

أفرففة الءفمقراطفة الشفعبفة

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMO
Ministère de l'enseignement Supérieur



781THV-2

Université Saad Dahleb de Blida
Faculté des Sciences Agro- Vétérinaire et Biologique
Département des sciences vétérinaire



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'Obtention du diplôme de
DOCTEUR VETERINAIRE

THEME
**REFRIGERATION A LONG TERME ET EVALUATION DU
SPERME CANIN**

Réalisé par :

DARIADI Hakim

MERAIMI Oussama

Promoteur : BELALA.R

MAA

USD Blida

Président : ADEL. Dj

MAA

USD Blida

Examineur : YAHIMI.A/K

MAA

USD Blida

Promotion : 2013

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à celle qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, le symbole de tendresse, à ma mère.

A mon père, école de mon enfance, qui été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, a me donner l'aide et à me protéger, et surtout d'être ami a moi.

Que DIEU les gardes et les protège.

A mes frères Ahmed, Toufik, Boumediene et ses conjointes Selma, Hasna, Nabila, et ses enfants Nourhane, Malik, Amdjad.

A ma seule adorable sœur Fatima et ses enfants Anes et Asma.

A mon binôme Oussama, et sa famille surtout Abdelkader, Heythem et Saleh.

A mes amis Hichem, Ahmed, Nassim, Mohamed Amine, Imad, Maher, Oussama, Abderrahmane Kouadri, Moussa, Abdou, Yousef, Mohamed, Redouane, Khaled, Bilal sans oublier Mohamed Anouar.

A tous mes collègues en faculté.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

A ma future conjointe.

DARIADI Hakim

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents.

Pour leur soutien inconditionnel et leur
bienveillance

Toute ma reconnaissance et mon amour

Ma grand-mère :

Qui me manque tellement, mais.....

Que Je garde dans mon cœur à tout jamais..

J'ai toujours rêvés de te partager ce
moment..... « *elahi yarhimek* »

J'espère que tu serais fière de moi,

Mes frères :

Ahmed, Mohammed, Abdelkader, Salah-eddine et
Heythem

Mes chères sœurs :

Yassmine, Houda et Hanadi

Je vous souhaite à tous un brillant parcours
dans la vie

À ma chère tente louiza et mon oncle Mahmoud
Pour tous ces moments de bon humeur passés et a
ceux qui restent à venir....

A Mohammed et à toute ma famille.....

A Hakim et à toute sa famille

Merci de m'avoir supporté durant toutes ces
longues années d'étude

Ce fut très agréable de travailler avec toi

Mes amies et compagnons d'études :

Abderahman, Ahmed, Hichem, Moussa, Salah,

Pour tous ces moments inoubliables !!

mes amies d'enfance : mhammed, el hbib, Mustapha
et boualem

à notre amitié sincère qui a su résister au
temps et a la distance

À Allel : qu'il trouve enfin et en ce moment
exacte la sortie du tunnel...mes félicitation.

Mes amies de la faculté et de tous les horizons

À Bilel et tous les gens de SIDI AISSA :

Merci pour votre hospitalité

A tous ceux qui mon transmis leur savoir et
leur passion.

MERAIMI OUSSAMA

REMERCIEMENT

Merci ALLAH de nous avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever nos mains vers le ciel et dire ALHAMDULLAH

A Monsieur R. BELALA, qui fut à l'origine de ce travail, qui a bien voulu accepter la responsabilité de nous guider, pour sa confiance, pour ces conseils et sa sympathie.

Hommage respectueux,

A Monsieur DJ. ADEL, qui a bien voulu accepter de présider l'examen de notre mémoire.

Hommage respectueux,

A Monsieur A. K. YAHIMI, qui a bien voulu accepter d'examiner notre mémoire.

Hommage respectueux,

A Zayneb BAKER pour son accueil chaleureux, sa disponibilité, son sourire et son aide précieuse au cours de ce travail

Sincères remerciements.

A Poutine cet excellent étalon, qui a bien voulu collaborer et rester calme pendant notre travail.

ملخص

في سنة 2001 تم إثبات إمكانية حفظ أمشاج الكلب تحت 4 د م لمدة 10 أيام قابلة للتمديد الى غاية ثلاثة أسابيع عن طريق تجديد وسط الحفظ و ذلك يوم 11 و يوم 21

يهدف هذا البحث الى تفسير و محاولة تقدير قابلية استرجاع الخلايا المنوية لخاصية التنقل

و لأجل ذلك قمنا بتحصيل أمشاج كلب من نوع بولدوغ فرنسي عمره ثلاث سنوات و بصحة جيدة و ذا خصوبة معلومة . ثم قمنا بحفظها لمدة عشرة أيام بعد اجراء فحوصات للتأكد من قابليته لذلك في وسط حفظ كلاسيكي مكون من مادة tris glucose مضاف اليها صفار البيض .

في اليوم العاشر قمنا بتجديد وسط الحفظ مما ادى الى اعادة تنشيط حركة الحيوانات المنوية و تمديد مدة الحفظ أربعة أيام إضافية

سمح هذا العمل باستخلاص ما يلي

امكانية حفظ امشاج الكلب لمدة عشرة ايام عل الاقل تحت أربعة درجات مئوية

تنقل الخلايا المنوية خاصة غير حيوية و قابلة للاسترجاع و غيابها لا يعني بالضرورة موت او انعدام وظيفية الخلايا المنوية

التنقل خاصة ممكن بعثها بشرط ضمان حيوية و وظيفية أغشية الخلايا المنوية

لا تعتبر خاصية التنقل من وسائل تقييم الامشاج خلال الحفظ بالتبريد تحت اربعة درجات مئوية

الكلمات المفتاح : كلب ، امشاج ، التبريد في 4° ، المدى الطويل، الحركية ، وظيفية اغشية الخلايا المنوية (HOS-Test) ، الحيوية، خاصية التنقل.

RESUME

En 2001, il a été démontré que la semence canine peut être réfrigérée à long terme pendant dix (10) jours prolongeables jusqu'à trois (03) semaines par changement du dilueur le onzième (11^{ème}) et les vingt et unième (21ère) jours.

Le présent travail a pour objectif d'expliquer et de tenter d'évaluer la réversibilité de la motilité pendant la réfrigération à long terme. Pour cela, nous avons collecté la semence sur un chien de race Bouledogue Français âgé de trois (03) ans, en bon état de santé et de fertilité comfirmé. Ensuite, nous avons procédé à sa réfrigération pendant dix (10) jours, après contrôle de conservabilité, dans un dilueur classique de laboratoire à base de Tris-Glucose additionné de jaune d'œuf. A J10, alors que la motilité est devenue nulle, nous avons changé le dilueur, ce qui a réactivé la motilité et prolongé la conservation quatre (04) jours de plus.

Les résultats de notre étude ont montré que :

- Le sperme canin peut être réfrigéré à +4°C pendant au moins dix (10) jours.
- La motilité est une fonction non vitale et réversible, son absence ne signifie pas forcément la mortalité ou la non fonctionnalité membranaire du spermatozoïde.
- La motilité peut être réactivée in vitro (par changement de dilueur) à condition que la vitalité et la fonctionnalité membranaire soient conservées.
- La motilité seule n'est pas un test fiable et ne suffit pas seule à évaluer la qualité de la semence pendant la réfrigération. Elle doit être associée aux deux autres tests cités ci-haut.
- La morphologie ne semble pas être un moyen d'évaluation pendant la réfrigération.

Mots clés : chien ; semence ; réfrigération a 4°C ; long terme ; motilité ;fonctionnalité membranaire(HOS-Test); vitalité ;morphologie.

SUMMARY

On 2001, it has been demonstrated that the dog semen could be chilled for a long term during ten (10) days, extended until three weeks by an extender exchange at the eleventh and twenty-first days

The aim of the present work is to explain and try to evaluate the motility's reversibility during a long term chilling. For this we have collected the semen of a healthy 3 years old French-Bulldog dog and confirmed fertility. After that we have chilled the semen during ten (10) days, after a preservability using the Egg-yolk added Tris-Glucose laboratory extender.

At the tenth (10) day we have exchange the extender which reactivated the motility and extended the chilling over four (4) added days.

The results of our work showed that:

- The dog semen could be chilled during at least ten (10) days at +4°C.
- The motility is a non-vital and reversible function. Its absence is not meaning the mortality nor the membrane non-functionality of spermatozoa.
- The motility could be reactivated in vitro by extender exchange in a condition that vitality a functional membrane be preserved.
- The motility is a poor mean to evaluate the semen quality during chilling. it must be associated with the two others previously mentioned.
- The morphology does not seem to be a useful mean of chilled semen evaluation.

Key words: dog; semen; chilling at 4°C; long term; motility; membrane functionality (HOS-Test) ; vitality ; morphology.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I. SPERME CANIN	3
1. <i>Caractéristiques et fractionnement d'un éjaculat</i>	3
2. <i>Composition du sperme</i>	3
3. <i>Récolte de la semence canine</i>	4
4. <i>Evaluation de la semence canine</i>	4
II. REFREGERATION DE LA SEMENCE CANINE	7
1. <i>Indication</i>	7
2. <i>Centrifugation</i>	7
3. <i>Dilution</i>	8
4. <i>Protocole de Réfrigération</i>	9
I. OBJECTIFS.....	10
<i>Objectif principal</i>	10
<i>Objectifs secondaires.....</i>	10
II. MATERIELS ET METHODES	10
1. <i>Animaux</i>	10
2. <i>Méthodes et Matériels</i>	11
RESULTAT	15
DISCUSSION	18
CONCLUSION	22
RECOMMANDATION	23
ANNEXES	24

LISTE DES ILLUSTRATION GRAPHIQUE ET TABLEAU

Figure 1. Les trois phases de l'éjaculat du chien

Figure 2. Cône de récolte

Figure 3. Principales anomalies morphologiques majeures et mineures

Figure 4. Les modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique

Figure 5. Evolution de la motilité massale sans et avec changement de dilueur

Figure 6. Evolution de la motilité progressive sans et avec changement de dilueur

Figure 7. Evolution et pourcentage des spermatozoïdes vivant sans et avec changement de dilueur

Figure 8. Evolution et pourcentage des spermatozoïdes réactifs sans et avec changement de dilueur

Figure 9. Evolution

Tableau I. Caractères généraux de l'éjaculat du chien

Tableau II. Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien

Tableau III. Composition d'un dilueur de réfrigération LINDE-FORSBERG, 2001 & CERCA

Tableau IV. Identification de l'échantillon (chien)

Tableau V. Composition d'un dilueur de réfrigération (Iguer-Ouada M & Verstegen J ; 2001)

Tableau VI. Résultats de l'évaluation de la semence à l'état frais

INTRODUCTION

L'insémination artificielle est une technique de reproduction assistée aussi utile en espèce canine que chez les autres, notamment avec la particularité des chaleurs très étalées et les difficultés connues en reproduction naturelle chez la chienne. Ainsi l'évolution des techniques de conservation de la semence a beaucoup encouragé le développement et l'extension de cette pratique qui permet l'insémination à distance en évitant le déplacement des animaux, et facilite les échanges commerciaux internationaux ainsi que la préservation des lignées de valeur.

Bien que très utile pour la conservation illimitée de la semence qu'elle offre, l'insémination artificielle à sperme congelé demeure jusqu'à ce jour associée à des résultats décevants en raison de l'inadéquation des milieux de dilution et des altérations des spermatozoïdes qui en résultent tel que l'altération de l'acrosome. Elle exige aussi le recours à une technique onéreuse et assez compliquée qui est l'insémination sous endoscopie (IGUER-OUADA M; 2001).

L'insémination à semence réfrigérée donne de meilleurs résultats par rapport à la congélation et présente l'avantage de la simplicité dans l'acte d'insémination (intra-vaginale), dans les procédés de conservation et de transport de la semence. Cependant, la durée de conservation reste très limitée et représente l'inconvénient majeur. Si cette durée s'allonge dans le temps, la réfrigération serait la solution pour pallier aux inconvénients de la congélation.

En effet, en 2001, IGUER-OUADA et VERSTEGEN ont été les premiers à démontrer la possibilité avec succès de réfrigérer le sperme de chien pendant une dizaine de jours et prolonger cette conservation jusqu'à 27 jours par renouvellement du dilueur à J11 et J21. Avant 2001, cette durée n'avait jamais dépassé les 48 à 72h.

En 2005, VERSTEGEN et ses collaborateurs ont publié une deuxième fois les résultats de l'étude précédente. Ceci a abouti à la commercialisation du premier dilueur canin de réfrigération à long terme sous le nom de CANIPLUS 10 ® par (MINITUBE.USA).

A partir des résultats de cette étude, nous nous sommes posés les questions suivantes :

- Pourquoi la réactivation de la motilité a-t-elle été possible à J11 et J21 et pas à J27 ?
- Est ce qu'il y a un moyen pour évaluer cette réversibilité de la motilité ?

Nous avons supposés que les tests de vitalité et de fonctionnalité membranaire peuvent servir de moyen pour expliquer la réactivation et évaluer la réversibilité de la motilité spermatique. Ainsi pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous effectuons le présent travail préliminaire.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. SPERME CANIN

Le sperme canin est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation (PRINGS, 1998).

1. Caractéristiques et fractionnement d'un éjaculat

L'éjaculat de chien est composé de trois fractions différentes du point de vue origine, composition, volume et même leur durée d'émission ainsi que leur concentration en spermatozoïdes. (Figure 1)

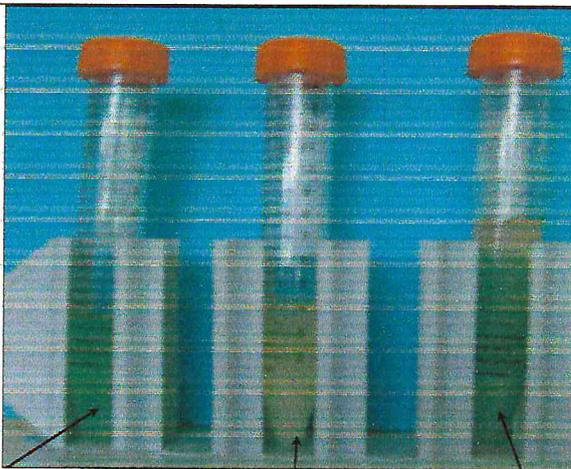
Tableau I : Caractères généraux de l'éjaculat du chien (d'après FONTEBONNE et DUMONT, 1992)

	Couleur consistance	Durée d'émission	Volume (ml)	PH	Concentration en Spermatozoïdes (x10 ⁶ /ml)
Fraction urétrale	Blanc jaunâtre	30 à 50 Secondes	0.2-2	6.2 -6.5	< 3
Fraction épидидymaire	Blanchâtre aqueux	2 à 3 Minutes	0.5-3.5	6.3 - 6.6	400
Fraction prostatique	Clair visqueux	5 à 7 Minutes	3-30	6.5 -7.0	Très rare Spermatozoïdes
Ejaculat complet	Blanchâtre	7 à 10 Minutes	4-35		environ 400

2. Composition du sperme

2.1. Spermatozoïde :

Le spermatozoïde mesure entre 62 et 66 µm, sa tête est ovale et aplatie dorso-ventralement. Le flagelle propulse le spermatozoïde à une vitesse moyenne de 45µm/s (FONTEBONNE et DUMONT, 1992).



Phase pré-spermatique Phase spermatique Phase post-spermatique
Figure 1 : Les trois phases de l'éjaculat du chien
 (BRIFFAUT AS ; 2007)



Figure 2 : Cône de récolte.
 Cliché CERCA In
 (FUERTES PV ; 2008)

2.2. Le liquide séminal :

Le liquide séminal représente plus des trois quarts du volume de l'éjaculat. Il est sécrété par les glandes annexes : la prostate et les glandes de Littre. Il contient des glucides, lipides, protéines, hormone, des ions et des électrolytes pour assurer le transport et la nutrition des spermatozoïdes.

3. Récolte de la semence canine

La récolte par stimulation manuelle, décrite par LINDE-FORSBERG en 1991, est la technique la plus utilisée chez le chien. Elle se pratique préférentiellement en présence d'une femelle en chaleur et en utilisant des cônes en caoutchouc reliés à des tubes gradués stériles (LINDE-FORSBERG C; 1991). (Figure 2)

4. Evaluation de la semence canine

4.1. Le spermogramme :

Le spermogramme consiste en une mesure des aspects physiques du sperme : volume, aspect, pH, motilité, numération. (FONTBONNE et DUMONT, 1992).

4.1.1. Volume :

Variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille et de la fréquence des récoltes. (Voir Tableau I).

4.1.2. Aspect : l'éjaculat complet est de couleur blanchâtre (Voir Tableau I).

4.1.3. Ph : varie de 6.2 à 7 selon les trois phases (Voir Tableau I).

4.1.4. Motilité :

La motilité des spermatozoïdes doit être évaluée dans les plus brefs délais après la récolte.

a. Motilité massale :

L'évaluation de la motilité massale au grossissement x40 permettra d'apprécier les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes et sera notée de 0 à 5

Tableau II : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien

(D'après FONTBONNE, 1993)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

b. Motilité individuelle :

L'évaluation de la motilité individuelle au grossissement x40 permettra de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles qui progressent d'une façon rectiligne (fléchant). Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (LINDEFORSBERG, 1995).

4.1.5. Numération

La numération se fait par comptage des spermatozoïdes entre une lame et lamelle d'une cellule hématimétrique (Thoma, Malassez, Neubauer ...), après une dilution (au 1/100^{ème} ou 1/200^{ème}) dans une solution hypertonique (NaCl à 3 %) pour immobiliser les spermatozoïdes.

La concentration est calculée selon une équation spécifique à chaque hématimètre.

4.2. Spermocytogramme

Le spermocytogramme consiste à analyser la morphologie des spermatozoïdes dénombrés sur un frottis coloré et répartis en normaux et anormaux. Ces derniers se classent en anomalies majeurs et anomalies mineurs (OTT et al., 1987).

Une semence est considérée de bonne qualité si elle contient plus de 70 % de spermatozoïdes normaux, avec moins de 10 % d'anomalies majeurs et moins de 20 % d'anomalies mineurs (FELDMAN et NELSON, 2004a).

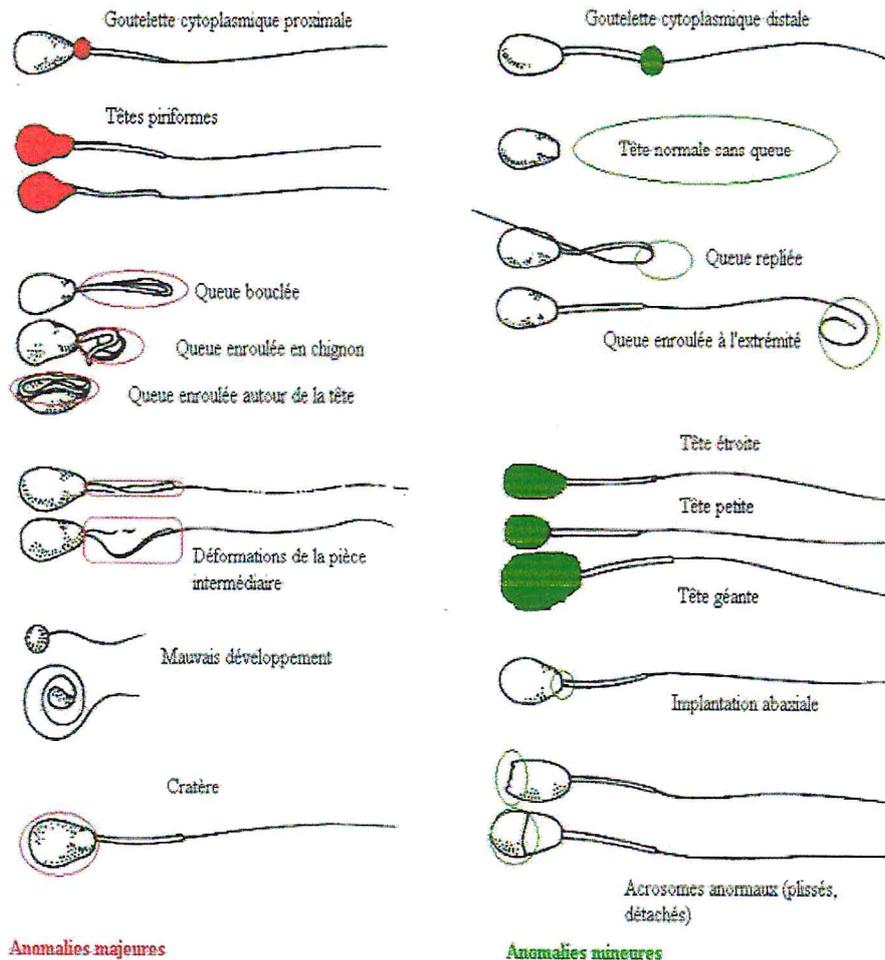


Figure 3 : Principales anomalies morphologiques majeures et mineures. (OTT et al., 1987)

4.3. Evaluation de la vitalité :

L'évaluation de la vitalité consiste à déterminer le nombre des cellules vivantes et mortes après dénombrement d'un minimum de 100 spz sur un frottis coloré avec une coloration spéciale (Eosin-nigrosine, à fluorescence). Les cellules vivantes apparaissent non colorées et les mortes colorés en rose par l'éosine-nigrosine (FONTBONNE, 1995).

4.4. Test hypo-osmotique (HOST) :

Le test hypo-osmotique permet de vérifier la fonctionnalité et d'évaluer l'intégrité membranaire flagellaire des spermatozoïdes après incubation dans une solution hypotonique (60 mOsm) pendant 30 à 60 mn à 37°C.

Le principe est basé sur l'équilibre osmotique intra et extra cellulaire. La membrane flagellaire réagit par gonflement à l'entrée d'eau prenant diverses formes si elle est fonctionnelle, et ne réagit pas si elle ne l'est pas (ENGLAND et PLUMMER 1993).

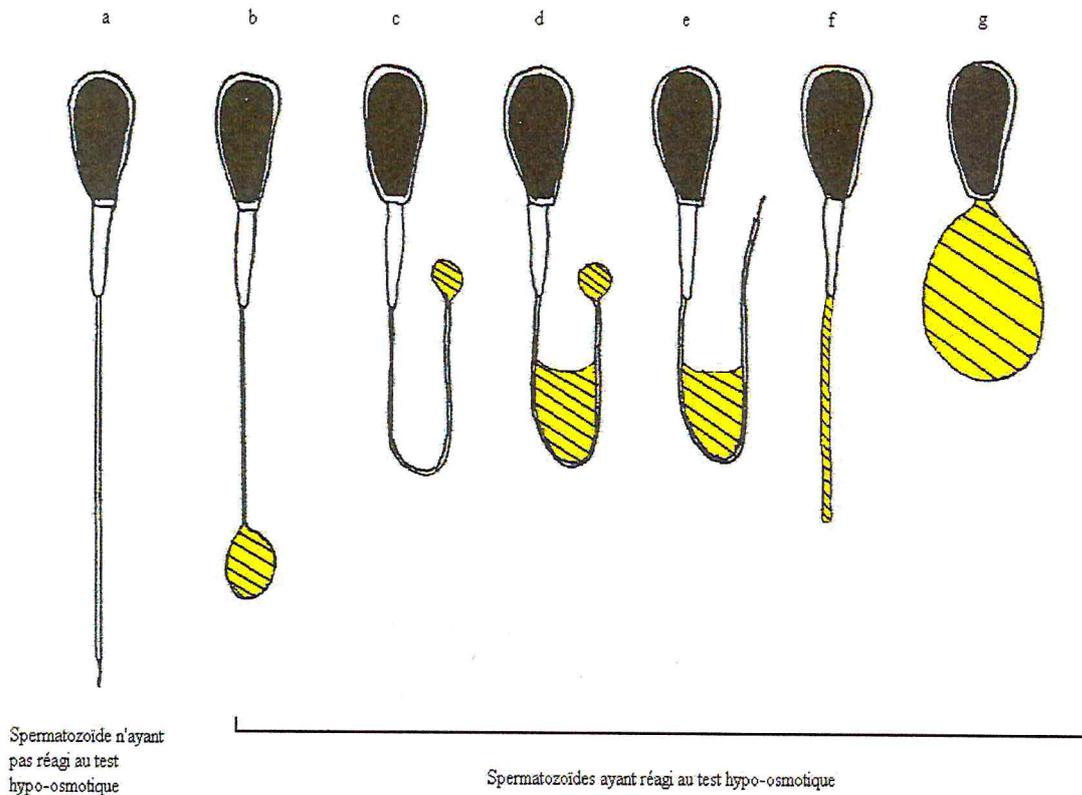


Figure 4 : Les modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo- osmotique (JEYENDRAN et al., 1984).

II. REFREGERATION DE LA SEMENCE CANINE

Elle consiste à diminuer la température de la semence diluée à 4°C afin de la conserver à cette température pendant une période précise.

1. Indication

L'utilisation de la réfrigération de la semence est en expansion dans le domaine de la reproduction canine car elle permet de faire des inséminations artificielles différées, et permet aussi de conserver et transporter la semence à court ou moyen terme avec des avantages identiques à celle de la congélation tout en évitant les conséquences négatives de transport d'animaux tel que le stress. Les protocoles de réfrigération utilisés sont plus simples et moins chers et moins dangereux que la congélation.

2. Centrifugation

Il est généralement recommandé de séparer le liquide prostatique par centrifugation avant réfrigération (LINDE-FORSBERG. ROTA et al 1995). Cependant, il suffirait de séparer la fraction

spermatique des deux autres manuellement pendant la collecte, si la centrifugation n'est pas possible (CHRISTIANSEN.I.J. ; 1984).

3. Dilution

3.1. Nécessité de l'utilisation d'un dilueur.

Le dilueur est utilisé pour augmenter la durée de vie des spermatozoïdes et préserver leur capacité de fécondation LINDE-FORSBERG (1995).

D'après IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001c), les dilueurs préparés extemporanément au laboratoire ont une efficacité comparable à celle des dilueurs commercialisés.

3.2. Caractéristiques et rôles du dilueur.

Le dilueur utilisé pour la réfrigération de la semence, doit posséder certaines propriétés (BUE, 1992; LINDE-FORSBERG, 1995; FELDMAN et NELSON, 2004b; VERSTEGEN et al., 2005) à savoir:

- L'isotonicité par rapport à la semence, pour lutter contre le choc osmotique.
- Le pouvoir tampon, pour maintenir un pH proche de la neutralité.
- Le pouvoir de protection et de stabilisation membranaire, pour protéger les membranes plasmatiques des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et mécaniques.
- Le pouvoir nutritif, pour fournir l'énergie nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes.
- Le pouvoir anti-oxydant, pour lutter contre l'action néfaste des radicaux libres.
- Le pouvoir bactéricide.

3.3. Composition des dilueurs

Tableau III : Composition d'un dilueur de réfrigération d'après LINDE-FORSBERG, 2001 & CERCA.

	Protocole UPPSALA	Protocole CERCA
TRIS	3,025 g	3,025 g
Acide citrique	1,7 g	1,7 g
Fructose	1,25 g	1,25 g
Jaune d'œuf	20 Ml	20 mL
Benzyl-pénicilline	1 mg/mL	100 000 UI
Dihydrostreptomycine	1 mg/Ml	0,1 g
Eau distillée	Jusqu'à 100 mL	Jusqu'à 100 mL

Le fructose a été remplacé par le glucose qui a montré une nette supériorité selon (IGUER-OUADA M & VERSTGEN J. ; 2001a). Contrairement à cela, le fructose a donné les meilleurs résultats dans la réfrigération à long terme selon (PONGLOWHAPAN et al.; 2004).

3.4. Réalisation de la dilution

La semence et le dilueur doivent être à la même température pour éviter le choc thermique sur les spermatozoïdes. Ainsi le taux de la dilution est compris entre 1/2 et 1/4 (ENGLAND GCW ; 1992), (PENA A & LIND-FORSBERG C ; 2000) ou entre 1/3 et 1/5 (IGUER-OUADA M; 2001). La dilution ne doit pas être trop importante car elle a une influence négative sur la mobilité des spermatozoïdes (PENA A & LIND-FORSBERG C ; 2000).

4. Protocole de Réfrigération

La semence est réfrigérée à 4°C, car cette température permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et donc prolonger leur longévité et aussi ralentir la croissance bactérienne (LINDE-FORSBERG, 1995).

De plus la vitesse du refroidissement ne doit pas être trop rapide ou trop lente. En effet, il existe plusieurs protocoles :

- Placer la semence diluée directement au réfrigérateur ou dans une chambre froide à 4°C (BUE, 1992).
- placer la semence diluée dans un verre d'eau à température ambiante et mettre le tout au réfrigérateur (LINDE-FORSBERG, 1995).
- placer la semence diluée dans un dispositif qui permet une diminution de la température constante et programmable (BUE, 1992 et VERSTEGEN et al. 2005).

PARTIE
EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS

Objectif principal

Le but de notre travail est de vérifier que la qualité de la semence n'est pas en relation avec la motilité seulement mais il y a d'autres paramètres tel que la vitalité et l'intégrité membranaire qu'il faut lui associer dans l'évaluation. Nous voulons vérifier aussi qu'un spermatozoïde immobile n'est pas forcément mort ou non réactif. La motilité est une fonction réversible (réactivée par le renouvellement du milieu de conservation) à condition que les deux autres paramètres soient préservés.

Objectifs secondaires

- Maîtriser toutes les étapes d'évaluation microscopique de la semence canine. [motilité massale et progressive, concentration (numération), morphologie, vitalité, intégrité membranaire (HOS-Test)].
- Réduire les étapes d'évaluations en regroupons la vitalité et l'intégrité membranaire. Évaluations sous forme d'une fiche d'évaluations (version papier) et un fichier Excel (version électronique).
- Essai de réfrigération à long terme de la semence canine prolongé encore plus par changement (renouvellement) du dilueur de réfrigération.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Animaux

Au départ, nous voulions travailler sur le mélange d'au moins trois (03) éjaculats de chiens différents à qualité individuelle satisfaisante. Il s'agit là d'une technique appelée dans la littérature « pouling » (VERSTEGEN J., ONCLIN K. et IGUER-OUADA M. VERSTEGEN J., ONCLIN K. et IGUER-OUADA M. ; 2005) et recommandée pour les avantages d'augmenter le volume spermatique et de lutter contre les variations individuelles pour ne laisser que les variations des paramètres étudiés. Par la suite, nous étions contraints de nous limiter à un seul chien disponible qui a une très forte concentration spermatique nous permettant à priori de continuer l'expérimentation envisagée. Nous avons effectué un examen général du chien et un examen spécial de la fonction sexuelle ainsi qu'un examen de sa semence, les trois examens n'ont montrés aucune anomalie.

Tableau IV : Identification de l'échantillon (chien)

Nom	Race	Age	Etat de santé général	Appareil uro-génital	Fertilité
POUTINE	Bull-dog français	3 ans	Bon état de santé	RAS	connue

2. Méthodes et Matériel

2.1. Récolte de la semence :

La récolte de semence est faite par stimulation manuellement sans présence de femelle en chaleur et avec séparation rigoureuse des trois fractions d'éjaculat dont seule la fraction spermatique « epididymaire » a été utilisée dans l'expérimentation. La récolte a été facile car le mâle est un étalon habitué au geste.

2.2. Manipulations de la semence :

Une fois récoltée, la fraction spermatique et post spermatique sont mises immédiatement dans un bain marie réglé à 37°C et les tests d'évaluation à l'état frais sont lancés sur un échantillon de cet éjaculat avant sa réfrigération.

2.2.1. Dilution :

Dans notre expérience nous avons utilisés un dilueur de réfrigération préparé au laboratoire car il a été démontré dans la littérature que ce dernier est plus efficace que les dilueurs du commerce (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J ; 2001).

Tableau V : Composition du dilueur de réfrigération (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J ; 2001).

TRIS	3,025 g
Acide citrique	1,7 g
Glucose	1,25 g
Jaune d'œuf	20 MI
Benzyl-pénicilline	1 mg/mL
Dihydrostreptomycine	1 mg/mL
Eau distillée	Jusqu'à 100 mL

D'autres auteurs utilisent le fructose comme source d'énergie dans la composition du dilueur de réfrigération (LIND-FORSBERG ; 2000), cependant nous avons opté pour le glucose car selon IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J (2001), il donne de meilleurs résultats que le fructose.

Le dilueur a été préparé au Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale de l'Université Saad Dahlab de Blida, le jour du début de la réfrigération et l'addition du jaune d'œuf frais a été différée à la dernière minute de son utilisation.

Une fois prés, ce dilueur a été mis à la même température de la semence récoltée pour la condition d' « isothermie » puis ajouté au goutte à goutte à la semence à la dilution de 1/5.

2.2.2. Réfrigération :

Le tube de la semence diluée a été mis dans un deuxième récipient en plastic rempli d'eau à température ambiante. Ce récipient a été placé dans un réfrigérateur réglé à 4°C pendant une heure et demi (01h30). Ainsi, le refroidissement de la semence se fait doucement par transmission à travers l'eau du récipient évitant le choc thermique des spermatozoïdes. Cette technique permet aussi une meilleure stabilité de la température à 4°C pendant les déplacements et manipulation de l'échantillon en dehors du réfrigérateur (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J ; 2001).

2.3. Evaluation de la semence :

Pour l'évaluation de la semence à l'état frais et pendant la réfrigération nous avons réalisé les tests suivants:

Evaluation macroscopique des caractéristiques physico-chimiques de l'éjaculat à savoir le **volume**, la couleur, l'aspect, l'odeur.

Evaluation de la motilité spermatique selon les méthodes décrites ci-après :
Motilité massale : On met une goutte de semence fraîche sur une lame propre, dégraissée, préchauffée à 37°C et recouverte par une lamelle. Sous le microscope optique avec un grossissement x10 et x40 on donne une note pour la motilité massale (**Tableau II**),

Motilité individuelle : Au grossissement x40 on estime la motilité individuelle subjectivement sur plusieurs champs afin de donner un pourcentage de spermatozoïdes mobile fléchant (progressive rapide ou lent), mobile non fléchant et immobile (statique) (**Tableau II**).

Evaluation de la concentration spermatique sur cellule hématimétrique de Thoma avec une dilution au 1/100^{ème} (10µm de semence et 990µ de solution NaCl à 3%). Une goutte de cette semence diluée est disposée entre la cellule de Thoma et lamelle et le comptage se fait sur les 4 carrés extérieurs plus un 5^{ème} carré intérieur de choix sur la grille de comptage de l'hématimètre. (Annexe 1)

Vitalité et intégrité membranaire permet de minimiser le temps et résumer le travail, elle se fait par l'observation de 100 spermatozoïdes tout en classant en spermatozoïdes vivant ou mort et en spermatozoïdes réactifs ou non réactifs à la fois (Annexe 3).

Evaluation de la morphologie (Spermocytogramme) en observant 100 spermatozoïdes sur un frottis colore par l'Harris-Shorr simplifié (Annexe 4). et sous le microscope au grossissement x40. Un pourcentage des spermatozoïdes normaux et anormaux (anomalie majeurs et mineurs) est calculé.

2.4. Protocole expérimental

Notre protocole de travail est réalisé en deux phases :

Phase I : avant le changement de dilueur

Après la récolte de chien (poutine) à J0 on a fait une évaluation de la semence fraîche avec une batterie de tests, comprenant le calcul de la concentration, l'estimation de la motilité massale et motilité individuelle, la morphologie et finalement la vitalité et la fonctionnalité membranaire flagellaire par le HOS-Test.

Les résultats de ces tests permettront de savoir si la semence est conservable ou non c'est-à-dire de bonne qualité. Une semence de bonne qualité doit répondre aux critères suivants :

- Concentration en spermatozoïdes $> 150.10^6$ spz/ml.
- Motilité individuelle $> 70\%$.
- Vitalité $> 80\%$.

Si la semence est conservable on pratique une réfrigération immédiate selon le protocole décrit plus haut :

Centrifugation et ensuite une dilution avec un dilueur préparé le jour même (selon la méthode décrite au-dessus) et finalement la réfrigération à 4°C.

A J1 on prend une prise de 130µ pour faire l'évaluation selon le protocole simplifié (motilité massale et motilité individuelle, la morphologie, vitalité et HOS-Test regroupés).

On effectue cette prise et évaluation quotidiennement jusqu'au **Jn** (le jour où la motilité devient presque nulle).

Phase II : après le changement de dilueur.

Lorsque la motilité devient presque nulle on divise la semence en deux :

1/3 de semence noter1, on le laisse à 4°C et continue à faire l'évaluation chaque 48h jusqu'à la mort complète de semence (Jn, Jn+2, Jn+i). Toujours par la prise de 130µ.

2/3 de semence noter 2

- on fait une centrifugation par une centrifugeuse à 4°C à 300xG pendant 15 minutes. Enlever le surnageant qui contient les déchets de métabolisme et certain produit toxique.
- Renouvellement de dilueur en volume initial (le dilueur est toujours préparé le jour même).
- faire une évaluation par une prise de 130µ le jour de changement de dilueur.
- Continue à faire le suivi d'évaluation chaque 48h jusqu'à Jn+z ou la motilité devient nulle.

RESULTAT

Evaluation de l'état frais

Tableau VI : Résultats de l'évaluation de la semence à l'état frais.

Motilité massale	60% (3)
Motilité progressive	80 %
Vitalité	92.6 %
Intégrité membranaire	78.8 %
Morphologie (Spz normaux)	96 %
Concentration* (Spz/éjaculat)	1 milliard 734 millions
Concentration* (Spz/ml)	1 milliard 445 millions

Concentration* : voir Annexe 2

Motilité massale :

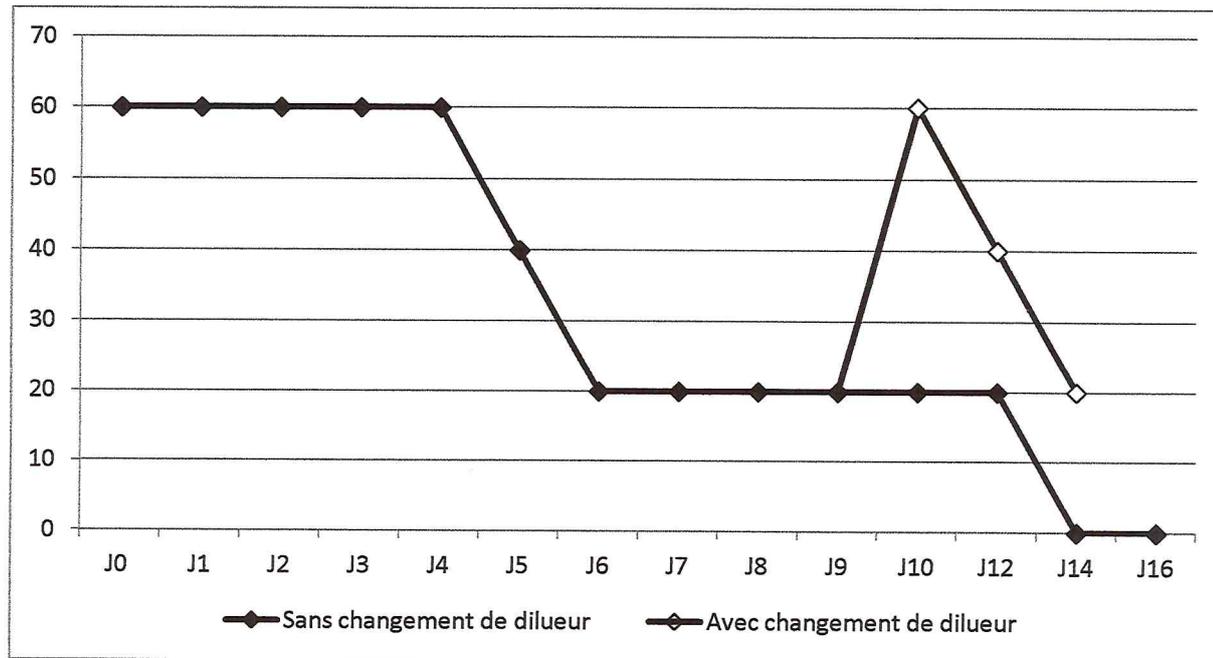


Figure 5 : Evolution de la motilité massale sans changement de dilueur (◆) et avec changement de dilueur (◇).

Motilité progressive :

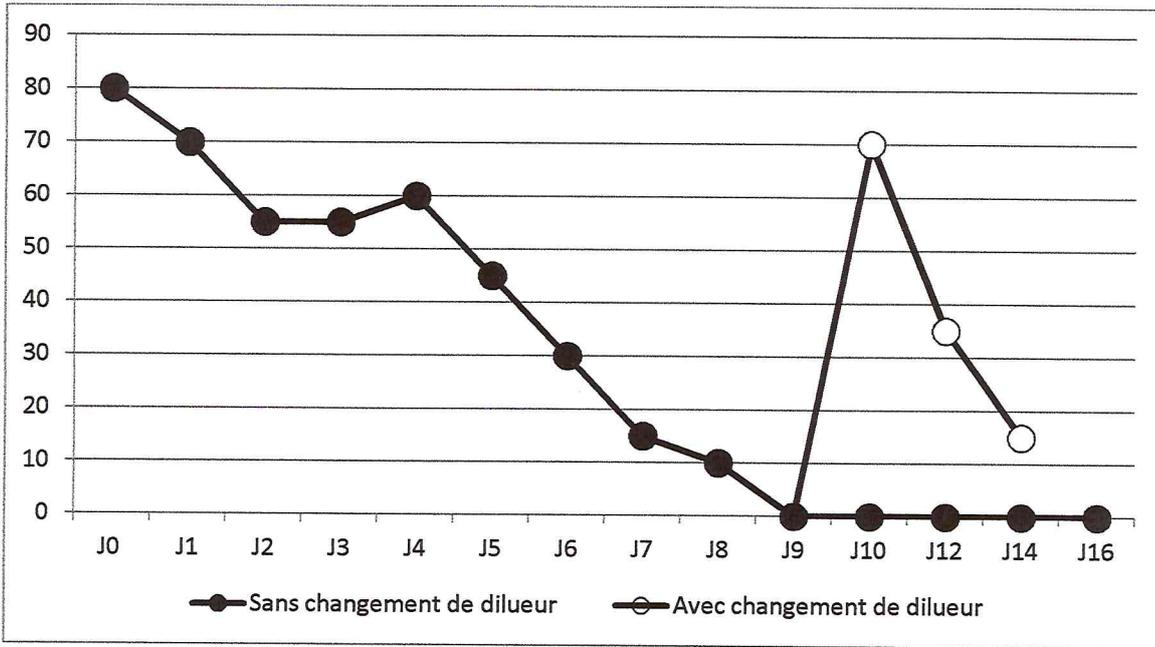


Figure 6 : Evolution de la motilité progressive sans changement de dilueur (●) et avec changement de dilueur (○).

Vitalité :

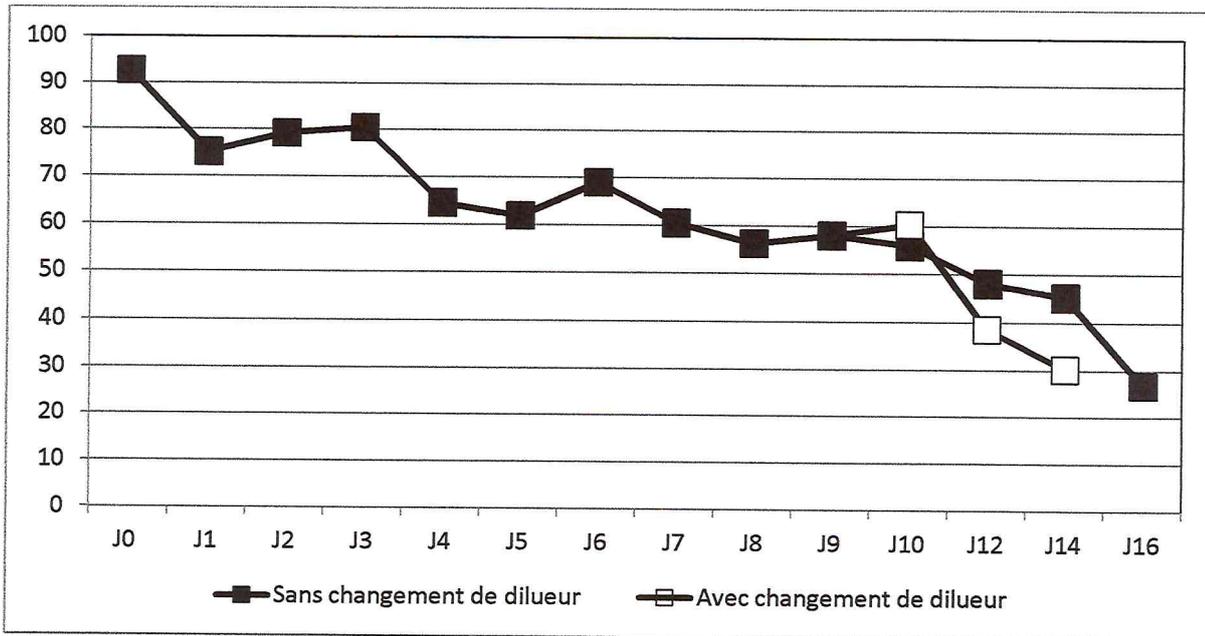


Figure 7 : Evolution et pourcentage des spermatozoïdes vivant sans changement de dilueur (■) et avec changement de dilueur (□).

Intégrité membranaire :

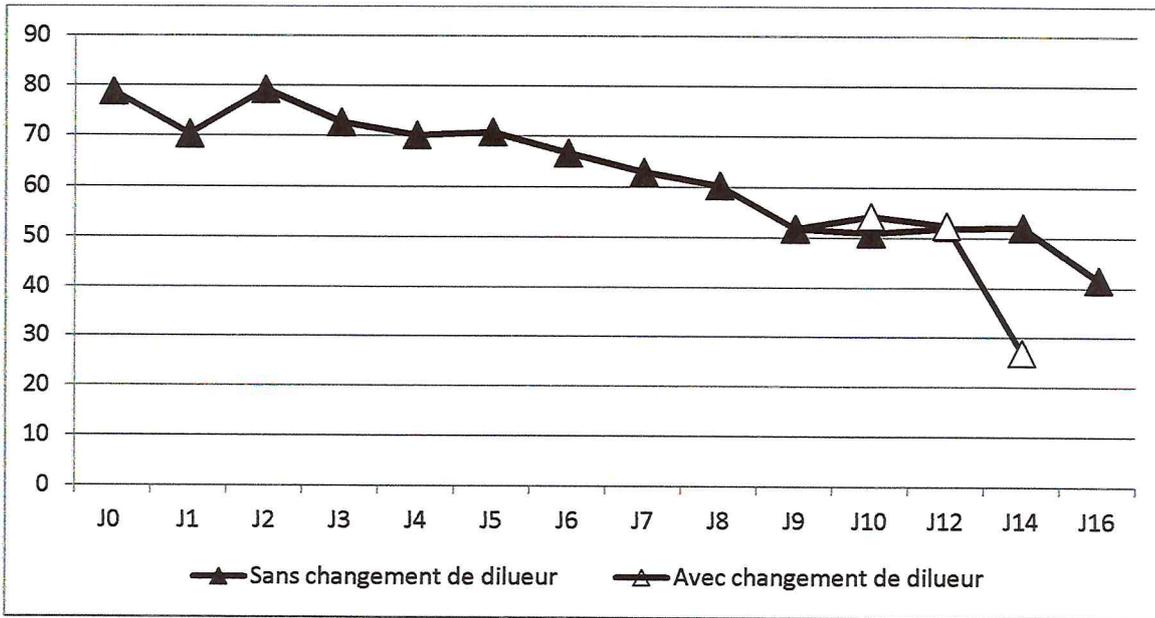


Figure 8 : Evolution et pourcentage des spermatozoïdes réactifs sans changement de dilueur (▲) et avec changement de dilueur (△).

Spermocytogramme :

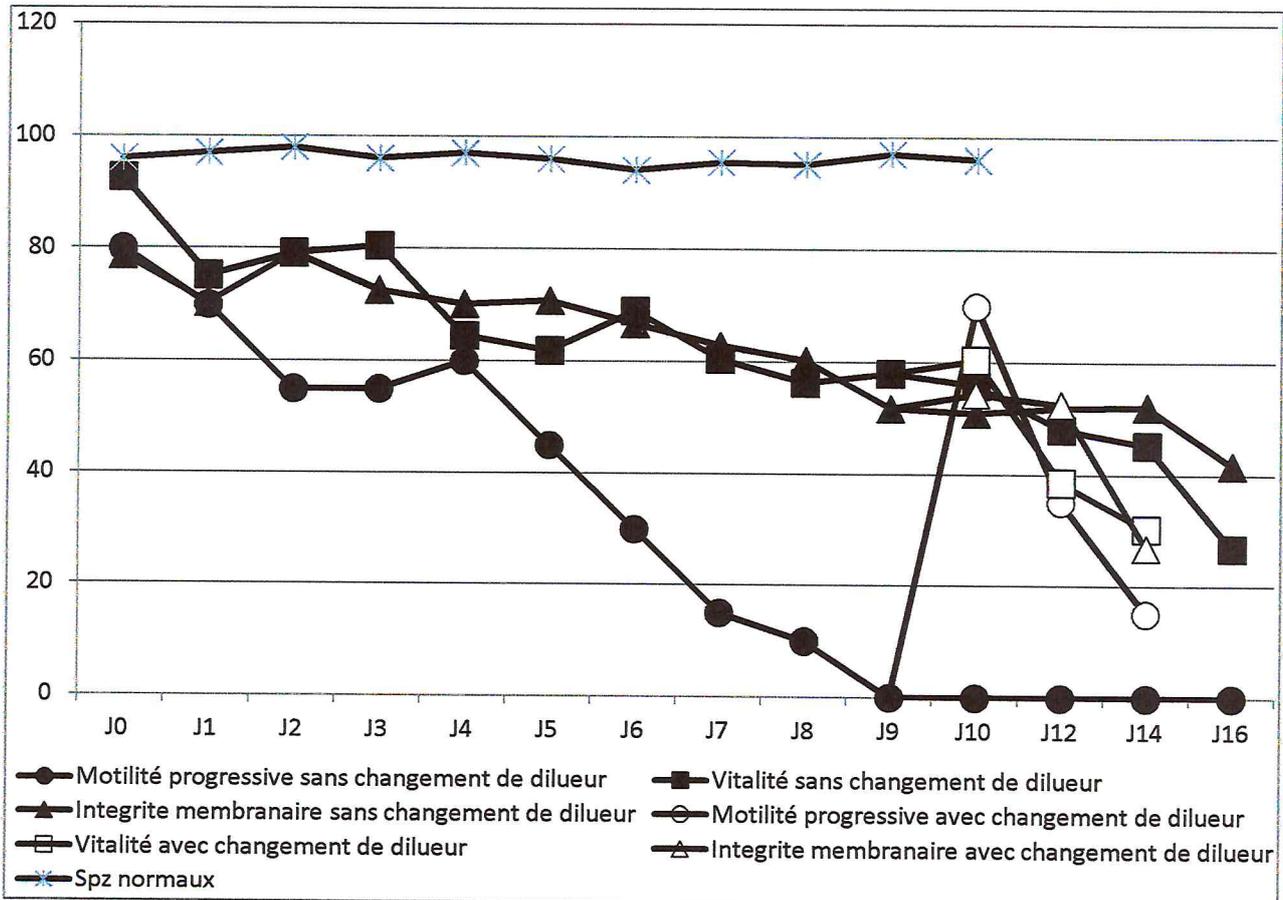


Figure 9 : Evolution de morphologie, motilité progressive, vitalité et intégrité membranaire sans et avec changement de dilueur.

DISCUSSION

1. REFRIGERATION A LONG TERME DE LA SEMENCE CANINE :

Nos résultats en matière de durée de réfrigération (9-10jours) sont identiques à ceux de IGUER-OUADA ET VERSTEGEN en 2001 en utilisant le même dilueur. Ces derniers ont été les premiers à conserver le sperme canin à +4°C pendant 10 jours avec un dilueur à base de Tris-Glucose additionné du jaune d'œuf (EYTG). Avant cette année, la réfrigération n'avait pas encore dépassé les 48 à 72 heures.

Nous avons ainsi confirmé la faisabilité d'une réfrigération à long terme (10j) chez le chien. Il y a lieu de noter ici que cette possibilité n'a pas été assez exploitée chez d'autres espèces animales.

IGUER-OUADA ET VERSTEGEN (2001) ont pu aussi prolonger cette conservation jusqu'à 27 jours par renouvellement du dilueur une fois la motilité progressive devient très faible à nulle avec succès le J11 (% Progressivité : 15%) et J21 (% Progressivité : 0%) mais sans succès le J27 (% Progressivité : 0%). Le changement du dilueur par centrifugation est un procédé permettant le renouvellement de la source d'énergie, des antioxydants et l'élimination des toxiques (radicaux libres). Ceci réactive immédiatement la motilité et prolonge la conservabilité du pouvoir fertilisant de la semence.

Nous avons pu effectuer le changement du dilueur à J10 une fois que la motilité progressive est devenue nulle ou que la motilité massale égale à 20%. Ceci a permis une reprise immédiate de la motilité (70% progressivité) presque au même niveau initial du contrôle à l'état frais (80% progressivité) (Figure 6). Ainsi, nous avons confirmé la possibilité de réactiver la motilité de façon immédiate par changement de dilueur. Cependant, dans les conditions de notre étude, il n'a pas été possible de prolonger la conservation après changement du dilueur au-delà de quatre (04) jours, car le volume initial de l'échantillon était insuffisant et de ce fait, nous n'avons pas eu l'occasion de renouveler le dilueur une deuxième fois.

2. MOTILITE

a. Motilité et fertilité (Vitalité et fonctionnalité membranaire)

Il a été clairement établi que la mobilité est un mauvais moyen pour l'évaluation de la vitalité et est loin d'être un critère fiable pour estimer le potentiel de fertilité d'un sperme canin (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J.; 2001b) (VERSTEGEN J, ONCLIN K & IGUER-OUADA M.; 2005). Ceci explique la non corrélation entre la motilité et la fertilité rapportée dans la littérature (SANCHEZ-PARTIDA L.G. et al ; 1999).

Cette fonction de motilité faiblement corrélée à la vitalité et la fertilité peut régresser jusqu'à s'annuler sans pour autant signifier obligatoirement la mortalité ou l'infertilité de cette semence. En effet, cette fonction est réversible car elle peut être activée in vivo une fois au contact des sécrétions du tractus génital femelle et par des procédés in vitro comme le changement du milieu de conservation (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J.; 2001b) (VERSTEGEN J, ONCLIN K & IGUER-OUADA M.; 2005).

Nos courbes de vitalité et de fonctionnalité membranaire sont restées conservées à un niveau acceptable (respectivement 56% et 51%) (Figure 7 et 8) pendant que la motilité s'est complètement annulée. Contrairement à cette dernière qui a repris presque son niveau initial, elles n'ont pas été modifiées par le changement du dilueur à J10 . Ces résultats préliminaires tendent à dire que les paramètres de vitalité et fonctionnalité membranaires expliquent la reprise de la motilité par changement du dilueur et pourraient servir d'un moyen d'évaluation de sa réversibilité.

Dans notre étude, et par défaut de volume spermatique, nous n'avons pas pu aller jusqu'à J27 pour prouver le contraire, c-à-d prouver que la non reprise de la motilité dans l'étude de Iguer-Ouada et Verstegen est associée à un seuil trop faible ou nul de vitalité et de fonctionnalité membranaire. D'autres études semblent être nécessaires pour apporter plus d'éclaircissement à ce point.

b. Motilité sans réactivation :

En comparant nos résultats relatifs à l'évolution de la motilité pendant la réfrigération à ceux d'Iguer-Ouada et ses collaborateurs, nous remarquons ce qui suit :

- dans l'étude comparative (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J.; 2001b) (VERSTEGEN J, ONCLIN K & IGUER-OUADA M.; 2005) la motilité totale s'est annulée à J16 alors que la motilité progressive à J14.
- dans notre étude, la motilité massale s'est annulée à J14 (Figure 5) alors que la motilité progressive (ou individuelle) à J9 (Figure 6).

L'écart entre les résultats des deux expériences (14j Vs 16j & 09j Vs 14j) peut s'expliquer par la différence de méthode d'évaluation de la motilité. Nous avons utilisé une évaluation subjective de la motilité basée sur la microscopie classique alors que Verstegen et ses collaborateurs ont effectué une analyse informatique des paramètres de la motilité par un système CASA qui offre plus d'exactitude et de précision par rapport à la méthode subjective qui sous-estime ces paramètres et s'avère de ce fait beaucoup plus restrictive (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M ET ONCLIN K.; 2002).

En effet, l'écart entre les valeurs de motilité progressive est de cinq (05) jours alors que l'écart entre la motilité massale et la motilité totale n'est que deux (02) jours. Ceci peut s'expliquer par les deux points suivants:

- L'évaluation de la motilité progressive est faite avec beaucoup de précision par l'analyse informatique (objective) alors qu'elle est fortement sous-estimée par la microscopie classique (subjective) qui ne peut capter tous les mouvements au même temps (VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M ET ONCLIN K.; 2002).
- L'évaluation du pourcentage de motilité totale par système CASA (défini comme le pourcentage de spermatozoïdes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale) n'est pas très loin du principe de l'évaluation classique de la motilité massale (IGUER-OUADA M; 2001).

c. Motilité après activation :

Après renouvellement du milieu de conservation à J10, nous avons observé une reprise immédiate de la motilité qui n'a duré que quatre (04) jours dans les conditions de notre expérimentation (Figure 5) contre dix jours (10j) pour l'étude comparative (IGUER-OUADA M & VERSTEGEN J.; 2001b) (VERSTEGEN J, ONCLIN K & IGUER-OUADA M.; 2005).

Cet écart peut s'expliquer par les deux points suivants :

- Erreurs probables de manipulation pendant la séparation de l'ancien dilueur et son renouvellement qui aurait occasionné des dommages aux spermatozoïdes ayant limité leur durée de vie.
- A j14 (motilité nulle) il ne restait de notre échantillon de semence réfrigérée qu'une centaine de microlitres ayant servi à peine pour la réalisation des tests d'évaluation. Ce faible volume de semence trop diluée en fin d'expérimentation pourrait agir négativement sur la motilité (PENA A & LIND-FORSBERG C ; 2000)

Cependant, le plus important pour nous à ce niveau, est de vérifier l'activation de la motilité par changement de dilueur même si nous n'avons pas pu prolonger la conservation à l'état réfrigérée de cette semence au-delà du 14^{ème} jour.

Il a été rapporté dans la littérature l'existence de variations individuelles dans la qualité et la conservabilité de la semence d'un chien à un autre (DAVIES PR; 1982). Les tests de vitalité et de fonctionnalité membranaire, simples à réaliser, une fois associés à la motilité, pourraient servir d'un moyen pour déterminer les limites dans le temps de la réversibilité de la motilité, ainsi que les variations individuelles de cette réversibilité.

Ces deux tests pourraient être intégrés dans l'évaluation de la conservabilité du sperme canin pour mettre en évidence les variations individuelles chez les chiens donneurs de sperme. Ainsi, grâce à la vitalité et la fonctionnalité membranaire, le sperme de certains chiens pourrait être conservé plus longtemps que celui d'autre, et cela en plus des critères initiaux de conservabilité connus en occurrence la motilité, la morphologie et la concentration.

3. Morphologie et son utilité dans l'évaluation de la semence réfrigérée.

Différemment aux autres paramètres étudiés, la morphologie est restée inchangée pendant dix (10) jours au même niveau initial du contrôle à l'état frais (Figure 9).

Cette constatation signifie que le contrôle de la morphologie n'a aucun intérêt dans l'évaluation de la qualité de la semence pendant la réfrigération. Par contre, il a toute son utilité dans le contrôle à l'état frais pour évaluer et juger la conservabilité de la semence (OETTLE E.E. ; 1993). Pour cette raison, et pour économiser le volume de l'échantillon, nous avons abandonné ce contrôle de la morphologie dans la deuxième phase de conservation.

Par ailleurs ces résultats peuvent éventuellement signifier que les manipulations des échantillons pendant notre expérimentation n'ont pas occasionné des altérations des spermatozoïdes qui s'expriment par des anomalies mineures (OETTLE E.E. ; 1993).

CONCLUSION

Notre expérimentation nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- Le sperme canin peut être réfrigéré à long terme pendant au moins dix (10) jours à +4°C dans un dilueur de laboratoire à base de Tris-Glucose additionné du jaune d'œuf.
- La motilité est une fonction non vitale qui s'exprime chez un spermatozoïde vivant avec une membrane cytoplasmique intègre et fonctionnelle. elle est maximale dans les conditions optimales de disponibilité de source d'énergie, d'osmolarité et de PH. Elle peut s'atténuer si les conditions sont défavorables dans le milieu de conservation (in vitro) et peut même s'annuler sans pour autant que sa vitalité et sa fonctionnalité membranaire ne soient forcément touchée (un spermatozoïde immobile n'est pas forcément mort).
- La réactivation de la motilité peut être obtenue en optimisant les conditions citées plus haut (changement de dilueur par exemple) à condition que la vitalité et la fonctionnalité membranaire soient conservées.
- Les tests de vitalité (Eosine-Nigrosine) et de fonctionnalité membranaire (HOS-Test) doivent être associés à la motilité dans l'évaluation de la qualité de la semence pendant la réfrigération, car la motilité seule n'est pas un test fiable dans ce cas.
- La morphologie ne varie pas avec la durée de conservation de la semence et ne semble pas être un moyen d'évaluation pendant la réfrigération. Cependant, elle trouve toute son utilité dans l'analyse à l'état frais pour évaluer la conservabilité d'une semence.

RECOMMANDATION

Sur le plan méthodologique et pour avoir de meilleurs résultats, nous recommandons de refaire la présente expérimentation en veillant aux points suivants :

- Réplication de l'expérimentation au minimum 3 fois pour pouvoir appliquer les tests statistiques aux résultats et réduire l'effet du hasard en dessous d'un seuil d'acceptabilité.
- Utiliser la technique de pooling de plusieurs éjaculats pour augmenter le volume de semence et pouvoir ainsi prolonger l'expérimentation jusqu'au 27^{ème} jour et plus et pour lutter ainsi contre les variations individuelles et ne laisser que la variation des paramètres étudiés, minimisant ainsi le biais de l'étude.
- Refaire la présente expérimentation dans les conditions contrôlées et sur un large effectif de façon à pouvoir étudier la corrélation entre la motilité et les deux autres tests et définir des seuils de réversibilité de la motilité. Dans ce cas, le pooling est abandonné au profit d'échantillons individuels et au recours à l'insémination artificielle chez des femelles comme test de fertilité in vivo...

Sur le plan scientifique, nous recommandons :

- pendant l'insémination artificielle a semence réfrigérée « à long terme », de recourir à l'activation de motilité de la semence par une solution d'activation avant son utilisation ce qui augmente les chances de fertilité (en les réanimant dans une solution de dilution remplissant les conditions optimales de source d'énergie ph et antioxydant ainsi que d'osmolarité)
- pendant la réfrigération de la semence canine, d'associer à l'évaluation de la motilité, les tests de vitalité et de fonctionnalité membranaire pour maîtriser les limites dans le temps de conservabilité de la motilité.

BIBLIOGRAPHIE

BRIFFAUT AS. (2007)

Congélation de la semence canine : détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents

Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENVL 2007.

BUE P. (1992)

Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 81 p.

CHRISTIANSEN IJ. (1984)

Reproduction in the dog and the cat .

LONDON . ailliere tindall ,1984. 99-100.

DAVIES.P.R(1982)

A study of spermatogenesis,rates of sperm production and methods of preserving the semen of dog
PhD thesis, university of SYDNEY,AUSTRALIA

ENGLAND GCW. (1992)

The cryoconservation of dog semen

PhD thesis 1992 . Royal Veterinary College. Univ of LONDON.

ENGLAND G.et PLUMMER J. (1993)

Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa.

Journal of Reproduction and fertility, 47 (suppl), 261-270.

FELDMAN E. et NELSON R. (2004a)

Clinical and diagnostic evaluation of the male

reproductive tract. In : Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed.

Philadelphia : WB Saunders, 930-952.

FELDMAN E. et NELSON R. (2004b)

Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In : Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1005-1013.

FONTBONNE A., DUMONT C. (1992)

Prélèvement et examen de la semence chez le chien.

In : Pages J.P. (eds.).Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260.

FONTBONNE A. (1995)

Infécondité du chien mâle.

In : encyclopédie vétérinaire .Pathologie de la reproduction. Elviesier, Paris , Volume 5,1-13.

FUERTE PV. (2008)

Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale

Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENVA 2008.

GOODMAN M. et CAIN J. (1993)

Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47 (suppl), 554.

IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001a)

Long-term preservation of chilled canine semen : effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55, 671-684.

IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001b)

Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using eeg-yolk added tris-glucose extender. *In vitro and in vivo studies . biot.reprod* 2001.

IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001c)

Evaluation of hamilton thorne computer based automated system for dog semen analysis
*Theriogénologie*2001,55,733-749

JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J.D. (1984)

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.
J. Repro Fert., 70, 219-225.

LINDE-FORESBERG C. (1991)

Achieving canine pregnancy using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin N Am Small Anim Pract* 1991;21:467-85.

LINDE-FORSBERG C. (1995)

Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, 48-58.

LINDE-FORSBERG C. (2000)

Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in the dog. In : *Proceedings of the 4th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Oslo. p 120.

LINDE-FORSBERG C. (2001)

Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In : *CONCANNON P., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C. Recent Advances in Small Animal Reproduction*. [en-ligne].

New York : *International Veterinary Information Service* [www.ivis.org] (Consulté le 25 Février 2007).

OETTLÉ.E.E(1993)

Sperm morphology and fertility dog.
*j.reprod.fert.supp.*47(1993) ,257-260

OTT R.S., GOFFAUX M., THIBIER M. (1987)

Examen morphologique des spermatozoïdes.

El. et Ins., 221, 15-20.

PENA A .LINDE FORSBERG C. (2000)

Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa.

Theriogénology, 54, 703-718.

PINTO C., PACCAMONTI D. et EILTS B. (1999)

Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen.

Theriogenology, 52, 609-616.

PRINS G.S. (1998)

In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4.

Academic press, San Diego, 360-367.

PONGLOWHAPAN S. ESSEN-GUSTAVSEN.linde Forsberg c.(2004)

Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen

ROTA A., STROM B. et LINDE-FORSBERG C. (1995)

Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. Theriogenology, 44, 885-900.

SANCHEZ-PARTIDEA LG

TSUTSUI T., TEZUKA T., MIKASA Y., SUGISAWA H., KIRIHARA N., HORI T. et

KAWAKAMI E. (2003)

Artificial insemination with canine semen stored at low temperature.

Journal of Veterinary Medicine Science, 65, 307-312.

VERSTEGEN J., ONCLIN K. et IGUER-OUADA M. (2005)

Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender : in vitro and in vivo studies. Theriogenology, 64, 720-733.

ANNEXES

Annexe 1:

Technique de calcul de concentration sur la cellule de Thoma

$$N = n \times V \times 1/d \times 50\,000$$

$$N = [(R1 + R2 + R3 + R4 + R5)/5] \times 100 \times 250 \times 1000 \times V$$

Dont

N : nombre de spz/éjaculat.

n : est la somme R1-5.

R1-5 : est la somme des spermatozoïdes comptés dans les 16 petits carreaux.

V : volume de fraction spermatique.

D : dilution.

Nb : pour avoir calculer le nombre de spermatozoïdes par (ml), il suffit de calculer sans multiplier par V

Annexe 2 : Résultats de calcule de concentration

R1=63						R2=54			
2	2	4	2			4	3	2	3
4	2	7	4			4	1	2	4
4	3	3	5			2	5	7	5
5	4	7	5		R5= 48	2	3	3	4
					4	7	3	3	
					2	2	0	1	
					5	2	4	3	
					5	3	1	3	
5	5	4	3			7	6	6	4
3	4	8	2			1	4	3	4
2	2	2	2			4	2	5	4
5	3	5	5			5	1	4	4
R4=60						R3= 64			

$$N(\text{spz/éjaculat}) = n \times V \times 1/d \times 50\,000$$

$$N(\text{spz/éjaculat}) = 289 \times 1.2 \times 1/0.01 \times 50\,000 = 1 \text{ milliard } 734 \text{ millions}$$

$$N(\text{spz/éjaculat}) = [(R1 + R2 + R3 + R4 + R5)/5] \times 100 \times 250 \times 1000 \times V$$

$$N(\text{spz/éjaculat}) = 89 \times 100 \times 250 \times 1000 \times 1.2 = 1 \text{ milliard } 734 \text{ millions}$$

$$N(\text{spz/ml}) = (\text{spz/éjaculat})/v = 1 \text{ milliard } 445 \text{ millions}$$

Annexe 3 : Technique de coloration d'Eosine-Negrosine

- Préparation de solution hypo-osmotique : 1/5 de solution de NaCl a 9% et 4/5 d'eau distillée.
- Prendre 1ml de solution hypo osmotique (60 mOsmol/l) et 0.1 ml de semence.
- Mettre en incubation pendant 60 minutes dans un bain marie à 37°C.
- Poser une goutte de solution incubée dans une lame et rajouter une goutte de coloration d'éosine.
- Après 30 secondes ajouter une goutte de negrosine.
- Faire un frottis et observer sous microscope optique à Gx40.

Annexe 4 : Technique de coloration Harris-Shorr simplifiée

- Préparation d'un frottis, et laisser sécher à l'air.
- Plonger la lame dans un bain d'alcool éthanol à 70% pendant 1 minute.
- Rincage avec l'eau courant (eau de robinet).
- Mettre le frottis dans le bain de coloration d'Harris pendant 2 minutes.
- Faire un deuxième rincage avec l'eau de robinet.
- Mettre la lame dans l'alcool ammoniacal pendant 1 minute.
- Faire un troisième rincage toujours avec l'eau de robinet.
- Placez la lame dans le bain d'éthanol à 70 % pendant 1 minute.
- Plonger la lame dans le bain d'éthanol 95% pendant une minute.
- Mettre la lame dans le bain de coloration de Shorr de 2 à 3 minutes.
- Remettre la lame dans un bain d'éthanol à 95 % pendant 1 minute.
- Plonger la lame dans le bain d'éthanol absolu pendant 1 minute 2 fois consécutives.

