

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
(Université de Blida1)

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

En sciences vétérinaires

Spécialité : Sciences Vétérinaires

OPTIMISATION DE LA CONSERVATION DE LA SEMENCE CANINE :

Réfrigération et congélation

Par

Rédha BELALA

devant le jury composé de :

M. LAFRI, Professeur à Université de Blida1	Président
D. KHELEF, Professeur à l'ENSV Alger	Examineur
M. OUMOUNA, Professeur à Université de Médéa	Examineur
B. KHIATI, MC à l'Université de Tiaret	Examineur
R. KAIDI, Professeur à Université de Blida1	Promoteur
D. BENCHARIF, MC, Agrégé, HDR, à Oniris-Nantes, France.	Co promoteur

Blida, Juin 2016

RESUME

Le présent travail a pour objectif de déterminer les éventuels bénéfices et mécanismes d'action des liposomes et du plasma de jaune d'œuf naturel en substitution aux lipoprotéines de basse densité (LDL) dans la congélation et la réfrigération de la semence canine.

Les dilueurs à base de liposomes (6% et 2%) préservent la motilité et les caractéristiques d'intégrité spermatiques (membrane plasmique, acrosome et ADN) avec autant d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL) dans la congélation (à la concentration de 6%) et la réfrigération (à la concentration de 2%) de la semence canine. De plus, ils ne semblent pas interférer avec la fertilité *in vivo*.

Le dilueur à base de plasma du jaune d'œuf naturel (40%) préserve également la motilité et l'intégrité spermatiques avec autant d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL) dans la cryoconservation de la semence canine.

L'allongement du temps d'équilibration jusqu'à 6H améliore significativement ($p < 0,001$) l'efficacité des liposomes et du plasma de jaune d'œuf par rapport à la durée conventionnelle d'une heure et demi.

Les liposomes et les LDL se comportent différemment vis-à-vis de la membrane modèle suggérant deux mécanismes distincts de protection du spermatozoïde. En effet, indifféremment du mode de conservation de la semence, (réfrigération et congélation), les LDL semblent agir à travers l'incorporation au sein de la membrane plasmique alors que les liposomes agiraient probablement sans incorporation.

Mots clés : Semence – Chien – Cryoconservation – Réfrigération – Lipoprotéines de basse densité (LDL) – Plasma de Jaune d'œuf (PJO) naturel – Liposomes.

ABSTRACT

The present work aims to determine the benefits and protective mechanisms of liposomes and natural egg yolk plasma in substitution to low density lipoproteins (LDL) for dog semen cryopreservation and chilling.

Extenders composed of (6% et 2%) liposomes preserve the motility and sperm integrity characteristics (Plasma membrane, acrosome and DNA) as effectively as the reference extender (6%LDL) in freezing (6%) and chilling (2%) dog semen. Furthermore, they do not seem to interfere with *in vivo* fertility.

The extender composed of (40%) natural egg yolk plasma preserves also both the motility and the integrity as effectively as the reference extender (6%LDL) in freezing dog semen.

Extending the time of equilibration up to 6 hrs improved significantly ($p < 0,001$) the efficiency of liposomes and egg yolk plasma compared to the conventional time (one hour and half).

Liposomes and LDL behave differently towards the model membrane suggesting two different mechanisms of sperm protection. Indeed, regardless the mode of preservation (chilling or freezing), LDL seem to act by incorporating into plasma membrane while the liposomes protect the sperm cells probably without incorporation.

Key words: Semen – Dog – Cryoconservation – Chilling – Low Density Lipoproteins (LDL) – Natural Egg Yolk Plasma – Liposomes.

ملخص

إن هذا البحث يهدف إلى تحديد الفوائد المحتملة وكذا آليات عمل مادتي "الجسيمات الشحمية" و "بلازما صفار البيض الطبيعي" بدلا عن مادة "البروتين الدهني منخفض الكثافة" أثناء عملية تبريد وتجميد نطفة الكليبات.

إن محاليل التمديد المكونة من مادة الجسيمات الشحمية تسمح بحفظ خاصية القدرة على الحركة وكذا خصائص السلامة التكوينية والوظيفية للحيوانات المنوية (الغشاء البلازمي - الاكروزوم - الحمض النووي) بنفس مستوى فعالية محلول التمديد المكون من البروتين الدهني منخفض الكثافة (الشاهد) سواء أثناء عملية التبريد (2%) أو التجميد (6%). إضافة إلى ذلك فإن الجسيمات الشحمية لا تبدي أي تعارض مع الخصوبة الطبيعية (في الجسم الحي).

إن محاليل التمديد المكونة من مادة بلازما صفار البيض الطبيعي بتركيز 40% تسمح كذلك بحفظ جميع خصائص الحيوانات المنوية سائلة الذكر طوال عملية التجميد وذلك بنفس فعالية محلول التمديد الشاهد.

إن تمديد زمن فترة الموازنة خلال عملية التجميد إلى غاية 6 ساعات يسمح برفع فعالية هاته المواد الجديدة "الجسيمات الشحمية وبلازما صفار البيض" بقدر معتبر مقارنة مع الزمن التقليدي "ساعة ونصف" لفترة الموازنة.

بالنسبة لآلية العمل فإن مادتي الجسيمات الشحمية والبروتين الدهني منخفض الكثافة أظهرتا سلوكين مختلفين تجاه الغشاء البلازمي للخلية المنوية مما يفيد أنهما يختلفان في كيفية حماية هاته الخلايا. بالفعل، فمهما يكن نظام حفظ المنى "التبريد أو التجميد" فإن البروتين الدهني ينشط عبر الاندماج ضمن الغشاء البلازمي للخلية على عكس الجسيمات الشحمية.

الكلمات المفتاح: النطفة - الكلب - التبريد - التجميد - البروتين دهني منخفض الكثافة - بلازما صفار البيض الطبيعي - الجسيمات الشحمية.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

Mon directeur de thèse **Professeur Rachid KAIDI** de m'avoir accompagné depuis ma graduation jusqu'à ce jour, de m'avoir soutenu dans les moments difficiles et surtout d'avoir placé toute sa confiance en moi. Merci infiniment « cheikh » pour le promoteur exemplaire que vous êtes. **Vous êtes beaucoup plus qu'un promoteur pour moi.**

Mon codirecteur de thèse **Dr Djemil BENCHARIF**, de m'avoir réservé le meilleur accueil au Service de Pathologie de la Reproduction à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS) et de m'avoir assuré un coencadrement de qualité. Merci infiniment très chère Djemil.

Professeur Daniel TANTURIER, chef du Service de la Pathologie de la Reproduction à ONIRIS et **Dr Lamia BRIAND-AMIRAT** pour leur collaboration efficace et leur disponibilité. Vous avez été des « personnes-ressources » pour moi durant mon séjour parmi vous. Je remercie aussi tous mes collègues du service : Pr Francis FIENI, Pr Jean François BRUYAS, Dr Anne GOGNY, Dr Emmanuel TOPIE et Mme Annie ALIOT.

Le personnel technicien de l'unité de recherche (ONIRIS) : Mesdames **Sandrine MICHOT**, **Sandrine DESTRUMELLE** et **Sylvie ANESO** et également le personnel animalier du chenil de reproduction et du chenil de l'alimentation.

Professeur Chantal THORIN du département de statistiques (ONIRIS) pour sa collaboration efficace, son extrême gentillesse et sa disponibilité tout au long de nos travaux. Merci beaucoup très chère Chantal.

Professeur Mohammed LAFRI, directeur de l'ISV de Blida, mon ancien enseignant et mon actuel directeur qui m'a honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

Mes anciens enseignants de graduation et mes actuels collègues :

- **Professeur Mustapha OUMOUNA**, chef du Département de Biologie à l'Université de Médéa
- **Professeur Djamel KHELAF**, responsable des relations extérieures à l'ENSV d'Alger
- **Dr Baghdad KHIATI**, de l'Université de Tiaret

de m'avoir fait l'honneur d'examiner ma thèse et de l'avoir enrichie de leurs remarques combien pertinentes et de m'avoir ouvert l'esprit sur des perspectives prometteuses. Qu'ils trouvent ici l'expression d'un profond respect et de toute ma gratitude.

Je remercie également mes collègues et amis de l'ISV de Blida et particulièrement **Dr Seddik KEBBAL** et **Dr A.Krim YAHIMI** pour leur soutien indéfectible dans les moments les plus dures de mon parcours de thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je voudrais aussi remercier de façon particulière notre Chef d'Etablissement **Professeur Taher ABADLIA** qui nous a toujours tirés vers le haut et motivés à aller de l'avant. Merci infiniment Monsieur le Recteur, grâce à vous la première banque de semence (experimentale) des carnivores domestique et sauvages connaîtra bientôt le jour à l'Université SAAD DAHLEB de Blida (U.Blida1).

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

L'âme de mon regretté papa et à ma très chère maman

Mon épouse bien chérie « Hadjer »,

Mes sœurs bien aimées : Bahia, Faïza, Houria et amina

Mes trois bouts de choux : Abdou, Youcef et Khaled.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	2
ABSTRACT	3
ملخص.....	4
REMERCIEMENTS.....	5
DEDICACES	7
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	10
INTRODUCTION.....	12
RECOLTE DE LA SEMENCE CANINE ET INSEMINATION ARTIFICIELLE	17
1.1. Introduction	17
1.2. Récolte du sperme canin.....	19
1.3. Suivi du cycle œstral chez la chienne.....	20
1.4. Techniques d'insémination artificielle chez la chienne	22
ANALYSE DU SPERME CANIN	26
2.1. Introduction	26
2.2. Analyse conventionnelle de la semence	26
2.3. Analyse non conventionnelle de la semence.....	28
CONSERVATION DU SPERME CANIN	36
3.1. Introduction	36
3.2. Lésions spermatiques consécutives à la conservation.	37
3.3. La cryoprotection des spermatozoïdes.....	41
ETUDE DES STABILISANTS MEMBRANAIRES	46
4.1. Introduction	46
4.2. Le Jaune d'œuf	46
4.3. Le Plasma du Jaune d'œuf	47
4.4. Les Lipoprotéines a faible densité (LDL)	52
4.5. Les liposomes	55
PARTIE EXPERIMENTALE	68
INTERET DES LIPOSOMES DANS LA REFRIGERATION DE LA SEMENCE CANINE	70
5.1. Introduction	70
5.2. Matériels et méthodes.....	72

5.3. Résultats.....	83
5.4. Discussion.....	91
INTERET DES LIPOSOMES DANS LA CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE	96
6.1. Introduction	96
6.2. Matériels et méthodes.....	97
6.3. Résultats.....	104
6.4. Discussion.....	113
EFFETS DU TEMPS D'EQUILIBRATION SUR LA QUALITE SPERMATIQUE ET INTERACTIONs AVEC LES CRYOPROTECTEURS (LDL, LIPO, PJO)	119
7.1. Introduction	119
7.2. Matériels et Méthodes.....	121
7.3. Résultats.....	126
7.4. Discussion.....	143
DISCUSSION GENERALE	151
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
REFERENCES.....	167
APPENDICE	192

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Tableaux

Tableau 2.1	Notes mobilité massale selon l'échelle de MILOVANOV	27
Tableau 2.2.	Valeurs des paramètres de mobilité (semence fraîche)	31
Tableau 4.1	Composition des lécithines du commerce utilisées.	58
Tableau 5.1	Composition des dilueurs de réfrigération (liposomes)	74
Tableau 5.2	Motilité totale (MOT) après 4 jours de réfrigération	85
Tableau 5.3	Motilité progressive mesuré après 4 jours de réfrigération	85
Tableau 5.4.	Intégrité spermatique évaluée après réfrigération	87
Tableau 5.5	Résultats du dosage de progestérone et d'insémination des six chiennes par une semence réfrigérée dans un dilueur à base de 2% de liposomes.	89
Tableau 6.1	Composition des dilueurs de congélation (liposomes)	100
Tableau 6.2	Paramètres de vitesse (VAP, VCL, VSL) et ALH d'une semence canine congelée (Liposomes).	107
Tableau 7.1	Composition de trois dilueurs (LDL, PJO, LIPO) pour la congélation de la semence	123
Tableau 7.2	Etude des différents paramètres de mobilité de la semence fraîche	126
Tableau 7.3	Pourcentages des spermatozoïdes mobiles après décongélation de la semence	127
Tableau 7.11	Moyennes des pourcentages des spermatozoïdes progressifs après décongélation à T0 + dix minute	131
Tableau 7.19	Paramètres de vitesse (VCL, VSL, VAP) et ALH des spermatozoïdes canins congelés dans trois milieux (LDL, LIPO et PJO) évalués après décongélation.	136
Tableau 7.20	Intégrité membranaire fonctionnelle (HOST) pour les trois milieux à travers le processus de cryoconservation.	137
Tableau 7.21	Intégrité de l'acrosome (FITC PSA) pour les trois milieux à travers le processus de cryoconservation.	138
Tableau 7.22	Intégrité membranaire structurale (HOST) pour les trois milieux à travers le processus de cryoconservation.	138
Tableau 7.23	Intégrité de l'ADN (le test Acridine Orange) pour les trois milieux à travers le processus de cryoconservation.	139

Figures

Figure 2.1	Terminologie standard des variables mesurées par le système CASA	29
Figure 4.1	Procédé analytique de fractionnement du Jaune d'Œuf	50

Figure 4.2	Procédé industriel de fractionnement du jaune d'oeuf.	51
Figure 4.3	Structure d'une lipoprotéine à faible densité (LDL pour low density lipoprotein)	52
Figure 4.4	Structure d'un liposome uni lamellaire	56
Figure 4.5	Différents types de liposomes	57
Figure 4.6.	Mini Extruder fabriqué par Avanti Polar Lipids, Inc. USA	59
Figure 5.1	Effets des dilueurs sur la motilité progressive mesurée après 4 jours de réfrigération	84
Figure 5.2	Effets des dilueurs (LDL, LIPO) sur l'intégrité spermatique évaluée après 4 jours de réfrigération	88
Figure 5.3.	Aire de surface relative en fonction du temps après injection de 6%LDL et 2% LIPO (réfrigération).	90
Figure 5.4.	Aire de surface relative en fonction du temps après injection du liquide prostatique canin seul ou mélangé aux milieux 2%LIPO et 6%LDL (réfrigération).	91
Figure 6.1	Effets des dilueurs sur la mobilité totale (MOT) mesurée après décongélation de la semence canine.	105
Figure 6.2	Effets des dilueurs sur la mobilité progressive (PMOT) mesurée après décongélation de la semence canine	106
Figure 6.3	Effets des dilueurs (LDL, LIPO) sur l'intégrité spermatique évaluée après décongélation de la semence canine	109
Figure 6.4	Le premier plan de l'analyse en composantes principale (ACP)	110
Figure 6.5	Aire de surface relative en fonction du temps après injection de 6%LDL et 6% LIPO (congélation).	112
Figure 6.6	Aire de surface relative en fonction du temps après injection du liquide prostatique canin seul ou mélangé aux milieux 6%LIPO et 6%LDL (congélation).	113
Figure 7.1	Effets du temps d'équilibration (30mn, 1H, 3H and 6H) sur la mobilité totale (MOT) et progressive (PMOT) évaluées après décongélation.	136
Figure 7.2.	Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN évaluée après dilution de la semence.	140
Figure 7.3.	Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN évaluée après 6H d'équilibration de la semence.	141
Figure 7.4.	Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN évaluée après décongélation de la semence.	141
Figure 7.5.	Le premier plan de l'analyse en composantes principale	143

INTRODUCTION

La semence canine conservée par le froid fût utilisée avec succès pour la première fois sous forme réfrigérée par HARROP en 1954 [1] et congelée dans les travaux de SEAGER en 1969 [2].

L'emploi du sperme réfrigéré et congelé s'est considérablement répandu ces dernières décennies, notamment avec le développement de l'élevage canin à l'échelle internationale et la réglementation de l'insémination artificielle dans les programmes de reproduction en élevage. Ceci a permis de promouvoir l'élevage canin en offrant aux éleveurs des opportunités qui relevaient autrefois du domaine de l'impossible, surtout avec les déplacements de géniteurs imposés auparavant par les stratégies de croisement.

La conservation de la semence canine et les techniques de procréation assistée s'avèrent donc d'un intérêt indéniable pour la réussite de la reproduction et le progrès des programmes d'élevage recrutant des étalons de grande valeur génétique et/ou utilitaire tel que les chiens employés pour le secourisme (Protection Civile) ou à des fins sécuritaires et de lutte contre la criminalité (Armée et Gendarmerie Nationales) en Algérie.

En plus de l'amélioration de la fertilité dans les programmes d'élevage canin, les techniques de procréation assistée trouvent des applications fortement utiles et porteuses dans la préservation des races canines autochtones menacées tel que le **Sloughi du Maghreb** vivant en Algérie ainsi que dans la biodiversité et la préservation des carnivores sauvages menacés d'extinction vivant dans les parcs nationaux et en captivité tel que les grands félin sauvages dans le sud d'Algérie (Guépard particulièrement).

L'étude du sperme canin pourrait aussi contribuer sérieusement à **l'avancement de la recherche médicale** dans des domaines particuliers où le chien est utilisé comme meilleur modèle animal à causes des limitations

déontologiques. Nous citons pour exemple l'étude des facteurs d'influence sur **l'infertilité masculine** et les **pathologies de la prostate** chez l'homme [3].

Ainsi, la prise en charge de tous les aspects problématiques évoqués ci-dessus semble être tout à fait possible par la création d'une banque de semence et d'un centre de reproduction assistée des carnivores domestiques et sauvages en Algérie.

Cependant, les procédés de conservation de la semence par le froid (réfrigération et congélation) ne sont pas sans inconvénients. Ils exposent le sperme au choc du froid qui induit des dommages irréversibles et affectent le statut structural et fonctionnel des spermatozoïdes compromettant par conséquent la fertilité du sperme réfrigéré ou congelé [4].

Les dilueurs de conservation ont pour rôle de protéger le sperme tout au long de ce processus en réduisant la proportion des spermatozoïdes morts et en améliorant la qualité des survivants. Leur composition est déterminante pour leur efficacité [5].

Beaucoup de chercheurs travaillent sur les cryoprotecteurs afin de développer le dilueur le plus efficace [6]. Les cryoprotecteurs peuvent être divisés en agents prévenant la formation de cristaux de glace i.e. agent cryoprotecteurs proprement dits (essentiellement le glycérol chez le chien) et les agents stabilisants membranaires [7] i.e. protecteurs membranaires de refroidissement [8] qui sont traditionnellement représentés par le Jaune d'œuf (JO) dans la conservation de la semence canine [6].

L'utilisation du JO fût recommandée pour la première fois par PHILIPS et LARDY en 1940 [9] pour la conservation de la semence bovine. Depuis, le JO 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) contenues en lui [10 ; 11 ; 12 ; 13].

Cependant, après l'utilisation du JO pendant longtemps, divers inconvénients apparurent représentés essentiellement par le risque de contamination bactérienne du dilueur [14] et les granules contenus en lui qui inhibent la respiration des spermatozoïdes (directement par les lipoprotéines de haute densité HDL : pour High Density Lipoproteins) [15] 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 conservation de la semence bovine [15 ; 16], canine [17 ; 18], équine [19], et ovine [20].

Divers protocoles d'extraction des LDL ont été publiés [10 ; 21 ; 22 ; 23] mais basés sur l'ultracentrifugation à gradient de densité qui est une technique assez compliquée. La procédure la plus simple et la plus rapide a été décrite par MOUSSA et ses collaborateurs en 2002 [13] permettant d'atteindre un degré de pureté de 97% et donnant ainsi un espoir pour des applications industrielles.

Néanmoins, jusqu'à ce jour, aucune de toutes les techniques analytiques rapportées précédemment n'a pu être transposée à l'échelle industrielle en plus de l'impossibilité d'appliquer aux LDL natives les traitements physiques de stérilisation [24] et de lyophilisation [25 ; 26].

Ces limitations se sont érigées en obstacle devant l'utilisation des LDL dans la production et la commercialisation des dilueurs. Pour toutes ces raisons, il est devenu évident de remplacer les LDL.

Deux molécules s'avèrent intéressantes comme substituts aux LDL car capables de contrebalancer leurs inconvénients mentionnés supra et méritent de ce fait d'être explorées. Il s'agit du plasma de jaune d'œuf (PJO) et des liposomes (LIPO).

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) [25 ; 26]. Il est composé de LDL (15%) et de glycoprotéines globulaires (85%) (essentiellement α , β and γ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfates d'ammonium dans l'extraction des LDL pures [13 ; 27].

Ce procédé de fractionnement é été évoqué pour la première fois par BURLEY and COOK en 1961 [28] puis décrit en détail par MACBEE and COTTERILL en 1979 [29]. Différemment aux LDL, ce procédé a été appliqué industriellement (Brevet Européen n° 0 430 757 A1) et le plasma a pu être gamma ionisé [30].

Des études récentes ont montré que le PJO naturel peut être une alternative viable au JO entier dans la cryoconservation de la semence équine [30] et canine [31], mais le plasma n'a jamais été exploré en substitution aux LDL dans la congélation de la semence canine.

Les liposomes (LIPO) sont des vésicules artificielles composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, ayant la capacité d'encapsuler des molécules [32]. Ils sont formés de phospholipides (PL), i.e. le principe actif des LDL dans leur action protectrice et stabilisatrice de la membrane du spermatozoïde [33]. Différemment des LDL, les LIPO peuvent être produits industriellement et incorporés dans des dilueurs clairs, semi-synthétiques, chimiquement définis, facilement stérilisables et prêts à l'usage [32].

Les liposomes peuvent être produits par simple sonication (traitement aux ultrasons) ou à travers un procédé d'extrusion (passage forcé à travers un filtre poreux) [32]. Les liposomes soniqués sont composés de petites vésicules (30nm of diameter) qui sont moins efficaces en cryoconservation de la semence que les grandes vésicules (100–400nm) des liposomes extrudés [34].

Les liposomes soniqués ont été largement explorés [12 ; 7 ; 14] et ont permis d'apporter beaucoup d'éclaircissements aux propriétés cryoprotectrices des lipides exogènes, même si les résultats ne sont pas directement transposables sur les liposomes extrudés.

Récemment, les LIPO se sont avérés être une bonne alternative au JO entier ou aux LDL dans la conservation du sperme de l'homme [35], de l'étalon [36] du taureau [37] et du buffle [38]. Il serait intéressant d'explorer leur effet cryoprotecteur et leur mécanisme d'action dans la congélation et la réfrigération de la semence canine.

L'objectif du présent travail est de déterminer les éventuels bénéfices et mécanismes d'action des **liposomes** et du **plasma de jaune d'œuf** naturel en substitution aux LDL dans la congélation et la réfrigération de la semence canine.

La présente thèse sera divisée en 2 parties (biblio graphique et expérimentale) dont chacune se scinde en plusieurs chapitres numérotés de façon continue de la première à la deuxième partie.

La première partie (bibliographique) comprendra quatre chapitres :

Chapitre 1 : Récole de la semence canine et insémination artificielle. Ce premier chapitre passera en revue la technique de prélèvement du sperme canine, les techniques de suivi du cycle ainsi que les techniques d'insémination chez la chienne.

Chapitre 2 : Analyse du sperme canine. Ce chapitre sera consacré essentiellement à faire un état des lieux sur les techniques d'analyse de la semence canine.

Chapitre 3 : Conservation du sperme canine. Ce chapitre visera à faire un état des lieux sur la cryoconservation et la réfrigération de la semence canine

Chapitre 4 : Etude des stabilisants membranaires. Ce chapitre portera sur l'étude des stabilisants membranaires dans les différents dilueurs de conservation de la semence canine (LDL, PJO, Liposomes).

La deuxième partie sera **expérimentale**, et comprendra trois chapitres :

Chapitre 5 : Intérêt des liposomes dans la réfrigération de la semence canine

Chapitre 6 : Intérêt des liposomes dans la congélation de la semence canine

Chapitre 7 : Effets du temps d'équilibration sur la qualité spermatique et interactions avec les cryoprotecteurs (LDL, LIPO, EYP).

Tous les résultats précédents seront repris dans un chapitre indépendant « DISCUSSION GENERALE » qui sera suivie du dernier chapitre de la thèse « CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ».

CHAPITRE 1

RECOLTE DE LA SEMENCE CANINE ET INSEMINATION ARTIFICIELLE

1.1. Introduction

Le sperme canin est un liquide biologique constitué essentiellement de gamètes mâles (spermatozoïdes) et d'une fraction liquide issue des sécrétions des glandes accessoires de l'appareil génital du chien.

La formation du sperme s'effectue d'abord par la genèse des spermatozoïdes (spermatogenèse) qui passeront ensuite par plusieurs phases de maturation.

La spermatogenèse a lieu dans les testicules depuis la puberté jusqu'à la fin de vie de l'animal, par vagues régulières. La durée complète d'un cycle est de 54 jours chez le chien [39].

Dès la vie fœtale, les spermatogonies issues des cellules souches (gonocytes) constituent le pool de cellules germinales. A partir de la puberté, ces dernières vont subir plusieurs mitoses pour donner les spermatogonies (phase de prolifération). La division des spermatogonies B va aboutir à la formation d'un nombre important de spermatocytes qui vont subir une méiose et ainsi donner des spermatides (Phase de méiose). Les spermatides vont évoluer en spermatozoïdes à l'issue de plusieurs remaniements structurels tels que la réorganisation du noyau, le développement de l'acrosome et l'assemblage des structures de la queue (Phase de différenciation).

La spermatogenèse se termine par la phase de spermiation qui correspond à la libération des spermatozoïdes dans le tube séminifère. A l'issue de cette étape, les spermatozoïdes sont encore immatures et immobiles, et c'est dans l'épididyme qu'ils vont acquérir l'activité vibratile. Ainsi les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme ont leur pouvoir fécondant. Cependant la maturation complète et la capacitation auront lieu dans les voies génitales femelles.

En plus des spermatozoïdes, le sperme se compose des sécrétions des glandes accessoires dont le rôle est primordial pour la survie des gamètes mâles dans les voies génitales femelles.

Particulièrement chez le chien, il n'existe pas de glandes séminales, ni de glandes bulbo-urétrales, les seules glandes accessoires rencontrées chez cet animal sont la prostate et les glandes de Littré.

La glande prostatique est la plus importante, elle est bien développée, et sa sécrétion (liquide prostatique) constitue donc plus des trois quarts du volume de l'éjaculat. De part sa composition, le liquide prostatique assure la nutrition des spermatozoïdes (richesse en fructose), participe à leur maturation et leur protection contre l'acidité et la flore bactérienne du vagin ainsi que la réaction inflammatoire de l'appareil génital femelle [40 ; 41].

Les *glandes de Littré*, situées dans l'épithélium de la partie pelvienne de l'urètre, synthétisent le liquide pré-spermatique, appelé encore fraction urétrale, en association avec la muqueuse de l'urètre. Cependant, ENGLAND et ses collaborateurs [42] ont attribué cette fraction à la glande prostatique.

Lors de l'éjaculation, les canaux déférents et la prostate vont subir une série de contractions entraînant une progression des liquides sous pression au sein de l'urètre. Ce dernier se contracte alors à son tour jusqu'à l'émission du sperme.

Chronologiquement parlant, l'émission de la semence se divise en trois fractions. La première appelée *fraction urétrale (pré-spermatique)* de couleur transparente et d'un volume de 0,5 à 2ml en fonction de la taille des animaux, suivie par la seconde fraction dite *epidydimaire (spermatique)* très riche en spermatozoïdes de couleur blanc laiteuse et d'un volume de 0,5 à 3,5 ml, puis enfin la troisième fraction (*fraction prostatique ou post-spermatique*) qui est aqueuse, de couleur jaunâtre légèrement transparente et d'un volume de 3 à 30 ml. Cette dernière grâce à son grand volume, elle va permettre d'augmenter la pression dans le vagin de la chienne et ainsi favoriser la migration rapide des spermatozoïdes vers l'utérus [43].

1.2. Récolte du sperme canin

Habituellement, la semence canine est récoltée par stimulation digitale. Il s'agit d'une technique ancienne utilisée par l'abbé SPALLANZANI en 1787 pour réaliser ses essais d'insémination artificielle chez le chien [44]. Cette technique est restée la plus utilisée et a été décrite par plusieurs auteurs [45 ; 46].

La récolte manuelle se pratique préférentiellement en présence d'une chienne en chaleur tenue par un assistant qui présente son postérieur au chien qui est tenu par un autre aide (ou son propriétaire). L'opérateur se fait aider par un troisième assistant pour le changement des tubes de prélèvement et leur mise en bain-marie au fur et à mesure du déroulement de la récolte.

Le matériel de la récolte (Voir illustrations en Annexe 02) est gardé à 37°C jusqu'à son utilisation pour éviter le choc thermique nocif pour aux spermatozoïdes.

L'opérateur commence à masser les bulbes érectiles de façon assez vigoureuse jusqu'à obtenir un début d'érection, puis repousse le fourreau en arrière des bulbes en introduisant le gland du pénis dans le cône de prélèvement avec le premier tube attaché à son extrémité. De manière concomitante, le chien présente des mouvements d'avant en arrière du bassin. L'opérateur doit alors maintenir une pression en arrière des bulbes afin d'entretenir l'éjaculation (cela reproduit la coaptation vaginale) et de l'autre main, placer sur la verge le cône fixé sur un tube à essai (Voir illustrations en Annexe 02). A ce stade, la phase urétrale est émise par jets (Voir illustrations en Annexe 02).

Le chien arrête ses mouvements de va et vient et lève un membre postérieur. Dès que l'opérateur aperçoit le changement de couleur du liquide à travers le cône, le tube à essai est changé, pour récupérer la fraction spermatique (Voir illustrations en Annexe 02) qui est alors émise pendant environ une minute.

Dès que la semence commence à être transparente, le tube à essai est récupéré et remplacé par un autre pour ainsi recueillir la phase prostatique (Voir illustrations en Annexe 02).

Dans les centres d'insémination artificielle, la semence est rapidement examinée (cf chapitre 2) après récolte pour être inséminée immédiatement (semence fraîche) ou après conservation par réfrigération ou par congélation (cf chapitre 3).

Outre la qualité de la semence en soi, le succès de l'insémination artificielle dépend de la fécondabilité de la chienne au moment de l'insémination. Le suivi du cycle œstral est le facteur le plus souvent incriminé dans les échecs d'insémination [47].

1.3. Suivi du cycle œstral chez la chienne

Il existe plusieurs méthodes pour le suivi du cycle chez la chienne. Des méthodes dites subjectives et d'autres objectives assurant un suivi médicalisé du cycle.

Les méthodes subjectives comme le nombre de jours après le début des chaleurs, l'acceptation du mâle par la femelle, l'aspect des écoulements vulvaires s'avèrent être de mauvais critères d'orientation à la recherche du moment optimal d'accouplement et conduiront inévitablement à un échec d'insémination artificielle.

Deux techniques sont couramment utilisées de façon complémentaire pour déterminer le meilleur moment de l'insémination artificielle de la chienne. Il s'agit du frottis vaginal et du dosage de la progestérone.

1.3.1. Frottis vaginaux

Le frottis vaginal est une technique qui permet de prélever des cellules à la surface de l'épithélium vaginal (par écouvillonnage), les étaler sur une lame de verre, les fixer et les colorer (différentes colorations) en vue de les observer au microscope. Un examen au faible grossissement renseigne sur les caractères généraux du frottis (richesse en cellules, regroupement en amas, fond du frottis) et le fort grossissement permet d'identifier les types de cellules et apprécier celles qui sont kératinisées.

Ainsi, l'interprétation des lames de frottis se fait par typage des cellules de l'épithélium vaginal et surtout par appréciation du phénomène de kératinisation de ces cellules consécutive à leur imprégnation œstrogénique pendant le pro-œstrus.

Le frottis vaginal est moins précis que la progestéronémie dans le diagnostic de l'ovulation, cependant, s'il est utilisé conjointement, il sert d'un moyen d'orientation pour le commencement des dosages de la progestérone afin d'éviter l'impact financier des mesures de cette hormone répétées précocement avec des valeurs en dessous du niveau basal [48].

1.3.2. Dosage de la progestérone

Le dosage quantitatif de la progestérone est facilement réalisable par envoi rapide à un laboratoire vétérinaire ou dans les laboratoires d'analyses médicales humaines car le principe est le même. Cependant, les valeurs obtenues peuvent varier selon la technique utilisée, d'où l'intérêt de toujours employer la même technique pour des comparaisons valides.

Le dosage de la progestérone est actuellement la méthode la plus précise pour détecter le moment d'insémination.

Au moment du pic de LH, on enregistre une légère augmentation de la progestérone au dessus du niveau de base grâce au phénomène de lutéinisation pré-ovulatoire des follicules.

Au moment de l'ovulation, la progestérone atteint 5 à 10 ng/ml selon les laboratoires. La période féconde se situe environ 2 jours après que la progestérone ait dépassé les 15ng/ml. Dans les centres de reproduction canine, la semence fraîche est inséminée à partir de 8ng/ml et la semence congelée deux jours après la valeur de 10ng/ml [47].

1.3.3. Echographie ovarienne

L'échographie ovarienne est un moyen très précis de suivi de l'ovulation. Les images échographiques des follicules à la surface de l'ovaire, leurs tailles et l'appréciation de leurs parois fournissent des informations très utiles.

L'échographie ovarienne est très intéressante pour détecter avec précision d'ovulation lors d'insémination en semence congelée [48].

L'échographie ovarienne nécessite l'utilisation d'échographes perfectionnés (avec des sondes de 7,5 à 12 MHz). Elle demande une technicité importante de la part de l'échographiste et surtout, n'est réalisable que sous la forme d'un suivi échographique et d'examens rapprochés. Le jour de l'ovulation peut ainsi être déterminé de manière précise mais nécessite un suivi journalier par échographie. En effet l'aspect d'un follicule pré-ovulatoire est très proche d'un corps jaune en début d'évolution, d'où la nécessité d'échographier tous les jours [49].

Au début des chaleurs apparaissent de petits follicules de 2 à 3 mm à paroi fine. En période pré-ovulatoire, les follicules deviennent augmentent de taille et la paroi s'épaissit jusqu'à atteindre 2 mm sur un follicule préovulatoire de 7 mm de diamètre en moyenne. Ceci donne une image à l'échographie appelée en « nid d'abeille » par rapport à la ressemblance avec les alvéoles fabriquées dans la ruche [48].

Lorsque l'ovulation a eu lieu on remarque la disparition de certaines cavités folliculaires et parfois la présence de liquide en péri-ovarien entre l'ovaire et la bourse ovarique [49].

1.4. Techniques d'insémination artificielle chez la chienne

Après détermination du moment de l'insémination artificielle, cette dernière sera effectuée pour déposer la semence fraîche ou réfrigérée dans le vagin et la semence congelé-décongelée dans l'utérus de la chienne. Ainsi, l'insémination peut se faire en intra-vaginal ou en intra-utérin.

1.4.1. L'insémination artificielle intra vaginale

La semence est récoltée comme décrit précédemment (cf § 1.4.) et les trois phases de l'éjaculat examinés (cf chapitre 2) puis remplies séparément dans des seringues à deux pièces (la pièce intermédiaire en caoutchouc noir est spermicide) et maintenues à 37°C.

Le train postérieur de la chienne est relevé par un assistant et l'opérateur lubrifie la sonde d'insémination et l'introduit jusqu'au fond du vagin en respectant la topographie particulière du vagin de la chienne. La sonde est orientée diagonalement afin d'éviter la fosse clitoridienne et le méat urinaire situés sur le

plancher, puis redressée vers une position horizontale une fois le tiers postérieur du vagin dépassé. Un deuxième assistant s'occupe de fixer les seringues dans l'orifice de la sonde en respectant l'ordre des trois phases de l'éjaculat. A la fin de ces phases, un volume d'air est injecté dans la sonde pour la vider du volume résiduel de semence avant de la retirer.

Pour empêcher la semence de refluer, la chienne doit rester dans sa position (le postérieur relevé) pendant une période de 10 min en effectuant un massage clitoridien qui stimule une motricité du tractus génital afin de favoriser la remontée des spermatozoïdes. Dans le cas où une sonde de type OSIRIS est utilisée, il est inutile de relever les postérieurs de la chienne, car cette sonde est minie d'un bolonnet qui empêche le reflux de la semence vers l'extérieur.

1.4.2. L'insémination artificielle intra-utérine

L'insémination intra utérine est la technique de choix lors d'insémination en semence congelée. Elle l'est aussi lors d'utilisation de semence réfrigérée ou fraîche de mauvaise qualité (vieux chien, antécédents de pathologie de l'appareil reproducteur...) ou d'une affection du vagin.

Le dépôt de la semence congelée-décongelée en milieu utérin peut se faire par le biais de plusieurs méthodes. Une technique chirurgicale par laparotomie [50], une cathérisation aveugle du col au moyen d'une sonde scandinave [51 ; 52 ; 53 ; 54] et plus récemment la cathérisation cervicale sous vidéo-endoscopie qui sera brièvement décrite ci-après et illustrée par l'annexe 03.

Dans la technique chirurgicale, le sperme est directement injecté dans les deux cornes utérines par laparotomie ou par coelioscopie. Le caractère « invasif » de l'acte peut constituer un frein éthique ou une crainte pour le propriétaire notamment que c'est un acte chirurgical qui se fait sous anesthésie générale avec tous les risques que cette dernière peut engendrer.

La technique scandinave présente aussi des contraintes telles que la difficulté de pouvoir tenir le col par palpation transabdominale chez les chiennes de grande taille ou obèses et la difficulté d'opérer sans brusquerie afin d'éviter la contraction réflexe de la paroi abdominale d'où la nécessité de recourir à une tranquilisation.

La technique endoscopique, a été mise au point par FOUIGNER et ses collaborateurs en 1973 [55] pour l'insémination des renardes d'élevage de fourrure puis transposée à la chienne par WILSON en 1993 [56]. Cette technique implique l'utilisation de sondes flexibles avec un endoscope (téléscope) rigide pour accéder au col à travers le vagin et cathétériser le canal cervical. Elle a été développée particulièrement pour permettre la visualisation de la lumière vaginale entière, et la portion vaginale du col (orifice externe).

Matériel : (Voir illustration en Annexe 03)

Pour cette technique, on utilise un long cysto-urethroscopie qui comprend un télescope (diamètre de 3.5 mm, vision oblique avec angle de 308°, 22 Fr), une chemise de protection (adaptateurs et obturateur) et une pièce intermédiaire (10 Fr) permettant de relier les deux. Ce télescope sera relié par un câble à une source de lumière froide et son optique à une unité de contrôle vidéo qui affichera l'image sur un moniteur.

La longueur pratique du télescope est de 29 cm et son angle de vision de 308° pour permettre la visualisation du col qui est orienté dorsalement. Une sonde souple en polypropylène est faite passer par le canal opérateur du télescope pour être introduite dans l'ouverture du col (ostium) [57].

Technique : (Voir illustration en Annexe 03)

L'endoscope est introduit à travers la vulve et le long de la commissure dorsale à l'intérieur du vestibule puis du vagin. Afin d'éviter la fosse clitoridienne et l'orifice urétral, l'opérateur doit diriger l'extrémité de l'endoscope dorsalement.

L'instrument est avancé entre les plis vaginaux en suivant la direction de la lumière du vagin jusqu'à l'apparition du faux vagin (paracervix). A ce niveau, le tubercule caudal du pli médian dorsal apparaît comme un repère important qui facilite le passage dans la partie craniale du vagin. La portion vaginale du col apparaît alors comme un tubercule distinct sous forme d'une rosette à cause des plis muqueux convergeant vers l'ouverture (ostium) du col. Ce dernier est parfois identifié grâce aux sécrétions séro-sanguinolentes s'écoulant du canal cervical [58].

L'ouverture du col peut être difficile à visualiser car il tend à s'orienter ventralement ou latéralement sur le tubercule cervical. Le télescope et le cathéter peuvent être utilisés pour manipuler le col plus ou moins mobile dans la position qui permet de mieux visualiser son ouverture. Si des écoulements abondants d'œstrus empêchent la visualisation du vagin cranial, une aspiration de ce liquide à travers le cathéter ainsi qu'une insufflation d'air peuvent éventuellement améliorer la visibilité. L'extrémité du cathéter en polypropylène est avancée dans l'ouverture du col par manipulation simultanée de l'endoscope et du cathéter. La rigidité de l'endoscope facilite la manipulation du tubercule cervical pour accéder à l'ouverture du col et commencer l'insertion du cathéter. Après insertion du bout du cathéter, l'extrémité de l'endoscope doit être baissée suffisamment pour aligner le cathéter et le mettre dans l'axe du canal cervical. Une fois cette position obtenue, le cathéter peut être avancé à travers le col avec des mouvements de rotation. Pour une insémination intra-utérine, le cathéter est avancé au plus loin possible sans buter sur un obstacle [57].

La lumière utérine d'une chienne de taille moyenne en chaleur peut accommoder approximativement 2 ml de semence. Cette dernière va se répartir sur les deux cornes même si elle a été inséminée dans une seule. Après injection de la semence, un petit volume d'air (1 à 2 ml) est utilisé pour chasser le reste de la semence du cathéter vers l'utérus [58].

CHAPITRE 2

ANALYSE DU SPERME CANIN

2.1. Introduction

L'examen de la semence canine doit être réalisé systématiquement avant chaque utilisation de celle-ci (i.e. insémination artificielle, réfrigération ou congélation) afin d'évaluer le potentiel de fertilité de cette semence. Cet examen doit se faire à 37 °C pour éviter aux spermatozoïdes le choc thermique.

2.2. Analyse conventionnelle de la semence

2.2.1. Spermogramme

2.2.1.1. Examen macroscopique

Le spermogramme commence par l'appréciation des caractéristiques macroscopiques de la semence telles que le volume, la couleur et le pH.

Le volume de la fraction riche en spermatozoïdes varie entre 0,5 et 2 millilitres. L'absence totale de sperme (i.e. aspermie) ou la diminution de son volume (i.e. oligospermie) sont considérées comme des anomalies [59].

Toute modification de la couleur du sperme traduirait la présence d'un ou plusieurs éléments pouvant altérer les spermatozoïdes. La présence de sang (hémospermie) par exemple est néfaste sur la qualité du sperme après congélation-décongélation car la lyse des globules rouges entraîne la libération d'hémoglobine qui altère les spermatozoïdes [59]. La présence de pus (pyospermie) et de l'urine (urospermie) affectent aussi la fertilité.

En temps normal, le pH est compris entre 6,4 et 6,8. Toute augmentation de ce paramètre doit faire penser à une infection sous-jacente. La mesure du pH permettrait d'écarter ou d'incriminer toute affection de la prostate en cas d'asthénozoospermie (i.e. spermatozoïdes très peu mobiles) [60].

2.2.1.2. Examen microscopique

Cet examen doit se faire immédiatement après la récolte du sperme pour éviter toute dégradation de la qualité spermatique. Il se fait au microscope en déposant une goutte de la fraction spermatique de l'éjaculat sur une lame pour la mobilité massale et entre lame et lamell pour la mobilité individuelle. Afin de minimiser les risques de choc thermique pour les spermatozoïdes, cette observation au microscope doit être réalisée avec une platine chauffante.

2.2.1.1. Mobilité massale

La mobilité massale s'observe avec un faible grossissement (x100) toujours sur une platine chauffante. Elle permet d'apprécier les mouvements par vagues, les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note de zéro à cinq est alors attribuée selon l'échelle de MILOVANOV [61] (voir tableau 2.1).

Cette méthode est subjective, d'où l'intérêt d'avoir toujours le même opérateur expérimenté. Un sperme de bonne qualité a habituellement une mobilité massale d'au moins quatre sur cinq.

Tableau 2.1. Notes d'appréciation subjective de la mobilité massale selon l'échelle de MILOVANOV [61]

0	Absence de mouvement
1	Absence de mouvement d'ensemble mais faible mobilité des spermatozoïdes
2	Ebauches 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 avec déplacements fléchants

2.2.1.2. Mobilité individuelle

La mobilité individuelle est observée au grossissement (x400). Elle permet d'apprécier subjectivement le pourcentage de spermatozoïdes fléchants (ayant des

déplacements rapides en lignes droites). Un sperme de bonne qualité possède plus de 70% de spermatozoïdes fléchant [62].

2.2.1.3. Concentration des spermatozoïdes

Le comptage des spermatozoïdes est réalisée classiquement par la technique microscopique en utilisant une cellule hématimétrique après dilution de la semence généralement au centième dans une solution hypertonique de chlorure de sodium à 3% afin d'immobiliser les spermatozoïdes. Les cellules sont comptées dans les quadrillages de l'hématimètre, ensuite une formule permettra de calculer la concentration [63].

Dans les centres d'insémination artificielle et les banques de semence canine, la technique microscopique s'avère trop lente et donc incompatible avec la cadence du travail. La concentration est plutôt mesurée par des spectrophotomètres de commerce calibrés spécialement pour la semence canine et capable de donner un résultat en quelques secondes [64].

2.3. Analyse non conventionnelle de la semence

Les techniques conventionnelles d'analyse de la semence basées sur l'appréciation macroscopique et microscopique de la mobilité, la morphologie des spermatozoïdes ont l'inconvénient de la subjectivité et celui de la lenteur. Actuellement, la référence en matière d'analyse de laboratoire de la semence est représentée par l'analyse des caractéristiques de mouvement spermatique assistée par ordinateur [65] combinée aux différents tests d'intégrité fonctionnelle et structurale utilisant les sondes fluorescentes (i.e. fluorochromes) et la microscopie à épi fluorescence [65].

2.3.1. Analyse informatique des caractéristiques de mouvement.

Autrefois, la microscopie photonique était utilisée de routine pour évaluer la concentration, la mobilité et la morphologie. Le problème de base était la subjectivité et la variabilité dues essentiellement à l'expérience de l'opérateur et la qualité du microscope. A cela, s'ajoute aussi le nombre limité de spermatozoïdes analysés et le temps nécessaire à la réalisation de ces analyses. Toutes ces limitations ont favorisé le développement de techniques d'analyse assistées par ordinateur (CASA pour Computer Aided Sperm Analysis).

En effet, le premier système CASA chez le chien a été mis au point par GUNZEL-APEL et ses collaborateurs en 1993 [66] et STACHECKI et ses collaborateurs en 1993 [67]. Depuis, plusieurs systèmes ont été développés et tous validés chez le chien dont essentiellement le Hamilton-Thorne [68 ; 69], le Sperm Vision [70] et dernièrement le Sperm Class Analyzer [71].

Ces systèmes assistés par ordinateur consistent généralement en un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra, d'une platine chauffante, un numériseur d'image et un ordinateur pour analyser et stocker les données. Ce sont des analyseurs de mouvements spermatiques qui reconstruisent les trajectoires d'après les positions de la tête du spermatozoïde sur des captures d'images successives et calculent simultanément plusieurs paramètres de motilité.

Le système CASA offre une analyse précise, rapide et simultanée de plusieurs paramètres de mobilité qui sont détaillés ci-après [72] et schématisés par la figure 2.1.

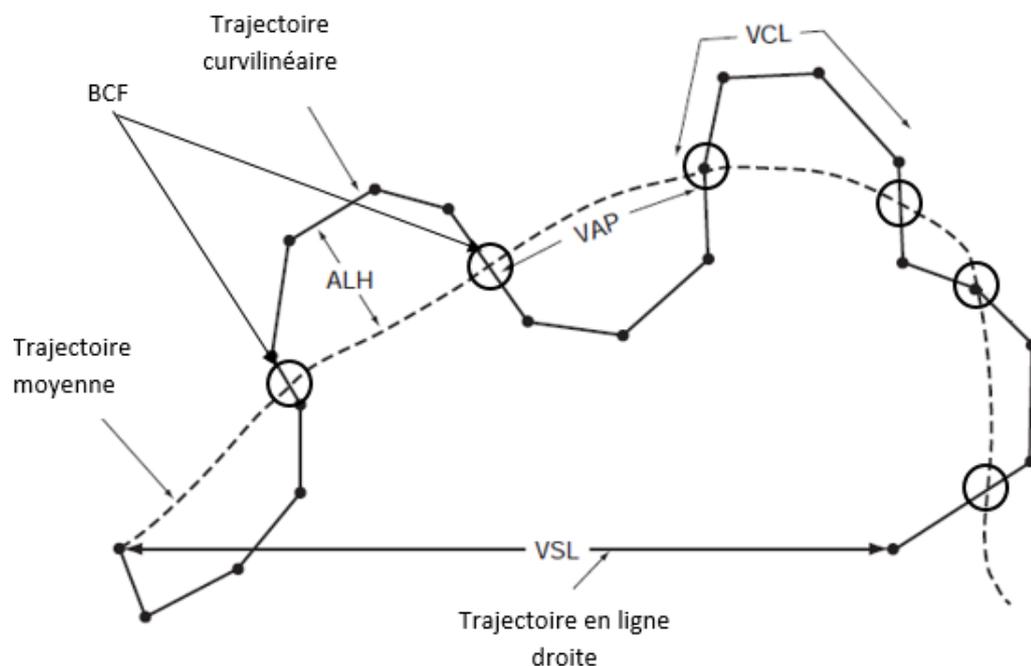


Figure 2.1. Terminologie standard des variables mesurées par le système CASA [72]

- Le pourcentage total de spermatozoïdes mobiles (**MOT** pour Motility, %).

- Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs (**PMOT** pour Progressive Motility, %) qui se déplacent rapidement et avec une trajectoire relativement rectiligne. Ces spermatozoïdes se caractérisent par une VAP > 50 $\mu\text{m/s}$ (vitesse le long de la trajectoire moyenne des spermatozoïdes) et une STR > 70 % (rectitude de la trajectoire des spermatozoïdes).
- La vitesse le long de la trajectoire moyenne des spermatozoïdes (**VAP** pour Average Path Velocity, $\mu\text{m/s}$). Elle est calculée en lissant la trajectoire curvilinéaire réelle des spermatozoïdes selon des algorithmes propres aux analyseurs. Les algorithmes peuvent être différents selon les analyseurs, les valeurs ne sont donc pas comparables entre les différents systèmes.
- La vitesse de progression linéaire des spermatozoïdes (**VSL** pour Straight Line Velocity, $\mu\text{m/s}$). Elle correspond à la vitesse des spermatozoïdes en ligne droite (la distance entre la première et la dernière position détectée).
- La vitesse curvilinéaire des spermatozoïdes (**VCL** pour Curvilinear Velocity, $\mu\text{m/s}$). Elle correspond à la vitesse des spermatozoïdes selon leur trajectoire curvilinéaire réelle telle que reconstruite point par point par le système. Ce paramètre renseigne sur la vigueur des spermatozoïdes.
- L'amplitude de déplacement latéral de la tête des spermatozoïdes (**ALH** pour Amplitude of Lateral Head displacement, μm). Elle correspond à l'amplitude des déplacements latéraux des têtes de spermatozoïdes par rapport à leur trajectoire moyenne. Ce paramètre est calculé grâce aux algorithmes variables selon les analyseurs, les valeurs ne sont donc pas comparables entre différents systèmes.
- La fréquence de croisement des trajectoires moyennes et curvilinéaires des spermatozoïdes (**BCF** pour Beat Cross Frequency, **Hz**). Elle correspond à la fréquence à laquelle les trajectoires moyennes et curvilinéaires se croisent. Elle reflète artificiellement la fréquence de battements flagellaires.
- La rectitude de la trajectoire des spermatozoïdes (**STR** pour straightness, %). Elle correspond à la linéarité de la trajectoire moyenne. La STR est obtenue par le rapport VSL/VAP.
- La linéarité de la trajectoire des spermatozoïdes (**LIN**, %). Elle correspond à la linéarité de la trajectoire curvilinéaire et est obtenue par le rapport VSL/VCL.

Depuis la validation chez le chien du système Hamilton Thorne (HT), il n'y a eu que deux études de faites sur du sperme frais provenant de chiens fertiles dont les résultats peuvent servir de valeurs de référence chez le chien [68 ; 69].

RIJSSELAERE et ses collaborateurs (2003) [69] ont prélevés 45 chiens de 16 races différentes et ont utilisé le système HT- CEROS. IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001) [68] ont par contre prélevé 42 chiens de race Beagle en utilisant le système HT-IVOS. Nous avons rapporté les données de ces derniers auteurs (Tableau 2.2.) car ils avaient utilisé le même programme (IVOS) et la même race canine (Beagle) que dans nos travaux expérimentaux notamment qu'il a été montré que la qualité du sperme canin évaluée par CASA varie avec la race et l'âge [73].

Tableau 2.2. Valeurs moyennes et extrêmes des paramètres étudiés sur la semence canine fraîche dans un lot de 42 chiens de race Beagle [68]

	Moyenne	Minimum	Maximum
Concentration (10^6spz/mL)	393	332,5	658
Mobilité (%)	89	73	99
Mobilité progressive (%)	61	43	75
VAP ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	107	81	146
VSL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	88	64	121
VCL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	163	103	235
ALH (μm)	7	4	11
BCF (Hz)	25	17	34
Linéarité (%)	55	37	70

L'analyseur d'image (systèmes CASA) a été utilisé avec succès et beaucoup d'objectivité dans l'étude comparative de l'efficacité des différents dilueurs de la semence canine et aussi dans l'amélioration des protocoles de cryoconservation et de réfrigération chez le chien [70 ; 74 ; 75 ; 76 ; 17 ; 18 ; 65 ; 77].

2.3.2. Evaluation des caractéristiques d'intégrité spermatique par marquage fluorescent.

Pendant les dernières décennies, plusieurs sondes fluorescentes (fluorochromes) ont été utilisées dans l'analyse de la semence canine. Ces fluorochromes sont

destinés à se fixer sur des cibles cytologiques différentes pour renseigner sur l'état d'intégrité des diverses parties du spermatozoïde (i.e. membrane plasmique, acrosome, chromatine) et par conséquent son statut fonctionnel [73].

Contrairement aux méthodes conventionnelles, ces colorations à fluorescence ont l'avantage d'évaluer la fonctionnalité spermatique dans l'échantillon sans interférer avec les globules gras ou d'autres substances non colorées [78] et ont également l'avantage d'une distinction nette entre les différentes populations de spermatozoïdes lors de l'interprétation [79].

2.3.2.1. Intégrité de la membrane plasmique du spermatozoïde

Avant d'aborder les tests de coloration à fluorescence qui explorent l'intégrité structurale de la membrane (i.e. viabilité), il est utile de parler d'un test très simple réalisable par microscopie photonique pour explorer l'intégrité membranaire fonctionnelle (flagellaire).

2.3.2.1.1. Intégrité fonctionnelle (flagellaire) de la membrane plasmique (HOSt)

L'intégrité membranaire fonctionnelle (flagellaire) du spermatozoïde est évaluée par le test hypo-osmotique (HOSt :Hypo-osmotic swelling test) selon la technique mise en oeuvre sur semence humaine par JEYENDRAN et ses collaborateurs en 1984 [80] puis validée sur la semence canine par ENGLAND et PLUMMER en 1993 [81].

Ce test est basé sur le principe du phénomène d'osmose à travers une membrane intacte. En effet, les spermatozoïdes incubés dans une solution hypo osmotique verront l'eau se déplacer vers le milieu intracellulaire par simple osmose augmentant ainsi le volume du cytoplasme. Dans les conditions hypo-osmotiques, le flagelle dont les fibres sont en temps normal entourées intimement par la membrane plasmique, donnera lieu à une flexion et une ondulation observable au microscope à contraste de phases [82].

Un spermatozoïde qui réagit au test possède une membrane intacte et fonctionnelle et celui qui n'y réagit pas une membrane détériorée (non fonctionnelle) et est considéré comme un spermatozoïde mort [81].

2.3.2.1.2. Intégrité structurale de la membrane plasmique (Viabilité)

L'intégrité de la membrane plasmique est une condition sine qua non pour la vitalité et la fonctionnalité du spermatozoïde. Elle est l'interface entre ce dernier et son environnement, et est de ce fait le premier site de lésions ou de dysfonctionnements occasionnés par la cryoconservation [83 ; 84]. L'intégrité membranaire du spermatozoïde canin peut être évaluée par la combinaison de plusieurs sondes fluorescentes (fluorophores) incluant essentiellement le SYBR14 couplé à l'iodure de propidium (IP) [79 ; 85 ; 86].

EN 1995, GARNER et JOHNSON de l'université de Nevada (USA) ont été les premiers à mettre en évidence l'intérêt du colorant « SYBR 14 » combiné à l'iodure de propidium « IP », (i.e. colorant conventionnel des cellules mortes) dans l'évaluation de l'intégrité membranaire du spermatozoïde [87]. Depuis, cette combinaison de colorants (SYBR14/IP) fût validée et largement appliquée sur le sperme canin [79 ; 88 ; 85 ; 86].

Le SYBR14 est devenu un marqueur habituel des cellules vivantes dans diverses espèces animales y compris le chien. Il est un colorant non fluorescent qui traverse passivement la membrane plasmique du spermatozoïde pour être après rapidement converti en un composant hautement fluorescent par les estérases intracellulaires [89]. Ce fluorochrome vert est maintenu à l'intérieur de la cellule par les cellules à membranes intactes [90]. Lorsque la membrane se dégrade suite à la mort cellulaire, les cellules perdent leur capacité à résister à l'entrée du colorant à fluorescence rouge (IP). Par conséquent, ce dernier remplace le colorant vert (SYBR14) [87]. Ainsi, le spermatozoïde vivant à membrane intacte émet une fluorescence verte (SYBR-14) alors que le spermatozoïde mort une fluorescence rouge (IP).

La coloration combinant SYBR-14/IP est beaucoup plus sensible dans la détection des dégâts mineurs comparativement aux méthodes conventionnelles de viabilité [78 ; 79] à cause d'une part de l'absence d'interférence avec les particules lipidiques et autres substances présentes dans les dilueurs de conservation de semence. Un autre avantage de cette coloration est la possibilité de détecter une troisième catégorie de spermatozoïdes (i.e. moribonds) [78]. Cette population consiste en spermatozoïdes montrant à la fois deux fluorescences rouge et verte et représente

les cellules légèrement endommagées ayant perdu leur capacité d'exclure l'entrée du colorant à fluorescence rouge (IP) [87].

L'utilisation de ces fluorochromes pour évaluer l'intégrité membranaire spermatique est devenue une méthode de routine dans l'analyse de la semence canine fraîche [86], centrifugée [79], réfrigérée [91] et congelée-décongelée [92 ; 93].

2.3.2.2. Intégrité de la membrane acrosomique du spermatozoïde.

L'acrosome est un organe sécrétoire acide contenant des enzymes hydrolytiques nécessaires à la pénétration de la zone pellucide. Son intégrité est donc d'une grande importance pour le pouvoir fécondant du spermatozoïde [73]. Cette intégrité peut être évaluée par le test de coloration à fluorescence au PSA-FITC (Pisum Sativum Agglutinin – Fluorescein Isothiocyanate) grâce à une lectine (PSA) qui est une glycoprotéine végétale (agglutinine extraite du pois) capable de se fixer à des fragments de l' α -mannose et l' α -galactose de la matrice acrosomique et marquer ainsi l'acrosome intact [90]. Cette agglutinine (PSA) se lie intensément sur les régions antérieures et équatoriales de l'acrosome et faiblement sur les autres régions du spermatozoïde. Elle est couplée à un marqueur fluorescent le FITC qui permet de révéler deux modes de fluorescence en fonction du statut de l'acrosome. En effet, l'acrosome intact apparaît vert tandis que les spermatozoïdes ne présentant pas de coloration ou bien une fluorescence limitée à la région équatoriale, ne possèdent pas de vésicule acrosomique.

Cette technique a été mise en évidence par MENDOZA en 1992 [94] en semence humaine, puis elle a été largement appliquée dans l'analyse de la semence canine. Actuellement, les lectines sont utilisées en routine pour l'évaluation du statut acrosomique et la capacité fécondante de la semence canine fraîche [86], réfrigérée [91] et cryoconservée [95 ; 96 ; 97].

2.3.2.3. Intégrité de la chromatine du spermatozoïde

L'intégrité de l'ADN du spermatozoïde a été évaluée par un test destiné à explorer le statut structural de la chromatine du spermatozoïde (SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay) en utilisant le colorant fluorescent acridine-orange (AO). Le principe de ce test est que les anomalies de structure rendent l'ADN plus sensible à la dénaturation à l'acide [98].

La coloration A.O. permet de mettre en évidence l'ADN natif (double brin) et l'ADN dénaturé (simple brin). En effet, selon la liaison à l'ADN simple ou double brin, l'acridine orange émet une couleur différente. Ainsi, lorsque le spermatozoïde apparaît vert, cela signifie que son ADN est natif alors qu'il apparaît rouge si l'ADN est dénaturé.

La difficulté d'utilisation de l'acridine orange réside dans le fait qu'il faut un équilibre précis entre les molécules d'Acridine orange et les groupements phosphates d'ADN. Il peut également y avoir des défauts de colorations (toutes les cellules rouges ou vertes) si la lame ou la lamelle ne sont pas parfaitement plates.

Le résultat est lu en fonction de l'émission fluorescente du spermatozoïde. Une fluorescence verte signe une fixation à de l'ADN natif (double brin), et une fluorescence rouge une fixation à de l'ADN dénaturé (mono brin). Le taux de dénaturation est évalué par le rapport entre la proportion de spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge et la population totale de spermatozoïdes (fluorescences verte + rouge).

Cette technique a été utilisée avec succès et présente une bonne corrélation avec la fertilité sur la semence bovine [99] équine [100] et canine [101].

L'interprétation des résultats de ce test se fait en calculant l'index de fragmentation d'ADN (DFI), qui permet de classer la semence humaine selon les critères suivants : (<15% : semence excellente – 15-30% : semence bonne - >30% : semence mauvaise). Un taux de fragmentation supérieur à 30% est associé à des faibles taux de blastocysts et de gestation ainsi qu'à des taux élevés d'avortements [102].

KIM et ses collaborateurs (2010) ont travaillé sur l'effet du processus de cryoconservation sur l'intégrité d'ADN du sperme canin et ils ont rapporté un index de fragmentation moyen de 6,47% [103].

CHAPITRE 3

CONSERVATION DU SPERME CANIN

3.1. Introduction

La première insémination artificielle avec du sperme frais fût réalisée en Italie par l'Abbé SPALLANZANI en 1787, mais ce succès n'a pas été suivi de progrès dans la conservation de la semence canine. Il fallut attendre l'année 1954 pour voir la première insémination artificielle réussie en semence réfrigérée dans les travaux d'HARROP en 1954 [1] et une dizaine d'années après (1967) pour voir naître la première portée de chiots vivants par insémination artificielle de sperme congelé dans les travaux de SEAGER [2].

Ce succès a suscité chez les scientifiques et les éleveurs un grand intérêt quant aux progrès des techniques de procréation assistée dans cette espèce. De nos jours, les techniques de conservation de la semence connaissent un grand essor, notamment avec la naissance de plusieurs banques de semence canine aux universités, dans les clubs cynophiles ou dans des compagnies privées offrant des prestations d'élevage [6].

La conservation de la semence canine peut se faire soit sous forme liquide pendant quelques jours (à court terme) grâce à un protocole de réfrigération (à 4°C) soit à l'état congelé pendant un temps indéterminé (à long terme) par le biais d'un protocole de cryoconservation à l'azote liquide (à -196°C).

Ces processus de cryoconservation ou de réfrigération représentent une interruption artificielle de la progression du spermatozoïde vers la maturation et la fertilisation qui suit naturellement l'éjaculation. Ils comprennent ainsi les stades qui se succèdent depuis la sortie du spermatozoïde du milieu (température) corporel jusqu'à son retour à cette température [104].

La résistance du spermatozoïde à la réfrigération et à la congélation diffère selon les espèces. Les spermatozoïdes équin, félin, canin et humain sont relativement

insensibles au choc de refroidissement alors que les cellules spermatiques bovine, ovine, caprine montrent plus de sensibilité [105 ; 106].

Les altérations physiques et chimiques de la membrane cellulaire induites par le refroidissement sont irréversibles et diffèrent de celles causées par la congélation-décongélation. Le choc de refroidissement et les lésions de congélation constituent alors deux phénomènes distincts [107].

Ces deux processus provoquent plusieurs altérations membranaires irréversibles (perturbation de la structure des bicouches lipidiques) telles que la diminution de la fluidité et l'augmentation de la perméabilité membranaire, les lésions de l'acrosome, la déshydratation, la libération d'enzymes et de PL, la réduction de l'activité métabolique et la diminution de la consommation d'ATP. Ces altérations compromettent totalement ou partiellement la fertilité et se traduisent évidemment par une chute de la mobilité spermatique [107].

3.2. Lésions spermatiques consécutives à la conservation.

Les lésions consécutives aux processus de congélation et de réfrigération sont généralement de deux grands types. Les lésions létales qui affectent la viabilité des spermatozoïdes congelés-décongelés ou réfrigérés-réanimés et les perturbations fonctionnelles des spermatozoïdes ayant survécu aux processus de conservation par le froid.

3.2.1. Lésions spermatiques létales

Ces lésions sont généralement létales compromettant considérablement la viabilité de spermatozoïdes. Elles sont consécutives à trois facteurs en l'occurrence le changement de température, l'addition du cryoprotecteur et la formation et la dissolution des cristaux de glaces. Le premier facteur concerne au même temps la réfrigération et la congélation de la semence alors que les deux derniers sont liés uniquement au processus de congélation. Ainsi, les spermatozoïdes congelés-décongelés sont exposés à beaucoup plus de lésions létales que ceux réfrigérés-réanimés et ont par conséquent une viabilité beaucoup plus amoindrie [6].

3.2.1.1. Lésions liées au changement de la température

Dans le processus de cryoconservation ou de réfrigération, lorsque la température chute brusquement entre 30°C et 0°C il en résulte un stress létal proportionnel au taux de refroidissement, à l'intervalle et à la gamme de température [108]. Ce phénomène s'appelle le choc de refroidissement « cold shock » et affecte variablement le sperme des différentes espèces animales. La gestion du refroidissement dans cet intervalle de température doit être conduite avec beaucoup de prudence.

Même avec un refroidissement très lent, le changement de température induit beaucoup de stress sur la membrane plasmique. Ce stress est probablement lié à un changement de phase des lipides et à l'altération du statut fonctionnel de la membrane. Il peut continuer en dessous de la température de 0°C car le changement de phase des lipides membranaires n'est pas achevé à cette température. Cependant, il a été bien établi que les lésions majeures consécutives au changement de phase se produisent entre 5 et 15°C [84].

Plusieurs auteurs ont exploré à l'échelle moléculaire la membrane plasmique du spermatozoïde avant pendant et après refroidissement et ont mis en évidence une séparation de phase qui n'est que partiellement réversible après réveil de la semence [109 ; 110]. PETTITT et BUHR [111] ont montré en 1998 l'importance de la modulation de l'environnement des lipides membranaires pendant le refroidissement impliquant la composition lipidique dans les mécanismes lésionnels.

D'autres constituants membranaires sont altérés par ce stress thermique. Les protéines membranaires sont groupées sous l'effet de la séparation de phase des lipides ce qui pourrait éventuellement perturber leurs fonctions particulièrement les protéines qui fonctionnent par modulation structurale telles que les protéines des canaux ioniques.

Il est aussi évident que la perméabilité membranaire s'accroît après refroidissement [112 ; 113] à cause probablement d'une déstabilisation membranaire et aussi de l'altération de certaines protéines-canaux.

La régulation calcique est également perturbée par le phénomène de refroidissement ayant inévitablement des conséquences sérieuses en matière de fonctions cellulaires [114] pouvant aller dans des cas extrêmes jusqu'à l'incompatibilité avec la viabilité. L'entrée calcique pendant le refroidissement contribue aux changements capacitifs et aux phénomènes de fusion entre les membranes plasmique et externe de l'acrosome à l'instar de la réaction acrosomique.

En plus, les éléments du cytosquelette sont sensibles au changement de température. Le refroidissement peut induire une polymérisation précoce des filaments d'actine [115 ; 116] qui peut être à l'origine de la fusion entre les membranes plasmique et acrosomique externe [117] lors d'un processus de réfrigération ou de cryoconservation.

3.2.1.2. Lésions liées aux cryoprotecteurs (CPA)

Dans le cadre de la congélation du sperme, l'ajout du cryoprotecteur (essentiellement le glycérol chez le chien) en proportions molaires induit d'une part un stress osmotique très fort mais transitoire à la membrane plasmique du spermatozoïde [118] et d'autre part une action toxique dose-dépendante [119].

3.2.1.3. Lésions liées aux cristaux de glace

Pendant la congélation, il se forme des cristaux de glace qui provoquent une augmentation excessive de la pression osmotique dans les fractions non encore congelées dans le dilueur [120]. Ceci s'explique par le fait que la fraction hydrique du dilueur exposé à une température de congélation se cristallise sous forme de glace et les solutés sont dissouts dans l'eau de la fraction non encore congelée d'où l'augmentation de la pression osmotique. La proportion de la fraction hydrique qui se cristallise ainsi que la pression osmotique de la fraction non cristallisée dépendent de la température. Plus elle est basse et moins la fraction hydrique non cristallisée sera importante et par conséquent la pression osmotique dans cette dernière est plus importante.

Il est évident que la durée d'exposition à ces conditions devrait être minimisée pour une survie optimale des spermatozoïdes ce qui implique que le refroidissement

devrait être rapide. Cependant, le taux de refroidissement devrait aussi être assez lent pour permettre la sortie d'eau par osmose afin d'éviter une cristallisation intracellulaire mortelle.

3.2.2. Dysfonctionnement spermatique

Contrairement aux lésions létales décrites plus haut, le dysfonctionnement ne compromet pas la viabilité des spermatozoïdes. Il comprend la pseudo-capacitation, le déclin de la mobilité, le stress oxydatif et l'incapacité à assurer un développement embryonnaire.

3.2.2.1. Pseudo-capacitation

Les spermatozoïdes refroidis et réanimés montrent une augmentation considérable du calcium intracellulaire et se comportent comme s'ils étaient capités [104].

3.2.2.2. Déclin de la mobilité spermatique

Parmi les effets les plus évidents de la cryoconservation sur les spermatozoïdes on note le déclin de leur mobilité. Au moment où une minorité de ces cellules spermatiques semble conserver une bonne mobilité progressive, la majorité a une mobilité détériorée compromettant leur capacité de se mouvoir jusqu'au site de fécondation. Ceci explique leur pouvoir fécondant relativement faible une fois introduits dans le tractus génital femelle par insémination artificielle [121].

3.2.2.3. Stress oxydatif

Il est évident que le processus de cryoconservation perturbe les mécanismes anti oxydatifs naturels du spermatozoïde et provoque ainsi une production excessive des radicaux libres. Le stress oxydatif qui en résulte induit un dysfonctionnement spermatique [122 ; 123 ; 124]. Cependant, un taux minimal de ces radicaux libre (super oxyde) est indispensable pour le bon déroulement de la fécondation [125].

3.2.2.4. Incapacité à assurer un bon développement embryonnaire

La structure de l'ADN du spermatozoïde est un trait spermatique non compensable : l'intégrité de l'ADN n'est pas indispensable pour la fécondation de l'ovocyte, mais après fertilisation ce trait est nécessaire pour assurer un développement

embryonnaire normal [126 ; 127]. L'évaluation du statut structural de l'ADN avant et après congélation peut être très utile pour juger de la capacité fécondante du sperme et pour prédire la fertilité du sperme congelé-décongelé en général [128 ; 129]. SALAMON et MAXWELL (1995) [130] ont rapporté chez le bovin que le sperme congelé-décongelé est associé à une incidence élevée de mortalité embryonnaire précoce. Les éventuels mécanismes ont pu être étudiés par exploration du statut d'intégrité de l'ADN (Cf Chap. 2 § 3.2.1) et mise en évidence de lésions de dénaturation de la chromatine [131].

NAVARA et ses collaborateurs [132] ont suggéré en 1995 que la contribution du spermatozoïde au zygote ne se limite pas seulement au génome mâle haploïde. En effet, plusieurs auteurs ont évoqué l'éventuelle implication de l'ARN spermatique aux événements qui précèdent l'activation de génome embryonnaire [133 ; 134 ; 135]. Ceci implique d'autres possibilités de dysfonctionnement spermatique affectant le développement embryonnaire.

La littérature contient des données controversées au sujet de l'effet de la cryoconservation sur l'intégrité d'ADN spermatique. Cette intégrité serait inaltérée selon [98 ; 136] et dégradée par ce processus de conservation selon [137 ; 138 ; 102 ; 128 ; 103].

3.3. La cryoprotection des spermatozoïdes

Dans le cadre de la conservation de la semence, les différents mécanismes de cryoprotection spermatique visent généralement deux grands objectifs. Le premier est l'amélioration du taux de viabilité des spermatozoïdes congelés-décongelés en réduisant l'incidence des lésions létales cryo-induites. Le second est d'améliorer la qualité des cellules ayant survécu à la cryoconservation en limitant le dysfonctionnement spermatique consécutif au processus de conservation [5].

Le succès de la conservation du spermatozoïde par réfrigération et par congélation dépend de plusieurs étapes destinées à réduire les lésions cellulaires et à assurer une longévité adéquate *in-vitro* et *in-vivo* dont essentiellement, l'adition des dilueurs, le type de tampon utilisé, l'adition des stabilisants membranaires, l'ajout du cryoprotecteur proprement dit (glycérol) ainsi que la durée d'équilibration avant congélation.

3.3.1. Les dilueurs de réfrigération et de congélation :

Les dilueurs sont les milieux dans lesquels le sperme est conservé. Ils assurent des conditions osmotiques et de pH favorables et fournissent de l'énergie aux spermatozoïdes pendant la période de stockage à 4°C en cas de réfrigération et entre le refroidissement, l'équilibration et la congélation pour la cryoconservation.

Pour assurer ces fonctions, les dilueurs de réfrigération et de congélation de semence contiennent généralement une source d'énergie, des tampons, et des antibiotiques.

L'adaptation empirique des dilueurs utilisés chez le bovin a initié l'emploi de tampons à base de glucose-phosphate [139], citrate [1], chloride-phosphate [140], lactose [2], Tris (trimethylhydroxyaminomethane) [141] et Tris-fructose-citrate [142 ; 143 ; 51] dans les premières expérimentations pour la conservation réfrigérée ou congelée du sperme canin.

La plupart des chercheurs utilisent sans modification l'ancien tampon Tris-fructose d'autres l'ont développé en remplaçant le fructose par du glucose pour son double effet nutritionnel et osmotique ou par du saccharose ou du lactose qui agissent comme des cryoprotecteurs extracellulaires en plus d'assurer un effet osmotique favorable [52 ; 144 ; 145 ; 146 ; 147 ; 56].

Le tampon Tris-citrate a une action supérieure aux autres tampons pour la réfrigération [148] et la congélation [149] du sperme canin.

Pour protéger les spermatozoïdes contre les effets du froid, les dilueurs de réfrigération comme ceux de congélation doivent contenir obligatoirement des stabilisants membranaires encore appelés protecteurs de refroidissement (classiquement jaune d'œuf) alors que les dilueurs de congélation contiennent en plus des substances dites cryoprotectrices destinées à protéger les gamètes contre la formation des cristaux de glaces.

3.3.1.1. Les cryoprotecteurs proprement dit (CPA)

En plus des constituants communs entre les dilueurs de réfrigération et de congélation de la semence, ces derniers contiennent des substances dites

cryoprotectrices destinées à réduire les dégâts liés à une concentration trop élevée en sels d'une part et surtout éviter la formation de cristaux de glaces qui vont léser la membrane cytoplasmique du spermatozoïde d'autre part.

Les cryoprotecteurs sont des solvants organiques utilisés seuls ou en association qui peuvent être scindés en 2 catégories : pénétrants et non pénétrants à travers la membrane du spermatozoïde.

Les cryoprotecteurs pénétrants sont souvent des molécules de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau à température ambiante, porteurs de radicaux hydroxyles (alcools : glycérol, éthylène glycol, propylène glycol) ou sulfoxydes (diméthylsulfoxyde : DMSO). Les non pénétrants peuvent être de faible poids moléculaire (la plupart des sucres ajoutés : le galactose, le glucose, le saccharose, le tréhalose...) ou de poids moléculaire élevé (le polyvinylpyrrolidone, l'alcool polyvinylique, l'acide hyaluronique,...).

Dans la congélation du sperme canin, le glycérol est utilisé avec succès depuis longtemps et s'est avéré mieux que beaucoup d'autres cryoprotecteurs. La présence du glycérol dans les dilueurs entraîne, dans un premier temps, une déshydratation des cellules par effet d'une forte osmose. Une fois qu'il est à l'intérieur des spermatozoïdes, ses radicaux hydroxyles établissent des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, les retenant ainsi à l'intérieur de la cellule. Le volume cellulaire ré augmente jusqu'à atteindre l'équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane. Le glycérol diminue alors les flux hydriques et solubilise les sels intracellulaires. Il assure ainsi le maintien du volume cellulaire. Cet équilibre est obtenu en une vingtaine de seconde mais s'accélère avec la température.

Finalement, l'ajout de glycérol permet de réduire le volume des cellules mais il contribue aussi à la réduction 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 congelée. Il modifie aussi le schéma de cristallisation de l'eau qui se fait de façon cubique plutôt qu'hexagonale (délétère aux cellules). Les cristaux de glace formés sont plus petits et moins anguleux, diminuant ainsi le risque de lésions membranaires à l'origine d'une mort cellulaire [150].

Le glycérol fournit donc aux spermatozoïdes un environnement propice à la préservation et à l'intégrité de leurs membranes et de leurs fonctions. Il est donc le

cryoprotecteur le plus largement utilisé pour la congélation de la semence des animaux domestiques [151].

Le glycérol n'est cependant pas sans inconvénients. A côté de ses facultés cryoprotectrices, il a été montré qu'il a un effet toxique sur les spermatozoïdes touchant toutes les parties de la membrane plasmique [152]. En plus, il altère fortement l'osmolarité du dilueur. L'osmolarité du milieu spermatique semble être dans les limites de celle du plasma normal (300 mOsm /L). Une solution contenant 6% (v/v) de glycérol dans un tampon Tris a une osmolarité approximativement de 1300 mOsm/L [152]. Une concentration finale oscillant entre 2 et 4% (v/v) semble suffisante pour protéger les spermatozoïdes pendant une congélation rapide avec un minimum d'effets toxiques profonds [147 ; 152].

3.3.1.2. Temps d'équilibration/adaptation

L'équilibration est une étape essentielle dans la cryoconservation du sperme. En plus de la prévention de la formation des cristaux de glace assurée par le cryoprotecteur (glycérol), cette équilibration permet au spermatozoïde d'être plus stabilisé et adapté aux basses températures en préparation à la congélation. Ces changements sont dus à la température de réfrigération et aux protecteurs de refroidissement encore appelés agents stabilisants membranaires (JO et substituts) [153].

Dans la congélation de la semence canine, le glycérol est ajouté soit en une seule étape suivie d'une réfrigération à 4°C pendant 1 à 2 heures selon la majorité des protocoles [154] ou en deux étapes pendant un temps global d'une heure et demi à deux heures selon d'autres auteurs [155; 156; 157].

Beaucoup d'études ont exploré le prolongement du temps de réfrigération avant l'ajout du glycérol et la congélation de la semence canine [153 ; 158 ; 159] mais seulement quelques auteurs ont étudié l'effet du temps d'équilibration (avec ajout de glycérol) proprement dit.

Il a été rapporté que le temps optimal est de 2h chez le bouc [160] et 4 heures pour le taureau [161] et le chien [162]. Tous ces protocoles utilisent le JO.

Selon ANDERSEN (1972) [163], et YUBI (1984) [164] la semence canine doit être mise en équilibration à une température de réfrigération pendant 2-3h avant

congélation. OLAR (1982) [165] n'a pas détecté de différence dans la mobilité post décongélation entre des échantillons équilibrés pendant 1, 2 et 3 heures et ENGLAND (1992) [147] a trouvé que l'équilibration optimale était de 4h. Ce résultat a été confirmé par IGNA et al (2008) [162].

Il est à noter que la pénétration du cryoprotecteur ne demande pas plus de 30 secondes [166] et le bénéfice d'une durée d'équilibration plus longue n'est donc pas lié uniquement à la pénétration du cryoprotecteur. En effet, l'équilibration correspond au temps d'incubation des spermatozoïdes avec les protecteurs de refroidissement (jaune d'œuf ou substituts) qui exigent parfois un temps prolongé [34].

3.3.1.3. Les Stabilisants membranaires

Les stabilisants membranaires ou protecteurs de refroidissement sont représentés essentiellement par le JO qui est largement utilisé comme aditif au dilueurs de réfrigération et de congélation à base du tampon Tris. Il contient la phosphatidylcholine (lécithine) qui protégerait la membrane plasmique du spermatozoïde en restaurant les phospholipides perdus pendant le choc de refroidissement [105 ; 152].

La concentration du jaune d'œuf dans le dilueur à base de Tris varie chez le chien entre 10 et 20% v/v [52 ; 56]. ENGLAND (1992) [147] a trouvé que 10% était meilleure que 20%.

Dans la plupart des études sur la réfrigération et la congélation du sperme canin, le jaune d'œuf entier fût utilisé comme le protecteur de refroidissement majeur. Cependant, le JO entier pose quelques problèmes d'ordre bio sanitaire ayant suscité un grand intérêt à sa substitution.

Plusieurs substances ont été tentées pour le remplacer en l'occurrence les LDL qui sont sa fraction cryoprotectrice et plus récemment les lipides exogènes tels que les liposomes.

CHAPITRE 4

ETUDE DES STABILISANTS MEMBRANAIRES

4.1. Introduction

Les agents stabilisants membranaires [7] encore appelés protecteurs membranaires de refroidissement [8], sont représentés classiquement par le JO entier ou par des substances extraites du JO en l'occurrence le plasma ou plus spécifiquement les lipoprotéines à basse densité (LDL, pour low density lipoproteins). Plus récemment, de nouvelles substances ont été explorées comme structures biomimétiques destinées à se substituer au JO. Il s'agit d'assemblages molécules de phospholipides appelés liposomes.

4.2. Le Jaune d'œuf

En 1940, PHILLIPS and LARDY recommandèrent pour la première fois l'utilisation du JO pour la conservation de la semence bovine [9]. Depuis, il a été exploré de façon extensive pour devenir rapidement le protecteur par excellence du spermatozoïde contre le choc de refroidissement.

Le JO entier a pu être utilisé avec succès sous forme lyophilisée (commercialisée par Sigma) dans la congélation de la semence du bélier [167] et celle du buffle [168]. Dans ces deux études, une comparaison a été faite entre la forme lyophilisée (en poudre) et la forme naturelle (en liquide) et la mobilité après décongélation était meilleure pour le JO en poudre.

Cependant, après l'utilisation du JO pendant longtemps, divers inconvénients apparurent. En effet, le JO n'est pas une entité chimiquement définie, mais un composé biologique complexe contenant des protéines, des vitamines, des phospholipides, du glucose et des antioxydants qui sont tous potentiellement utiles à préserver l'intégrité de la membrane plasmique du spermatozoïde. Malheureusement, il présente aussi un risque de contamination bactérienne du

dilueur [169] ainsi qu'une grande variabilité biologique dans sa composition tenant à plusieurs facteurs tels que la race, l'âge et la nutrition des poules [169 ; 170].

En plus de ces contraintes liées à la complexité et la variabilité de sa composition, le jaune d'œuf contient de la progestérone qui est impliquée dans la capacitation du spermatozoïde par activation secondaire des canaux calciques entraînant ainsi une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule [171]. La présence de progestérone est donc préjudiciable à la conservation des spermatozoïdes puisque ces derniers une fois capités ou ayant subi une réaction acrosomique précoce perdent leur pouvoir fécondant.

Le JO contient également les granules qui sont capables d'inhiber la respiration des spermatozoïdes (directement par les lipoprotéines de haute densité HDL : pour High Density Lipoproteins) [172 ; 10 ; 173 ; 15]. La toxicité des HDL se manifestant après décongélation est, soit liée à un effet cytotoxique direct, ou alors à une modification des propriétés physiques du dilueur [174]. Les granules interfèrent aussi avec l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes décongelés par effet mécanique et entraînent une surestimation du nombre de spermatozoïdes détectés immobiles par l'analyseur d'image par confusion avec des têtes de spermatozoïdes ayant un diamètre comparable [175]. Ils interfèrent également avec certains dosages biochimiques [176].

A cause de tous ces inconvénients, le JO devait être substitué dans les dilueurs de conservation de la semence. Cet impératif a donné lieu à une recherche intense pour comprendre d'abord ses mécanismes 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 densité (LDL pour Low Density Lipoproteins) qu'il contient [10 ; 11 ; 12 ; 13].

Le JO peut être fractionné en granules et plasma. Le plasma de jaune d'œuf (PJO) est un bon candidat à la substitution du JO entier.

4.3. Le Plasma du Jaune d'œuf

Le plasma du jaune d'œuf (PJO) est la fraction soluble obtenue par simple dilution et centrifugation du JO entier en granules (sédiment : 19-23% du JO) et en plasma

(culot : 77-81 du JO) [25 ; 26]. Il est composé des LDL (15%) et des glycoprotéines globulaires (85%) (Essentiellement α , β et γ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans l'extraction des LDL pures [13 ; 177].

Le procédé de fractionnement du PJO a été évoqué pour la première fois par BURLEY et COOK en 1961 [28] puis décrit en détail par MACBEE and COTTERILL en 1979 [29]. Il s'agit d'un procédé analytique (voir Figure 4.1) mais très simple, basé sur une double centrifugation après dilution avec une solution saline.

Le procédé analytique utilise généralement, le jaune d'œuf à partir d'œufs frais cassés au laboratoire comme décrits dans pratiquement toutes les études disponible dans la littérature.

Quoique simple à réaliser au laboratoire, ce procédé demeure analytique et ne peut être transposable à l'échelle industrielle à cause d'une part de la limitation d'emploi des œufs frais et d'autre part de l'accélération centrifuge supérieure exigée. Cependant, en remplaçant les œufs frais par le mélange industriel du JO et l'ultracentrifugation par un décanteur centrifuge (Westfalia CA 365) et en rajoutant une étape d'homogénéisation (Broyeur colloïdal Stephan de type Microcut MC10), le fractionnement du JO a pu être appliqué industriellement et protégé par un brevet Européen [181] déposé par SICA S.A. dite Société Laitière de l'Ouest (actuellement Epi Bretagne) en date du 19/11/1990 et publié sous le numéro (EP 0 430 757 A1) (Voir Figure 4.2).

Des études récentes ont montré que le PJO naturel peut être une alternative viable au JO entier dans la cryoconservation de la semence équine [30] et canine [31]. PILLET et ses collaborateurs [30] ont montré en 2011 que le PJO pouvait être stérilisé par gamma ionisation à la dose de 5kGy sans altération de ses propriétés cryoprotectrices. Ceci présente l'avantage de pouvoir se conformer aux exigences de biosécurité dans l'industrie des dilueurs à base de PJO.

Il est à noter que toutes les études faites sur le PJO en cryoconservation de la semence, ont utilisé le procédé analytique décrit par MACBEE and COTTERILL en 1979 [29] et des œufs frais cassés au laboratoire (sauf pour les tests de fertilité dans les travaux de PILLET et al. en 2011 [30] où un mélange industriel de JO fût utilisé). Ceci nous empêche de tirer une conclusion à propos de l'efficacité du PJO préparé

selon le procédé industriel. Il serait donc plus intéressant de faire des essais de congélation avec du PJO industriel plutôt qu'analytique.

De plus, ces études ont exploré le remplacement du JO par le plasma mais n'ont pas testé sa substitution aux LDL ce qui serait plus intéressant, notamment avec les limitations que présentent ces substances aux applications industrielles comme il sera détaillé dans la section suivante.

Par ailleurs, aucune étude disponible dans la littérature n'a fait état d'exploration de la possibilité d'appliquer la lyophilisation au PJO. 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.

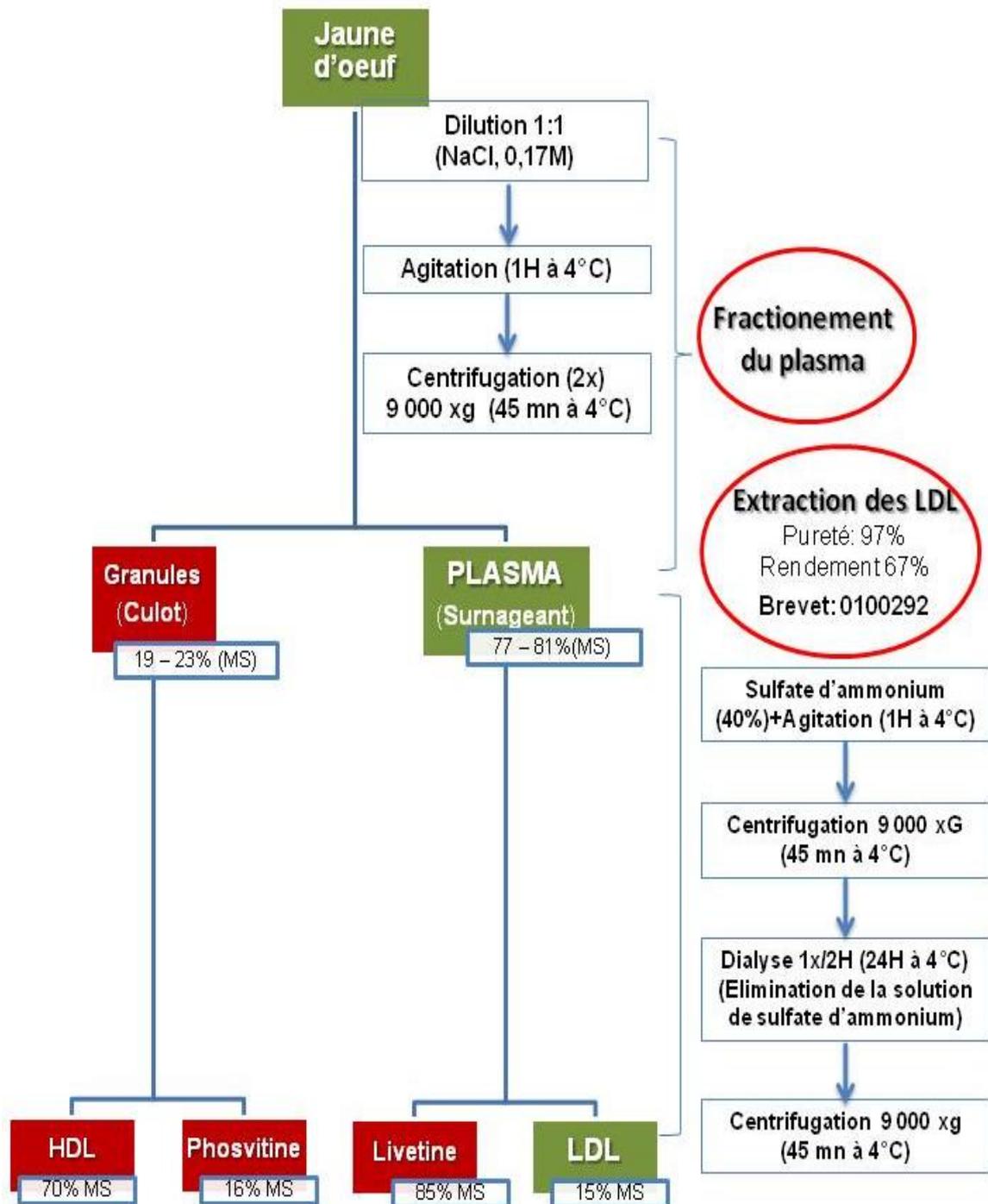


Figure 4.1. Procédé analytique de fractionnement du JO [29] et d'extraction des LDL [13].

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 4.2. 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 [181]. **Légende** : PJO : plasma du jaune d'oeuf.

4.4. Les Lipoprotéines a faible densité (LDL)

4.4.1. Structure

Les lipoprotéines à basse densité (LDL pour low density lipoproteins) sont les constituants majeurs du jaune d'œuf, elles représentent 66% de sa matière sèche et 24% des protéines totales du jaune [178]. Les LDL présentent une densité de 0,98 [179], des masses moléculaires (MM) comprises entre 3 et 10 millions de daltons (Da) et contiennent environ 11 % de protéines et 80 à 89 % de lipides [180].

Une suspension des LDL est considérée comme une microémulsion d'huile liquide stabilisée par une membrane de phospholipides et de protéines [182]. Les LDL ressemblent à des micelles et possèdent une forme sphérique avec un diamètre compris entre 17 et 60 nm, se situant en moyenne à 30 nm [183]. Elles sont constituées d'un coeur de lipides neutres entouré par une monocouche de phospholipides et d'apoprotéines (Figure 4.2). La taille des lipoprotéines dépendrait essentiellement des proportions de triglycérides et de stérols formant le coeur apolaire et dans une moindre mesure, de la teneur en phospholipides [184].

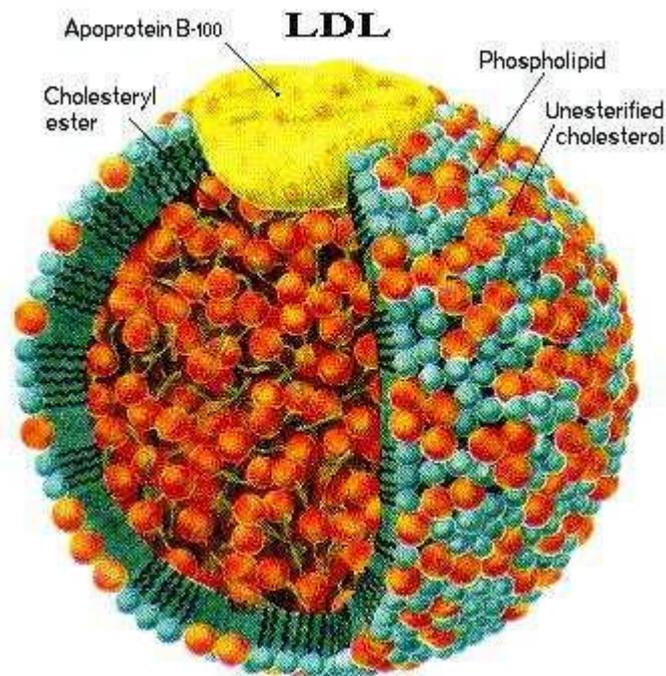


Figure 4.3. Structure d'une lipoprotéine à faible densité (LDL pour low density lipoprotein) [185]

4.4.2. Procédés d'Extraction analytique des LDL

Divers protocoles d'extraction des LDL à partir du JO ont été publiés [10 ; 21 ; 23] mais basés sur l'ultracentrifugation à gradient de densité qui est une technique assez compliquée.

La procédure la plus simple et la plus rapide a été décrite par MOUSSA et ses collaborateurs en 2002 [13] permettant d'atteindre un degré de pureté de 97% et un rendement de 67%. Ce procédé a donné lieu à un brevet français déposé conjointement par l'Institut Nationale de Recherche Agronomique (INRA) de Nantes et Oniris sous le numéro 0100292 (Voir Figure 4.1).

4.4.3. Application

Les LDL ont connu des applications très utiles et ont prouvé leur efficacité dans la cryoconservation de la semence bovine depuis déjà les travaux de MOUSSA et ses collaborateurs (2002) [13] et ceux d'AMIRAT et ses collaborateurs (2004) [15] qui ont montré que la concentration optimale était de 8% (w/v).

Chez le chien, les travaux de BENCHARIF et ses collaborateurs en 2008 [17] ont montré l'efficacité d'une concentration de 6% (w/v) à préserver les paramètres de mobilité, la fertilité in vitro et in vivo dans la congélation [17] et ont abouti au développement d'un dilueur commercial (Canifreeze, IMV Technologies, Aigles, France). Cette même concentration a prouvé son efficacité dans le cadre de la réfrigération de la semence canine [18] et a donné naissance à un dilueur commercial de réfrigération sous le nom de (CaniXcell, IMV Technologies, Aigles, France).

Chez l'étalon, MORENO et ses collaborateurs [19] ont montré en 2013 l'efficacité des LDL dans la congélation de la semence équine en supplémentant le dilueur équin (INRA 82) avec 2% de LDL au lieu de 2% de JO. Cependant, cette étude n'a pas eu de conséquence industrielle car des études en cours à l'époque [30] avait mis en évidence un dilueur prêt à l'emploi à base de PJO (INRA Freeze) à partir de l'INRA96 ce qui a offert plus de facilité et de sécurité sanitaire et aussi d'autonomie aux industriels dans la production des dilueurs. Nous reviendrons sur cet aspect en

parlant des avantages du PJO par rapport aux LDL et les possibilités de substitution chez le chien.

4.4.4. Hypothèses mécanistiques des LDL

Plusieurs hypothèses ont été postulées 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 réduisant aussi la température de transition de phase de cette membrane [186 ; 7 ; 187].

Il a été également suggéré que les LDL ne fusionnent pas dans la membrane, mais s'y associent en formant un film protecteur à sa surface lui conférant ainsi protection et stabilisation pendant la cryoconservation. Dans ce phénomène de recouvrement « coating » une action de synergie entre les phospholipides (spécialement la phosphatidylcholines « PC ») et les protéines contenues dans les LDL semble être impliquée en offrant aux spermatozoïdes une double action de « résistance et protection » [108 ; 188 ; 189]. Cependant, les rôles respectifs des protéines et des lipides en interaction avec la membrane plasmique ne sont pas encore clairement établis [30].

Une autre hypothèse a été formulée selon laquelle les LDL 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 [33]. Ce phénomène a été parfaitement étudié en semence bovine et plusieurs approches biophysiques ont permis récemment de le mettre en évidence [37 ; 190].

Chez le chien il n'existe pas de glandes séminales comme celles qui produisent 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 [3]. Cependant aucune exploration biophysique d'une éventuelle interaction de ces protéines avec les LDL n'a été faite chez le chien.

4.4.5. Limitations

Devant tous ces avantages, les LDL natives présentent quelques contraintes qui ont demeuré jusque là incontournables.

Le procédé d'extraction décrit par MOUSSA et al, (2002) [13] a donné un espoir pour des applications industrielles contrairement à ceux qui l'ont précédé, basés sur l'ultracentrifugation à gradient de densité. Les industrielles se sont fortement intéressés à la question et beaucoup d'essais ont été effectués, mais hélas, jusqu'à ce jour, aucune de toutes les techniques analytiques rapportées précédemment n'a pu être transposée à l'échelle industrielle.

De plus, aucun des essais d'appliquer aux LDL natives les différents traitements physiques de stérilisation [24] et de lyophilisation n'a été couronné de succès [25 ; 26].

Toutes ces limitations se sont érigées en obstacle devant l'utilisation des LDL dans la production et la commercialisation des dilueurs. Pour toutes ces raisons, il est devenu évident de remplacer les LDL. Les recherches se sont donc portées sur d'autres molécules pouvant avoir les mêmes propriétés cryoprotectrices et principalement à base de phosphatidylcholines (PC) qui est l'essentiel composant des LDL.

Dans cette optique de substitution des LDL natives, les liposomes qui sont des assemblages moléculaires lipidiques de production industrielle (molécules biomimétiques), seront explorées pour leur éventuelle capacité à mimer les LDL dans leurs actions cryoprotectrices sans leurs inconvénients.

4.5. Les liposomes

BANGHAM et ses collaborateurs (1965) ont été les premiers à fabriquer volontairement des liposomes [191]. Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées

d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur (**Figure 4.4**).

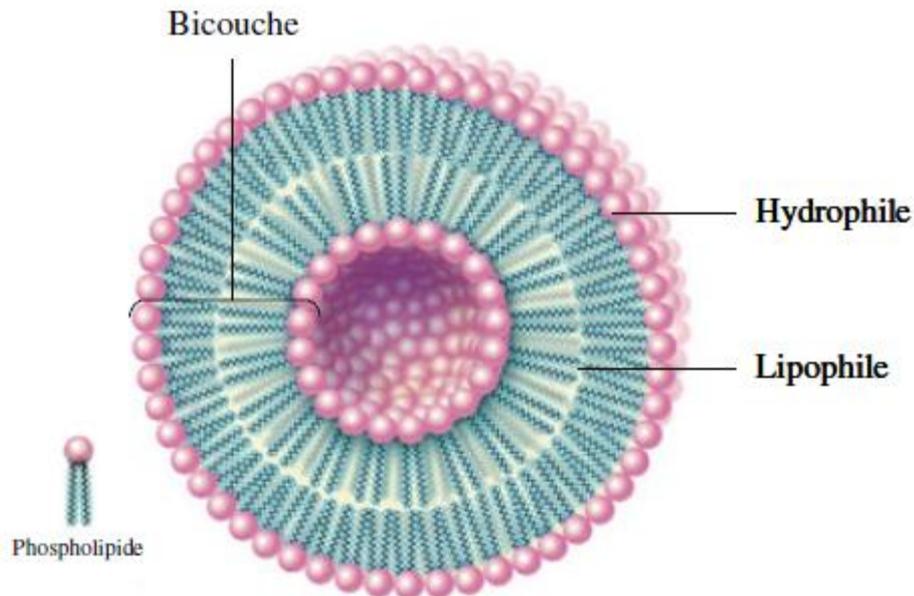


Figure 4.4. Structure d'un liposome unilamellaire [192]

Ces structures sphériques résultent d'une organisation stable des phospholipides dans un milieu aqueux. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire et une queue apolaire. En milieu aqueux, ils recherchent l'organisation la plus stable en minimisant les interactions entre composantes hydrophobes et molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (Figure 4.4).

4.5.1. Structure

Les liposomes sont classés selon leur taille et leur nombre de bicouches en vésicules multilamellaires (MLV pour multi lamellar 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).

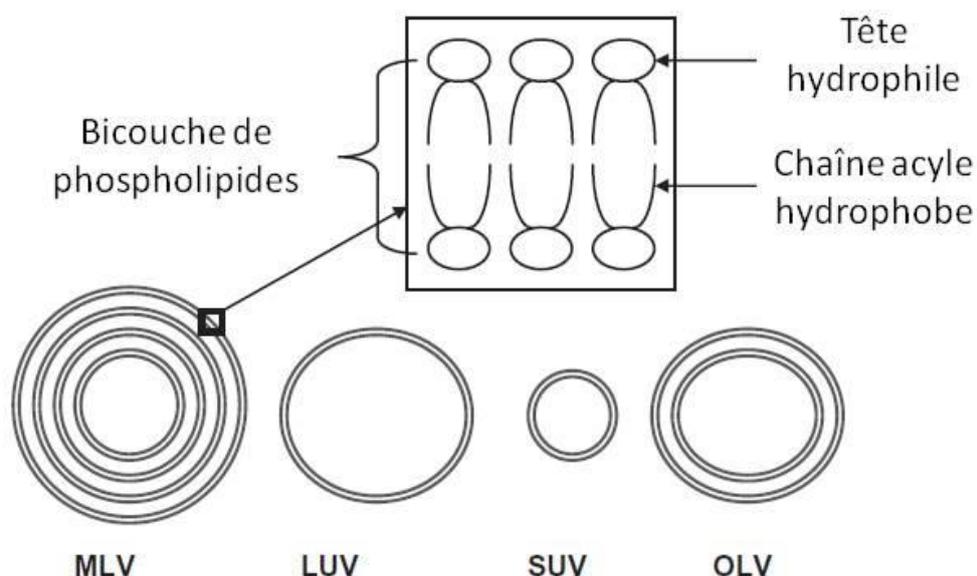


Figure 4.5. Différents types de liposomes [192]

4.5.2. Fabrication

La technique de préparation des liposomes est basée sur trois étapes principales qui sont la préparation, l'hydratation des lipides et l'homogénéisation de la taille des vésicules lipidiques.

4.5.2.1 Première étape : Préparation des lipides

Pour préparer des liposomes à base d'un mélange de lipides, ceux-ci doivent être d'abord dissous et mélangés dans un solvant organique pour assurer un mélange clair, homogène et complet des lipides.

Les lipides utilisés pour fabriquer les liposomes peuvent être des phospholipides (PL) de synthèse utilisés individuellement ou en combinaison ou alors des lécithines (extraits) de JO. Ces lécithines sont commercialisées sous diverses formulations dérivées du JO (E80® et E80S®) ou du soja (S75®). Elles contiennent essentiellement de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que d'autres constituants mineurs comme la sphingosine et les lysoPC et lysoPE (voir le tableau 4.1 pour leurs compositions détaillées) [193].

Tableau 4.1. Composition des lécithines du commerce d'après les données du fabricant Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) [193]

	E80®	E80S®	S75®
Phosphatidylcholine (PC)	83.6	74.1	71.3
Phosphatidyléthanolamine (PE)	9.1	13.3	8.9
Sphingomyéline (SPH)	2	11.9	//
Lyso-PC	1.8	//	1.6
Lyso-PE	0.5	//	//
Autres	3	0.7	18.4

4.5.2.2 Deuxième étape : Hydratation des lipides

L'hydratation du film lipidique sec est accomplie simplement en ajoutant un milieu aqueux au récipient contenant les lipides. Le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant, il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des liposomes multi lamellaires (MLV) se constituent en bicouches lipidiques concentriques et séparées, les unes des autres, par des couches d'eau qui sont d'un très grand diamètre ($\varnothing \approx 1500$ nm).

4.5.2.3 Troisième étape : réduction de taille des vésicules

Une fois qu'une suspension stable de liposomes multi lamellaires (MLV) hydratée est produite, un traitement physique doit être appliqué pour les transformer en vésicules de taille homogène, formées d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux.

Des techniques variées peuvent être employées incluant la sonication ou l'extrusion. Suivant le traitement appliqué, les vésicules peuvent être de petites tailles (SUV) ou de grandes tailles (LUV).

Le traitement par les ultrasons (**la sonication**) perturbe les suspensions de MLV en produisant des petites vésicules uni-lamellaires (SUV) avec un diamètre compris entre 15 et 50 nm.

L'extrusion des lipides est une technique plus récente dans laquelle une suspension de lipides est passée à travers un filtre polycarbonate poreux (une taille des pores bien définie) pour produire des particules ayant un diamètre proche du diamètre des pores du filtre utilisé (\varnothing : 100 - 400 nm) (Voir figure 4.6).

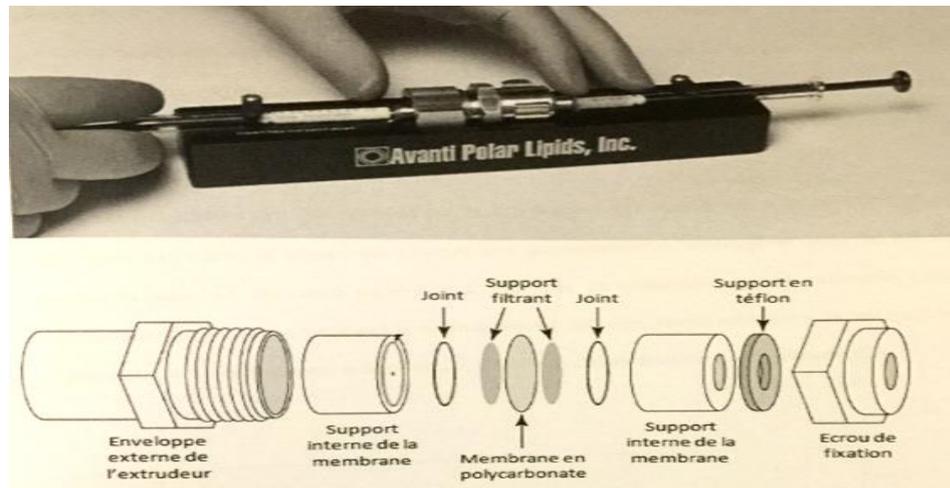


Figure 4.6. Mini Extrudeur fabriqué par Avanti Polar Lipids, Inc. USA [193]

4.5.3. Applications

Les liposomes sont des produits de la nanotechnologie qui ont plusieurs applications utiles.

4.5.3.1. Applications thérapeutiques.

Les liposomes peuvent être 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 [194 ; 195]. Les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages [196]. L'addition de gangliosides ou de polyéthylène glycol (PEG) augmente le temps de vie des liposomes dans la circulation en évitant la phagocytose [197].

Les liposomes peuvent être utilisés comme vecteur de thérapie génique en encapsulant un gène ou un plasmide qu'ils vont libérer par fusion avec l'endosome une fois dans la cellule [198].

Ils peuvent également être employés pour exposer des protéines (antigènes) à leur surface et les présenter aux macrophages et activer le système immunitaire tels les virus. Ces liposomes sont ainsi appelés virosomes et sont employés comme vaccins [199].

4.5.3.2. Applications cosmétologiques.

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 émulsions huileuses et solutions alcooliques capables d'endommager la peau en cas d'application prolongée [194].

Les liposomes ont aussi diverses applications biochimiques et biophysiques. 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 (molécules biomimétiques). 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 [200].

En effet, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que la fusion [201]. Dans cet exemple d'application biochimique, les liposomes ont été très utiles à l'étude de nombreux mécanismes intervenant lors de la fusion.

Dans notre 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 auteurs ayant étudié la fusion entre les liposomes et le spermatozoïde [14].

L'analyse de la fusion des liposomes a tout d'abord montré que les deux bicouches devaient 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 catalyseurs est nécessaire [202].

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, appelé peptide de fusion [203]. Ces segments protéiques s'insèrent obliquement dans la membrane et perturbent le parallélisme des chaînes acyles des phospholipides, qui se réorganiseraient autour des peptides de fusion [204]. Après rapprochement des deux bicouches, la fusion entre les zones déstabilisées peut s'opérer. Les deux membranes mélangent leurs composants et fusionnent [205].

Les fusions sont donc toujours contrôlées par des protéines [206]. Ces protéines déstabilisent la bicouche lipidique et jouent ainsi un rôle catalytique.

Par ailleurs, il est a été établi 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 qui rend la zone de contact enrichie en lipides, tels que le cholestérol et les sphingolipides. Ces derniers auront alors tendance à adopter une organisation hexagonale favorable à la fusion [207].

4.5.3.3. Applications en cryoconservation spermatique

Ce sont QUINN et CHOW (1980) [12] ainsi que GRAHAM et FOOTE (1987) [7] qui ont ainsi découvert l'effet stabilisant des liposomes dans la lutte contre le choc thermique au cours du procédé de cryoconservation du sperme. Depuis leurs travaux, plusieurs études se sont succédées et les liposomes font actuellement l'objet d'études visant à les substituer au JO dans la cryoconservation spermatique.

4.5.4. Etudes antérieures sur les lipides exogènes

Les chercheurs se sont intéressés depuis longtemps aux lipides exogènes en cryoprotection spermatique avant même l'avènement des technologies de fabrication des liposomes (nanotechnologies). Déjà en 1946, PHILLIPS et SPITZER avaient montré l'intérêt des lécithines dans la substitution du JO dans les dilueurs de semence bovine [208].

Plus tard, après la mise en évidence des phospholipides du JO comme substances jouant un rôle clef dans la cryoprotection spermatique [10], beaucoup d'auteurs se sont intéressés à explorer l'action directe des lipides exogènes comme alternative au JO dans les dilueurs de congélation et de réfrigération.

Ainsi, les lipides exogènes ont fait l'objet de recherches extensives en cryoprotection spermatique d'abord sous forme d'agrégat (\emptyset : 1500 nm) obtenus par simple réhydrations des films lipidiques des phospholipides et des lécithines du commerce et plus tard avec les liposomes soniqués (\emptyset : 30 nm) [12 ; 7 ; 14].

Ces études menées sur l'effet des liposomes soniqués ont permis d'apporter beaucoup d'éclaircissements sur les mécanismes de protection spermatique par les phospholipides exogènes même si les résultats ne semblent pas directement transposables aux liposomes obtenus par procédé d'extrusion et utilisés dans les études récentes.

QUINN et CHOW (1980) [12] ont utilisé une suspension de phosphatidylcholine du JO traitée par ultrasons et ont montré sa capacité à protéger la semence ovine contre le choc de refroidissement. Cette protection disparaissait après lavage des spermatozoïdes. Ils avaient donc proposé l'hypothèse mécanistique d'une faible association réversible entre les phospholipides et la membrane plasmique des cellules spermatiques.

GRAHAM et FOOTE (1987) [7] ont utilisé des liposomes fabriqués par sonication à partir de plusieurs formulations expérimentales de phospholipides et ont aussi comparé des phospholipides de longueurs de chaînes acyle variables (8 – 20 carbones).

Ces auteurs ont démontré que les phosphatidylcholines (PC) contenant de longues chaînes acyles (minimum 12 carbones) sont bénéfiques à la cryoconservation des spermatozoïdes bovins et que les courtes chaînes de moins de 12 carbones étaient toxiques. Ils ont montré également que la phosphatidylsérine (PS) seule ou associée à la PC ou au cholestérol (CHL) protège les spermatozoïdes contre le choc de refroidissement avec autant d'efficacité que le JO ou les liposomes à base de lécithine de JO. Par contre, la PC seule et le cholestérol seul n'étaient pas efficaces et les associations PS/PC ou PS/CHL n'étaient pas plus efficaces que la

PS seule contre l'effet du choc de refroidissement. Les spermatozoïdes bovins cryoconservés étaient mieux protégés par l'association PS/CHL.

De LEUW et ses collaborateurs (1993) [14] avaient utilisé des liposomes soniqués et n'ont pu atteindre l'efficacité cryoprotectrice du JO. Par contre, l'association des liposomes avec l'albumine du sérum bovin (BSA pour Bovine Serum Albumin) qui est une grosse molécule a pu améliorer significativement leur efficacité.

Ce n'est qu'à partir de 1993 avec les travaux de ARTS et ses collaborateurs [209] que les liposomes extrudés (\varnothing : 100 - 400 nm) ont été explorés pour leurs propriétés cryoprotectrices comme additifs dans les dilueurs de congélation et de réfrigération de sperme.

Il est à préciser également que dans les études menées sur les liposomes en cryoprotection spermatique, peu sont celles où les auteurs ont présenté et discuté les détails de composition des dilueurs à base liposomes car la plupart avaient utilisé des dilueurs de commerce à base de lécithines végétales comme Andromed® (Minitube, Tiefenbach, Germany) et Bioxcell® (IMV-Technologies, Aigles, France) dont la composition lipidique est tenue confidentielle par les laboratoires [15 ; 210 ; 38]. Ceci constitue une limitation dans l'exploitation de ces résultats et laisse leurs conclusions très générales par rapport à l'étude des effets et mécanismes de cryoprotection spermatique par des liposomes.

ARTS et ses collaborateurs (1993) [209] n'avaient pas pour objectif d'utiliser les liposomes comme cryoprotecteurs de semence, mais comme un modèle de membrane artificielle qui aide à comprendre le phénomène de fusion du spermatozoïde. Cette étude a permis de comprendre que la fusion avec les liposomes est gouvernée par les facteurs spermatiques et requiert la présence de phospholipide acide comme la cardiolipine et la phosphatidylsérine dans la bicouche liposomiale. Cette réaction de fusion était inhibée par l'incorporation de phosphatidylcholine dans les vésicules liposomiales.

Chez l'étalon WILHEM et ses collaborateurs [211] ont testé en 1996 l'efficacité de cryoprotecteurs à base de liposomes composés de PS et de PS-cholestérol (PS-CH). Ils ont montré que ces liposomes améliorent le taux de fertilité chez les juments

(50 % vs 17 % par comparaison à un dilueur classique) ainsi que la mobilité spermatique.

ZERON et ses collaborateurs [212] ont montré en 2002 que les liposomes sont capables de modifier la transition de phase des lipides membranaire des spermatozoïdes.

RICKER et ses collaborateurs [189] ont démontré en 2006 l'intérêt des liposomes extrudés et leur capacité à remplacer le JO dans la cryoconservation des spermatozoïdes équin. Dans une approche mécanistique, Ils ont mis en évidence un phénomène d'association externe entre les liposomes et la membrane plasmique du spermatozoïde équin grâce à une exploration biophysique par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR pour Fourier Transform Infra Red) couplée à la microscopie électronique à balayage (SEM pour Scanning Electron Microscopy).

En effet, selon ces auteurs, les liposomes dans ce schéma ne s'incorporent pas au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde équin mais s'associent fortement à sa surface. Ils constituent ainsi une barrière physique contre les lésions de la congélation-décongélation et préviennent la séparation de phase au sein de la membrane plasmique en influençant l'agencement des lipides à sa surface. Ce mécanisme de protection s'appela « protection par revêtement ».

RÖPKE et ses collaborateurs [34] ont utilisé en 2011 des liposomes extrudés à partir de plusieurs formulations lipidiques et plusieurs longueurs de chaînes acyles et ont étudié la possibilité de les substituer au JO dans la cryoconservation des spermatozoïdes bovins. Ces auteurs ont comparé aussi l'efficacité de plusieurs durées d'incubation des liposomes (à 4°C) avec les spermatozoïdes avant congélation (temps d'équilibration).

Ils ont confirmé les résultats de GRAHAM et FOOTE (1987) [7] concernant la toxicité des phospholipides à courtes chaînes acyles (<8 carbones). Ils ont démontré également la supériorité des liposomes à base de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylglycerol (PG) qui est un phospholipide (PL) chargé négativement. Ceci semble signifier que la présence de PL chargés au sein des bicouches liposomiales favorisent l'interaction des liposomes avec les zones électriquement chargées dans

la membrane plasmique des spermatozoïdes et améliorent par conséquent l'action cryoprotectrice. Cette étude a mis en évidence également que la qualité de la semence cryoconservée s'améliore significativement avec le prolongement du temps d'incubation (4°C) des liposomes avec les spermatozoïdes avant la congélation.

PILLET et ses collaborateurs [36] ont mené en 2012 à l'INRA de Nantes une étude sur les liposomes extrudés fabriqués à partir de différentes lécithines commerciales dérivées du JO et du soja (E80S®, E80®, S75®). Ils ont étudié leur efficacité dans la cryoconservation des spermatozoïdes équins en les substituant au JO dans le dilueur de référence (INRA96®, IMV-Technologies, Aigles, France). Les liposomes à base E80® (à 4%) se sont avérés d'une efficacité comparable au JO pour la mobilité, l'intégrité spermatique ainsi que la fertilité *in-vivo* [36].

Le GUILLOU et ses collaborateurs [37] ont étudié récemment (2015) la possibilité de remplacer les LDL par des liposomes extrudés à partir d'une lécithine de JO (E80S®) en testant une gamme de concentrations (0.37, 0.74, 1.48 et 2.22 g/100ml de dilueur). La concentration idéale variait entre 1.48 et 2.22 g/100ml. En utilisant la technique des balances de Langmuir-Blodgett, ces auteurs ont démontré que les liposomes sont capables de protéger les spermatozoïdes bovins cryoconservés de façon plus efficace que les LDL en séquestrant les protéines BSP du plasma séminal. Par la même approche biophysique (Langmuir-Blodgett trough), il a été démontré dans cette étude que différemment aux LDL, les liposomes ne s'intègrent pas dans la membrane plasmique des spermatozoïdes [37].

Enfin, il n'existe pas dans la littérature de données chez le chien car avant notre présent travail de thèse, les liposomes n'avaient jamais été utilisés pour la conservation de la semence canine.

4.5.5. Hypothèses mécanistiques des Liposomes

Avant d'aborder les mécanismes de protection spermatique par les liposomes, il s'agit de préciser que si les LDL sont des molécules biologiques de composition fixes dont les propriétés cryoprotectrices seraient constantes, les liposomes sont des assemblages moléculaires artificiels à partir d'extraits lipidiques. Leurs activités

sont variables en fonction de plusieurs facteurs d'où la possibilité d'optimiser leur efficacité en cryoprotection spermatique en modulant ces facteurs.

En effet, l'activité cryoprotectrice des liposomes varie en fonction de la taille des vésicules, de la composition physique et chimique des PL contenus dans les bicouches liposomiales et en fonction aussi de la durée de leur incubation (4°C) avec les spermatozoïdes avant congélation.

Les schémas mécanistiques pouvant être retenus à partir des études récentes sur les liposomes, sont une protection par revêtement et une protection indirecte par interaction avec les constituants du dilueur.

4.5.5.1. Protection directe par revêtement

Aucune étude récente sur les liposomes extrudés depuis RICKER et al (2006) [189] n'a pu mettre en évidence une interaction directe avec la MP des spermatozoïdes malgré les diverses investigations biophysiques effectuées (Spectroscopie, microscopie électronique et balance de Langmuir). L'action des liposomes semblent résider dans leur association à la surface de la membrane plasmique des spermatozoïdes plutôt que dans leur intégration dans cette membrane [6].

Le schéma mécanistique le plus probable semble correspondre au phénomène de protection par revêtement décrit la première fois par RICKER et al (2006) [189] chez l'étalon. Il s'agit d'une forte association établie entre la bicouche liposomiale et la membrane plasmique du spermatozoïde différemment au schéma de l'association réversible proposée par QUINN et al. (1980) [12]. Cette forte association protectrice ne semble pas perceptible par les techniques d'exploration biophysique comme étant une intégration au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde.

4.5.5.2. Protection indirecte

Les liposomes peuvent aussi agir indirectement par interaction avec les constituants des dilueurs (lipides, protéines, ions, caséines, micelles ...) comme chélateur de calcium par exemple. Les liposomes protègent les spermatozoïdes en luttant contre la peroxydation du lipide membranaire et empêchant l'entrée du calcium à l'intérieur du spermatozoïde [36].

Comme protection indirecte aussi, les liposomes protègent les spermatozoïdes par séquestration des protéines liantes (BSP) du plasma séminal empêchant ainsi l'efflux des phospholipides et du cholestérol et prévenant par conséquent la capacitation précoce qui en résulte [37]. Ce mécanisme représente l'action protectrice principale du spermatozoïde bovin car dans cette espèce les BSP représentent 65% des protéines du plasma séminal. Chez les autres animaux domestiques ce pourcentage est variable impliquant ainsi une importance relative de ce mode de protection spermatique.

Par contre chez le chien il n'existe pas de glandes séminales sécrétant ces protéines comme chez les autres mâles domestiques. Cependant, des protéines liantes à activité similaire ont pu être caractérisées dans le liquide prostatique produites éventuellement par la prostate [3]. Cependant, à notre connaissance, aucune exploration biophysique d'une éventuelle interaction de ces protéines avec les liposomes n'a été faite chez le chien. Il serait intéressant donc d'explorer ce phénomène de séquestration par les liposomes des protéines liantes présentes éventuellement dans le liquide prostatique chez le chien.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans le cadre de cette thèse de doctorat, une série d'expérimentations a été effectuée dans le but d'approfondir les connaissances concernant les LDL, le plasma du JO ainsi que les liposomes et de valider la substitution aux LDL du plasma du JO et des liposomes dans la congélation et la réfrigération de la semence canine.

L'objectif de cette étude était de répondre aux questions suivantes :

- ✓ Est-ce que la semence canine, est autant protégée par un dilueur à base de liposomes qu'un milieu à base de LDL ? Si c'est le cas, quelle en serait la concentration optimale ?
- ✓ Est-ce que, la semence de chien conserve-t-elle sa fertilité *in vitro et in vivo* après le processus de congélation-décongélation et celui de la réfrigération avec les Liposomes en substitution aux LDL ?
- ✓ Peut-on remplacer les LDL du jaune d'œuf de poule par le plasma du JO sans altération de la mobilité et de la fonctionnalité des spermatozoïdes de chien congelés-décongelés ?
- ✓ Quels seraient les mécanismes de protection spermatique des liposomes et du plasma de jaune d'œuf ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé plusieurs travaux qui seront présentés comme suit :

Chapitre 5 : Intérêt des liposomes dans la réfrigération de la semence canine

1ère expérience : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

2^{ème} expérience : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

3^{ème} expérience : Essai préliminaire de fertilité *in vivo* (Insémination artificielle intra-vaginale).

4^{ème} expérience : Etude des interactions avec une membrane biomimétique (Etude mécanistique avec la Balance de Langmuir).

Chapitre 6 : Intérêt des liposomes dans la congélation de la semence canine

Ce chapitre se scinde en 4 expériences :

1^{ere} expérience : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

2^{ème} expérience : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

3^{ème} expérience : Essai préliminaire de fertilité in vivo (Insémination artificielle intra-utérine sous vidéo-endoscopie).

4^{ème} expérience : Etude des interactions avec un modèle biomimétique de la membrane du spermatozoïde (Etude mécanistique avec la Balance de Langmuir).

Chapitre 7 : Effets du temps d'équilibration sur la qualité spermatique et interactions avec les cryoprotecteurs (LDL, LIPO, EYP).

1^{ère} expérience : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

2^{ème} expérience : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

CHAPITRE 5

INTERET DES LIPOSOMES DANS LA REFRIGERATION DE LA SEMENCE CANINE

5.1. Introduction

La semence canine réfrigérée a été utilisée la première fois 1954 [1]. Son emploi est devenu de plus en plus répandu pendant ces dernières décennies, notamment avec le développement à l'échelle internationale de l'insémination artificielle et de l'élevage canin.

Dans le contexte de l'insémination artificielle et le stockage à court terme de la semence, la réfrigération présente divers avantages par rapport à la congélation. En effet, le taux de fertilité in vivo est meilleur [156], la technique d'insémination est plus simple (intra-vaginale vs. Intra-utérine) [213], et le transport est plus facile et moins dangereux [214]. Cette technique de conservation est ainsi la méthode de choix pour transporter la semence sur de longues distances.

Cependant, la réfrigération n'est pas sans inconvénients, elle expose le sperme au choc de refroidissement « cold shock » qui induit des dommages irréversibles tant structuraux que fonctionnels aux spermatozoïdes compromettant par conséquent la fertilité du sperme réfrigéré [4].

Les dilueurs sont destinés à protéger la semence par prévention ou réduction des effets du froid. Cette action protectrice est assurée essentiellement par les stabilisants membranaires [215] i.e. protecteurs de refroidissement [8], représentés traditionnellement par le jaune d'œuf (JO) dans la préservation de la semence canine [57].

A cause de divers inconvénients tel que le risque de contamination microbienne et des effets délétères sur les spermatozoïdes de certains de ses constituants (lipoprotéines de haute densité), le JO entier a été remplacé par sa fraction cryoprotectrice i.e. les lipoprotéines de basse densité (LDL) [10 ; 11 ; 12].

Ces dernières sont extraites avec un degré de pureté de 97% selon la technique décrite par MOUSSA *et al.* (2002) [13] et se sont montrées efficaces dans la réfrigération de la semence bovine [16], ovine [20], équine [19] et canine [18].

Néanmoins, les LDL souffrent toujours de deux limitations majeures d'ordre technologique et bio-sanitaire. Elles ne peuvent ni être produites sur une échelle industrielle ni être stérilisées conformément aux règlements de biosécurité [24]. Leur substitution est ainsi fortement recommandée.

Les liposomes (LIPO) sont des vésicules artificielles composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, ayant la capacité d'encapsuler des molécules [32]. Ils sont composés de phospholipides (PL), i.e. le principe actif des LDL pour la protection et la stabilisation de la membrane spermatique [33]. Différemment aux LDL, ils peuvent être produits à une échelle industrielle et incorporés dans des dilueurs clairs, semi-synthétique, chimiquement définis, facilement stérilisables et prêts à l'emploi [32].

Récemment, les LIPO se sont montrés comme une alternative viable au JO dans la cryconservation de la semence humaine [35], équine [36], bovine [34] et du buffle [38].

Le GUILLOU *et ses collaborateurs* [35] ont démontré en 2015 la possibilité de remplacer les LDL par les liposomes dans la congélation de la semence bovine et ils ont exploré les interactions mécanistiques de ces dilueurs avec la membrane plasmique du spermatozoïde en utilisant un modèle biomimétique (i.e. la membrane de Langmuir Blodgett). Cette technique mime la face externe de la membrane du spermatozoïde sous forme d'une monocouche de molécules surfactantes placée au dessus d'une sous phase liquide qui mime le dilueur de base [190]. Cette membrane modèle simule les interactions entre la membrane du spermatozoïde et les molécules injectées dans la sous phase [35].

Les liposomes n'ont jamais été testés dans la réfrigération de la semence canine ni leur mécanisme de protection du spermatozoïde canin n'a été exploré

Ainsi, le présent travail vise à déterminer les éventuels bénéfices des liposomes en substitution au LDL pour la réfrigération de la semence canine (sur une période de

quatre jours) et à explorer leur mécanisme de protection spermatique par le biais de la balance de Langmuir-Blodgett.

5.2. Matériels et méthodes

5.2.1. Expérience 1 : Etude des paramètres de mobilité spermatique

5.2.1.1. Prélèvement et évaluation initiale de la semence

Vingt trois éjaculats ont été prélevés à intervalle de 48 – 72 heures sur 5 chiens de race Beagle âgés entre 3 et 7 ans, appartenant au département de pathologie de la reproduction à ONIRIS : Ecole Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire de l'Alimentation de Loire Atlantique, Nantes, France. Toutes les expérimentations ont été conduites conformément aux exigences du comité d'éthique d'Oniris, Nantes.

Tous les échantillons ont été prélevés manuellement par le même opérateur, de façon fractionnée et en présence d'une chienne en chaleur. Seulement la fraction riche en spermatozoïdes a été utilisée. Chaque éjaculat a été évalué (motilité massale et concentration des spz) suite à sa collecte pour sa qualité et son aptitude à la réfrigération.

5.2.1.1.1. Mobilité massale

Une goutte de sperme est placée sur une lame, et est observée au faible grossissement d'un microscope muni d'une platine chauffante (Voir annexe 04). Elle est notée selon l'échelle de MILOVANOV de 0 à 5 (0 : Spermatozoïdes morts et 5 : Présence de vagues).

5.2.1.1.2. Concentration en spermatozoïdes

La concentration en spermatozoïdes a été mesurée par un photomètre calibré pour le sperme canin (SpermaCu®, Minitube, Tiefenbach, Germany) (Voir annexe 04).

Seules les semences qui ont présenté une mobilité massale supérieure ou égale à 4 et une concentration supérieure ou égale à 200×10^6 spz/ml ont été retenues pour cette expérience. En plus de ces deux tests, le pourcentage des spermatozoïdes

mobiles calculé par analyseur d'image à T0 (voir § 5.2.1.4) est inclus comme critère d'évaluation initiale et le seuil d'acceptation de 60% est appliqué (Voir Annexe 04).

5.2.1.2. Preparation des dilueurs

5.2.1.2.1. Extraction des LDL

La methode utilisée pour l'extraction des LDL a été développée par Moussa et *al.* (2002) [13] et protégée par un brevet déposé conjointement par l'Ecole Nationale Vétérinaire et l'Institut Nationale de Recherche Agronomique de Nantes. Elle a été décrite précédemment (Voir § 4.4.2, Figure 4.3).

5.2.1.2.2. Fabrication des liposomes

Les liposomes ont été produits à partir d'un extrait de phospholipides (PL) de JO composé de 74.1% phosphatidylcholine (PC), 13.3% phosphatidylethanolamine (PE), 1% sphingosine (SPH) and 1.9% lysoPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Après dissolution de la lécithine de JO dans le chloroforme, des films de phospholipides (PL) ont été obtenus et réhydratés dans une solution de dilueur de base pendant 12 heures. La suspension a été soniquée pendant 15 min dans un bain à ultrasons (Elmasonic S 30H Elma, Sin-gen, Germany avec une puissance de 275 W) puis extrudée (20 passages à travers une membrane de 100 nm) dans un Mini-extruder (AVANTI Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA). La distribution de taille a été centrée à 120 nm.

5.2.1.2.3. Préparation des dilueurs

Huit dilueurs de réfrigération ont été préparées à partir d'une solution de base (composition présentée en tableau 1) et en ajoutant 6% LDL (Contrôle) ou une des 7 concentrations expérimentales en liposomes (2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 15%, et 20%). La composition des dilueurs est présentée en tableau 1.

Le dilueur à base de 6% LDL a été utilisé comme témoin dans cette expérimentation car il a été vérifié qu'il est capable de préserver la semence canine réfrigérée pendant 4 jours pour la totalité (100%) des chiens utilisés dans les travaux de BENCHARIF *et al.* (2013) [18].

Tableau 5.1 : Composition des dilueurs à base de liposomes.

Légende : PL : phospholipides

Dilueur	2%	4%	6%	8%	10%	15%	20%
Poudre de PL (g)	1.82	3.64	5.46	7.28	9.10	13.65	18.20
TRIS-Base (g)				30.26			
Acide citrique (g)				17.00			
Fructose (g)				12.50			
Glutathione (g)				1.44			
Streptomycine (mg)				1			
Baytril 10% (mL)				0.8			
Eau distillée (L)				1			

5.2.1.3. Dilution et réfrigération de la semence

Cent microlitres de chaque dilueur des huit préparés précédemment ont été placés dans huit cryotubes différents et 100µl de la fraction spermatique ont été ajoutés dans chacun des huit cryotubes. Cette dilution a été réalisée dans un bain-marie à 37°C. Après mesure de la concentration en spermatozoïdes dans l'échantillon, un volume de chaque dilueur a été ajouté pour avoir la concentration finale de 100 x 10⁶ spermatozoïdes / ml.

Les huit cryotubes ont été immédiatement mis au réfrigérateur à 4°C sans transition entre 37°C et 4°C.

5.2.1.4. Analyse automatisée de la semence

L'analyse des caractéristiques de mouvement de la semence a été réalisée aux moyens d'un analyseur d'image de type Hamilton Thorne system (HTM-IVOS version 14.0 ; Hamilton Thorne, Inc. Beverly, MA, USA) et d'une chambre d'analyse d'une profondeur de 20µm (Leja Products B.V., Nieuw Venne, Pays-bas). L'analyse a été faite suivant les paramètres techniques recommandés par IGUER-OUADA and VERSTEGEN (2001) [68] lors de la validation de ce système chez le chien (Pour le détail voir Annexe n° 06).

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**: $\mu\text{m}/\text{second}$), La vitesse linéaire “Straight Line Velocity” (**VSL**: $\mu\text{m}/\text{second}$), la vitesse moyenne “Average Path Velocity” (**VAP**: $\mu\text{m}/\text{second}$) et l’amplitude latérale des mouvements de la tête du spermatozoïde “Amplitude of Lateral Head Displacement” (**ALH**: μm).

Une analyse d’image de la mobilité spermatique a été effectuée avant réfrigération (J0) puis chaque jour pendant les 4 jours de réfrigération (J1, J2, J3, J4). Pour cela, un volume de 30 μL de chaque échantillon a été mélangé avec 90 μl d’un dilueur commercial EasyBuffer (IMV-Technologies, l’Aigle, France) pour obtenir une concentration finale de 25 x 10⁶ spermatozoa/ml, puis incubé à 37°C pendant 10min avant d’être analysé.

5.2.1.5. Analyse statistique

Etant donné que notre étude est une approche à mesures répétées, nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes (lme) avec le logiciel R® pour analyser les effets du temps de réfrigération (J0, J1, J2, J3, J4) et du dilueurs (6%LDL, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20% liposomes) sur chacun des paramètres de mobilité. Un modèle à effets mixtes est un modèle hiérarchique dans lequel le premier niveau modélise la réponse individuelle (effet chien), et le deuxième niveau modélise le comportement des paramètres pour l’ensemble de la population. Par exemple pour l’étude de l’effet du temps sur la variable mobilité, le modèle s’écrit :

Niveau individuel : $\text{Mobilité}_{ijk} = \alpha_i + \beta_{1i} * \text{Temps}_j + \beta_{2i} * \text{Milieu}_k + \varepsilon_{ijk}$

$$\text{Niveau de la population : } \left\{ \begin{array}{l} \alpha_i = \alpha + a_i \\ \beta_{1i} = \beta_1 + b_{1i} \\ \beta_{2i} = \beta_2 + b_{2i} \end{array} \right.$$

- ε_{ijk} indépendamment et identiquement distribués selon la loi $N(0, \sigma^2)$
- σ^2 est la variance résiduelle
- α, β_1, β_2 , sont les effets mixtes

- a_i , b_{1i} , b_{2i} sont les effets aléatoires distribués selon une loi normale

La normalité des résidus et des effets aléatoires ont été vérifiées et validées pour chaque modèle au moyen de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes [216].

Les interactions du temps et du dilueur sur la mobilité ont été intégrées dans le modèle à travers le terme "Time*Extender". Les effets fixes sont utilisés comme des estimations ponctuelles des paramètres pour la totalité de la population. La base théorique d'estimation fournit différents outils pour calculer la p-value pour l'effet du temps et du dilueur sur la motilité. La significativité est fixée à $P < 0.05$.

5.2.2. Deuxième expérience : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

Douze éjaculats ont été collectés sur les mêmes chiens de l'expérience précédente et soumis aux examens d'évaluation initiale (Mobilité et concentration) tel que décrit pour la première expérience (Voir § 5.2.1.1). Les éjaculats répondant aux conditions d'inclusion ($n=10$) ont été dilués avec le milieu 6% LDL (Dilueur de référence) et le milieu 2% LIPO puis réfrigérés comme décrit précédemment dans l'expérience 1 (Voir § 5.2.1.3).

Quatre tests ont été réalisés et nous ont permis d'évaluer l'intégrité acrosomique par le test à la FITC-PSA (Fluorescein Isothiocyanate-Pisum Sativum Agglutinin), l'intégrité de la membrane plasmique par le test hypo-osmotique (HOST) et le test au SYBR14/Iodure de propidium (SYBR14/IP) et finalement l'intégrité d'ADN en utilisant le test d'Acridine Orange (AO). Les caractéristiques d'intégrité spermatique ont été évaluées avant réfrigération et chaque 48 heures pendant les 4 jours de conservation (J0, J2, J4).

5.2.2.1. Evaluation de l'intégrité de l'acrosome (Test FITC/PSA)

L'intégrité de l'acrosome a été analysée par le test FITC-PSA (*pisum sativum agglutinin*) selon la technique décrite pour la première fois par MENDOZA et al. en 1992 [94] (Pour le détail voir annexe 07).

Cinq μl de semence sont déposés sur l'extrémité d'une lame de verre et un frottis est effectué. Après séchage à l'air, les lames sont trempées pendant 15 minutes dans un bain de méthanol à 100%. Après un deuxième séchage, elles sont incubées avec une solution de 200 μl de FITC-PSA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante dans une chambre sombre et humide. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant puis trempées pendant 15 minutes dans un bain d'eau distillée. Après un troisième et dernier séchage à l'air, elles sont stockées à +4 °C avant observation sous microscope à épifluorescence verticale (Olympus BX41, Japan). 200 spermatozoïdes par lame réparties sur plusieurs champs sont comptés et classées en deux catégories :

- ✓ **Spermatozoïdes à acrosome intact** : Acrosome fluorescent,
- ✓ **Spermatozoïdes à acrosome désintégré** : Acrosome non fluorescent (terne)

5.2.2.2. Evaluation de l'intégrité de la membrane plasmique flagellaire (HOSt)

L'intégrité membranaire flagellaire ou fonctionnelle du spermatozoïde a été évaluée par le test hypo-osmotique (HOSt : Hypo-osmotic swelling test) validé chez le chien par ENGLAND & PLUMMER (1993) [81] (Pour le détail voir annexe 08).

Un volume de 25 μL de semence sont mélangés au même volume de solution hypo-osmotique à 100mOsmol/L (100 ml d'eau distillée, 75mM de fructose, 25mM de tri-citrate de sodium), et laissés en incubation à 37°C pendant 60 min. A partir de 15 μl de cette suspension, un frottis est réalisé, coloré (RAL 5.5.5), séché puis conservé jusqu'à observation au microscope optique (Olympus CK2, ULWCD 0,30) au grossissement (x40). 200 cellules réparties sur plusieurs champs sont comptées par lame et classées en deux catégories :

- ✓ **Spermatozoïdes à membrane flagellaire intact (vivant)** : si le flagelle réagit à la solution hypo-osmotique par un gonflement et un enroulement.
- ✓ **Spermatozoïdes à membrane flagellaire altérée (mort)** : si le flagelle ne réagit pas à la solution hypo-osmotique.

5.2.2.3. Evaluation de l'intégrité de de la membrane cytoplasmique du spermatozoïde (Test SYBR14/PI)

L'intégrité membranaire cytoplasmique ou structurale du spermatozoïde a été évaluée par un test à fluorescence à base du SYBR14 couplé à l'iodure de propidium selon le principe évoqué la première fois par GARNER et JOHNSON (1995) [87] en utilisant le kit LIVE/DEAD® Sperm Viability (LIFE Technologie SAS, Saint-Aubin, France) selon la technique rapportée par Du BOIS et al. (2012) [217].

Un volume de 1,25 µL du colorant SYBR14 dilué (1/50^{ème} au DMSO) est ajouté à 250 µl de semence diluée puis incubé à +37°C pendant 10 mn. Ensuite 1,25 µL du colorant différentiel iodure de propidium (PI) est ajouté à cette suspension puis incubée à nouveau à +37°C pendant 10 minutes. Un frottis cellulaire est préparé puis observé sous microscope à epifluorescence verticale (Olympus BX41, Japan). 200 spermatozoïdes répartis sur plusieurs champs sont comptés par lame et classés en deux catégories :

- ✓ **Spermatozoïdes vivants** : fluorescence verte.
- ✓ **Spermatozoïdes morts** : fluorescence rouge.

Il est à noter que les **spermatozoïdes moribonds** (à fluorescence mixte) sont classés dans les cellules mortes.

5.2.2.4. Evaluation de l'intégrité de l'ADN (Test à l'Acridine Orange)

L'intégrité de l'ADN a été évaluée par un test destiné à explorer le statut structural de la chromatine du spermatozoïde en utilisant l'acridine-orange [98 ; 101 ; 103] (Pour le détail voir annexe 09).

Un volume de 150 µL de semence sont mélangés à 4 mL de PBS préalablement chauffés à +37°C puis centrifugés à 500 xg pendant 10 minutes. 100 µL du culot sont remis en suspension avec 100 µL de la solution TNE à pH 7,2 (TNE = Tris HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM). 400 µL d'une solution au Triton à pH 1.2 sont ensuite déposés dans le mélange. Après 30 secondes, 1,2 mL de la solution d'Acridine Orange à pH 6 est rajouté au mélange puis laissé à incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Un frottis est réalisé (5µL), fixée entre lame et lamelle puis observée sous microscope à epifluorescence verticale (Olympus BX41,

Japan). 200 spermatozoïdes répartis sur plusieurs champs sont comptés par lame et classés en deux catégories :

- ✓ **Spermatozoïdes à ADN natif** : fluorescence verte (double brin).
- ✓ **Spermatozoïdes à ADN dénaturé** : fluorescence rouge (mono brin).

L'index de fragmentation d'ADN est calculé par le rapport entre la proportion de spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge et la population totale de spermatozoïdes.

5.2.2.4. Analyse statistique

Comme dans la première expérience, les effets du temps de réfrigération (J0, J2, J4) et du dilueur sur chaque paramètre fonctionnel ont été analysés avec un modèle lme. Les effets des interactions entre le temps de réfrigération et le dilueur sur les paramètres fonctionnels ont été inclus dans le modèle. La significativité a été fixée à $P < 0.05$ et les résultats sont donnés en moyennes plus ou moins erreur standard (Moy \pm SEM).

5.2.3. Expérience 3 : Essai préliminaire de fertilité *in-vivo* (Insémination artificielle intra-vaginales).

Pour cet essai préliminaire, 6 chiennes de race Beagle ont été utilisées, appartenant au service de Pathologie de la Reproduction, ONIRIS-Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de la Loire Atlantique, France.

Les cycles oestriques des chiennes ont été suivies au moyens des frottis vaginaux et du dosage quantitatif de la progestérone (Mini-Vidas machine, Biomérieux, France). L'échographie ovarienne a été parfois utilisée pour objectiver l'ovulation. Deux inséminations artificielles intra-vaginales ont été pratiquées à 48H d'intervalle quand le taux de progestéronémie atteint ou dépasse les 10 ng/ml. Un éjaculat réfrigéré (48H ou 96H) fût déposée au fond du vagin à l'aide d'une sonde de type Osiris® sans être chauffé au préalable.

Les éjaculats ayant servi pour le test de fertilité ont été récoltés, soumis à l'évaluation initiale pour leur aptitude à la réfrigération puis réfrigérés (pendant 48 ou 96H) dans un dilueur à base de 2% liposomes exactement comme décrit dans

les expérimentations précédentes. La mobilité de la semence est contrôlée avant et après réfrigération par analyseur d'image comme décrit précédemment pour s'assurer de sa bonne qualité. Une nouvelle analyse automatisée de cette semence est effectuée juste avant insémination et le seuil d'acceptation de cette semence pour l'insémination artificielle est 30% de mobilité.

Quinze jours après la date d'insémination, un diagnostic de gestation par échographie a été effectué. Après confirmation, un avortement a été médicalement provoqué dans le cadre d'une autre étude expérimentale.

5.2.4. Expérience 4 : Etude des interactions avec une membrane biomimétique (Etude mécanistique avec la Balance de Langmuir).

Dans cette expérience, nous avons utilisé les dilueurs de réfrigération à base de 6%LDL, 2%LIPO et le liquide prostatique (LP) canin. Les dilueurs de réfrigération furent préparés exactement comme décrit précédemment dans l'expérience 1 et le liquide prostatique a été récolté sur 3 chiens Beagle de manière fractionnée et la troisième fraction (post spermatique) translucide a été considérée comme liquide prostatique (Kutzler, 2005). Les trois récoltes ont été mélangées et utilisées le jour de leur prélèvement.

5.2.4.1. La balance de Langmuir-Blodgett trough (Description technique)

La balance de Langmuir-Blodgett est une technique utilisée pour mimer la face externe de la membrane plasmique du spermatozoïde sous forme d'une monocouche de molécules surfactantes (membrane biomimétique) placée au dessus d'une sous phase liquide mimant la base du dilueur de réfrigération canin. Cette membrane reconstruite permet donc de mimer les interactions entre la membrane plasmique du spz et les molécules injectées en sous phase.

En effet, le dispositif de cette balance (302LL, Nima Technology, UK) comprend une monocouche composée des mêmes constituants lipidiques de la membrane plasmique du spermatozoïde [190] déposé délicatement sur une sous-phase liquide constituée des même composants du dilueur de réfrigération (TRIS, acide citrique, fructose et antibiotiques) et dans les mêmes proportions précédemment

mentionnées dans l'expérience 1 (Voir tableau 5.1), (Voir illustrations à l'annexe 10).

La balance est connectée à un programme sur ordinateur (NIMA516) permettant d'effectuer plusieurs ajustements, tel que le réglage de la pression exercée sur la monocouche. Le système fonctionne sous atmosphère contrôlée entre des barrières mobiles utilisées pour calculer la pression (tension) de surface. Si les molécules ajoutées (injectées) en sous phase s'intègrent dans la monocouche, la pression de surface de cette dernière va changer, et ce changement sera mesuré par déplacement des barrières mobiles et le programme génère un graphique illustrant ces changements en fonction du temps.

5.2.4.2. Déroulement de l'expérimentation

La présente expérimentation, divisée en 3 étapes, vise à étudier les interactions possibles des dilueurs de réfrigération (6%LDL, 2%LIPO) et du liquide prostatique canin avec la membrane plasmique du spermatozoïde simulée par la monocouche de la balance de Langmuir-Blodgett (302LL, Nima Technology, UK). Elle a été réalisée en collaboration avec l'INRA de Nantes selon la technique décrite par Le GUILLOU et al. en 2013 [190].

5.2.4.2.1. Première étape : Reconstruction de la couche externe de la membrane plasmique du spermatozoïde

Cette étape représente la reconstitution des domaines lipidiques de la couche externe de la membrane plasmique du spermatozoïde. Les constituants de la membrane plasmique (Phosphatidylcholine, sphingomyéline, cholestérol, plasmalogène-phosphatidylcholine, achetés chez Lipoïde) sont utilisés dans les mêmes proportions molaires que dans la membrane plasmique du spermatozoïde (respectivement 14/31/16/39). Ils sont déposés délicatement en gouttes à goutte sur la sous-phase pour constituer au contact du liquide une héli-membrane biomimétique (Voir illustrations à l'annexe 10).

5.2.4.2.2. Deuxième étape : Equilibration du système

Après la première étape, le système est laissé s'équilibrer et les barrières se déplacent de manière à ce que la membrane biomimétique forme une monocouche et que la pression exercée sur les capteurs se stabilise.

Ainsi, après l'injection de molécules dans la sous-phase, le seul paramètre qui peut varier est la pression entre les deux barrières mobiles. Si le liquide injecté interagit avec la membrane biomimétique la pression de la monocouche va augmenter (Voir illustrations à l'annexe 10).

5.2.4.2.3. Troisième étape : Injection de molécules dans la sous-phase

Diverses combinaisons de molécules (LDL, LIPO et LP) ont été injectées à l'aide d'une seringue à aiguille incurvée dans la sous-phase (Voir illustrations à l'annexe 11). Toutes les injections ont été faites indépendamment l'une de l'autre.

Dans une première série, nous avons injecté dans la sous-phase séparément 0.3mL de la solution : LDL (6%) seule, LIPO (2%) seule et le LP canin seul.

Dans une deuxième série, deux mélanges ont été préparés puis injectés (0.3mL) dans la sous-phase :

- LP mélangé avec 6%LDL au ratio **10:1** (exprimé en poids LP/LDL)
- LP mélangé avec 6%LIPO au ratio **10:1** (exprimé en poids LP/ LIPO).

Le volume équivalent (0.3mL de chaque additif) a été préalablement retiré de la sous-phase. Après injection des biomolécules, le changement de la pression de surface de la monocouche a été enregistré pendant 4500 secondes. Toutes les données ont été répliquées et les variations n'ont pas excédé 5% de pression de surface.

5.3. Résultats

5.3.1. Expérience 1 : Etude des paramètres de motilité spermatique

Sur la base des critères d'évaluation initiale mentionnés précédemment, 20 sur les 23 éjaculats récoltés ont été inclus dans cette expérimentation et 3 exclus.

Après 4 jours de réfrigération (J4), le pourcentage des spermatozoïdes mobiles était au dessus de 50% dans tous les lots, ce qui dépasse de loin le seuil d'acceptation (30%) en insémination artificielle.

L'étude des interactions entre la durée de réfrigération (Temps) et le dilueur ainsi que leur effet sur la motilité totale ont montré une interaction positive ($p=0.038$) entre le dilueur 2% LIPO et la durée de 4 jours de réfrigération (J4).

Une interaction significativement négative existe également entre les milieux 15% LIPO ($p=0.0454$) et 20% LIPO ($p=0.0003$) et la durée de 4 jours de réfrigération (J4).

Par conséquent, le dilueur à base de 2% LIPO a montré la valeur de mobilité la plus élevée après 4 jours de réfrigération ($P<0.05$; Tableau 2) comparativement à tous les autres milieux incluant le milieu de référence (6%LDL) alors qu'une différence n'a pu s'observer à T0 (J0) entre tous les dilueurs étudiés.

Quant à la mobilité progressive, aucune interaction n'a pu être observée entre la durée de réfrigération (Temps) et les dilueurs. Cependant, après 4 jours de réfrigération, la mobilité progressive tend à être plus élevée dans le dilueur à 2% LIPO que le dilueur de référence (6%LDL) ($P=0.07$) et la différence n'a pas été significative à cause d'une forte valeur d'erreur standard (Tableau 3).

L'étude des effets principaux des dilueurs sur la mobilité totale sans tenir compte des interactions (temps*diluer) a montré que les résultats des milieux à forte concentrations 15% et 20% LIPO étaient significativement plus faibles ($p=0.0006$; $p<0.0001$ respectivement) que tous les autres milieux testés (Tableau 2).

Pour la mobilité progressive après 4 jours de réfrigération, le dilueur à 2%LIPO ne diffère pas significativement du milieu de référence (31.4 vs. 26 ; $p=0.587$; Figure

1) alors qu'il est significativement plus élevé que tous les autres milieux testés ($0.01 < P < 0.05$; Figure 1).

Pour les paramètres de vitesse mesurés après 4 jours de réfrigération, le dilueur à base de 2% LIPO a donné la meilleure ($p < 0.05$) valeur de VSL que tous les autres milieux à l'exception du milieu de référence. Les dilueurs à base de 15% et 20% LIPO ont donné significativement les valeurs les plus basses de VAP ($p < 0.05$).

Enfin, en considérant simultanément la totalité des paramètres étudiés, 2% semble être la concentration optimale en liposomes. Ainsi, les expériences suivantes seront conduites avec cette concentration.

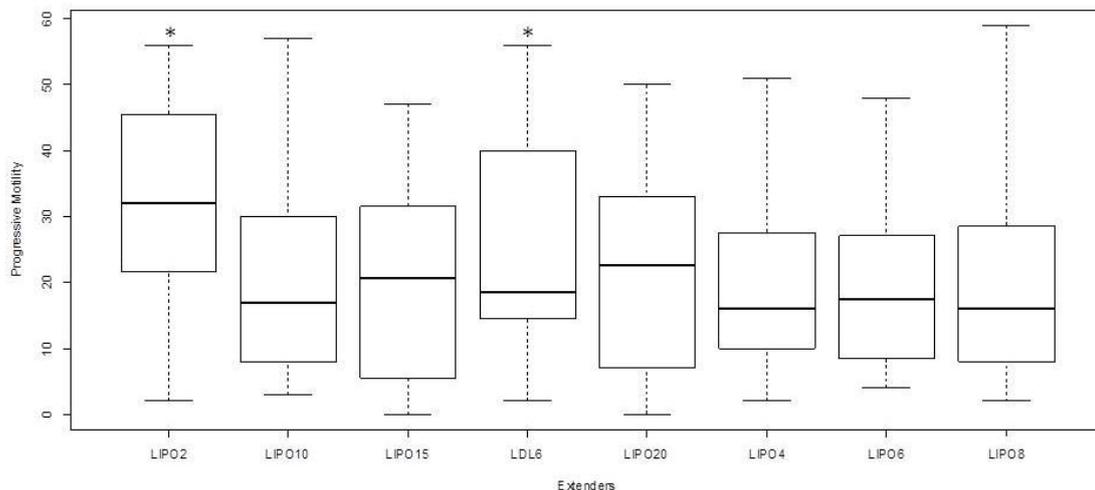


Figure. 5.1 : Effets des dilueurs sur la mobilité progressive mesurée par CASA après 4 jours de réfrigération (4°C) en utilisant un dilueur à base de 6% lipoprotéines de basse densité (6%LDL) et des dilueurs à base de différentes concentrations en liposomes (2, 4, 6, 8, 10, 15, and 20% LIPO).

L'Astéris (*) signifie que c'est significativement différent à ($0.01 < P < 0.05$).

LIPO 2% et LDL 6% ne diffèrent pas significativement (31.4 vs. 26, $p = 0.587$)

($n = 20$).

Tableau 5.2 : Pourcentage des spermatozoïdes mobiles (Mobilité totale) mesuré par CASA après 4 jours de réfrigération (4°C) en utilisant un dilueur à base de 6% lipoprotéines de basse densité (6%LDL) et des dilueurs à base de différentes concentrations en liposomes (2, 4, 6, 8, 10, 15, et 20% LIPO).

Temps (heures)	LDL 6%	LIPO 2%	LIPO 4%	LIPO 6%	LIPO 8%	LIPO 10%	LIPO 15%	LIPO 20%
T0	88	84	85.05	85.6	87.55	84.2	84.55	85.05
T0+24h	81.85	78.7	77.7	81.2	79.85	79.55	79.35	80.4
T0+48h	77.05	75.3	78.25	79.4	79.75	79	75.55	73.3
T0+72h	72.05	75.05	74.75	76.45	76	76.5	69.85	68.75
T0+96h	68.75	72.55^A	67.3	68.35	66.85	63.9	58 ^a	52.45 ^a

Dans la colonne (T0+96h), la lettre en exposant (^A) signifie que c'est significativement plus élevé que tous les autres dilueurs incluant le dilueur de référence (6%LDL); la lettre en exposant (^a) signifie que c'est significativement plus faible que tous les autres dilueurs incluant le dilueur de référence (6%LDL) à $p < 0.05$ (n=20).

Tableau 5.3 : Pourcentage des spermatozoïdes progressifs (Mobilité progressive) mesuré par CASA après 4 jours de réfrigération (4°C) en utilisant un dilueur à base de 6% lipoprotéines de basse densité (6%LDL) et des dilueurs à base de différentes concentrations en liposomes (2, 4, 6, 8, 10, 15, and 20% LIPO).

Temps (heures)	LDL 6%	LIPO 2%	LIPO 4%	LIPO 6%	LIPO 8%	LIPO 10%	LIPO 15%	LIPO 20%
T0	65.45	61.65	66.05	65.1	66.05	64.4	68.1	66.35
T0+24h	56.8	53.6	50.7	56.1	55.95	56.75	57.35	56.8
T0+48h	51.95	47.4	41.15	42.2	45.95	47.1	48.55	46.95
T0+72h	37.05	38.8	28.95	29.5	31	32.8	35.35	36.2
T0+96h	26	31.4	20.25 ^a	19.25 ^a	19.35 ^a	21 ^a	20.45	22.2

Dans la colonne (T0+96h), la lettre en exposant (^a) signifie que c'est significativement plus faible que tous les autres dilueurs incluant le dilueur de référence (6%LDL) à $p < 0.05$ (n=20).

5.3.2. Expérience 2 : Etude des paramètres d'intégrité spermatique

Sur la base des critères d'évaluation initiale mentionnées précédemment, 10 sur les 12 éjaculats récoltés ont été inclus dans cette expérimentation et 2 exclus.

5.3.2.1. Intégrité membranaire et acrosomique

Les résultats du modèle lme ont montré que le diluer à base de 2%LIPO n'était pas significativement différent ($p > 0.05$; Tableau 5.4) du dilueur de référence (6%LDL) pour la préservation de l'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique 79.53 ± 3.13 vs. 78.05 ± 3.20 , l'intégrité structurale de la membrane 73.70 ± 1.59 vs. 71.95 ± 2.12 , et l'intégrité acrosomique 70.85 ± 2.25 vs. 72.45 ± 2.23 après 4 jours de réfrigération (Tableau 5.4).

Aucune interaction significative n'a pu être observée entre la durée de réfrigération (D0, D2, D4) et les dilueurs (6%LDL, 2%LIPO) alors que l'effet du temps a été statistiquement significatif sur l'intégrité membranaire et acrosomique ($p < 0.01$).

5.3.2.2. Intégrité de l'ADN

Les taux d'ADN intact étaient dans les dilueurs à base de 2%LIPO and 6%LDL 98.4 ± 0.33 vs. 99.1 ± 0.52 respectivement (Tableau 5.4) et les taux de fragmentation d'ADN respectivement de 1.4% vs. 0.9%.

Aucune différence significative ($p = 0.6848$) n'a été observée entre les dilueurs testés et le temps (durée de réfrigération) n'avait pas modifié significativement ($p = 0.4558$) l'intégrité d'AND.

Tableau 5.4 : Moyennes (Moy \pm SEM) des taux d'intégrité de la membranaire plasmique (PM) évaluée par le test hypo-osmotique (HOST) et le test au SYBER14/Iodure de Propidium (SYBR14/IP), d'intégrité de l'acrosome (Acros) évaluée par le test à la FITC-Pisum Sativum Agglutinin (FITC/PSA) et enfin d'intégrité de l'ADN évaluée par le test à l'Acridine Orange (AO) après 4 jours de réfrigération (4°C) en utilisant les dilueurs à base de 6% de lipoprotéines de basse densité (LDL) et à base de 2% de liposomes (LIPO).

Temps (Jours)	Dilueurs	Intact PM (HOST)	Intact PM (SYBR14/PI)	Intact Acros (FITC/PSA)	Intact DNA (AO)
J0	LDL	92.60	87.00	79.85	99.20
		± 1.22	± 1.66	± 1.90	± 0.29
	LIPO	90.58	85.38	80.80	98.75
		± 1.33	± 1.88	± 2.01	± 0.44
J2	LDL	85.53	83.70	77.85	98.90
		± 1.86	± 1.59	± 2.25	± 0.31
	LIPO	84.05	81.95	79.45	98.35
		± 2.65	± 2.12	± 2.23	± 0.53
J4	LDL	79.53	73.70	70.85	98.4
		$\pm 3.13^{a1}$	$\pm 1.59^{a2}$	$\pm 2.25^{a3}$	$\pm 0.33^{a4}$
	LIPO	78.05	71.95	72.45	99.1
		$\pm 3.20^{a1}$	$\pm 2.12^{a2}$	$\pm 2.23^{a3}$	$\pm 0.52^{a4}$

Dans la colonne (J4), les valeurs sont comparées entre LDL et LIPO indépendamment pour les quatre tests d'intégrité effectués. Le meme signe en exposant signifie que les LIPO ne diffèrent pas significativement des LDL. Le signe en exposant (^{a1}) est utilisé pour le HOST, (^{a2}) pour le test SYBR14/PI, (^{a3}) pour le test FITC/PSA et (^{a4}) pour le test AO. Significativité est fixée à $p < 0.05$; (n=20).

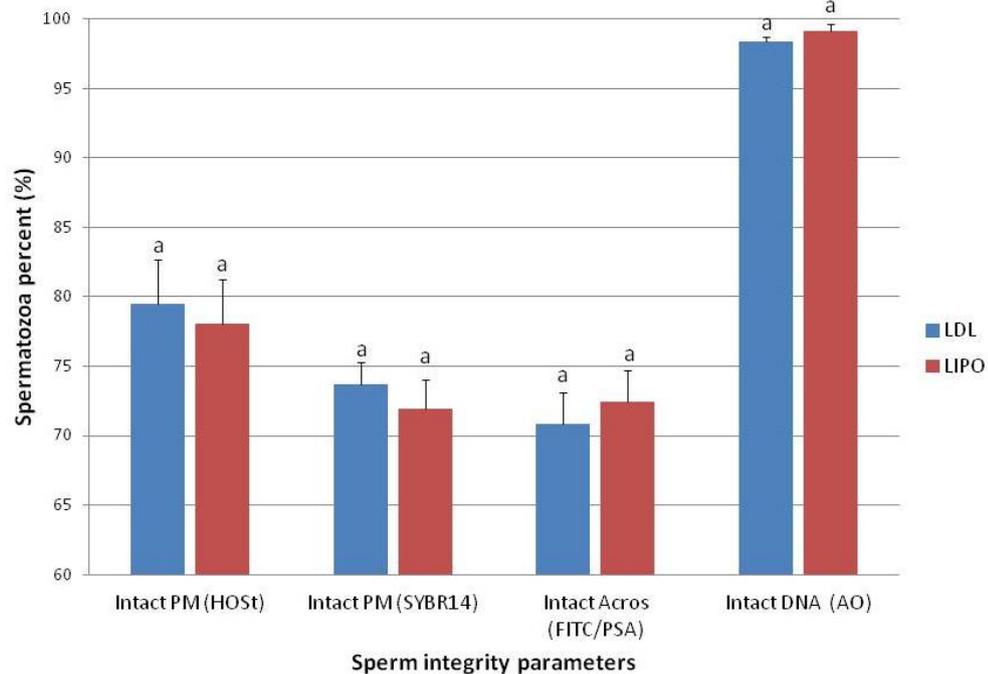


Figure. 5.2 : Effets des dilueurs (LDL, LIPO) sur l'intégrité de la membrane (Intact PM), de l'acrosome (Intact Acros) et de l'ADN (Intact DNA) évaluées après 4 jours de réfrigération (4°C) de la semence canine en utilisant les dilueurs à base de 6% de lipoprotéines de basse densité (LDL) et à base de 2% de liposomes (LIPO).

Legendes: PM: Membrane plasmique; Acros: Acrosome; HOS: test hypo-osmotique; SYBR14: test au Syber14-Iodure de Propidium; FITC/PSA: test à la Fluorescein isothiocyanate –*Pisum Sativum Agglutinin*; AO: test à l'Acridine-orange.

Les valeurs sont comparées entre LDL et LIPO indépendamment pour les quatre tests d'intégrité effectués. Le même signe en exposant signifie que les LIPO ne diffèrent pas significativement des LDL. Significativité est fixée à $p < 0.05$; (n=10).

5.3.3. Experience 3 : Essai préliminaire de fertilité *in vivo*

Parmi les 6 chiennes inséminées, 5 ont été confirmées gestantes. Les dosages de la progestérone, les dates d'insémination artificielle vaginale (IAV) ainsi que les résultats de diagnostic échographique de la gestation sont présentés dans le tableau 5.5

Tableau 5.5 Résultats du dosage de progestérone et d'insémination des six chiennes par une semence réfrigérée pendant 48H ou 96H dans un dilueur à base de 2% de liposomes.

Chienne	Progesteronémie (ng/ml)/Date	1ère IAP	2ème IAP	Durée de la réfrigération	DG à J15	Mise bas
IRIS	8.98 ng/ml (04/10/15)	(04/10/15)	(06/10/15)	48H	Positif	05/12/15
JOIE	9.21 ng/ml (17/01/16)	(17/01/16)	(19/01/16)	48H	Positif	ND*
FICELLE	10.30 ng/ml (17/01/16)	(17/01/16)	(19/01/16)	48H	Positif	ND*
JALOUSE	9.64 ng/ml (19/01/16)	(19/01/16)	(21/01/16)	48H	Négatif	ND*
IMAGE	14.91 ng/ml (31/01/16)	(31/01/16)	(02/02/16)	96H	Positif	ND*
IRIS	7.92 ng/ml (22/03/2016)	24/03/16	26/03/16	96H	Positif	ND*

Légende : IAP : Insémination artificielle vaginale, DG : Diagnostic de gestation par échographie 15 jours après insémination. (*) :
 Pour ces chiennes, après confirmation de l'état de gestation, un avortement médical a été provoqué.

5.3.4. Expérience 4 : Etude des interactions avec une membrane biomimétique.

5.3.4.1. Résultats obtenus avec les LDL et les liposomes seuls

La figure 5.3 montre qu'après injection de 6%LDL seul, la pression de surface de la monocouche s'élevé progressivement entre les deux barrières mobiles. Ceci refléterait l'intégration des LDL dans la monocouche. Après addition de 2%LIPO seul, la pression de surface ne montre qu'une très faible variation, signifiant probablement que les liposomes ne se sont pas intégrés dans la monocouche.

5.3.4.2. Résultats obtenus avec le liquide prostatique (LP) canin

La figure 5.4 montre que le LP seul n'interagit pas avec l'hémi-membrane. Lorsque le LP est couplé avec le dilueur 6%LDL, la pression de surface de la monocouche augmente indiquant éventuellement que cette combinaison interagit avec la membrane. Lorsque le LP est combiné avec le dilueur 2% LIPO, aucune interaction n'a pu être enregistrée.

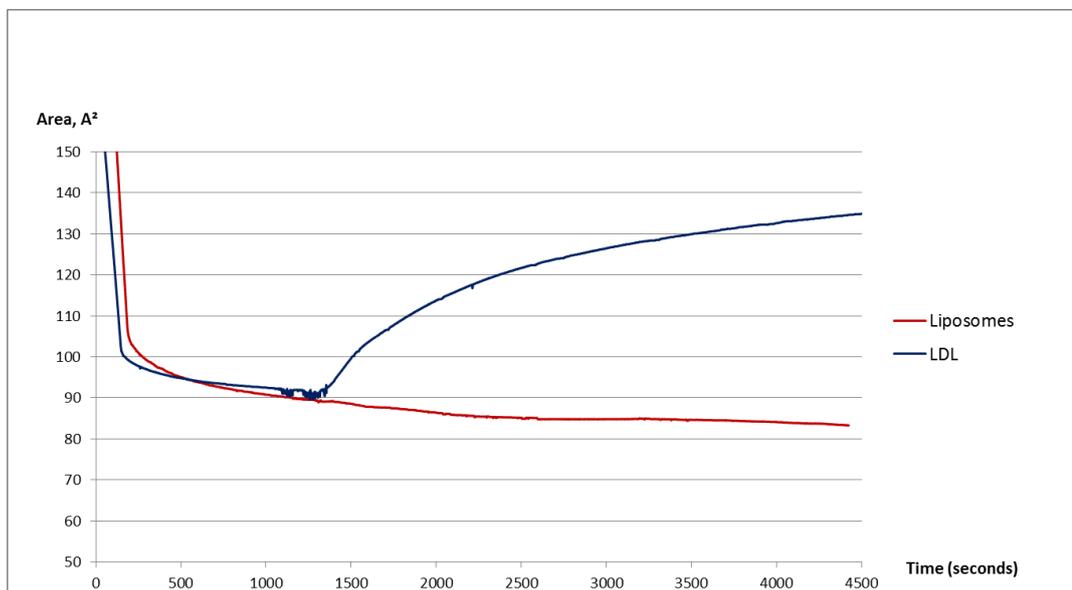


Figure.5.3 : Aire de surface relative (A²) en fonction du temps (secondes) pour l'interface couverte par la monocouche et formée sur le dilueur de base (sous-phase) ne contenant aucune molécule additive, après injection de 6%LDL (courbe bleue) et 2% LIPO (courbe rouge).

Cette figure représente l'action des dilueurs à base de 6% LDL seul et 2% LIPO seul sur la monocouche de la balance de Langmuir-Blodgett.

Legende : LDL : Lipoprotéines de basse densité.

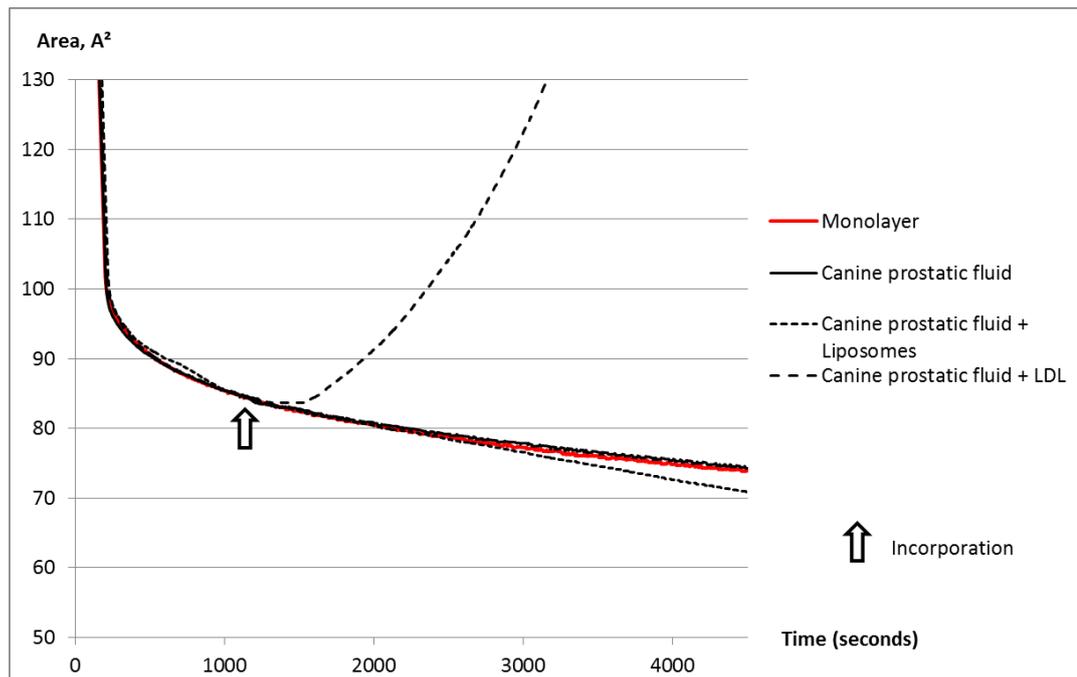


Figure. 5.4 : Aire de surface relative (A^2) en fonction du temps (secondes) pour l'interface couverte par la monocouche et formée sur le dilueur de base (sous-phase) ne contenant aucune molécule additive, après injection du PL canin seul, un mélange de LP et 2%LIPO (10:1 ratio exprimé en poids) et un mélange de LP et 6%LDL (10:1 ratio exprimé en poids).

Cette figure représente l'action du LP canin seul ou combiné aux dilueurs à base de 6% LDL et 6% LIPO sur la monocouche de la balance de Langmuir-Blodgett.

Legende : LDL : Lipoprotéines de basse densité, LP: Liquide prostatique

5.4. Discussion

5.4.1. Paramètres de mobilité spermatique

Dans la présente étude 20 sur les 23 éjaculats récoltés ont été inclus et 3 exclus pour des notes de mobilité massale en dessous du seuil d'acceptation (Voir § 5.2.1.1).

Les résultats du milieu à base de 6%LDL sont similaires à ceux rapportés par BENCHARIF *et al.* en 2013 [18] qui ont montré que ce milieu préserve avec efficacité la mobilité après 4 jours de réfrigération pour 100% des chiens testés.

C'est la première fois que les liposomes ont été testés en réfrigération de la semence canine et parmi les différentes concentrations, 2% semble être l'optimale. La littérature n'offre pas de données auxquelles nous pouvons comparer nos résultats.

Dans cette étude, les concentrations oscillant entre 4% and 10% LIPO semblent offrir une bonne préservation de la mobilité pour une courte période de réfrigération (48 – 72h) comparable au dilueur de référence, mais la mobilité se dégrade plus rapidement que dans le dilueur à base de 2%.

Les fortes concentrations en liposomes (15 et 20%) semblent être en discordance avec la mobilité. Dans les conditions de notre actuelle expérimentation, aucune explication de base n'a pu être donnée à cette observation. De plus amples explorations méritent d'être effectuées.

5.4.2. Statut d'intégrité spermatique

Dans cette expérience, 10 sur les 12 éjaculats récoltés ont été inclus et 2 exclus pour des valeurs de concentration en dessous du seuil d'acceptation (Voir § 5.2.1.1).

L'évaluation de l'intégrité d'ADN est importante dans la réfrigération car le choc du froid peut endommager l'intégrité structurale de la chromatine et affecter par conséquent l'aptitude du spermatozoïde à maintenir le développement embryonnaire [219]. Les taux de fragmentation d'ADN dans les dilueurs à base de 2% LIPO et 6% LDL étaient de loin en dessous du seuil toléré pour l'effet de la cryoconservation sur le sperme canin [103]. Ceci signifierait que le dilueur à base de 2% LIPO préserve l'intégrité de la chromatine avec autant d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL) pendant la pleine période de réfrigération (4jours).

Les intégrités de la membrane plasmique et de l'acrosome sont des caractéristiques importantes à évaluer dans le spermatozoïde réfrigéré et réchauffé car le choc de refroidissement est connu pour induire des lésions irréversibles de la membrane et de l'acrosome pouvant affecter le pouvoir fécondant de la semence réfrigérée (5 ; 108).

Il a été montré précédemment [18] que le dilueur de référence (6%LDL) préserve avec efficacité la totalité des paramètres d'intégrité évalués, et nos résultats sont similaires à ceux de ces auteurs.

Les LDL semblent protéger le sperme contre les dommages du refroidissement en s'incorporant dans la membrane plasmique et réduisant sa température de transition de phase et en remplaçant les phospholipides perdus ou endommagés par le choc de refroidissement [186 ; 7 ; 220].

Une action synergique entre les phospholipides (spécialement PC) et les protéines contenues dans les LDL semble conférer aux cellules spermatiques un double effet de « résistance et protection » [108 ; 188].

Cependant, Les rôles respectifs des protéines et des lipides en interaction avec la membrane plasmique ne sont pas encore clairement établis [30].

5.4.3. Fertilité *in-vivo*

Pour évaluer l'efficacité du dilueur à base de 2%LIPO, un essai préliminaire de fertilité a été effectué. Sur les 6 chiennes inséminées, 5 ont été confirmées gestantes.

Ce test préliminaire permet de confirmer que la réfrigération de la semence canine dans un dilueur à base de 2% de liposomes pendant 48 et 96H n'interfère pas avec la fertilité *in vivo*.

Aucune autre conclusion particulière ne peut être tirée à cause du faible nombre de chiennes utilisées dans cet essai préliminaire. Un test plus large est requis pour pouvoir comparer le taux de gestation entre ce dilueur expérimental et le milieu de référence.

5.4.4. Interactions avec la membrane biomimétique

L'interaction des LDL avec l'hémi-membrane lorsqu'ils sont utilisés seules semble être en faveur d'un mécanisme de protection direct à travers leur incorporation au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde. Cette observation est en accord avec les études précédentes ayant démontré la reconnaissance et la fixation des

LDL avec les résidus glycosidiques de la membrane plasmique [11] ainsi qu'avec les échanges permanents et irréversibles de lipides mis en évidence entre les LDL et la membrane plasmique du spermatozoïde ovin [14], équin [211] et bovin [15].

Les liposomes seuls ne semblent pas interagir avec la membrane biomimétique à cause du fait que la lécithine de JO utilisée contient essentiellement la PC (74.1%) et la PE (13.3%) qui sont des phospholipides neutres alors que la fusion avec la membrane plasmique requiert la présence de phospholipides chargés négativement tel que la PS [209] ou le PG [34] au sein des bicouches liposomiales .

Notre formulation de liposomes semble agir sans incorporation au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde. Ils agissent probablement à travers deux mécanismes hypothétiques. Le premier est une protection par recouvrement qui est une forte association entre les lipides exogènes et les composants de la membrane plasmique sans intégration dans cette membrane. Le mécanisme de protection par recouvrement a été décrit pour la première fois par Ricker *et al.* en 2006 [189] dans la cryoprotection du spermatozoïde équin par des liposomes à base de PC de JO et aux moyens de la spectroscopie à infra rouge de transformé de Fourier (FTIR) et de la microscopie électronique de balayage (SEM). Ces dernières techniques peuvent objectiver cette association contrairement à la balance de Langmuir-Blodgett qui ne peut mettre en évidence que l'incorporation des lipides au sein de la membrane plasmique [37].

La seconde hypothèse est en faveur d'un mécanisme indirect à travers l'interaction avec les composants du dilueur (Lipides, protéines, ions) comme agir par exemple en chélateur de calcium (prévenir l'influx de Ca^{2+}). L'interaction des liposomes à base de PC avec les composants du dilueur a été décrite depuis longtemps comme action protectrice des lipides exogènes [108] et a été récemment mise en évidence dans la protection du spermatozoïde équin par des liposomes à base d'une lécithine de JO ayant la même composition que ceux utilisés dans notre étude [36].

Bien que les LDL et les LIPO sont composés tous les deux de phospholipides, (connus pour avoir le rôle clef dans la protection du spermatozoïde), leurs mécanismes de protection semblent être différents. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les liposomes sont constitués seulement de phospholipides alors que les

LDL contiennent d'autres composants comme les protéines qui sont nécessaires à la solubilisation des phospholipides et à leur mise en contact étroit avec la membrane plasmique [14 ; 108]. Cette synergie entre les lipides et les protéines semble favoriser l'interaction des LDL avec la membrane plasmique du spermatozoïde.

Contrairement au plasma séminal bovin chez le taureau [36], le liquide prostatique canin ne semble ni interagir avec la membrane de Langmuir-Blodgett lorsqu'il est ajouté seul, ni modifier les modes d'interaction des LDL et des LIPO lorsqu'il est mélangé à eux. Dans les conditions expérimentales de notre étude, aucune conclusion n'a pu être faite à propos de la séquestration d'éventuelles protéines liantes. D'autres études semblent nécessaires pour des explorations plus poussées (interactions et analyses bio-moléculaires) des différentes fractions de l'éjaculat.

En résumé, les liposomes (2%) semblent être une alternative viable aux lipoprotéines de basse densité (6%LDL) dans la réfrigération de la semence canine. Ils préservent 72.55% de spermatozoïdes mobiles et 31.4% progressifs après 96H de réfrigération et permettent d'avoir 3 chiennes gestantes sur 4 inséminées après 48H de réfrigération et 2 chiennes gestantes sur 2 inséminées après 96H de réfrigération. Ces deux cryoprotecteurs agiraient suivant deux mécanismes de protection différents. Les LDL semblent agir par incorporation dans la membrane plasmique alors que les liposomes probablement sans incorporation.

CHAPITRE 6

INTERET DES LIPOSOMES DANS LA CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE

6.1. Introduction

La cryoconservation du sperme interfère avec la fertilité en réduisant la viabilité et affectant le statut structural et fonctionnel des spermatozoïdes survivant au processus de congélation-décongélation. Le rôle des dilueurs est de protéger les spermatozoïdes tout au long de ce processus en réduisant la proportion des morts et en améliorant la qualité des survivants [5].

Beaucoup de chercheurs travaillent sur les cryoprotecteurs afin de développer le dilueur le plus efficace [6]. Les cryoprotecteurs peuvent être divisés en agents prévenant la formation de cristaux de glace i.e. agent cryoprotecteurs proprement dits (essentiellement le glycérol chez le chien) et les agents stabilisants membranaires [7] i.e. protecteurs membranaires de refroidissement [8] représentés par le Jaune d'œuf (JO) dans la conservation de la semence canine [6].

Pour pallier aux inconvénients du JO, ce dernier fût remplacé par les LDL qui ont prouvé leur efficacité dans la congélation de la semence de taureau [15], de chien [17] et de l'étalon [19]. Malgré cette efficacité, les LDL se sont aussi heurtées à des contraintes sérieuses d'ordre technologique et bio-sanitaire, d'où la nécessité de les remplacer.

Récemment, les liposomes se sont avérés être une bonne alternative au JO entier ou aux LDL dans la conservation du sperme de l'homme [35], l'étalon [36], le taureau [37] et le buffle [38]. Il serait intéressant d'explorer leur effet cryoprotecteur et leur mécanisme d'action dans la congélation de la semence canine.

Nous avons montré dans l'étude précédente (Voir chapitre 5) que les liposomes (à 2%) peuvent remplacer avec succès les LDL dans la réfrigération de la semence canine. Nous avons également étudié leur mécanisme de protection spermatique

au moyen d'une membrane biomimétique (La balance de Langmuir). Il serait donc intéressant d'explorer leur intérêt et leur mode d'action lors de la cryoconservation du spermatozoïde canin.

L'objectif du présent travail est de déterminer les éventuels bénéfices et mécanismes de protection d'un dilueur à base de liposomes en substitution aux LDL dans la congélation du sperme de chien.

6.2. Matériels et méthodes

6.2.1. Expérience 1 : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

6.2.1.1. Animaux et prélèvement de semence

Vingt cinq éjaculats ont été prélevés sur 6 chiens de race Beagle (deux fois par semaine), âgés entre 3 et 7 ans appartenant au service de Pathologie de la Reproduction, ONIRIS-Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de la Loire Atlantique, France. Toutes les expérimentations ont été conduites conformément aux exigences du comité d'éthique d'Oniris, Nantes.

La récolte par stimulation digitale a été faite par le même opérateur et en présence d'une femelle en chaleur. Seulement la fraction riche en spermatozoïdes a été analysée [46].

6.2.1.2. Evaluation initiale de la qualité spermatique

Chaque éjaculat a été évalué (mobilité massale et concentration des spz) suite à sa collecte pour juger de sa qualité et son aptitude à la congélation. La mobilité massale a été appréciée par microscopie selon l'échelle de MILOVANOV et la concentration a été mesurée par un photomètre calibré pour le sperme canin (SpermaCu®, Minitube, Tiefenbach, Germany) tel que précédemment décrit (Voir § 5.2.1.1). Seulement les éjaculats ayant une concentration minimale de 200×10^6 spz/ml et une motilité massale de 4 et plus ont été inclus dans cette étude.

6.2.1.3. Préparation des LDL et des liposomes

L'extraction des LDL a été effectuée selon la technique décrite par MOUSSA *et al.* (2002) [13], protégée par brevet sous le numéro (0100292) et déjà détaillée dans le

chapitre 4 (Voir § 4.4.2, Figure 4.3). Les liposomes ont été produits selon la technique rapportée par Le GUILLOU *et al.* (2015) [37] et déjà décrite dans le chapitre 5 (Voir § 5.2.1.2.2).

6.2.1.4. Préparation des dilueurs

Neuf dilueurs de congélation ont été préparés à partir d'un dilueur de base commun (Tris, acide citrique, fructose, antibiotiques and glycérol) par addition de 20% de JO, 6% LDL ou une des 7 concentrations (v/v) en LIPO (2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 15%, and 20%) correspondant respectivement aux concentrations (w/v) suivantes: (0.18, 0.36, 0.55, 0.73, 0.91, 1.37 et 1.82 g/100ml de dilueur). La composition détaillée des dilueurs est donnée en Tableau 6.1.

Ce panel de concentrations en LIPO a été établi par rapport au dilueur de référence (6%LDL) qui est l'équivalent de la concentration 6%LIPO en termes de quantité de PL [13]. Ainsi, nous avons choisi la concentration 6% LIPO et quelques concentrations au dessous (2%, 4%) et au dessus (8%, 10%, 15%, et 20%).

Le dilueur 6%LDL a été utilisé comme dilueur de référence (contrôle positif) car il a été démontré que ce milieu préserve avec efficacité la semence canine [17]. Le dilueur à base de 20% JO a été aussi utilisé comme un deuxième contrôle.

6.2.1.5. Dilution de la semence

Neuf cryotubes ont été placés dans un bain marie (37°C) et remplis d'un volume initial (100µl) de chaque dilueur expérimental. La fraction riche en spermatozoïdes de chaque éjaculat (échantillon) a été divisée en 9 aliquotes de volume égal ajoutés aux neuf cryotubes. Sur la base de la concentration mesurée sur l'échantillon, le volume de chaque dilueur a été ajusté pour avoir une concentration finale de 100×10^6 spz/ml dans chaque cryotube.

6.2.1.6. Equilibration, congélation et décongélation

Les 9 cryotubes sont mis dans une vitrine réfrigérante pendant 1 heure à + 4°C pour équilibration, puis remplie manuellement dans des paillettes françaises de 0.25 ml (IMV Technologies, Aigles, France). Ces dernières ont été bouchées avec une poudre d'alcool polyvinylique et placées horizontalement sur une rampe métallique

de congélation maintenue à 4°C pendant 30 min. Les paillettes ont été congelées en vapeur d'azote (4 cm au dessus du niveau liquidien de l'azote) pendant 10 min puis immergées et stockées dans un container d'azote pendant 24H. Pour la décongélation, les paillettes sont immergées directement dans un bain marie (37°C) pendant 30 secondes (Voir annexe 06). Chaque lot était analysé 10 min après. Avant l'analyse, la semence de chaque lot a été diluée au quart pour obtenir la concentration de $(25 \times 10^6 \text{ spz/ml})$ dans une solution EasyBuffer B® (IMV-Technologies, Aigle, France) et mis à l'étuve pendant 10mn à 37°C.

6.2.1.7. Analyse automatisée de la semence

Les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes ont été analysés immédiatement après dilution (T0) et 10 min après décongélation au moyen d'un analyseur Hamilton Thorn system (HTM-IVOS version 14.0 ; Hamilton Thorne, Inc. Beverly, MA, USA) et d'une chambre d'analyse de type (Leja, 20µm Products B.V., Nieuw Vennepe, Pays-bas). Les paramètres de mobilité (MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP et ALH) ont été mesurés tel que décrit précédemment (Voir § 5.2.1.4).

Tableau 6.1 : Composition des milieux 20% Jaune d'oeuf (JO), 6% LDL, et des différentes concentrations de liposomes.

PL : Phospholipides ; TRIS : Trihydroxymethyl aminométhane ; QSP : Quantité suffisante pour.

Dilueur	Diluers à base de liposomes							6%	20%
	2%	4%	6%	8%	10%	15%	20%	LDL	JO
Poudre PL (g)	1.82	3.64	5.46	7.28	9.10	13.65	18.20	//	//
JO (mL)				//				//	200
LDL(g)				//				16.5	//
TRIS-Base (g)				30.26					
Acid citrique (g)				17.00					
Fructose (g)				12.50					
Glycerol (mL)				32.00					
Streptomycine (mg)				1					
Baytril 10% (mL)				0.8					
QSP Eau (L)				1					

6.2.1.8. Analyse statistique

Nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes (lme) pour analyser les effets du temps (stade d'évaluation) et des dilueurs sur chaque paramètre de mobilité à part. Les interactions du temps et des dilueurs sur la mobilité ont été intégrées dans ce modèle avec le terme « Time*Extender ». Ce modèle statistique a déjà été décrit précédemment (Voir § 5.2.1.5). La significativité a été fixée à $P < 0.05$ et les résultats sont donnés en moyennes plus ou moins erreur standard (Moy \pm SEM).

6.2.2. Expérience 2 : Etude des paramètres d'intégrité spermatique

Douze éjaculats ont été récoltés sur les 6 mêmes chiens Beagle de la première expérience. Les échantillons répondant aux critères d'inclusion ($n=10$) ont été dilués dans deux milieux à base de 6% LDL (Dilueur de référence) et 6% LIPO puis congelés comme décrit précédemment (expérience 1).

Une analyse d'image de la semence (MOT and PMOT) puis une évaluation des paramètres d'intégrité spermatique ont été réalisées. A cet effet, quatre tests ont été entrepris comme décrits précédemment et permettant d'évaluer l'intégrité acrosomique par le test à la FITC-PSA (Voir § 5.2.2.1), l'intégrité de la membrane plasmique par le test hypo-osmotique (Voir § 5.2.2.2) et le test au SYBR14/Iodure de propidium (Voir § 5.2.2.3) et finalement l'intégrité d'ADN en utilisant le test à l'Acridine Orange (Voir § 5.2.2.4).

La mobilité (MOT and PMOT) et les caractéristiques d'intégrité ont été évaluées à deux moments différents : après dilution (T0) et 10 min après décongélation de la semence (T1).

6.2.2.1. Analyse statistique

Comme dans la première expérience, les effets du temps ou stade d'évaluation (après dilution, après décongélation) et les dilueurs sur chaque paramètre d'intégrité spermatique ont été analysés grâce à un lme. Les effets d'interaction entre le temps (stade d'évaluation) et les dilueurs sur les paramètres d'intégrité ont été inclus dans le modèle lme. La significativité statistique est mise à $P < 0.05$ et les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM (erreur standard de la moyenne).

Pour évaluer la corrélation de tous les paramètres d'intégrité simultanément à chaque stade d'évaluation de la semence (Après dilution "T0", après décongélation) Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Il s'agit d'une méthode de statistique descriptive consistant à synthétiser et représenter graphiquement l'information contenue dans l'observation de plusieurs variables. C'est une analyse multivariée prenant comme variables actives les quatre tests (HOS, FITC, SYBR et Acridine orange) et comme variable illustrative le milieu (LDL 6%, Liposomes 6%).

Cette approche statistique offre la possibilité d'une appréciation plus globale du statut d'intégrité du spermatozoïde et de suivre sa variation entre les deux dilueurs comparés. Cette approche est justifiée par le fait que chacun des quatre tests d'intégrité réalisés reflète une fonction du spermatozoïde nécessaire mais pas suffisante seule pour son pouvoir fécondant. Une exploration globale et simultanée de ces fonctions spermatiques renseigne de meilleure façon sur le pouvoir fécondant du spermatozoïde (*in-vitro*).

Graphiquement, les dilueurs ont été représentés par leurs points moyens et leurs ellipses de confiance (95%) dans le premier plan de l'ACP. L'intersection de ces ellipses de confiance renseigne sur la présence ou l'absence d'une différence significative entre les dilueurs comparés.

6.2.3. Expérience 3 : Essai préliminaire de fertilité *in-vivo*.

Pour cet essai préliminaire, 6 chiennes de race Beagle appartenant au service de Reproduction, ONIRIS-Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de la Loire Atlantique, France, ont été utilisées.

Les cycles oestriques des chiennes ont été suivis au moyens des frottis vaginaux et du dosage quantitatif de la progestérone (Mini-Vidas machine, Biomérieux, France). L'échographie ovarienne a été parfois utilisée pour objectiver l'ovulation. Deux inséminations transcervicales sous vidéo-endoscopie (Voir annexe 3 et § 1.4.2) ont été pratiquées à 24H d'intervalle deux jours après que la valeur de la progestéronémie ait dépassé les 10ng/ml. Une dose de 200–300x10⁶ spz/ml (8 - 12 paillettes) a été déposée dans l'utérus.

Les éjaculats ayant servi pour le test de fertilité ont été récoltés, soumis à l'évaluation initiale pour leur aptitude à la congélation puis congelés dans un dilueur à base de 6% liposomes exactement comme décrit dans les expérimentations précédentes. La mobilité de la semence a été contrôlée avant et après congélation par analyseur d'image comme précédemment décrit pour s'assurer de sa bonne qualité. Une nouvelle analyse automatisée de cette semence a été effectuée juste avant insémination et le seuil d'acceptation de cette semence pour l'insémination artificielle est 30% de spermatozoïdes mobiles après décongélation.

Quinze jours après la date d'insémination, un diagnostic échographique de la gestation a été réalisé au moyen d'un échographe (Esaote, France) muni d'une sonde linéaire de 12,5 Mhz. Si une gestation est confirmée, un suivi périodique est observé jusqu'à mise bas.

6.2.4. Expérience 4 : Etude des interactions avec une membrane biomimétique.

Dans cette expérience, nous avons utilisé les dilueurs de congélation à base de 6%LDL, 6%LIPO préparés exactement comme décrit dans l'expérience 1 et le liquide prostatique (LP) canin récolté sur 3 chiens Beagle, et le mélange utilisé le jour de son prélèvement.

Le dispositif de la membrane de Langmuir-Blodgett (302LL, Nima Technology, UK) a été le même que celui utilisé précédemment pour l'étude des dilueurs de réfrigération (Voir § 5.2.3.1) sauf que la sous-phase liquide est composée des mêmes constituants du dilueur de congélation (TRIS, acide citrique, fructose, antibiotiques et le glycérole) avec les mêmes proportions mentionnées précédemment (Tableau 6.1). Ainsi, la sous-phase va mimer la base du dilueur de congélation.

Les trois étapes de l'expérimentation ont été conduites comme décrit précédemment (Voir § 5.2.3.2) à la différence que le cryoprotecteur injecté en sous-phase était à base de 6% de liposomes (congélation) au lieu de 2% (réfrigération) et qu'il contenait du glycérol (3.2%).

6.3. Résultats

6.3.1. Expérience 1 : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

Sur la base des critères d'évaluation initiale mentionnés précédemment, 20 sur les 25 éjaculats récoltés ont été inclus dans cette expérimentation.

D'après la mobilité totale (MOT), seulement les dilueurs à base de 20% JO (27.8 ± 2.8) et 20% LIPO (23.4 ± 2.9) étaient significativement faibles au dilueur de référence 6%LDL (36.5 ± 3.1) et seulement les concentrations 4% et 6% LIPO étaient au dessus du seuil d'acceptation pour l'insémination artificielle (30% de MOT) même si non significativement différentes du dilueur de référence (Figure.1).

En considérant simultanément la mobilité totale et progressive (MOT et PMOT), seulement la concentration 6% LIPO (14.80 ± 1.66) a pu préserver les deux paramètres autant que le dilueur de référence (6%LDL) (18.60 ± 2.07) ($p > 0.05$) (Figure 6.2).

Concernant tous les paramètres de vitesse (VAP, VSL, VCL) et l'ALH, la concentration de 6% LIPO est similaire au milieu de référence ($p > 0.05$) (Tableau 6.2).

De plus, en prenant le milieu à base de JO comme référence, cette concentration (6%LIPO) était beaucoup mieux avec les plus hauts degrés de significativité (p-value variant entre 0.005 et 0.0001) pour les six paramètres cinétiques suivants (MOT, PMOT, VAP, VSL, VCL and ALH).

Ainsi, si nous considérons simultanément la totalité des paramètres étudiés, 6% LIPO semble être la concentration optimale en liposomes. Les expériences à venir seront donc réalisées en utilisant cette concentration.

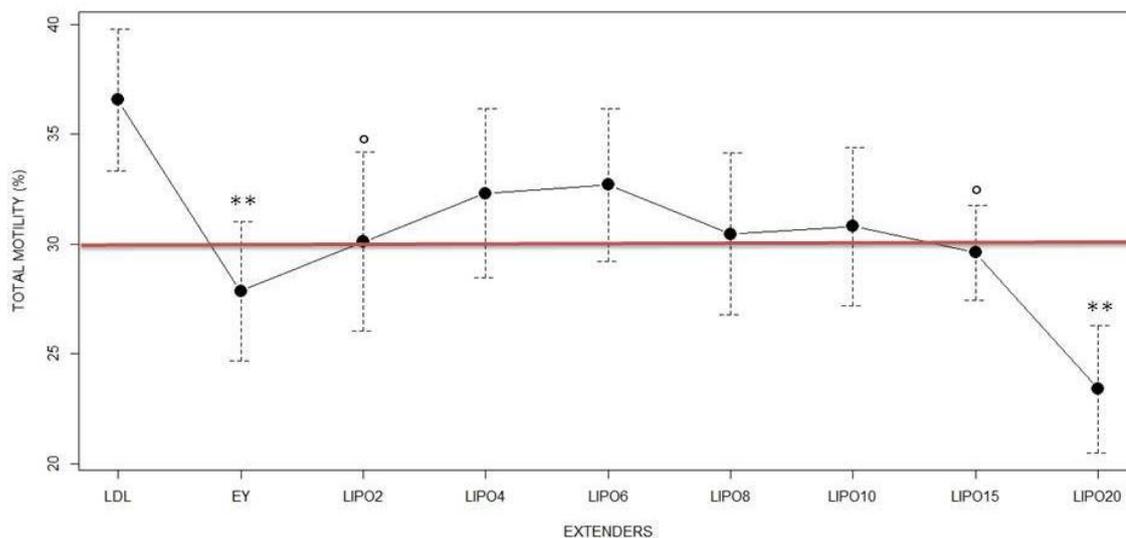


Figure 6.1: Effets des dilueurs sur la mobilité totale (MOT) mesurée avec HTM-IVOS 10min après décongélation de la semence canine congelée avec un dilueur à base de 6% de lipoprotéines à faible densité (LDL pour low density lipoprotein-based extender), un dilueur à base de 20% de plasma de jaune d'œuf (EY pour egg yolk) et différentes concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 15, and 20%) de liposomes donnant lieu à différents dilueurs (2LIPO, 4LIPO, 6LIPO, 8LIPO, 10LIPO, 15LIPO, 20LIPO respectivement).

HTM-IVOS: Systeme Hamilton Thorne avec le logiciel IVOS; La ligne rouge représente le seuil d'acceptation (30% de MOT) pour l'insémination artificielle; le signe en exposant (°) signifie que la valeur tend à être plus faible que le dilueur de référence (6%LDL) à ($0.05 < p < 0.06$); double asterix (**) signifie que la valeur est significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) à ($0.01 < p < 0.001$); (n=20).

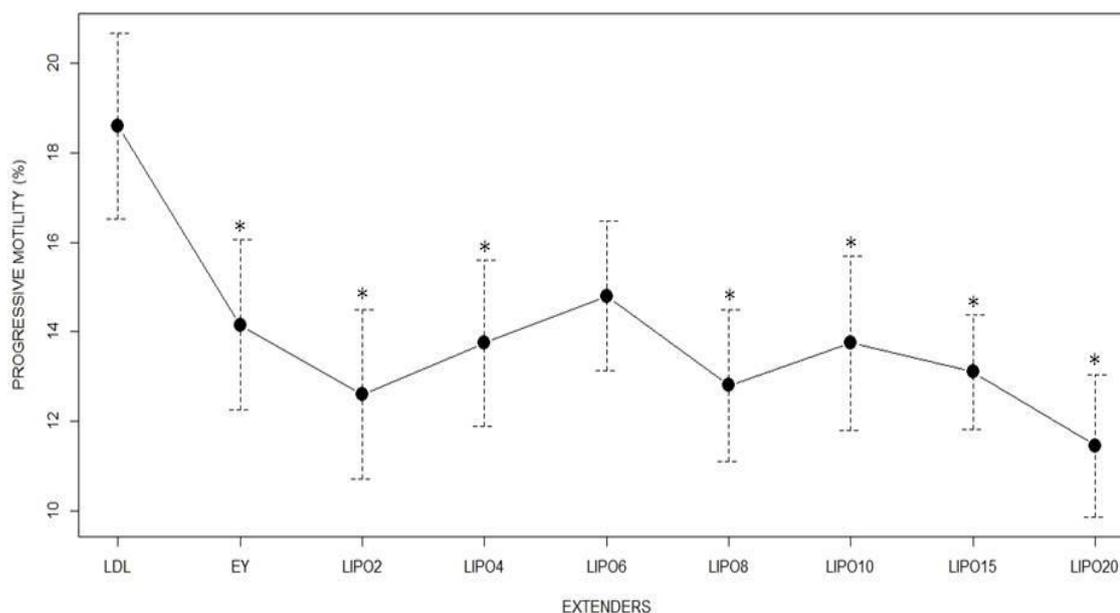


Figure 6.2 : Effets des dilueurs sur la mobilité progressive (PMOT) mesurée avec HTM-IVOS 10min après décongélation de la semence canine congelée avec un dilueur à base de 6% de lipoprotéines à faible densité (LDL pour low density lipoprotein-based extender), un dilueur à base de 20% de plasma de jaune d'œuf (EY pour egg yolk) et différentes concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 15, and 20%) de liposomes donnant lieu à différents dilueurs (2LIPO, 4LIPO, 6LIPO, 8LIPO, 10LIPO, 15LIPO, 20LIPO respectivement).

HTM-IVOS : Système Hamilton Thorne avec logiciel IVOS ; l'asterix (*) signifie que la valeur est significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) à $p < 0.05$ (n=20).

Table. 6.2 : Moyennes (moy \pm SEM) des paramètres de vitesse (VAP, VCL, VSL) et de l'ALH d'une semence canine congelée dans 6% de lipoprotéine à faible densité (6LDL pour low density lipoproteins), 20% jaune d'oeuf (20EY pour egg yolk) et une des différentes concentrations des liposomes (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20LIPO) évaluée 10mn après décongélation par HTM-IVOS 14.0.

Dilueurs	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
6%LDL	78.11 \pm 2.61	61.66 \pm 2.04	140.88 \pm 3.76	7.12 \pm 0.20
20%EY	76.84 \pm 2.83*	61.60 \pm 2.57°	132.34 \pm 4.34***	6.92 \pm 0.25
2LIPO	80.83 \pm 2.78°	61.13 \pm 2.09	151.57 \pm 5.37°	7.54 \pm 0.28
4LIPO	78.38 \pm 2.41	59.38 \pm 2.04	147.66 \pm 3.10	7.70 \pm 0.21°
6LIPO	81.45 \pm 2.30	63.17 \pm 1.97	149.97 \pm 3.70	7.55 \pm 0.24
8LIPO	79.79 \pm 2.50	60.73 \pm 2.26°	147.21 \pm 4.44	7.41 \pm 0.24
10LIPO	80.60 \pm 3.02	62.54 \pm 2.57	144.99 \pm 4.00	7.15 \pm 0.21
15LIPO	80.20 \pm 2.66	62.32 \pm 2.81	145.18 \pm 3.26	7.36 \pm 0.25
20LIPO	76.42 \pm 3.13*	62.67 \pm 3.08°	133.74 \pm 3.84***	6.46 \pm 0.24

VAP : Velocity average pathway ; VSL : velocity straight line ; VCL : velocity curvilinear ; ALH : amplitude of lateral head displacement ; asterix (*) signifie que la valeur est significativement plus faible que le dilueur de référence (6%LDL) à $0.01 < p < 0.05$; triple asterix (***) signifie que la valeur est significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) à $p < 0.001$ (n=20).

6.3.2. Expérience 2 : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

Sur la base des critères d'évaluation initiale mentionnés précédemment, 10 sur les 12 éjaculats récoltés ont été inclus dans cette expérimentation.

6.3.2.1. Intégrité membranaire et acrosomique

Les résultats du Ime montrent que le dilueur à base de 6% LIPO était significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) dans la préservation de l'intégrité membranaire (51.65 ± 2.3 vs 57.60 ± 1.6) et acrosomique (66.5 ± 2.42 vs. 72.4 ± 2.2) après le phénomène de congélation décongélation (Figure 6.3).

L'ACP a confirmé cette observation en montrant graphiquement (Figure 6.4) que le statut d'intégrité du dilueur à base de 6%LIPO tend à être plus faible que le dilueur de référence et qu'il est influencé particulièrement par la différence de l'intégrité acrosomique.

6.3.2.2. Intégrité d'ADN

Les taux d'ADN intact dans les dilueurs à base de 6% LIPO et 6% LDL étaient 97.9 ± 0.6 vs. 98.8 ± 0.4 respectivement. Les taux de fragmentation d'ADN ne différaient pas significativement entre 6%LIPO (2.1%) et 6%LDL (1.2%).

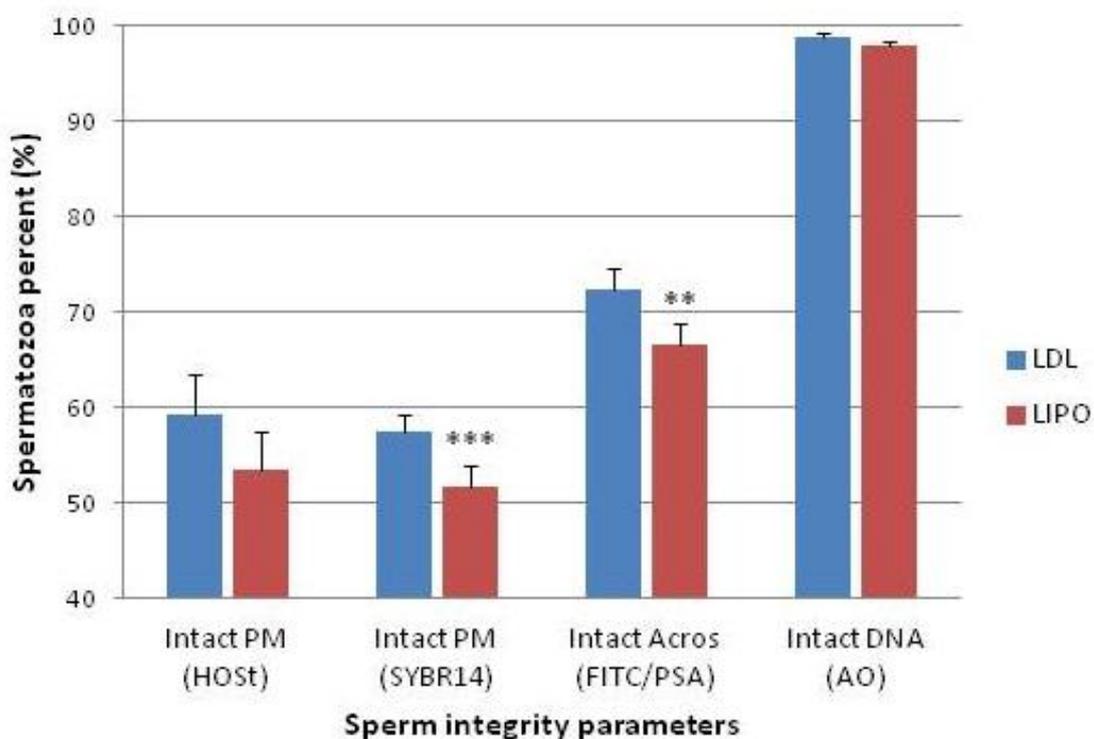


Figure 6.3 : Effets des dilueurs (LDL, LIPO) sur l'intégrité de la membrane (Intact PM), l'acrosome (Intact Acros) et l'ADN (Intact DNA) évaluée après décongélation de la semence canine congelée dans un dilueur à base de 6% de lipoprotéines à faible densité (LDL pour low density lipoprotein-based extender), et un dilueur à base de 6% de liposomes (LIPO pour liposome-based extender).

PM: pour plasma membrane; Acros: Acrosome; HOST: Hypo-osmotic swelling test; SYBR14: Syber14-Propidium Iodide staining; FITC/PSA: Fluorescein isothiocyanate –*Pisum Sativum Aglutinin* test; AO: Acridine-orange staining; double asterix (**) signifie que la valeur est significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) à $0.001 < p < 0.01$; triple asterix (***) signifie que la valeur est significativement plus faible que le milieu de référence (6%LDL) à $p < 0.001$ (n=10).

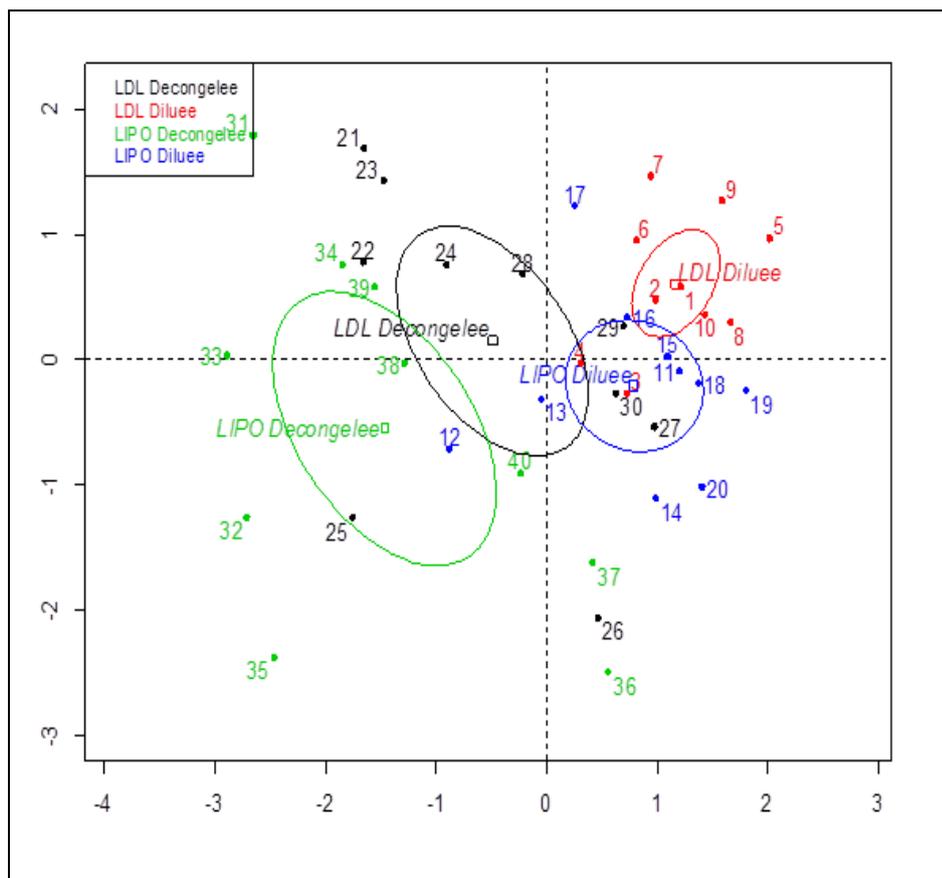


Figure.6.4 : Le premier plan de l'analyse en composantes principale (ACP) pour les quatre tests d'intégrité spermatique (HOST, SYBR14/PI, FITC-PSA et Acridine-Orange) de la semence canine évaluée après décongélation. Les deux dilueurs sont représentés par leurs points moyens et leurs ellipses de confiance à 95% sur ce plan.

Cette figure montre que : (a) les deux points moyens représentant les deux dilueurs étudiés ne sont pas très proches du centre ; (b) les ellipses de confiance, illustrant l'aire de probabilité à 95% de la position de chaque point ne tendent pas clairement à se superposer et que leurs intersections sont vides. Il est à conclure qu'il existe une tendance vers une différence significative entre les deux dilueurs pour la totalité des paramètres évalués considérés simultanément. Cette différence est influencée plus par le test FITC-PSA.

6.3.3. Experience 3 : Essai préliminaire de fertilité in vivo.

Parmi les 6 chiennes inséminées, 4 ont été gestantes et ont donné naissance à des chiots vivants et en bonne santé. Les dosages de la progestérone, les dates d'insémination artificielle profonde (IAP) ainsi que les résultats de diagnostic échographique de la gestation et le nombre de chiots par portée sont présentés dans le tableau 6.3.

Tableau 6.3 Résultats du dosage de progestérone et d'insémination des six chiennes par une semence congelée dans un dilueur à base de 6% de liposomes.

Chienne	Progesteronémie (ng/ml)/Date	1ère IAP	2ème IAP	DG à J15	Mise bas	Nb de chiots
CERISE	13.46 (26/09/2014)	29/09/2014	//	Positif	30/11/2014	4
IMAGE	12 (10/10/2014)	13/01/2014	14/10/2014	Positif	13/12/2014	2
BUDE	12.13 (10/10/2014)	12/10/2014	13/10/2014	Positif	13/12/2014	1
COMETE	8.2 (29/10/2014)	30/10/2014	31/10/2014	Positif	04/01/2015	3
BUDE2	9.37 (26/05/2004)	26/05/2015	27/05/2015	Négatif	//	//
CAPUCINE	7 (12/06/2015)	15/06/2015	16/06/2015	Négatif	//	//
	18.86 (13/06/2015)					

Légende : IAP : Insémination artificielle profonde (intrautérine sous endoscopie), DG : Diagnostic de gestation par échographie 15 jours après insémination.

6.3.4. Expérience 4 : Etude des interactions avec une membrane biomimétique.

6.3.4.1. Résultats obtenus avec les LDL et les liposomes seuls

La figure 6.5 montre qu'après injection en sous phase du dilueur à base de 6%LDL seul, la pression de surface de l'hémi-membrane augmente progressivement. Ceci signifierait que les LDL se sont intégrés dans l'hémi-membrane.

D'un autre côté, après injection du dilueur 6%LIPO seul, la pression de surface de l'hémi-membrane ne montre qu'une très faible variation ce qui signifierait l'absence d'intégration des liposomes (Figure 6.5).

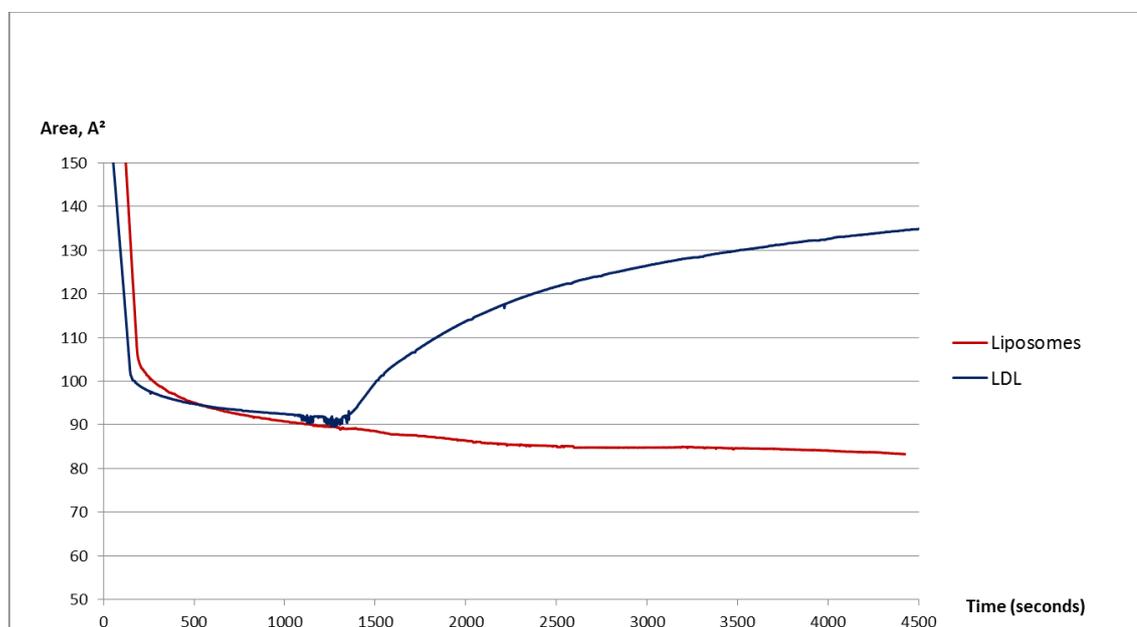


Figure. 6.5. Aire de surface relative en fonction du temps pour l'interface couverte de la monocouche et formée sur le tampon après injection de 6% de lipoprotéines à faible densité (6%LDL, courbe bleue) et de 6% de liposomes LIPO (courbe rouge). Cette figure représente l'action des 6% LDL seules et des 6% LIPO seules sur la monocouche de la balance de Labgmuir-Blodgett.

6.3.4.2. Résultats obtenus avec le liquide prostatique (LP) canin

La figure 6.6 montre que le LP seul n'interagit pas avec l'hémi-membrane. Quand le LP est associé au 6%LDL, la pression de surface de l'hémi-membrane augmente signifiant que la combinaison (LDL-LP) interagit avec l'hémi-membrane. Cependant,

quand le LP est associé au 6%LIPO, aucune interaction n'a pu être observée avec l'hémi-membrane (figure 6.6).

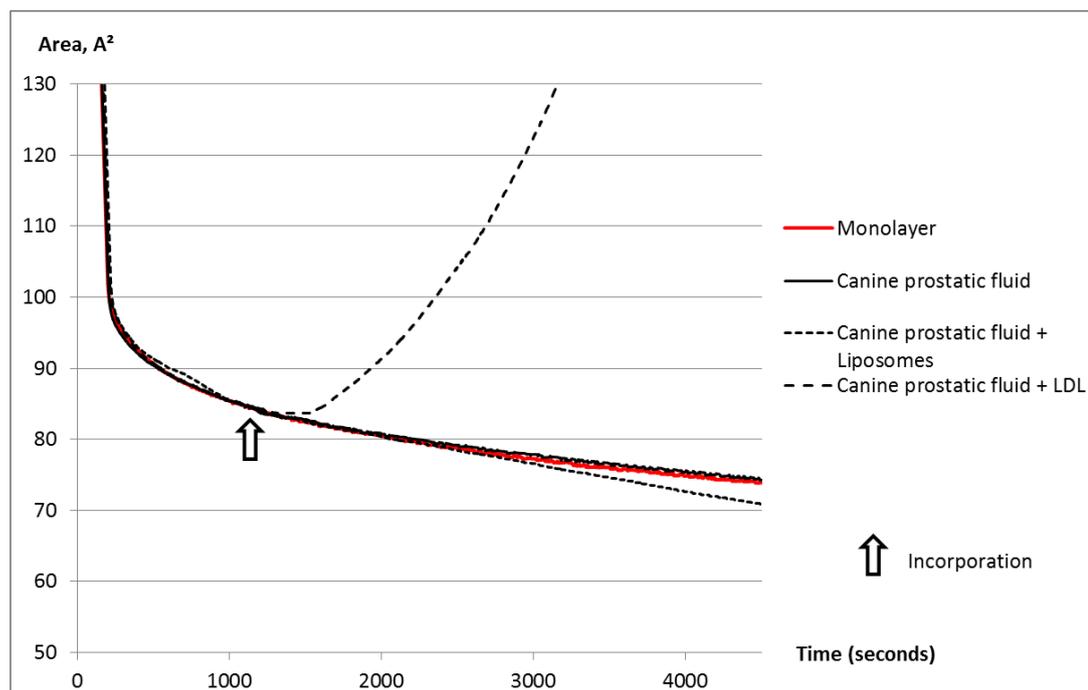


Figure. 6.6. Aire de surface relative en fonction du temps pour l'interface couverte de la monocouche (courbe rouge) et formée sur le tampon après injection du liquide prostatique canin, d'un mélange de liquide prostatique et de 6% LDL (ratio 10 :1 exprimé en poids) et d'un mélange de liquide prostatique et de 6% LIPO (ratio 10 :1 exprimé en poids). Cette figure représente l'action du liquide prostatique seul ou combiné avec 6% LDL et 6%LIPO sur la monocouche de la balance de Labgmuir-Blodgett.

6.4. Discussion

6.4.1. Paramètres de mobilité

Parmi les 25 éjaculats récoltés, 3 ont été exclus pour faibles concentrations, 2 pour faible mobilité massale et 20 ont été inclus dans cette étude.

Le transport du sperme jusqu'au site de fécondation requiert un minimum de capacité de mouvement progressif qui peut être compromise dans un grand nombre de spermatozoïdes congelés-décongelés. Ainsi, les dilueurs de congélations doivent permettre une bonne protection des spermatozoïdes et préservation de leur mobilité [5].

La supériorité du milieu de référence (6%LDL) sur les milieux à base de 20% JO a déjà été démontrée dans la congélation de la semence canine [17] et pourrait s'expliquer par les bénéfices de l'extraction des LDL à partir du JO entier [13] ainsi que l'élimination consécutive des granules affectant la mobilité spermatique [15].

En considérant simultanément la totalité des paramètres mesurés, la concentration optimale en liposomes apparaît être 6% (i.e. 0.55g/100ml). Elle a pu préserver la mobilité aussi efficacement que le dilueur de référence (6%LDL) et beaucoup mieux ($p < 0.05$) que le milieu à base de 20% JO.

Dans la réfrigération de la semence canine, la concentration optimale en liposomes a été 2% (voir chapitre 6). Cette observation signifierait que pour la congélation, la concentration en liposomes nécessaire à un effet protecteur est plus importante que pour la réfrigération.

En semence bovine, RÖPKE et ses collaborateurs [34] ont rapporté en 2011 une concentration optimale plus faible (0.2g/100ml) quand les liposomes étaient incubés avec la semence pendant 24h à 4°C avant congélation (temps d'équilibration : 24H) et de **0.4g/100ml** quand le temps d'équilibration était de 6H. Cette concentration se rapproche de la notre (**0.55g/100ml**) malgré la différence d'espèces et du protocole expérimental (i.e. temps d'incubation avant congélation et technique d'analyse spermatique).

En semence équine, PILLET et ses collaborateurs [36] rapportèrent en 2012 la concentration de **0.12g/100ml** comme optimum qui est quatre fois plus petite que notre concentration chez le chien. Cependant, en plus de la différence d'espèces, ces auteurs ont ajouté les liposomes pour remplacer seulement 2% de JO (v/v) dans le dilueur INRA96 (IMV-Technologies, Aigles, France) qui contenait déjà les phosphocasinates natives (i.e. fraction cryoprotective du lait) [221]. Cette association de deux protecteurs membranaires justifie la concentration réduite pour une action optimale.

La plus forte concentration en liposomes testée (20% i.e. 1.82g/100ml) semble être inefficace avec presque tous les paramètres cinétiques étudiés, affectant significativement MOT, PMOT, VAP and VCL. Cette observation est en accord avec ce qui a été constaté auparavant dans nos études sur la réfrigération (voir chapitre

5). Ceci pourrait être dû à un phénomène d'agrégation des liposomes réduisant leur efficacité en cryoprotection du sperme comme observé précédemment avec les fortes concentrations des LDL (au delà de 10%) en semence bovine [13 ; 15].

6.4.2. Paramètres d'intégrité spermatique

Parmi les 12 éjaculats récoltés dans cette expérimentation, 2 ont été exclus pour faibles concentrations et 10 ont été inclus dans cette étude.

L'évaluation de l'intégrité d'ADN est d'une grande importance après congélation-décongélation du sperme car ce processus de cryoconservation peut affecter l'intégrité structurale de la chromatine et par conséquent la capacité du sperme à maintenir un développement embryonnaire normal [219]. Les taux de fragmentation d'ADN dans les dilueurs à base de 6% LDL et 6% LIPO sont de loin en dessous du seuil moyen (6.47%) rapporté comme acceptable dans la cryoconservation de la semence canine [103]. Ceci suggère que le dilueur à base de 6%LIPO préserve l'intégrité de la chromatine du spermatozoïde canin au même degré d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL) à travers le processus de cryoconservation.

Cependant, en ce qui concerne l'intégrité de la membrane plasmique et l'acrosome, les faibles résultats obtenus avec le dilueur à base de 6%LIPO pourraient s'expliquer par une durée totale d'équilibration (une heure et 30 min dans notre protocole) insuffisante aux liposomes pour atteindre l'optimum de leur action cryoprotectrice.

En effet, RÖPKE et al. (2011) [34] ont montré que les liposomes requièrent un temps plus long (6H comme minimum) d'incubation avec la semence à 4°C (optimum de température) pour assurer une cryoprotection optimale des spermatozoïdes. Le GUILLOU et al. (2015) [37] ont démontré que les liposomes (de même composition que ceux utilisés dans notre étude) sont beaucoup plus lents que les LDL dans leur action cryoprotectrice du spermatozoïde bovin.

Contrairement au dilueur de congélation, il a été montré dans une étude précédente (Voir Chapitre 5) que le dilueur de réfrigération à base de 2% de liposomes est capable de préserver les caractéristiques d'intégrité spermatique avec autant d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL). Ceci s'expliquerait par le fait que la

réfrigération à 4°C permet aux liposomes de rester plus longtemps en incubation à 4°C avec les spermatozoïdes et atteindre ainsi une action protectrice optimale. Un protocole de congélation avec une durée d'équilibration (4°C) de 1.5h ne permettrait pas à ces cryoprotecteurs d'atteindre cet optimum.

Il serait donc intéressant d'explorer cet aspect dans une autre expérimentation en allongeant le temps d'équilibration (4°C) jusqu'à 6H afin d'optimiser l'action cryoprotectrice des liposomes.

Néanmoins, cette différence significative observée entre 6%LIPO et 6%LDL pour l'intégrité acrosomique surtout ne semble pas être incompatible avec la fertilité *in vivo*, car 4 chiennes ont été gestantes et ont mis bas suite à l'insémination artificielle avec un dilueur à base de 6% de liposomes.

De plus, les valeurs d'intégrité acrosomique obtenues après décongélation avec le dilueur à base de 6%LIPO étaient meilleures que celle rapportées en semence bovine [190] à la concentration optimale des liposomes (66.5 ± 2.4 vs. 58.56 ± 8.86), même si le protocole est différent.

6.4.3. Fertilité *in-vivo*

Pour évaluer l'efficacité du dilueur à base de 6%LIPO, un essai préliminaire de fertilité a été effectué suite à des inséminations artificielles. Sur les 6 chiennes inséminées, 4 ont été gestantes et ont mené à terme leurs gestations jusqu'à la mise bas de chiots vivants et en bonne santé.

Certes, ce test de fertilité n'a pas de puissance statistique permettant de conclure à un taux de gestation et de mise-bas significatif. Cependant, il permet de confirmer que la congélation de la semence canine dans un dilueur à base de 6% de liposomes n'interfère pas avec la fertilité *in vivo*.

Aucune autre conclusion particulière ne peut être tirée à cause du faible nombre de chiennes utilisées dans cet essai préliminaire. Un test plus large est requis pour pouvoir comparer le taux de gestation entre ce dilueur expérimental et le milieu de référence.

6.4.4. Interactions avec la membrane biomimétique

Les observations de cette expérimentation sont similaires à celles relatives à la réfrigération de la semence canine (dilueur à base de 2% de liposomes) probablement parce que l'action protectrice des liposomes comme des LDL s'effectue notamment lors du refroidissement (4°C) qui est une étape commune dans les deux modes de conservation (réfrigération et congélation).

Les LDL ajoutés seules en sous phase interagissent avec l'hémi-membrane suggérant un mécanisme de protection direct par incorporation au sein de la membrane plasmique du spermatozoïde. Ceci est en accord avec les études précédentes en semence ovine [14], équine [211] et bovine [15].

Comme dans la réfrigération, l'absence d'interaction des liposomes avec la membrane biomimétique pourrait s'expliquer par la composition lipidique des liposomes utilisés dans notre étude qui est en faveur de phospholipides neutres (PC et PE du JO) n'ayant pas de propriété fusigène avec la membrane contrairement aux PL chargés négativement tels que la PS [109] ou le PG [34].

Nos observations concernant le mode de protection spermatique par les liposomes, agissant sans incorporation au sein de la membrane, semblent en accord avec les deux hypothèses mécanistiques expliquées précédemment en l'occurrence la protection par revêtement [189] et la protection indirecte par interaction avec les constituants (Lipides, protéines, ions) du dilueur [108 ; 36].

La différence de mécanismes de protection entre les LDL et les liposomes pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que les liposomes sont composés exclusivement de PL alors que les LDL contiennent des protéines qui solubilisent les PL et les mettent en contact étroit avec la membrane plasmique [108 ; 14].

Le liquide prostatique n'a interagi ni avec l'hémi-membrane de Langmuir-Blodgett ni avec les LDL et les liposomes. Dans les conditions de notre expérimentation, aucune conclusion ne saurait être tirée quant à la séquestration d'éventuelles protéines liantes. D'autres études sont requises pour de plus amples explorations (interactions et analyse biomoléculaires) des différentes fractions du sperme canin.

En résumé, les liposomes (6%) semblent être une alternative viable aux lipoprotéines de basse densité (6%LDL) dans la congélation de la semence canine. Cependant, le protocole de congélation (temps d'équilibration) doit être amélioré afin d'optimiser leur action cryoprotectrice. Les LDL semblent protéger le spermatozoïde par incorporation dans la membrane plasmique alors que les liposomes probablement sans incorporation.

CHAPITRE 7

EFFETS DU TEMPS D'EQUILIBRATION SUR LA QUALITE SPERMATIQUE ET INTERACTIONS AVEC LES CRYOPROTECTEURS (LDL, LIPO, PJO)

7.1. Introduction

L'équilibration est une étape essentielle dans le processus de congélation du sperme. Elle correspond à l'addition du dilueur contenant le cryo-protecteur (glycérol) et la mise à 4°C de la semence diluée. Elle permet le remaniement, la stabilisation et l'adaptation, de la membrane cytoplasmique du spermatozoïde aux basses températures en préparation à la congélation [153].

Dans le cadre de la congélation de la semence canine, l'addition du glycérol se fait soit, conventionnellement en une seule étape suivie d'une mise à +4°C pendant 1 à 2 heures selon la plupart des protocoles publiés [142 ; 141 ; 222 ; 223] soit en deux étapes pendant un temps global d'1 heure et demi à 2 heures selon d'autres [45 ; 155 ; 156 ; 222 ; 157].

Malheureusement, il y a très peu d'études scientifiques ayant fait varier le temps d'équilibration proprement dit chez le chien, exceptés les essais de congélation différée après une étape de réfrigération pouvant aller jusqu'à 48 heures [153 ; 158 ; 159].

ENGLAND avait trouvé que le meilleur temps d'équilibration chez le chien est de 4H [147]. IGNA et ses collaborateurs [162] ont comparé en 2008 plusieurs durées d'équilibration dans la congélation du sperme canin allant de 30mn jusqu'à 5heures et ont trouvé que le meilleur temps était de 4H.

LEITE et ses ses collaborateurs [161] ont décrit aussi en 2010 une durée optimale d'équilibration de 4H dans la congélation du sperme bovin.

L'effet protecteur du phénomène d'équilibration à l'égard du spermatozoïde ne se limite pas à la température de (+4°C) en soi ou à l'action du cryoprotecteur (glycérol), mais implique également les agents stabilisants membranaires contenus

dans les dilueurs de congélation notamment le jaune d'œuf et particulièrement les lipoprotéines de basse densité « LDL ».

Les milieux de congélation à base de LDL donnent de bons résultats dans la congélation du sperme de taureau [13 ; 15], d'étalon [19] et de chien [17 ; 18 ; 224]. Cependant, comme mentionné précédemment (dans les chapitres précédents), les LDL posent actuellement divers problèmes, d'ordre technologique, car ne pouvant passer à une échelle de production industrielle et d'ordre bio-sanitaire puisque elles ne peuvent être stérilisées.

Des études récentes ont montré la possibilité de substituer LDL par les liposomes dans la congélation de la semence équine [36] et bovine [37]. Il a été aussi montré dans une étude antérieure (Voir chapitre 5) l'efficacité des liposomes à remplacer les LDL dans un dilueur de réfrigération (2% de liposomes) de la semence canine, cependant dans les travaux sur le dilueur de congélation à base de 6% de liposomes, les résultats d'intégrité spermatique (notamment l'acrosome) étaient légèrement inférieurs à ceux obtenus par les LDL (Voir chapitre 6). L'hypothèse explicative d'une durée d'incubation (temps d'équilibration) insuffisante (1.5h) à atteindre une action cryoprotectrice optimale des liposomes a été émise. Il serait donc intéressant d'allonger le temps d'équilibration et étudier son effet sur l'efficacité du dilueur à base de 6% de liposomes.

En plus des liposomes, le plasma du jaune d'œuf (PJO) pourrait représenter une alternative intéressante aux LDL. Il est obtenu à partir du jaune d'œuf entier par un procédé de fractionnement très simple décrit par MCBEE and COTTERILL en 1979 [29] et transposé à l'échelle industrielle en 1990 dont brevet Européen enregistré sous le numéro 0430757A1 [181]. De plus, le plasma est parfaitement compatible avec une stérilisation par ionisation [30]. Le plasma de jaune d'œuf a été récemment utilisé pour remplacer le JO entier dans un dilueur de congélation équin (INRA 96®, IMV-Technologies, l'Aigle, France) [30] et dans le dilueur classique de congélation canin [31]. Cependant, le plasma n'a jamais été tenté en substitution aux LDL chez le chien.

Le présent travail vise deux objectifs. Le premier est d'évaluer l'effet de la variation du temps d'équilibration sur les paramètres de mobilité du sperme canin congelé

dans trois milieux différents (LDL, LIPO et PJO). Le second est d'évaluer les caractéristiques fonctionnels du sperme de chien congelé dans les mêmes dilueurs cités précédemment après avoir déterminé le meilleur temps d'équilibration.

7.2. Matériels et Méthodes

7.2.1. Expérience 1 : Effets de différents temps d'équilibration au cours du phénomène de congélation de la semence canine : «*Etude des paramètres de mobilité spermatique*».

7.2.1.1. Prélèvement de la semence

Vingt cinq éjaculats ont été collectés à partir de 7 chiens âgés entre 2 et 7 ans (6 Beagle du département de pathologie de la reproduction, Oniris-Nantes) et 1 Malinois appartenant à un particulier). Les prélèvements ont été effectués toutes les 48 heures minimum et par le même opérateur. Les chiens étaient prélevés par stimulation manuelle en présence d'une chienne en chaleur, comme décrit dans les expérimentations précédentes (Voir chapitres 5 et 6).

7.2.1.2. Evaluation initiale de la qualité spermatique

Chaque éjaculat (fraction spermatique) a été évalué (motilité massale et concentration des spz) suite à sa collecte pour sa qualité et son aptitude à la congélation. La motilité massale a été appréciée par microscopie selon l'échelle de MILOVANOV et la concentration a été mesurée par un photomètre calibré pour le sperme canin (SpermaCu®, Minitube, Tiefenbach, Germany) tel que précédemment décrit (Voir § 5.2.1.1). Seulement les éjaculats ayant une concentration minimale de 200×10^6 spz/ml et une motilité massale de 4 et plus ont été inclus dans cette étude.

7.2.1.3. Préparation des dilueurs

7.2.1.3.1. Préparation des LDL et des liposomes

L'extraction des LDL a été effectuée selon la technique décrite par MOUSSA *et al.* (2002) [13], protégée par brevet sous le numéro (0100292) et déjà décrite dans le

chapitre 4 (Voir § 4.4.2, Figure 4.3). Les liposomes ont été produits selon la technique rapportée par Le GUILLOU *et al.* (2015) [37] et déjà décrite dans le chapitre 5 (Voir § 5.2.1.2.2).

7.2.1.3.2. Extraction du plasma de jaune d'œuf

Le fractionnement du Jaune d'œuf en granules et plasma se fait selon la technique publiée par MCBEE and COTTERILL (1984) [29] et décrite précédemment (Voir § 4.3, Figure 4.3).

7.2.1.3.3. Préparation des dilueurs

Trois milieux de congélation ont été préparés à partir d'une base commune additionnée soit de 6 % de LDL (témoin), soit 6% liposomes et en fin le troisième dilueur est à base de plasma du jaune d'œuf à la concentration de 40% (car équivalent de 20% de JO) (Tableau 7.1).

Tableau 7.1 : Composition des différents dilueurs pour la congélation de la semence canine. (QSP 1L).

	LDL 6% (Canifreeze ®)	Plasma du JO 40%	Liposomes 6%
Composé	Quantité		
Tris (g)	30,26	30,26	30,26
Acide citrique (g)	17,00	17,00	17,00
Fructose (g)	12,50	12,50	12,50
Glycérol (ml)	32,00	32,00	32,00
Gluthation (g)	/	/	1,44
Pénicilline-Streptomycine (UI/g)	10 ⁶ -1	/	/
Pénicilline G sodique (g)	/	0,695	/
Streptomycine sulfate (g)	/	1,00	0,10
Enrofloxacin à 10% (ml)	/	/	0,80
LDL (g)	165	/	/
Plasma du JO (L)	/	0,400	/
Poudre de phospholipides (g)	/	/	5,46
Eau bi-distillée	QSP 1L		

7.2.1.4.2. Equilibration

Les 12 cryotubes sont ensuite placés dans une vitrine réfrigérante à + 4°C.

A l'issue de chacun des 4 temps d'équilibration testés (30 mn, 1H, 3H et 6H), les paillettes 0.25 ml (IMV Technologies, Aigles, France) correspondantes sont remplies manuellement avec les différents milieux testés et sont ensuite bouchées avec de la poudre d'alcool polyvinylique. Les paillettes sont posées horizontalement sur une rampe métallique à + 4°C pendant 30 mn avant la congélation.

7.2.1.4.3. Congélation-décongélation:

Les paillettes ont été congelées en vapeur d'azote (4 cm au dessus du niveau liquidien de l'azote) pendant 10 min puis immergées et enfin stockées en container d'azote pendant 24H. Pour la décongélation, les paillettes ont été plongées directement dans un bain marie (37°C) pendant 30 secondes (Voir illustrations à l'annexe 05). Chaque lot a été analysé 10 min après. Avant l'analyse, la semence a été diluée jusqu'à la concentration de $(25 \times 10^6 \text{ spz/ml})$ dans la solution EasyBuffer B® (IMV-Technologies, Aigle, France).

7.2.1.5. Analyse automatisée de la semence décongelée

Les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes ont été analysées immédiatement après dilution avant la congélation (T0) et 10 min après décongélation au moyen d'un analyseur Hamilton Thorn system (HTM-IVOS version 14.0; Hamilton Thorne, Inc. Beverly, MA, USA) et d'une chambre d'analyse de type (Leja, 20µm Products B.V., Nieuw Venne, Pays-bas). Les paramètres de mobilité (MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP et ALH) ont été mesurés tel que décrit précédemment (Voir § 5.2.1.4 & annexe 06).

7.2.1.6. Analyse statistique

Pour l'expérience 1, nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes (lme) pour analyser les effets du temps (durée d'équilibration) et des dilueurs sur chaque paramètre de mobilité à part. Les interactions du temps et des dilueurs sur la mobilité ont été intégrées dans ce modèle avec le terme « Time*Extender ». Ce

modèle statistique a déjà été décrit précédemment (Voir § 5.2.1.5). La significativité a été fixée à $P < 0.05$ et les résultats sont donnés en moyennes plus ou moins erreur standard (Moy \pm SEM).

7.2.2. Expérience 2 : Comparaison de trois milieux à 6H d'équilibration dans la congélation du sperme canin : « Etude des paramètres fonctionnels des spermatozoïdes ».

12 éjaculats ont été récoltés à partir de 6 chiens Beagle appartenant au Service de Pathologie de la Reproduction d'Oniris, Nantes (âgés entre 2 et 7 ans).

L'évaluation initiale, la dilution et la congélation de la semence sont réalisées de la même manière que pour la première expérience à l'exception du temps d'équilibration qui a été fixé à 6 heures suite aux résultats de la première expérience.

7.2.2.1. Evaluation des caractéristiques fonctionnelles et de l'intégrité des spermatozoïdes

Pour les paramètres d'intégrité spermatique, quatre (04) tests ont été réalisés comme décrits précédemment et nous ont permis d'évaluer l'intégrité acrosomique par le test à la FITC-PSA (Voir § 5.2.2.1), l'intégrité de la membrane plasmique par le test hypo-osmotique (Voir § 5.2.2.2) et le test au SYBR14/Iodure de propidium (Voir § 5.2.2.3) et finalement l'intégrité d'ADN en utilisant le test à l'Acridine Orange (Voir § 5.2.2.4).

Les caractéristiques d'intégrité ont été évaluées à trois moments différents :

- Juste après dilution avant la mise en équilibration (T0),
- à la fin des 6 heures d'équilibration (T1),
- 10 minutes après décongélation (T2).

7.2.2.2. Analyse statistique

Pour l'expérience 2, en utilisant le logiciel « R », nous avons dans un premier temps appliqué un modèle linéaire à effet mixte (lme, voir § 5.2.1.5) pour objectiver

l'existence ou non d'une interaction entre les trois milieux de congélation étudiés et les trois étapes d'analyses durant le processus de congélation/décongélation.

Ensuite nous avons utilisé une analyse de variances « ANOVA » à mesure répétée en comparant entre eux les trois milieux et ce pour chaque test fonctionnel indépendamment. Cette ANOVA a été complétée par une analyse en composantes principales (ACP, voir § 6.2.2.1) pour étudier les variations entre les trois milieux (LDL 6%, Liposomes 6% et Plasma de jaune d'œuf) et les quatre tests fonctionnels (HOS, FITC, SYBR et Acridine orange) simultanément afin de mieux interpréter les éventuelles différences significatives entre les milieux.

La significativité a été fixée à $P < 0.05$ et les résultats sont donnés en moyennes plus ou moins l'écart type (MOY \pm ET).

7.3. Résultats

7.3.1. Expérience 1 : Etude des paramètres de mobilité spermatique.

Sur les 25 éjaculats prélevés, 20 ont été exploités pour cette étude et 5 exclus.

Les paramètres de mobilité de la semence fraîche sont présentés dans le tableau 7.2.

Tableau 7.2: Etude des différents paramètres de mobilité de la semence fraîche (T0) (n=20).

Concentration (x10⁶spz/ml)	MOT (%)	PMOT (%)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	VAP (μm/s)	ALH (μm)
349,1	76,40	63,30	184,32	110,78	123,66	7,71
$\pm 123,16$	$\pm 11,77$	$\pm 16,17$	$\pm 22,87$	$\pm 23,69$	$\pm 23,27$	$\pm 0,66$

Aucune interaction significative n'a été démontrée lors des tests statistiques. C'est pour cela qu'aucun couple TEMPS/MILIEU ne sera retenu.

7.3.1.1. Mobilité totale (Pourcentage des spermatozoïdes mobiles)

7.3.1.1.1. Comparaison des trois milieux de congélation pour chaque temps d'équilibration

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes mobiles en fonction du milieu et de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 7.3. : Moyennes des pourcentages des spermatozoïdes mobiles après décongélation à T0 + 10 min

	30mn	1h	3h	6h
LDL 6%	32,3±2,53	42,7±2,28	53,1±2,73	58,9±3,02
LIPO 6%	28,4±2,08	36,1±2,28	46,1±2,91	54,4±3,24
PJO 40%	34,9±3,09	40,5±2,68	47,1±2,19	55,4±2,24

Pour chacune des quatre durées d'équilibration, nous allons voir s'il existe des différences significatives entre **les trois milieux**. Pour cela nous utilisons le modèle linéaire à effets mixtes et comparaisons multiples.

Tableau 7.4. : Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de **30 minutes** sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

30 min	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	NS		
PJO 40%	NS	p=0,01	

Pour une durée de 30 minutes d'équilibration on constate une différence significative entre le milieu liposomes à 6% et le milieu plasma de jaune d'œuf à 40% en faveur de ce dernier.

Tableau 7.5. : Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration **d'une heure** sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

1 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	NS		
PJO 40%	NS	NS	

Pour une durée d'une heure d'équilibration, les tests statistiques nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les milieux.

Tableau 7.6. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de **trois heures** sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

3 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	p=0,05**		
PJO 40%	p=0,05**	NS	

Pour une durée de trois heures d'équilibration il y a une différence très significative entre le milieu LDL à 6% et les deux autres milieux en faveur du milieu LDL à 6%.

Tableau 7.7. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de **six heures** sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

6 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	NS		
PJO 40%	NS	NS	

Pour une durée de six heures d'équilibration, les tests statistiques nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les milieux.

7.3.1.1.2. Comparaison des quatre temps d'équilibration pour chaque milieu de congélation

De la même manière, nous étudions pour chaque milieu l'existence ou non de différences significatives entre **les quatre durées d'équilibration**.

Tableau 7.8. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu LDL 6% sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

LDL 6%	30 min	1 h	3 h	6 h
30 min				
1 h	p<0,05**			
3 h	p<0,05***	p<0,05**		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	NS	

Pour le milieu LDL6%, on constate qu'il existe des différences significatives entre les différents temps d'équilibration sauf entre trois heures et six heures. La figure 7.1 nous montre que plus la durée d'équilibration augmente et meilleurs sont les

résultats de mobilité. La différence est hautement significative entre une heure et six heures en faveur de six heures.

Tableau 7.9. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu Liposomes 6% sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

LIPO 6%	30 min	1 h	3 h	6 h
30 min				
1 h	p=0,04			
3 h	p<0,05***	p<0,05**		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	p=0,02	

Pour le milieu Liposomes 6%, il existe des différences significatives entre toutes les durées d'équilibration. Remarquons que la différence est hautement significative entre une heure et six heures en faveur de cette dernière.

Tableau 7.10. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu Plasma de jaune d'œuf sur les pourcentages de mobilité après décongélation à T0 + 10 min

PJO 40%	30 MN	1 h	3 h	6 h
30 min				
1 h	NS			
3 h	p<0,05***	P=0,02		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	p<0,05**	

Pour le milieu plasma de jaune d'œuf, il n'y a pas de différence significative entre 30 minutes et une heure d'équilibration, par contre pour toutes les autres durées il

existe des différences significatives. Il y a encore des différences hautement significatives entre une heure et six heures d'équilibration en faveur de six heures.

7.3.1.2. Mobilité progressive (Pourcentage des spermatozoïdes progressifs)

7.3.1.2.1. Comparaison des trois milieux de congélation pour chaque temps d'équilibration

Les moyennes des pourcentages des spermatozoïdes progressifs en fonction du milieu et de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 7.11. Moyennes des pourcentages des spermatozoïdes progressifs après décongélation à T0 + 10 min

	30mn	1h	3h	6h
LDL 6%	22,8±2,06	31,9±2,30	39,4±2,77	45,7±3,29
LIPO 6%	19,7±1,79	26,4±2,28	34,5±3,13	39,5±4,11
PJO 40%	24,1±2,28	29,3±2,35	35,3±2,44	41,3±2,44

Pour chacune des quatre durées d'équilibration, nous allons voir s'il existe des différences significatives entre **les trois milieux**. Pour cela nous utilisons le modèle linéaire à effets mixtes et comparaisons multiples.

Tableau 7.12. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de 30 minutes sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

30 M	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	NS		
PJO 40%	NS	p=0,03	

Pour une durée de 30 minutes d'équilibration on constate une différence significative entre le milieu Liposomes 6% et le milieu plasma de jaune d'œuf en faveur de ce dernier.

Tableau 7.13. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration d'une heure sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

1 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	NS		
PJO 40%	NS	NS	

Pour une durée d'une heure d'équilibration, il n'y aucune différence significative entre les trois milieux.

Tableau 7.14. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de trois heures sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

3 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	p=0,01		
PJO 40%	p=0,04	NS	

Pour une durée de trois heures d'équilibration, on constate que le milieu LDL 6% permet d'avoir un pourcentage de mobilité progressive significativement supérieur à ceux des milieux Liposomes 6% et plasma de jaune d'œuf.

Tableau 7.15. Mise en évidence de différences significatives entre les trois milieux pour une durée d'équilibration de six heures sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

6 H	LDL 6%	LIPO 6%	PJO 40%
LDL 6%			
LIPO 6%	p=0,04		
PJO 40%	NS	NS	

Avec une durée d'équilibration de six heures, on remarque une différence significative entre le milieu Liposome 6% et le milieu LDL 6% en faveur de ce dernier.

7.3.1.2.2. Comparaison des quatre temps d'équilibration pour chaque milieu de congélation

Intéressons-nous à présent à l'existence ou non de différences significatives entre **les quatre durées d'équilibration** pour chaque milieu.

Tableau 8.16. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu LDL 6% sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

LDL 6%	30 MN	1 h	3 h	6 h
30 MN				
1 h	p<0,05**			
3 h	p<0,05***	p=0,02		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	NS	

Pour le milieu LDL 6%, on constate qu'il existe des différences significatives entre les différents temps d'équilibration sauf entre trois heures et six heures. La figure 7.1 nous montre que plus la durée d'équilibration n'augmente, meilleurs sont les

résultats de mobilité progressive. La différence est hautement significative entre une heure et six heures en faveur de cette dernière durée.

Tableau 7.17. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu Liposomes 6% sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

LIPO 6%	30 min	1 h	3 h	6 h
30 min				
1 h	NS			
3 h	p<0,05***	p=0,02		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	NS	

Pour le milieu Liposomes 6%, il existe des différences significatives entre toutes les durées d'équilibration sauf entre 30 minutes et une heure ou entre trois heures et six heures. Remarquons que la différence est hautement significative entre une heure et six heures en faveur de cette dernière.

Tableau 7.18. Mise en évidence de différences significatives entre les quatre temps d'équilibration pour le milieu Plasma de jaune d'œuf sur les pourcentages de mobilité progressive après décongélation à T0 + 10 min

Plasma	30 min	1 h	3 h	6 h
30 min				
1 h	NS			
3 h	p<0,05***	p=0,02		
6 h	p<0,05***	p<0,05***	p=0,03	

Pour le milieu plasma de jaune d'œuf, il n'y a pas de différence significative entre 30 minutes et une heure d'équilibration, par contre pour toutes les autres durées il

existe des différences significatives. Il y a encore une différence hautement significative entre une heure et six heures d'équilibration en faveur de six heures.

De tout ce qui précède et comme le montre bien la figure 7.1 on voit que pour la mobilité totale et progressive, qui demeure le paramètre reconnu comme étant déterminant dans les critères décisionnels de l'insémination artificielle, la durée optimale d'équilibration est six heures quel que soit le milieu (LDL 6%, Liposomes 6% ou plasma de jaune d'œuf).

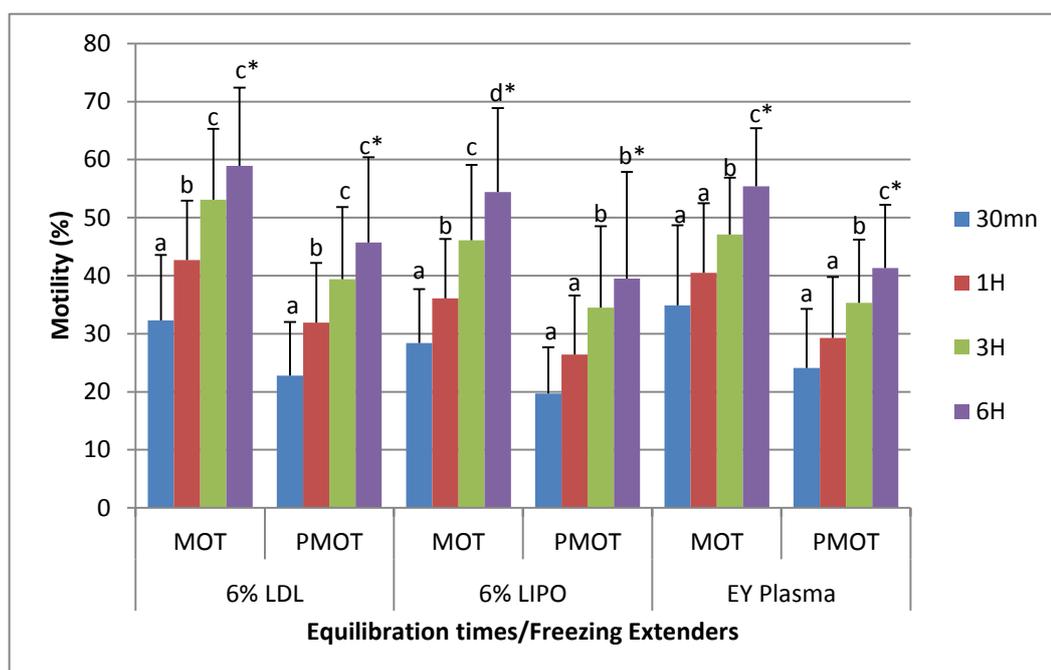


Figure 7.1: Effets des différents temps d'équilibration (30mn, 1H, 3H and 6H) sur les valeurs après décongélation de la mobilité totale (MOT) et progressive (PMOT) de la semence canine congelée dans trois dilueurs (LDL, LIPO, PJO).

“a, b, c, d” : des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$, *: $p < 0.001$ (n = 20).

Plus le temps d'équilibration augmente et meilleurs sont les résultats des pourcentages de spermatozoïdes mobiles et progressifs dans chacun des trois milieux étudiés. La durée d'équilibration de 6H diffère de façon hautement significative ($p < 0,001$) par rapport à 30 mn et une heure d'équilibration.

Pour cette durée de 6H d'équilibration, il n'existe pas de différence significative entre les trois milieux étudiés à l'exception d'une différence à la limite de la significativité ($p=0.04$) entre les liposomes et le milieu de référence (LDL) pour la mobilité progressive.

7.3.1.3. Les autres paramètres de mobilité (VCL, VSL, VAP et ALH)

Les valeurs des paramètres de vitesse après décongélation ne montrent pas de différences significatives entre les différentes durées d'équilibration étudiées (Tableau 7.19). Les résultats d'ALH ont tendance à diminuer en fonction du temps d'équilibration et ce pour les 3 milieux testés.

Tableau 7.19. Moyennes des paramètres de vitesse (VCL, VSL, VAP) et de l'amplitude latérale des mouvements de la tête (ALH) des spermatozoïdes canins congelés dans trois milieux différents (LDL, LIPO et Plasma du jaune d'oeuf) évalués dix minutes après décongélation.

		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
6%LDL	30mn	170,8 \pm 5,43 ^a	90,26 \pm 4,43 ^a	103,4 \pm 4,27 ^a	7,55 \pm 0,17 ^a
	1H	168,0 \pm 4,76 ^a	93,77 \pm 4,63 ^{ab}	106,1 \pm 4,27 ^{ab}	7,30 \pm 0,16 ^{ab}
	3H	164,2 \pm 4,81 ^a	95,92 \pm 4,38 ^{ab}	109,4 \pm 4,11 ^b	7,08 \pm 0,17 ^b
	6H	160,7 \pm 4,11 ^a	98,37 \pm 4,63 ^b	110,0 \pm 4,45 ^b	6,90 \pm 0,13 ^b
6%LIPO	30mn	169,6 \pm 5,97 ^a	87,43 \pm 5,12 ^a	101,0 \pm 4,90 ^a	7,49 \pm 0,19 ^a
	1H	169,0 \pm 6,04 ^a	91,33 \pm 5,46 ^a	104,3 \pm 5,25 ^a	7,34 \pm 0,18 ^{ac}
	3H	155,4 \pm 4,76 ^b	92,50 \pm 5,17 ^a	104,2 \pm 4,94 ^a	6,86 \pm 0,14 ^b
	6H	155,3 \pm 5,77 ^b	92,12 \pm 5,61 ^a	104,2 \pm 5,52 ^a	6,97 \pm 0,15 ^{bc}
EY Plasma	30mn	156,4 \pm 3,00 ^a	83,39 \pm 3,56 ^a	95,90 \pm 3,22 ^a	7,07 \pm 0,12 ^a
	1H	155,7 \pm 3,64 ^a	89,53 \pm 4,07 ^{ab}	101,3 \pm 3,78 ^a	6,89 \pm 0,14 ^a
	3H	156,0 \pm 4,58 ^a	90,28 \pm 3,44 ^{ab}	101,9 \pm 3,44 ^a	6,79 \pm 0,15 ^a
	6H	155,1 \pm 4,32 ^a	91,39 \pm 3,67 ^b	103,9 \pm 3,42 ^b	6,85 \pm 0,13 ^a

Dans la même colonne et pour le même dilueur, des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$, (n = 20).

7.3.2. Expérience 2 : Etude des paramètres d'intégrité spermatique.

Sur les 12 éjaculats prélevés, 10 ont été exploités pour cette étude et deux éliminés.

Aucune interaction entre les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation et les trois milieux de conservation n'a été démontrée statistiquement. Les trois milieux réagissent de la même manière suivant les trois étapes étudiées (après dilution, après 6H d'équilibration et après décongélation).

7.3.2.1. Résultats présentés par tests d'intégrité spermatique

7.3.2.1.1. Test hypo-osmotique (HOS)

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à membrane flagellaire intègre obtenues par le test de HOS pour les trois milieux et les trois étapes du processus de congélation/décongélation sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 7.20. Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à membrane flagellaire intègre obtenues par le test de HOS pour les trois milieux dans les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation

	Post-dilution	Post-équilibration	Post-Décongélation
LDL 6%	85 ± 5,73	82,2 ± 5,14	62,6 ± 13,1
LIPO 6%	80,9 ± 9,17	80 ± 5,36	58 ± 11,7
PJO 40%	85,1 ± 4,49	81,9 ± 4,84	64,4 ± 11,8

7.3.2.1.2. Test FITC PSA

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à acrosome intègre obtenues par le test FITC PSA pour les trois milieux et les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 8.21. Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à acrosome intègre obtenues par le test FITC PSA pour les trois milieux dans les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation

	Post-dilution	Post- équilibre	Post- Décongélation
LDL 6%	83,6 ± 3,14	81,2 ± 3,73	79,4 ± 5,21
LIPO 6%	78,7 ± 3,72	75,3 ± 4,15	74 ± 6,08
PJO 40%	81,5 ± 3,34	80 ± 3,50	76,2 ± 4,53

7.3.2.1.3. Test SYBR 14/Iodure de propidium

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes vivants obtenues par le test SYBR 14 pour les trois milieux et les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 8.22. Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes vivants obtenues par le test SYBR 14 pour les trois milieux dans les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation

	Post-dilution	Post- équilibre	Post- Décongélation
LDL 6%	81,5 ± 4,21	75,7 ± 7,43	63,6 ± 7,22
LIPO 6%	78,3 ± 3,50	73,8 ± 7,38	57,9 ± 7,89
PJO 40%	81,6 ± 4,60	75,1 ± 6,94	64,8 ± 5,30

7.3.2.1.4. Test Acridine Orange

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à ADN natif obtenues par le test Acridine Orange pour les trois milieux et les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 8.23. Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes à ADN natif obtenues par le test Acridine Orange pour les trois milieux dans les trois étapes du phénomène de congélation/décongélation

	Post-dilution	Post-équilibre	Post-Décongélation
LDL 6%	99,5 ± 0,82	99,1 ± 1,07	98,9 ± 1,33
LIPO 6%	99,4 ± 1,00	98,7 ± 1,25	98,5 ± 1,80
PJO 40%	99,6 ± 0,75	98,7 ± 1,62	98,7 ± 1,42

7.3.2.2. Résultats présentés par temps d'évaluation

7.3.2.2.1. Caractéristiques fonctionnelles évaluées après dilution (T0)

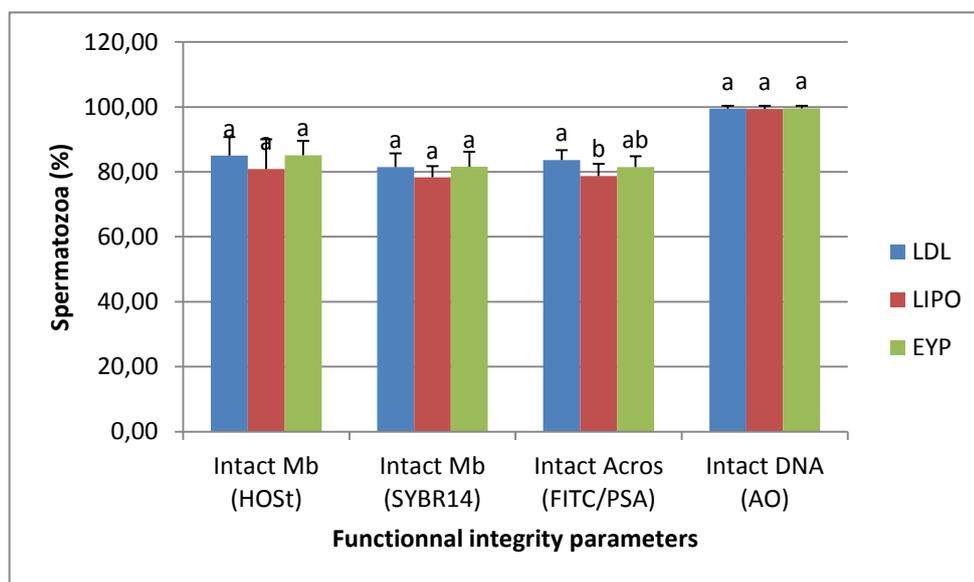


Figure 7.2. Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN après dilution d'une semence canine congelée dans trois dilueurs. "a, b": des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$. (n=10)

Pour les tests fonctionnels HOST, SYBER14/PI et AO, il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les trois milieux étudiés. Cependant, le test FITC-PSA montre que le milieu LDL est significativement supérieur ($p < 0,05$) au milieu à base de liposomes ($83,6 \pm 3,14$ vs $78,7 \pm 3,72$ respectivement).

7.3.2.2.2. Caractéristiques fonctionnelles évaluées après équilibration (6H)

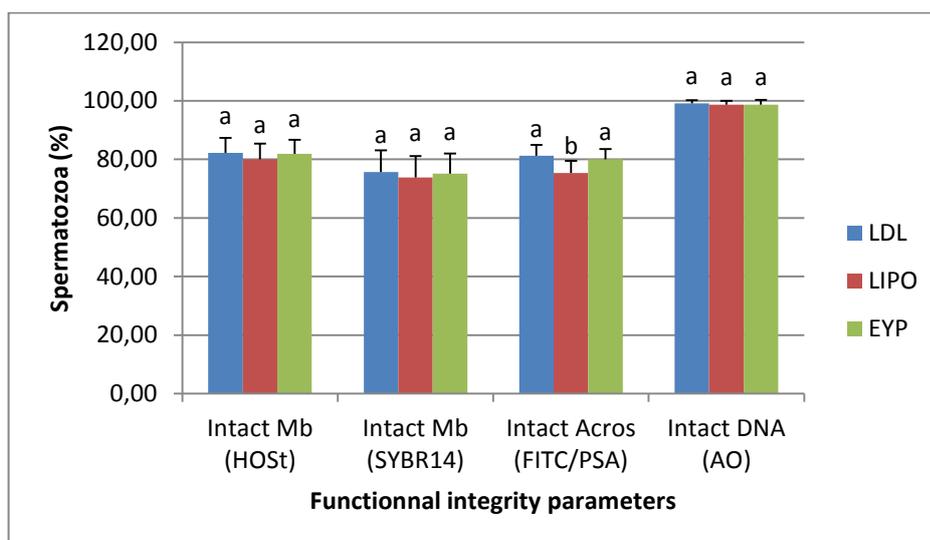


Figure 7.3. Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN après 6H d'équilibration d'une semence canine congelée dans trois dilueurs. "a, b": des letters différentes signifient une difference significative à $p < 0.05$. (n=10)

Il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les 3 milieux étudiés pour les tests HOST, SYBER14/IP et l'AO après 6H d'équilibration. Par contre, le test FITC-PSA montre une différence significative ($p < 0,05$) entre le milieu à base de liposomes et les deux autres milieux ($75,3 \pm 4,15$ vs $81,2 \pm 3,73$ vs $80 \pm 3,50$ pour LIPO, LDL et PJO respectivement).

7.3.2.2.3. Caractéristiques fonctionnelles évaluées après décongélation

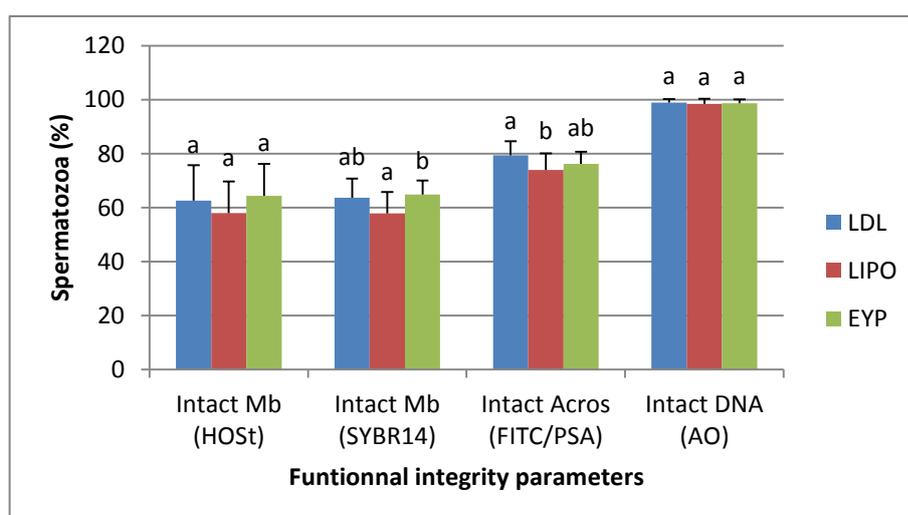


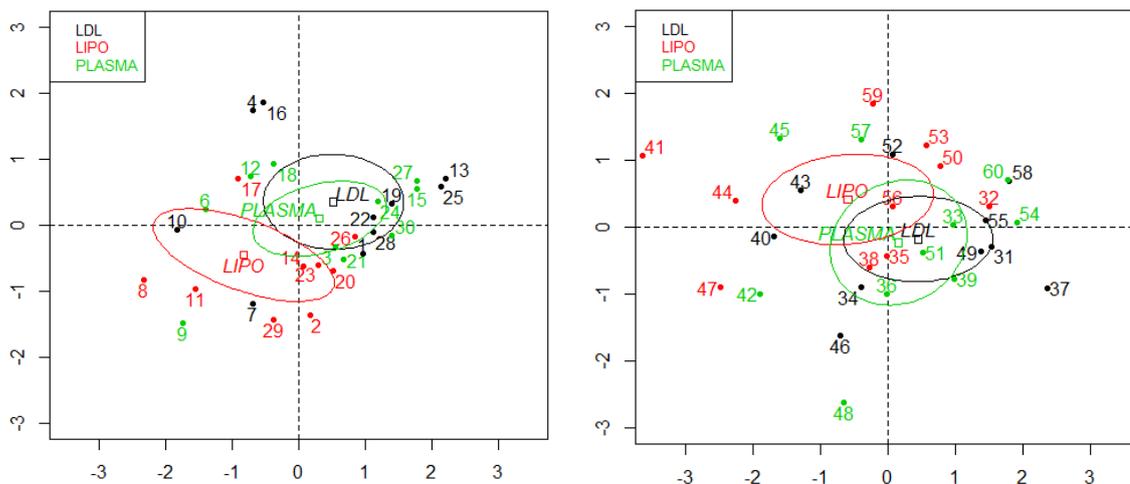
Figure 7.4. Intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN après décongélation d'une semence canine congelée dans trois dilueurs. "a, b": des letters différentes signifient une difference significative à $p < 0.05$. (n=10)

Il n'existe pas de différence statistiquement significative ($p > 0,05$) entre les 3 milieux testés pour les tests hypo-osmotique et l'AO après décongélation. Cependant, elle est statistiquement significative pour le SYBER14/IP ($p < 0,05$) entre le milieu à base de liposomes et le milieu à base de plasma du jaune d'œuf ($57,9 \pm 7,89$ vs $64,8 \pm 5,30$ respectivement) et pour le test FITC-PSA entre le milieu liposomes et le milieu de référence (LDL) ($74 \pm 6,08$ vs $79,4 \pm 5,21$ respectivement).

7.3.2.2.4. Etude de la variation du statut fonctionnel entre les milieux par combinaison simultanée des quatre tests d'intégrité

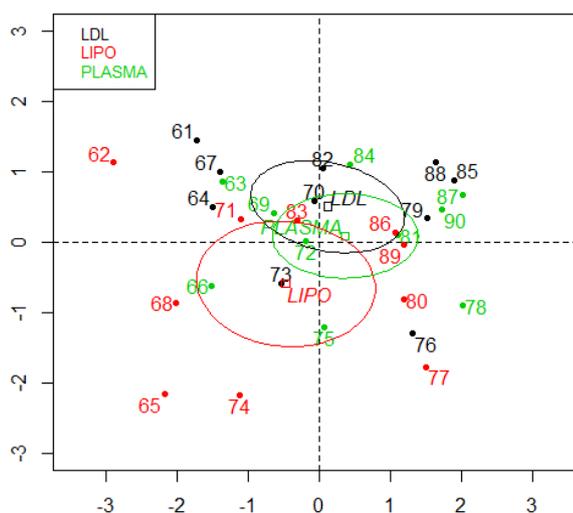
Au-delà des différences significatives que nous avons pu constater à l'application du modèle linéaire, qui prenait en compte les quatre tests de fonctionnalité de manière indépendante, nous avons comparé ces quatre mêmes tests avec les trois milieux en même temps grâce à une ACP en prenant comme variables actives les quatre tests (HOS, FITC, SYBR et Acridine orange) et comme variable illustrative le milieu (LDL 6%, Liposomes 6% et Plasma de jaune d'œuf).

La figure 7.5 montre que l'intersection des ellipses de confiance à 95% n'est pas vide. Nous pouvons donc considérer qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois milieux et ce après la dilution, après six heures d'équilibration et après décongélation.



(5a) : Après dilution

(5b) : Après six heures d'équilibration



(5c) : 10mn après décongélation

Figure 7.5. Le premier plan de l'analyse en composantes principale (ACP). Représentation schématique des ellipses de confiance de l'analyse à composante principale pour les trois milieux et les quatre tests (HOS_t, SYBR14/PI, FITC-PSA et Acridine-Orange) d'évaluation de la fonctionnalité du spermatozoïde canin juste après dilution (5a), après six heures d'équilibration (5b) et après décongélation (5c).

7.4. Discussion

Dans cette section, nous allons présenter la discussion des résultats des paramètres de mobilité (expérience1) et d'intégrité (expérience1) spermatique.

7.4.1. Etude des effets du temps d'équilibration sur les paramètres de mobilité après décongélation

Parmi les 25 éjaculats prélevés dans la première expérience, 20 ont été retenus pour l'étude et 5 exclus. Deux sont éliminés avant congélation à cause d'une faible mobilité massale, et d'un pourcentage des spermatozoïdes mobiles inférieur à 60% et trois en raison d'une faible concentration (inférieure à 200×10^6 spz/ml).

7.4.1.1. Pourcentage de spermatozoïdes mobiles et progressifs.

La durée d'équilibration de 6 heures s'est avérée la meilleure car elle a donné les plus fortes proportions de spermatozoïdes mobiles et progressifs après décongélation. La motilité totale est largement supérieure à la limite acceptable pour une insémination artificielle (30%).

Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles montre des différences hautement significatives ($p < 0,001$) entre la durée de six heures et celle d'une heure d'équilibration: (LDL 6% : 58,9% vs 42,7%; LIPO 6% : 54,4% vs 31,9%; PJO : 55,4% vs 40,5%). Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs après décongélation diffère également de manière significative entre six heures et une heure d'équilibration: (LDL 6% : 45,7% vs 31,9% ; LIPO 6% : 39,5% vs 26,4% % ; PJO : 41,3% vs 29,3%).

Une équilibration de 3 heures donne également une meilleure mobilité qu'une durée d'1 heure ($p < 0,05$), mais reste significativement plus faible que six heures ($p < 0,05$), sauf pour le milieu de référence (LDL) où trois heures semblent suffire pour donner un résultat comparable.

La durée d'une heure d'équilibration, semble être dans les conditions de notre étude légèrement insuffisante pour avoir une bonne mobilité spermatique en post-décongélation.

OKANO et ses collaborateurs [153] ont démontré en 2004 que lorsque les spermatozoïdes canins sont réfrigérés à +4°C dans un premier milieu ne contenant pas de glycérol (entre 1 et 3H), le temps d'équilibration dans un deuxième dilueur à base de glycérol ne sera pas long pour avoir une bonne qualité spermatique après décongélation. Inversement, si les spermatozoïdes ne sont pas préalablement réfrigérés, tel le cas de notre protocole, la durée d'une heure d'équilibration aura comme conséquence après décongélation une qualité spermatique insuffisante par forte proportion de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. Cela a été également observé sur le sperme du bélier [225].

En effet, une heure d'équilibration sans réfrigération préalable serait une période insuffisante pour décroître la température des spermatozoïdes jusqu'à +4°C avant congélation, ce qui les expose à un changement brusque de température expliquant la détérioration de la qualité spermatique [226], ou encore à une stabilité insuffisante des membranes.

Les plus mauvais résultats ($p < 0,05$), de pourcentages de spermatozoïdes mobiles et de progressifs sont obtenus pour une durée d'équilibration de 30 mn par rapport à 1 heure sauf pour le milieu à base de plasma de jaune d'œuf ($p > 0,05$). La durée de 30 mn d'équilibration serait insuffisante pour avoir une bonne qualité spermatique après décongélation [217].

En effet, il semble que le prolongement de la durée d'équilibration jusqu'à **3** heures et mieux encore **6** heures fait augmenter de manière significative les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et progressifs en post-décongélation. Ceci est en accord avec les résultats d'ENGLAND (1992) [147], d'IGNA et *al.* (2008) [162] et de LEITE et *al.* (2010) [161] qui ont décrit une durée d'équilibration optimale de 4H dans la congélation du sperme canin et bovin respectivement, sauf que contrairement aux résultats de cette expérience, IGNA et ses collaborateurs [162] ont rapporté une décroissance des paramètres de mobilité de la semence congelée-décongelée lorsque le temps d'équilibration a été étendu à 5 heures. Les autres auteurs n'avaient étudié des temps d'équilibration supérieurs à 4H.

L'amélioration des paramètres de mobilité après décongélation observée à l'allongement de la durée d'équilibration ne saurait s'expliquer par le temps de

pénétration du Cryo-protecteur (glycerole) à l'intérieur du spermatozoïde, car il a été clairement démontré que sa pénétration dans le milieu intracellulaire est rapide (15 – 30mn) et ne requiert pas plus que le temps minimal évalué dans cette étude [81 ; 153]. De plus, le glycérol, outre son action cryo-protectrice recherchée pendant la congélation, a un effet délétère et déstabilisant sur la membrane et la concentration employée dans les dilueurs serait le compromis entre son effet toxique et son action cryo-protectrice [81 ; 150].

L'effet bénéfique de l'équilibration à +4°C pourrait être attribué d'une part aux remaniements et réarrangements de la membrane cytoplasmique du spermatozoïde permettant son adaptation aux basses températures en augmentant sa résistance à la congélation « cryotolérance » [153], et d'autre part, à l'action protectrice des agents dits « stabilisants membranaires » contenus dans les dilueurs (LDL, liposomes et PJO).

7.4.1.2. Amplitude latérale des mouvements de la tête du spermatozoïde (ALH)

Ce paramètre cinétique (ALH) reflète l'hyper-activation des spermatozoïdes, mais aucun seuil ou intervalle de référence n'est établi. Il est exploitable par suivi d'évolution et non par interprétation d'une valeur isolée, différemment avant et après décongélation. Une amélioration des valeurs de ce paramètre après congélation possède une valeur prédictive de la gestation après insémination intra-utérine avec du sperme humain congelé [227 ; 228]. Par contre une décroissance de ces valeurs avant congélation pourrait signifier un retardement de l'hyper-activation et donc de la réaction acrosomique des spermatozoïdes ce qui est compatible avec la préservation de l'intégrité de l'acrosome.

En effet, les résultats de l'ALH obtenus au cours de ce travail, à T0 et à la fin de l'équilibration tendent à diminuer. Ceci pourrait traduire un effet bénéfique du prolongement du temps d'équilibration sur le retardement de l'hyper-activation des spermatozoïdes avant congélation et la préservation de leur intégrité acrosomique.

7.4.1.3. Les autres paramètres cinétiques de vitesse (VAP, VSL et VCL)

Les valeurs des paramètres de vitesse après décongélation ne montrent pas de différences significatives entre les différentes durées d'équilibration étudiées. Ces résultats sont discordants par rapport aux pourcentages de spermatozoïdes mobiles et progressifs que ce soit en comparant les durées d'équilibration ou les milieux étudiés entre eux. A l'état actuel de nos connaissances, ces paramètres ne semblent pas être exploitables pour l'évaluation de la qualité spermatique dans le cadre de la cryoconservation de la semence canine par manque de valeur prédictive sur les paramètres de la fertilité *in vivo* [78 ; 227 ; 228 ; 229].

7.4.2. Comparaison des paramètres de mobilité entre les trois milieux étudiés

Les différences dans les résultats de mobilité obtenus entre les trois milieux étudiés tiennent à leurs compositions qualitatives qui diffèrent par les agents de stabilisation membranaire (LDL, LIPO, PJO).

Ainsi, les milieux à base des LDL et du PJO ont des valeurs de mobilité très proches ce qui s'expliquerait par leur composition très proche car le plasma contient 85% des LDL et 15% de livétines [27]. Cependant, la légère supériorité des LDL s'expliquerait par un degré de pureté élevé de la fraction protectrice (97% selon MOUSA et *al.* (2002) [13] contrairement au plasma qui en plus des livétines pourrait contenir encore des éléments du jaune d'œuf capables d'inhiber la mobilité, en l'occurrence le reste des granules ou des lipoprotéines de haute densité (HDL) qui sont responsables de l'inhibition de la respiration des spermatozoïdes [10 ; 172 ; 173).

Par ailleurs, les liposomes semblent préserver la mobilité avec autant d'efficacité que les LDL même si leurs mécanismes de protection semblent différents. En plus, quels que soient les modes d'action des LDL et des liposomes, leur bénéfice semble augmenter avec l'allongement du temps de contact avec la membrane du spermatozoïde et cela de façon similaire entre elles d'où l'amélioration des paramètres de mobilité au fur et à mesure de la durée d'équilibration observée dans notre étude. Pour les liposomes, ce constat est en accord avec les travaux de RÖPKE et *al.* (2011) [34] sur le sperme bovin.

7.4.3. Comparaison des paramètres d'intégrité spermatique entre les trois milieux étudiés.

Parmi les 12 éjaculats récoltés dans l'expérience 2 concernant les paramètres d'intégrité, 2 ont été éliminés à cause de faibles notes de mobilité massale à la récolte et 10 ont été inclus dans cette étude.

7.4.3.1. Intégrité de la membrane plasmique du spermatozoïde (HOSt)

L'évaluation de l'intégrité membranaire flagellaire ou fonctionnelle par le test hypo-osmotique (HOSt) montre une absence de différence significative entre les trois milieux étudiés ($p > 0,05$) aux trois temps d'évaluation (après dilution, après 6H d'équilibration et 10mn après décongélation) ce qui semble démontrer que les 3 dilueurs (LDL, LIPO et PJO) préservent dans les mêmes proportions l'intégrité membranaire flagellaire des spermatozoïdes canins tout au long du processus de cryoconservation.

7.4.3.2. Intégrité de la membrane plasmique du spermatozoïde (SYBR14/PI)

Les résultats d'exploration de l'intégrité membranaire cytoplasmique ou structurale du spermatozoïde par le test (SYBR14/PI) ne montrent aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les 3 milieux testés (LDL, Liposomes et Plasma du jaune d'œuf) sauf une faible différence entre le dilueur à base de Liposomes et celui à base de plasma du jaune d'œuf ($p = 0,03$). Cependant, tout comme le plasma de jaune d'œuf, les liposomes ne montrent aucune différence significative avec le milieu de référence (LDL6%) et que cette différence entre les liposomes et le plasma pourrait s'expliquer statistiquement par la faible variance des valeurs de ce paramètre ayant causé la surestimation d'une faible différence. Donc, un autre test statistique est nécessaire pour trancher au sujet de la significativité de cette différence.

Le milieu à base de 40% de plasma de JO préserve l'intégrité membranaire dans les mêmes proportions et sans différence significative avec le milieu de référence (LDL 6%) (62,6 vs 64,4, $p < 0,05$) ; (63,6 vs 64,8, $p < 0,05$) respectivement pour HOSt et SYBR14/IP. Ceci s'expliquerait par le fait que le mécanisme de protection des

spermatozoïdes est identique entre ces deux milieux car attribué à la même fraction cryoprotectrice (LDL) même si cette dernière a un degré de pureté plus faible dans le plasma de jaune d'œuf [27].

7.4.3.3. Intégrité de l'acrosome

Pour la préservation de l'intégrité acrosomiale, la seule différence significative ($p < 0,05$) observée lors de la première approche statistique (Ime) est entre les liposomes et le milieu de référence (LDL). Néanmoins, cette différence était déjà présente juste après la dilution de la semence avant même que les dilueurs n'aient eu le temps d'agir et ne serait donc pas attribuable aux dilueurs. Elle pourrait aussi traduire une différence surestimée à cause d'une faible variance. Une autre analyse statistique s'impose donc avant de conclure à la significativité de cette différence.

Les résultats d'intégrité de l'acrosome (FITC/PSA) sont très proches de ceux obtenus en 2008 par BENCHARIF et ses collaborateurs (79,4% vs 81,3%) dans leurs travaux de mise au point du dilueur de congélation à base de 6% LDL (Canifreez®) qui est notre milieu de référence [17]. Cependant, ils diffèrent beaucoup à la hausse de ceux rapportés par DIAZ et *al.* (2014) pour les trois milieux étudiés « 79,4% vs 23,72% », « 76,2% vs 30,53% » et « 74% vs 20,54% » respectivement pour LDL, Plasma et liposomes. Ces différences de résultats reflètent probablement des différences de techniques d'analyses tout en précisant que la technique utilisée dans les travaux de ces auteurs (Easykit Viabilité-Acrosome analysé par Easycyte II Mini®, IMV-Biotechnologies, l'Aigle, France) n'est pas encore adaptée à la semence canine (validée pour semences bovine, équine et porcine), d'où éventuellement la variation des résultats. En effet, nous avons obtenu avec la même technique des résultats préliminaires (non publiés et non présentés dans cette thèse) discordants par rapport aux techniques classiques de colorations à fluorescence (Résultats non publiés).

7.4.3.4. Intégrité de l'ADN

Les taux de fragmentation d'ADN dans les milieux LDL, LIPO et PJO (1,1%, 1,5% et 1,3% respectivement) reflètent un excellent statut structural de la chromatine

suyant les critères de classification de la semence humaine [102] et sont largement en dessous de la moyenne (6,47%) associée à l'effet de la cryoconservation sur le sperme canin [103].

En plus, l'exploration de l'intégrité d'ADN n'a révélé aucune différence significative entre les trois milieux étudiés ($p > 0,05$) aux trois temps d'évaluation. Ceci signifierait que ces trois milieux préservent dans les mêmes proportions l'intégrité d'ADN des spermatozoïdes canins tout au long du processus de cryoconservation.

7.4.3.5. Variation du statut fonctionnel global entre les milieux

Devant les différences significatives apparues lors de l'application du modèle linéaire à effets mixte sur les paramètres d'intégrité spermatique entre les dilueurs étudiés et notamment entre le milieu à 6% de liposome et le milieu de référence (LDL 6%), Le recourir à une analyse statistique multivariée pour trancher sur la significativité de ces différences a été réalisé.

Ainsi, une analyse en composantes principales (ACP) a été entreprise pour comparer les trois milieux de congélation (LDL, LIPO, PJO) en combinant de façon simultanée les quatre tests fonctionnels. Cette approche statistique a permis donc d'apprécier de façon plus globale et plus significative la variation de la fonctionnalité spermatique entre les milieux étudiés. Ceci est justifié par le fait que chacun des quatre tests traduit une fonction du spermatozoïde nécessaire mais pas suffisante à son pouvoir fécondant. Une exploration globale et simultanée de toutes ces fonctions du spermatozoïde reflète (*in-vitro*) certainement mieux son pouvoir fécondant.

En effet, cette approche statistique a permis de démontrer que quelle que soit l'étape du phénomène de congélation-décongélation (après dilution, après 6h d'équilibration et 10 min après décongélation), il n'existe pas de différence significative entre les trois milieux étudiés (LDL, PJO et LIPO). Ceci signifie que ces derniers préservent de façon satisfaisante et similaire entre eux l'intégrité membranaire, acrosomique et d'ADN des spermatozoïdes canins tout au long du processus de congélation-décongélation (6h d'équilibration).

Pour les LDL et par conséquent le plasma de jaune d'œuf, les différents schémas mécanistique de protection spermatique ont été présentés en détails dans les chapitres précédents (Voir § 4.4.4 & § 6.4.4) et certaines hypothèses semblent être en accord avec l'incorporation des LDL au sein de la membrane plasmique tel que montré prédemment avec la balance de Langmuir (Voir § 6.3.4.1 & § 6.4.4) ainsi que par Le GUILLOU et ses collaborateurs (2015) [37] sur la semence bovine.

Pour les liposomes, les différentes hypothèses expliquant le mécanisme de protection du spermatozoïde ont été présentés dans les chapitres précédents (Voir § 4.5.5 & § 6.4.4) et concordent avec un mécanisme d'action s'opérant sans incorporation au sein de la membrane plasmique tel que suggéré par l'absence d'interaction avec la monocouche de la balance de Langmuir (Voir § 6.3.4.1 & § 6.4.4). Ce mode de protection est en accord avec les études récentes en semence équine [36] et bovine [37].

En résumé, le prolongement de la durée d'équilibration (Optimum 6H) peut améliorer les paramètres de mobilité et les caractéristiques d'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes canins congelés dans les milieux à base de liposomes et plasma du jaune d'œuf en substitution aux LDL.

Les liposomes (6%) et le plasma de jaune d'œuf (40%) semblent être deux alternatives très intéressantes aux LDL (6%) dans la congélation de la semence canine.

DISCUSSION GENERALE

Le jaune d'œuf entier a été utilisé depuis plus de 60 ans comme additif aux dilueurs de réfrigération et de congélation de la semence. Dans la conservation du sperme canin, il est le protecteur membranaire de choix contre le refroidissement. Cependant, en raison de ses multiples inconvénients apparus après toutes ses années d'utilisation (effet toxique des lipoprotéines de haute densité « HDL », risque de contamination microbiologique du dilueur), il fût remplacé avec succès par sa fraction cryoprotectrice représentée par les lipoprotéines de basse densité (LDL).

Les LDL sont extraites du JO selon le protocole publié par MOUSSA et ses collaborateurs en 2002 [13] et qui a fait l'objet d'un brevêt d'invention déposé conjointement par l'Ecole Nationale Vétérinaire et l'INRA de Nantes. Ce cryoprotecteur a prouvé son efficacité dans la réfrigération et la congélation de la semence bovine [13 ; 15 ; 16], ovine [20] et equine [19].

Chez le chien, les travaux de BENCHARIF et ses collaborateurs (2008) [17] ont permis de mettre au point un dilueur à base de 6% de LDL commercialisé sous nom de Canifreeze® (IMV-Technologies, Aigle, France). Lors de la congélation, ce dilueur a prouvé son efficacité à préserver les paramètres de mobilité et d'intégrité spermatique ainsi que la fertilité *in-vivo* [17] mais aussi dans le cadre de la réfrigération [18] de la semence canine avec un autre milieu qui est la Canixcell® commercialisé par (IMV-Technologies, Aigle, France)..

Malgré cette efficacité, les LDL se sont heurtées à quelques obstacles dans leur fabrication (protocole d'extraction non transposable à l'échelle industrielle) ainsi qu'à des contraintes sur le plan sécurité sanitaire (incompatibilité aux procédés de stérilisation). Leur substitution est devenue donc plus que nécessaire et la recherche d'éventuelles molécules de remplacement fût l'objet de beaucoup d'études dernièrement.

Dans le cadre d'essai de substitution des LDL, notre travail de thèse a pour objectif d'explorer l'intérêt de deux différentes molécules, à savoir les liposomes, assemblage moléculaire de phospholipides et le plasma du jaune d'œuf naturel.

Intérêt des liposomes dans la réfrigération et la congélation de la semence canine.

Contrairement aux LDL, les liposomes sont fabriqués de façon totalement industrielle selon un procédé basé essentiellement sur l'extrusion. Ils ont de nombreux avantages sur les LDL et peuvent être incorporés dans des dilueurs clairs, chimiquement définis, semi-synthétiques, facilement stérilisables et prêts à l'emploi.

Il a été démontré dans cette thèse que les liposomes à 2% lors de la réfrigération et à 6% lors de la congélation de la semence canine, sont capables de préserver avec autant d'efficacité que les LDL à 6% (dilueur de référence) les paramètres de mobilité et d'intégrité spermatique et qu'ils n'ont aucune incompatibilité avec la fertilité *in-vivo*.

Les liposomes à base de phospholipides de jaune d'œuf sont donc une alternative viable pour le remplacement des LDL dans les dilueurs de réfrigération et de congélation de la semence canine.

Cependant, nos premiers résultats avec le dilueur de congélation à base de 6% de liposomes ont suggéré que les liposomes n'étaient pas aussi efficaces que les LDL. L'objectif était alors d'optimiser ce nouveau dilueur pour améliorer son action cryoprotectrice.

Optimisation de l'action cryoprotectrice des liposomes : Agir sur le temps d'équilibration

Le jaune d'œuf entier semble être néfaste avec l'augmentation du temps d'équilibration sans doute à cause d'un contact prolongé avec les fractions toxiques (HDL) qui contrebalancent les bienfaits de sa fraction cryoprotectrice « LDL » [15]. Donc, les dilueurs classiques à base de JO étaient utilisés chez le chien avec une durée globale d'équilibration n'excédant généralement pas les 2h [153].

Après substitution des LDL au JO dans les dilueurs de congélation chez le chien [17 ; 224], le protocole de cryoconservation est resté inchangé observant une durée d'équilibration d'une heure et demi.

Ainsi, dans notre première expérimentation sur la congélation comparant les LDL et les liposomes (Voir chapitre 6) nous avons appliqué le protocole de congélation classique avec 1.5h d'équilibration et les liposomes se sont avérés relativement moins efficaces que les LDL pour certains traits de l'intégrité spermatique (intégrité membranaire et surtout de l'acrosome).

L'hypothèse explicative qui a été alors émise est, que la durée d'incubation des spermatozoïdes au contact des liposomes (4°C) était insuffisante à assurer une action cryoprotectrice optimale car il a été montré que les liposomes requièrent une durée plus longue (6 h comme minimum) d'incubation à 4°C avec le sperme bovin avant congélation pour avoir une action protectrice optimale [34] et qu'ils sont beaucoup plus lents que les LDL dans la protection du spermatozoïde bovin [37]. En effet, cette hypothèse a été vérifiée dans l'expérimentation ayant suivi en prolongeant la durée d'équilibration jusqu'à 3H (minimum) et 6H (maximum) ce qui a permis d'améliorer la qualité spermatique après décongélation (tous paramètres confondus) aussi bien pour les LDL que les liposomes (Voir Chapitre 7). Ce constat est en accord avec les études récemment publiées sur la congélation de la semence bovine dans des nouveaux dilueurs à base de liposomes [34 ; 37]. Nos résultats (Voir Chapitre 7) ont suggéré également que les liposomes ont une action plus lente que les LDL tel que rapporté récemment dans la congélation de la semence bovine [37].

Contrairement au protocole de congélation de la semence canine (Le temps d'équilibration), celui de la semence bovine n'a pas posé problème après substitution des LDL [15] et même des Liposomes [37] au JO car la durée globale d'équilibration avant congélation est classiquement d'environ 4 heures (3,4 heures). Ce temps est donc compatible avec une action optimale des LDL et des LIPO selon les résultats de notre étude sur la variation du temps d'équilibration (Voir Chapitre 7).

Par ailleurs, il est à signaler que, contrairement à la congélation (Voir Chapitre 6), nos résultats sur la réfrigération aux liposomes (Voir Chapitre 5) avaient montré d'emblée une efficacité comparable entre les dilueurs à base des LDL et des liposomes. Ce constat s'expliquerait par le fait que le protocole de réfrigération favorise une incubation prolongée dans le temps des spermatozoïdes avec les liposomes (à 4°C) en faveur d'une action de protection optimale contre le choc de refroidissement.

Possibilité d'optimisation de l'action cryoprotectrice des liposomes : Agir sur leur composition lipidique !

Il est bien connu que l'action (efficacité) des liposomes dépend des propriétés physiques et chimiques des lipides contenus dans les bicouches liposomiales [34 ; 104] et que la modulation de leur composition (formulation en phospholipides) pourrait optimiser leur action cryoprotectrice. Il est donc important de noter que nos résultats ne renseignent donc que sur la formulation en phospholipides des liposomes utilisés dans nos travaux (74% phosphatidylcholine « PC »; 13.1% phosphatidylethanolamine « PE »). Ainsi, il serait intéressant d'explorer les éventuels bénéfices d'autres formulations lipidiques incluant particulièrement les PL chargés négativement comme la phosphatidylsérine « PS » [7 ; 209] et le phosphatidylglycérol « PG » pour leurs propriétés fusigènes et leur capacité d'interagir avec les régions chargées de la membrane plasmique du spermatozoïde [34] et d'encapsuler (i.e. incorporer) du cholestérol dans les liposomes pour son action stabilisante [7 ; 35].

Intérêt du plasma naturel dans la congélation de la semence canine.

En plus des liposomes, il a été démontré sur la base des paramètres de mobilité et la fertilité spermatique *in vitro* que le plasma du jaune d'œuf naturel ajouté à la concentration de 40% est autant efficace que le dilueur de référence (LDL à 6%) dans la cryoconservation de la semence canine.

Nous avons montré la possibilité d'obtenir le même degré d'efficacité des LDL en réduisant leur procédé d'extraction analytique décrit par MOUSSA et al. (2002) [13] à sa première étape de fractionnement du JO en plasma et granules. Il s'agit d'un procédé très simple et rapide évoqué pour la première fois par BURLEY and COOK

(1961) [28] puis décrit en détail par MCBEE and COTTRILL (1979) [29], permettant d'obtenir le plasma à partir du JO entier à travers deux simples centrifugations.

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, mais 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 et l'intégrité spermatique après décongélation. Il serait donc sans intérêt pratique de purifier le plasma à travers une précipitation au sulfates d'ammonium (solution saturée à 40%) comme décrit par MOUSSA et al., (2002) [13]. Ceci présente un risque de contamination par les sulfates d'amminium si leur élimination par ultrafiltration à travers des membranes de dialyse ne se fait pas convenablement [31].

Il semble que la fraction la plus nocive du JO à éliminer est les granules contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL : pour High Density Lipoproteins), qui inhibent la respiration des spermatozoïdes [15]. Il est sans doute indispensable d'utiliser les LDL pures à des fins de recherche, mais il serait plus intéressant au plan pratique d'utiliser le PJO au lieu des LDL en ayant la même efficacité cryoprotectrice.

A propos de la concentration, d'emblée la concentration de 40% a été choisie dans l'expérimentation car elle correspond à la concentration de 20% de JO. En effet, 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 est aussi approximativement équivalente à la concentration (w/v) de 6% LDL exprimée en matière sèche selon les tables de composition du JO rapportées par ANTON et al. (2003) [177] (20%EY = 1.72g PL/100ml ; 8%LDL= 1.72g ; 6%LDL= 1.29g). Ainsi, nous retrouverons la même quantité en LDL dans les dilueurs à base de 20% de JO, 40% de PJO et 6% LDL, d'où les résultats similaires entre ces dilueurs observé dans notre étude.

Par contre, CORCINI et al. (2015) [31] ont utilisé d'emblé le PJO à 20% dans la congélation de la semence canine et ont rapporté des résultats satisfaisants ce qui

est en contraste avec nos observations. Il nous paraît donc intéressant de comparer à l'avenir plusieurs concentrations du plasma.

Comparé aux LDL, le PJO naturel a les avantages d'être compatible avec certains traitements physiques tels que la stérilisation par ionisation [30] et son procédé de fractionnement analytique (de laboratoire) décrit par MCBEE and COTTRILL en 1979 [29] a pu être transposé à l'échelle industrielle 11 ans après par la société laitière de l'ouest (actuellement Epi Bretagne Oeufs) dont la technique a fait l'objet d'un dépôt de brevet Européen sous le numéro 0 430 757 A1 [181]. Il représente donc (à côté des liposomes) une autre alternative viable pour le remplacement des LDL permettant la fabrication industrielle et le transport des dilueurs en toute conformité avec les normes de biosécurité.

Au vue des résultats intéressants obtenus avec le plasma naturel, nous voulions tenter la possibilité d'un traitement de lyophilisation afin d'optimiser sa forme et obtenir un plasma (lyophilisé) beaucoup plus stable et compatible avec nombreuses applications industrielles et commerciales. Cependant, la contrainte du temps nous a empêchés de réaliser cette expérimentation dans le cadre de notre travail de thèse. Il serait donc intéressant à l'avenir d'explorer cette piste.

Mécanisme de protection spermatique par les LDL, le PJO et les LIPO.

Mécanismes de protection spermatique par les LDL

Même s'il n'est pas encore parfaitement élucidé, le mécanisme de protection spermatique par les LDL s'éclaircit de plus en plus en faveur d'une action mixte (directe et indirecte) incluant les échanges de lipides avec la membrane plasmique du spermatozoïde et la séquestration des facteurs (protéines) capacitants du plasma séminal chez le bovin.

En effet, 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 [186 ; 7 ; 220]. Ce mécanisme est en accord avec notre constat d'une incorporation des LDL au sein de la membrane biomimétique (balance de Langmuir-Blodgett).

Il a été également évoqué que les LDL s'associent avec la membrane plasmique en formant un film protecteur à sa surface lui conférant ainsi une protection et une stabilisation pendant la cryoconservation. Dans ce phénomène de recouvrement une action de synergie entre les phospholipides (spécialement la Phosphatidylcholine) et les protéines contenues dans les LDL semble être impliquée en offrant aux spermatozoïdes une double action de « résistance et protection » [108 ; 188 ; 189]. Cependant, les rôles respectifs des protéines et des lipides en interaction avec la membrane plasmique ne sont pas encore clairement établis [30].

Mécanismes de protection spermatique par le PJO

Le PJO est en général composé essentiellement des LDL [231] et son action cryoprotectrice leur est certainement attribuable et ses mécanismes de protection spermatique seraient expliqués par toutes les hypothèses présentées ci-dessus. Même si ce dernier n'est pas aussi pur que les LDL, l'action bénéfique des lipoprotéines de faible densité compensent l'action délétère des HDL et des granules.

Mécanismes de protection spermatique par les liposomes :

Selon nos résultats sur la semence canine et avec la membrane modèle de Langmuir, le mécanisme d'action des liposomes semble être en faveur d'un mécanisme indirect s'opérant sans intégration au sein de la membrane plasmique.

Ceci est en accord avec les quelques travaux récemment publiés [34 ; 36 ; 37]. Ces auteurs ont utilisé diverses techniques d'exploration biophysiques [Balance de Langmuir-Blodgett, la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) et la cryo-microscopie électronique (cryo-EM)] pour étudier l'interaction des liposomes avec la membrane plasmique. Ils n'ont pu mettre en évidence aucun contact direct entre les LIPO et la membrane plasmique du spermatozoïde.

Nous ignorons s'il existe un contact quelconque avec la membrane plasmique non perceptible par les méthodes employées jusque là dans l'évaluation du comportement de la membrane à l'égard des liposomes (Protection par

recouvrement) [189]. Il serait intéressant d'utiliser à l'avenir le marquage fluorescent pour objectiver un éventuel échange de lipides.

Les LDL et les liposomes : quelles similitudes et quelles différences ?

L'idée d'employer les liposomes (assemblage moléculaire biomimétique) dans la conservation de la semence est venue de leur similitude avec les LDL, fraction cryoprotectrice du jaune d'oeuf. Ces deux molécules se composent essentiellement de phospholipides, principe actif de la cryoprotection spermatique.

Les liposomes utilisés dans nos travaux étaient conçus comme des molécules destinées à mimer la fraction cryoprotectrice du JO (JO-like) sans ses inconvénients. Ils se composent donc des mêmes phospholipides et aux mêmes proportions que dans le jaune d'oeuf (fabriqué à partir de la lécithine de jaune d'oeuf). Ainsi nous nous attendions au même mécanisme de protection spermatique que les LDL.

Cependant, les résultats de nos travaux de thèse ont suggéré que les mécanismes de protection sont différents entre les deux substances. Cette différence s'expliquerait éventuellement par le fait que les LDL ont une composition moléculaire beaucoup plus complexe que l'assemblage moléculaire des PL représenté par les liposomes.

En effet, les LDL contiennent en plus des PL, des constituants protéiques (Apoprotéines) qui semblent avoir un rôle à jouer dans l'action cryoprotectrice. Il a été avancé depuis longtemps [108 ; 14] que les apoprotéines sont nécessaires à solubiliser des phospholipides et les mettre en contact étroit avec la membrane plasmique.

En revanche, les lipides exogènes (liposomes) employés en cryoconservation de semences ne possèdent pas de fraction protéique capable d'assurer la même action que les apoprotéines. Il a été montré dans les travaux de DELEUW et ses collaborateurs (1993) [14] que l'albumine du sérum bovin (BSA, pour sérum albumine bovine) ajoutée aux liposomes peut jouer ce rôle de solubilisant et favoriser le contact avec la membrane plasmique.

En plus des phospholipides et des fractions protéiques, les LDL contiennent du cholestérol qui semble jouer un rôle dans la stabilisation de la membrane plasmique. L'incorporation du cholestérol dans les lipides exogènes (Liposomes) pourrait améliorer leur action cryoprotectrice [7 ; 35].

Mécanisme de protection identique entre congélation et réfrigération ?

Les résultats de notre exploration biophysique pour l'étude mécanistique des LDL et des liposomes ont donné strictement les mêmes résultats indifféremment du mode de conservation de la semence canine (réfrigération vs congélation).

Cette similitude pourrait s'expliquer par le fait que les lésions spermatiques les plus redoutables (irréversible) s'opère pendant le refroidissement des spermatozoïdes en passant de 37 à 0°C [5 ; 6], une étape commune entre le processus de réfrigération et de congélation de la semence. Donc, les protecteurs de refroidissement (LDL et LIPO), comme leur nom l'indique d'ailleurs, protègent les spermatozoïdes contre ces lésions irréversibles en agissant de la même manière en réfrigération ou en congélation.

Ce constat s'expliquerait également par le fait que l'action protectrice de ces molécules atteint son optimum par incubation avec les spz à 4°C [34] qui est une température commune entre la réfrigération et l'équilibration (avant congélation) de la semence.

Cependant, nous ignorons si ces protecteurs de refroidissement et stabilisants membranaires puissent avoir d'autres actions protectrices lors du processus de cryoconservation qui ne soient pas applicables au contexte de réfrigération. D'autres explorations mécanistiques semblent être nécessaires (avec d'autres approches biophysiques que la balance de Langmuir-Blodgett) pour élucider cet aspect.

Le rôle des secretion des glandes annexes (PS et LP) dans le mécanisme de protection ?

Aux deux hypothèses mécanistiques des LDL citées plus haut s'ajoute une troisième stipulant que les LDL 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 [33].

Ce schéma mécanistique proposé par BERGERON et MANJUNAH en 2006 [33] a été récemment vérifié pour les liposomes dans la congélation du sperme de taureau [37], mais n'a pas pu être confirmé chez le chien dans nos études lors de la réfrigération (Voir Chapitre 5) et la congélation (Voir Chapitre 6). En effet, nous avons noté une absence d'interaction entre le liquide prostatique canin et la membrane biomimétique (balance de Langmuir-Blodgett).

Cependant, ce résultat obtenu par un modèle de membrane biomimétique n'est pas obligatoirement transposable à l'échelle biologique et ne signifie pas nécessairement l'absence d'une interaction avec la membrane du spermatozoïde. Il n'exclut donc pas de façon certaine ce phénomène de séquestration d'éventuels protéines (ou facteurs) liantes à action capacitante comme chez beaucoup d'autres espèces de mammifères [232]. En ce sens, des protéines homologues telles que les protéines liantes à l'héparine (HBP pour Heparin Binding Proteins) [3] ainsi que d'autres facteurs tels que les vésicules membraneuses encore appelées epididymosomes [233 ; 234] ont été caractérisés dans le plasma séminal du chien même si les fonctions des premières et les origines des derniers n'ont pu être mis clairement en évidence. Il serait donc intéressant d'explorer au plans biomoléculaire, biochimique et biophysique (balance de Langmuir) les différentes fractions spermatiques du chien pour apporter plus d'éclaircissements à cet aspect.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Dans cette thèse, les lipoprotéines de basse densité (LDL) ont pu être remplacées par **les liposomes** dans les dilueurs de réfrigération et de congélation du sperme canin en préservant les paramètres de mobilité et les caractéristiques d'intégrité fonctionnelle (membrane, acrosome et ADN) des spermatozoïdes et sans aucune interférence avec la fertilité *in vivo*. Nous avons obtenu des valeurs de mobilité largement supérieures au seuil de 30 % exigé pour l'insémination artificielle dans l'espèce canine.

En effet, la semence canine a pu être réfrigérée (4°C) pendant 4 jours et congelée (-196°C) grâce à des dilueurs à base respectivement de **2%** et de **6% de liposomes** (fabriqués à partir de phospholipides de jaune d'œuf) avec autant d'efficacité que le milieu de référence (6%LDL).

Contrairement aux LDL, **les liposomes** ont l'avantage de pouvoir être intégrés dans des dilueurs clairs, chimiquement définis, semi-synthétiques, facilement stérilisables et prêts à l'emploi. Ils semblent être alors une alternative viable aux lipoprotéines de basse densité dans les dilueurs de réfrigération et de congélation de la semence canine.

Par ailleurs, les LDL ont pu également être remplacés par **le plasma du jaune d'œuf** dans la congélation de la semence canine. Un dilueur à base de 40% de plasma du jaune d'œuf naturel a permis de préserver les paramètres de mobilité et de fertilité *in-vitro* tout au long du processus de cryoconservation de la semence canine avec autant d'efficacité que le dilueur de référence (6% LDL).

Par rapport aux LDL, le plasma de jaune d'œuf présente l'avantage d'une compatibilité avec le procédé de stérilisation par ionisation et d'une méthode de préparation facile (au plan analytique) et transposable à l'échelle industrielle. Il

semble donc présenter (en plus des liposomes) une deuxième alternative aux LDL dans la congélation de la semence canine.

L'allongement de la durée d'équilibration peut améliorer les paramètres de mobilité et les caractéristiques d'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes canins congelés-décongelés dans les milieux à base des LDL, du plasma du jaune d'œuf et notamment des liposomes. La meilleure durée d'équilibration pour les trois milieux étudiés est de 6 heures comparée à une durée conventionnelle d'une heure et demi.

Le mécanisme de protection de la membrane plasmique du spermatozoïde serait différent entre les LDL et les liposomes. En effet, indifféremment du mode de conservation de la semence, (réfrigération et congélation), les LDL semblent agir à travers l'incorporation au sein de la membrane plasmique alors que les liposomes agiraient probablement sans incorporation.

PERSPECTIVES

Optimisation de la composition des liposomes:

Au vu de nos résultats et ceux déjà obtenus par d'autres chercheurs ayant travaillé dans le passé ou récemment sur les liposomes, et après avoir contribué à optimiser l'efficacité du dilueur à base de liposomes en prolongeant la durée d'équilibration avant congélation, nous voulions enchaîner en explorant la possibilité d'optimiser encore plus ces liposomes en incluant dans leur formulation des phospholipides chargés négativement pour favoriser plus d'interactions avec la membrane plasmique et en incluant aussi du cholestérol pour plus de stabilisation membranaire. Par faute de temps, nous n'avons pas pu réaliser ces travaux dans le cadre de cette thèse, et nous pensons qu'il serait très intéressant d'explorer à l'avenir ces pistes.

Toujours dans le cadre d'optimisation des dilueurs à base de liposomes, et afin de s'affranchir totalement des produits d'origine animale (protéines et lipides) dans leurs

compositions, il nous semble très intéressant de comparer à l'avenir des formulations à base de lécithines extraites de JO à des lécithines végétales.

Il est vrai que dans le passé, les essais sur les lécithines végétales n'ont pas été couronnés de succès, mais récemment, des résultats très encourageant ont été publiés notamment en incluant du cholestérol. Ceci justifie des explorations plus poussées sur cette piste prometteuse au plan de sécurité sanitaire.

Le plasma du jaune d'œuf (PJO) :

Optimisation de la concentration du PJO :

Nous avons montré que la concentration 40% du PJO naturel, équivalente à la concentration de 20% de JO était efficace dans la protection de spermatozoïde canin, cependant, à notre connaissance aucune étude n'a eu pour objectif de comparer plusieurs concentrations de plasma. Il nous semble donc intéressant à l'avenir d'explorer cet aspect.

Optimisation de la forme du PJO (Possibilité de lyophilisation):

Le plasma du jaune d'œuf naturel représente un grand intérêt et beaucoup d'avantage par rapport au LDL natives au plan de facilité et rapidité de préparation et surtout pour sa compatibilité au traitement de stérilisation par ionisation. Cependant, la forme liquide du plasma naturel et la nécessité de le conserver à 4°C continue à représenter une limitation à son utilisation et stockage à l'échelle industrielle. Ainsi, si une forme lyophilisée du PJO pourrait être obtenue sans altération des propriétés cryoprotectrices, elle offrirait certainement les avantages d'une conservation de longue durée, une manipulation plus aisée et de nombreuses autres applications industrielles et commerciales.

Equilibration-Glycérol :

Optimisation de l'action cryoprotectrice des liposomes (3-6h d'équilibration):

Dans une optique d'intégration de nos résultats dans une démarche d'optimisation du protocole de cryoconservation de la semence canine, nous pensons qu'il faut

adapter les protocoles aux particularités des dilueurs utilisés et notamment le choix des cryoprotecteurs.

Certes, il n'existe pas de protocole de cryoconservation fixe chez le chien, car les étapes de ce protocole dépendent du type de cryoprotecteur utilisé. Comme il est difficile de fixer un protocole à cause des variations entre les laboratoires en matière de choix des cryoprotecteurs et leurs concentrations.

Cependant, il nous semble important d'arrêter les grandes lignes protocolaires de cryoconservation de la semence canine avec des différentes variantes en fonction du type de cryoprotecteur utilisé, notamment une durée d'équilibration de 3 – 6 heures pour les dilueurs à base de LDL et Liposomes.

Optimisation du protocole de congélation (24-48h d'équilibration):

Au vue des résultats obtenus avec 6h d'équilibration, il nous semble intéressant d'explorer à l'avenir une durée d'équilibration de 24-48h, notamment avec une concentration plus basse en glycérol. Cela ouvre une perspective d'envoi de semence à des labos spécialisés pour la congélation sous une durée d'acheminement postal moyenne (24 – 48 heures).

La semence pourra donc être congelée immédiatement à sa réception.

Optimisation de la concentration en glycérole :

Dans l'expérimentation sur le temps d'équilibration, nous avons procédé à une étude factorielle (4X3) en croisant 4 temps d'équilibration (30min, 1h, 3h et 6h) avec 3 différents dilueurs (LDL, PJO, LIPO) résultant ainsi à 12 tests expérimentaux. Comme nous avons utilisé dans cette étude des éjaculats individuels (afin de prendre en considération l'effet individuel « chien » dans le modèle statistique linéaire à effets mixtes), nous devons diviser chaque éjaculat (\approx 1ml, beagle) en 12 aliquotes. Il était donc non envisageable de faire varier un troisième facteur tel que la concentration du glycérol, car comparer seulement deux concentrations aurait augmenté le nombre d'aliquotes carrément à 24 par éjaculat (factoriel $4 \times 3 \times 2$).

Cependant, nous avons choisi d'utiliser une concentration faible de glycérol (3.2%) pour éviter ses effets toxiques notamment représenté par le temps de contact avec les spermatozoïdes dans notre protocole pouvait atteindre 6h.

La contrainte de temps nous a empêchés d'enchaîner avec une nouvelle expérimentation dans le cadre de cette thèse. Ainsi il nous paraît intéressant d'explorer à l'avenir la possibilité d'optimiser la concentration du cryoprotecteur proprement dit (glycérol) en étudiant les effets de leurs éventuelles interactions avec les stabilisants membranaires (LDL, Liposomes) sur les paramètres fonctionnels et structuraux des spermatozoïdes.

Mécanisme d'action des LDL et des liposomes:

Exploration des secretions des glandes annexes et leurs éventuelles interactions avec les LDL et les liposomes:

Au vue des études récentes sur les propriétés des secretions des glandes annexes du chien et leurs implications dans le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, il serait intéressant d'explorer à l'avenir le plasma seminal (SP) et le liquide prostatique (LP) aux plans moléculaire, biochimique et biophysique. L'objectif est d'une part de caractériser les protéines liantes au sperme (homologues des BSP protéines chez les bovins) et déterminer leurs rôles dans les différents événements de la reproduction chez le chien et d'autre part d'étudier leurs éventuelles interactions avec les LDL et les liposomes (A la recherche d'une éventuelle sequestration de ces protéines par les LDL et les liposomes à l'instar du sperme bovin).

Marquage fluorescent des phospholipides liposomiaux:

La membrane de Langmuir-Blodgett (membranaire biomimétique) est une approche biophysique intéressante dans l'étude mécanistique des cryoprotecteurs (LDL et Liposomes). Cependant, il serait intéressant de la renforcer à l'avenir dans l'exploration des éventuelles échanges de lipides entre les liposomes et la membrane plasmique par des techniques de marquage fluorescent des phospholipides contenus des bicouches liposomiales.

Test de fertilité *in vivo*:

Pour évaluer l'efficacité des nouveaux dilueurs à base de liposomes, outre les caractéristiques fonctionnelles et structurales des spermatozoïdes (fertilité *in vitro*), il est indispensable d'effectuer des tests de fertilité *in vivo* à travers des inséminations artificielles de chienne. Dans le présent travail, on a effectué deux tests préliminaires sur 6 chiennes chacune afin de vérifier la compatibilité de nos nouveaux dilueurs de réfrigération (2% liposomes) et de congélation (6% liposomes) avec la fertilité *in vivo*. Cependant, le faible effectif de femelles utilisées empêchait toute comparaison entre ces nouveaux dilueurs et le milieu de référence par contre, ces milieux ont prouvé qu'ils n'interfèrent pas avec la fertilité. Il est nécessaire d'élargir l'effectif et faire des essais cliniques randomisés permettant de conclure à des taux de gestation et de mise-bas statistiquement significatifs afin de pouvoir comparer ces paramètres entre les dilueurs expérimentaux (liposomes 2% et 6%) et le milieu de référence (LDL 6%).

En ce même sens, il serait également intéressant d'effectuer des tests de fertilité *in vivo* avec du sperme réfrigéré et congelé dans un dilueur à base de plasma de jaune.

REFERENCES

1. 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.
2. Seager, S.W.J., "Successful pregnancies using frozen semen in the dog", A.A. Digest., V. 12, (1969), 6.
3. De Souza, F.F., Barreto, C.S., Lopes, M.D. "Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis", Theriogenology, V. 68, (2007), 100–106.
4. Watson, P.F. et Morris, G.J. "Cold shock injury in animal cells", Symp. Soc. Exp. Biol. V. 41, (1987), 311–340.
5. Watson, P.F., "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen", Animal Reproduction Science, V. 60–61, (2000), 481–492.
6. Farstad, W., "Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges", Reprod Dom Anim., V. 44, (Suppl. 2), (2009), 336–341.
7. 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.
8. Farstad, W., "Semen cryopreservation in dogs and foxes", Animal Reproduction Science, V. 42, (1996), 251-260.
9. 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.
10. 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.

11. Foulkes, J.A., "The separation of lipoprotein from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa", *J. Reprod. Fert.*, V. 40, (1977), 277-284.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Thorin, C., Tainturier, D., "Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4°C", *Asian Journal of Andrology*. V. 13, (2011), 281–286.
17. 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.
18. 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.

19. Moreno D., Bencharif D., Amirat-Briand L., Neira A.; Destrumelle S., Tainturier D., "Preliminary Results: The Advantages of Low-Density Lipoproteins for the Cryopreservation of Equine Semen", *Journal of Equine Veterinary Science*, V. 3, n° 12, (2013), 1068-1075.
20. Gharibi, S., Niasari-Naslaji, A., Poursasan, N., Moosavi-Movahedi, A. A., "Replacement of salamon with shotor diluent and egg yolk with low-density lipoprotein for chilled storage of ram semen", *I.J.V.R.*, V. 15, n° 3, (2014), 279-284.
21. Yamauchi, K., Kurisaki, J., Sasago, K., "Polypeptide composition of hen's yolk very low-density lipoproteins", *Agri Biol Chem.* V. 40, (1976), 1581-6.
22. Bengtsson, G., Maoklund, S.E., Olivectrona, T., "Proteins components of very low-density lipoproteins from hen's egg yolk", *Eur J Biochem*, V. 79, (1977), 211-23.
23. Burley, R.W., "Studies on the apoproteins of the major lipoproteins of the yolk of hen's eggs III. Influence of salt concentration during isolation on the amount and composition of the apoproteins", *Aust J. Biol Sci*, V. 31, (1978), 587-92.
24. Tainturier D., Bencharif D., Briand L., Topie E., Kamga-Waladjo A.R., "Production et conservation de la semence animale. Revue Africaine de Santé et de Productions animales", *E.I.S.M.V de Dakar*, V. 11, n° S, (2013), 107-111.
25. Moustacasa, V.S., Zaffalonb, F.G., Lagaresa, M.A., Loaiza-Eccheverria, A.M., Varagoa, F.C., Nevesa, 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.
26. 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.
27. Anton, M., "Structure and functional properties of hen egg yolk constituents", *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*, V. 2, (1998), 839.

28. 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.
29. MacBee, LE. et Cotterill, OJ., "Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins", *J Food Sci.*, V. 44, (1979), 656 – 60.
30. 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.
31. 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
32. Elhissi, A., David, P., Waqar, A., "Some approaches to large-scale manufacturing of liposomes", In: Waqar, A. et Mark, J.J., (Editors), "Emerging nanotechnologies for manufacturing", 2nd Edit Elsevier Inc., USA, (2015).
33. Bergeron, A. et Manjunath, P., "New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk", *Mol. Reprod. Dev.*, V. 73, n° 10, (2006), 1338-44.
34. Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., Wolkers, W.F., "Liposomes for cryopreservation of bovine sperm", *Theriogenology*, V. 76, n° 8, (2011), 1465-1472.
35. Mutalik, S., Salian, S.R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A.R., Kumar, P., Kalthur, G., Kumar, A.G., "Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium", *Syst Biol Reprod Med.*, V. 60, n° 3, (2014), 183–188.
36. Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamps, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M., "Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender", *Theriogenology*, V. 77, n° 2, (2012), 268-279.

37. Le Guillou, J., Ropers, M.H., Gaillard, C., David-Briand, E., van Leeuwen-Ibarrolab, J., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Anton, M., Tainturier, D., "Sequestration of bovine seminal plasma proteins by different assemblies of phosphatidylcholine: A new technical approach. Colloids and surfaces B: Biointerfaces", (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.034>
38. Kumar, P., Sainia, M., Kumar, D., Balhara, A.K., Yadav, S.P., Singh, P., Yadav, P.S., "Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen", *Anim. Reprod. Sci.*, V. 159, (2015), 38–45.
39. Foote, R.H., Swierstra, E.E., Hunt, W.L., « Spermatogenesis in the dog », *Anat Rec.*, V.175, (1972), 341–351.
40. England, G.C.W., Burgess, C.M., Clutterbuck, A.L., Freeman, S.L., «Epithelial surface changes and spermatozoa storage in the reproductive tract of the bitch », *The Veterinary Journal*, V. 195, (2013), 185–191.
41. England, G.C.W. Russo, M. Freeman, S.L. « he bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions », *The Veterinary Journal* 195 (2013b) 179–184
42. England, G.C., Allen, W.E., Middleton D.J., « An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate », *Res. Vet. Sci.*, V. 49, (1990), 66–70.
43. Linde-Forsberg, C., "Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog", *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*. V. 10, (1995), 48-58.
44. Badinand, F. et Petit, C., "Quels résultats attendre de la reproduction assistée chez la chienne?", *Recueil de médecine vétérinaire. Spécial reproduction canine*, V. 174, (1998), 153-161.
45. Christiansen J., "Reproduction in the Dog and Cat", Bailliere Tindall, London, United Kingdom, (1984), 309 p.

46. Kutzler, M.A., "Semen collection in the dog", *Theriogenology*, V. 64, n° 3, (2005), 747-754.
47. Fontbonne, A., "Physiologie sexuelle du chien mâle. Reproduction du chien et du chat", PMCAC Edition, Paris, (1992), 19-26 p.
48. England, G., et Concannon, P. W., "Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations", In: Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg C., (Editors), "Recent advances in small animal reproduction", International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, (juin 2002), <http://www.ivis.org/advances/Concannon/england2/chapter.asp?LA=1>, consulté le 03 mai 2016.
49. Marseloo, N., Fontbonne, A., Bassu, G., Riviere., Leblanc B., Rault D., Biourge V., Chastant-Maillard S., "Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches", 5th International symposium on canine and feline reproduction "Basic and applied research on domestic, exotic and endangered carnivores", V. 8, (4 - 6th August 2004), 75-77.
50. Smith, F.O., "Cryopreservation of canine semen: technique and performance", *Diss Abstr Int B Sci Eng.*, V. 45, (1985), 3441.
51. Anderson, K., « Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique », *Zuchthygiene*, V.10, (1975), 1–4.
52. Farstad, W., "Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen", *J. Small Anim. Pratt.*, V. 25, (1984), 561-565.
53. Linde-Forsberg, C., Strom, H.B., Govette, G., "Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen–thawed dog semen: a retrospective study", *Theriogenology*, V. 52, (1999), 11–23.
54. Linde-Forsberg, C., "Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in dogs", In: *Proceedings of the fourth international symposium on canine and feline reproduction*; (2000), 120 p.

55. Fougner, J.A., Aamdal, J., Andersen, K., "Intrauterine insemination with frozen semen in the Blue Fox", *Nord. Vet. Med.*, V. 25, (1973), 144-149.
56. Wilson, M.S., "Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen", *J. Reprod. Fertil.*, V. 47, (1993), 307-11.
57. Thomassen, R. et Farstad, W., "Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation", *Theriogenology.*, V. 71, (2009), 190-199.
58. Davidson, A.P., "Endoscopy as a tool in assessing the reproductive tract in bitches and queens", In: *Compendium of the Norwegian school of veterinary science postgraduate continuing education course in canine and feline reproduction, obstetrics and neonatology*, Oslo, (2007).
59. Fontbonne, A. « Faire reproduire son chien ou sa chienne. Les clefs d'une pratique réussie », Maradi Ed., Isle en Dodon, (1996), 15-75p, 244-252p.
60. 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.
61. Milovanov, V.K., "The biology of reproduction and the artificial insemination of animals", *Seljhozgiz*, Moscow, (1962), 969p,
62. Fontbonne, A., Levy, X., Fontaine, E., Gilson, C., "Guide pratique de reproduction clinique canine et féline", *Med'Com*, Paris, (2007), 225-227p.
63. Oettle, E., "Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology", *Veterinary Medicine*, V. 81, (1986), 263-266p.
64. Mimouni, P., Dumon, C., "Vade-medum de pathologie de la reproduction chez le chien", *Med'Com*, Paris, (2005), 178-179p.
65. Nizanski, W., Klimowicz, M., Partyka, A., Savic, M., Dubiel, A., "Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C", *Reprod Domest Anim.*, V. 44(Suppl. 2), (2009), 363-365.

66. Gunzel-Apel, A.R., Gunther, C., Terhaer, P., Bader, H., "Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa", *J Reprod Fertil.*, V. 47, (1993), 271–278.
67. Stachecki, J.J., Ginsburg, K.A., Leach, R.E., Armant, D.R., "Computer assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat", *J Androl.*, V. 14, (1993), 60–65.
68. Iguer-Ouada, M., Verstegen, J.P., "Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system for dog semen analysis", *Theriogenology*, V. 55, n° 3, (2001), 733-749.
69. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., "Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer", *Theriogenology*, V. 60, (2003), 1553–1568.
70. Schafer-Somi, S. et Aurich, C., "Use of new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution", *Anim Reprod Sci.*, V. 102, (2007), 1–13.
71. Dorado, J., Rijsselaere, T., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M. "Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer Systems", *Biology in Reproductive Medicine*, V. 57, (2011), 318–325.
72. Cannon, L.M., "Cryoconservation de la semence bovine dans les liposomes: Mise au point d'un nouveau dilueur", *Thèse vétérinaire, Oniris-nantes*, (2015), 179p.
73. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Nizanski, W. "Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years", *Reprod Dom Anim.*, V. 47, n° 6, (2012), 204–207.
74. Iguer-Ouada, M., Verstegen, J.P., "Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders", *Theriogenology*, V. 55, n° 2, (2001), 671-681.

75. Rota, A., Milani, C., Cabianca, G., Martini, M., "Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation", *Theriogenology*, V. 65, (2006), 1848–1858.
76. Rota, A., Milani, C., Romagnoli, S., "Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status", *Theriogenology*, V. 67, (2007), 520–525.
77. Milani, C., Fontbonne, A., Sellem, E., Stelletta, C., Gerard, O., Romagnoli, S., "Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen", *Theriogenology*, V. 74, (2010), 153–164.
78. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. "New techniques for the assessment of canine semen quality: a review", *Theriogenology*, V. 64, (2005), 706-719.
79. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., "Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa", *Theriogenology*, V. 57, (2002), 1669–81.
80. Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld L.J.D., "Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics", *Journal of Reproduction and Fertility*, V. 70, (1984), 219-228.
81. England, G.C.W. et Plummer, J.M., "Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa", *Journal of Reproduction and Fertility*, V. 47, (1993), 261-270.
82. Spittaler, P.J. et Tyler, J.P.P., "Further evaluation of a simple test for determining the integrity of spermatozoa membrane", *Clin. Reprod. Fertil.*, V. 3, (1985), 187-90.
83. De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., "The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury", in: I.A. Johnson, D. Rath (Eds.), *Boar Semen Preservation II*, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, (1991), 95–104p.

84. Drobnis, E.Z. Crowe, L.M. Berger, T. Anchoroguy, T.J. Overstreet, J.W. Crowe, J.H., "Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model", *J. Exp. Zool.*, V.65, (1993), 432–437.
85. Nizanski, W., "Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter", *Theriogenology*, V. 66, (2006), 470–483.
86. Cheuqueman, C., Bravo, P., Treulen, F., Giojalas, LC., Villegas, J., Sanchez, R., Risopatron, J., "Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry", *Reprod Domest Anim.*, V. 47, (2012), 39–43.
87. Garner, DL. et Johnson LA., "Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide", *Biol Reprod.*, V. 53, (1995), 276–284.
88. Yu, I., Songasen, N., Godke, RA., Leibo, SP., "Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates", *Cryobiology*, V. 44, (2002), 62–78.
89. Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C., "Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry", *Theriogenology*, V. 52, (1999), 965–980.
90. De Silva, P.F., Gadella, B.M., "Detection of damage in mammalian sperm cells", *Theriogenology*, V. 65, (2006), 958-978.
91. Lopes, G., Simoes, A., Ferreira, P., Martins-Bessa, A., Rocha, A., "Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers", *Anim Reprod Sci.*, V. 112, (2009), 158–163.
92. Peña, A., Quintella, L.A., Herradon, P.G., "Flow cytométrie assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa", *RDA*, V. 34, (1999), 495–502.
93. Peña, A.I., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C., "Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation", *Journal of Reproduction and Fertility*, V. 57, (2001), 371–376.

94. Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., Tesarik, J., "Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *pisum sativum* agglutinin", *J.Reprod.Fert.*, V. 95, (1992), 755-763.
95. Szasz, F., Gabor, G., Solti, L., "Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions", *Acta Vet Hung.*, V. 48, (2000), 325–333.
96. Szasz, F., Sirivaidyapong, S, Cheng F.P., Voorhout, W.F., Marks, A., Colenbrander, B., Solti, A.L., Gadella, B.M., "Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen", *Mol Reprod Dev.*, V. 55, (2000), 289–298.
97. Dorado, J., Alcaraz, L., Duarte, N., Porteroa, J.M., Achaa, D., Demydab, S., Munozerrano, A., Hidalgo, M., "Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen", *Theriogenology*, V. 76, (2011), 381–385.
98. Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K., "Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques", *J Androl.*, V. 23, (2002), 25–43.
99. Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K., Kaproth, M.T., "Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry", *J Dairy Sci.*, V. 73, (1990), 2364–2371.
100. Love, C.C., Kenney, R.M., "The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion", *Theriogenology*, V. 50, (1998), 955–972.
101. Garcia-Macias, V., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Garde, J.J., Anel, E., Anel, L., de Paz, D., "Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog", *Theriogenology*, V. 66, (2006), 1921–1930.
102. Evenson, D. et Wixon, R., "Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay", *RBM Online*, V. 12, (2006), 466–472.

103. Kim, S.H., Yu, D.H., Kim, Y.J., "Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm", *Theriogenology*, V.73, (2010), 282–292.
104. Watson, P.F., "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function", *Reprod. Fertil. Dev.*, V.7, (1995), 871–891.
105. Watson, P.F. et Plummer, J.M., "The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling", *Proc. 1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen*, (1985), 113-127.
106. Bwanga, C.O., (1991), "Cryopreservation of boar semen: A literature review", *Acta Vet. Stand.*, V.32, (1985), 431-453.
107. Paulenz, H., "The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock", *Norw. J. Vet. Med.*, V.105, (1993), 1135-1 142
108. Watson, P.F., "The effect of cold shock on sperm cell membranes", In: Morris, G.J., Clarke, A., (Editors.), "Effects of low temperatures on biological membranes", Academic Press, London, (1981), pp.189–218.
109. Holt, W.V. et North, R.D., "Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study", *J. Exp. Zool.*, V.230, (1984), 473–483.
110. De Leeuw, F.E., Chen, H.-C., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., "Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes", *Cryobiology*, V.27, (1990), 171–183.
111. Pettitt, M.J. et Buhr, M.M., "Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behaviour during cryopreservation", *J. Androl.*, V.19, (1998), 736–746.
112. Robertson, L. et Watson, P.F., "Calcium transport in diluted or cooled ram semen", *J. Reprod. Fertil.*, V.77, (1986), 177–185.

113. Robertson, L., Watson, P.F., Plummer, J.M., "Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock", *Cryo-Lett.*, V.9, (1988), 286–293.
114. Bailey, J.L. et Buhr, M.M., « Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa », *Can. J. Anim. Sci.* V.74, (1994), 45-51.
115. Hall, S.M., Evans, J., Haworth, S.G., "Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, V.9, (1993), 106–114.
116. Saunders, K.M. et Parks, J.E. « Effects of Cryopreservation Procedures on the Cytology and Fertilization Rate of In Vitro-Matured Bovine Oocytes », *Biology of Reproduction*, V.61, (1999), 178–187.
117. Spungin, B., Margalit, I. Breitbart, H., « Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system : evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion », *Journal of Cell Science*, V.108, (1995), 2525-2535.
118. Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Critser, J.K., « Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis », *Biology of Reproduction*, V.49, no. 1, (July 1993), 112-123.
119. Katkov, I.I., Katkova, N., Critser, J.K., Mazur, P., "Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations", *Cryobiology*, V.37, (1998), 325–338.
120. Watson, P.F., Duncan, A.E., "Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa", *Cryobiology*, V.25, (1988), 131–142.
121. Watson, P.F., "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen", *Animal Reproduction Science*, V.60–61, (2000), 481–492.

122. Alvarez, J.G., Storey, B.T., "Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation", *J. Androl.*, V.13, (1992), 232–241.
123. Bell, M., Wang, R., Hellstrom, W.J., Sikka, S.K., "Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm", *J. Androl.*, V.14, (1993), 472–478.
124. O'Flaherty, C., Beconi, M., Beorlegui, N. "Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa", *Andrologia*, V.29, (1997), 269–275.
125. De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., "Reactive oxygen species and sperm physiology", *Rev. Reprod.*, V.2, (1997), 48–54.
126. Aitken, R.J. et Baker, M.A., "Oxidative stress and male reproductive biology", *Reprod Fertil Dev.*, V.16, (2004), 581–588.
127. Fatehi, A.N., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., Gadella, B.M., "DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages", *J Androl.*, V.27, (2006), 176–188.
128. Waterhouse, K.E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D.P., De Angelis, P.M., "Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls", *Reprod Fertil Dev.*, V.18, (2006), 781–788.
129. Al Haider, A., "Studies Related to Assisted Reproduction in Dogs: In Vitro Oocyte Maturation and Sperm Cryopreservation", PhD Thesis, The Royal Veterinary College, University of London, United Kingdom, (2007).
130. Salamon, S., Maxwell, W.M.C., "Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement", *Anim. Reprod. Sci.*, V.38, (1995), 1–36.

131. Ellington, J.E., Samper, J.C., Jones, A.E., Oliver, S.A., Burnett, K.M., Wright, R.W., "In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct uterine tube. Epithelial cells or their secretory products", *Anim. Reprod. Sci.*, V.56, (1999), 51–65.
132. Navara, C.S., Simerly, C., Zoran, S., Schatten, G., "The sperm centrosome during fertilisation in mammals: implications for fertility and reproduction", *Reprod. Fertil. Dev.*, V.7, (1995), 745–754.
133. Sutovsky, P., Navara, C.S., Schatten, G., "Fate of mitochondria, and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization", *Biol. Reprod.*, V.55, (1996), 1195–1205.
134. Rohwedder, A., Liedigk, O., Schaller, J., Glander, H.J., Werchau, H., "Detection of mRNA transcripts of beta 1 integrins in ejaculated human spermatozoa by nested reverse transcription-polymerase chain reaction", *Mol. Hum. Reprod.*, V.2, (1996), 499–505.
135. Sathananthan, A.H., Tatham, B., Dharmawardena, V., Grills, B., Lewis, I., Trounson, A., "Inheritance of centrioles and centrosomes in bovine embryos", *Arch. Androl.*, V.38, (1997), 37–48.
136. Van der Schans, G.P., Haring, R., Dijk-Knijnenburg, H.C.M., Bruijnzeel, P.L.B., Den Daas, N.H.G., "An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm", *J. Androl.*, V.21, (2000), 250–257.
137. Hamamah, S., Royere, D., Nicolle, J.C., Paquignon, M., Lansac, J., "Effects of freezing thawing on the spermatozoon nucleus-a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species", *Reprod. Nutr. Dev.*, V.30, (1990), 59–64.
138. Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., "Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa" *J. Androl.*, V.24, (2003), 621–628.
139. Lofstedt, F., "Artificial insemination in the dog and the possibility of low temperature conservation", *Kynologischer Weltkongress, Dortmund*, (1956), 195-200.

140. Wales, R.G. et White, LG., "Viability of diluted dog spermatozoa in vitro". *J. Reprod. Fertil.*, V.5, (1963), 67-76.
141. 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.
142. Foote, R.H., "Extenders for freezing dog semen", *Am. J. Vet. Res.*, V. 25, (1964), 37-40.
143. Andersen, K., "Fertility of frozen dog semen". *Acta Vet. Stand.*, V.13, (1972), 128-130.
144. Linde-Forsberg, C. et Forsberg, M., "Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen". *J. Reprod. Fertil.*, V.39, (1989), 299-310.
145. Ivanova-Kicheva, M.G., Subev, M.S., Bobadov, N.D., Dacheva, D.P., Rouseva, L.A., "Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa". *Theriogenology*, V.44, (1995), 563-569.
146. Ivanova-Kicheva, M.G., Nikolov, I.I., Dacheva, D.P., Ivanov, I.H. and Ivanova, N.B., "Testing of different media for cryopreservation of dog semen", *Proc. 12th Int. Congress on Animal Reproduction, The Hague*, V.4, (1992), 1776- 1778.
147. England, G.C.W., "The cryopreservation of dog semen". Thesis, Royal Veterinary College, University of London, UK, (1992) 152 pp.
148. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C., "Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C", *Theriogenology*, V.44, (1995), 885-900.
149. Thomas, P.G.A., Larsen, R.E., Bums, J.M., Hahn, C.N., "A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen", *Theriogenology*, V.40, (1993), 1199- 1205.
150. Holt, W.V., "Basic aspects of frozen storage of semen", *Animal Reproduction Science*, V.62, (2000), 3-22.

151. 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.
152. 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.
153. Okano, T., Murase, T., Asano, M., Tsubota, T., "Effects of final dilution rate, sperm concentration and time for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa", *J.Vet.Med.Sci.*, V.66, n° 11, (2004), 1359-1364.
154. Rota, A., Pena, A.I., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H., "In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns", *Anim Reprod Sci*, V.57, (1999), 199–215.
155. Nizanski, W., Dubiel, A., Birger, M., Bielas, W., "In vitro evaluation of dog semen extended into TRIS-buffered diluents and frozen in pellets", *Reprod. Dom. Anim.*, V.32, (1997), 102.
156. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H., "Effects of Equex STM paste on viability of frozenthawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C", *Theriogenology*, V.47, (1997), 1093–1101.
157. Pena, A. et Linde-Forsberg, C., "Effects of Equex, one or two-step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa", *Theriogenology*, V.54, (2000), 859-875.
158. Hermansson, U., Linde-Forsberg, C., "Freezing of stored, chilled dog spermatozoa", *Theriogenology*, V.65, (2006), 584–593.
159. Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Luz, M., Onclin, K., "Conservation of canine semen motility parameters assessed using the Hamilton-Thorn computer assisted motility analyzer and acrosome reaction integrity in semen frozen after up to 3 days conservation at 4°C (chilled)", 3d EVSSAR congress, Liege, (2002), 109-110.

160. Sundararaman, M.N., Edwin, M.J., « Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol equilibration and the relevance to cryopreservation », *Asian J. Cell Biol.*, V.3, n°1, (2008), 22–23.
161. Leite, T.G., do Vale Filho, V.R., de Arruda, R.P., de Andrade, A.F.C., Emerick, L.L., Zaffalon, F.G., André, J., Martins, M., de Andrade, V.J., “Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry”, *Animal Reproduction Science*, V.120, (2010), 31–38.
162. Igna, V., Hanganu, M., Tulcan, C., Mircu, C., Otava, G., Knop, R., Cernescu, H., Ardelean, V., “The influence of equilibration time on dog semen cryopreservation”, *Scientific works-Lucrari Stiintifice; C series LIII*, (2008), 621-268.
163. Anderson, K., « Insemination with frozen dog semen based on a new insemination Technique ». *Zuchthygiene*, V.10, (1975), 1–4.
164. Yubi, AC., “Investigations of dog semen with particular reference to freezing techniques”, MVM Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow, (1984).
165. Olar, T.T., “Cryopreservation of dog spermatozoa”, MS Thesis, Colorado University, Fort Collins, (1984), 158 pp.
166. Almlid, T. et Johnson, L.A., “Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws”, *J. Anim. Sci.*, V.66, (1988), 2899-2905.
167. Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Moce, E., Viudes-de-Castro, 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.
168. 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.

169. 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.
170. 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
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. 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.
176. Wall, R.J., Foote, R.H., "Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg-yolk-Tris-glycerol extender", *Journal of Dairy Science*, V.82, (1999), 817-821.
177. Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, 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

178. Thapon, J.L. et Bourgeois, C.M., "L'oeuf et les ovoproduits", Lavoisier TEC & DOC, Paris, (1994), chapitre 1.
179. 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.
180. 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.
181. Kerandivez, C.Y., "Procédé de fractionnement du jaune d'œuf de poule", Brevet Européen 0430757A1. 19.11.1990.
182. Kamat, V.B., Lawrence, G.A., Barratt, M.D., Darke, A., Leslie, R.B., Skipley, G.G., Stubbs, J.M., "Physical studies of egg yolk low-density lipoproteins", Chemistry and Physics of Lipids, V.9, n°1, (1972).
183. Chang, M.C., Powrie, W.D., Fennema, O., "Microstructure of egg yolk", J. Food Sci., V.42, (1977), 1193.
184. 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), 493.
185. 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.
186. 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.
187. Parks, J.E., Lynch, D.V., "Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes", Cryobiology, V.29, (1992), 255-266.

188. Watson, P.F., "The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein", *J Reprod Fert.*, V.62, (1981), 483–92.
189. Ricker, J.V., Linfor, J.J., Delfino, W.J., Kysar, P., Scholtz, E.L., Tablin, F., "Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants", *Biol Reprod.*, V.74, (2006), 359–65.
190. Le Guillou, J., Ropers, M.H., Gaillard, C., David-Briand, E., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Tainturier, D., Anton, M., "Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air - water interface", *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, V.108, (2013), 246-254.
191. 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.
192. Castagne, D., « Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques », Thèse doctorale, Université de Liège, faculté de Médecine, (2010). 140p.
193. Le Guillou, J., "Lipoprotéines de basse densité et structure biomimétiques: rôle dans le mécanisme de cryoconservation des spermatozoïdes", Thèse de Doctorat. Oniris-nantes. Université Nantes-Angers-Le Mans. (2014), 209 pp.
194. Redziniak, G., "Liposomes et peau: passé, présent, futur: Liposomes and skin: past, present, future", *Pathol. Biol.*, V.51, (2003), 279–281.
195. 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.
196. Schwendener, R.A., Lagocki, P.A., Rahman, Y.E. "The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages", *Biochim. Biophys. Acta*, V.772, (1984), 93–101.

197. Correa, SG., Rivero, VE., Yranzo-Volonté, N., Romero-Piffiguer, M., Ferro, ME., Riera, C.M. "Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens", *Autoimmunity*, V.15, (1993), 195–200.
198. Gregoriadis, G., "Targeting of drugs: implications in medicine", *Lancet*, V.2, (1981), 241–246.
199. Kapczynski, DR., Tumpey, T.M., "Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus", *Avian Dis.*, V.47, (2003), 578–587.
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.
201. Martin, I., Ruyschaert, J.M., "Common properties of fusion peptides from diverse systems", *Biosci. Rep.*, 20p. (2000), 483–500.
202. Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., "Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes", *Ann. Rev. Biochem*, V.72, (2003), 175–207.
203. Epand, R.M., "Fusion peptides and the mechanism of viral fusion", *Biochim. Biophys. Acta*, V.1614, (2003), 116–121.
204. Brasseur, R., "Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis)", *Mol. Membr. Biol.*, V.17, (2000), 31–40.
205. White, J.M., "Membrane fusion", *Science*, V.258, (1992), 917–924.
206. Stegmann, T., "Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion", *Traffic*, V.1, (2000), 598–604.
207. 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.
208. Phillips, P.H. et Spitzer, R.R., « A Synthetic Pabulum for the Preservation of Bull Semen », University of Wisconsin, Wisconsin, (1946), 1–6p. <http://jds.fass.org/cgi/reprint/29/7/407.pdf> consulté le 2 mai 2016.

209. Arts, E.G.J.M., Kuiken, I.J., Jager, S., Hoekstra, D., "Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction", *Eur. J. Biochem.*, V.217, (1993), 1001-1009.
210. Rastegarnia, A., Shahverdi, A., Topraggaleh, T.R., Ebrahimi, B., Shafipour, V., "Effect of different thawing rates on post thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*bubalus bubalis*) spermatozoa", *Cell Journal*, V.14, n° 4, (2013), 306-313.
211. Wilhelm, K.M., Graham, J.K., Squires, E.L., "Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation", *Cryobiology*, V.33, (1996), 320 - 9.
212. Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J., Arav, A., « The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity », *Cryobiology*, Vol.45, n° 2, (October 2002), 143–152.
213. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C., "Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C", *Thetiogenology*, V.44, (1995), 885-900.
214. Rijsselaere, T., Maes, D., Van Den Berghe, F., Van Soom, A., « Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen », *VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT*, V.80, n° 3, (2011), 248-253.
215. 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.
216. Pinheiro, J.C. et Bates, M.D., "Mixed-Effects Models in S and Splus", Springer-Verlag, New York, (2000), 145p.
217. Du Bois, S., Len, J.A., Parlevliet, J.M., Eilts, B.E., "Effect of cooling time on membrane integrity and mobility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk-based extenders at two different cooldown equilibration times", *Reproduction in Domestic Animals*, V.47, n° 6, (2012), 278-280.

218. Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barriere, P., Destrumellea, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. « Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (low density lipoproteins) », *Anim. Reprod. Sci.*, V.119, (2010), 305–313.
219. Hammamah, S., Royere, D., Nicolle, J.C., Paquignon, M., Larsac, J., “Effect of freezing thawing on the spermatozoa nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species”, *Reprod. Nutr. Dev.*, V.30, (1990), 59-64.
220. Parks, J.E. et Graham, J.K., 1992. “Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes”, *Theriogenology*, V.38, (1990), 209-22.
221. Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., Palmer, E., “Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa”, *Theriogenology*, V.48, (1997), 391-410.
222. Ström, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C., “In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation”, *Theriogenology*, V.48, (1997), 247-256.
223. Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C., “Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste”, *Theriogenology*, V.51, n° 6, (1999), 1045-1058.
224. Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Ulguim, R.R., Alvarenga, M.V.F., Bianchi, I., Corrêa, M.N., Lucia, T. Jr., Deschamps, J.C., “Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen”, *Animal Reproduction Science*, V.115, (2009), 323–327.
225. Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., “Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen”, *Theriogenology*, V.59, (2003), 1241-1255.
226. Arthur, G.H., Noakes, D.E., Person, H., “Reproductive abnormalities of male animals”. in: Noakes, D., Parkinson, T., England, G., (Eds), “*Veterinary Reproduction and Obstetrics*”. Baillière Tindall., 5th ed., London, (1982), 431-468p.

227. Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Langlois, M.L., Dubourdieu, S., Barriere, P., "Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm", *Int J Androl*, V.32, n° 5, (2009), 498-504.
228. Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Dubourdieu, S., Barriere, P., "Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, V.149, n° 2, (2010), 186-9.
229. Pena Martinez, A.I., "Canine fresh and cryopreserved semen evaluation", *Anim Reprod Sci.*, V.82, (2004), 209–224.
230. Diaz, J., Tainturier, D., Topie, E., Micheau, S., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., "Could the liposomes be an alternative to egg yolk in canine semen freezing", *Reprod Dom Anim.*, V.49 (Suppl. 3), (2014), 64. doi: 10.1111/rda.12391
231. Anton, M., « Egg yolk: structures, functionalities and processes », *J Sci Food Agric.*, V.93, (2013), 2871–2880.
232. Manjunath, P., « New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components », *Anim. Reprod.*, V.9, n.4, (2012); 809-815,
233. Zelli, R., Bellezza, I., Rambotti, M.G., Minelli, A., Polisca, A., « Ultrastructural and Enzymatic Activity of Membranous Vesicles Isolated from Canine Seminal Plasma », *Reprod. Dom. Anim.*, V.48, (2013), 252–257. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02141.x
234. Goericke-Pesch, S., Hauck, S., Bergmann, M., Wehrend, A., « Morphological characterisation of vesicular structures in the canine ejaculate », *Micron*, Vol.77, (October 2015), 66–73.

APPENDICE

ANNEXE 1

LISTE DES ABREVIATIONS

Spz : Spermatozoïde
MP : Membrane Plasmique
Tris : Trihydroxyméthylaminométhane
JO: Jaune d'oeuf
LDL: Lipoprotéines de basse densité (pour Low Density Lipoproteins)
LIPO : Liposomes
PJO : Plasma de jaune d'œuf
PL : Phospholipide
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidylethanolamine
PS : Phosphatidylserine
ROS : Pour Reactive Oxygen Species
IAP : Insémination Artificielle Profonde
MOT: Motilité totale (%)
PMOT: Motilité progressive (%)
VCL: Vitesse linéaire du spz (Pour Velocity curvi-linear, $\mu\text{m/s}$)
VSL: Vitesse progressive du spz (Pour Velocity straight-line, $\mu\text{m/s}$)
VAP: Vitesse à trajectoire lissée du spz (Pour Velocity average pathway, $\mu\text{m/s}$)
ALH: Amplitude latérale de déplacement de la tête du spz (μm)
BCF: Fréquence de battement de cil du spz (Pour Beat cross frequency, Hz)
HOS: Test hypo-osmotique (Hypo-osmotic swelling test)
FITC-PSA: Fluorescein Isothiocyanate – Pisum sativum agglutinin
IP: Iodure de propidium
AO: Acridine-orange
QSP : Quantité suffisante pour
LP : Liquide prostatique
PS : Plasma séminal

ANNEXE 2
TECHNIQUE DE PRELEVEMENT DE LA SEMENCE CANINE
D'après BENCHARIF, 2009.



Figure.1. Technique de récolte du sperme canin fractionnée en trois étapes : (a) : Récolte de la fraction urétrale, (b) : Récolte de la fraction epididymaire, (c) : Récolte de la fraction prostatique.

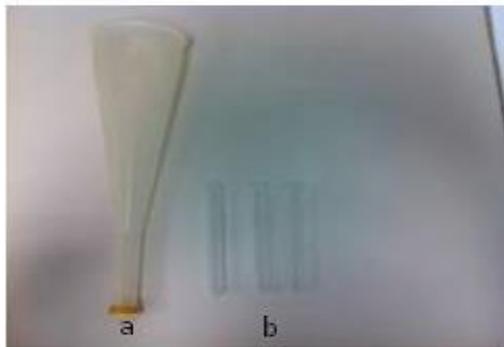


Figure.2. Matériel de récolte du sperme
(a) : cône de récolte en caoutchouc,
(b) : tubes de prélèvement.

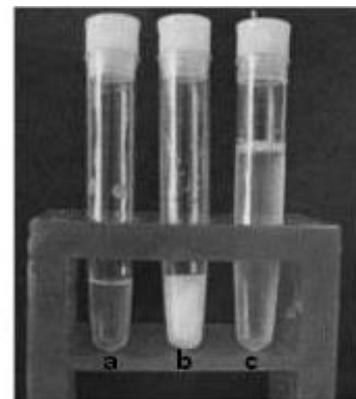


Figure.1.3. Les trois fractions de l'éjaculat canin : (a) : pré spermatique (urétrale), (b) : spermatique (epididymaire), C : post spermatique (prostatique).

ANNEXE 3
TECHNIQUE D'INSEMINATION INTRA-UTERINE
 D'après DAVIDSON, 2007 ; THOMASSEN and FARSTAD, 2009.



Cystourethroscopie (29-cm)
 De gauche à droite: *Pièce intermédiaire, chemise, télescope, et source de lumière/câble.*



Manipulation de l'endoscope rigide et du cathéter pour accéder à l'ostium cervical.



Le pli dorsal médian (DMF) repère pour le passage cranial de l'endoscope



Le cervix apparaît comme une rosette (vu du dôme vaginal)



Les écoulements d'oestrus empêchent la visualisation de l'ostium cervical



Cathéter introduit dans l'ostium cervical



Injection de la semence sans reflux



Après insémination, 1 – 2 ml d'air sont injectés pour vider la sonde de la semence résiduelle.

ANNEXE 4

EVALUATION INITIALE DE LA QUALITE SPERMATIQUE (Partie expérimentale)



Motilité massale

Microscope à platine chauffée
(Leica, HM Lux 3)



Critère d'inclusion
 ≥ 4

Concentration

(SpermaCue® Mini Tube)



Critère d'inclusion
 $>200 \times 10^6$ spz/mL

Paramètres de mobilité (Hamilton Thorn IVOS 14.0)



Critère d'inclusion
Motilité $>60\%$

ANNEXE 5

TECHNIQUE DE CONGELATION ET DE DECONGELATION DE LA SEMENCE (Partie expérimentale)

Décongélation

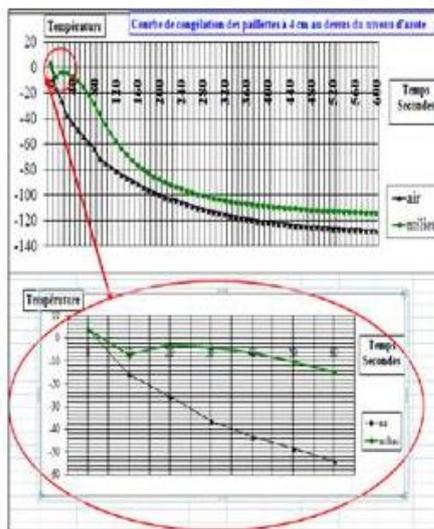
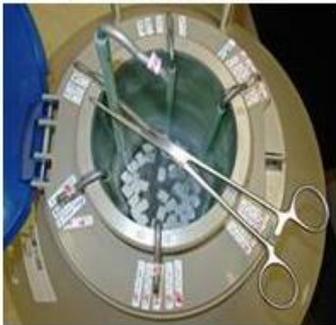
(à 37°C pdt 30 min)



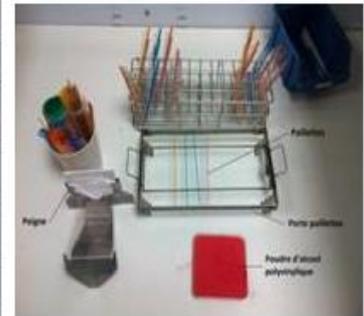
Equilibration à 4°C



Stockage
dans l'azote
(Pendant 24H)



Conditionnement des
paillettes
(Pailles 0,25mL)
+ 30mn Equilibration



Congélation

(10mn dans la vapeur
d'azote à 4cm de la
surface)



ANNEXE 6
TECHNIQUE D'ANALYSE D'IMAGE AUTOMATISEE DE LA SEMENCE
(Partie expérimentale)



HTR IVOS version 14.0



® ONIRIS



Chambre d'analyse Leja ©

Paramètres techniques HTR IVOS version 14.0

Parameters	Cutt-offvalue
Chamber type	Leja 4 (20µm)
Temperature of analysis (°C)	37
Fields acquired	10
Frame rate (Hz)	60
Minimum contrast	75
Minimum cell size (Fixels)	6
Straightness (STR), threshold (%)	75
Prog. min VAP (µm/s)	100.0
Low VAP cut-off (µm/s, LVV)	9.9
Low VSP cut-off (µm/s, LVS)	20
Medium VAP cut-off (µm/s, MVV)	50

egend: VAP: Velocity Average Path way ; VSL: Velocity Straight Line ; LVV: LowVAP cut-off Value ; LVS: LowVSL cut-o Value ; MVV: Medium VAP cut-off Value.

ANNEXE 07
 PROTOCOLE DU TEST FITC-PSA
 (Partie expérimentale)

Préparer une solution mère de FITC-PSA à 50µg/ml.

FITC-PSA	50µg/ml	5 mg	2.5 mg*	2 mg*	0,5 mg*
PBS		100 ml	50 ml*	40 ml*	10 ml*

Aliquoter en micro tubes de 1ml et mettre à - 24°C.

Protocole (technique) de coloration «FITC/PSA » :

- Déposer 5 µl de semence décongelée sur l'extrémité d'une lame de verre, étalée ensuite avec une autre lame pour effectuer un frottis.
- Laisser sécher à l'air.
- Tremper les lames pendant 15 minutes dans un bain de méthanol à 100% (éventuellement filtré dans un filtre à 0,45µm).
- Laisser sécher à l'air,
- Laisser incuber avec une solution de 200 µl de FITC-PSA (50 µg/ml) dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante dans une chambre sombre et humide.
- Rincer les lames à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.
- Tremper pendant 15 minutes dans un bain d'eau distillée.
- Laisser sécher à l'air.
- Stocker les lames à + 4 °C avant observation au microscope à fluorescence.
- Compter 200 spz et procéder au classement.

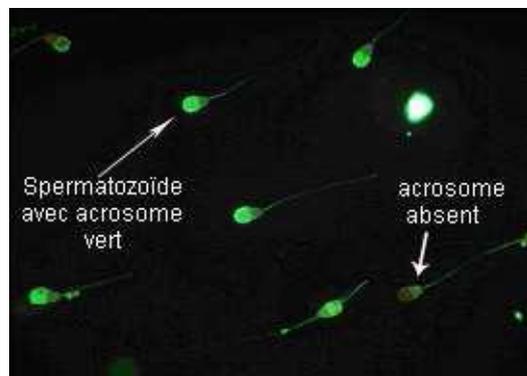
Interprétation des résultats :

Les spermatozoïdes observés (n=200 spermatozoïdes/lame) sont classés en :

- ✓ Spermatozoïdes à acrosome intact : Si l'acrosome est fluorescent,
- ✓ Spermatozoïdes à acrosome rompu : Si l'acrosome n'est pas fluorescent.



Olympus BX43



Microphotographie du test FITC-PSA

ANNEXE 8

PROTOCOLE DU TEST HYPO-OSMOTIQUE (Partie expérimentale)

PREPARATION DE LA SOLUTION HYPO OSMOTIQUE 100 M.OSMOL

Préparer une solution hypo-osmotique à 100 mOsmol/l en mélangeant dans 100 ml d'eau distillée 75 mM de fructose et de 25 mM de tri- citrate de sodium.

Fructose	13.5g/L	0.9g
Trisodium citrate	7.35g/L	0.5g
Eau distillée	QSP	100ml

Mesurer l'osmolarité (100 mosmol)

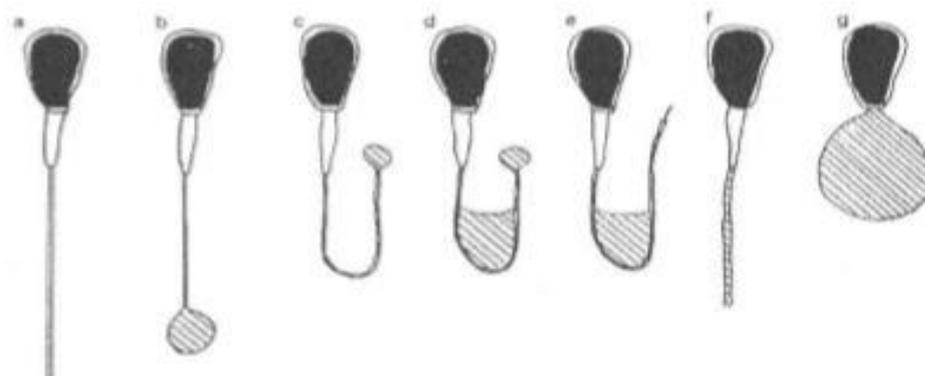
Stocker à 4°C.

PROTOCOLE (TECHNIQUE) DU TEST HYPO-OSMOTIQUE:

- Déposer 25 µL de semence décongelée dans un tube Eppendorf,
- Rajouter 25 µl de solution hypo-osmotique (100 mOsmol/l)
- Laisser incuber pendant 60 min à 37 °C,
- Déposer 15 µl de la solution sur une lame et faire un frottis,
- Observer au microscope à contraste de phase,
- Compter 200 spz.

Interprétation : (Voir la grille d'interprétation ci-dessous d'après Jeyendran, 1984 puis Elgland et Plummer, 1993)

Ce test simple permet de reconnaître les spermatozoïdes vivants qui réagissent à la solution hypo-osmotique par un gonflement et/ou un enroulement du flagelle (b-g) par rapport aux morts qui ne sont pas modifiés (a).



NB/ Attention, ne pas confondre sous microscope le spz (f) avec le spz (a).

ANNEXE 09
 PROTOCOLE DU TEST A L'ACRIDINE-ORANGE
 (Partie expérimentale)

A. PREPARATION DES SOLUTIONS NECESSAIRES A LA COLORATION ACRIDINE ORANGE:

Préparer une solution mère d'acridine Orange à 6µg/ml :

Acridine Orange	06µg/ml	6 mg	0,6 mg*
PBS		1L	100 ml*

Stocker cette solution mère à 4°C.

Préparer les trois solutions suivantes :

Solution TNE à pH=7.4 :

Tris HCL	0.01M	0.08g
NaCl	0.15M	0.44g
EDTA	1mM	0.02g
Eau PPI	QSP	50ml

Solution au triton pH=1.2

Triton	0.1%	0.05ml
NaCL	0.15M	0.44g
Eau PPI	QSP	50ml
HCL	0.08 N (à diluer)	Ajuster le pH

Solution d'Acridine Orange pH=6 :

Acridine Orange	Solution mère à 6µg/ml	250µl
Acide citrique	0.1M	1.05g
Na ₂ HPO ₄	0.2M	2.68g
Disodium EDTA	1mM	0.02g
NaCl	0.15M	0.44g
Eau PPI	QSP	50ml

Stocker ces solutions à 4°C.

B. PROTOCOLE DE COLORATION ACRIDINE ORANGE (SUITE):

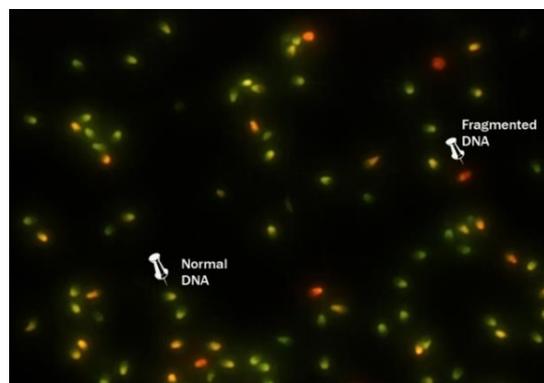
- Déposer 150 μL de semence dans un tube à hémolyse contenant 4 mL de PBS préchauffé dans un bain marie à 37°C.
- Centrifuger à 500xg durant 10 minutes.
- Récupérer 100 μL du culot et remettre en suspension dans 100 μL de solution de TNE.
- Ajouter 400 μL de solution de Triton au mélange semence/TNE et laisser pendant 30 secondes.
- Ajouter 1,2mL de la solution Acridine Orange (protéger le tube de la lumière avec du papier aluminium).
- Laisser incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Déposer 10 à 15 μL de solution finale sur une lame, couvrir avec une lamelle puis lutter avec du vernis à ongle.
- Observation au microscope à fluorescence.
- Compter 200 spz et classer en deux groupes.

Interprétation

Le résultat est lu en fonction de l'émission fluorescente du spermatozoïde. Une fluorescence verte signe une fixation à de l'ADN natif (double brin), et une fluorescence rouge une fixation à de l'ADN dénaturé (mono brin). Le taux de dénaturation est évalué par le rapport entre la proportion de spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge et la population totale de spermatozoïdes (fluorescences verte + rouge).

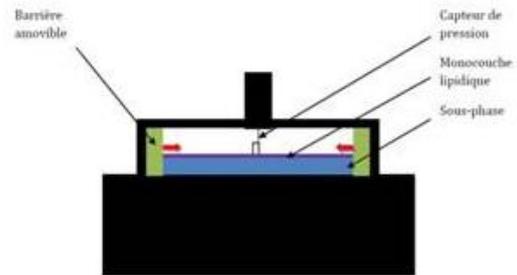
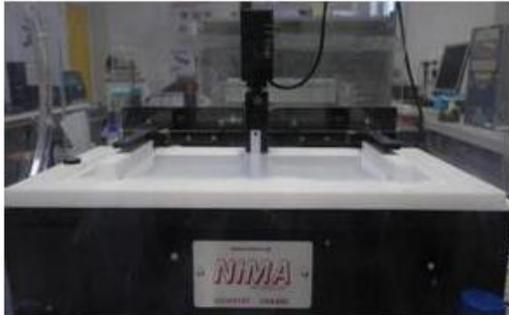


Olympus BX43

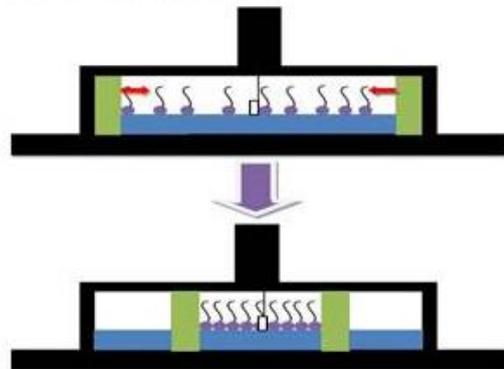


Microphotographie du test à l'acridine-orange

ANNEXE 10 LA BALANCE DE LANGMUIR-BLODGETT (Partie expérimentale)



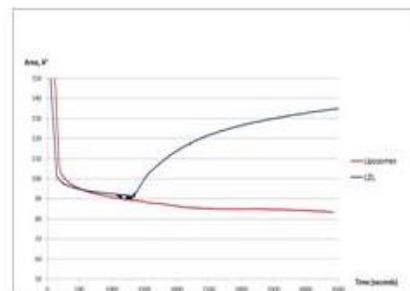
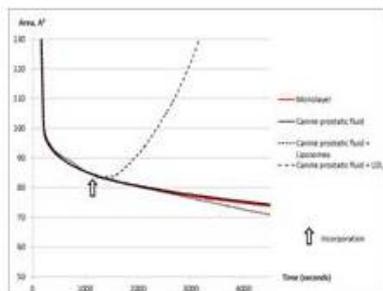
La membrane de Langmuir-Blodgett (302LL, Nima Technology, UK)
(Photo à gauche et schéma légendé à droite).



Etape 2 (à gauche): Dépôt en goutte à goutte des constituants de la membrane (lipides du commerce) sur la sous-phase liquide pour constituer la membrane biomimétique. Etape 3 (à droite): Equilibration du système (Déplacement des barrières amovibles) et constitution d'une monocouche.



Etape 3. Injection en sous phase des biomolécules (LDL, liposomes, LP)



Etape 4. Obtention des courbes de variation de la pression avec le logiciel NIMA 516

PUBLICATIONS CONCERNANT CETTE THESE

1er Article :

The benefits of liposomes for chilling canine sperm during 4 days at 4°C.

Redha Belala, Lamia Amirat, Juliette Delay, Marie-Hélène Ropers, Jocya Le Guillou, Marc Anton, Eric Schmitt, Chantal Thorin Sandrine Michaud, Rachid. Kaidi, Daniel Tainturier, Djemil Bencharif

Publié à la revue : **ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE (Animal Reproduction Science 168 (2016) 100–109)**, « IF : 1.511 ».

2ème Article :

Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders.

R. Belala, L. Briand-Amirat, L. Vinciguerra, D. Tainturier, R. Kaidi, C. Thorin, S. Michaud, M. Anton, D. Bencharif

Publié à la revue : **RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE (RVS 106 (2016) 66-73)**, « IF : 1.409 ».

1ère Communication orale: Presented at the 19th Annual Conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction (ESDAR), organized in Albena, Bulgaria, 17th – 19th September 2015

Comparison of functional parameters of dog semen frozen after 6 hrs of equilibration in three different media.

R. Belala, D. Tainturier, L. Vinciguerra, R. Kaidi, C. Thorin, J. Le Guillou, E. Schmitt, S. Michaud, L. Amirat-Briand, D Bencharif

Publiée à: *Reprod Dom Anim* 50 (Suppl. 3), 27–32 (2015) **OC 7.3**, doi: 10.1111/rda.12582.

2ème Communication orale: Presented at the 18th Annual congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Hannover, Germany (11-12th September 2015)

Liposomes, a viable alternative to LDL for chilling canine sperm at +4°C?

J. Delay, **R. Belala**, D. Tainturier, J. Le Guillou, E. Schmitt, S. Michaud, L. Amirat-Briand, D. Bencharif.

Poster: Presented at the 18th Annual congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Hannover, Germany (11-12th September 2015).

Effect of equilibration time on motility parameters of dog sperm frozen in three different media.

R. Belala, D. Tainturier, L. Vinciguerra, R. Kaidi, C. Thorin, J. Le Guillou, E. Schmitt, S. Michaud, L. Amirat-Briand and D. Bencharif ¹