



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

## **Diplôme de Docteur Vétérinaire**

### **Cryoconservation de la semence canine**

Présenté par

**AMAERIA Walaa et KHALDI Fatma zohra**

Soutenu le : 03/07/ 2025

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>Adel. D</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Examineur :</b>	<b>Yahimi. A</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Promoteur :</b>	<b>Belala. R</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Co-promoteur :</b>	<b>Medjkoune. M</b>	DMV	ISV- Blida 1

**Année : 2024/2025**





Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**Cryoconservation de la semence canine**

Présenté par

**AMAERIA Walaa et KHALDI Fatma zohra**

Soutenu le : 03/07/ 2025

Devant le jury :

<b>Président :</b>	<b>Adel. D</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Examineur :</b>	<b>Yahimi. A</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Promoteur :</b>	<b>Belala. R</b>	MCA	ISV - Blida 1
<b>Co-promoteur :</b>	<b>Medjkoune. M</b>	DMV	ISV- Blida 1

**Année : 2024/2025**

## **REMERCIEMENTS:**

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté afin de mener à terme notre mémoire.

Nous tenons exprimer notre gratitude à nos encadrants MR BELLALA.R et Mlle MEDJKOUNE.M pour leur soutien et leur aide si précieuse, leur patience, tout notre respect et gratitude à vous.

Que Mr Adel.D trouve nos plus profonds remerciements d'avoir accepté de présider ce travail.

Que Mr Yahimi.A soit remercié d'avoir voulu examiner notre travail.

Nous remercions tous nos professeurs de l'institut des sciences vétérinaires blida 1 qui nous ont accompagnée tout au long de notre parcours universitaire, nous vous remercions pour votre engagement, votre rigueur et votre passion pour l'enseignement, vos précieux conseils qui ont contribué à notre formation et vos encouragements. Cette réussite vous revient aussi.

Nous remercions également nos amis et camarades vétérinaires.

## Dédicaces :

Je dédie ce travail

À mes parents, pour leur amour, leur patience et leur soutien  
indéfectible tout au long de mon parcours

À ma petite soeur Ilhem, à mes grands frères Riad et Raouf et leurs  
épouses

À mes amies, Nahla et Maissa

À Walaa et toute sa famille

Je le dédie aussi à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue avec  
leurs encouragements

Ce travail est le fruit de mes efforts et la sueur des 5 années passées ;  
avec des rires, des joies et parfois des pleurs et des angoisses mais dieu  
merci la fin est fructueuse ( tout est bien qui fini bien)

Dédicace de khaldi fatma zohra

A ma famille , ma vie , ma source d'inspiration et d'amour

**A ma chère maman** , qui m'a toujours soutenue et protégée à chaque étape de ma vie .  
Pour ton amour infini et ton soutien indéfectible . Tu restes toujours mon modèle , ma meilleure amie et ma confidente . Ma maman, merci du fond du coeur , je t'aime .

**A mon papa** ,l'homme de ma vie , tu as toujours été le pilier sur lequel je pouvais m'appuyer et la force tranquille qui m'a toujours guidé . Pour ton soutien sans faille durant ces années ; merci pour tout que tu m'as appris et pour la personne que tu m'as aidé à devenir , je t'adore papa .

Tous ça , mon parcours , celle que je suis devenue aujourd'hui ; c'est grâce à vous .

**Au docteurs** Ismail et Mohammed , je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude pour vous ; je vous remercie pour votre gentillesse et vos conseil illimités , merci de m'avoir donner la chance de travailler avec vous .

**A mes frères** Ghazali , Asaad et **mes sœurs** Khouloud et loudjaine , mes premiers amis et mes plus fidèles compagnons de route , chaque étape de mon parcours a été marqué par votre présence . vous êtes une partie essentiel de qui je suis merci pour tous .

**A ma grand mère** Halima , **mes tantes** : Zohra, Leila, Kheira et tata Naima , a ma tante adorée qui repose en paix Mina . **A mes oncles** : Said , Ahmed . vous m'avez toujours encouragés et vous continuez à le faire , merci beaucoup je vous souhaite que du bonheur et de la santé .

**A mes cousines** : Malek, Rihab, Naima , les deux Djidjat , Zouzou , Houria , Safia et Nafissa , merci d'être toujours une source d'amour et de soutien , je vous souhaite que du bonheur mes belles .

**A mon amie ma binôme et ma copine de chambre** Maria et toute sa famille , merci pour tous les moments adorables qu'on a passé ensemble merci pour votre soutien et votre amour je vous aime.

**A ma meilleur amie** d'enfance et de tous le temps Rahma , merci pour ton soutien illimité et ton amour infini , t'es toujours dans le cœur je t'aime ma chérie .

**A mes amis** Maya , Mamika , Khalil, lina , je vous aime , merci d'avoir rendue ces années d'études plus agreable et moins pénible .

**AMAERIA WALAA**

---

## **Résumé :**

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une synthèse bibliographique portant sur la cryoconservation de la semence canine. Le premier volet de ce travail aborde de manière détaillée l'anatomie ainsi que la physiologie de l'appareil génital mâle du chien, éléments indispensables à la compréhension des mécanismes de production et de libération des spermatozoïdes.

Le deuxième volet du travail aborde les différentes techniques de récolte de la semence canine, avec un accent particulier sur la méthode manuelle, considérée comme la plus courante et la plus efficace. Il explore également les facteurs influençant la qualité du sperme, tels que l'âge, la race, l'alimentation, la stimulation sexuelle, ou encore les conditions environnementales. Une analyse approfondie de la semence est ensuite présentée, incluant des examens macroscopiques (volume, couleur, pH) et microscopiques (mobilité, concentration, morphologie), ainsi que l'utilisation de systèmes d'analyse assistée par ordinateur (CASA), qui permettent une évaluation plus précise de la qualité spermatique.

Le dernier chapitre est consacré à la cryoconservation proprement dite, une méthode qui permet de préserver la semence à très basse température ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) dans de l'azote liquide. Le processus comprend plusieurs étapes : centrifugation, dilution avec des milieux enrichis en cryoprotecteurs, conditionnement en paillettes, congélation progressive, puis stockage. Divers agents sont étudiés pour leur rôle protecteur, comme le glycérol (cryoprotecteur pénétrant), le jaune d'œuf (JO), son plasma (PJO), les lipoprotéines à faible densité (LDL), et les liposomes. Ces substances assurent la protection membranaire des spermatozoïdes contre les effets délétères du froid. Le développement de dilueurs adaptés, comme Canifreez® ou Canixcell®, illustre les avancées technologiques récentes dans ce domaine.

**Mots clés:** Cryoconservation, semence canine , insémination artificiel , azote liquide.

## ملخص :

يأتي هذا العمل في إطار تلخيص أدبي حول الحفظ بالتبريد للبذور الكلبية. يتناول الجزء الأول من هذا العمل بشكل مفصل تشريح ووظائف الجهاز التناسلي الذكري للكلب، وهما عنصران أساسيان لفهم آليات إنتاج وإطلاق الحيوانات المنوية. يتناول الجزء الثاني من العمل التقنيات المختلفة لجمع السائل المنوي للكلاب، مع التركيز بشكل خاص على الطريقة اليدوية، التي تعتبر الأكثر شيوعًا وفعالية. يستكشف أيضًا العوامل التي تؤثر على جودة السائل المنوي، مثل العمر، السلالة، التغذية، التحفيز الجنسي، أو حتى الظروف البيئية. يتم بعد ذلك تقديم تحليل شامل للسائل المنوي، بما في ذلك الفحوصات الماكروسكوبية (الحجم، اللون، الرقم الهيدروجيني) والميكروسكوبية (الحركة، التركيز، الشكل)، بالإضافة إلى استخدام أنظمة التحليل بمساعدة الكمبيوتر (CASA)، التي تسمح بتقييم أكثر دقة لجودة الحيوانات المنوية.

الفصل الأخير مخصص للحفظ بالتبريد الفعلي، وهي طريقة تسمح بالحفاظ على السائل المنوي في درجات حرارة منخفضة جدًا (-196 درجة مئوية) في النيتروجين السائل. تشمل العملية عدة مراحل: الطرد المركزي، التخفيف بوسائط غنية بالمواد الحافظة للتجميد، التعبئة في قشات، التجميد التدريجي، ثم التخزين. تُدرس عوامل مختلفة لدورها الحامي، مثل الجلوسين (الواقى البارد المتغلغل)، صفار البيض (JO)، بلازماه (PIO)، البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL)، والليبوسومات. تضمن هذه المواد الحماية الغشائية للحيوانات المنوية ضد التأثيرات الضارة للبرودة. تطوير المحاليل المخففة المناسبة، مثل Canifreez® أو Canixcell®، يُظهر التقدم التكنولوجي الحديث في هذا المجال.

**الكلمات المفتاحية:** الحفظ بالتبريد، وسط الحفظ بالتبريد، السائل المنوي الكلابي، التلقيح الاصطناعي، النيتروجين السائل.

## **Abstract :**

This work is part of a bibliographic synthesis on the cryopreservation of canine semen. The first part of this work addresses in detail the anatomy and physiology of the male dog's genital system, essential elements for understanding the mechanisms of sperm production and release.

The second part of the work addresses the different techniques for collecting canine semen, with a particular emphasis on the manual method, considered the most common and effective. It also explores the factors influencing sperm quality, such as age, breed, diet, sexual stimulation, and environmental conditions. A thorough analysis of the semen is then presented, including macroscopic examinations (volume, color, pH) and microscopic examinations (motility, concentration, morphology), as well as the use of computer-assisted sperm analysis (CASA) systems, which allow for a more precise evaluation of sperm quality.

The final chapter is dedicated to cryopreservation proper, a method that allows for the preservation of semen at very low temperatures ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) in liquid nitrogen. The process includes several steps: centrifugation, dilution with media enriched with cryoprotectants, packaging into straws, gradual freezing, and then storage. Various agents are studied for their protective role, such as glycerol (penetrating cryoprotectant), egg yolk (EY), its plasma (EYP), low-density lipoproteins (LDL), and liposomes. These substances ensure the membrane protection of spermatozoa against the deleterious effects of cold. The development of suitable extenders, such as Canifreez<sup>®</sup> or Canixcell<sup>®</sup>, illustrates recent technological advances in this field.

**Keywords:** Cryopreservation, canine semen, artificial insemination, nitrogen liquid.

## SOMMAIRE :

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 01: Anatomie et Physiologie de l'appareil génital mâle</b> .....	2
*Introduction .....	3
1- Anatomie:.....	3
1-1- Les testicules .....	3
1-2- Le pénis .....	3
1-3- Les glandes accessoires .....	4
1-3-1- la prostate.....	4
1-3-2- les glandes préputiales .....	4
2- physiologie : .....	4
2-1- les testicules .....	4
2-1-1- fonction exocrine .....	5
2-1-2- fonction endocrine .....	5
2-2- le pénis .....	6
2-2-1- l'érection .....	6
2-2-2- l'éjaculation.....	6
2-3- les glandes annexes.....	8
2-3-1- la prostate.....	8
2-3-1- les glandes préputiales.....	8
<b>Chapitre 02: Récolte et Analyse de la semence canine</b> .....	9
*Récolte de la semence canine .....	10
A- La semence canine .....	10
B- La récolte de la semence canine .....	11
- les différentes techniques de récolte .....	11
1- Technique manuelle par masturbation .....	11
2- Vagins artificiels.....	13
3- L'électro éjaculation .....	13
4- Technique pharmacologique .....	14
- les paramètres qui peuvent influencer la récolte et la qualité de la semence..	14

1- En relation avec l'animal.....	14
1-1- L'age .....	14
1-2- La race.....	14
1-3- La santé et la nutrition .....	14
1-4- Libido et stimulation .....	15
1-5- La fréquence de collecte .....	16
2- En relation avec l'environnement .....	16
2-1-L'endroit .....	16
2-2- personnel et vétérinaire .....	16
2-3- présence de la femelle .....	17
*Analyse de la semence :.....	17
1- Examens macroscopiques .....	17
1-1- Volume de l'éjaculat .....	17
1-2- Couleur et aspect .....	17
1-3- Le pH.....	18
2-Examens microscopiques .....	18
2-1- La mobilité massale .....	18
2-2- La mobilité progressive .....	19
2-3- La numérotation spermatique .....	19
2-4- Le spermogramme .....	19
3-L'Analyse informatique de la semence (CASA).....	20
<b>Chapite 03 : Cryoconservation de la semence canine .....</b>	<b>23</b>
* Introduction .....	24
1- La centrifugation .....	24
2- La dilution .....	24
2-1- Les dilueurs de congélation et de réfrigération .....	24
2-2- Les cryoprotecteurs proprement dit .....	25
2-3- Les stabilisateurs membranaires .....	26
2-3-1- Le jaune d'oeuf.....	26
2-3-2- le plasma du jaune d'oeuf .....	27
2-3-3- les lipoprotéines à faible densité.....	31

A- Structure .....	31
B-Procédé d'extraction des LDL .....	31
C-Applications .....	32
2-3-4- Les liposomes .....	32
A- structure .....	33
B-Applications .....	34
3-Le conditionnement .....	36
4- La congélation .....	36
5- Le stockage .....	36
Conclusion.....	37
Références .....	38

## **Liste desTableaux :**

**Tableau 01:** Description des trois phases de l'éjaculation du chien ..... p 10

**Tableau 02 :** Echelles d'appréciation de la mobilité de masse .....p18  
de la semence canine .

**Tableau 03 :** Classification des anomalies morphologique des SPZ... .....p20

## Listes des Figures :

<b><u>Figure 01:</u></b> Organisation interne du testicule et de l'épididyme .....	3
<b><u>Figure 02:</u></b> Les différentes étapes de spermatogenèse .....	6
<b><u>Figure 03:</u></b> L'appareil génital male .....	7
<b><u>Figure 04:</u></b> Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien .....	11
<b><u>Figure 05:</u></b> Début de la récolte .....	12
<b><u>Figure 06:</u></b> Orientation caudale du pénis.....	12
<b><u>Figure 07:</u></b> Les trois phase de l'éjaculat du chien .....	13
<b><u>Figure 08:</u></b> Présence d'une femelle en oeustrus lors de la récolte .....	17
<b><u>Figure 09:</u></b> Cellule de Thoma .....	19
<b><u>Figure10:</u></b> Équipement pour l'analyse spermatique assistée par ordinateur.....	20
<b><u>Figure 11:</u></b> Représentation schématique de VAP, VCL, VSL .....	22
<b><u>Figure 12:</u></b> Procédé industriel de fractionnement du JOet d'extraction des LDL.	29
<b><u>Figure 13:</u></b> Procédé industriel de fractionnement du JO .....	30
<b><u>Figure 14:</u></b> Structure d'une lipoprotéine à faible densité LDL.....	31
<b><u>Figure 15:</u></b> Structure d'un liposome unilamellaire .....	33
<b><u>Figure 16:</u></b> Différents types de liposomes .....	33

### Liste des abréviations :

**SPZ:** Les spermatozoïdes

**CPA:** Les Crayoprotecteurs proprement dit

**JO:** Le jaune d'oeuf

**PJO:** Le plasma du jaune d'oeuf

**LDL:** Les lipoprotéines à faible densité (Low Density Lipoproteines)

**HDL:** Les lipoprotéines de haute densité ( Hight Density Lipoprpteines )

## Introduction

La cryoconservation de la semence constitue aujourd'hui un outil précieux en reproduction canine. Elle permet de préserver le patrimoine génétique d'animaux d'utilités, d'optimiser les programmes de sélection et de faciliter l'échange de matériel reproductif à l'échelle nationale ou internationale. (Fontbonne et Dumont, 1992 ; England, 1992).

Cependant, malgré ses nombreux avantages, la cryoconservation n'est pas sans conséquences sur la qualité de la semence. Le processus de congélation et de décongélation peut entraîner des altérations structurales importantes au niveau des membranes cellulaires, des mitochondries ou encore de l'ADN spermatique (Hammerstedt et al., 1990). Pour limiter ces dommages, différentes substances protectrices sont utilisées, notamment le glycérol, les extraits de jaune d'œuf, les lipoprotéines à faible densité (LDL), ou encore les liposomes, qui ont démontré leur efficacité en stabilisant les membranes spermatiques durant le refroidissement (Quinn et al., 1980 ; Moussa et al., 2002).

Parmi les différentes étapes techniques, celle de l'équilibration joue un rôle déterminant. Il s'agit d'une phase de repos à basse température (souvent autour de 4 °C), durant laquelle les spermatozoïdes s'adaptent progressivement à l'environnement cryoprotecteur. Plusieurs études ont montré que la durée de cette étape influence directement la survie cellulaire et les paramètres de motilité après décongélation (De Leeuw et al., 1993 ; Amirat et al., 2004). Toutefois, il existe encore aujourd'hui des divergences concernant sa durée optimale, celle-ci semblant dépendre du dilueur utilisé, de l'individu donneur, voire de l'espèce considérée (Courtens et Rety, 2001).

Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif d'examiner, à travers une analyse bibliographique, visant à mieux comprendre les facteurs qui influencent la réussite de la cryoconservation, et à contribuer à l'amélioration des protocoles actuels en vue d'une meilleure préservation de la fertilité chez le chien.

# **Chapitre 1:**

## **Anatomie et Physiologie de l'appareil génital mâle :**

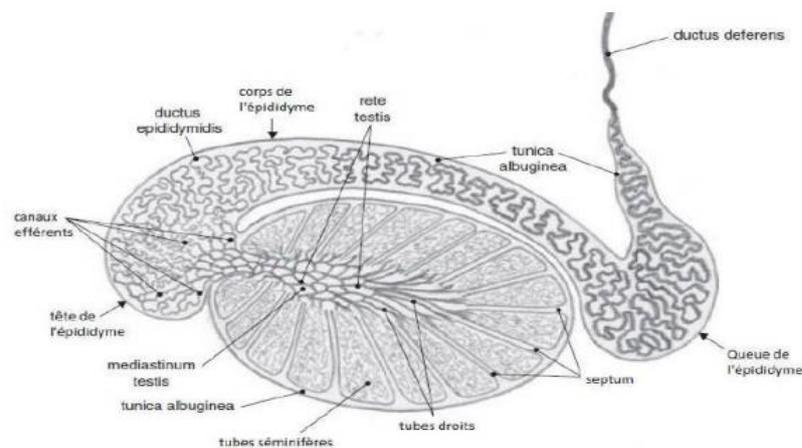
Les organes reproducteurs du mâle assurent trois principales fonctions sont la production, maturation et stockage des spermatozoïdes dans les testicules et le transport dans le canal défèrent et le dépôt de la semence dans le tractus génital femelle par le pénis .

## **1-Anatomie:**

L'appareil génital mâle est composé de trois sections : testicules, pénis et les glandes accessoires .

### **1-1-Les testicules:**

Sont deux organes pairs dont la taille diffère selon le poids du chien. Le testicule gauche est plus volumineux que le droit ,ils sont de forme ovoïde déprimés d'un côté à l'autre situés en haut du scrotum à l'extérieur de la cavité abdominale. (Barone, 1978; Collin,2003). ce dernier est la poche cutanée qui contient et protège les testicules, riche en vaisseaux et en nerfs , il aide aussi à maintenir une température légèrement inférieure à celle du corps, essentielle à la spermatogenèse. Chaque testicule est constitué d'un parenchyme testiculaire parcouru par une structure fibreuse appelée l'albuginée , chaque testicule contient de nombreux tubules séminifères entre eux le tissu interstitiel ou se situe les cellules de sertoli. Les tubules séminifères convergent dans un petit réseau appelé le *rete testis* qui forme des canalicules efférents aboutissant aux 20 niveaux de la tête de l'épididyme . le canal défèrent transporte les spermatozoïde (SPZ) de l'épididyme à l'urètre lors de l'éjaculation.(Barone,1978; Collin,2003).(Figure1)



**Figure 1:** Organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten, 2007).

## **1-2- le pénis:**

Le pénis mesure en moyenne 6-20 cm selon la taille du chien . L'artère du pénis assure sa vascularisation ,il se divise en d'autres artères qui sont flexueuses permettant l'adaptation au changement de la taille du pénis lors de l'érection ( Baron,1978) (Colin,2003). Il est Composé de quatre parties:

- le corps du pénis : composé de tissus érectiles capable de se remplir de sang pendant l'excitation sexuelle , permettant ainsi l'érection. (Colin,2003) (Johnston *et al* ,2001 a)
- L'os pénien ou le baculum: avant et pendant l'érection,il donne du soutien au pénis.
- Le bulbe du gland ou *bulbus glandis* : composé de deux partie, partie allongée cranialement et une partie renflée caudale appelé le bulbe érectile qui génère de nombreux influx nerveux; c'est la zone qui doit être stimulée pendant la masturbation. Le bulbe du gland se gonfle lors de l'érection et joue un rôle crucial dans le processus de verrouillage copulatoire (10-30 mins).(Colin,2003)
- Le prépuce: lors de l'érection, le pénis sort du prépuce . ce dernier est l'enveloppe cutanée qui protège le pénis lorsqu'il est flaccide. ( Baron,1978) (Colin,2003)

## **1-3-Les glandes accessoires:**

Chez le chien, les glandes annexes sont peu nombreuses en comparant avec les autres mammifères , présentées par le prostate et les glandes préputiales. Il n'y a ni la vésicule séminale ni glande bulbo-urétrales.

**1-3-1 La prostate:** par rapport à sa taille et le volume du liquide qu'elle sécrète, c'est la plus importante . Elle est constituée d'une partie bilobée bien discernable autour du col de la vessie et d'une partie diffuse formé de petits lobules glandulaires se prolongeant jusque sous le sphincter de l'urètre.(Collin,2003).

**1-3-2 Les glandes préputiales:** sont des glandes sébacés situées à la base du gland et destiné à la lubrification du gland. Ainsi qu'à la sécrétion des phéromones odoriférantes essentielles pour le rapprochement sexuel.(Fontbonne,1992).

## **2-Physiologie:**

### **2-1-Les testicules:**

leur rôle principale est la production des SPZ (fonction exocrine), et la sécrétion des hormones

sexuelles mâle principalement la testostérone (fonction endocrine) .

2-1-1- Fonction exocrine: ou la gamétogénèse qui assure la production de SPZ de la puberté jusqu'à la fin de la vie de l'animal, par des vagues régulières , donc l'andropause n'existe pas dans l'espèce canine . la durée de spermatogénèse n'est pas clairement établie ; elle varie de soixante-trois à soixante-dix jours suivant les auteurs (Fontbonne *et al*,2000). la quantité des SPZ produits est proportionnelle à la taille de chien , elle varie de deux cent millions à plus de deux milliards de SPZ par éjaculat (Fontbonne,1992). la spermatogénèse se déroule au sien de la paroi des tubes séminifères en deux étapes (Figure2):

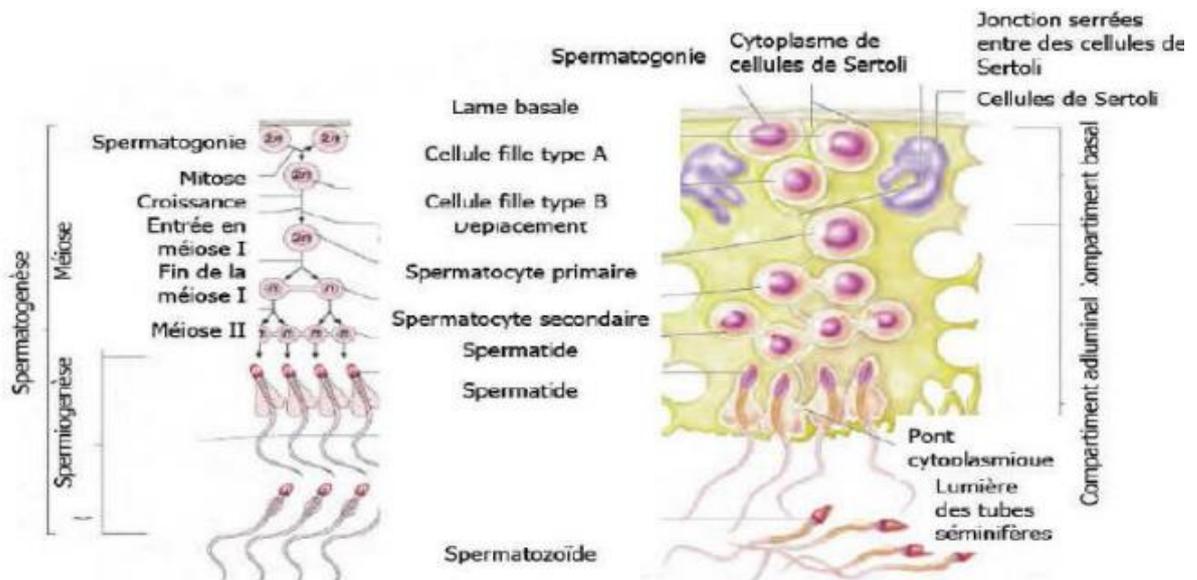
- la spermatocytogénèse: c'est le passage du stade spermatogonie au stade spermatide par méiose .

- La spermiogénèse :c'est la différenciation des spermatides en SPZ , qui sont à la fin libérés dans la lumière des tubes séminifères au cour de la spermiation , et les spermatogonies souches se renouvellent par mitose. les SPZ immatures libères dans la lumière de tube séminifères rejoignant l'épididyme la ou il vont avoir leur mobilité et l'aptitude à féconder ; c'est la maturation épидидymaire effectuer sous le control androgenique , ces dernier sont finalement stockés dans la queue de l'épididyme . (Reece,1997).

2-1-2-Fonction endocrine: ou sécrétion d'hormones : la sécrétion des hormones chez le mâle est assuré par les cellules de leydig et les cellules de sertoli au niveau des testicules .(figure)

\* les cellules de leydig : située dans le tissu interstitiel des testicules , sécrétant la testostérone et des hormones androgenique .(Fontbonne *et al* ,2000)(Reece ,1997). la testostérone a un rôle dans la spermatogénèse et elle intervient sur le développement structurel et sur le fonctionnement physiologique des glandes sexuelles accessoires . Finalement elle joue sur le développement des caractères sexuels secondaire et sur le développement et le maintient de la libido (Johnston *et al* ,2001a)( Reece,1997).

\* les cellules de sertoli :situées dans la paroi des tubes séminifère , sécrétant de nombreuses hormones dont l'activine , l'inhibine, et l'oestradiol ,ainsi que plus d'une soixantaine de protéines . De plus elles protègent , nourrissent et servent aux cellules souches .(Fontbonne,1992)( Johnston *et al* ,2001a).



**Figure 2:** Les différentes étapes de la spermatogénèse (Senger, 2012)

## **2-2-Le pénis:** érection et éjaculation

**2-2-1- L'érection** : correspond à l'augmentation de la rigidité du pénis , la présence de l'os pénien empêchant une réelle augmentation de la longueur du pénis , c'est au niveau de la largeur que le pénis augmente du volume notamment au niveau du bulbe érectile (Fontbonne,1992). (Figure3)

L'érection se fait sous le contrôle du système parasympathique via le nerf érecteur d'Eckard à l'origine d'une vasodilatation et système orthosympathique qui entraîne une contraction des fibres musculaires lisses .(Fontbonne,1992).

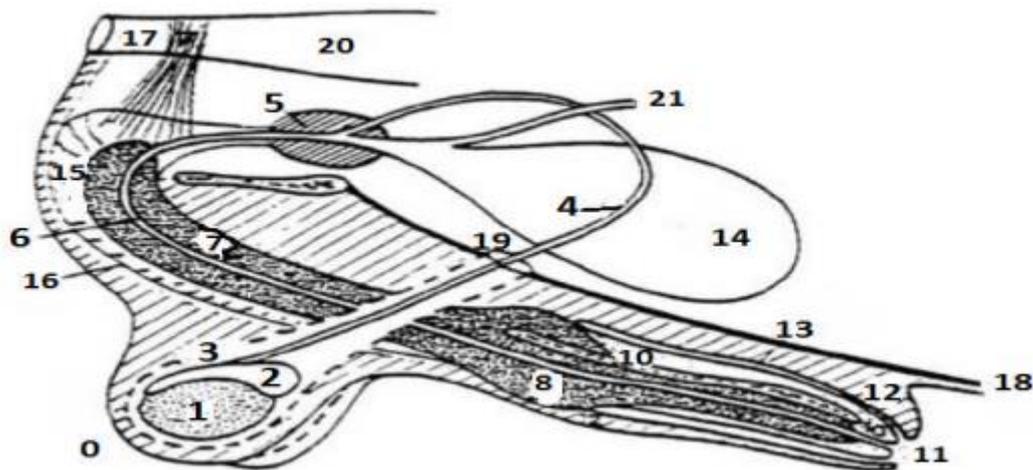
Elle débute par un afflux de sang dans le corps caverneux et par une augmentation de pression dans le corps spongieux . puis , la relaxation des muscles lisses entraîne une diminution de la résistance et une augmentation du flux artériel .l'augmentation de pression entraîne l'obstruction des veines empêchant ainsi le retour veineux .(Reece,1997)(Johnston *et al* ,2001a). Suite a l'érection ,il y a accumulation de sperme sous pression et contraction de la prostate et des canaux déférents .

**2-2-2-L'éjaculation** : Après l'accumulation du sperme , la pression augmente jusqu'à l'ouverture

du sphincter, donc éjaculation.

Cette dernière est sous le contrôle de système sympathique via le nerf honteux et du système orthosympathique via le nerf hypogastrique (Johnston *et al.*2001a).

La stimulation de plusieurs zones déclenche l'éjaculation notamment lors de la masturbation . il s'agit du bulbe érectile , de la pointe du gland , de la face interne de la cuisse et du périnée .(Fontbonne ,1992)( Johnston *et al* ;2001a).



**Figure 3:** L'appareil génital mâle (D'après Mialot J.-P., 1984)

**Légendes:**

- |                                   |  |                                       |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>0 : Scrotum</b>                | <b>1 : Testicule</b>                   | <b>2 : Épididyme</b>                  |
| <b>3 : Gaine vaginale</b>         | <b>4 : Canal déférent</b>              | <b>5 : Prostate</b>                   |
| <b>6 : Urètre</b>                 | <b>7 : Tissu érectile</b>              | <b>8 : Bulbe érectile</b>             |
| <b>9 : Os pénien</b>              | <b>10 : Gland du pénis</b>             | <b>11 : Orifice préputial</b>         |
| <b>12 : Fourreaux</b>             | <b>13 : Cvité préputial</b>            | <b>14 : Vessi</b>                     |
| <b>15 : Muscle bulbocaverneux</b> | <b>16 : Muscle rétracteur du pénis</b> | <b>17 : Muscle releveur de l'anús</b> |
| <b>18 : Sangle abdominal</b>      | <b>19 : Anneau inguinal</b>            | <b>20 : Rectum</b>                    |
| <b>21 : uretèr</b>                |  |                                       |

## **2-3-Les glandes annexes :**

**2-3-1- La prostate:** joue un rôle primordiale dans l'élaboration du sperme ; ces sécrétions représente les trois quart du volume spermatique . Ils ont des rôles multiples : effet tampon contre le PH vaginal, action bactériostatique, participation à la fin de la maturation des SPZ , propriétés immunosuppressives dirigées contre les éléments du tractus génital femelle. (Fontbonne,1992)( Johnston *et al* ,2001a).

**2-3-2 Les glandes préputiales:** jouent un rôle lubrifiant et sécrétient des phéromones.(Fontbonne,1992)

## **Chapitre 2:**

### **Récolte et analyse de la semence canine .**

## Récolte de la semence canine :

### A/ La semence canine :

La semence canine est un liquide biologique constitué de gamètes mâles (SPZ) et de sécrétions des glandes sexuelles accessoires s'unissant au moment de l'éjaculation (Prins,1998) . L'éjaculat canin de couleur blanchâtre ,varie en volume de 1 à 80 ml selon la race et l'individu (Johnston *al* ,2001b) . Il est structuré en trois fractions distinctes par leur origine , leur composition et leur volume (Fontbonne et Dumont,1992) (Tableau 1) .

	<b>Origine</b>	<b>Aspect</b>	<b>Volume</b>	<b>PH</b>	<b>Composition</b>
<b>Phase Pré -spermatique</b>	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2-6.5	+ Moins de 3 millions de SPZ + liquide prostatique
<b>Phase spermatique</b>	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3-6.6	+ Très riche en SPZ + Sécrétion Epididymaire
<b>Phase postspermatique</b>	Prostatique	Claire	4 à 30mL et plus	6.5-7.0	+ Très rare SPZ + liquide prostatique

**Tableau 1:** description des trois phases de l'éjaculat du chien

(Fontbonne et Dumont,1992)

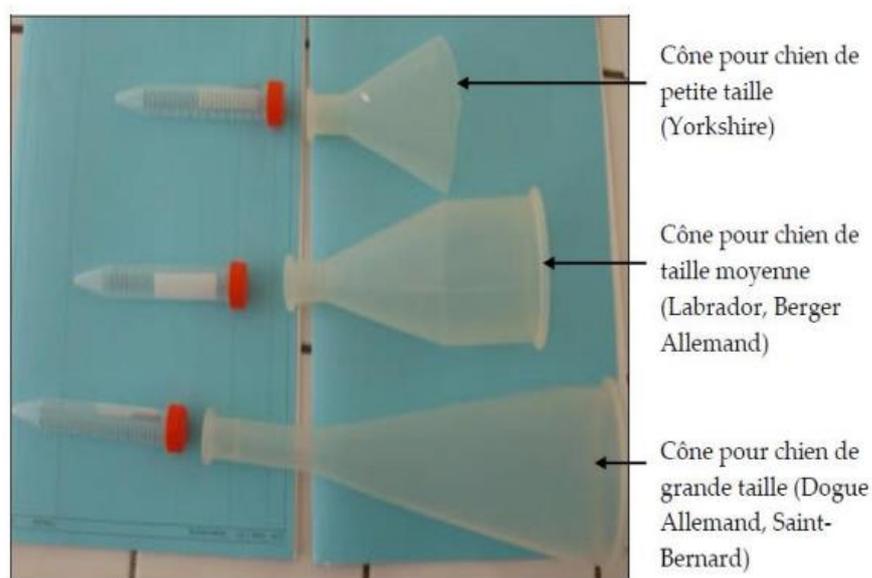
## **B/ La récolte de la semence de chien :**

Il existe aujourd'hui différentes techniques pour la récolte de la semence canine et si chacune assure une qualité minimale (liée à l'animal source) , les propriétés de la semence obtenue diffèrent grandement selon les paramètres .

### **\* Les différentes techniques de récolte :**

#### **1-Technique manuelle par masturbation : (par stimulation digital )**

C'est la méthode la plus répandue pour la récolte du sperme chez le chien , une technique déjà utilisée par l'abbé spllazani en 1780 (Fontbonne et Dumont ,1992). pour ce faire , on utilise des cônes en caoutchouc raccordé à des tubes de centrifugation stériles en plastique . Il faut éviter les récipients en verre qui pourraient blesser le chien (Fontbonne et Dumont,1992) .(Figure 4) le nettoyage des cônes nécessite une attention particulière par un rinçage abondant afin d'éliminer les détergents ,l'eau de javel ou les sulfamides (souvent spermicides) . un séchage minutieux est ensuite nécessaire pour garantir l'absence d'eau , potentiellement nocive pour les SPZ (Fontbonne et Dumont,1992).



**Figure 4 :** Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.

(Anne-Sophie Briffaut.,2007)

#### **\* La technique :**

Au cas où l'opérateur est droitier, il se positionne à gauche du chien. La main droite est utilisée pour masser le pénis du chien, la main gauche pour tenir le cône de récolte. Placé à la droite du chien, près de sa tête, le propriétaire dirige celle-ci vers la vulve de la chienne si cette dernière est présente (Feldman et Nelson, 1987), (Kutzler, 2005). (Figure 5).



**Figure 5 :** début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. (Cliché CERREC)

La récolte commence par un massage vigoureux en arrière des bulbes érectiles à travers le fourreau, afin d'induire une érection partielle. Lorsque les bulbes sont trop engagés ou lorsque le chien souffre d'un paraphimosis, le prépuce est alors récliné en arrière des bulbes érectile (Kutzler, 2005), (Fontbonne et Dumont, 1992). Dans ce cas, un gêne voire une douleur peut avoir lieu et l'érection peut alors cesser (Feldman et Nelson, 1987). Une pression est ensuite exercée à l'arrière des bulbes érectiles à l'aide de l'index et le pouce, cette pression mime la captation vaginale du pénis pendant la saillie (Fontbonne et Dumont, 1992).

Le chien présente alors des mouvements de va-et-vient du bassin pendant quelques minutes, ensuite il s'immobilise et soulève son postérieur pour essayer de se retourner.

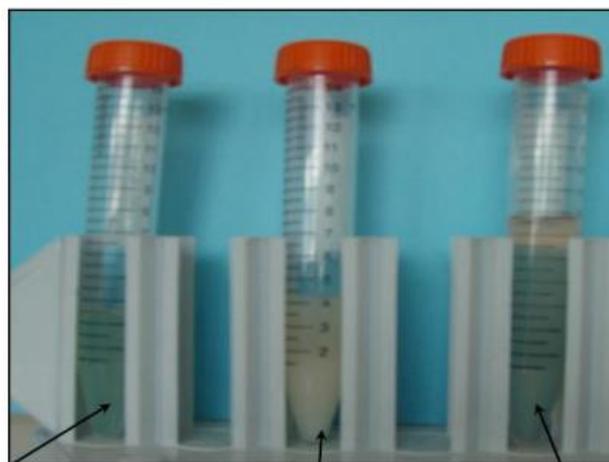
Le pénis peut être orienté vers l'arrière (caudalement), la pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (Kutzler, 2005). (Figure 6).



Deuxième phase      Echange des cônes pour récupérer la troisième phase

**Figure 6 :** orientation caudale du pénis (Cliché CERREC)

En ce moment l'érection est complète et l'éjaculation des deux premières phases se produit, elle est environ de deux à cinq minutes (Feldman et Nelson, 1987). Si la diminution de l'érection est observée, un massage de l'urtère périnéale peut être nécessaire (Fontbonne et Dumont, 1992). La séquence se poursuit par l'éjaculation de la troisième phase, la récolte totale de cette dernière n'est pas nécessaire en raison de sa durée longue. Il est aussi important de prélever une quantité suffisante pour analyser l'aspect. (Figure 7)



Phase pré-spermatique      Phase spermatique      Phase post-spermatique

**Figure 7 :** Les trois phases de l'éjaculat du chien.

(Anne-Sophie Briffaut., 2007)

## 2/ Les vagins artificiel:

Les vagins artificiels offrent l'avantage de mimer aux mieux l'accouplement ,mais cette méthodes n'est plus employée , car elle est plus complexe à mettre en œuvre , nécessite un équipement adapté à la taille de chaque chien , ne permette pas le fractionnement de l'éjaculat , et détériore la qualité du sperme (Fontbonne et Dumont ,1992) ( Johnston et al ,2001a).

## 3/ L'électroéjaculation:

Souvent utilisée chez le chat , cette méthode n'est pas couramment utilisée car elle exige une anesthésie générale , et elle favorise le risque de contamination urinaire de la semence (Johnston et al ,2001a)

## 4/ Technique pharmacologique :

Consiste a l'injection sous cutané d'une molécule a action parasymphomimétique.( Kutzler, 2005) a rassemblé les résultats d'essais de récolte de semence suite à l'administration d'agent pharmacologique : l'imipramine et xylazine d'une part et la pilocarpine d'autre part . cette technique présente des effets secondaires généraux mais aussi sur l'éjaculat en modifiant sa quantité et sa qualité . cette méthode n'est plus utilisée a l'heure actuelle .

Donc on a détaillés la technique de la récolte manuelle car c'est la méthode la plus utiliser et la plus simple et efficace en ce temps .

## **\*Les paramètres qui peuvent influencer la récolte et la qualité de la semence :**

### 1/En relation avec l'animal :

#### 1-1-L'age :

La puberté chez les chiens selon les races survient entre 7 et 18 mois , les chiens de petite taille étant généralement pubères plus précocement que ceux de grande taille .

L'age affecte la capacité du chien a produire du sperme . en vieillissant l'hypophyse produit de moins en moins de testostérone , ce qui affecte la production du sperme par le testicule ( Article sperme du chien ) .

L'âge de l'animal c'est un facteur à ne pas négliger , en effet un animal jeune peut malgré qu'il soit pubère être immature sexuellement parlant et à l'inverse un animal âgé ayant été utilisé pour de nombreux accouplements pour présenter une baisse de libido (Fontbonne ,1996)

### 1-2-Race :

Selon (Fontbonne ,2007) , par rapport aux autres races , les races naines et les plus timides et les chiens de défense agressifs produisent moins de semence .

### 1-3- La santé et la nutrition :

Un déséquilibre alimentaire peut agir sur la fertilité de l'animal :

\*Une alimentation pauvre surtout en protéines provoque de dysfonctionnement métaboliques qui entraînent une diminution de spermatogenèse (Delompré ,2011) .

\*Un manque de folates (vitamine B12) jouent un rôle dans la maturation des SPZ . il a été montré un lien direct entre une diminution du nombre de SPZ par éjaculat ainsi qu'une augmentation des anomalies et un déficit en folates . on correspond donc qu'une supplémentation en folates est parfois envisagée pour les cas d'oligospermie (Forges et al ,2008) .

\* une augmentation significative de SPZ anormaux (morphologie et motilité) est causée par un déficit en sélénium , en revanche il n'y aurait aucune incidence sur le volume et le nombre de SPZ dans les éjaculats (Delompre,2011).

\*Un déficit en zinc provoque par ailleurs une diminution du taux sérique de testostérone ainsi qu'une baisse de volume des éjaculats et de la qualité des SPZ produits (Colagar et al ,2009)(Delompre,2011)

### 1-4-Libido et stimulation :

Libido ou le désir sexuel , est un facteur lié au succès de la récolte de semence chez le chien .

Selon (Delompre,2011)et(Fontbonne,1996) elle influence ce processus par:

\*la volonté de saillir: Un chien qui présente une libido élevée est beaucoup plus enclin à tenter saillie la femelle en chaleur .

\*érection et éjaculation: Une libido élevée est généralement associée à une meilleure qualité d'érection et à une éjaculation plus rapide et complète . un chien peu intéressé sexuellement peut avoir des érection faible et incomplètes ,ou mettre beaucoup de temps à éjaculer , ce qui rend la récolte plus laborieuse et potentiellement moins abondante .

\*qualité de la semence : Un chien avec une bonne libido est plus susceptible de produire des éjaculats régulières et de volume suffisant , ce qui facilite la récolte d'une quantité adéquate de semence de bonne qualité . un chien avec une faible libido peut produire des éjaculats plus petits ou moins fréquents .

\*réponse à la stimulation : La libido influence la réactivité du chien aux stimuli sexuel , tels que les phéromones de femelle en chaleurs ou la manipulation par l'éleveur . un chien avec une forte libido répondra rapidement et efficacement à ces stimuli , facilitant l'érection et l'éjaculation .

\*manipulation facile : un chien avec une bonne libido est souvent plus coopératif lors des tentatives de récolte que ce soit par saillie naturelle ou manuellement . Il est réceptif aux manipulation et moins stressé par le processus , ce qui facilite le travail .

### 1-5-La fréquence de collecte :

Une fréquence de prélèvement supérieure à 1 fois tous les 2 jours entraînant une diminution du nombre de SPZ mobiles par éjaculat . les auteurs ont donc établi que la fréquence maximale de prélèvement n'entraînant pas de modification de la qualité de la semence était d'une fois tous les 2 jours .( OTT ,RS *et al* ,1987)

une période de repos trop longue entre 2 éjaculations provoque une baisse de la mobilité des SPZ et une augmentation de pourcentage de SPZ anormaux (VIVIN,2019).

### 2/ En relation avec l'environnement:

#### 2-1-L'endroit :

L'endroit idéal est une pièce calme avec une bonne adhérence sous les pattes des chiens et un endroit doux pour que la personne qui recueille s'agenouille , mais aussi pour conserver l'odeur de la chienne en chaleur précédente . ces tapis sont rarement lavés afin d'améliorer l'arome de la zone pour l'étalon . Il est préférable d'utiliser la même entrée de l'hôpital et la même pièce pour le recueils , car de nombreux chiens identifient rapidement la raison de leur présence à l'hôpital , ce qui facilite les recueils . Pour les chiens facilement distraits , les sonnerais de téléphone , les minuteurs et le téléphones portables doivent être éteints . le personnel ne doit pas frapper à la porte ni entrer pendant le recueil d'un chien distrait ou timide . (Marthina L,

Greer, DVM ,JD ,2014)

## 2-2- Personnel et vétérinaire:

Si le chien a une préférence , dans la mesure du possible la personne qui effectue le recueil doit rester la même , car cela est à niveau psychologiquement bénéfique pour le chien .

Certains chiens développent «un syndrome de la blouse blanche» , si le chien est réticent à la collecte , le retrait des blouses de laboratoire et des stéthoscopes de la personne qui recueille peut améliorer le niveau de confort du chien .

Deux membres de personnel doivent être présents , l'un pour maintenir la chienne d'excitation et l'autre pour recueillir le sperme de l'étalon .

La plus part des chiens comporteront bien en présence de leur propriétaire ou de leur manipulateur . le manipulateur peut se tenir à coté du chien mais il doit être informé de tenir la laisse lâchement(en supposant que le chien ne mord pas ) et de parler le moins possible , car cela peut dérouter le chien . de nombreux chiens sont très «à l'écoute» de leurs propriétaires / manipulateurs , et le fait de parler peut être mal interprété par le chien , qui pourrait pense qu'il fait quelque chose qu'il ne devait pas faire, aucune autre personne ne doit se trouver dans la pièce . (Marthina L, Greer, DVM ,JD ,2014).

## 2-3- La présence de la femelle :

La présence d'une chienne en œstrus est conseillée mais absolument pas nécessaire . cependant, elle peut aider à la récolte de chiens timides à faible libido ou nerveux . de plus , la présence d'une chienne en chaleur augmente la qualité de l'éjaculat (Johnstone et *al* ,2001b ) (Figure 8 ) .



**Figure 8 :** Présence d'une femelle en œstrus lors de la récolte manuelle de semence canine  
(Cliché CERREC).

## **Analyse de la semence canine:**

### **1-Examens macroscopiques :**

#### **1-1-Volume de l'éjaculat :**

Juste après la récolte le volume est mesuré par lecture directe sur le tube de collecte gradué .la mesure du volume est importante pour évalué le nombre totale de SPZ dans l'éjaculat mais elle peut pas être un indicateur de la qualité de semence (Johnston *et al* ,2001)

#### **1-2-Couleur et Aspect :**

La première phase est généralement translucide ou un peut opaque . la deuxième phase est caractérisée par une couleur laiteuse et opaque , et la troisième phase est translucide .

Si la deuxième phase apparaît translucide cela peut indiquer une azoospermie ; ce fait étant lié à la corrélation entre l'opacité de la seconde phase et la concentration en SPZ . (Feldman et Nelson , 2004 a)

Des coloration anormales peuvent être observées:

\*une coloration jaunâtre peut signifie une contamination par l'urine ou le pus .

\*une coloration verdâtre évoque une présence de pus .

\*une coloration rougeâtre mettant en évidence un saignement prostatique ou pénien (Freshman JL,2002).

#### **1-3-Le pH:**

Le pH normal de plasma séminal d'un chien est entre 6.3 à 7.0 ; cela doit être mesurée directement après le prélèvement par un équipement précis(pH mètre probablement)(Threlfall,2003). la plage normale de liquide prostatique varie entre 6.0 à 7.4 avec une moyenne de 6.5ou 6.8 . (Feldman et Nelson,1996)(Johnston,1989).

### **2-Examens microscopiques:**

#### **2-1-La mobilité massale:**

Elle présente des mouvement de dispersion et de réunion de spermatozoïdes .la notation entre 0 à 5 est attribuée par l'observateur (Tableau 2)

Malgré sa simplicité et son manque de précision cette observation révèle à la fois la vitesse de progression et la concentration des SPZ (Fontbonne et Dumont ,1992).

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

**Tableau 2:** Échelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine , dérivée de l'échelle de MILOVANOV (Milovanov,VK ,1962).

### 2-2-La mobilité progressive (individuelle):

Par un fort grossissement entre lame et lamelle se fait l'examen de sperme pour apprécier le pourcentage de SPZ qui sont en mouvements et leur vitesse et leur trajectoire est estimé .les SPZ fléchant sont les SPZ qui traverse rapidement le champs microscopique (Guigardet V,1997)(Fontbonne,1995).

### 2-3-La numération spermatique:

Les méthodes manuelles sont rapides , simples et peu exigeantes en matériel ,débutent par la dilution du sperme dans un liquide hypertonique comme le chlorure de sodium à 3%, ce qui a pour effet d'immobiliser les SPZ . cette dilution est effectuée à l'aide de mélangeurs de potain , couramment utilisés pour la numération des cellules sanguines.une dilution au centième ,voir au deux centième ,est effectuée si l'examen microscopique à faible grossissement révèle un sperme concentré en SPZ ;par contre , si la concentration est faible , une dilution au deuxième ou au vingtième suffi .une fois diluée , une goutte de la préparation est placée sur une cellule hématimétrique ( Neubauer, Malassez ou Thoma ) (Figure 9) . les SPZ sont comptés en respectant des règles précises. Des facteurs multiplicateurs permettent d'obtenir la concentration ainsi que le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat . L' interprétation de

cette concentration est complexe car elle dépend de la quantité de fluide prostatique recueillie lors du prélèvement .(Fontbonne,1995).



**Figure 9:** cellule de thoma (Bousenna ,2013)

#### 2-4 Le spermocytogramme :

C'est l'étude de la morphologie de spermatozoïdes en les observant au microscope optique à contraste de phase après coloration . plusieurs anomalies peut être observées (Tableau 3)

Anomalies du flagelle	<p>Flagelle replié</p> <p>Flagelle rudimentaire ou cassé</p> <p>Flagelle enroulé</p> <p>Gouttelette cytoplasmique distale</p>
Anomalies de la pièce intermédiaire	<p>Pièce intermédiaire dédoublée</p> <p>Déformations de la pièce intermédiaire</p> <p>Gouttelette cytoplasmique proximale</p>
Anomalies de la tête	<p>Tête piriforme</p> <p>Tête repliée</p> <p>Tête décapitée</p> <p>Tête ronde</p>

**Tableau 3 :** Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Rigal, 2008)

#### 3-L'analyse informatique de la semence (CASA: Computerized Assisted Sperm Analysis )

CASA ou les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur , ces derniers offrent une

évaluation rapide et objectif d'une grande quantité de SPZ ce qui permet d'obtenir de nombreux paramètres différents .( Figure 10)



**Figure 10:** Équipement pour L'analyse Spermatique assistée par ordinateur, CASA, Hamilton Thorn IVOS II

Pour évaluer la mobilité des SPZ chez le chien ; deux systèmes sont actuellement disponible . le système Hamilton-Thorne est parmi eux , il a été validé pour un usage canin par( IGHEROUADA et VERSTEGEN, 2001a ) . C'est un analyseur d'image capable d'évaluer plusieurs paramètres tels que : le pourcentage de SPZ mobiles , la vitesse moyenne , la vitesse curvilinéaire, la vitesse en ligne droite , la linéarité ainsi que l'amplitude et la fréquence des battement flagellaires .

Cette appareil mesure plusieurs paramètres de mobilité tels que :

- \*la motilité totale (TMOT) : pourcentage de SPZ en mouvement ,sans distinction de leur qualité de déplacement .

- \*le pourcentage de SPZ progressifs (PMOT) : des SPZ qui ont une vitesse moyenne (VAP) > 50 nm/s et une linéarité (VSL/ VAP) >75%

- \*le pourcentage statique : c'est les SPZ immobiles

- \*les différentes vitesses mesurée :

  - VCL : vitesse suivant le trajet réel du SPZ point par point

  - VSL : vitesse en ligne droite entre le points de départ et d'arrivée.

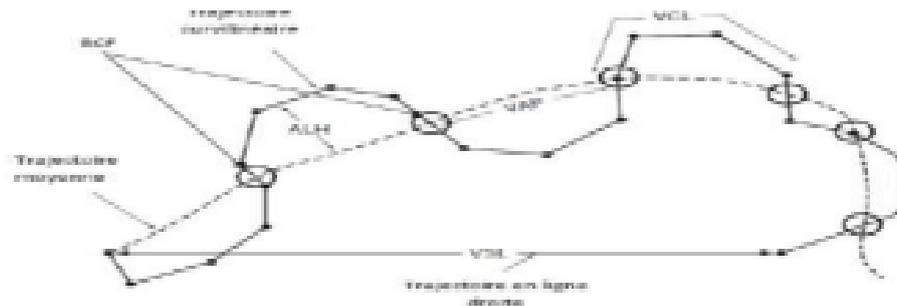
  - VAP : moyenne de VCL après lissage du trajet (Figure 11)

- \*ALH( Amplitude of Lateral Head Displacement)amplitude de déplacement latéral de la tête du SPZ .

\*BCF ( Beat Cross Frequency) fréquence de battement de la tête du SPZ .

Ce système permet d'évaluer un nombre élevé de SPZ en peu de temps , toute fois il nécessite un matériel coûteux réservé aux centres spécialisés .(Baril *et al* ,1993)(Pena Martinez,2004)( Alliman,2010).

Les SPZ ayant subit la capacitation présentent une vitesse curvilinéaire accrue , une grande amplitude de déplacement latéral de la tête et une baisse linéaire . cette technique permet une évaluation beaucoup plus spécifique de la mobilité d'un nombre élevé de SPZ en un temps limité d'une façon simple et après un paramétrage minutieux . elle est peut être utilisée sur un sperme frais , réfrigéré ou congelé / décongelé .(Baril *et al* ,1993)(Pena Martinez,2004)( Alliman,2010).



**Figure 11:** Représentation schématique de VAP , VCL , VSL (Cannon 2015)

## **Chapitre 3:**

### **Cryoconservation de la semence canine :**

## **Introduction**

la semence canine peut être conservée sous forme liquide pendant quelques jours ( à court terme ) par un protocole de cryoconservation à l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$  ) . Une interruption artificielle de la progression du SPZ vers la maturation et la fertilisation qui suit naturellement l'éjaculation est due aux processus de cryoconservation ou réfrigération .Il comprend donc les étapes successives depuis le moment où le SPZ quitte le milieu ( température ) corporel jusqu'à son retour à cette température (Watson,2000) .

Dans le cadre de la conservation de la semence,deux grands objectifs sont visés généralement par des différents mécanismes de cryoprotection spermatique .le premier objectif est d'augmenter le taux de SPZ viables après congélation décongélation , en diminuant les lésions fatales dues à la cryoconservation . le deuxième est d'assurer une meilleure qualité des SPZ qui survivent à la cryoconservation , en limitant les problèmes de fonctionnement dues à ce processus .( Watson,2000)

### **1- La centrifugation :**

Consiste à la séparation des SPZ au liquide séminal . Elle doit pas être trop vite pour prévenir les dommages des SPZ . une centrifugation de  $180\times g$  ,  $720\times g$  ,  $1620\times g$  et  $2880\times g$  pendant 5 minutes . les deux dernières endommagent l'intégrité membranaire et la meilleure est  $720\times g$  pendant 5 minutes .(RIJSSELEAR T *et al* ,2002).

### **2- La dilution :**

#### **2-1-Les dilueurs de congélation et de réfrigération:**

Utilisés pour conserver le sperme , les dilueurs créent un environnement optimal en régulant l'osmoticité et le pH ,tout en fournissant l'énergie nécessaire aux SPZ pendant le stockage à  $4^{\circ}\text{C}$  ou durant les phases de refroidissement d'équilibration et de congélation en vue de cryoconservation . les dilueurs de réfrigération et de congélation de semence contiennent généralement une source d'énergie , des tampons et des antibiotiques ; pour assurer ces fonctions.

l'adaptation empirique des dilueurs utilisés chez le bovin a imité l'emploi de tampon à base de

glucose -phosphate (Lofsted,F, 1956), citrate (Harrop ,1962), chloride-phosphate (Wales,1963),lactose (seager,1969), tris(Trimethylhydroxyaminomethane) (Gill,Hp. *et al* , 1970) et tris fructose-citrate (Foote, R,H .1964.)( Andrson,K, 1972,1975) dans les premières expérimentation pour la conservation réfrigérée ou congelée du sperme canin .

Pour protéger les spermatozoïdes du froid , les dilueurs doivent contenir des stabilisants membranaires , comme le jaune d'oeuf (JO) . de plus , les dilueurs de congélation intègrent des substances cryoprotectrices spécifiques ,qui empêche la formation des cristaux de glaces .

## 2-2-Les cryoprotecteurs proprement dit(CPA) :

Les cryoprotecteurs sont ds solvants organiques employés seul ou en association . Ils peuvent être divisés en deux groupes : pénétrants et non pénétrants à travers la membrane du SPZ .

\* Les cryoprotecteurs pénétrants: sont des molécules d'un poids moléculaire légère , hydrosoluble à température ordinaire , protecteurs de radicaux hydroxyles (alcools glycérols ,éthylène , glycol, propylène glycol) ou sulfoxydes (diméthylsulfoxide DMSO) .

\*Les non pénétrants sont des substances de faible poids moléculaire (la plus-part des sucres ajoutés : le galactose , le glucose ,le saccharose , le tréhalose ..... ) ou de poids moléculaire élevée (le polyvinylpyrrolidone , l'alcool polyvinylique , l'acide hyaluronique ..... ) .

Dans la congélation du sperme canin ,le glycérol est utilisé efficacement depuis longtemps et s'est prouvé mieux que les dilueurs entraine , dans un premier temps une déshydratation des cellules par effet d'une forte osmose . une fois qu'il est à l'intérieur des SPZ , ses radicaux hydroxyles s'accroche par des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau , retenant ces dernières à l'intérieur de la cellule (Hammerstedt, *et al* ,1990).le volume cellulaire remente jusqu'à attendre l'équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane .

Le glycérol baisse alors les flux hydrique et solubilise les sels intracellulaire . Il garanti ainsi la conservation du volume cellulaire . cet équilibre est obtenue en une vingtaine de seconde mais s'accélère avec la température .

En fin, l'ajout de glycérol permet de diminuer le volume cellulaire mais il contribue aussi à la baisse du point de congélation de l'eau en dessous de -6°C et fait chuter la concentration en électrolytes de la fraction d'eau non congelées . Cela modifie aussi le schéma de cristallisation

de l'eau qu'il devient cubique et moins anguleux, une mort cellulaire causée par diminution de risque de lésions membranaire (Holt, W.V, 2000).

Le glycérol apporte donc aux SPZ un environnement adéquat à la préservation et à l'intégrité de leur membranes et de leur fonction (Fortier, M, 2010).

Le glycérol n'est pas sans inconvénient. A côté de ses avantages cryoprotectrices, il a été montré qu'il a un impact nocif sur les SPZ touchant toute les parties de la membrane plasmique (Hammerstedt, *et al*, 1990). En plus il altère fortement l'osmolarité du dilueur (England, G.C.W, 1992).

### 2-3-Les stabilisants membranaires:

Les agents stabilisants membranaires aussi nommés protecteurs membranaires de refroidissement (Farsted, W, 1996), sont représentés classiquement par le JO entier ou par des extraits du JO en l'occurrence le plasma ou plus spécifiquement les lipoprotéines à basse densité (LDL, pour low density lipoproteins). plus récemment, de nouvelles substituer au JO. Il s'agit d'assemblages molécules de phospholipides appelés liposomes.

#### 2-3-1-Le jaune d'oeuf (JO):

pour la première fois en 1940, PHILIPS et LARDY suggérèrent l'usage de JO pour la conservation de la semence bovine. (Philips et Ladry, 1940). Depuis, il a été exploré de façon extensive pour devenir vite le protecteur idéal du SPZ contre le choc de refroidissement. Le JO entier a pu être utilisé avec réussite sous forme lyophilisée (commercialisée par sigma) dans la congélation du sperme de bélier (Marco-jimenez *et al*, 2004) et de buffle (Ansari, M.S. *et al*, 2010).

la mobilité après décongélation était meilleur pour le JO en poudre après une comparaison effectuée entre la forme lyophilisée (en poudre) et la forme naturelle (en liquide).

Mais après l'utilisation du JO pendant longtemps, plusieurs inconvénients apparaissent. en effet, le JO n'est pas une entité chimiquement définie, mais une substance biologique complexe contenant des protéines, des vitamines, des phospholipides, du glucose et des antioxydants qui peuvent servir à préserver l'intégrité de la membrane plasmique des SPZ.

Malheureusement, il comporte aussi un risque de contamination bactérienne du dilueur

(Bousseau, S. et *al.* 1998) , ainsi qu'une forte diversité biologique dans sa composition lié a plusieurs facteurs tels que la race , l'âge et la nutrition des poules (Bousseau, S. et *al.* 1998) (De Leew, F.E . et *al.* 1993)

Le jaune d'oeuf contient de la progestérone qui est engagé dans la capacitation du SPZ par activation secondaire des canaux calciques entraînant ainsi un afflux important de  $Ca^{2+}$  dans la cellule (Aitken et Mc Laughlin,2007).

Le JO contient aussi les granules qui sont capable d'empêcher la respiration des SPZ (directement par HDL : pour high density lipoproteines )(Kampschmidt, et *al.* 1953) (Pace et Graham, 1974) (Watson et Martin, 1975) (Holt,2000), . la toxicité des HDL apparaissent après décongélation est , soit associée à un effet cytotoxique direct , ou à un changement des propriétés physique du dilueur (Courstens et Rety,2001) les granules perturbe aussi l'évaluation de la mobilité des SPZ décongelés par effet mécanique et provoque une sur estimation du nombre de SPZ détectés immobiles par l'analyseur d'image par erreur avec des têtes de SPZ ayant un diamètre comparable (Anzar et *al.* 1991) , ils interfèrent également avec certaines dosages biochimique (Wall et Foote,1999) .

A cause de tous ces défauts . le JO devait être remplacé dans les dilueurs de conservation de la semence , cet impératif a donné lieu à un examen minutieux pour comprendre d'abord ces modes d'action et isoler les substances responsables de ses facultés cryoprotectrices .

Ainsi il a été mis en évidence que les propriétés cryoprotectrices du JO sont liées aux lipoprotéines de basse densités (LDL pour: low density lipoproteines ) . (Pace M.M et Graham E.F. 1974) (Foulkes,J.A. 1977) (Quinn,*et al.* , 1980) (Moussa et *al.* 2002)

### 2-3-2-Le plasma du jaune d'oeuf :

Le plasma du jaune d'oeuf (PJO) est la partie soluble obtenue par simple dilution et centrifugation du JO entier en granules (sédiment 19-23% du JO)et en plasma (culot 77-81%) (Moustacasa et *al.* 2011),(Neves et *al.* 2014) , il est constitué des LDL (15%) et des glycoprotéines globulaires (85%)( principalement alpha et bêta et gamma - livetines )qui peuvent être retirées par précipitation au sulfate d'ammonium dans l'extraction des LDL pure (Moussa, M., et *al.* 2002). (Anton et *al.* 2003 )

Le principe de fonctionnement du PJO a été abordé pour la premier lieu par BURLEY et COOK en 1961 (Burley et Cook,1961). puis détaillée par MACBEE et COTTERIL en 1979 (MacBee et

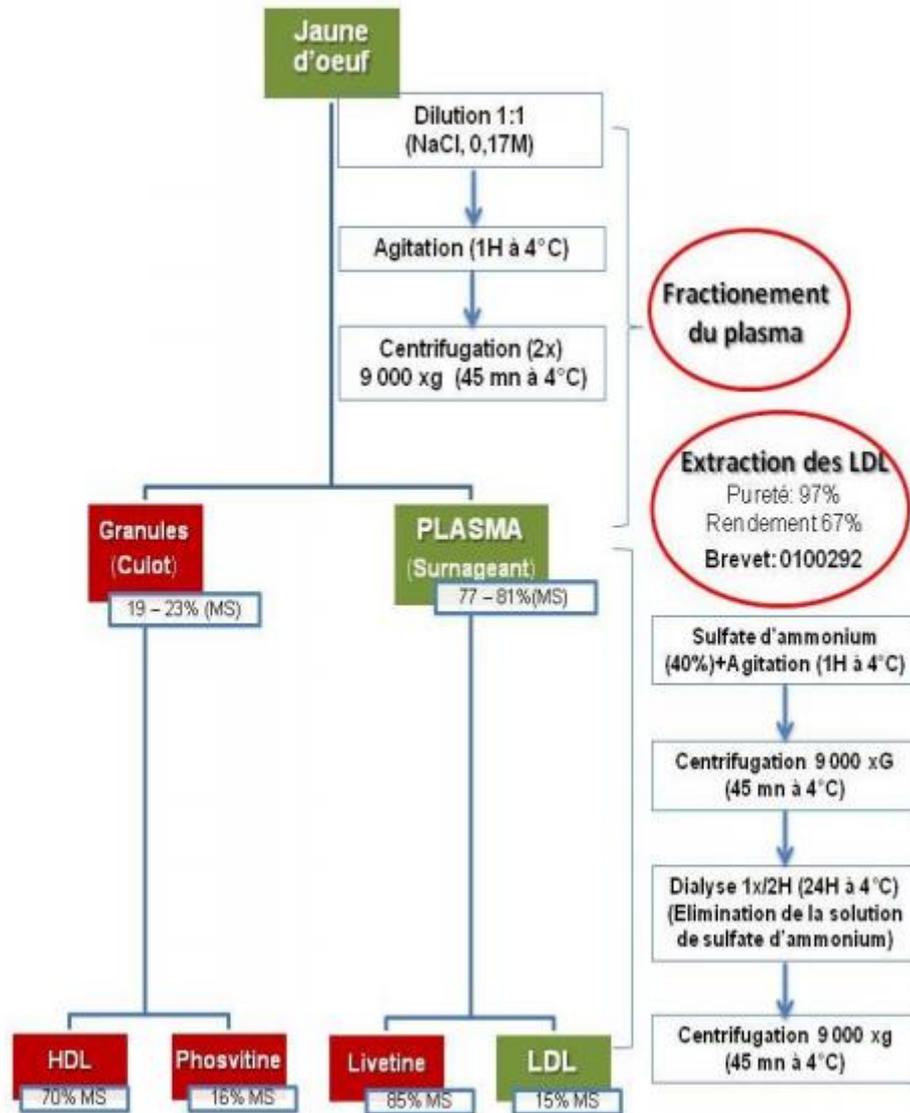
Cotterill, 1975) , il s'agit d'un procédé analytique ( Figure 12 ) mais très simple reposée sur une double centrifugation après dilution avec une solution saline

Le procédé analytique utilise généralement le jaune d'œuf partir d'œufs frais cassés au laboratoire comme le montrent pratiquement toutes les études disponibles dans la littérature . Quoique facile à faire au laboratoire , ce procédé demeure analytique et ne peut être transposable à l'échelle industrielle en raison d'une part de la restriction d'emploi des œufs frais et d'autre part l'accélération centrifuge supérieure exigée .

Cependant , par substitution des œufs frais par le mélange industriel du JO et l'ultracentrifugation par un décanteur centrifuge et en insérant une étape d'homogénéisation . Le fractionnement du JO a pu être utilisé industriellement et défendu par un brevet européen ( Kerandivez, C.Y., 19.11.1990 ) déposé par SICA.SA dite société laitière de l'ouest en date du 19/11/1990 et publié sous le numéro (EP0430757A1)( Figure 13 )

Des études menées récemment ont montré que le PJO naturel peut être une alternative viable au JO entier dans la cryoconservation de sperme canin (Corcini et al .2015) . PILLET et ses collaborateurs (Pillet et al . 2011 ) ont montré en 2011 que le PJO pouvait être stérilisé par gamma ionisation à la dose de 5 kg sans modification de ses propriétés cryoprotectrices . Les résultats recueillis avec le PJO préparé en laboratoire empêchant de conclure quant à l'efficacité du PJO produit industriellement , il serait donc crucial de réaliser des tests de congélation avec le PJO issu de procédés industriels pour une évaluation plus pertinente . De plus , les nouvelles études portent sur le remplacement du JO par le plasma , mais n'ont pas explorés son remplacement des LDL surtout avec les restrictions industrielles que posent ces substances .

La possibilité de lyophiliser le PJO sans qu'il perde ses propriétés cryoprotectrices ouvrirait de nouvelles voies pour sa conservation durable sa manipulation et son exploitation commerciale .



**Figure 12:** Procédé analytique de fractionnement du JO et d'extraction des LDL . (MacBee, LE. Et Cotterill, OJ. 1979) (Moussa *et al*,2002)

**Légende :** JO : Jaune d'œuf, PJO : Plasma du jaune d'œuf, LDL : lipoprotéines de faible densité (pour Low density lipoproteins), HDL : lipoprotéines de haute densité (pour high density lipoproteins)



**Figure 13 :** Procédé industriel de fractionnement du JO selon le Brevet Européen n° 0 430 757 A1 déposé la 19.11.1990 par SICA S.A. dite : Société Laitière de l'Ouest (Kerandivez ,CY)

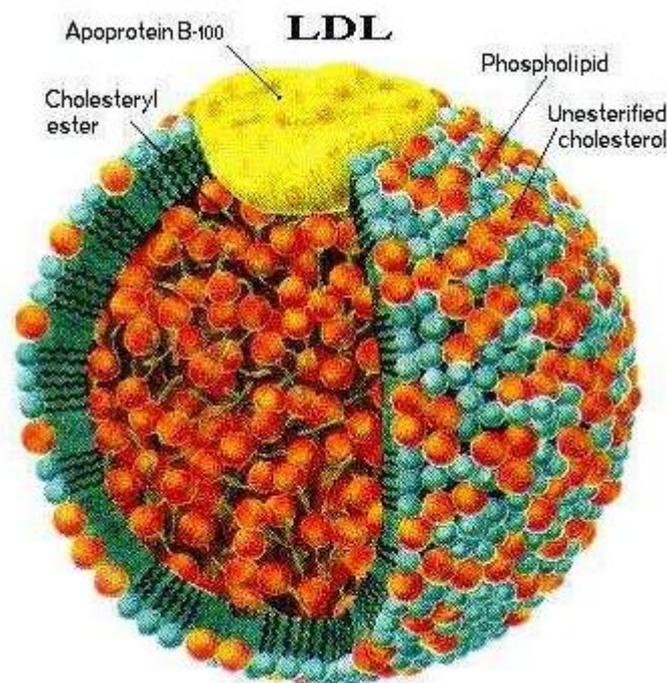
**Légende :** PJO : plamsa du jaune d'œuf

### 2-3-3- Les lipoprotéines à faible densité (LDL) :

#### A-Structure

Sont les éléments majeurs du JO , elle représentent 66% de sa matière sèche et 24 % des protéines totales du jaune (Thapon et Bourgeois.,1994) , les LDL ont une densité de 0.98 (Martin *et al.* .1959) des masses moléculaires (MM) varie entre 3 et 10 millions de daltons (Da) et contiennent environ 11% de protéines et 80 à 89 % de lipides (Powrir et Nakai ,1986).

Un mélange des LDL est considéré comme une microémulsion d'huile liquide stabilisé par une membrane de phospholipide et de protéines (Kamat *et al.* 1972) . les LDL sert a des micelles et possèdent une forme sphérique avec un diamètre entre 17 et 60 nm , se situent en moyenne à 30 nm (Chang *et al.* ,1977) , elles sont composées d'un cœur de lipides neutres entouré par une monocouche de phospholipides et proportions de triglycérides et de sterols formant le cœur apolaire et dans une moindre proportion , de la teneur en phospholipides (Evans *et al.*, 1973) .



**Figure 14** :structure d'une lipoprotéine à faible densité (LDL pour low density lipoprotein) (Bencharif,2009)

#### B-Procédés d'extraction des LDL:

La méthode la plus simple et la plus vite a été décrite par MOUSSA et ses collaborateurs en

2002 (Moussa, M., et al., 2002) permettent d'avoir un pourcentage de pureté de 97% et un rendement de 67%. Ce procédé a donné lieu à un brevet français déposé conjointement par l'institut national de recherche agronomique (INRA) de Nantes et Oniris le numéro 00100292.

#### C-Applications :

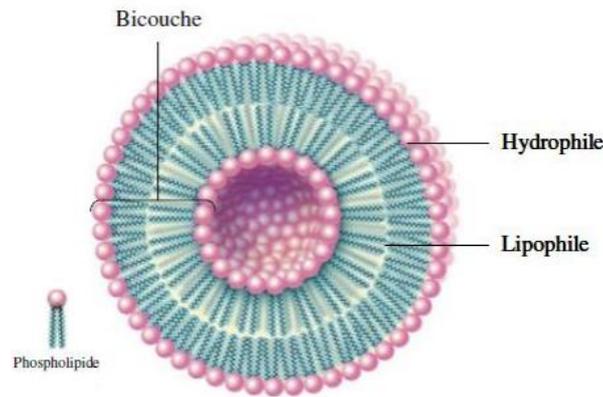
Les applications des LDL sont très utiles et ont prouvé leur utilités dans la cryoconservation de la semence bovine depuis les travaux de MOUSSA et ses collaborateurs 2002 (Moussa, M., et al., 2002) et ceux d'AMIRAT et ses collaborateurs 2004 (Amirat et al., 2004) qui ont révélés que la concentration optimale était de 8%(w/v)

chez le chien, les travaux de BENCHARIF et ses collaborateurs en 2008 (Bencharif et al., 2008) ont prouvé l'efficacité d'une concentration de 6%(w/v) à préserver les facteurs de mobilité, la fertilité *in vitro* et *in vivo* dans la congélation (Bencharif et al., 2008) et ont mené au développement d'un dilueur commercial (Canifreez, IMVE Technologie, Aigles, France). Cette même concentration a montré son efficacité dans la réfrigération de la semence canine (Bencharif et al., 2013) et a donné naissance à un dilueur commercial de réfrigération sous le nom (Canixcelle, IMV Technologies, Aigles, France)

#### 2-3-4-Les liposomes:

BANGHAM et ses collaborateurs 1965 ont été les premiers à fabriquer volontairement des liposomes (Bangham et Horne, 1964).

Il s'agit de vésicules sphériques de presque quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre qui sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire à un milieu extérieur. (Figure 14)

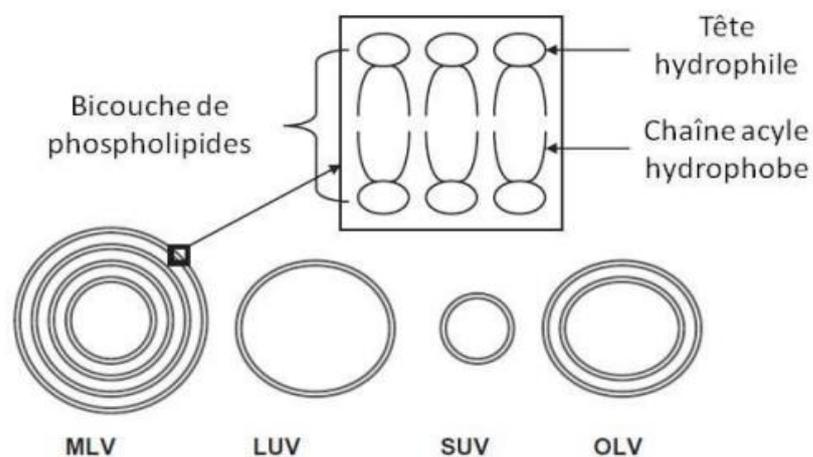


**Figure 15:** Structure d'un liposome unilamellaire( Castagne.,2010)

Ces liposomes résultent d'une organisation stable des phospholipides dans un milieu aqueux , les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui se caractérisent par une tête polaire et une queue apolaire . en milieu aqueux , ils recherchent l'organisation la plus stable en minimisant les interactions entre composants hydrophobes et molécule d'eau . les lipides s'organisent le plus souvent en bicouche avec une queue apolaire au centre de la bicouche non accessible à l'eau et des têtes polaires exposées aux milieux aqueux .

A- Structure :

On classe les liposomes selon leur taille et leur nombre de bicouche en vésicules multilamellaires (MLV pour multilamellar vesicles) , vésicules unilamellaires de petite taille (SUV pour small unilamellar vesicles) , vésicules unilamellaires de grande taille ( LUV pour large unilamellar vesicles ) et les liposomes géants (GUV pour giant unilamellar vesicles) .(Figure 16)



**Figure 16:** Différents types de liposomes(Castagne,2010)

## B- Applications :

### B-1-Applications thérapeutiques:

les liposomes sont utilisés pour véhiculer des principes actifs dans l'organisme , ils sont capables d'encapsuler les médicaments lipophiles , hydrophiles et amphiphiles . une fois dans la circulation , le principe actif est délivré dans la cellule par fusion ou endocytose avec les membranes cellulaires (Redziniak, 2003) (Espuelas *et al* ,2003) .

Les liposomes peuvent être utilisés comme vecteur de thérapie génique en capsulant un gène ou un plasmide; qu'ils libèrent par fusion avec l'endosome une fois dans la cellule 198 , ils sont également employés comme (antigènes) à leur surfac, les présentant aux macrophages et activant le système immunitaire tels les virus . ces liposomes sont ainsi appelés virosomes et sont employés comme vaccins (Kapczynski,2003)

### B-2Application cosmétologique :

Les liposomes sont utilisés pour véhiculer et libérer lentement des substances telles que les antioxydants ou le collagène . leur utilisation se substitue à l'emploi classique des émulsion huileuses et solutions alcooliques capables d'endommager la peau en cas d'application prolongée (Redziniak, 2003).

Les liposomes ont aussi diverses application biochimique et biophysique . Dans ce domaine ils sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires . En effet , ils constituent un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques (molécule biomimétique). leur avantage dans cette application réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales afin d'étudier l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires (Lorin *et al* , 2004 ).

En effet les liposomes constituent des modèles parfaits pour l'étude de ce qui se déroule au niveau membranaire lors des différents processus tel que la fusion (Martin et Ruyschaert , 2000).

Dans la revue de la littérature , ce ne sont pas les étapes de la fusion des liposomes qui nous intéressent mais plutôt les conclusions concernant les facteurs qui gouvernent le comportement

des liposomes . Il nous semble utile de relater ici ces conclusions pouvant aider à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction avec la membrane plasmique du spermatozoïde surtout que ces conclusions concordent avec ce qui a été rapporté par des autres ayant étudié la fusion entre les liposomes et les SPZ .(De Leew et *al* .1993).

L'analyse de la fusion des liposomes a montré que les deux bicouches devait entrer en contact avant la fusion , impliquant au moins de manière transitoire un réarrangement de la bicouche et l'adoption par les lipides d'une structure d'énergie plus élevée . cet assemblage ne se réalise pas spontanément .la présence de catalyseur est nécessaire (Chernomordik et Kozlov, 2003).

Dans le cas de la fusion virale , il a été clairement montré , par analyse de fusion de liposomes , que le catalyseur pouvait être un petit fragment d'une glycoprotéine de surface virale , qu'on appel «peptide de fusion» (Epan, 2003).

Ces segment protéique s'insèrent obliquement dans la membrane et perturbent le parallélisme des chaînes acyle de phospholipides , qui se réorganiserait autour des peptides de fusion (Brasseur , 2000) . Après rapprochement des deux bicouches , la fusion entre les zones déstabilisées peut s'opérer . les deux membranes mélangent leur composant et fusionnent (White , 1992).

Par ailleurs , il a été établis que l'efficacité de la fusion dépend de la nature des lipides dans la zone de contact entre les deux liposomes . En effet , les lipides sont animés d'une diffusion latérale importante ce qui rend la zone de contacte enrichie en lipides , tels que le cholestérol et les sphingolipides , ces derniers auront alors tendance à adopter une organisation hexagonale favorable a la fusion (Shaikh et *al* ,2003) .

### B-3-Application en cryoconservation spermatique:

QUINN et CHOW 1980 (Quinn,*et al* , 1980) ainsi que GRAHAM et FOOTE 1987 (Graham et Foote , 1987) sont les premiers qui ont découvert l'effet stabilisant de liposomes dans la lutte contre le choc thermique au cours du procédé de cryoconservation du sperme . Depuis leur travaux , plusieurs études de sont succédées , et les liposomes sont actuellement l'objet d'étude visant à les substituer au JO dans la cryoconservation spermatique .

### 3- le conditionnement :

Pour que la semence soit facilement utilisable et identifiable . elle doit être fractionnée dans des pastilles ou des paillettes .

### 4- La congélation :

Se fait en deux étapes , la première est le refroidissement préalable à 70° , sur un portoir à l'intérieur d'une boîte de polystyrène dans les vapeurs d'azote durant 10 minutes les paillettes sont déposées . la deuxième est de les mettre dans l'azote liquide à -196°C.

### 5- Le stockage :

Des visotubes identifiés ou les paillettes sont disposées , sont stockés dans des containers d'azote .

## Conclusion:

Ce travail de synthèse bibliographique montre que la cryoconservation de la semence canine constitue un outil essentiel en médecine vétérinaire reproductive. Elle permet non seulement la **préservation du patrimoine génétique**, mais également une **meilleure gestion des programmes d'élevage**, notamment via l'insémination artificielle. La réussite de cette technique repose sur :

- Une bonne qualité initiale du sperme,
- Des techniques rigoureuses de récolte et d'évaluation,
- Et surtout sur l'utilisation judicieuse de **dilueurs et stabilisateurs adaptés**.

Malgré ses avancées, la cryoconservation canine reste un **domaine en constante évolution**, où l'optimisation des protocoles et l'innovation (notamment l'utilisation des liposomes) sont des enjeux majeurs.

## REFERENCES:

- \* Aitken, R.J. et Mc Laughlin, E.A., "Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of a capacitated state", *Society of Reproduction and Fertility*, V.63, (2007), 273-293.
- \*Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L., Anton, M., "Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender", *Theriogenology*, V. 6, (2004), 895-907
- \*Andersen, K., "Fertility of frozen dog semen". *Acta Vet. Stand.*, V.13, (1972), 128-130
- \* Anderson, K., « Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique », *Zuchthygiene*, V.10, (1975), 1-4.
- \*Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrrondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H., "Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk", *Food Chemistry*, V.83, (2003), 175-183
- \*ALLIMANT M.(2010) *Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'éta lon . Thèse de doctorat vétérinaire , Université Claude-Bernard , Lyon , 138p.*
- \*Ansari, M.S., Rakha, B.A., Andrabi, S.M.H., Akhter, S., "Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa", *Reproductive Biology*, V.10, n° 3, (2010), 235-240.
- \*Anzar, M., Hassan, M.M., Graham, E.F., Deyo, R.C., Singh, G., "Efficacy of the Hamilton Thorne Motility Analyser (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen", *Theriogenology*, (1991), 307-317
- \*BARIL ,G.,CHEMINAU , P.,COGNIE ,Y .,GUERIN ,Y.,LEBOEUF ,B., ORGEUR,P., VALLET ,J.L.(1993). *Manuel de formation pour l'insémination artificiel chez les ovins et les caprins . Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture , FAO, Rome,Italy,125p.*
- \*BARONE R. (1978) *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie Abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp.*
- \*Bangham, A.D. et Horne, R.W., « Negative staining of phospholipids and their

structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope », *J. Mol. Biol.*, V.8, (1964), 660–8

\*Bencharif, D., “Intérêt des lipoprotéines à faible densité (LDL) du jaune d'oeuf de poule dans la congélation et la réfrigération du sperme canin”, *Th. Univ. : Biol. Rennes* : s.n., 2009. p. 296

\*Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barriere, P., Larrat, M., Tainturier, D., “The advantage of LDL (Low-density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen”, *Theriogenology*, V. 70, (2008), 1478-1486

\*Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Le Guillou, J., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Barriere, P., Tainturier, D., “Canine-chilled sperm: study of a semen extender made with low-density lipoproteins from hen egg yolk supplemented with glutamine”, *Reprod. Dom. Anim.* V. 48, (2013), 258-266.

\*Burley, R.W. et Cook, W.H., “Isolation and composition of avian EY granules and their constituents (alpha) and (beta) lipovitellins”, *Can. J. Biochem. Physiol.*, V. 39, (1961), 1292-1307

\*BOUSENNA, S. 2013, Performances de reproduction chez les ovins Ouled Djellal : Avènement de la puberté et évolution des caractéristiques séminales chez le mâle jusqu'à l'âge de 1 an . Thèse de Doctorat en science , Institut vétérinaires de constantine , 210p .

\*Bousseau, S., Brillard, J.P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M., “Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents”, *Theriogenology*, V.50, (1998), 699-706.

\*Brasseur, R., “Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis)”, *Mol. Membr. Biol.*, V.17, (2000), 31–40

\*Burley, R.W. et Cook, W.H., “Isolation and composition of avian EY granules and their constituents (alpha) and (beta) lipovitellins”, *Can. J. Biochem. Physiol.*, V. 39, (1961), 1292-1307.

\*Cannon, L.M., “Cryoconservation de la semence bovine dans les liposomes: Mise au point d'un nouveau dilueur”, *Thèse vétérinaire, Oniris-nantes*, (2015), 179 p.

\*Chang, M.C., Powrie, W.D., Fennema, O., “Microstructure of egg yolk”, *J. Food Sci.*, V.42, (1977), 1193.

- \*Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., “Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes”, *Ann. Rev. Biochem*, V.72, (2003), 175–207
- \*COLLIN B. (2003) Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp
- \*Corcini, C.D., Goularte, K L., Bongalhardo, D.C., Lucia Jr, T., Jardim, R.D., Varela Junior, A.S., “Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation”, *Andrologia*, (2015), doi: 10.1111/and.12411
- \*Castagne, D., « Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques », Thèse doctorale, Université de Liège, faculté de Médecine, (2010). 140p.
- \*Courtens, J.L. et Rety, J.M., “Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa. Evaluation of cell injuries at different depth in bags or straws during all steps of the technique”, *Genetic Selection Evolution*, V.33 (Suppl 1) , (2001), 85-104 .
- \*De Leeuw, F.E., de Leeuw, A.M., den Daas, J.H.G., Colenbrander, B., Verkley, A.J., “Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing”, *Cryobiology*, V.30, (1993), 32– 44 .
- \*DELOMPRE , A, ENV ALFOR , TH : Doctorat vétérinaire 2011 , “ les chiens sentinelles du risque sanitaire d’origine environnementaux et défauts de fertilité chez les animaux mâles “
- \* England, G.C.W., “The cryopreservation of dog semen”. Thesis, Royal Veterinary College, University of London, UK, (1992) 152 pp .
- \*Epanand, R.M., “Fusion peptides and the mechanism of viral fusion”, *Biochim. Biophys. Acta*, V.1614, (2003), 116–121
- \*Espuelas, S., Haller, P., Schuber, F., Frisch, B., “Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, V.13, (2003), 2557–2560
- \*Evans, R.J., Bauer, D.H., Bandemer, S.L., Vaghefi, S.B., Flegal, C.J., “Structure of egg yolk very low-density lipoprotein. Polydispersity of the very low-density lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure”, *Arch. Biochem. Biophys.*, V.154, (1973), 493L
- \*Farstad, W., “Semen cryopreservation in dogs and foxes”, *Animal Reproduction Science*, V. 42, (1996), 251-260.

\*FELDMAN,EC, and Nelson,R,W,1996.Clinical and diagnostic evaluation of the malereproductive tract , in canine and feline endocrinology and reproduction .W.B.Saunders , Philadelphia , pp,673-690.

\*FELDMAN,EC, and Nelson 1987,Clinical and diagnostic evaluation of the malereproductive tract , in canine and feline endocrinology and reproduction .W.B.Saunders , Philadelphia .

\*FELDMAN,EC, and Nelson, 2004 a ,Clinical and diagnostic evaluation of the malereproductive tract , in canine and feline endocrinology and reproduction , 3 rd ed . philadelphia .W.B.Saunders .

\*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.

\*FONTBONNE A., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.).Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260.

\* FONTBONNE . A 1995 Infécondité du chien mâle . In Encyclopédie vétérinaire . pathologie de la reproduction . Elviesier,paris,volume 5 ,1-13.

\*FONTBONNE,A, faire reproduire son chien ou sa chienne, les clefs d'une pratique réussie édition Maradi 1996,4,192,202.

\*FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. (2000) Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. Le point vétérinaire, 31, 209, 27-32.

\*FONTBONNE,A,LEVY, X, FONTAINE , E., GILSON ,C,2007 Guide pratique de reproduction clinique canine et féline , MED'COM édition ,217p.

\*Foote, R.H., "Extenders for freezing dog semen", Am. J. Vet. Res., V. 25, (1964), 37-40

\*FORGES,T . PELLANDA ,H . DILIGENT ,C . MONNIER ,P . GUEANT ,J-L . Les folates : quel impact sur la fertilité ? Gynécologie obstétrique & fertilité , 2008 , 36 (9),930-939 .

\*Fortier, M., "La cytométrie en flux comme outil pour caractériser et évaluer le potentiel de fertilité des spermatozoïdes bovins", Mémoire: Laval (Québec), 2010, 104 p

\*Foulkes, J.A., Sweasey, D., Goodey, R.G., "Fertility of bull spermatozoa in egg yolk diluents of varied lipid fatty-acid composition", J Reprod Fertil., V.60, (1980), 165-9.

\*FRESHMAN J.L. (2002) Semen collection and evaluation. Clin. Tech. Small Anim. Pract., 17, 3, 104-107.

\*Guigardet, V., "Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome: le SPERMAC®", Th. Méd. Vet. Lyon, (1997), 190p.

\*Gill, H.P., Kaufman, C.F., Foote, R.H., Kirk, R.W., "Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen", Am. J. Vet. Res., V. 31, (1970), 1807-1813

\*. Graham, J.K. et Foote, R.H., "Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing", Cryobiology, V.24, (1987), 42-52.

\*Holt, W.V., "Basic aspects of frozen storage of semen", Animal Reproduction Science, V.62, (2000), 3-22.

\*Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., "Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive", J. Androl., V.11, (1990), 73-88.

\*Harrop, A.E., "Artificial insemination in the dog", In: Maule, P.T., (Editor), "The Semen of Animals and Artificial Insemination", Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, UK, (1962), 304-315 p.

\*\*IGHER-OUADA, M ET VERSTEGEN, J ,2001a. Evaluation of the « Hamilton Thormcomputer - based automated system » for dog semen analysis . Theriogenology ,55,733-749.

\*JOHNSTON , S.D . New canine semen evaluation techniques for the small animal practitioner in proceedings of the Annual Meeting , Society for Theriogenology , coeur d'Alene , ID, 1989, pp,320-326.

\*JOHNSTON , S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S, 2001a. Canine and feline theriogenology , Philadelphia .

\*JOHNSTON , S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S, 2001b. Semen collection, Evaluation and Preservation. Saunders company , Philadelphia .

\*Kamat, V.B., Lawrence, G.A., Barratt, M.D., Darke, A., Leslie, R.B., Skiple, G.G., Stubbs, J.M., "Physical studies of egg yolk low-density lipoproteins", Chemistry and Physics of Lipids, V.9, n°1, (1972)

\*Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T., Herman, H.A., "Lipids and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa", J. Dairy Sci., V.36, (1953) , 733-742

\*Kapczynski, DR., Tumpey, T.M., "Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus", Avian Dis., V.47, (2003), 578-587

- \*Kerandivez, C.Y., "Procédé de fractionnement du jaune d'œuf de poule", Brevet Européen 0430757A1. 19.11.1990.
- \*Kutzler, M.A., 2005 . "Semen collection in the dog",
- \*Lofstedt, F., "Artificial insemination in the dog and the possibility of low temperature conservation", Kynologisher Weltkongress, Dortmund, (1956), 195-200
- \*Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R., « Les liposomes : description, fabrication et applications », Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, V.8, (2004), 163-176
- \*MacBee, LE. et Cotterill, OJ., "Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins", J Food Sci., V. 44, (1979),656 – 60
- \*. Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Moce, E., Viudes-de-Cartro, E., Vicente, J.S., Rodriguez. M., "Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen", Reprod Dom Anim., V.39, (2004), 438–441
- \*Martin, W.G., Turner, K.J., Cook, W.H., "Macromolecular properties of vitellenin from egg yolk and its parent complex with lipids", Canadian J. Biochem. Physiol., V.37, (1959), 1197
- \*Martin, I., Ruyschaert, J.M., "Common properties of fusion peptides from diverse systems", Biosci. Rep., 20p. (2000), 483–500
- \*MARTHINA , L , GRRER , DVM,JD,. 2014 ,. Canine Reproduction and Neonatology , p 286,287.
- \*MILOVANOC , V.K.«The biology of reproduction and the artificial insemination of animals» . Seljhozgiz , Moscow ,481-524.
- \*MIALOT J.-P. (1984) Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques. Edition du point vétérinaire, Maisons-Alfort.
- \*Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., "Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen", Theriogenology, V. 57, (2002), 1695-1706 .
- \*Moustacasa, V.S., Zaffalonb, F.G., Lagaresa, M.A., Loaiza-Eccheverria, A.M., Varagoa, F.C., Neves, M.M., Heneinec, L.G.D., Arrudab, R.P., Henry, M., "Natural, but not lyophilized, low-density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen", Theriogenology, V. 75, (2011), 300–307
- \*Neves, M.M., Heneine, L.G.D., Henri, M., "Cryoprotection effectiveness of low density concentrations of natural and lyophilized LDL on canine spermatozoa", Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V. 66, n° 3, (2014), 769-777

\*OTT RS, GOFFAUX M , THIBIER M ,. 1987 . Examen morphologique des spermatozoïdes . EL et Ins., 221,15-20.

\*. Pace M.M. et Graham E.F., “Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa during Freezing”, Journal of Animal Science, V. 39, (1974), 1144-1149.

\*PENA Martinez AI , 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation .Anim,Reprod .SCI, 82-83 , 209-224 .

\*Phillips, P.H. et Lardy, H.A., “A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen”, Journal of Dairy Science, V. 23, n° 5, (May 1940), 399-404.

\*Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumalh, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M., “Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders”, Theriogenology, V. 75, (2011), 105-114.

\*Powrie, W.D. et Nakai, S., “The chemistry of eggs and egg products” in: Egg Science and Technology, Stadelman W.J. and Cotterill O.J., Eds., The Avi Publishing Company, Westport, (1986), chap. 6.

\*PRINS GS , 1998 .semen . In : Knobil E , Neill JD (eds) . encyclopedia of reproduction . volume 4 . academic press , San Deigo,360-367 .

\*Quinn, P.J., Chow, P., With, I., “Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site”, J. Reprod. Fert., V. 60, (1980), 403-407

\* Redziniak, G., “Liposomes et peau: passé, présent, futur: Liposomes and skin: past, present, future”, Pathol. Biol., V.51, (2003), 279–281.

\*REECE W.O. (1997) Mâle reproduction. In : Reece W.O. (eds.). Physiology of domestic animals. Second edition. Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, 344-365

\*RIJSSELAERE T, Van SOOM A ,MAES D ,De Kruif A.2002 .Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa . theriogenology , 57,1669 -1681.

\*Seager, S.W.J., “Successful pregnancies using frozen semen in the dog”, A.A. Digest., V. 12, (1969), 6

\*Shaikh, S.R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., Wassall, S., “Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation?”, Biochemistry, V.42, (2003),12028–12037

\*sperme de chien« <https://canine-semen.com/fr/sperme-de-chien-sperme-de-chien/#>» ,  
16/04/2025

\*Thapon, J.L. et Bourgeois, C.M., "L'oeuf et les ovoproducts", Lavoisier TEC & DOC,  
Paris, (1994), chapitre 1

\*THRELFALL,WR, 2003, Semen collection and evaluation In : Root Kustriz MV (ed) . The practical  
veterinarian : Smal A nimal Theriogenology .Louis: Butter Worth - Heineman , pp 97,123

\*VIVIN Fiona ,ENV, Lyon 2019. Tn Doctorat Vétérinaire «Analyse des facteurs de performance en  
insémination artificielle canine . Application aux donnés du cerrec .

\*White, J.M., "Membrane fusion", Science, V.258, (1992), 917–924

\*Wales, R.G. et White, LG., "Viability of diluted dog spermatozoa in vitro". J. Reprod.  
Fertil., V.5, (1963), 67-76

\* Watson, P.F. et Martin, C.A., "The influence of some fractions of egg yolk on the  
survival of ram spermatozoa at 5°C", Australian Journal Science, V.28, (1975), 145-  
152.

\*Watson, P.F. et Martin, C.A., "The influence of some fractions of egg yolk on the  
survival of ram spermatozoa at 5°C", Australian Journal Science, V.28, (1975), 145-  
152

\*Watson, P.F., "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen", Animal  
Reproduction Science, V. 60–61, (2000), 481–492 .

