

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université SAAD DAHLEB de Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département Biologie des organismes et de population

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en

Spécialité : Reproduction Animale

Domaine : Science de la nature et de la vie

Thème

Effet d'un nouveau diluant de réfrigération de sperme, à base de plasma de jaune d'œuf (P. J.O) lyophilisé, sur les paramètres spermatiques chez le chien.

Réalisée par : Mell CHERIFI ASSIA & Melle BENOUAHLIMA WAHIBA

Devant le jury composé de:

- | | | | |
|------------------------|-----|------------|--------------|
| ➤ Mr ADEL Djalal | MAA | U.Blida1 | président |
| ➤ Mr BEN AZOUZE Fella | MCB | U.Blida1 | Examinatrice |
| ➤ Mr BELALA Redha | MCB | U. Blida1 | Promoteur |
| ➤ Mr BESSAAD Med Amine | MCB | U. Blida 1 | Co-promoteur |

Année Universitaire 2016-2017



Dédicace

Avec un grand amour je dédie ce travail :

*A mes chers parents pour leur soutien et leur présence éternel
à mes côtés, merci de m'avoir donné la vie, l'amour et la
tendreté, j'ai l'honneur d'être votre fille et je suis fière de vous
énormément.*

À mes chers frères: Youcef et Hassan.

*À mes chères tantes, Amina, Djamilia, Horia, Fatima, Zahia et
sa belle-famille.*

*À mes amies que j'adore ; Fatima, Cherifa, Asma, Anissa,
Hayat, Amira, Zolikha, Haizia, Fouzia*

À mon binôme Wahiba.

*À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail,
j'exprime mes profonds remerciements.*

A tous mes amis et collègues de la promotion Reproduction

Animale 2016/2017

Assia



Dédicace

Avec un grand amour je dédie ce travail :

À mon cher papa, à ma chère maman :

Berceau de ma culture, pour leur soutien tout au long de mon cheminement scolaire. Ce travail n'aurait pas pu être finalisé sans votre présence dans ma vie. Sans vous je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui, il n'existe pas assez de mots pour exprimer tout ce que vous représentez pour moi.

À mon cher époux Mourad :

Il n'existe pas assez de mots pour exprimer tout ce que tu représentes pour moi, je te remercie pour ta présence, ta disponibilité, ton aide permanent, ton grand soutien, et pour ta contribution à la réalisation de ce travail.

À mes chers frères Salim, Azdin

À mes chères Frangines Faiza, Hamida

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, j'exprime mes profonds remerciements.

A tous les étudiants de la promotion 2017, Reproduction Animale

Wahiba

Remerciement

En premier, nous dédions tous nos remerciements à dieu ALLAH qui nous a donné la volonté et le courage pour avoir réalisé ce travail,

La réalisation de ce travail a été possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes, c'est l'occasion de les remercier et de leurs avouer nos profondes reconnaissances.

Nous remercions notre promoteur Mr «BELALA Redha» d'avoir acceptée d'encadrer notre recherche, pour sa disponibilité à tout moment ainsi pour sa patience et sa gentillesse avec nous, merci aussi pour votre sagesse en matière d'orientation et la fourniture de conseils.

Nous remercions également notre Co-promoteur messieurs « BESSAD Mohammed Amine» Vos précieux conseils, vos explications et orientations qui nous ont éclairé la méthodologie de la recherche et votre aide durant toute la période de la réalisation de ce modeste travail.

Vous êtes vraiment l'exemple concret de la personne compétente et responsable.

Nos vifs remerciements vont également Mr Adel pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

A Mme Ben Azouze , nous sommes heureuses de votre présence parmi les jurys en tant que examinatrice, veuillez accepter l'expression de notre considération.

A tous notre enseignants qui ont veillé à nous donner du savoir tout au long de notre carrière scolaire et, en particulier, à tous notre professeurs de la faculté des sciences de Blida qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu durant toutes ces 5 années.

Je remercie aussi Mme Baka selma kalissa et son époux Mr Fahim pour leur contribution à la réalisation de ce mémoire, nous vous remercions infiniment pour tous ces précieux moments.

Un grand merci à Mme AOUANE Nedjma non seulement pour son extraordinaire collaboration technique mais pour partager ses appréciables qualités.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Nous remercions particulièrement le Directeur du Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A) de l'université de Blida1 pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous remercions également le Directeur du Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (C.N.I.A.A.G) de Baba Ali d'avoir mis à notre disposition à titre gracieux dans le cadre d'une convention de collaboration entre le C.N.I.A.A.G et le L.B.R.A les produits chimiques et les colorants nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail. Que le C.N.I.A.A.G trouve ici l'expression de nos forts remerciements et notre sincère reconnaissance.

Nous remercions aussi le centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques C.R.A.P.C de Boussmaïl pour sa collaboration très efficace et d'avoir pris en charge à titre gracieux la lyophilisation de nos échantillon de plasma de jaune d'œuf. Merci au Directeur Bachari Khaldoun pour l'aide qui nous a donné la chance de faire notre travail au niveau du CRAPC sans oublier Mme Hadjar, Mr Hamitouche, Mr Azzi et l'équipe des chercheurs en général.

Liste d'abréviation :

MOsm: Osmole

J.O : Jaune d'Oeuf

PJO N: Plasma Jaune d'œuf Natif

PJO I: Plasma Jaune d'œuf lyophilisé

SPZ : Spermatozoïde

HOSt : Hypo Osmotique Solution test

CRAPC: Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques

SCA: Sperm Class Analyzer

CASA : Coputer Aided Sperme Analysis

VLC : Curvilinear Velocity : qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation.

VSL : Straight-Line Velocity : est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite.

VAP : Average Path Velocity : correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation.

L'ALH : Amplitude of Lateral Head displacement : correspond à l'amplitude de déplacement latéral de la tête.

BCF : Beat Cross Frequency : est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.

SOMMAIRE

CHAPITRE I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction.....	
I-1-Généralités.....	2
I-1-1-Rappel sur l'Anatomie.....	2
I-1-2-physiologie de la reproduction.....	3
I-1-2-1- La semence canine.....	3
I-1-2-1-1- Le plasma séminal.....	4
I-1-2-1-2- Le spermatozoïde.....	5
I-2- Récolte de sperme canine.....	5
I-3- Evaluation de la semence fraîche.....	5
I-3-1- Examens utilisés en routine.....	6
I-3-1- 1- Examen macroscopique.....	6
I-3-1- 2- Examen microscopique.....	6
I-3-2- Examens non utilisés en routine.....	10
I-4- Conservation de la semence canine.....	11
I-4-1- Dilution.....	11
I-4-1- 1- Caractéristiques de dileur.....	11
I-4-1- 2- Compositions de dileur.....	11
I-4-1- 2- 1- le jaune d'œuf.....	12

I-4-1- 2- 2- le plasma de jaune d'œuf.....	13
I-4-2- Réfrigération.....	13
I-5- Effets de la réfrigération sur les Spermatozoïdes.....	13
I-6- Amélioration de l'efficacité des diluants protecteurs.....	14
I-6-1- lyophilisation du plasma jaune d'œuf.....	14

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

Objectifs.....	16
II-1- Etude de la mobilité spermatique.....	16
II-1-1-Récolte de la semence.....	16
II-1-2- Evaluation de la semence.....	18
II-2-3- préparation de dilueur Tris base de la réfrigération.....	21
II-2-4- Extraction des LDL à partir du jaune d'œuf de poule.....	25
II-2-5- lyophilisation de plasma jaune d'œuf.....	29
II-2-6- Préparation des dilueurs final pour la réfrigération de la semence canine.....	33
II-2-7- Evaluation de la qualité de sperme canine réfrigéré	34
II-2-8- Analyse statistique	35
II-2- Etude de l'intégrité membranaire.....	36

Chapitre III : résultats et discussion

III - 1- Paramètres de mobilité spermatique	41
III -2- Paramètres d'intégrité spermatique.....	48

Les références bibliographiques

Les annexes

Résumé

Résumé

La présente étude vise à explorer l'éventuel intérêt du plasma de jaune d'œuf naturel et lyophilisé en substitution au jaune d'œuf entier (JO) dans la réfrigération de la semence canine.

Douze éjaculats ont été récoltés sur 6 chiens Beagle et réfrigérés dans des dilueurs à base de 20% JO (contrôle) et trois concentrations (20%, 40% et 60%) de plasma de jaune d'œuf (PJO) liquide et lyophilisé.

Les paramètres de mobilité ont été évalués avant réfrigération et 10 min après réanimation par un analyseur d'image de marque Microptic (SCA®, Evolution v. 6.2). La concentration de 40% s'est montrée optimale pour les PJO liquide et lyophilisé sans aucune différence significative avec le contrôle.

Les caractéristiques d'intégrité membranaire (le test hypo-osmotique et le test de coloration à l'éosine-nigrosine) ont été évaluées avant réfrigération et 10min après réanimation. Les dilueurs à base de PJO liquide et lyophilisé (40%) préservent les caractéristiques d'intégrité spermatiques avec autant d'efficacité que le contrôle.

Le PJO lyophilisé semble représenter une alternative viable au JO dans la réfrigération de la semence canine.

Mots clés : Semence Canine - réfrigération – Plasma de jaune d'œuf – Lyophilisation – paramètres de mobilité – intégrité membranaire

ملخص

تهدف الدراسة الحالية الى استكشاف الفائدة المحتملة لبلازما صفار البيض الطبيعية و المجفف في التجميد كبديل عن صفار البيض كله في تبريد مني الكلاب

تم حصاد 12 قذف من 6 كلاب تم تبريده في مخففات 60% , 40% , 20% من بلازما صفار البيض السائل والمجمد تم تقييم معلومات التنقل قبل التبريد وبعد 10 دقائق للإنعاش مع محلل في صورة العلامة التجارية ميكروبيتيك كان تركيز 40% الامثل بالنسبة للسائل والمجفف دون اي فرق كبير مع السيطرة على خصائص سلامة الغشاء قبل التبريد و10 دقائق بعد الانعاش

يبدو 40% المجفف بديل امثل لصفار البيض كله في عملية تبريد مني الكلاب
كلمات البحث : نطاف الكلاب , التبريد , بلازما صفار البيض , التجفيف , معلومات التنقل , سلامة الغشاء

Abstract

Abstract

The current study aimed to explore the possible benefits of natural and lyophilized egg yolk plasma (liquid EYP, lyophilized EYP) in substitution to whole egg yolk (EY) for chilling of canine sperm.

12 ejaculates collected from 6 dogs were chilled in extenders composed of 20% EY (Control), 20%, 40%, 60% natural-EYP and 20%, 40%, 60% lyophilized-EYP.

Motility parameters were assessed before chilling (T0) and 10 min after rewarming by Sperm Class Analyzer (SCA® Microoptics, v 6.2). The concentration of 40% was the optimal for both natural and lyophilized EYP with no significant difference to (6%LDL).

Spermatozoal membrane (Hypo-osmotic swelling test, and Eosinine-Nigrosine vital staining) integrity characteristics were evaluated before chilling (T0) and 10 min after rewarming. Both liquid and lyophilized 40% EYP-based extenders preserve successfully all integrity parameters assessed as efficiently as the reference extender (20% EY). Lyophilized EYP seem to be a viable alternative to the whole EY in chilling extenders for dog semen.

Key words: Canine Sperm - Cryopreservation – Egg Yolk Plasma – Lyophilization – in vitro fertility

Introduction

Introduction

En 1940, PHILIPS et LARDY ont recommandé pour la première fois l'utilisation du jaune d'œuf (JO) dans la conservation de la semence bovine (Phillips et Lardy, 1940). Depuis, il est devenu sujet à une recherche extensive et est devenu rapidement le protecteur par excellence du spermatozoïde contre le choc de refroidissement. Quelques décennies plus tard, il fût mis en évidence que les propriétés cryoprotectrices du JO sont liées aux lipoprotéines de basse densité (LDL pour Low Density Lipoproteins) qu'il contient (Pace et Graham, 1974 ; Foulkes, 1977 ; Quinn et Chow, 1980 ; Moussa et *al.* 2002).

Cependant, après l'utilisation du JO pendant longtemps, divers inconvénients sont apparues représentés essentiellement par le risque de contamination bactérienne du dilueur (de Leeuw et *al.* 1993 ; Bousseau et *al.* 1998) et les granules qui inhibent la respiration des spermatozoïdes (directement par les lipoprotéines de haute densité HDL : pour High Density Lipoproteins) (Amirat et *al.* 2004) et interfèrent avec la technique d'analyse des caractéristiques de mouvement. Pour ces raisons le JO entier a été remplacé par sa fraction cryoprotectrice (i.e. LDL) qui a prouvé son efficacité dans la cryoconservation de la semence canine (Bencharif et *al.* 2008).

Plusieurs contraintes techniques se sont érigées en obstacle devant l'utilisation des LDL dans la production et la commercialisation des dilueurs. Il est devenu donc évident de substituer les LDL.

Le plasma du jaune d'œuf (PJO) est la fraction soluble obtenue facilement par simple dilution et centrifugation du JO entier en granules (sédiment : 19-23% du JO) et en plasma (culot : 77-81 du JO) (Moustacas et *al.* 2011 ; Neves et *al.* 2014). Il est

Introduction

composé de LDL (85%) et de glycoprotéines globulaires (15%) (Essentiellement α , β and γ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans le protocole d'extraction des LDL pures (Moussa et *al.* 2002; Anton, 2013).

Ce procédé de fractionnement a été évoqué pour la première fois par BURLEY et COOK (1961) puis décrit en détail par MCBEE et COTTRILL (1979). Différemment aux LDL, ce procédé a été appliqué industriellement et breveté sous le numéro 0 430 757 A1 (Kerandivez, 1990).

Des études récentes ont montré l'intérêt du PJO liquide comme alternative au JO entier dans la cryoconservation de la semence équine (Pillet et *al.* 2011) et canine (Corcini et *al.* 2015), mais il n'a jamais été lyophilisé et sa concentration n'a jamais été optimisée. Il serait certainement intéressant si le PJO puisse être lyophilisé sans altération de ses propriétés cryoprotectrices. Ceci offrirait les avantages d'une conservation de longue durée, une manipulation plus aisée et bien d'autres applications commerciales.

Ainsi, le présent travail vise à déterminer l'éventuel intérêt de trois concentrations (20%, 40%, 60%) de PJO, liquide et lyophilisé en substitution au JO dans la réfrigération de la semence canine.

I-1-Généralités

I-1-1-Rappels sur l'anatomie de l'appareil sexuel du chien mâle :

L'anatomie de l'appareil génital mâle du chien est représentée dans la figure 1.

I-1-1-1- Les testicules:

Les testicules du chien, de forme ovoïde, sont situés en région périnéale basse où ils sont protégés, de l'extérieur vers l'intérieur, par le scrotum, la tunique vaginale et l'albuginée

Les testicules possèdent donc deux fonctions essentielles :

- une fonction exocrine : l'élaboration des gamètes mâles ou spermatozoïdes, (différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes, dont la durée moyenne est de 62 jours.) et
- une fonction endocrine : la production d'hormones sexuelles responsables du développement et du maintien des caractères sexuels mâles. (3)

I-1-1-2- les glandes annexes:

Chez le chien, les glandes annexes, ne sont présentes que la prostate et les glandes de Littre. Il n'y a ni vésicules séminales ni glandes bulbo-urétrales.

La prostate, de structure bilobée, est située autour de l'urètre proximal, en arrière du col vésical (voir figure 1).

La prostate est la glande accessoire la plus importante chez le chien. Sous contrôle des androgènes, elle sécrète le liquide prostatique qui constitue la majeure partie de l'éjaculat.

Ce liquide assure la dilution, le transport, la nutrition, la protection et la maturation des spermatozoïdes.

Les glandes de Littre sont situées le long de l'urètre pénien.

Elles élaborent, en association avec la muqueuse urétrale, la phase urétrale ou préspermatique de l'éjaculat. (4)

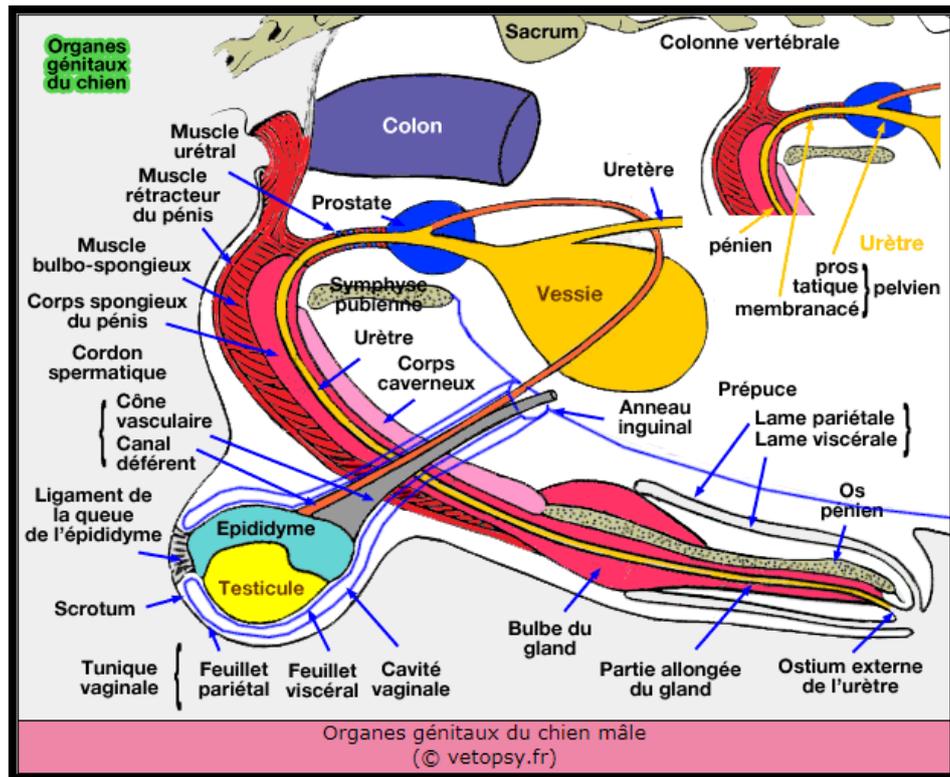


Figure1 : Structure Organes génitaux du chien mâle (76)

I-1-1-3- le pénis :

La longueur moyenne du pénis varie de six à vingt-cinq centimètres selon la taille du chien. Le pénis est composé de trois parties : **la racine** et **le corps** qui sont les éléments fixes du pénis et **le gland** qui constitue sa partie libre. (5), (6)

La racine est constituée des corps caverneux, (6) ;(7). Le gland du pénis est divisé en deux parties, une partie allongée cranialement et une partie renflée caudale : **le bulbe érectile**. Le bulbe érectile génère de nombreux influx nerveux ; c'est cette zone qui doit être stimulée lors de la masturbation.

I-1-2-physiologie de la reproduction :

L'âge d'apparition de la puberté est variable d'une race à l'autre. Les grandes races sont plus tardives que les petites. Les premières éjaculations contiennent une faible quantité de spermatozoïdes immatures. (8)

Selon les races la puberté du chien mâle apparaît entre 6 et 10-18 mois : 6 mois pour les races très petites et 18 mois pour les très grandes (9).

I-1-2-1- la semence canine :

Chapitre 1 : Synthèse bibliographiques

La semence canine 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. (10)

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (11). L'éjaculat de chien est composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (figure 2 et tableau n° 1).

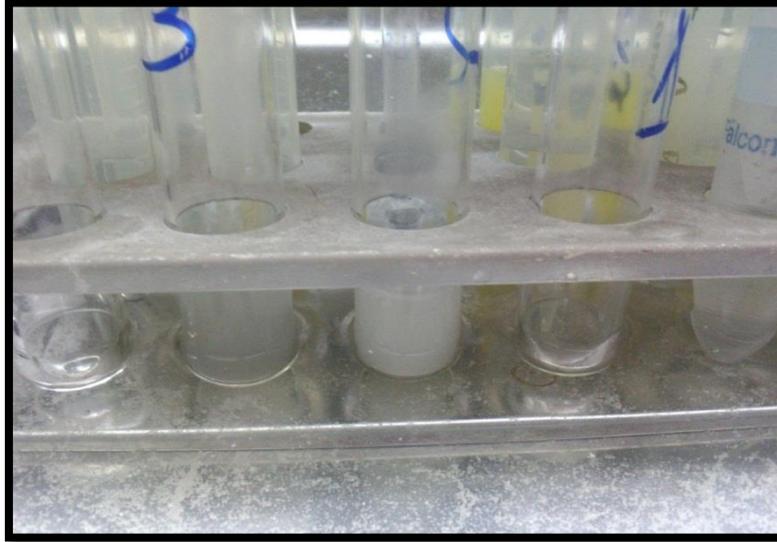


Figure 2 : les trois phases de l'éjaculat du chien mâle

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien. (12)

(Fontbonne et Dumont, 1992)

	Origine	Aspect	Volume	PH	Composition
Phase pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 ml	6.2 à 6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes+Liquide prostatique
Phase spermatique	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 ml	6.3 à 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
Phase post-spermatique	Prostatique	Claire	4 à 30 ml et plus	6.5 à 7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide prostatique

I-1-2-2-Le plasma séminal:

Le liquide séminal est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal

proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles.

Les rôles du liquide séminal sont doubles. Le liquide séminal intervient à la fois dans le transport et la nutrition des spermatozoïdes. Cependant, ce liquide n'est pas absolument nécessaire à la fécondation. En effet, des expériences ont montré que des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme conservent leurs propriétés fécondantes in vitro. Toutefois, in vivo, le liquide séminal augmente le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. (10)

I-1-2-3- Le spermatozoïde :

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. (12)

Il mesure entre 62 et 66 μm

Sa tête est ovale et aplatie dorso-ventralement.

Le flagelle propulse le spermatozoïde à une vitesse moyenne de 45 $\mu\text{m/s}$.

I-2- Récolte de sperme :

La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte manuelle par masturbation. Cette méthode simple a été utilisée dès 1780 par l'abbé Spallanzani. (12)

La récolte de sperme peut avoir plusieurs objectifs :

- La réalisation d'une insémination artificielle ;
- La conservation du sperme : cryoconservation ou réfrigération ;
- L'évaluation de la qualité de la semence dans différents cas : chez un

vieux chien, chez des animaux qui n'ont pas reproduits depuis longtemps, chez des mâles qui ont laissés plusieurs chiennes vides ou qui ont fait de petites portées ou enfin simplement avant une saillie afin d'évaluer la qualité de la semence ;

- L'objectivation d'une pathologie (13)

La semence est sensible au froid qui entraîne un choc thermique mais également au chaud. La semence doit donc être conservée à température ambiante durant son évaluation. (12)

I-3- Evaluation de la semence fraîche :

L'examen de la semence est une étape préalable et indispensable à toute utilisation de la semence, que ce soit pour une insémination artificielle en semence fraîche, une réfrigération ou une congélation, afin d'essayer de prévoir les capacités de fertilisation de cette semence. (2)

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle (14).

I-3-1- Les examens utilisés en routine :

Ces examens sont simples ; ils sont effectués avant une insémination artificielle, une congélation de semence ou plus simplement dans le cadre d'une analyse de sperme en vue d'en apprécier sa qualité. (15)

I-3-1- 1- Examen macroscopique:

- Volume :

La lecture du volume de sperme récolté se fait directement sur les tubes de prélèvement gradués.

Lors du prélèvement, il est possible de séparer les trois fractions de l'éjaculat. Ainsi, on diminue la dilution de la fraction spermatique et on facilite sa numération. De plus, il n'est pas utile de prélever la totalité de la fraction prostatique qui représente un grand volume pour un piètre intérêt(12)

Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. (11)

- Aspect:

L'aspect de l'éjaculat est un élément important. Par exemple, l'opacité de la phase spermatique donne une première indication sur la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. (15)

Ainsi, si la deuxième phase est translucide, cela suggère une azoospermie

Normalement, la première phase est translucide ou légèrement opaque, la seconde phase est laiteuse et opaque, et la troisième phase est translucide. (16).

La phase spermatique est de couleur laiteuse, elle contient les spermatozoïdes. Son volume varie de 1 à 4 ml environ. (17)

I-3-1- 2- Examen microscopique:

L'analyse microscopique est pratiquée sur la phase spermatique, le prélèvement de la totalité de l'éjaculat est inutile pour cet examen car le recueil d'un trop grand volume a pour conséquence une dilution des spermatozoïdes.

- Mobilité :

La mobilité des spermatozoïdes doit être évaluée le plus rapidement possible après la récolte. (2)

La mobilité des spermatozoïdes est étudiée au microscope sur platine chauffante à 37°C entre lame et lamelle; elle doit être effectuée rapidement après le prélèvement. (11), (18)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographiques

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement de façon à apprécier la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes. (12), (19) (Tableau2)

Tableau 2 : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (20)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïde 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

Lorsque la mobilité est maximale, on peut observer un mouvement de vague(1)

Dans un deuxième temps, le sperme est examiné au fort grossissement entre lame et lamelle afin d'apprécier la mobilité progressive : le pourcentage de spermatozoïdes qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés spermatozoïdes fléchant. (12), (19)

Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchant (12), (21)

On considère qu'un spermatozoïde de chien avec une motilité normale doit traverser le champ du microscope en 2 à 3 secondes (22). De plus, chez le chien, le pourcentage de spermatozoïdes fléchant est positivement corrélé au pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux (23).

Les importantes variations liées à l'évaluation subjective de la mobilité des spermatozoïdes ont incité les chercheurs à développer des systèmes d'évaluation objectifs et standardisés, les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA (Computer-Aided Semen Analysis). (2)

Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. (24)

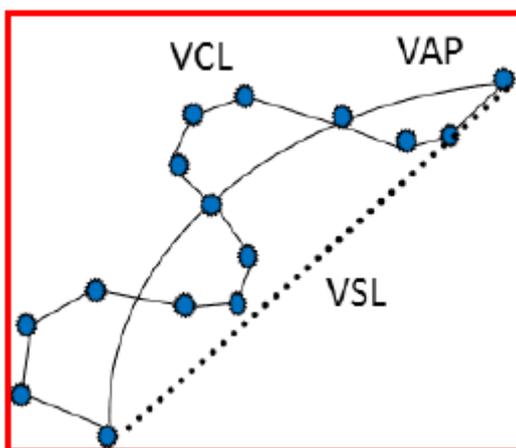
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations objectives, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles (25)

L'analyse des spermatozoïdes se fait grâce à un système optique composé d'une source de lumière, d'un microscope et d'une caméra vidéo qui digitalise les images. Ces images sont ensuite traitées par un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse d'image intégré qui permet de définir de façon objective et répétable des paramètres tels que la proportion de spermatozoïdes mobiles, leur vitesse, la linéarité de leurs trajectoires, etc. (24)

Ces analyseurs automatiques de mobilité fournissent un très grand nombre de mesures objectives sur les caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes :

- Le pourcentage de spermatozoïdes motiles.
- La vitesse curviligne (VCL) est la distance dans le temps de la trajectoire réelle de la tête du spermatozoïde (Figure 3).
- La vitesse en ligne droite (VSL) est la distance en ligne droite entre la tête du spermatozoïde au début de l'analyse et sa position à la fin du temps écoulé (Figure 3).
- La vitesse de trajet (VAP) est la vitesse ou position moyenne des spermatozoïdes ($\mu\text{m/s}$) le long d'un chemin de 5 points mathématiquement lissé où les spermatozoïdes se déplacent au fil du temps (Figure 3).
- Le pourcentage de spermatozoïdes rapides est le pourcentage de spermatozoïdes en mouvement avec une $VAP > 50 \mu\text{m/s}$
- Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs est la proportion de spermatozoïdes rapides avec une rectitude $> 75 \mu\text{m/s}$. (24)



$$\text{STR} = \text{VSL} / \text{VAP} * 100$$

$$\text{LIN} = \text{VSL} / \text{VCL} * 100$$

Figure 3 : Représentation schématique des VAP, VCL et VSL (Source de Select Breeders services)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographiques

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux : la mobilité massale et individuelle, les mouvements lents, moyens et rapides, la fréquence des battements des flagelles... Ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur capacitation sont reconnus à leur mouvement hyperactif (26).

Ces techniques assistées par ordinateur ne sont pas utilisées en routine dans l'espèce canine. (19)

- Numération

La numération s'effectue après avoir dilué une fraction de sperme avec un liquide hypertonique qui immobilise les spermatozoïdes. Après agitation du mélangeur, une goutte est déposée entre lame et lamelle sur une cellule hématimétrique (dite de Thoma ou de Mallassez)

Les spermatozoïdes sont dénombrés au grossissement 40 en contraste de la phase à l'intérieur de cinq carrés de la cellule hématimétrique. On fait ensuite la moyenne de ces cinq carrés.

A partir de cette valeur, la concentration en spermatozoïdes de la phase spermatique est calculée en fonction de la dilution réalisée.

Enfin, on obtient le nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat en multipliant la concentration de la phase spermatique par le volume de sperme total. (1)

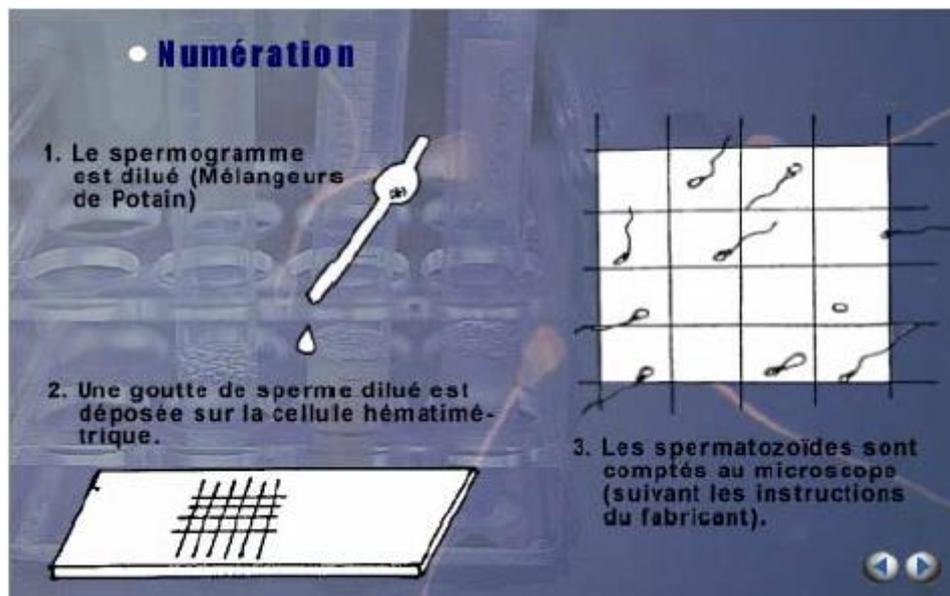


Figure 4 : Numération de spermatozoïdes (27)

- La vitalité :

La vitalité est le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence. L'éosine-nigrosine est un colorant permettant d'évaluer

la vitalité. En effet, il permet de différencier les spermatozoïdes morts qui seront colorés en rose des spermatozoïdes vivants qui eux resteront incolores. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci. (21)

I-3-2- Examen non utilisée en routine:

- Test hypo-osmotique :

Le test hypo-osmotique permet de vérifier la fonctionnalité de la membrane plasmatique des spermatozoïdes. Dans un milieu hypo-osmotique, les spermatozoïdes, dont la membrane plasmatique est fonctionnelle, vont se gorger d'eau et montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement. Si la membrane plasmatique est endommagée, elle ne permettra pas la pénétration et la rétention d'eau dans les spermatozoïdes et ces derniers vont conserver leur.

Après dilution dans une solution hypo-osmotique et incubation, une goutte de semence est placée entre lame et lamelle et 100 à 200 spermatozoïdes sont observés au microscope au grossissement x40. Le pourcentage de spermatozoïdes incurvés ou gonflés est calculé. Ce pourcentage est inversement proportionnel au pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane plasmatique endommagée. (28)

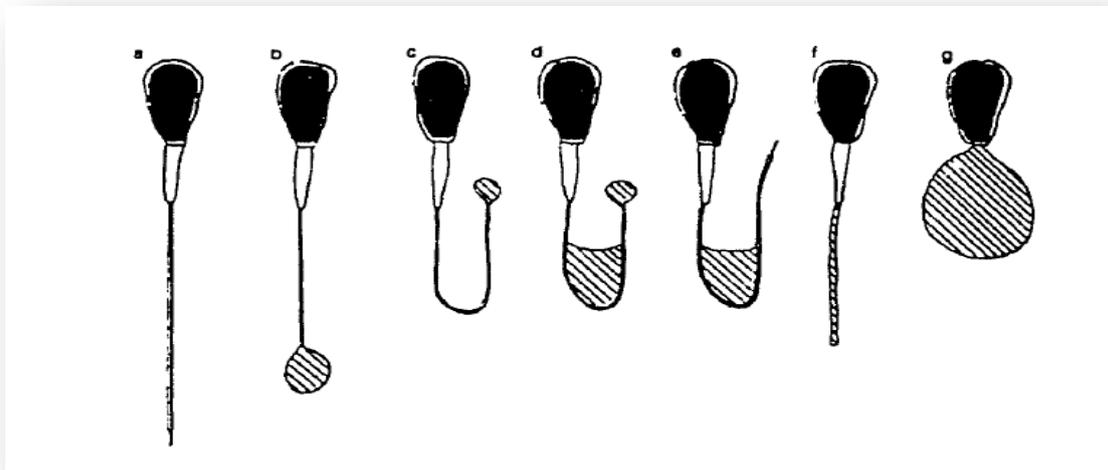


Figure 5 : Schéma des modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique. La région enflée du flagelle est représentée par la partie hachurée (29)

a : pas de modification morphologique

b,c,d : zone enflée à l'extrémité du flagelle

c,d,e : flagelle courbé en épingle à cheveux

d , e : zone enflée enveloppant en partie le flagelle recourbé

f : flagelle court et épais

g : zone enflée enveloppant entièrement le flagelle

I-4- Conservation de la semence canine :

La première utilisation réussie du sperme glacé chez les chiens remonte à 1954 (30)
Un certain nombre de phénomènes se produisent pendant le processus de refroidissement, dont certaines ne sont pas encore entièrement comprises tels que «choc à froid»; (31), (32)
Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour limiter ce phénomène: les extensions (dont certaines jouent directement rôle de protecteur de membrane cellulaire) et d'autres facteurs tels que la température de stockage et la vitesse de réfrigération peuvent aider pour améliorer la conservation du sperme glacé. (33)

I-4-1- Dilution :

Etant donné que la survie des spermatozoïdes à 4°C est réduite, il est nécessaire d'utiliser un milieu spécifique, ou dilueur, afin d'accroître leur longévité et de préserver au mieux leur capacité de fécondation. (2)

Les dilueurs sont des milieux permettant de conserver la semence en gardant les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. (34), (35)

La mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un dilueur qu'en l'absence de dilueur. (32), (36)

De plus, (21) a prouvé que des IA de semence réfrigérée avec un dilueur donnent des taux de gestation significativement plus élevés que des IA de semence réfrigérée sans dilueur.

I-4-1- 1- Caractéristiques de dilueur :

Le dilueur, utilisé pour la réfrigération de la semence, doit posséder certaines propriétés

- isotonicité par rapport à la semence, pour lutter contre les chocs osmotiques,
- pouvoir tampon, pour maintenir un pH proche de la neutralité,
- pouvoir de protection et de stabilisation membranaire, pour protéger les membranes plasmiques des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et mécaniques,
- pouvoir nutritif, pour fournir l'énergie nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes,
- pouvoir anti-oxydant, pour lutter contre l'action néfaste des radicaux libres, et
- pouvoir bactéricide. (21), (37), (38), (39)

I-4-1- 2- Compositions de dilueur :

Un exemple de dilueur fréquemment employé pour la réfrigération de la semence canine est présenté dans le tableau 03,

Tableau03 : Composition d'un dilueur de réfrigération (d'après LINDE-FORSBERG, 2001)
(40)

TRIS	3,025 g
Acide citrique	1,7 g
Fructose	1,25 g
Jaune d'œuf	20 ml
Benzyl-pénicilline	1 mg/ml
Dihydrostreptomycine	1 mg/ml
Eau distillée	Jusqu'à 80 ml

- L'ajout de sucres (glucose ou fructose) au dilueur permet de maintenir une mobilité supérieure à 70 % jusqu'à 8 jours de conservation à 5°C. (41)

- Le métabolisme des spermatozoïdes entraîne une augmentation de la production d'ions hydrogène à l'origine d'une acidification du milieu. En l'absence de substance tampon, cette diminution du pH peut entraîner une diminution de la fertilité et de la longévité des spermatozoïdes. (35)

- Des antibiotiques sont généralement ajoutés au dilueur afin d'éviter la multiplication bactérienne et la dispersion d'infections. Ceci est très important lors de l'utilisation de jaune d'œuf qui peut être contaminé et qui favorise la croissance bactérienne. Les substances antibactériennes les plus communément employées sont la benzyl-pénicilline et la dihydrostreptomycine. (2)

I-4-1- 2- 1- le jaune d'œuf :

Le jaune d'œuf est ajouté aux diluants utilisés pour conserver les spermatozoïdes de chien (42)

Le jaune d'œuf est composé d'eau, de lipides, de protéines, de glucides, de minéraux et de vitamines (43)

Permet de maintenir la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes canine au cours de leur réfrigération. (44)

Le jaune d'œuf contient des phospholipides tels que la lécithine protégeant les membranes des spermatozoïdes. Il protège les spermatozoïdes contre le choc thermique en restaurant les phospholipides membranaires altérés. (35)(45)

D'après Vallon (46), ses composés protégeraient la tête du spermatozoïde en le recouvrant d'une mince pellicule protectrice.

Ainsi, des LDL isolés à partir du jaune d'œuf protègent aussi efficacement les spermatozoïdes que le jaune d'œuf entier lors du refroidissement et de la congélation (47).

I-4-1- 2- 2- le plasma de jaune d'œuf :

Le plasma du jaune d'œuf qui est constitué d'eau, contient aussi d'autres particules appelées granules. (48)

Le jaune d'œuf contient aussi des protéines solubles dans son plasma, (48)

Le plasma du jaune d'œuf contient aussi des minéraux (48)

I-4-2- Réfrigération :

La réfrigération permet de conserver le pouvoir fécondant du sperme de chien pendant quatre jours à 4 °C, alors que le sperme frais doit être utilisé extemporanément. (50), (32).

La longévité des spermatozoïdes est significativement plus importante à 4°C qu'à 22°C ou à 37°C (31), (23).

En effet, conserver la semence à 4°C permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et donc de prolonger leur longévité. De plus, la croissance bactérienne est plus importante à 22°C ou à 37°C qu'à 4°C.

Pour ces différentes raisons, la semence est, en général, réfrigérée et conservée à 4°C. (2).

I-5- Effets de la réfrigération sur les Spermatozoïdes :

Le refroidissement des spermatozoïdes à une température inférieure à 15 °C cause un choc thermique qui est nommé choc dû au froid (« cold shock »). Le choc dû au froid affecte principalement les membranes plasmiques, acrosomique et mitochondriale des spermatozoïdes (51), (52), (53)

La fluidité des membranes est modifiée pendant le changement de température. Les membranes des spermatozoïdes passent d'une phase plus fluide (liquide-cristalline) à une phase plus rigide (gel) lors du refroidissement, ce qui les rend plus cassables. Le changement de phase qu'engendre le refroidissement rend les membranes moins fonctionnelles (revu dans (54)

La mobilité des spermatozoïdes après réfrigération est réduite (55). Dans leur étude, la mobilité initiale de 81,7 % passe à 60 % après 24 heures de réfrigération et à 30 % et 40 % après 48 heures en fonction du dilueur utilisé.

La mobilité des spermatozoïdes n'est pas significativement affectée par une conservation à 4°C durant les 10 premiers jours et qu'elle commence à diminuer à partir du 11ème jour pour être nulle au bout de 16 ou 17 jours. (39)

En ce qui concerne la longévité des spermatozoïdes réfrigérés, elle est variable d'une étude à l'autre : 10 jours (56), 16 jours (39), 17 jours (42), 23 jours (57).

Ces différences peuvent s'expliquer par de nombreux paramètres : la qualité de la semence fraîche, la composition du dilueur utilisé, les protocoles de réfrigération et de conservation employés (vitesse de refroidissement, centrifugation, taux de dilution).

I-6- Amélioration de l'efficacité des diluants protecteurs :

Depuis la découverte du jaune d'œuf, du lait et du glycérol comme agents protecteurs, plusieurs tentatives ont été faites dans le but d'améliorer l'efficacité des diluants utilisés pour la cryopréservation. Cependant, ces tentatives ont été peu fructueuses et résultent seulement en une faible amélioration du pourcentage de spermatozoïdes motiles obtenus après congélation (58), (59)

L'efficacité du jaune d'œuf est attribuée à la présence de LDL (low density lipoproteins) qui adhèrent à la membrane du spermatozoïde et forment un film représentant une interface entre les acides gras et l'eau. Les LDL privilégient ainsi l'entrée de phospholipides et de cholestérol dans la membrane cellulaire ce qui protège le spermatozoïde du choc induit par le froid. (60)

Les LDL peuvent remplacer le jaune d'œuf dans la composition du dilueur Tris-glucose pour la congélation de la semence car elles sont à l'origine d'une amélioration de la mobilité et de l'intégrité membranaire. (61)

Cependant, il est difficile de trouver des substances de remplacement au jaune d'œuf car le mécanisme par lequel il protège les spermatozoïdes est encore inconnu. (62)

Chez le cheval, des essais utilisant le plasma de jaune d'œuf qui contient les LDL ont montré de bons résultats en termes de fertilité (59).

I-6-1- lyophilisation:

Parmi les méthodes de séchage modernes, la lyophilisation est un procédé de déshydratation à température suffisamment basse qui offre des produits déshydratés de haute qualité (63)

La lyophilisation est une opération en trois étapes. Dans la première, le produit doit être congelé afin que l'eau qui y est présente soit transformée en glace.

Deuxièmement, il y a une diminution marquée de la pression ambiante (vide) et ensuite la glace se retire du produit par sublimation. Pour que la sublimation se produise, il faut que l'atmosphère environnante de l'échantillon conserve une pression de vapeur d'eau inférieure à la pression de vapeur saturante du produit congelé.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographiques

Finalement, l'eau fortement liée à la matrice solide est enlevée par un procédé appelé désorption. (64)

Quelques avantages de la lyophilisation sont la protection contre la contamination ou l'infestation pendant l'entreposage, (65)

Les conditions de distribution, (66) et d'entreposage faciles ne requérant pas de très basses températures, (67), l'obtention de formules très sèches avec une humidité résiduelle inférieure à 1%, (68)

L'état déshydraté est responsable de la stabilité, (69)

Le produit lyophilisé peut être reconstitué d'une façon très rapide et complète, (70)

Nous rappelons que les objectifs sont :

- Lyophilisation du plasma de jaune d'œuf.
- Comparaison des dilueurs à base de jaune d'œuf et à base de plasma de jaune d'œuf liquide et lyophilisé.
- Optimisation de la concentration du plasma de jaune d'œuf liquide et lyophilisé.

Nous précisons que :

Les produits chimiques, les réactifs et les colorants utilisés dans notre travail sont mis à notre disposition à titre gracieux par le **Centre Nationale d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG)** de Baba Ali. Cette collaboration s'insère dans le cadre d'une convention entre le CNIAAG et le Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (LBRA) de l'Université de Blida1.

Les équipements de recherche et le matériel de laboratoire utilisés dans ce travail appartiennent au **Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A)** de l'Université de BLIDA1.

II-1- Etude de la mobilité spermatique :

❖ Population étudiée:

Notre travail a été effectué sur (6) chiens mâles de un an et demi à deux ans, les chiens sont en bonne santé apparente et ont été utilisés dans cette expérimentation Ils sont de six races différentes : un Berger Allemand, un Rottweiler, un Dogue Argentin, un Braque Français, un Staff Américain, et un Race croisé (Taros + chien errant).

Les chiens sont soumis à un spermogramme et autres tests dont le contenu est illustré dans la fiche de renseignements

Tableau 04 : L'âge et la race des animaux

Animale	Race	Age (ans)
ESKO	Berger Allemand	2
WILLIS	Rottweiler	2
ENZO	Dogue Argentin	2
ROKI	Braque Français	1.5
BOB	Staff Américain	1.6
BINO	Race croisé (Taros + chien errant)	2

❖ **Echantillon:**

Toutes nos manipulations ont été faites sur de sperme canin.

Les échantillons ont été récoltés par stimulation digitale effectuée par le même opérateur et en récupérant les 3 fractions distinctes de l'éjaculat en présence d'une chienne en chaleur. Seulement la fraction riche en spermatozoïdes a été analysée (13).

Animaux : Nous avons prélevé (12) éjaculats à partir de (06) chiens différents récoltés à 72 h d'intervalle minimal (8) exploitables, 4 non exploitables (concentration faible)

II-1-1-Récolte de la semence:

D'une main, le vétérinaire doit masser fermement et rapidement la base du pénis et, de l'autre, remonter le fourreau en arrière des bulbes érectiles tout en coiffant le cône sur la verge durcie dès le début du prélèvement.

Cette récolte a lieu le matin, sur le sol, dans la salle d'examen du LBRA, avec un minimum de personnes présentes.

Des cônes en plastique souple reliés à des tubes gradués et des gants pour le manipulateur sont utilisés pour le prélèvement.

Le chien doit être tenu en laisse et maintenu suffisamment par son propriétaire pour assurer la sécurité du vétérinaire, mais pas trop non plus afin de ne pas interférer avec sa libido.

-Mode opératoire :

Que l'animal vienne en consultation en vue de la préparation d'une semence réfrigérée ou pour un spermogramme, il convient de vérifier son identification. Les cônes et leurs tubes montés sont mis à l'étuve à 37 °C au moins un quart d'heure avant le prélèvement. Le matériel doit être prêt avant l'entrée de l'animal en salle de prélèvement car la récolte est parfois très rapide.

Une striction entre le pouce et l'index en arrière des bulbes érectiles est mise en place.

Quand le chien est suffisamment en érection, le fourreau reste naturellement en arrière des bulbes érectiles.

Il convient de comprimer rythmiquement mais avec douceur la zone en arrière des bulbes érectiles afin de mimer les contractions rythmiques du vagin de la chienne. L'autre main maintient le cône coiffé sur le pénis.

(Figure 6)



Figure 6 : Récolte de la semence canine par masturbation. (Photo Personnel)

La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière-train de la femelle.

Et à la fin de la récolte on obtient l'éjaculat qui composé de trois fractions sont la phase préspermatique, la phase spermatique (Figure7), la phase prostatique.



Figure 7 : La deuxième phase de l'éjaculat (la phase spermatique), (Photo Personnel)

Le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin. Les cônes doivent être abondamment rincés avec de l'eau distillée car les détergents sont pour la plupart spermicides. Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes (11).

On met l'éjaculat immédiatement dans le bain-marie à 37° (Figure 8)



Figure 8 : Mettre les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie, (Photo Personnel)

II-1-2- Evaluation de la semence :

Nous avons examiné la semence de chaque animal avant de l'utiliser.

La mobilité massale a été évaluée par microscopie et notée entre 0 et 5 sur l'échelle de MILOVANOV (71) et la concentration en spermatozoïdes numérée par hématimètre. Seulement les éjaculats avec une mobilité massale de 4 et plus et une concentration minimale de 200×10^6 spermatozoïdes par ml ont été réfrigérés.

- **Mobilité :**

La mobilité des spermatozoïdes est évaluée en plaçant une goutte de semence préalablement homogénéisée sur une lame préchauffée et recouverte ensuite d'une lamelle. La lame est lue au microscope à contraste de phase aux grossissements 10 et 40. Elle est évaluée immédiatement après la récolte. La mobilité est estimée subjectivement en distinguant les spermatozoïdes mobiles fléchant et non fléchant et les spermatozoïdes immobiles.

Il s'effectue en deux temps : (Figure 9)

Observation de la mobilité de masse : une goutte de sperme est observée au grossissement 10 ou 40 afin d'apprécier les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes (vague).

Observation de la mobilité individuelle : une goutte de sperme est observée entre lame et lamelle, de le diluer par liquide prostatique (1 ; 9) pour pouvoir individualiser les spermatozoïdes



Figure 9 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation, (Photo Personnel)

- **Numération :**

La numération des spermatozoïdes de l'éjaculat est effectuée à l'aide d'une cellule hématimétrique de Thoma.

Pour ce faire, nous avons dilué 5 μ L du mélange des deux premières phases avec 995 μ L d'une solution de NaCl à 3 % afin d'obtenir une dilution au 1/100ème. Nous avons déposé une goutte de cette semence diluée sur la cellule de Thoma et nous avons compté le nombre de spermatozoïdes présents dans les 4 carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. Nous avons ensuite extrapolé ce nombre à l'éjaculat selon la formule suivante :

Nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (en millions) = Nombre de spermatozoïdes dénombrés x 1/100 x 50.000 x volume (en mL) des deux premières phases.

Seuls sont gardés pour l'expérimentation la semence de bonne qualité c'est-à-dire avec :

- Mobilité > 70%

- concentration en spermatozoïdes >200. 10⁶ SPZ/mL (Tableau 5)

Tableau 5 : Spermogramme des éjaculats

Ejaculat	Volume (ml)	Mobilité massale (X/5)	Mobilité individuel (%)	Concentration (x10 ⁶)
EJ 01	2	5/5	70%	785
EJ 02	2	5/5	80%	475
EJ03	1,5	4/5	70%	750
EJ04	2	4/5	80%	530

EJ 05	1,5	4/5	80%	150 (non exploitable)
EJ06	2	5/5	70%	763
EJ07	1,8	5/5	70%	310
EJ08	0,8	4/5	70%	960
EJ09	1,8	5/5	70%	520
EJ10	2	5/5	80%	130
EJ11	1,7	4/5	70%	503
EJ12	1,7	5/5	80%	504

II-2-3- préparation de dilueur Tris base de la réfrigération :

Après avoir contrôlé la qualité de la semence par un spermogramme, la dilution doit être immédiate.

-Principe :

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes.

Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser (75), (76)

-Mode opératoire:

On effectue 7 sept tubes de dilueur à travers d'un dilueur de Tris base (Tableau n°6)

Tableau n° 6 : Composition de milieu de base

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Tris-Base(g)	3.026	3.026	3.026	3.026	3.026	3.026	3.026
Acide citrique(g)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Fructose(g)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Streptomycine(g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Baytril 10% (ml)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
QSP(eau) (ml)	80	60	40	80	60	40	80
Jaune d'œuf (JO)	/	/	/	/	/	/	20%
PJO liquide %	20	40	60	/	/	/	/
PJO lyophilisé %	/	/	/	20	40	60	/

On commence par la mesure des quantités précisées de produit pour la dilution selon le Tableau au-dessus (Figure 10, 11)

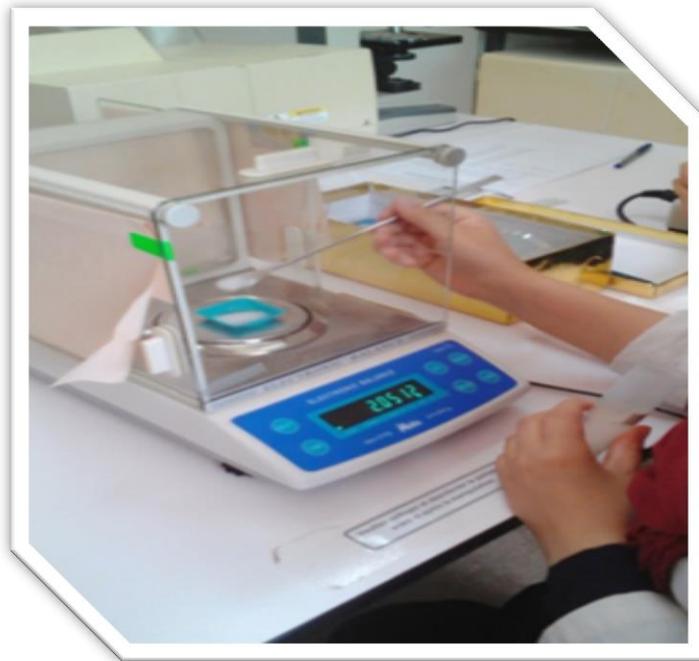


Figure 10 : La peser des produits par la balance analytique, (Photo Personnel)



Figure 11 : Les compositions de dilueur pour la réfrigération, (Photo Personnel)

Ce dilueur est préparé à l'avance sans jaune d'œuf, et nous avons le préparé le jour de leur utilisation.

On met 50 mL d'eau distillé dans un flacon sec et stérile contient un aimon, on ajoute les compositions de dilueur avec homogénéisation par l'agitateur magnétique, et afin de préparé 100 ml on rajoute l'eau distillé. Une fois préparés, le dilueur est filtré aussi mesuré de PH et d'Osmolarité. (Figure 12, 14, 15)



Figure 12 : Filtrage de dilueur par le papier filtre, (Photo Personnel)

Il est conditionné en échantillon de 100 mL dans flacon stérile et conservé à 4°

Ensuite de la peser des produits on met la quantité insuffisante de l'eau distillé pour passer à l'homogénéisation (figure 13)

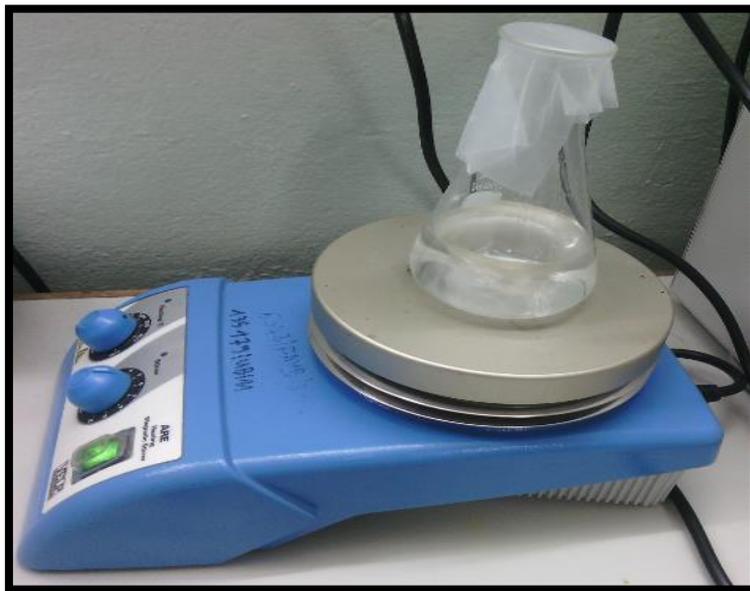
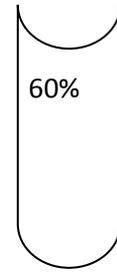
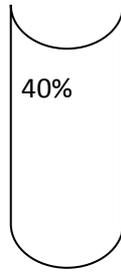


Figure 13 : Homogénéisation de composition de dilueur, (Photo Personnel)

Préparation de 3 dilieurs (100 ml)

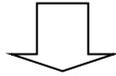
Dans un premier temps nous avons dilué le PJO en trois concentrations 20%, 40% et 60%. Ces dilutions ont été faites par le tampon tris comme montré ci-dessous.



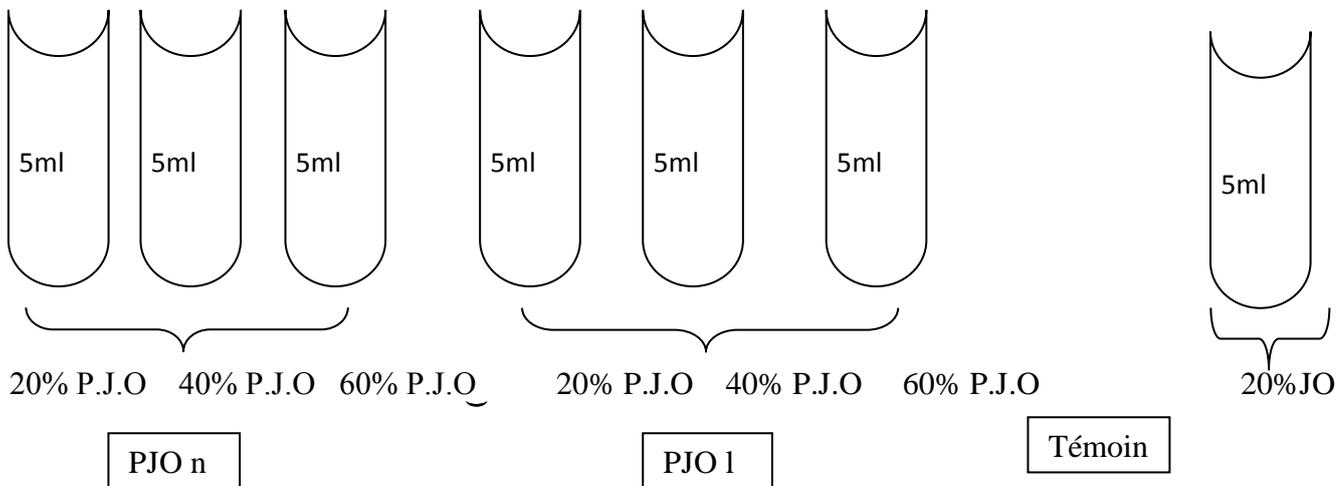
80 Tris base +20% PJO

Tris base 60 + 40% PJO

Tris base 40 L'eau distillée+ 60% PJO



Préparation de trois lot de PJO, un natif avec les trois dilutions, un lyophilisé correspondant aux trois dilutions et un lot témoin 20% de jaune d'œuf.



Les calculs permettant de mesurer la quantité en poudre équivalente aux trois concentrations sont présentés ci-dessous à droite. Notons que la quantité 16.3ml est celle choisi arbitrairement pour la lyophilisation.

100ml → 20% P.J.O n

5 ml → 1ml

100ml → 40% P.J.O n

5ml → 2ml

100ml → 60% P.J.O n

5ml → 3ml

16.3ml → 2.1713 g

1ml → 0.1332g

16.3ml → 2.1713g

2 ml → 0.26641g

16.3ml → 2.1713g

3 ml → 0.39962g

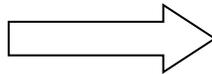




Figure 14 : la mesure de PH de dilueur, (Photo Personnel)



Figure 15 : La meure de l'osmolarité de dilueur, (Photo Personnel)

II-2-4- Extraction des LDL à partir du jaune d'œuf de poule :

L'extraction des LDL a été effectuée suivant la technique décrite par (78).

-Mode opératoire:

La préparation du jaune d'œuf est un peu délicate et fastidieuse ; en effet, il faut rouler le jaune sur un papier absorbant de manière à ôter les résidus de blanc. Puis la membrane entourant le jaune est percée afin de récolter le jaune. (Figure 16)



Figure 16 : Récolte de jaune d'œuf, (Photo Personnel)

Le dilueur à base de 6% LDL a servi de milieu de référence dont l'efficacité a été démontrée auparavant (79).

Pour la préparation de plasma de jaune d'œuf liquide, on ajoute l'eau distillé à la quantité de jaune d'œuf récolté qui doit être la même, après on les homogénéisés pendant une heure à 4°C (Figure 17)

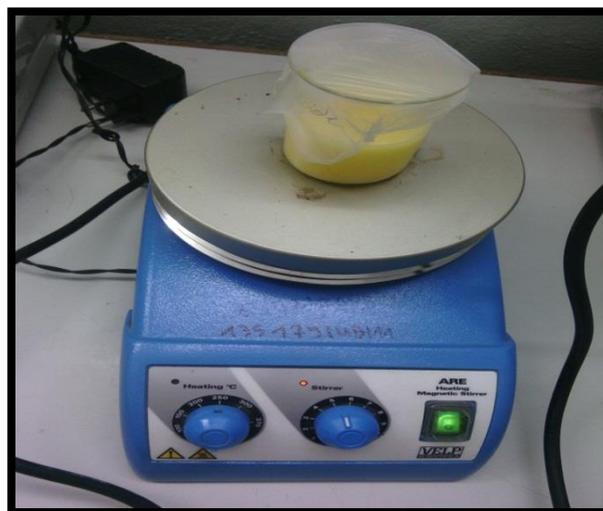


Figure 17 : Homogénéisation de jaune d'œuf, (Photo Personnel)

On récupère le produit et on le distribue dans des cônes Eppendorf pour la centrifugation pendant 45minute avec une vitesse de 9000 tour et en deux cycles. (Figure 18, 19)

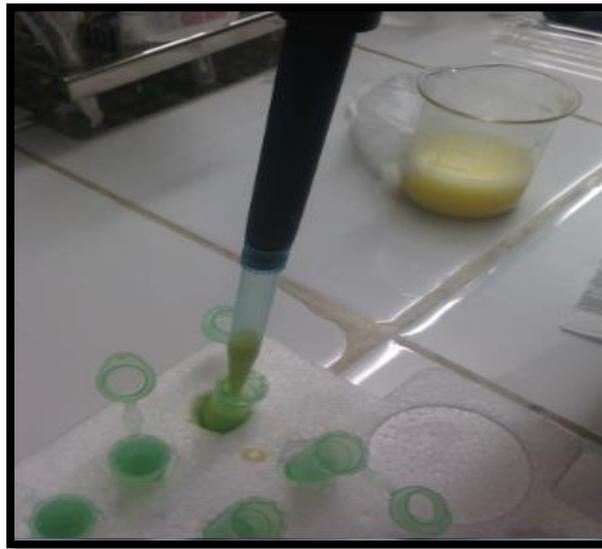


Figure 18: Distribution de produit finale dans les Eppendorf, (Photo Personnel)

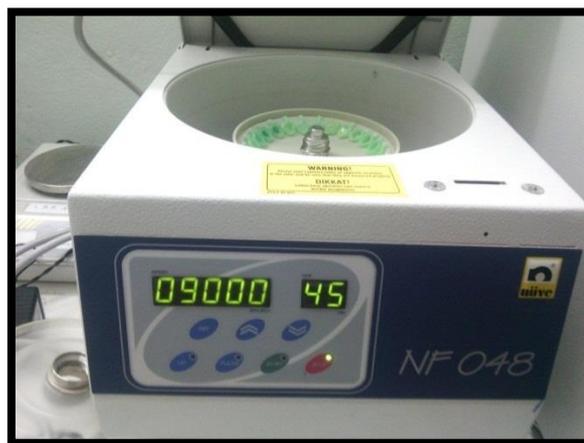


Figure 19 : Mettre les Eppendorf dans la centrifugeuse, (Photo Personnel)

Après les deux cycles de la centrifugation on récupère le plasma de jaune d'œuf et on rejeter le kilot(Figure20)



Figure 20: Le kilot dans un épindorff, (Photo Personnel)

A l'aide d'un filtre seringue on filtre le plasma jaune d'œuf afin d'éliminer les cultures microbiennes (Figure 21, 22)



Figure 21: Filtration de plasma jaune d'œuf, (Photo Personnel)

On conserve le plasma de jaune d'œuf liquide à 4° C dans un flacon stérile et fermé. (Figure 23)



Figure 22: Produit final de plasma jaune d'œuf, (Photo Personnel)

D'après les calculs qui ont été faits pour les concentrations de plasma de jaune d'œuf liquide dans les 3 tubes de la dilution de Tris base on réalise les 3 tubes finale (Tris base+PJO N). (Figure 24)



Figure 23 : Tubes du plasma de jaune d’œuf de différentes concentrations 20%, 40%, 60%,(Photo Personnel)

II-2-5- lyophilisation de plasma jaune d’œuf :

On prépare le plasma de jaune d’œuf le jour même de la lyophilisation.

La lyophilisation a été réalisée au niveau du centre d’analyse physico-chimique à BOUASMAIL. (Figure 25)



Figure 24: Centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques CRAPC, (Photo Personnel)

-Mode opératoire

La solution de plasma de jaune d'œuf préparée est alliquotée en volume de 16.3 mL pour chaque flacon de 50 ml ($V_{pjo} = 1/3$ environ) puis immédiatement acheminée au laboratoire sous 4°C (glacière) pour lyophilisation au niveau de centre de la recherche scientifique et technique en analyses physico-chimique (CRAPC) pour la procédure de la lyophilisation



Figure 25: Sac de congélation (glacière), (Photo Personnel)

La lyophilisation passe dans un cycle de durée totale : 48 H et qui comprend trois phases principales :

Congélation : On met le produit final de plasma de jaune d'œuf à -21 c°, pendant 30 minutes. (Figure27)

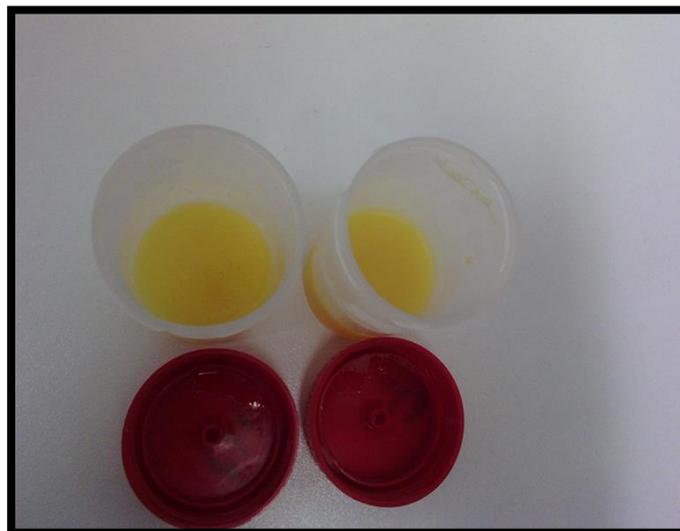


Figure 26: Plasma de jaune d'œuf congelé, (Photo Personnel)

On récupère les flacons de plasma de jaune d'œuf congelé, puis on les couvre par un papier alimentaire qui est doit être poreux pour l'élimination d'eau. (Figure 28)

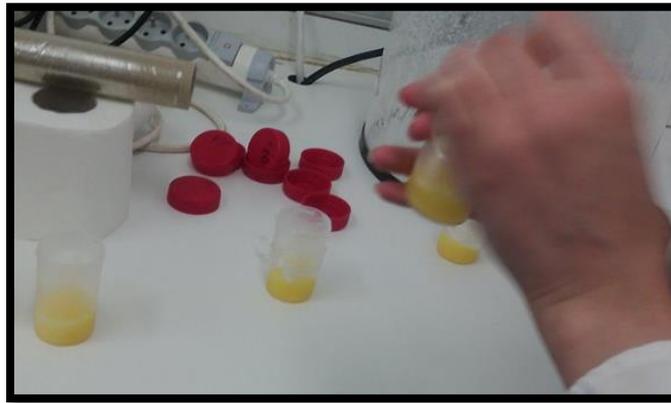


Figure 27: Mettre des pores sur le papier couvrant, (Photo Personnel)

Lyophilisation primaire : 43h 20 min

Doit se dérouler sans décongeler le produit avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace (conditionnée par la température). Plus cette température sera basse et plus le vide devra être bas.

Sur le plateau de l'appareil lyophilisa on installe les flacons congelé de plasma jaune d'œuf (Figure 29), et on lance le programme qui est doit être adaptatif avec notre produit. (Figure 30)

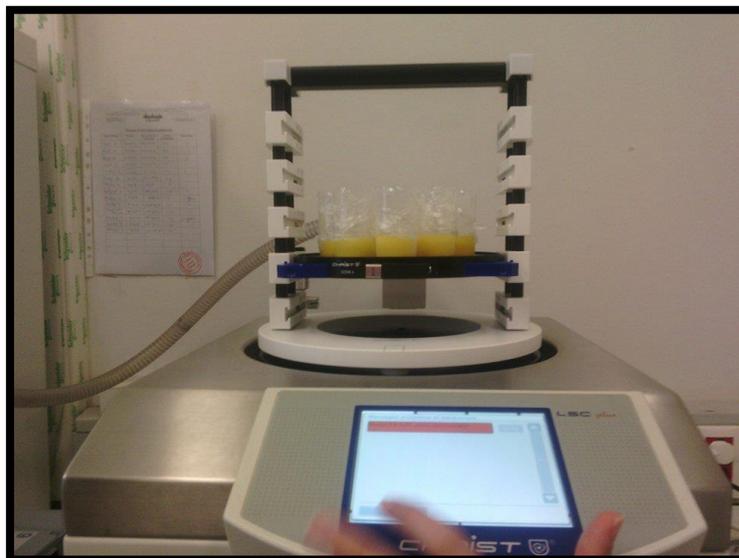


Figure 28: Mettre le plasma de jaune d'œuf congelé sur la lyophilisat, (Photo Personnel)



Figure 29: Programme pour la lyophilisation, (Photo Personnel)

Lyophilisation secondaire : 4h 10 min

Destiné à éliminer les dernières traces d'eau retenues par absorption ou pour assurer une quantité d'eau résiduelle la plus faible possible. (Figure 31)

La chauffe ne doit pas conduire à la destruction partielle ou totale par dénaturation du produit.

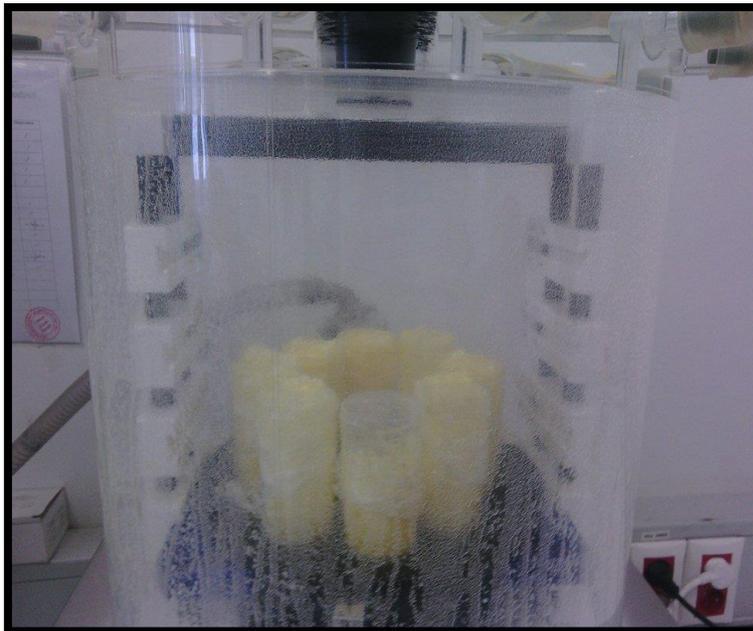


Figure 30: Elimination d'eau, (Photo Personnel)

A la fin de la procédure de lyophilisation on obtient un produit de plasma de jaune d'œuf déshydraté, lyophilisé. (Figure 32)



Figure 31: Plasma de jaune d'œuf lyophilisé, (Photo Personnel)

Ce lyophilisat a été reconstitué avec le dilueur de base pour avoir les différentes concentrations (20%, 40%, 60%) d'un dilueur prêt à l'emploi.

II-2-6- Préparation des dilueurs finaux pour la réfrigération de la semence canine:

Sept cryotubes ont été placés dans un bain marie à + 37°C et remplis d'un volume initial (100 µL) de chaque dilueur étudié. La fraction riche de spermatozoïdes de chaque éjaculat a été divisée en 7 aliquotes de même volume et ajoutés au cryotubes. En fonction de la concentration des spermatozoïdes dans l'échantillon, le volume de chaque dilueur a été ajusté pour obtenir une concentration finale de 100×10^6 spz/ml dans chaque tube.

Après la récolte ;

La phase spermatique est divisée en sept échantillons dans sept tubes gradués identifiés :

La concentration de spermatozoïdes dans ce mélange est calculée puis portée à la concentration voulue par ajout de dilueur.

On calcule la concentration de spermatozoïdes avec la formule introduisant la concentration et le volume initiaux et ceux finaux $c_i \cdot v_i = c_f \cdot v_f$

Dilution :

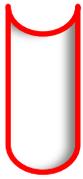
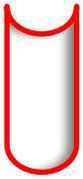
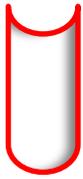
$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$V_2 = C_1 \times V_1 / C_2$$

$$V_f = V_2 - V_1$$

$$V_f - 100\mu\text{L}$$

Une étape de réfrigération s'en suit à 4°C sur 3 points temporels 48h, 96h et 144h. A ces points d'analyse s'ajoute celui sans réfrigération. On les a noté T0, T48, T96 et T144

						
DILUEUR de Base+ 20% P,J,O Liquide +sperme	DILUEUR de Base+ 40% PJOP Liquide +sperme	DILUEUR de Base+ 60% P,J,O Liquide +sperme	DILUEUR de Base+ 20% P,J,O Lyophilisé +sperme	DILUEUR de Base+ 20% P,J,O Lyophilisé +sperme	DILUEUR de Base+ 20% P,J,O Lyophilisé +sperme	DILUEUR de Base+ 20% J,O +sperme

Trois échantillons contenant le sperme avec le dilueur à base de plasma jaune d'œuf liquide à des concentrations 20%, 40%, 60%

Trois échantillons de sperme avec le dilueur à base de plasma jaune d'œuf lyophilisé à des concentrations 20%, 40%, 60%

Un échantillon de sperme avec le dilueur à base de plasma jaune d'œuf à des concentrations 20%, nous avons ajouté, aux 4 mL de dilueur, 1 mL de plasma jaune d'œuf préparé le jour-même.

Le sperme étant conservé dans du PJO à différentes concentrations puis réfrigéré pendant différentes durées.

L'ajout du dilueur, préalablement porté à 37°, à la phase spermatique du prélèvement, se fait lentement pour éviter le choc thermique des spermatozoïdes.

A chaque utilisation, nous avons fait le nécessaire pour que le dilueur ajouté à la semence et le matériel nécessaire à la dilution soient à la même température que la semence, c'est-à-dire à température ambiante pour la première étape de dilution et à 4°C pour la seconde étape de dilution, afin de limiter les chocs thermiques.

II-2-7- Evaluation de la qualité de sperme canin réfrigéré :

Il sera à présent analysé par CASA, par test HOS_t (intégrité membranaire) et coloration eosine-négrosine (vitalité)

II-2-7-1- Analyse de mobilité assistée par ordinateur (système SCA®).



Figure 32: Etude de la mobilité par le système SCA® (Photo Personnel)

Les caractéristiques de mouvement ont été analysées sur semence diluée (20 μ l de sperme réfrigéré + 60 μ l de liquide prostatique) à T0 + 10min après réanimation en utilisant un analyseur d'image SCA® (Micoptics) (Figure 32) et à l'aide d'une chambre d'analyse d'une profondeur de 20 μ m (Leja Products B.V., Nieuw Venne, The Netherlands). Cette analyse a été réalisée selon les paramètres techniques mentionnés auparavant (79).

Les paramètres suivants ont été mesurés : La mobilité totale i.e. Pourcentage des spz mobiles (**MOT** %), mobilité progressive i.e le pourcentage des spz progressifs (**PMOT** %), La vitesse curvi-linéaire ou vitesse de déplacement "Curvilinear Velocity" (**VCL**: μ m/second), La vitesse linéaire "Straight Line Velocity" (**VSL**: μ m/second), la vitesse moyenne "Average Path Velocity" (**VAP**: μ m/second) et l'amplitude latérale des mouvements de la tête du spermatozoïde "Amplitude of Lateral Head Displacement" (**ALH**: μ m).

II-2-8- Analyse statistique :

Un modèle linéaire à effets mixtes (lme) a été utilisé pour analyser les effets du temps (stade d'évaluation) et des dilueurs sur chaque paramètre de mobilité à part. Ce test est conçu comme un modèle à deux niveaux hiérarchiques. La mobilité individuelle (effet chien) est modélisée dans le premier niveau alors que les paramètres de population sont modélisés dans le second. Les interactions du temps et des dilueurs sur la mobilité ont été intégrées dans ce modèle avec le terme « Time*Extender ». Les effets fixes sont utilisés comme une estimation ponctuelle du paramètre pour la population entière. L'arrière-plan théorique d'estimation fournit différents moyens pour calculer la p-value pour l'effet du temps ou du dilueur sur la mobilité. La significativité statistique est mise à $P < 0.05$ et les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM (erreur standard de la moyenne).

Vitalité :

La technique de coloration est la suivante : une goutte de semence est prélevée à l'aide d'une micropipette, dans l'échantillon de sperme maintenu à 37°C à l'aide d'un bain d'eau chaude. Cette goutte est mélangée à une goutte de colorant, et le nouvel échantillon est laissé 5 minutes à 37°C. (72, 73, 74)

Une goutte de 20 µl de semence est mélangée pendant 30 secondes avec 20 µl de colorant éosine-nigrosine sur une lame. Un frottis est réalisé à partir de ce mélange puis séché à l'air. (Figure 34)

Cent spermatozoïdes sont dénombrés en différenciant les morts (colorés en rose) des vivants (non colorés).



Figure 33: Frottis pour le test de la vitalité, (Photo Personnel)

II- 2- Etude de l'intégrité membranaire :

Test hypo-osmotique :

Le test hypo-osmotique a été réalisé en accord avec la technique décrite par (27).

Le principe de ce test consiste à incuber un échantillon de semence dans une solution Hypo-Osmotique à 37°C pendant 45 mn afin d'identifier sous microscope les spermatozoïdes vivants qui réagissent à la solution hypo-osmotique par un gonflement et un enroulement de leurs flagelles contrairement aux spermatozoïdes endommagés qui demeurent non réactifs. Cent spermatozoïdes sont comptés en différenciant ceux dont la membrane plasmique est intacte (réactifs) de ceux dont la membrane plasmique est lésée (non réactifs).

Pour la préparation de la solution hypo-osmotique, nous avons utilisé un soluté de perfusion salé isotonique stérile (NaCl à 0.9%) avec une osmolarité contrôlée de 312mOsmol. Des dilutions à l'eau distillée stérile ont été effectuées (Tableau 7)

Tableau n° 7: Composition de la solution Hypo-Osmotique (100 mOsmol)

Produits	Volume (mL)
Eau Distillé	150
Na Cl 9%	50

Un volume de 40 μl de solution hypo-osmotique (100 mOsmol) a été mis dans un tube épendorff maintenu en bain marie à 37°C puis 10 μl de sperme ont été ajoutés à chaque tube.

Les tubes (mélange sperme solution hypo-osmotique) ont été mis à incuber pendant 45 min, dans une étuve de paille (Nüve, ...) à 37°C.

Les lames porte-objet ont été pré identifiées (nom du chien, n° d'éjaculat) et conservées à l'étuve à 37°C jusqu'à la préparation du frottis.



Figure 34: Frottis de test HOSSt, (Photo Personnel)

A l'issue de temps d'incubation (45 min), des frottis sur lame ont été confectionnés à partir de chaque tube. Ainsi nous avons préparé 7 lames de frottis-HOSSt pour chaque éjaculat totalisant

Les lames sont lues au microscope optique au grossissement $\times 400$. Cent spermatozoïdes sont observés et les spermatozoïdes ayant réagi positivement au test hypo-osmotique sont comptabilisés.

III - Résultats

III - 1- Paramètres de mobilité spermatique :

Les pourcentages en spermatozoïdes mobiles (MOT) après réfrigération (40% PJO liquide et 40% PJO lyophilisé) ont été similaires à ceux du dilueur de référence (6%LDL) alors que toutes les autres concentrations testées (20, 60%) étaient significativement plus faibles (Figure 35 et 36 ; Tableau 8).

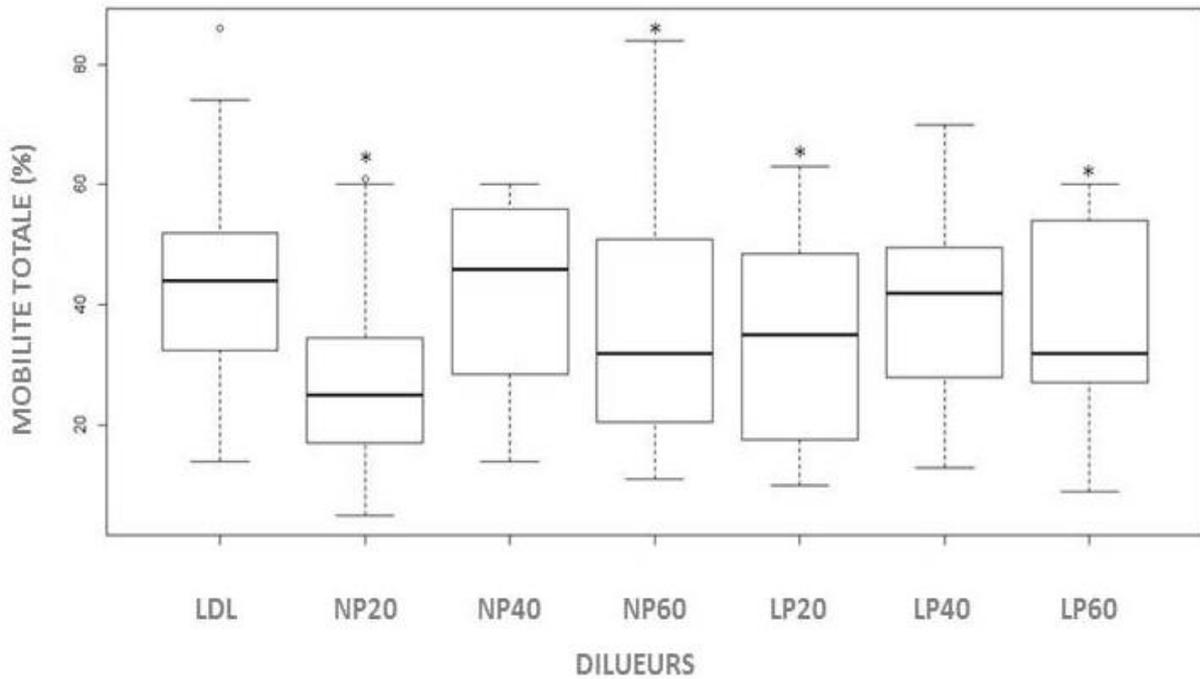


Figure 35 : Effets des dilueurs sur la la mobilité totale (MOT) mesurée par l'analyseur de semence SCA® Microoptics 10min après réanimation de la semence canine réfrigérée avec des dilueurs à base de 20% de JO équivalent à 6% lipoprotéines de faible densité (LDL pour low density lipoprotein), et trois concentrations (20, 40, 60%) de plasma de jaune d'œuf liquide (NP) et lyophilisé (LP).

SCA : Sperm Class Analyzer ; L'asterix (*) signifie que c'est significativement plus faible que le milieu de référence (LDL i.e. JO) à $p < 0.05$ (n=12).

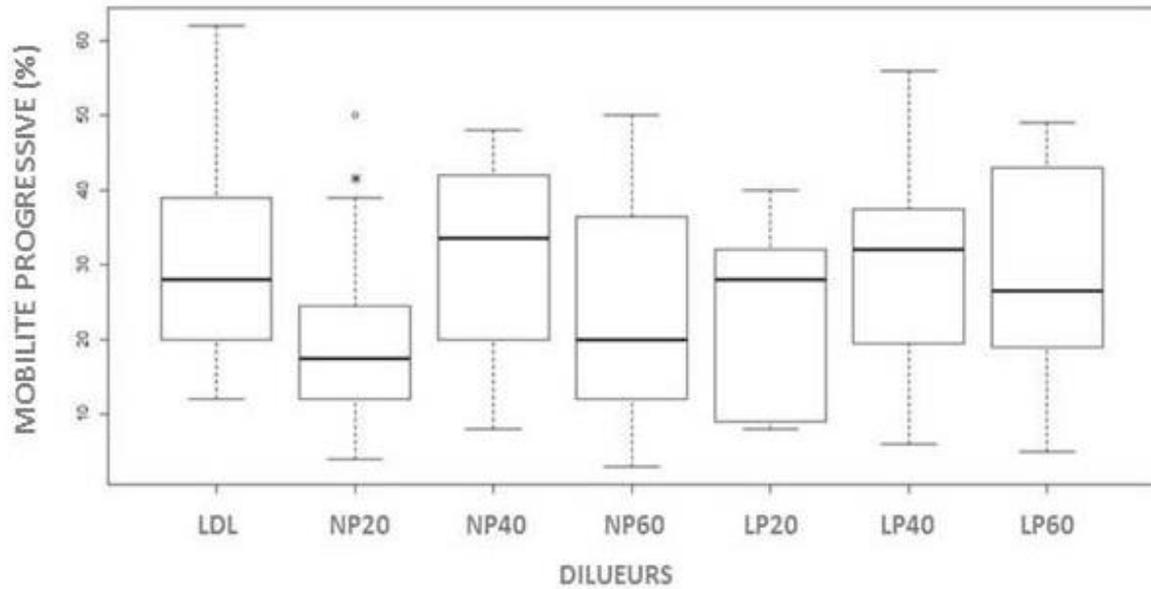


Figure 36 : Effets des dilueurs sur la mobilité progressive (PMOT) mesurée par l’analyseur de semence SCA® Microptics 10min après réanimation de la semence canine réfrigérée avec des dilueurs à base de 20% de jaune équivalente à 6% lipoprotéines de faible densité (LDL pour low density lipoprotein), et trois concentrations (20, 40, 60%) de plasma de jaune d’œuf liquide (NP) et lyophilisé (LP).

SCA : Sperm Class Analyzer ; L’asterix (*) signifie que c’est significativement plus faible que le milieu de référence (LDL i.e. JO) à $p < 0.05$ (n=12).

La mobilité progressive (PMOT) de toutes les concentrations testées était similaire à celle du milieu de référence, à l’exception du milieu 20% PJO liquide qui avait une PMOT plus faible que le dilueur de référence.

Pour l’ALH, les dilueurs à base de (20, 40 and 60%) PJO lyophilisé et 60% PJO liquide ont montré des valeurs significativement plus faibles que le milieu de référence ($0.001 < p < 0.01$) alors que les dilueurs à base de 20 et 40% de PJO liquide étaient similaires au milieu de référence.

Les paramètres VSL, STR et LIN considérés simultanément, les trois concentrations (20, 40, 60%) du PJO lyophilisé ont montré des valeurs significativement ($p < 0.001$) plus élevées que le milieu de référence alors que les concentrations du PJO liquide étaient similaires à ce milieu de référence (Tableau 8).

Tableau 8 : Moyennes (moy \pm SEM) des paramètres de vitesse (VAP, VCL, VSL) et de l'ALH mesurée par SCA 10min après réanimation de la semence canine réfrigérée avec des dilueurs à base de 20% de JO équivalent à 6% lipoprotéines de faible densité (LDL pour low density lipoprotein), et trois concentrations (20, 40, 60%) de plasma de jaune d'œuf liquide (NP) et lyophilisé (LP).

Dilueurs	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
JO (LDL)	101.2 \pm 4.11	88.3 \pm 4.46	156.4 \pm 4.94	6.9 \pm 0.19	27.8 \pm 0.64	84.2 \pm 1.37	57.1 \pm 2.29
NP20	95.2 \pm 4.39	82.7 \pm 4.51	149.8 \pm 5.39	6.7 \pm 0.14	28.7 \pm 0.77	83.6 \pm 1.44	54.5 \pm 2.10
NP40	98.6 \pm 3.56	87.2 \pm 3.63	151.3 \pm 3.82	6.5 \pm 0.15	27.9 \pm 0.71	85.3 \pm 1.13	57.3 \pm 1.70
NP60	88.2 \pm 3.90 ^{*-}	75.7 \pm 3.99	141.8 \pm 4.50 ^{*-}	6.6 \pm 0.21 ^{***-}	29.3 \pm 0.56 ^{*+}	82.3 \pm 1.19	54.1 \pm 2.05
LP20	106.2 \pm 4.47	95.4 \pm 4.56 ^{*+}	160.4 \pm 5.54	6.7 \pm 0.18 ^{*-}	27.5 \pm 0.76	87.2 \pm 1.04 ^{***+}	61.1 \pm 2.01 ^{***+}
LP40	100.9 \pm 3.96	90.6 \pm 4.18 ^{*+}	154.8 \pm 5.19	6.6 \pm 0.21 ^{**-}	29.2 \pm 0.65	86.9 \pm 1.23 ^{***+}	59.0 \pm 2.22 ^{***+}
LP60	104.1 \pm 3.07	93.8 \pm 3.25 ^{*+}	159.6 \pm 4.43	6.6 \pm 0.21 ^{**-}	29.1 \pm 0.59	87.3 \pm 0.90 ^{***+}	59.3 \pm 2.03 ^{***+}

VAP: Velocity average pathway; VSL: velocity straight line; VCL: velocity curvilinear; ALH: amplitude of lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; STR: straitness; LIN: linearity.

(^{*}-): significativement inférieur au milieu de référence (6%LDL) à 0.01<p<0.05; (^{*}+):significativement supérieur au milieu de référence (JO i.e. LDL) à 0.01<p<0.05; (^{**+})significativement supérieur au milieu de référence (20% JO i.e. 6%LDL) à 0.001<p<0.01; (^{**-}) significativement inférieur au milieu de référence (20% JO) à 0.001<p<0.01; (^{***+}): significativement supérieur au milieu de référence (6%LDL) à p<0.001; (^{***-}) significativement inférieur au milieu de référence (6%LDL) à p<0.001 (n=12).

En fin, la totalité des paramètres évalués simultanément, la concentration de 40% semble être la plus efficace pour le PJO liquide et lyophilisé dans la réfrigération de la semence canine.

III -2 : Paramètres d'intégrité membranaire spermatique

Les résultats du modèle LM ont montré que les dilués à base de 40% PJO liquide et 40 PJO lyophilisé ne diffèrent pas significativement ($p > 0.05$; figure 3) du dilueur de référence (6%LDL) pour la préservation de l'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique 50.03 ± 3.21 vs. 52.98 ± 4.31 vs. 49.62 ± 4.43 , l'intégrité structurale de la membrane 40.16 ± 2.06 vs. 33.5 ± 2.80 vs. 35.94 ± 3.43 , respectivement après réfrigération (Figure 37).

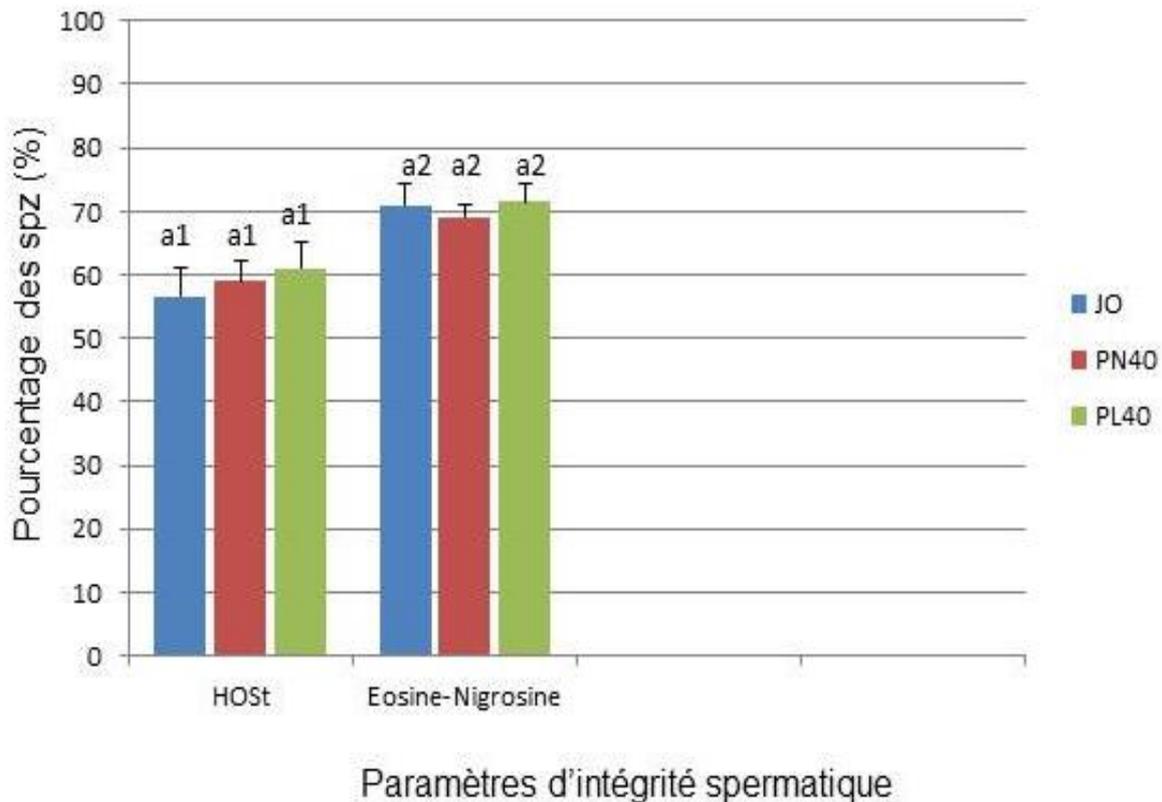


Figure 37 : Paramètres d'intégrité membranaires des spermatozoïdes canins évalués par le test hypo-osmotique (HOST) et la coloration vitale à l'Eosine-Nigrosine.

IV-Discussion

IV-1- Paramètres de mobilité spermatique :

Il est dans notre objectif de comparer le plasma de jaune d'œuf au jaune d'œuf entier ou directement à la fraction cryoprotectrice du JO à savoir les LDL (lipoprotéines de basse densité). On parlera donc des LDL (6%) comme équivalent du JO (20%) pour le milieu de référence ou témoin.

En effet, il serait plus intéressant de savoir si le PJO pourrait remplacer les LDL (i.e. JO), la fraction cryoprotectrice du JO (81)

L'extraction des LDL est un procédé analytique compliqué alors que le fractionnement est une méthode très simple et rapide permettant d'obtenir le plasma à partir du JO entier. Le fractionnement du jaune d'œuf a été évoqué pour la première fois par BURLEY et COOK (1961) puis décrit en détail par MCBEE et COTTRILL (1979). Différemment aux LDL, le PJO a été produit à une échelle industrielle sous le brevet Européen numéro 0 430 757 A1 (82)

Cependant, les LDL résultant de ce dernier procédé sont dans un état impure car toujours mélangées avec des glycoprotéines globulaires (i.e. α , β and γ -Livétines). Nous nous attendions à ce que cet état d'impureté allait se retentir négativement sur l'action cryoprotectrice, alors que le dilueur à base de 40% de PJO était aussi efficace que le milieu de référence (6%LDL). Ceci signifierait que les livétines n'ont aucun effet délétère sur la motilité après réfrigération. Il semble que la fraction du JO la plus nocive à éliminer est les granules contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL : pour High Density Lipoproteins), qui inhibent la respiration des spermatozoïdes (83).

Comme attendu, la concentration (v/v) de 40% de PJO était optimale et ne différait pas du milieu de référence (6%LDL). Le fractionnement du JO commence par une dilution 1:1 (v/v) dans une solution saline ce qui augmente le volume au double par rapport au volume initial du JO. Ceci signifie que la concentration 40% (v/v) de PJO est l'équivalent de 20% (v/v) de JO. Elle aussi équivalente à la concentration (w/v) de 6% LDL exprimée en matière sèche selon les tables de composition du JO rapportées par(84).

Ainsi, nous retrouverons la même quantité en LDL pures dans les dilueurs à base de 40% de PJO et 6% LDL, d'où le degré d'efficacité similaires entre ces dilueurs observé dans notre étude.

(85) n'avaient pas pour objectif d'optimiser la concentration du PJO, ils ont utilisé d'emblée le PJO à 20% dans la réfrigération de la semence canine et ont rapporté des résultats satisfaisants ce qui est en contraste avec nos observations.

(86) ont utilisé avec succès 2% de PJO pour remplacer le JO entier dans la réfrigération de la semence équine ce qui leur a permis de mettre au point un nouveau dilueur commercialisé sous le nom de (INRA-Freeze, IMV-Technologies, L'Aigle, France). Cependant, les résultats (concentration optimale) ne semblent pas être directement comparables entre cette étude et la notre car en plus de la différence des espèces, le dilueur utilisé par ces auteurs (INRA-Freeze) contient essentiellement les phosphocasinates natifs (fraction cryoprotectrice du lait). L'association de deux cryoprotecteurs pourrait justifier la faible concentration de PJO utilisée.

Dans la présente étude, la forte concentration en PJO (60%) a été clairement associée à une chute de la mobilité après réfrigération. Ceci pourrait être dû à l'effet délétère des concentrations élevées en LDL comme précédemment démontré par (78) pour les concentrations plus fortes que 10% des LDL dans la réfrigération de la semence bovine.

(80) ont démontré que la concentration de 10% en LDL. (Équivalente à 66%EYP et à 33%EY) était significativement moins efficace que le dilueur à base de 6% LDL.

Cette discordance entre la mobilité et les fortes concentrations en LDL (indirectement le PJO) serait due au phénomène d'agrégation des LDL comme montré par (81). Cette agrégation semble provoquer un dysfonctionnement des LDL et réduire ainsi leurs propriétés cryoprotectrices.

De plus, nous avons observé que toutes les concentrations testées (20, 40 et 60%) en PJO lyophilisé sont associées à un mode de mouvement des spermatozoïdes plus linéaire que dans le PJO liquide (valeurs de STR et LIN significativement plus élevées).

Il n'y a pas de données dans la littérature sur le plasma de jaune d'œuf lyophilisé auxquelles nous pouvions comparer nos résultats. Cependant, le JO en poudre a déjà été comparé au JO naturel dans la réfrigération de semence du bélier (86) et de la semence du buffle (87) et la mobilité après réanimation était meilleure pour le JO en poudre. De plus, ont comparé les LDL lyophilisées et natives dans la réfrigération de la semence canine et rapporté de meilleures valeurs de STR et LIN pour les LDL lyophilisées, même si ces dernières étaient inefficaces en

cryoprotection du sperme au regard des autres paramètres évalués. Ceci semble aller dans le même sens que la supériorité du plasma de jaune d'œuf lyophilisé observée dans notre étude pour les paramètres STR et LIN.

Aucune explication à cette observation n'a pu être développée, mais certaines étapes du procédé de lyophilisation auraient pu altérer des facteurs ayant probablement un effet délétère sur les paramètres STR et LIN a été avancé. D'autres études semblent nécessaires pour pouvoir confirmer ou infirmer cette hypothèse.

IV-2- Paramètres d'intégrité membranaire spermatique :

Les intégrités membranaires fonctionnelle et lésionnelle ont été évaluées, comme des critères d'efficacité des dilueurs étudiés. En effet, il est largement connu que la membrane plasmique du spermatozoïde subit en premier les lésions consécutives à la cryoconservation. (88), (89)

Les résultats de cette étude suggèrent que les dilueurs à base de 40% PJO liquide et lyophilisé préservent l'intégrité membranaire avec autant d'efficacité que le dilueur de référence (6%LDL).

Le PJO est composé essentiellement (85%) de LDL (84) et son action cryoprotectrice est certainement en relation à l'action cryoprotectrice des LDL dont l'efficacité a déjà été démontrée dans la préservation de toutes les caractéristiques d'intégrité spermatique évaluées. (80)

Plusieurs hypothèses ont été développées pour décrire le mécanisme de protection spermatique par les LDL.

Il a été suggéré que les LDL protègent les cellules spermatiques en s'incorporant au sein de la membrane plasmique et remplaçant les phospholipides perdus ou endommagés à cause du choc thermique et aussi en réduisant la température de transition de phase de cette membrane. (90)

Il a été également avancé que les LDL ne fusionnent pas dans la membrane, mais s'y associent en formant un film protecteur à sa surface lui conférant ainsi une protection et une stabilisation pendant la cryoconservation. Dans ce phénomène de recouvrement « coating » une action de synergie entre les phospholipides (spécialement la PC) et les protéines contenues dans les LDL semble être impliquée en offrant aux spermatozoïdes une double action de « résistance et protection ».

(91) Cependant, les rôles respectifs des protéines et des lipides en interaction avec la membrane plasmique ne sont pas encore clairement établis.

Une autre hypothèse qui pourrait éventuellement expliquer l'action de cryoconservation des LDL est que ces derniers protègent les spermatozoïdes par séquestration des protéines BSP (i.e. agents capacitants) qui se fixent aux phospholipides (choline) de la membrane suite à l'éjaculation en stimulant l'efflux du cholestérol et des phospholipides de cette membrane. La séquestration de ces agents capacitants présents dans le sperme est une action protectrice réduisant au minimum la modification de la membrane plasmique du spermatozoïde (92). Chez le chien il n'existe pas de glandes séminales qui produisent comme chez les autres mammifères les protéines BSP. Cependant, des protéines liantes homologues ont pu être caractérisées dans le liquide prostatique et qui sont probablement produites par la prostate (93)

Ainsi, comme le PJO contient des LDL, ses mécanismes de protection spermatique seraient expliqués par toutes les hypothèses présentées ci-dessus.

En plus des LDL, le PJO contient des glycoprotéines globulaires (15%) composés essentiellement de α , β and γ -livetines et correspondant aux protéines du sérum sanguin de la poule (94). Ces protéines sont généralement éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans le protocole d'extraction des LDL (84).

Comme mentionné précédemment, les livétines ne semblent pas altérer ou interférer avec l'action cryoprotectrice des LDL pures. Par conséquent il semblerait que leur élimination n'est pas une condition sine qanun pour une action cryoprotectrice efficace.

Cette observation est très intéressante car la purification de ces protéines est une procédure chimique incluant l'utilisation d'une solution saturée de sulfate d'ammonium qui sera par la suite dialysée (78). Ceci requiert plus de temps et d'effort au laboratoire et rend le protocole non transposable à l'échelle industrielle. Deplus, cette solution de sulfate d'ammonium représente un risque de contamination du dilueur si elle n'est pas parfaitement éliminée (85). Ainsi, aux plans pratique et économique, il serait plus intéressant d'utiliser le PJO au lieu des LDL pures en ayant la même efficacité cryoprotectrice.

VI-3-Traitements physiques du PJO

La lyophilisation est un procédé de conservation, incluant une congélation et une déshydratation. Cette technique est communément utilisée pour préserver divers produits biologiques, des cultures bactériennes et virales ainsi que des produits alimentaires et médicaments afin de maintenir à long terme leur stabilité et viabilité (95). Ce procédé serait une méthode intéressante permettant une conservation prolongée du PJO puisque la fraction hydrique présente dans la forme liquide agirait comme un substrat ou un milieu pour plusieurs réactions d'oxydation lipidique (96).

C'est la première fois que le PJO a été lyophilisé et il n'y a donc pas d'études précédentes relatives à son utilisation dans la cryoconservation de la semence canine. Cependant, les LDL natives ont été lyophilisées et ont échoué à maintenir leur capacité à préserver la mobilité et l'intégrité (membrane plasmique et acrosome) dans la réfrigération de la semence ovine (97) et canine (88).

Au vu de nos résultats, ce procédé appliqué au PJO ne semble pas altérer les propriétés cryoprotectrices des LDL qu'il contient. Cependant, d'autres études semblent nécessaires pour évaluer les propriétés physiques et chimiques des LDL (composition des protéines et taille des LDL) ainsi que les éventuels changements induits par ce traitement physique.

Il n'est pas clair pourquoi le PJO lyophilisé contrairement au LDL natives (pures) lyophilisées, peut maintenir la capacité de protection spermatique. Il a été rapporté que la lyophilisation pourrait causer la perte des propriétés protectrices des LDL suite à leur déstabilisation moléculaire résultant du retrait de la fraction hydrique (98). Ce procédé pourrait être délétère pour les lipoprotéines de basse densité à l'état natif mais pas quand elles sont en suspension dans une fraction liquide (plasma). Cette supposition semble être en concordance avec l'efficacité cryoprotectrice du JO entier lyophilisé comme rapporté précédemment dans la réfrigération de la semence du bélier (99) et du buffle (100). D'autres études plus approfondies semblent être nécessaires pour explorer cette hypothèse.

Enfin, étant donné que la préparation du PJO a pu être réalisée à une échelle industrielle, (82), le traitement physique de lyophilisation pourrait faciliter le développement d'un dilueur à base de PJO compatible avec une production industrielle complète ainsi que diverses applications commerciales.

Conclusion :

Dans la présente étude, nous avons montré que les paramètres de mobilité évalués par analyse d'image et les caractéristiques d'intégrité membranaire du sperme canin peuvent être conservés à l'état frais (réfrigération à +4°C) pendant au moins six (06) jours dans deux dilueurs à base de 40% de PJO liquide ou lyophilisé avec une efficacité équivalente au dilueur de référence (20%JO).

Le plasma de jaune d'œuf a été soumis au traitement physique de lyophilisation sans aucune interférence avec ses propriétés cryoprotectrices et semble être de ce fait une alternative viable au jaune d'œuf entier dans la réfrigération de la semence canine.

En plus de son efficacité cryoprotectrice, le plasma de jaune d'œuf lyophilisé a montré, par rapport à la forme liquide, une meilleure stabilité et une plus longue conservabilité. IL semble représenter de ce fait un grand intérêt dans la production industrielle et la commercialisation d'un nouveau diluer de réfrigération de la semence canine.

Les résultats de ce travail nécessitent d'être confirmés par d'autres études portant sur un d'échantillons plus élevé. Il serait alors nécessaire, avant de mettre en application ce dilueur, de réaliser des inséminations artificielles pour déterminer si les taux de gestation et les tailles des portées obtenus seraient satisfaisants.

Référence Bibliographique

1. **MAUD JACQUET M. (2003)**- contribution à l'étude des protocoles de la capacitation in vitro et de la congélation des spermatozoïdes chez le chien
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 79 pp.
2. **PAMELA, VIRGINIE FUERTES ANNEE 2008**- congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale, la faculté de médecine de creteil
3. **SETCHELL B. (1991)** - Male reproductive organs and semen. In: CUPPS P., editor. Reproduction in domestic animals. 4th ed. San Diego: Academic press, 221-245.
4. **VAISSAIRE JP. (1977)**- Sexualité et Reproduction des Mammifères Domestiques et de Laboratoire. Paris: Maloine, 457 p.
5. **BARONE R. (1978)** - Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie.Fascicule 2. Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp
6. **COLLIN B. (2003)** - Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp.
7. **JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001)** - Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 275-286.
8. **FONTBONNE A. (1992)** - Physiologie sexuelle du chien mâle. In: Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 19-26.
9. **CLUB BLEU DE GASCOGNE. 2006** - Conduite de la reproduction en élevage canin. Document technique à l'usage des candidats juges..
10. **PRINS G.S. (1998)** - Semen. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
11. **JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001)** - Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 287- 306.

Référence Bibliographique

12. **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.
13. **KUTZLER M.A. (2005)** - Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64, 747-754.
14. **EILTS B.E. (2005)** - Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691.
15. **ANNE-SOPHIE BRIFFAUT. (2007)** - congélation de la semence canine. Détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon,
16. **FELDMAN E. ET NELSON R. (2004)** - Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 930-952.
17. **FONTBONNE, A. (1993)** - 102 Prélèvement et examen de la semence chez le chien. Encyclopédie Vétérinaire, Paris, Elsevier, 1993, Reproduction 0800, 8 p
18. **CAROLE, ROSINPAER CABANNES (2008)** - comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine, Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse
19. **FONTBONNE A. (1995)** - Infécondité du chien mâle. In : Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elsevier, Paris, Volume 5, 1-13.
20. **GUIGARD ET V. (1997)** - Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome : le SPERMAC®. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°101, 96 p.
21. **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.
22. **ROOT, M.V. 2007** The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68, 329-337.
23. **PASQUALOTTO, FF; SOBREIRO B.P; HALLAK, J ET AL. 2005** - Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. *BJU International*, , 96, 1087-1091.

Référence Bibliographique

24. **NGUYEN THI MONG DIEP (2015)** - Rôle de protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinées à être cryopréservées,
25. **AMANN R.P. 2004** - Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, 25(3): 317-325.
26. **RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., TANGHE S., CORYN M., MAES D., DE KRUIF A. 2005** - New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64, 706-709.
27. **ENGLAND G. ET PLUMMER J. 1993** - Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47 (suppl), 261-270.
28. **JEYENDRAN R.S., VAN DER H.H., PEREZ-PALAEZ M. ET AL. 1984** - Developement of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J.reprod. Fertil.*, ,70, 219-225
29. **HARROP A.E. 1954** - Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br. Vet. J.* 110, 424-425.
30. **BOUCHARD G.F., MORRIS J.K., SIKES J.D., YOUNGQUIST R.S. 1990** - Effect of storage temperature, cooling rate and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology.*, 34, 147-157.
31. **ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. 1995** - Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44(6): 885-900.
32. **D. BENCHARIF¹*, L. AMIRAT-BRIAND¹, J. LE GUILLOU^{1,3}, C. VIALTELLE¹, M. ANTON², E. SCHMITT³, S. DESHERCES³, P. BARRIERE⁴, D. 2013** - TAINTURIER¹ Refrigeration of canine sperm at +4°C: Comparative study of four different extenders for the refrigeration of canine sperm at +4°C: LDL, Tris egg yolk, Equex®, and INRA96® *Revue Méd. Vét.* 164, 5, 252-262
33. **AMANN R.P. 199)** - Cryopreservation of sperm. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.). *Encyclopedia of reproduction*. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.
34. **ENGLAND G.C.W. 1993** - Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47, 243-255.
35. **TSUTSUI T., TEZUKA T., MIKASA Y., SUGISAWA H., KIRIHARA N., HORI T. et KAWAKAMI E. 2003** - Artificial insemination with canine

Référence Bibliographique

- semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 65, 307-312.
- 36. 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.
- 37. FELDMAN E. et NELSON R. 2004** - Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1005-1013.
- 38. 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.
- 39. 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).
- 40. PONGLOWHAPAN S., ESSEN-GUSTAVSSON B. ET LINDE-FORSBERG C. 2004** - Influence of glucose and fructose in the extender during long term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62, 1498-1517.
- 41. HAY M., KING W., GARTLEY C., LEIBO S. et GOODROWE K. 1997** - Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51 (suppl), 99-108.
- 42. POWRIE WD, NAKAI S. 1986** - The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman WJ, Cotterill OJ (eds.), *Egg science and technology*, 3 ed. Wesport: AVI publishing company: 97-138.
- 43. IGUER-OUADA M. ET VERSTEGEN J. 2001** - Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55, 671-684.
- 44. FARSTAD W. 1996** - Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 251-260.

Référence Bibliographique

45. **VALLON D. 1971** - Contribution à l'étude de la physiologie sexuelle du chien- Applications à l'insémination artificielle. Thèse Méd. Vét., Lyon.
46. **MOUSSA M, MARTINET V, TRIMECHE A, TAINTURIER D, ANTON M. 2002** - Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*; 57: 1695-1706.
47. **BURLEY RW, EVANS AJ, PEARSON JA. 1993** - Molecular aspects of the synthesis and deposition of hens' egg yolk with special reference to low density lipoprotein. *Poult Sci*; 72: 850-855.
48. **POWRIE WD, NAKAI S. 1986** - The chemistry of eggs and egg products. Dans: Stadelman WJ, Cotterili OJ (eds.), *Egg science and technology*, 3 ed. Westport: AVI publishing company: 97-138.
49. **FONTBONNE, A .1992** - Insémination artificielle en semence réfrigérée et congelée chez la chienne. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC), pp. 260-264, 7508 Paris.
50. **HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP. 1990** - Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*; 11: 73-88.
51. **WATSON PF. 1995** - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*; 7: 871-891.
52. **PARKS JE, 1992** Graham J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*; 38: 209-222.
53. **GAO D, CRITSER JK. 2000** - Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar J*; 41: 187- 196.
54. **HERMANSSON U.et LINDE-FORSBERG C. 2006** - Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65, 584-593.
55. **ENGLAND G.et PONZIO P. 1996** - Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46, 165-171.
56. **PONGLOWHAPAN S., ESSEN-GUSTAVSSON B. et LINDE-FORSBERG C. 2004** - Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62, 1498-1517.

- 57. MEDEIROS CM, FORELL F, OLIVEIRA AT, RODRIGUES IL. 2002** - Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*; 57: 327-344.
- 58. HOIT WV. 2000** - Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*; 62: 3-22.
- 59. MARC Stéphanie 2015** - ACTUALITES EN CRYOCONSERVATION DES SEMENCES DES PRINCIPALES ESPECES D'INTERET VETERINAIRE
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon I.
- 60. VARELA JUNIOR A.S, CORCINI C.D., ULGUIM R.R., ALVARENGA M.V.F., BIANCHI I., CORRÊA M.N., LUCIA T. et DESCHAMPS J.C. 2009** - Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 115, n° 1-4, pp. 323-327.
- 61. ANNICK BERGERON, 2004** - Étude du mécanisme impliqué dans la protection des spermatozoïdes de mammifères par le jaune d'œuf, Thèse de doctorat vétérinaire, Université de Montréal
- 62. FONTBONNE A, BUFF S, BOENDER G. 1998** - Le vétérinaire et la reproduction. [OCD ROM], Lures : Vetoquinol diagnostics,.
- 63. WOLFF, E., GIBERT, H: 1998** - Développements Technologiques Nouveaux en Lyophilisation, *Journal of Food Engineering*, 8, pp. 91-108.
- 64. FLINK, J.M. AND KNUDSEN, H. 1983** - An Introduction to Freeze Drying; Strandberg Bogtryk/ Offset: Denmark.
- 65. ABADIAS, M., A. BENABARRE, N. TEIXIDÓ, J. USALL AND I. VINAS 2001** - Effect of freeze-drying and protectants on the viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. 65, 173-182.
- 66. MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., IMAIZUMI, T., SUKENOBE, J., MURAKAMI, Y., KAWAMURA, S. AND KOMATSU, Y. 2000** - Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41, 251-255.
- 67. COSTA, E., USALL, J., TEIXIDO, N., GARCIA, N. AND VINAS, I. 2000** - Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected freeze drying. *Journal of Applied Microbiology* 89, 793-800.

Référence Bibliographique

- 68. BOZOGLU, T.F., OZILGEN, M. AND BAKIR, U. 1987** - Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbiology Technology*. 9, 531-537.
- 69. SIMATOS, D., BLOND.G., DAUVOIS, P., ET SAUVAGEOT, F. 1974** - La lyophilisation : Principes et Applications. Collection de l'Association Nationale de Recherche Technique, Paris, pp. 3-33
- 70. MEDA L. AND C. RATTI. 2005** -. Rehydration of freeze-dried strawberries. *Journal of Food Process Engineering*, 28, 233-246.
- 71. MILOVANOV, V.K., 1962** - The biology of reproduction and the artificial insemination of animals, 969 pages, Seljhozgiz, Moscow, 1962.
- 72. PENA MART NEZ A.I. 2004** - Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 82-83, p. 209-224.
- 73. BRITO LEONARDO F.C. 2007** - Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol. 6, n° 4, p 249-264.
- 74. GAULLIARD LAURE 2008** - La congélation de la semence de chat domestique : étude bibliographique et expérimentale. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil. 156p.
- 75. BARBAS J. P. ET MASCARENHAS R. D. 2009** - Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. Vol. 10, n° 1, p 49-62.
- 76. HANZEN CHRISTIAN 2014** - Biotechnologies: L'insémination artificielle chez les ruminants.
- 77. Site web Mauriès Jean Pierre, vetopsy, vétérinaire,comportementaliste diplômé des écoles national vétérinaires françaises (DENVF)**
- 78. MOUSSA, M., MARTINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D., ANTON, M., 2002** - Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method : cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57, 1695-1706.
- 79. BELALA, R., BRIAND-AMIRAT, L., VINCIGUERRA L., TAINTURIER, D., KAIDI, R., THORIN, C., MICHAUD, S., ANTON, M., BENCHARIF, D, 2016** - Effect of equilibration time on the motility and

functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders.

Research in Veterinary Science 106, 66–73.

- 80. BENCHARIF, D., AMIRAT-BRIAND, L., ANTON, M., SCHMITT, E., DESHERCES, S., DELHOMME, G., LANGLOIS, M.L., BARRIERE, P., LARRAT, M., TAINTURIER, D. 2008** -. The advantage of LDL (Low-density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. Theriogenology, 70: 1478-1486.
- 81. PACE, M.M. and GRAHAM, E.F., 1974** -. Components in egg yolk, which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39, 1144-1149.
- 82. KERANDIVEZ, C.Y, 1990** - “Procédé de fractionnement du jaune d’œuf de poule”, Brevet Européen 0430757A1. 19.11..
- 83. AMIRAT, L., TAINTURIER, D., JEANNEAU, L., THORIN, C., GERARD, O., COURTENS, J.L., ANTON, M. 2004** - Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 6: 895-907.
- 84. ANTON, M., MARTINET, V., DALGALARRONDO, M., BEAUMAL, V., DAVID-BRIAND, E., RABESONA, H., 2003** - Chemical and structural characterisation of low-density lip
- 85. CORCINI, C.D., GOULARTE, K L., BONGALHARDO, D.C., LUCIA JR, T., JARDIM, R.D., VARELA JUNIOR, A.S., 2015** - Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. Andrologia. doi: 10.1111/and.12411 oproteins purified from hen egg yolk. Food Chemistry. 83, 175–183
- 86. PILLET, E., DUCHAMP, G., BATELLIER, F., BEAUMALH, V., ANTON, M., DESHERCES, S., SCHMITT, E., MAGISTRINI, M., 2011** - Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. Theriogenology. 75, 105-114.
- 87. NEVES et AL., 2011** –
- 88. De Leeuw FE., Colenbrander, B. Verkleij, A.J.** The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury, in: I.A. Johnson, D. Rath (Eds.),

Référence Bibliographique

- Boar Semen Preservation II, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, 1991, pp. 95–104.
- 89.** Drobnis, E.Z. Crowe, L.M. Berger, T. Anchordoguy, T.J. Overstreet, J.W. Crowe, J.H. 1993: Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model, *J. Exp. Zool.* 265 432–437.
- 90.** Foulkes, J.A., Sweasey, D., Goodey, R.G., 1980. Fertility of bull spermatozoa in egg yolk diluents of varied lipid fatty-acid composition. *J Reprod Fertil.* 60, 165–9.
- 91.** Ricker, J.V., Linfor, J.J., Delfino, W.J., Kysar. P., Scholtz, E.L., Tablin, F., *et al.*, 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod.* 74, 359–65.

Référence Bibliographique

Annexe N° 02 : Photos de la partie expérimentale

spermogramme

Intervenant(s) prélèvement :

N°CLOVIS

Présence d'une chienne en oestrus :

NOM :

Race :

DATE : //

LIBIDO :

SEMENCE : Aspect macroscopique :

VOLUME	Phase 1 : ml	Phase 2 : ml	Phase 3 : ml
Volume total si phases mélangées		ml	
Volume après centrifugation		ml	volume dilueur : ml
MOBILITE	%	Nombre total de spermatozoïdes :	
ANOMALIES	Anormaux : %	Têtes : %	Pièces int : %
	Gouttelettes : %	Flagelles : %	Décapités : %
PMN <input type="checkbox"/>		Hématies <input type="checkbox"/>	Autres :

Concentration :

Conclusion :

EXAMENS COMPLEMENTAIRES :

- Oestradiol : P4 : PAL sur semence :
 Testostérone basale : T4 libre : RCCU :
 Post-stimulation : TSH :
 Brucellose : Herpesvirose : Bactériologie :
 Frottis prépuccial : Echographie génitale :

CONCLUSION :



Figure 1 : Gel lubrifiant



Figure 2 : Cellule de Thoma



Figure 3 : Microscopie à contraste de phase

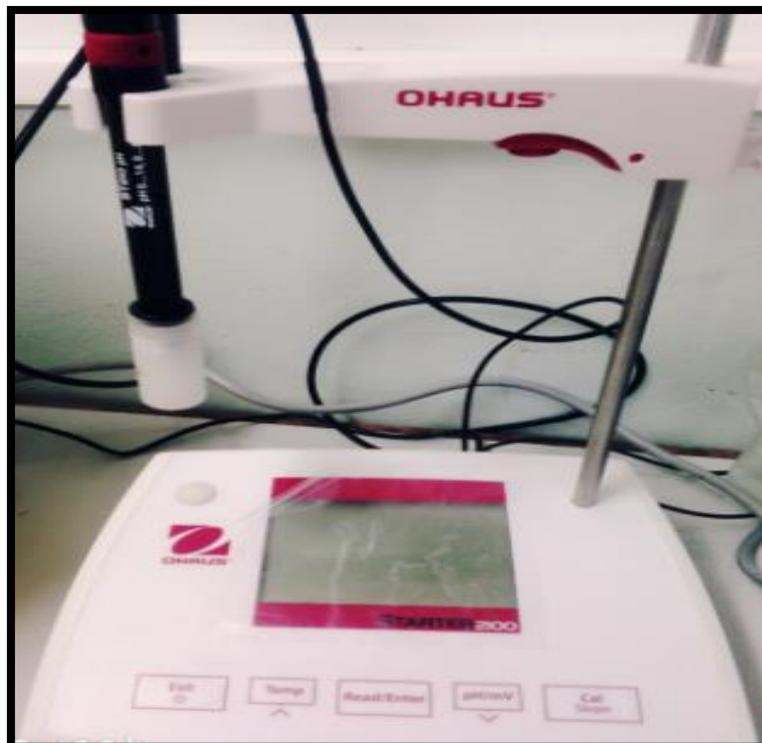


Figure 4 : Ph mètre



Figure 5 : Centrifugeuse à Eppendorff



Figure 6 : vortex

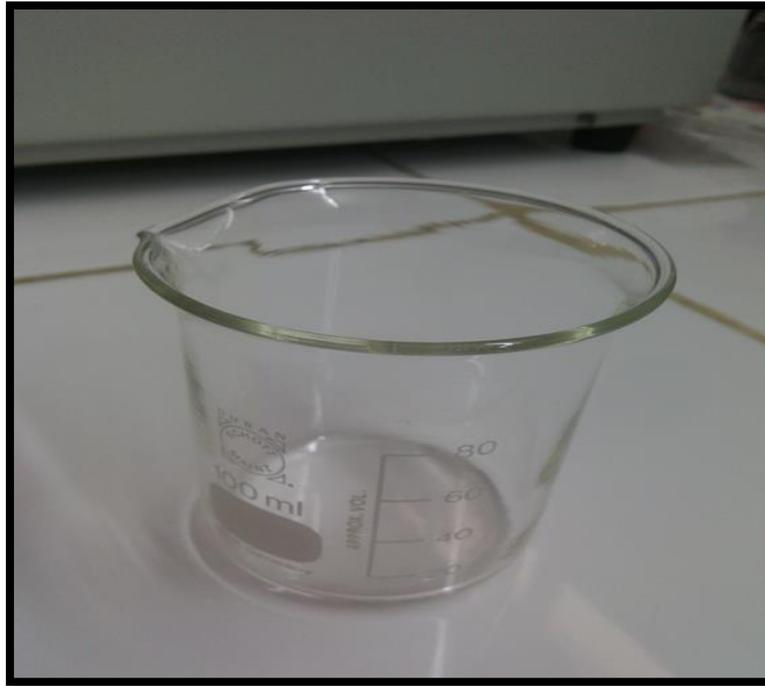


Figure 7 : Flacon



Figure 8 : Etuve



Figure 9 : Lyophilisateur



Figure 10 : Osmomètre manuel

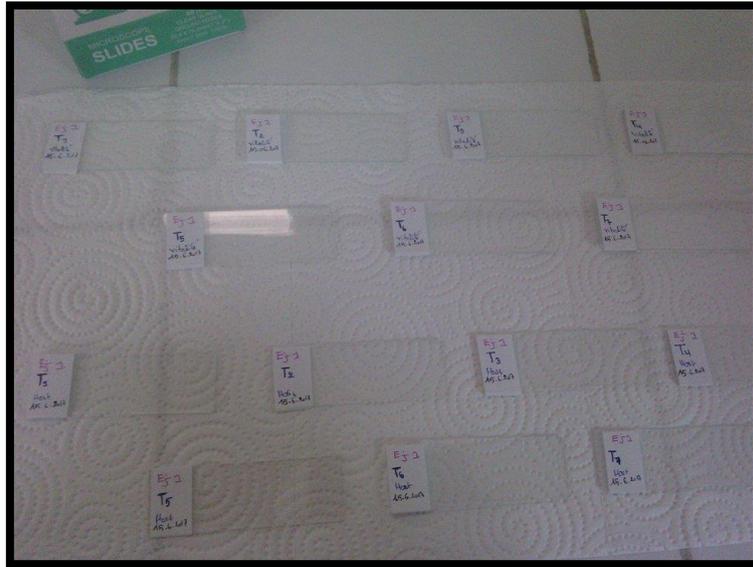


Figure 11 : lames porte-objet



Figure 12 : Lame Leja®



Figure 13: Filtre seringue de 0,22 µm

Annexe N°01

Matériel utilisés

Appareillage :

- Etuve.
- Bain-marie (37) °.
- Vortex.
- Agitateur.
- Balance analytique.
- Centrifugeuse.
- Microscopie à contraste de phase.
- Micropipette.
- bain de glasse.
- lyophilisateur.

Verrerie et accessoire :

- Les tubes en verre gradué.
- Support tubes.
- Baguette en verre.
- Cellule hématimétrique.
- Lame et lamelle.
- Les cônes en caoutchouc.
- Gants de récolte.
- Papier absorbant.
- Seringue.
- Filtre seringue.
- Flacon en verre.
- Boite de pétri.
- Epindorff.
- Porte objet.
- Micropipette.
- papier alimentaire.
- flacon en plastique.

Produits :

- Lubrifiant gynécologique (flacon).
- Solution de NaCl.
- Eosine-nigrosine.
- Solution Hypo-Hosmotique.
- Eau distillée.
- Les oeuf.

TRIS	3,025 g
Acide citrique	1,7 g
Fructose	1,25 g
Jaune d'œuf	20 ml
Benzyl-pénicilline	1 mg/ml
Dihydrostreptomycine	1 mg/ml
Eau distillée	Jusqu'à 80 ml