	,0144	S
2.CLIC, 4.TLC	,718	2,077	,4980	
2.CLIC, 5.TLC+VitC	1,004	2,072	,3423	
2.CLIC, 6.CLIC+VitC	-,327	2,045	,0017	S
2.CLIC, 7.CLIC+TLC	-,407	2,012	<,0001	S
2.CLIC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,207	1,957	,8354	
3.VitC, 4.TLC	3,271	2,007	,0014	S
3.VitC, 5.TLC+VitC	3,557	2,002	,0005	S
3.VitC, 6.CLIC+VitC	-,724	1,973	,4721	
3.VitC, 7.CLIC+TLC	-,474	1,939	,1364	
3.VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	2,346	1,882	,0146	S
4.TLC, 5.TLC+VitC	,286	2,035	,7831	
4.TLC, 6.CLIC+VitC	-,395	2,007	<,0001	S
4.TLC, 7.CLIC+TLC	-,474	1,974	<,0001	S
4.TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,926	1,917	,3440	
5.TLC+VitC, 6.CLIC+VitC	-,428	2,002	<,0001	S
5.TLC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,503	1,969	<,0001	S
5.TLC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,121	1,912	,2143	
6.CLIC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,750	1,940	,4486	
6.CLIC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	3,069	1,882	,0014	S
7.CLIC+TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	3,819	1,847	<,0001	S

Test PLSD de Fisher pour VCL

Effet : Milieu

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Temps de Refrédération

Céllule : 24h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLIC	-,346	2,643	,0013	S
1.CNTR, 3.VitC	-,349	2,851	,0162	S
1.CNTR, 4.TLC	-,696	2,955	<,0001	S
1.CNTR, 5.TLC+VitC	-,338	3,091	,0343	S
1.CNTR, 6.CLIC+VitC	,666	2,576	,6121	
1.CNTR, 7.CLIC+TLC	-,643	2,957	<,0001	S
1.CNTR, 8.CLIC+TLC+VitC	-,736	2,733	,0074	S
2.CLIC, 3.VitC	,848	2,571	,5181	
2.CLIC, 4.TLC	-,235	2,686	,0863	
2.CLIC, 5.TLC+VitC	1,007	2,835	,4860	
2.CLIC, 6.CLIC+VitC	5,012	2,262	<,0001	S
2.CLIC, 7.CLIC+TLC	-,208	2,688	,1285	
2.CLIC, 8.CLIC+TLC+VitC	,610	2,439	,6239	
3.VitC, 4.TLC	-,319	2,891	,0302	S
3.VitC, 5.TLC+VitC	,160	3,030	,9176	
3.VitC, 6.CLIC+VitC	4,165	2,502	,0011	S
3.VitC, 7.CLIC+TLC	-,292	2,893	,0470	S
3.VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,238	2,664	,8612	
4.TLC, 5.TLC+VitC	3,358	3,128	,0354	S
4.TLC, 6.CLIC+VitC	7,363	2,620	<,0001	S
4.TLC, 7.CLIC+TLC	,266	2,995	,8617	
4.TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	2,960	2,774	,0365	S
5.TLC+VitC, 6.CLIC+VitC	4,005	2,772	,0046	S
5.TLC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,302	3,130	,0528	
5.TLC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,397	2,919	,7895	
6.CLIC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,709	2,622	<,0001	S
6.CLIC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,402	2,366	,0003	S
7.CLIC+TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	2,694	2,776	,0572	

Test PLSD de Fisher pour VCL

Effet : Milieu

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Temps de Refrédération

Céllule : 48h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLIC	-,174	3,950	,0383	S
1.CNTR, 3.VitC	-,170	4,334	,4392	
1.CNTR, 4.TLC	-,341	3,775	,0828	
1.CNTR, 5.TLC+VitC	-,143	3,950	,4765	
1.CNTR, 6.CLIC+VitC	-,322	3,676	,0855	
1.CNTR, 7.CLIC+TLC	-,526	3,860	,7892	
1.CNTR, 8.CLIC+TLC+VitC	,821	4,092	,6940	
2.CLIC, 3.VitC	2,464	3,527	,1707	
2.CLIC, 4.TLC	,833	2,811	,5613	
2.CLIC, 5.TLC+VitC	2,740	3,042	,0774	
2.CLIC, 6.CLIC+VitC	,949	2,678	,4873	
2.CLIC, 7.CLIC+TLC	3,648	2,925	,0145	S
2.CLIC, 8.CLIC+TLC+VitC	4,995	3,225	,0024	S
3.VitC, 4.TLC	-,163	3,330	,3368	
3.VitC, 5.TLC+VitC	,276	3,527	,8781	
3.VitC, 6.CLIC+VitC	-,151	3,218	,3557	
3.VitC, 7.CLIC+TLC	1,184	3,426	,4981	
3.VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	2,531	3,685	,1782	
4.TLC, 5.TLC+VitC	1,907	2,811	,1836	
4.TLC, 6.CLIC+VitC	,116	2,413	,9252	
4.TLC, 7.CLIC+TLC	2,815	2,684	,0399	S
4.TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	4,162	3,008	,0067	S
5.TLC+VitC, 6.CLIC+VitC	-,192	2,678	,1896	
5.TLC+VitC, 7.CLIC+TLC	,908	2,925	,5427	
5.TLC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	2,255	3,225	,1704	
6.CLIC+VitC, 7.CLIC+TLC	2,700	2,544	,0376	S
6.CLIC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	4,047	2,884	,0060	S
7.CLIC+TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	1,347	3,115	,3964	

Test PLSD de Fisher pour VSL

Effet : Milieu

Niveau de significativité : 5 %

Eclaté par : Temps de Refrédération

Céllule : 0h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLIC	1,946	1,938	,0491	S
1.CNTR, 3.VitC	-,207	1,876	,0303	S
1.CNTR, 4.TLC	,250	1,905	,7972	
1.CNTR, 5.TLC+VitC	,843	1,901	,3850	
1.CNTR, 6.CLIC+VitC	1,212	1,877	,2056	
1.CNTR, 7.CLIC+TLC	-,569	1,847	,5460	
1.CNTR, 8.CLIC+TLC+VitC	-,106	1,798	,2279	
2.CLIC, 3.VitC	-,402	1,850	<,0001	S
2.CLIC, 4.TLC	-,169	1,880	,0770	
2.CLIC, 5.TLC+VitC	-,103	1,875	,2489	
2.CLIC, 6.CLIC+VitC	-,734	1,850	,4370	
2.CLIC, 7.CLIC+TLC	-,251	1,821	,0068	S
2.CLIC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,305	1,770	,0007	S
3.VitC, 4.TLC	2,324	1,816	,0121	S
3.VitC, 5.TLC+VitC	2,917	1,811	,0016	S
3.VitC, 6.CLIC+VitC	3,286	1,786	,0003	S
3.VitC, 7.CLIC+TLC	1,505	1,755	,0928	
3.VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	,968	1,703	,2650	
4.TLC, 5.TLC+VitC	,593	1,842	,5281	
4.TLC, 6.CLIC+VitC	,962	1,816	,2992	
4.TLC, 7.CLIC+TLC	-,819	1,786	,3689	
4.TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,356	1,735	,1256	
5.TLC+VitC, 6.CLIC+VitC	,369	1,812	,6894	
5.TLC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,141	1,782	,1204	
5.TLC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,194	1,730	,0273	S
6.CLIC+VitC, 7.CLIC+TLC	-,178	1,755	,0468	S
6.CLIC+VitC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,231	1,703	,0077	S
7.CLIC+TLC, 8.CLIC+TLC+VitC	-,537	1,671	,5288	

Test PLSD de Fisher pour VSL
Effet : Milieu
Niveau de significativité : 5 %
Eclaté par : Temps de Réfrigération
Céllule : 48h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLC	-3,064	1,912	,0017	S
1.CNTR, 3.ViIC	-1,976	2,098	,0648	
1.CNTR, 4.TLC	-4,248	1,828	<,0001	S
1.CNTR, 5.TLC+ViIC	-4,967	1,912	<,0001	S
1.CNTR, 6.CLC+ViIC	-5,330	1,780	<,0001	S
1.CNTR, 7.CLC+TLC	-4,666	1,869	<,0001	S
1.CNTR, 8.CLC+TLC+ViIC	-6,592	1,981	<,0001	S
2.CLC, 3.ViIC	1,088	1,707	,2116	
2.CLC, 4.TLC	-1,184	1,361	,0882	
2.CLC, 5.TLC+ViIC	-1,903	1,473	,0113	S
2.CLC, 6.CLC+ViIC	-2,266	1,296	,0006	S
2.CLC, 7.CLC+TLC	-1,602	1,416	,0266	S
2.CLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-3,528	1,561	<,0001	S
3.ViIC, 4.TLC	-2,272	1,612	,0058	S
3.ViIC, 5.TLC+ViIC	-2,991	1,707	,0006	S
3.ViIC, 6.CLC+ViIC	-3,354	1,558	<,0001	S
3.ViIC, 7.CLC+TLC	-2,689	1,659	,0015	S
3.ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-4,616	1,784	<,0001	S
4.TLC, 5.TLC+ViIC	-,719	1,361	,3005	
4.TLC, 6.CLC+ViIC	-1,082	1,168	,0694	
4.TLC, 7.CLC+TLC	-,418	1,300	,5286	
4.TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-2,344	1,456	,0016	S
5.TLC+ViIC, 6.CLC+ViIC	-,363	1,296	,5828	
5.TLC+ViIC, 7.CLC+TLC	,301	1,416	,6767	
5.TLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,625	1,561	,0413	S
6.CLC+ViIC, 7.CLC+TLC	,664	1,232	,2903	
6.CLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,262	1,396	,0763	
7.CLC+TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,927	1,508	,0123	S

Test PLSD de Fisher pour VSL
Effet : Milieu
Niveau de significativité : 5 %
Eclaté par : Temps de Réfrigération
Céllule : 24h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLC	-4,742	1,467	<,0001	S
1.CNTR, 3.ViIC	-2,983	1,582	,0002	S
1.CNTR, 4.TLC	-3,479	1,640	<,0001	S
1.CNTR, 5.TLC+ViIC	-3,054	1,715	,0005	S
1.CNTR, 6.CLC+ViIC	-4,056	1,430	<,0001	S
1.CNTR, 7.CLC+TLC	-5,732	1,641	<,0001	S
1.CNTR, 8.CLC+TLC+ViIC	-5,056	1,517	<,0001	S
2.CLC, 3.ViIC	1,759	1,427	,0157	S
2.CLC, 4.TLC	1,263	1,490	,0968	
2.CLC, 5.TLC+ViIC	1,688	1,573	,0354	S
2.CLC, 6.CLC+ViIC	,686	1,255	,2841	
2.CLC, 7.CLC+TLC	-,990	1,492	,1933	
2.CLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-,314	1,354	,6489	
3.ViIC, 4.TLC	-,496	1,604	,5442	
3.ViIC, 5.TLC+ViIC	-,071	1,681	,9343	
3.ViIC, 6.CLC+ViIC	-1,073	1,389	,1298	
3.ViIC, 7.CLC+TLC	-2,749	1,606	,0008	S
3.ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-2,073	1,478	,0060	S
4.TLC, 5.TLC+ViIC	,426	1,736	,6307	
4.TLC, 6.CLC+ViIC	-,577	1,454	,4366	
4.TLC, 7.CLC+TLC	-2,253	1,662	,0079	S
4.TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,577	1,540	,0447	S
5.TLC+ViIC, 6.CLC+ViIC	-1,003	1,538	,2015	
5.TLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-2,678	1,737	,0025	S
5.TLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-2,003	1,620	,0154	S
6.CLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-1,676	1,455	,0240	S
6.CLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,000	1,313	,1354	
7.CLC+TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	,676	1,541	,3899	

Test PLSD de Fisher pour VAP
Effet : Milieu
Niveau de significativité : 5 %
Eclaté par : Temps de Réfrigération
Céllule : 0h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLC	2,544	1,753	,0045	S
1.CNTR, 3.ViIC	-2,274	1,697	,0086	S
1.CNTR, 4.TLC	,673	1,724	,4444	
1.CNTR, 5.TLC+ViIC	1,643	1,720	,0611	
1.CNTR, 6.CLC+ViIC	-,584	1,698	,5002	
1.CNTR, 7.CLC+TLC	-2,219	1,671	,0093	S
1.CNTR, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,307	1,626	,1151	
2.CLC, 3.ViIC	-4,818	1,673	<,0001	S
2.CLC, 4.TLC	-1,872	1,700	,0310	S
2.CLC, 5.TLC+ViIC	-,901	1,696	,2978	
2.CLC, 6.CLC+ViIC	-3,128	1,674	,0003	S
2.CLC, 7.CLC+TLC	-4,764	1,647	<,0001	S
2.CLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-3,852	1,602	<,0001	S
3.ViIC, 4.TLC	2,947	1,643	,0004	S
3.ViIC, 5.TLC+ViIC	3,917	1,639	<,0001	S
3.ViIC, 6.CLC+ViIC	1,690	1,615	,0403	S
3.ViIC, 7.CLC+TLC	,055	1,588	,9461	
3.ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	,967	1,540	,2185	
4.TLC, 5.TLC+ViIC	971	1,666	,2534	
4.TLC, 6.CLC+ViIC	-1,256	1,643	,1339	
4.TLC, 7.CLC+TLC	-2,892	1,616	,0005	S
4.TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,980	1,569	,0134	S
5.TLC+ViIC, 6.CLC+ViIC	-2,227	1,639	,0078	S
5.TLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-3,863	1,612	<,0001	S
5.TLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-2,951	1,565	,0002	S
6.CLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-1,636	1,588	,0435	S
6.CLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-,724	1,541	,3573	
7.CLC+TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	,912	1,512	,2369	

Test PLSD de Fisher pour VAP
Effet : Milieu
Niveau de significativité : 5 %
Eclaté par : Temps de Réfrigération
Céllule : 24h

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
1.CNTR, 2.CLC	-3,944	1,689	<,0001	S
1.CNTR, 3.ViIC	-2,997	1,822	,0013	S
1.CNTR, 4.TLC	-4,719	1,888	<,0001	S
1.CNTR, 5.TLC+ViIC	-3,291	1,975	,0011	S
1.CNTR, 6.CLC+ViIC	-2,459	1,646	,0034	S
1.CNTR, 7.CLC+TLC	-7,502	1,890	<,0001	S
1.CNTR, 8.CLC+TLC+ViIC	-4,889	1,746	<,0001	S
2.CLC, 3.ViIC	,947	1,643	,2587	
2.CLC, 4.TLC	-,775	1,716	,3759	
2.CLC, 5.TLC+ViIC	,653	1,812	,4799	
2.CLC, 6.CLC+ViIC	1,484	1,446	,0442	S
2.CLC, 7.CLC+TLC	-3,558	1,718	<,0001	S
2.CLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-,945	1,559	,2347	
3.ViIC, 4.TLC	-1,722	1,848	,0677	
3.ViIC, 5.TLC+ViIC	-,294	1,936	,7660	
3.ViIC, 6.CLC+ViIC	,538	1,599	,5099	
3.ViIC, 7.CLC+TLC	-4,505	1,849	<,0001	S
3.ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,892	1,702	,0294	S
4.TLC, 5.TLC+ViIC	1,428	1,999	,1614	
4.TLC, 6.CLC+ViIC	2,260	1,674	,0082	S
4.TLC, 7.CLC+TLC	-2,783	1,914	,0044	S
4.TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	-,170	1,773	,8511	
5.TLC+ViIC, 6.CLC+ViIC	,832	1,772	,3575	
5.TLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-4,211	2,000	<,0001	S
5.TLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-1,598	1,865	,0931	
6.CLC+ViIC, 7.CLC+TLC	-5,042	1,676	<,0001	S
6.CLC+ViIC, 8.CLC+TLC+ViIC	-2,429	1,512	,0016	S
7.CLC+TLC, 8.CLC+TLC+ViIC	2,613	1,774	,0039	S

Interest of vitamin E and cholesterol preloaded in cyclodextrins on motility of cryopreserved rabbit semen

I. NABI*^{1,2}, S. FATMI³, N. ZERROUKI-DAOUDI⁴, M. IGUER-OUADA³

¹Superior National Veterinary School, BP 161, Algiers, Algeria

²Department of Nature and Life Sciences, Dr Yahia Farès University, Médéa, Algérie

³Associated Laboratory in Marine Ecosystems and Aquaculture, Department of Biological Sciences of the Environment, Faculty of Nature and Life Sciences, Abderrahmane-Mira-University, road of TarguaOuzemmour, 06000 Bejaia, Algeria

⁴University of Mouloud MAMERI, Tizi-Ouzou, Algeria.

*Corresponding author: nabi.ibrahim.vet@gmail.com

SUMMARY

The present study aimed to investigate the effect of cholesterol and α -tocopherol, loaded in cyclodextrin, on motility of cryopreserved rabbit semen. Rabbit sperm was collected from seven mature bucks. The pooled sperm was initially evaluated and then submitted -prior freezing- to seven dilution treatments. The control aliquot was diluted with Tris-based extender; the six others were treated with Tris-based extenders containing: β -cyclodextrins, cholesterol, α -tocopherol, cholesterol-loaded β -cyclodextrins, α -tocopherol-loaded β -cyclodextrins or a treatment of both complexes. Kinematic motility parameters were assessed by a computer assisted semen analyzer system before and after conventional freezing-thawing process. The results showed that both cholesterol and α -tocopherol complexed to β -cyclodextrins improved significantly ($p < 0.05$) the post-thaw kinematic parameters. However, no significant effect was recorded when complexes were simultaneously combined. In conclusion, the present results revealed that the most significant impact on rabbit cryopreserved sperm was observed when cholesterol and α -tocopherol were loaded in cyclodextrins.

Keywords : Cyclodextrins, Cholesterol, α -Tocopherol, Cryopreservation, Semen, Rabbit.

RESUME

Intérêt de la vitamine E et du cholestérol préchargé dans des cyclodextrines sur la motilité du sperme congelé du lapin

La présente étude a comme objectif d'étudier l'effet du cholestérol et de l' α -tocophérol, chargé dans des cyclodextrines sur la motilité du sperme congelé du lapin. Le sperme a été collecté à partir de sept mâles matures. Les éjaculats ont été regroupés sous forme de mélanges puis dilués dans sept traitements différents. Le témoin est un dilueur à base de Tris et les six autres ont été traités avec des diluants à base de Tris contenant : β -cyclodextrines, cholestérol, α -tocophérol, β -cyclodextrines-cholestérol, β -cyclodextrines- α -tocophérol, ou une association (v/v) des deux derniers complexes. Les paramètres de motilité ont été évalués par un système informatique d'analyse de semence avant et après le processus de congélation-décongélation. Les résultats ont montré que le cholestérol et l' α -tocophérol complexés améliorent de manière significative ($p < 0,05$) les paramètres de motilité après décongélation. Aucun effet significatif n'a été enregistré lorsque les deux complexes ont été simultanément utilisés. En conclusion, les présents résultats ont révélé que l'impact le plus significatif a été observé lorsque le cholestérol et l' α -tocophérol sont chargés dans les cyclodextrines, probablement par l'augmentation de leur solubilité.

Mots-clés : Cyclodextrines, Cholestérol, α -Tocophérol, Cryopreservation, Sperme, Lapin.

Introduction

Rabbit artificial insemination (AI) is usually performed with fresh or cooled semen stored for a short time period [20, 28], while rabbit cryopreserved sperm has been limited essentially to experimental purposes due to lower fertility/prolificacy outputs [23]. During cryopreservation, alterations in sperm cell integrity are observed and attributed to intracellular ice formation, toxicity of cryoprotectants, osmotic stress and to oxidative damages [36].

Poly-unsaturated fatty acids and cholesterol/phospholipids ratio are determinant factors in sperm cell membrane fluidity and resistance to cold-shock [2, 15]. Semen in cold shock-sensitive species (boar, bull, ram or stallion) expresses low cholesterol/phospholipids ratio level, while semen in cold shock-resistant species (rabbit, human) exhibits higher level ratio with more polyunsaturated fatty acids [10, 24]. During cryopreservation, lipids are subjected to intense peroxidation process through reactive oxygen species (ROS) causing

consequently sperm motility alterations and low fertilizing outputs [14]. Since spermatozoa lose cytoplasmic defenses through spermatogenesis, the antioxidant protection is barely handled by membrane antioxidant system. Vitamin E is the major natural lipid-soluble antioxidant acting as a scavenger system of peroxy radicals and breaks the propagation of peroxidation chain reaction [12].

Several strategies have been proposed to minimize cryo-injuries either by adjusting sperm cell environment (diluent, protocols) or by modifying sperm cell membrane composition essentially through dietary supplementation. In this respect, previous reports demonstrated that supplementation of vitamin E to rabbit diet (> 200 mg/kg) increases significantly α -tocopherol level in fresh semen [8-9]; Being so, the susceptibility of semen to oxidation, expressed by the amount of thio-barbituric acid reactive substances (TBARS), showed a high negative correlation with α -tocopherol intake (-0,8) and its seminal level (-0,9).

Cyclodextrins are cyclical oligosaccharides with a hydrophobic interior core expressing high affinity to guest lipophilic molecules such as cholesterol and α -tocopherol and a hydrophilic enclosure, increasing its solubility in semen extenders. Using cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) treatment for cold-sensitive sperm to a high threshold could improve gametes cryosurvival rates [24]. Semen pre-treatment with CLC has been used successfully to insert cholesterol into cell membranes [25-27, 37] in a view to improve sperm resistance to cold shock. Similarly, it has been shown that semen pre-treatment with α -tocopherol has demonstrated positive effects on post-thaw motility, viability and oxidation protection in boar [4, 30-31]; ram [13, 32]; fish [6]; dog [21] and human cryopreserved semen [33]. In rabbit, in our knowledge, there is no previous report concerning the interest of extender supplementation with antioxidants, especially α -tocopherol. We hypothesized that preloading α -tocopherol in cyclodextrins will increase its solubility and will consequently enhance rabbit sperm motility through fighting against oxidative stress.

On the basis of the presented background, the current study aimed to investigate the interest of a double protection on post thawed rabbit sperm motility using simultaneously cholesterol and α -tocopherol, both preloaded in cyclodextrins to increase their solubility in semen extenders.

Materials and methods

REAGENTS AND PREPARATION OF TREATMENTS COMPLEXES

All reagents used were from Sigma–Aldrich Company (Prochima Sigma – Tlemcen, Algeria).

Cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrins complex (CLC) was prepared as described previously by Purdy and Graham [27]. In a glass test tube, 1g of methyl- β -cyclodextrins was dissolved in 2ml of methanol. In a second glass test tube, 200mg of cholesterol was dissolved in 1ml of chloroform. A 0.45ml portion of the cholesterol solution was added to the cyclodextrins solution and mixed. The obtained mixture was maintained under stirring for 24h 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.

α -tocopherol loaded Methyl- β -cyclodextrins complex (TLC) was prepared in 1:1 molar ratios (α -tocopherol:methyl- β -cyclodextrins) by co-evaporation method. The methyl- β -cyclodextrins (309.11 mg) and α -tocopherol (100mg) were dissolved in 50ml of ethanol. The obtained mixture was maintained under stirring for 24h 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 [17].

SEMEN TREATMENT AND PROCESSING

Preparation of treatment and freezing extenders

A Tris based extender was used to prepare treatment and freezing solutions. Tris extender contained: Tris (hydroxymethylaminomethane) (3.025g), citric acid (1.7g), glucose (1.25g), Penicillin G (0.1g), dihydrostreptomycin (0.1g), and distilled water (QS 100ml). The freezing extender was obtained by adding dimethylsulfoxide DMSO (20%) to Tris based extender, representing the control treatment. The tested treatments were: 1). Control (Cntr); the six treatments prepared using Tris extender and their concentrations were determined as follows: 2). β -cyclodextrins (Cdx) (0.71mg/ml); 3). cholesterol (Chl) (4mg/ml); 4). α -tocopherol (Toc) (0.12mg/ml); 5). cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) (10.86 mg/ml); 6). α -tocopherol-loaded cyclodextrins (TLC) (0.92mg/ml) and 7). CLC+TLC with equal proportion (v/v). All solutions were filtered by syringe filter (0.45 μ m) and stored at 4°C until used.

Sperm collection, evaluation and cryopreservation

Seven mature local population rabbit bucks were used as sperm donors during a period of two months. The bucks were housed in individual cages; water and food were provided ad libitum. Semen samples were collected by artificial vagina and gel plugs were removed immediately after collection.

Semen ejaculates from each buck were examined for volume and masse motility (0-9) [3, 5]. Individual sperm motility was assessed subjectively at 400x magnification to arbitrary score progressive motility (0-4) and estimate motility percentage [28]. Concentration was estimated using a Thomas-Zeiss cell chamber (final dilution 1:200). Only sperm collection with a mass motility score over six (≥ 6), progressive motility score over three (≥ 3) and subjective motility percentage over sixty percent ($>60\%$) were pooled and allocated to cryopreservation treatments.

Cryopreservation protocol was addressed according to Rosato and Laffaldano [29]. Semen pools were initially cooled at 5°C for 90 minutes to minimize cold-shock damage, then diluted to a ratio 1:5 in Tris buffer containing 20% dimethylsulfoxide (DMSO). The pools were placed at 5°C for 45 mn for equilibration. Pools were then split and diluted to a ratio 1:1 (v/v) with the seven treatments extenders; including the control (Tris buffer), the treated semen was packaged in 250 μ l plastic straws and frozen by exposure to liquid nitrogen vapor (5 cm above the liquid nitrogen surface) for 10 minutes. The straws were then plunged into liquid nitrogen at -196°C for one hour. Sperm samples were thawed by immersing the straws in a water bath at 50°C for 10 seconds.

Sperm motion characteristics were determined before freezing and after thawing using sperm class analyser SCA

4.0 (Microptic® Spain). Briefly 10µl drop of sperm was placed onto a pre-warmed Makler chamber. A minimum of 200 cells, using at least three microscopic fields were measured using the previously established parameters: Frame to frame rate: (16-25/s); cell size (min/max): (10,5/24 µm²); Low VAP (20µm/s); Medium VAP (40µm/s); [7, 18]. The sperm parameters recorded were: curvilinear velocity (VCL, µm/s); straight line velocity (VSL, µm/s); average path velocity (VAP, µm/s); amplitude of lateral movement of the head (ALH, µm) and beat cross frequency (BCF, Hertz). The overall percentage of motile spermatozoa (TM), and the percentage of spermatozoa with a progressive motility (PM) i.e., cells with an average path velocity > 50 µm/s and straightness > 75%.

STATISTIC ANALYSIS

The statistical analysis was performed using StatView® statistical program (version 5.0). Values are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between percentages of motility and sperm kinematic parameters were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Post-hoc Fisher's test. A P-value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

FRESH SPERM CHARACTERISTICS

Table 1 represents the initial characteristics of fresh sperm used in the experiment. Mean values for volume and concentration were lower than values observed by brun et al., [5] within the same range of masse motility (Mm≥6) ; (respectively: volume (0.67), concentration (716 · 10⁶ spz)) [5]. The motility of the used sperm (Mm and Mi) showed

a medium score (6.7 and 2.9) with an acceptable motility percentages.

EFFECT OF CHOLESTEROL AND α-TOCOPHEROL ON POST THAW SPERM MOTILITY PARAMETERS

Total motility (TM) and progressive motility (PM)

The effect of cholesterol and α-tocopherol on post-thaw total motility (TM) and progressive motility (PM) are set out in table 2 and represented in figure 1. Compared to the control, the results showed that cholesterol and α-tocopherol complexation with β-cyclodextrin (CLC and TLC) presented higher but not significant difference on post-thaw total (TM) and progressive motility (PM). The same tendency was observed when comparing CLC or TLC to cholesterol (Chl) or α-tocopherol (Toc) alone. In contrast, cholesterol (Chl) and α-tocopherol (Toc) presented no observable effect compared to the control. When CLC and TLC were concomitantly associated (CLC+TLC), no significant improvement on post thaw TM and PM was observed compared to the control or to CLC and TLC alone.

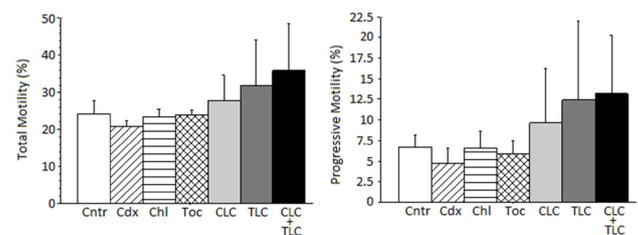


FIGURE 1: Effect of cholesterol and α-tocopherol on total motility (TM) and progressive motility (PM) of rabbit semen after thawing in: Control (Cntr), β-cyclodextrins (Cdx), cholesterol (Chl), α-tocopherol (Toc), cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC), α-tocopherol-loaded cyclodextrins (TLC) and CLC and TLC association (CLC+TLC), (Mean ± SEM).

(n=5)	Volume	Mm	Mi	% Mot	Cn(X10 ⁶)
	0.42 ± 0.49	6.7 ± 0.2	2.95 ± 0.16	78.3 ± 2.78	468.98 ± 27.77

Mm : masse motility ; Mi : individual motility ; %Mot : percentage of motility ; Cn: concentration

TABLE I: The mean ± SEM values of fresh rabbit sperm parameters.

Parameter	Cntr	Cdx	Chl	Toc	CLC	TLC	CLC+TLC
TM (%)	24.2 ± 3.3	20.6 ± 1.5	23.4 ± 1.9	23.7 ± 1.2	27.5 ± 7.1	31.7 ± 12.5	35.8 ± 12.7
PM (%)	6.6 ± 1.5	4.7 ± 1.8	6.5 ± 2.1	5.8 ± 1.6	9.6 ± 6.5	12.4 ± 9.5	13.1 ± 7
VCL (µm/s)	23.2 ± 0.8 ^a	23.2 ± 1.0 ^a	24.1 ± 0.9 ^a	24 ± 1.0 ^a	30.8 ± 1.2 ^b	31.1 ± 0.9 ^b	31.8 ± 0.9 ^b
VAP (µm/s)	10.1 ± 0.5 ^a	10.2 ± 0.7 ^a	10.3 ± 0.6 ^a	10.3 ± 0.6 ^a	13 ± 0.6 ^b	13.5 ± 0.5 ^{bc}	14.6 ± 0.5 ^c
VSL (µm/s)	5.3 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.6 ^{ac}	5.5 ± 0.5 ^a	5.6 ± 0.5 ^a	7.3 ± 0.4 ^b	7.1 ± 0.3 ^{bc}	7.8 ± 0.4 ^b
ALH (µm)	1.3 ± 0.04 ^a	1.3 ± 0.05 ^a	1.4 ± 0.04 ^a	1.4 ± 0.04 ^a	1.7 ± 0.05 ^b	1.8 ± 0.04 ^{bc}	1.8 ± 0.04 ^c
BCF (Hz)	1.6 ± 0.10 ^a	1.3 ± 0.09 ^a	1.8 ± 0.12 ^a	1.5 ± 0.11 ^b	2.4 ± 0.13 ^b	2.5 ± 0.10 ^b	2.7 ± 0.10 ^b

abcValues in rows with different letters differ significantly (P<0.05). TM: total motility; PM: progressive motility; VCL, curvilinear velocity; VAP, average path velocity; VSL, straight-line velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat-cross frequency. Control (Cntr), β-cyclodextrins (Cdx), cholesterol (Chl), α-tocopherol (Toc), cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC), α-tocopherol-loaded cyclodextrins (TLC) and CLC and TLC association (CLC+TLC).

TABLE II: The mean ± SEM effect of cholesterol and α-tocopherol on post-thaw sperm motility parameters.

Kinematic parameters (VCL, VAP, VSL, ALH, BCF)

The effect of cholesterol and α -tocopherol on post-thaw kinematic parameters are set out in table 2 and represented in figure 2. Compared to the control, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) and straight line velocity (VSL) of post thawed sperm were significantly improved ($p < 0.05$) by CLC. Also, α -Tocopherol-loaded cyclodextrins (TLC) enhanced significantly ($p < 0.05$) post-thaw kinematic parameters including VCL, VAP and VSL. The amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF), where significantly ($p < 0.05$) higher in CLC and TLC compared to the control. No significant effect was recorded when cholesterol (Chl) and α -Tocopherol (Toc) are used without complexation.

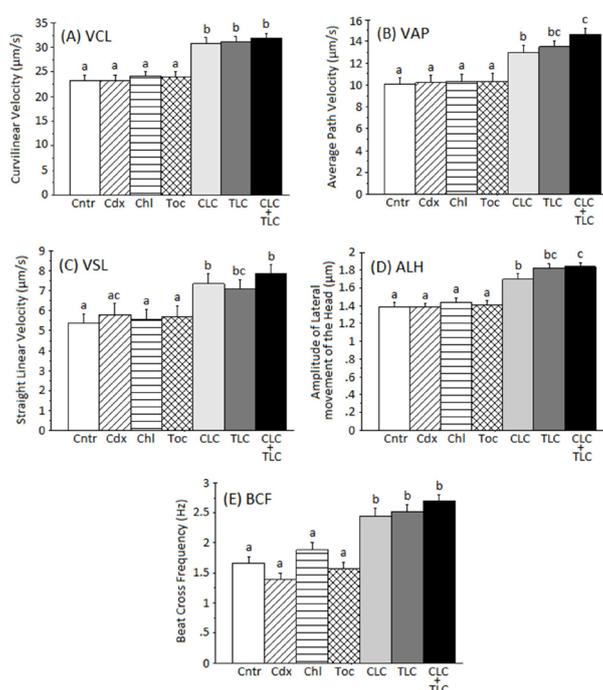


FIGURE 2: Effect of cholesterol and α -tocopherol on curvilinear velocity (VCL); straight line velocity (VSL); average path velocity (VAP); amplitude of lateral movement of the head (ALH) and beat cross frequency (BCF) of rabbit semen after thawing in: Control (Cntr), β -cyclodextrins (Cdx), cholesterol (Chl), α -tocopherol (Toc), cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC), α -tocopherol-loaded cyclodextrins (TLC) and CLC and TLC association (CLC+TLC). (abc: $P < 0.05$), (Mean \pm SEM).

When CLC and TLC are simultaneously added to semen (CLC+TLC), an enhancement effect on kinematics parameters was observed with significant difference ($P < 0.05$) compared to control concerning VCL, VAP, VSL, ALH and BCF. However, no improvement was observed when compared to CLC or TLC alone.

Discussion

The aim of the current study was to investigate the interest of cholesterol and α -tocopherol (vitamin E) as complementary molecules to improve post thawed rabbit

sperm motility. Cyclodextrins was proposed to solubilize and enhance bioavailability of hydrophobic components into aqueous solutions. Through the present study, it is presumed that cholesterol and α -tocopherol could work in a complementary manner; cholesterol by reinforcing the sperm cell membrane and facing consequently cold shock injuries, while α -tocopherol ensures an antioxidant protection over the phase transition stress.

Cholesterol is an important structural component of spermatozoal plasma membrane. Cholesterol:phospholipids ratio may establish differences among mammalian species toward sperm cold-shock resistance [24]. Rabbit spermatozoa presents high Cholesterol:phospholipids ratio (0.88) [35] and consequently only few studies investigated the interest of cholesterol on post-thaw motility. Mocé et al., [22] reported no CLC effect on rabbit semen cryopreservation, however, Aksoy et al. [1] found that CLC enhanced osmotic tolerance in fresh rabbit semen and inhibited premature acrosome reaction in liquid storage at 4°C. Despite that Aksoy et al. [1] did not cryopreserved rabbit sperm treated by CLC, the improvement of post-thaw kinematic parameters of our study would be associated to Aksoy et al. [1] findings; in fact, when osmotic tolerance of cells are increased this improves their cryotolerance.

In the present experimental, treatment with cyclodextrins alone was ineffective on most of post-thawed sperm motility parameters. Cyclodextrins cholesterol-efflux force appeared to be canceled in rabbit sperm, these findings are in concordance with those reported by Mocé et al., [22] demonstrating that rabbit sperm treated with cyclodextrins alone do not show depressed cryosurvival rates, but exhibit similar cryosurvival rates to untreated sperm. These observations could be related to the already cholesterol-rich membrane and probably also to the presence of rich-sterol prostate granules known as cholesterol efflux modulator [10, 11].

As spermatozoa discard and lose the majority of the cytoplasmic antioxidants during the final stages of spermatogenesis, vitamin E remains the most liposoluble and naturally membrane's integrated system of defense against peroxidative damage. Alternatively, supplementing α -tocopherol to sperm extenders would constitute an effective alternative against cryo-produced ROS [4, 6, 20]. In rabbit sperm, effect of α -tocopherol (Vitamin E) on sperm was explored but exclusively through nutritional supplementations [8, 9]; Castellini et al. [8], particularly, increased 1.9 fold the amount of vitamin E in fresh semen and 2.19 fold in 5°C stored semen by 4 fold α -tocopherol dietary supplementation. However, this enrichment did not improve spermatozoa characteristics but only reduced membrane lipid oxidation during storage. In the current work, direct incorporation of α -tocopherol presented also no improvement effect on motility parameters. In contrast, previous studies on other animal species, using the same tocopherol derivate, reported a positive impact

on cryopreserved sperm motility and lipid peroxidation, especially in boar [31] and sea bass [20].

Cyclodextrins was majorly proposed to solubilize α -tocopherol in a view to enhance the suppressive effect of α -tocopherol on lipid oxidation [34], in our knowledge; the use of this complexed form of α -tocopherol has never been investigated in rabbit semen diluents. In our study, α -tocopherol preloaded in β -cyclodextrins enhances significantly post thaw motility in the same manner as when using CLC treatment. cyclodextrins α -tocopherol inclusion would ensure a gradual release of α -tocopherol and constitute a short cut of nutritional supplementation with more efficiency on gametes motility. The protective effect of α -tocopherol is presumably due to preserving bio-membranes from lipid peroxidation [16].

When sperm was concomitantly treated with cholesterol and α -tocopherol, both preloaded in cyclodextrins, an additive effect was observed compared to CLC and TLC indicating probably a dual protection against membrane damages and oxidative injuries during cryopreservation.

In conclusion, cyclodextrins appeared as effective in improving cholesterol and α -tocopherol solubility in semen extenders and represent an interesting alternative to enhance post-thaw kinematic parameters.

References

1. - AKSOY M., AKMAN O., LEHIMCIOĞLU N.C., ERDEM H.: Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, **120**, 166-172.
2. - AMANN R.P., PICKETT B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine. Vet. Sci.*, 1987, **7**, 145-173.
3. - BOUSSIT D.: Reproduction et insémination artificielle en cuniculture, 234 pages, Association Française de Cuniculture, INRA, Lempdes, France, 1989.
4. - BREININGER E., BEORLEGUI N.B., O'FLAHERTY C.M., BECONI M.T.: Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 2005, **63**, 2126-2135.
5. - BRUN J.M., THEAU-CLÉMENT M., BOLET G.: The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002, **70**, 139-149.
6. - CABRITA E., MAS S., DIOGO P., MARTÍNEZ-PÁRAMO S., SARASQUETE C., DINIS M.T.: The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011, **125**, 189-195.
7. - CASTELLINI C., LATTAIOLI P.: Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 1999, **57**, 111-120.
8. - CASTELLINI C., LATTAIOLI P., BERNARDINI M., DAL BOSCO A.: Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5°C. *Theriogenology*, 2000, **54**, 523-533.
9. - CASTELLINI C., LATTAIOLI P., DAL BOSCO A., BEGHELLI D.: Effect of supranutritional level of dietary α -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology*, 2002, **58**, 1723-1732.
10. - CASTELLINI C., CARDINALI R., DAL BOSCO A., MINELLI A., CAMICI O.: Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*, 2006, **65**, 703-712.
11. - CASTELLINI C., MOURVAKI E., CARDINALI R., COLLODEL G., LASAGNA E., DEL VECCHIO M.T., DAL BOSCO A.: Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. *Theriogenology*, 2012, **78**, 715-723.
12. - DAD S., BISBY R.H., CLARK I.P., PARKER A.W.: Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free. Radic. Res.*, 2006, **40**, 333-338.
13. - DA SILVA MAIA M., BICUDO S.D., AZEVEDO H.C., SICHERLE C.C., DE SOUSA D.B., RODELLO L.: Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with antioxidants. *Small. Ruminant. Research.*, 2009, **85**, 85-90.
14. - GUTHRIE H.D., WELCH G.R.: Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 2012, **78**, 1700-1708.
15. - HAMMERSTEDT R.H., GRAHAM J.K., NOLAN J.P.: Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J. Androl.*, 1990, **11**, 73-88.
16. - KAGAN V.E., SERBINOVA E.A., BAKALOVA R.A., STOYTCHEV T.S., ERIN A.N., PRILIPKO L.L., EVSTIGNEEVA R.P.: Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol: The role of the hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **40**, 2403-2413.
17. - KOONTZ J.L., MARCY J.E., O'KEEFE S.F., DUNCAN S.E.: Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants α -Tocopherol and Quercetin. *J. Agr. Food. Chem.*, 2009, **57**, 1162-1171.
18. - LATTAIOLI P., CASTELLINI C.: Efficacité d'un système d'analyse d'images pour évaluer la semence de lapin: précision et répétabilité. In ITAVI (éd.): Proc. 7^{èmes} Journée de la Recherche Cunicole, Lyon, France. 1998, 233-236.
19. - LÓPEZ-GATIUS F., SANCES G., SANCHO M., YÁNIZ J., SANTOLARIA P., GUTIÉRREZ R., NÚÑEZ M., NÚÑEZ J., SOLER C.: Effect of solid storage at 15 °C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 2005, **64**, 252-260.

20. - MARTÍNEZ-PÁRAMO S., DIOGO P., DINIS M.T., HERRÁEZ M.P., SARASQUETE C., CABRITA E.: Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 2012, **77**, 1129-1136.
21. - MICHAEL A., ALEXOPOULOS C., PONTIKI E., HADJIPAVLOU-LITINA D., SARATSI P., BOSCO C.: Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 2007, **68**, 204-212.
22. - MOCÉ E., GRAHAM J.K.: Effect of egg yolk, cooling/thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm. In: The American Society of Andrology (éd.): 30th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Seattle, WA, USA. *J. Androl. Suppl.*, March-April, 2005, **79**, abstract 121.
23. - MOCÉE., VICENTE J.S.: Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009, **110**, 1-24.
24. - MOCÉ E., BLANCH E., TOMÁS C., GRAHAM J.K.: Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, **45**, 57-66.
25. - MOCÉ E., PURDY P.H., GRAHAM J.K.: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, **118**, 236-247.
26. - PAMORNSAKDA T., POJPRASATH T., SUWIMONTEERABUTR J., THARASANIT T.: Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology*, 2011, **63**, 90-95.
27. - PURDY P.H., GRAHAM J.K.: Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 2004, **48**, 36-45.
28. - ROCA J., MARTÍNEZ S., VÁZQUEZ J.M., LUCAS X., PARRILLA I., MARTÍNEZ E.A.: Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, **64**, 103-112.
29. - ROSATO M.P., LAFFALDANO N.: Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 2013, **79**, 508-516.
30. - SATORRE M.M., BREININGER E., BECONI M.T., BEORLEGUI N.B.: α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 2007, **68**, 958-965.
31. - SATORRE M.M., BREININGER E., BECONI M.T.: Cryopreservation with α -Tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 2012, **78**, 1548-1556.
32. - SILVA S.V., SOARES A.T., BATISTA A.M., ALMEIDA F.C., NUNES J.F., PEIXOTO C.A., GUERRA M.M.P.: Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013, **137**, 37-44.
33. - TAYLOR K., ROBERTS P., SANDERS K., BURTON P.: Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*, 2009, **18**, 184-189.
34. - WATANABE Y., YAMASHITA T., YAMASHITA M., ADACHI S.: Suppressive effect of α -tocopherol complexed with β -Cyclodextrin on the oxidation of Methyl Linoleate. *Food. Sci. Tech. Res.*, 2009, **15**, 479-482.
35. - WATSON P.F.: The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: G.J. MORRIS, A. CLARKE (éd.): Effects of Low Temperatures on Biological Membranes, Academic Press, London, 1981, 189-218.
36. - WATSON P.F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, **60-61**, 481-492.
37. - ZENG W.X., TERADA T.: Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 2001, **55**, 615-627.