



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologies

*Mémoire*

*En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique*

*Option*

*Biotechnologie et Pathologie Moléculaire*

*Thème*

Cryoconservation de la semence canine - Mise au point d'un nouveau diluant à base de plasma  
de jaune d'œuf lyophilisé

*Présenté par Mlle KHENATELA Reguia Lilia & LZAREFAhlem*

*Devant le Jury :*

<i>Mme KANANE A</i>	<i>GRADE MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Président (e)</i>
<i>Mme DJAZOUL ALIM FZ</i>	<i>GRADE PR</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examineur (ice)</i>
<i>Mr BELALA Redha</i>	<i>GRADE MCA</i>	<i>INV, Blida1</i>	<i>Promoteur (ice)</i>
<i>Mme BENAZOUZ Fella</i>	<i>GRADE MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur (ice)</i>

*Session 2019 / 2020*



## **Dédicace**

*A ma famille, ma vie, mon pilier, ma source d'amour et d'inspiration,*

***A ma Maman,** pour m'avoir soutenue depuis toujours dans cette voie que j'ai choisi. Pour n'avoir jamais douté de moi et de mes capacités. Pour être toujours présente à mes côtés, lors des événements marquants de ma vie mais aussi lors des petits moments simples du quotidien. Tu resteras mon modèle, mon inspiration, celle que je ne parviendrais jamais à égaler par sa force, sa gentillesse et son courage à toute épreuve. Ma maman, merci du fond du cœur.*

***A mon Papa,** pour avoir toujours cru en moi et en mes capacités. Pour ton soutien sans faille durant ces longues années où les études passaient avant tout. Pour la fierté que tu me portes au quotidien, sans jamais vraiment me le dire. Pour être toi aussi un modèle de force, d'ambition et de patience sans faille. Merci de m'avoir porté jusque là. Tout ça, mon parcours, celle que je suis devenue aujourd'hui, c'est grâce à vous.*

***A mes chers frères Salim, Akram et Mehdi.** Veuillez trouvez dans ce travail un modeste témoignage de mon admiration et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond*

***A mes tantes Yasmina, khadidja, Karima, Abla et leurs petites familles.***

*Vous m'avez toujours soutenu et vous continuez à le faire. Je vous considère beaucoup plus comme mes grandes sœurs que comme des tantes et je ne trouverais les mots pour vous exprimez mon affection et mon estime. Je vous souhaite tous bonheur, santé et prospérité.*

***A mes grands parents Aldjia ,Lkhdar,Hania, Moussa.***

*Je vous dédie cette thèse en témoignage de gratitude d'estime et d'attachement. Puisse dieu vous accorder santé, longue vie et prospérité.*

***A ma meilleure amie Soumia** que ces cinq années partagées ensemble ne sont que le début d'une longue et belle amitié. Je te souhaite tous le bonheur, santé et prospérité.*

**KHENATELA Reguia Lilia**



## Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Ma réalisation de ce mémoire a été grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Nous tiendrons à exprimer toute notre reconnaissance à notre promoteur Mr BELALA Redha Pour sa patience, sa gentillesse, sa générosité sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion. Qu'il veuille bien agréer nos profondes et éternelles gratitudes

On remercié également notre Co-promotrice Mme BENAZOUZ Fella pour ses précieux conseils, explications et orientations dont on a pu bénéficier.

Que Mme KANANE A trouve nos plus profonds remerciements d'avoir accepter de présider ce travail.

Que Mme DJAZOULI ALIM FZ soit chaleureusement remercié d'avoir voulu examiner ce travail, et pour son professionnalisme et sa disponibilité tout au long de ces deux ans de scolarité.

A tous nos enseignants en particulier de département de biotechnologie, Nous vous remercions d'avoir enrichi nos connaissances et de nous avoir guidés durant toutes ces années

**Nous remercions particulièrement le Directeur Mr «BELALA Redha» de la plateforme de biotechnologie et reproduction des carnivores (P.B.R.C) de l'université de Blida1 pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche nécessaires à la réalisation de ce travail.**

**Nous remercions aussi le centre de recherche scientifique et technique en analyses physico- chimiques C.R.A.P.C de Boussmaïl pour sa collaboration très efficace et d'avoir pris en charge à titre gracieux la lyophilisation de nos échantillons de plasma de jaune d'œuf.**

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
1.1. Généralités sur le spermatozoïde canin .....	3
1.1.1. Définition .....	3
1.1.2 .Description du spermatozoïde .....	3
1.1.3. Capacitation et fécondation .....	4
1.2. La semence canine.....	5
1.2.1. Composition de la semence canine.....	5
1.2.2. Récolte de la semence canine .....	6
1.3. Analyse de la semence canine .....	6
1.3.1. Techniques conventionnelles.....	6
1.3.1.1. Examen Macroscopique .....	7
1.3.1.1.1. Volume de l'éjaculat.....	7
1.3.1.1.2. Couleur et Aspect....	7
1.3.1.2. Examen Microscopique .....	7
1.3.1.2.1. La mobilité massale .....	8
1.3.1.2.2. La mobilité progressive (individuelle) .....	8
1.3.1.2.3. La numération spermatique .....	8
1.3.2. Techniques non conventionnelles.....	9
1.3.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis) .....	9
1.3.2.2. La cytométrie en flux .....	11
1.3.2.2.1. Définition.....	11
1.3.2.2.2. Le système optique (Capture des signaux lumineux) .....	12
1.3.2.2.3. Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux .....	13

1.3.2.2.4. Application de la cytométrie en flux dans l'analyse du spermatozoïde canin .....	14
1.4. Conservation et cryoprotection des spermatozoïdes canins .....	15
1.4.1. Les dilueurs de congélation .....	15
1.4.1.1. Les cryoprotecteurs proprement dit (CPA) .....	16
1.4.1.2. Les protecteurs membranaires .....	17
1.5. Les protecteurs membranaires .....	18
1.5.1. Le Jaune d'œuf .....	18
1.5.2. Les Lipoprotéines a faible densité (LDL) .....	19
1.5.2.1. Structure .....	19
1.5.2.2. Procédés d'Extraction analytique des LDL .....	20
1.5.2.3. Application .....	20
1.5.2.4. Hypothèses mécanistiques des LDL .....	21
1.5.2.5. Limitations .....	22
1.5.3. Le Plasma du Jaune d'œuf .....	22
1.6. Insémination artificielle .....	24
1.6.1. Suivi du cycle œstral chez la chienne .....	24
1.6.1.1. Frottis vaginaux .....	24
1.6.1.2. Dosage de la progestérone .....	25
1.6.1.3. Contrôle échographique de l'ovulation .....	25
1.6.2. Insémination artificielle intra-utérine chez la chienne .....	26

## **CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES**

2.1. Objectifs .....	27
2.2. Lieux d'expérience .....	27
2.3. Animaux .....	28

2.4. Préparation des dilueurs .....	28
2.4.1. Extraction des LDL .....	28
2.4.2. Fractionnement du plasma de jaune d'œuf .....	28
2.4.3. Lyophilisation du plasma de jaune d'œuf .....	30
2.4.3.1. Protocole de lyophilisation .....	30
2.4.3.2. Mode opératoire .....	31
2.4. Préparation des dilueurs.....	33
2.5. Récolte et évaluation initiale de la semence .....	34
2.5.1. Récolte de la semence.....	34
2.5.2. Evaluation initiale de la semence.....	35
2.5.2.1. Mobilité massale .....	35
2.5.2.2. Mobilité individuelle.....	35
2.5.2.3. Mesure de la concentration des spermatozoïdes .....	35
2.6. Dilution de la semence.....	36
2.7. Équilibration et conditionnement de la semence .....	36
2.8. Congélation et décongélation de la semence .....	37
2.8.1. Congélation de la semence .....	37
2.8.2. Décongélation des paillettes .....	38
2.9. Evaluation de la fertilité spermatique in vitro .....	38
2.9.1. Analyse spermatique assistée par ordinateur (Système HT-IVOS II®) .....	38
2.9.2. Analyse spermatique par cytométrie en flux (Système EasyCyte Plus II et EasySort) .....	40
2.10. Tests de fertilité in-vivo (Insémination artificielle intra-utérine) .....	41
2.11. Collecte des données et analyse statistique .....	43

## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

3.1. Résultats et discussion .....	44
<b>Conclusion</b> .....	50
<b>Recommandations</b> .....	51
<b>Les références bibliographiques</b> .....	52
<b>Les annexes</b> .....	65



## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Représentation schématique d'un spermatozoïde.....	4
<b>Figure 02</b> : Cellule de thoma.....	9
<b>Figure 03</b> : le comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre .....	9
<b>Figure 04</b> : représentation schématique de VAP , VCL et VSL.....	11
<b>Figure 05</b> : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux .....	11
<b>Figure 06</b> : Les différents systèmes intervenants dans le cytomètre en flux.....	12
<b>Figure 07</b> : Interaction de la lumière avec la cellule .....	13
<b>Figure 08</b> : Structure d'une lipoprotéine à faible densité (LDL pour low density lipoprotein). .....	20
<b>Figure 09</b> : Procédé analytique de fractionnement du JO et d'extraction des LDL.....	23
<b>Figure 10</b> : détermination du moment de l'ovulation par le suivi échographique des ovaires : en A, les follicules mûrs sont nettement visibles avant l'ovulation , à comparer avec l'image B,recueillie après l'ovulation .....	26
<b>Figure 11</b> :Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores/Université de Blida1. ....	27
<b>Figure 12</b> : Centre National de Recherche en analyse Physico-chimique (CRAPC) de Bousamïl.....	28
<b>Figure 13</b> : Récolte de jaune d'œuf.....	29
<b>Figure 14</b> : Homogénéisation de jaune d'œuf.....	29
<b>Figure 15</b> : Distribution de produit finale dans les Eppendorf.....	29
<b>Figure 16</b> : Filtration de plasma jaune d'œuf .....	30
<b>Figure 17</b> : Installation des flacons du PJO congelé sur la lyophilisateur .....	32

<b>Figure 18 :</b> Elimination d'eau .....	33
<b>Figure 19 :</b> Plasma de jaune d'œuf lyophilisé .....	33
<b>Figure 20 :</b> la récolte de sperme chez le chien .....	34
<b>Figure 21:</b> Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien (préspermatique, spermatique, post-spermatique).....	34
<b>Figure 22:</b> Mettre les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie .....	34
<b>Figure 23:</b> Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation. ....	35
<b>Figure 24:</b> Le photomètre SDM1, Minitub .....	36
<b>Figure 25 :</b> La machine de remplissage et de scellement de paille .....	36
<b>Figure 26 :</b> Le congélateur utilisé pour congeler les paillettes.....	37
<b>Figure 27 :</b> semence canine immergée dans une bonbonne d'azote liquide .....	37
<b>Figure 28 :</b> Décongélateur de paillettes Cito.....	38
<b>Figure 29:</b> Système Hamilton-Thorn-IVOS II. ....	40
<b>Figure 30 :</b> Le cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA).....	41
<b>Figure 31:</b> inséminations artificielles intra-utérines sous vidéo-endoscopie. ....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	5
<b>Tableau 02</b> : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine .....	8

## Liste des abréviations

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

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

**CASA** : Coputer Aided Sperme Analysis.

**DMSO** :diméthylsulfoxyde .

**FITC** :isothiocyanate de fluorescéine.

**FSC** :Forward Scatter.

**HDL** : pour High Density Lipoproteins.

**IA** : Insémination artificielle.

**J.O** : Jaune d'Oeuf.

**LDL** pour Low Density Lipoproteins.

**PE**: phycoérythryne .

**PJO I**: Plasma Jaune d'œuf lyophilisé.

**PJO N**: Plasma Jaune d'œuf Natif.

**PMOT** :Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs .

**PSA**:Pisum Sativum agglutinine .

**SCA**: Sperm Class Analyzer.

**SLN**: pour Solid Lipid Nanoparticles.

**SPZ** : Spermatozoïde.

**SSC** :Side Scatter.

**TMOT** :La motilité totale

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

**VLC** : Curvilinear Velocity : qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde

au cours de la période d'observation.

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

## RESUME

---

La présente étude se divise en deux parties : La première partie vise à optimiser le protocole de lyophilisation du PJO (pour obtenir une meilleure redispersibilité des particules après reconstitution) en étudiant quatre facteurs à savoir la vitesse de congélation du PJO avant lyophilisation (rapide/lente), le milieu de reconstitution (Tris-Fructose/NaCl 0.9%/PBS), la durée de dessiccation primaire (12H/24H/36H) et secondaire (0H/8H/16H). Le PJO est fractionné au niveau de la PBRC/Univ Blida1 selon le protocole conventionnel de MacBee et Cotterill (1979) puis transporté sous +4°C jusqu'au CRAPC de Bousmaïl où plusieurs cycles de lyophilisation sont réalisés (répliqué 3x) au moyen d'un lyophilisateur de laboratoire (Lyophilisateur ALPHA 2-4 LSC Plus, MARTIN CHRIST) en comparant les différentes modalités de variation des quatre facteurs étudiés. Le protocole de lyophilisation le plus adapté au PJO semble être d'une durée globale de 2H, avec une congélation rapide, et d'une dessiccation primaire de 24H (Vide : 100mTorr, -20°C) et d'une dessiccation secondaire de 16H (Vide : 100mTorr, +20°C). Ce protocole optimisé est retenu pour les expériences de la deuxième partie. La deuxième partie vise à évaluer la fertilité *in-vitro* et *in-vivo* de la semence canine congelée dans trois dilueurs à base de 6% LDL (Dilueur de référence) et 40% de PJO liquide et lyophilisé (Concentrations optimales rapportées dans les études précédentes). Pour cela, 60 éjaculats sont récoltés à partir de 20 chiens à raison de 3 récoltes par chien à 3 jours d'intervalle minimum. Après une évaluation initiale de la congélabilité, la semence est diluée dans les trois dilueurs étudiés (n=20 / diluer), équilibrée à +4°C pendant 1h30 puis conditionnée dans des paillettes fines Cassou (0.25mL) et congelés dans un congélateur programmable (Mini-Digit-Cool, IMV-Technologies, Aigles, France) puis immergées dans de l'azote liquide et conservées dedans jusqu'à utilisation. Les Paillettes sont décongelées à 37°C pendant 30secondes dans un décongélateur de paillasse (IMV-Technologies, Aigles, France) puis utilisées soit pour une analyse de fertilité *in vitro* par Analyseur d'image (HT-IVOS II) et cytomètre en flux (EasyCyte Plus II), soit pour une insémination artificielle. Les cycles œstraux des femelles sont suivis par cytologie vaginale combinée au dosage de la P4 pour déterminer le moment optimum de fécondabilité. Deux inséminations à 24H d'intervalle sont effectuées en déposant 200-300 millions de spermatozoïdes (8-12 paillettes) dans l'utérus par voie transcervicale au moyen d'un vidéo-endoscope (Télépack Vet, Storz). La gestation est confirmée après au moins 15 jours par échographie (MyLab Class C, ESAOTE) puis suivie jusqu'à mise-bas.

**Mots clés :** Spermatozoïde canin – Plasma de jaune d'œuf – LDL – Lyophilisation – Dilueurs de congélation – Fertilité spermatique *in vitro* – Fertilité *in vivo* - Insémination artificielle.

تنقسم هذه الدراسة إلى قسمين: يهدف الجزء الأول إلى تحسين بروتوكول التجفيف الخاص بـ بلازما صفار البيض (للحصول على قابلية تشتت أفضل للجسيمات بعد إعادة التركيب) من خلال دراسة أربعة عوامل وهي معدل تجميد بلازما صفار البيض قبل التجفيف (سريع / بطيء) ، ووسط إعادة التكوين (0.9 NaCl / Tris- Fructose / PBS / ) ، مدة التجفيف الأولي (12H / 24H / 36H) والثانوي (0H / 8H / 16H). يتم تجزئة بلازما صفار البيض على مستوى PBRC / Univ Blida1 وفقاً للبروتوكول التقليدي لـ MacBee وCotterill(1979) ثم يتم نقله عند +4 درجة مئوية إلى مركز CRAPC في بوسماعيل حيث يتم تنفيذ العديد من دورات التجفيف (مكررة x3) عن طريق مجفف بواسطة مرطب مختبري (Lyophilisateur ALPHA 2-4 LSC Plus, MARTIN CHRIST) من خلال مقارنة الطرائق المختلفة للتباين للعوامل الأربعة المدروسة. يبدو أن بروتوكول التجفيف الأنسب لـ بلازما صفار البيض يكون لمدة ساعتين ، مع تجميد سريع ، وتجفيف أولي لمدة 24 ساعة (فراغ: 100 متر جداً ، -20 درجة مئوية) وتجفيف ثانوي لمدة 16 ساعة. (فراغ: 100 متر ، +20 درجة مئوية). يتم الاحتفاظ بهذا البروتوكول الأمثل لتجارب الجزء الثاني. يهدف الجزء الثاني إلى تقييم الخصوبة في المختبر وداخل الجسم الحي للسائل المنوي للكلاب المجمدة في ثلاثة مخففات بناءً على 6% LDL (مخفف مرجعي) و 40% من بلازما صفار البيض السائل والمجفف بالتجميد (التركيزات المثلى المذكورة في الدراسات السابقة). لهذا الغرض ، يتم جمع 60 فذقاً من 20 كلباً بمعدل 3 مجموعات لكل كلب في فترة 3 أيام على الأقل. بعد التقييم الأولي لقابلية التجميد ، يتم تخفيف السائل المنوي في مخففات الثلاثة التي تمت دراستها (n = 20 / مخفف) ، ومعايرتها عند +4 درجة مئوية لمدة ساعة و 30 دقيقة ثم تكييفها في القصبيات Cassou (0.25 مل) وتجميدها في مبرمج قابل للبرمجة الفريزر. (Mini-Digit-Cool ،IMV-Technologies ،Aigles ، فرنسا) ثم غمرها في النيتروجين السائل وتخزينها هناك حتى الاستخدام. يتم إذابة القصبيات عند 37 درجة مئوية لمدة 30 ثانية في آلة إذابة الثلج من القصبيات (-IMV Technologies ،Aigles ، فرنسا) ثم تُستخدم إما لتحليل الخصوبة في المختبر باستخدام محلل الصور (HT-IVOS II) ومقياس التدفق الخلوي (EasyCyte Plus II) ، أو للتلقيح الاصطناعي. ويتبع الدورات الشبقية للإناث علم الخلايا المهبلي جنباً إلى جنب مع تحديد P4 لتحديد اللحظة المثلى للخصوبة. يتم إجراء عمليتي تلقيح كل 24 ساعة بإيداع 200-300 مليون حيوان منوي (8-12 قشة) في الرحم عن طريق الصوت عبر عنق الرحم باستخدام منظار الفيديو (Telepack ،Vet ،Storz).

يتم تأكيد الحمل بعد 15 يوماً على الأقل عن طريق الموجات فوق الصوتية (MyLab Class C ،ESAOTE) ثم يتم مراقبتها حتى الولادة.

**الكلمات المفتاحية:** الحيوانات المنوية للكلاب - بلازما صفار البيض - LDL - التجفيد - مخففات التجميد - خصوبة الحيوانات المنوية في المختبر - الخصوبة في الجسم الحي - التلقيح الاصطناعي.

## ABSTRACT

---

This study is divided into two parts: The first part aims to optimize the lyophilization protocol of the EYP (to obtain a better redispersibility of the particles after reconstitution) by studying four factors namely the freezing rate of the EYP before lyophilization (fast / slow), the reconstitution medium (Tris- Fructose / NaCl 0.9% / PBS), the duration of primary (12H / 24H / 36H) and secondary (0H / 8H / 16H) drying. The EYP is fractionated at the PBRC / Univ Blida1 level according to the conventional protocol of MacBee and Cotterill (1979) then transported at + 4 ° C to the CRAPC in Bousmaïl where several lyophilization cycles are carried out (replicated 3x) by means of a bench-top freeze-dryer (Lyophilizer, ALPHA 2-4 LSC Plus, MARTIN CHRIST) by comparing the different modalities of variation of the four factors studied. The lyophilization protocol most suited to the PJO seems to be of an overall duration of 2 hours, with rapid freezing, and a primary desiccation of 24 hours (vacuum: 100mT<sub>oo</sub>, -20 ° C) and a secondary desiccation of 16 hours. (Vacuum: 100mT<sub>oo</sub>, + 20 ° C). This optimized protocol is retained for the experiments of the second part. The second part aims to assess the in-vitro and in-vivo fertility of frozen canine semen in three extenders based on 6% LDL (Reference extender) and 40% of liquid and lyophilized PJO (Optimal concentrations reported in previous studies). For this, 60 ejaculates are collected from 20 dogs at the rate of 3 collections per dog at 3 days minimum interval. After an initial evaluation of freezability, the semen is diluted in the three extenders studied (n = 20 / dilute), equilibrated at + 4 ° C for 1 hour 30 minutes then conditioned in Cassou fine straws (0.25mL) and frozen in a programmable freezer. (Mini-Digit-Cool, IMV-Technologies, Aigles, France) then immersed in liquid nitrogen and stored there until use. The Straws are thawed at 37 ° C for 30 seconds in a bench-top thaw unit (IMV-Technologies, Aigles, France) then used either for an in vitro fertility analysis using an image analyzer (HT-IVOS II) and flow cytometer ( EasyCyte Plus II), or for artificial insemination. The estrous cycles of the females are followed by vaginal cytology combined with the determination of P4 to determine the optimum moment of fertility. Two inseminations at 24 hour intervals are performed by depositing 200-300 million spermatozoa (8-12 straws) in the uterus by transcervical voice using a video endoscope (Telepack Vet, Storz). Pregnancy is confirmed after at least 15 days by ultrasound (MyLab Class C, ESAOTE) and then monitored until parturition.

**Key words:** Canine sperm - Egg yolk plasma - LDL - Lyophilization - Freezing diluents - Sperm fertility in vitro - Fertility in vivo - Artificial insemination.



## INTRODUCTION

---

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) (1), (2). Il est composé de LDL (85%) et de glycoprotéines globulaires (15%) (Essentiellement  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans le protocole d'extraction des LDL pures (3), (4).

Des études récentes ont montré l'intérêt du PJO liquide comme alternative au JO entier dans la cryoconservation de la semence équine (5), canine (6) et chez le buffle (7). Des études plus récentes ont montré son intérêt en remplacement des LDL et ont évalué l'efficacité d'une forme lyophilisée du PJO.

En effet, le PJO liquide a été récemment lyophilisé avec succès dans la réfrigération (8) et la congélation (9) de la semence canine en remplacement aux LDL. Ces auteurs ont comparé trois concentrations (20%, 40% et 60%) de PJO liquide et lyophilisé et ont rapporté la concentration de 40% de PJO lyophilisé comme l'optimum dans la congélation et la réfrigération. Cette concentration a permis de préserver les paramètres cinétiques et les caractéristiques d'intégrité structurale du spermatozoïde canin de façon équivalente au PJO liquide et aux LDL (dilueur de référence). Sur la base de ces résultats, un nouveau dilueur composé de 40% PJO lyophilisé a été proposé.

Cependant, les études précédentes (8),(9) se sont heurtées à une contrainte technique à savoir une mauvaise qualité de remise en suspension (redispersibilité de particules) lors de la reconstitution du PJO lyophilisé. Ceci ne semblait pas avoir d'impact sur l'efficacité cryoprotectrice du dilueur mais induisait la persistance de granules capables d'interférer avec l'analyse d'image par le système CASA. Face à ce problème, les auteurs avaient tenté plusieurs méthodes d'homogénéisation de la suspension tel que le bac à ultrason, mais sans succès.

Cette mauvaise redispersibilité des particules du lyophilisat a été déjà évoquée dans la littérature lors de la lyophilisation des nanoparticules de lipides solides (SLN : pour Solid Lipid Nanoparticles) et la solution serait une optimisation du protocole de lyophilisation en ajustant quelques paramètres de ce processus (10). En effet, l'étude des facteurs pouvant avoir un effet sur la redispersibilité du PJO lyophilisé (i.e. la vitesse de congélation, la durée de la dessiccation « primaire et secondaire » et le milieu de reconstitution) permettrait de proposer un protocole optimisé.

## INTRODUCTION

---

Par ailleurs, ces auteurs qui ont pu réaliser pour la première fois une lyophilisation du PJO sans altération de son action cryoprotectrice envers le spermatozoïde canin, se sont basés dans leurs évaluations sur les paramètres de fertilité *in vitro* (i.e. mobilité et intégrité spermatiques), mais n'ont pas réalisé de tests de fertilité *in vivo* (i.e. insémination artificielle et taux de gestation) qui demeurent indispensables pour confirmer cette efficacité.

Ainsi, le présent travail vise les objectifs suivants :

- ✓ Optimiser le protocole de lyophilisation du PJO (pour obtenir une meilleure redispersibilité des particules après reconstitution) en étudiant les facteurs suivants :
  - la vitesse de congélation : rapide vs. lente,
  - le temps de la dessiccation primaire : 12H, vs.24H vs.36H,
  - le temps de la dessiccation secondaire : 0H, vs.8H vs. 16H,
  - le milieu de reconstitution : Solution Tris-Fructose vs. NaCl 0.9% vs. PBS,
- ✓ Évaluer la fertilité *in-vitro* et *in-vivo* de la semence canine congelée dans trois dilueurs à base de 6% LDL (Dilueur de référence) et 40% de PJO liquide et lyophilisé (Concentrations optimales rapportées dans les études précédentes).

### 1.1. Le spermatozoïde canin :

#### 1.1.1. Définition :

Le spermatozoïde correspond au gamète mâle, il transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié (11),(12). Il mesure soixante-deux à soixante-dix micromètres ; la queue mesure à elle seule cinquante-cinq micromètres.

#### 1.1.2. Description du spermatozoïde :(figure 1).

- **La tête.**

La tête du spermatozoïde est aplatie dorso-centralement. Elle contient le noyau, l'acrosome, le cytosquelette et le cytoplasme. (13)

- **Le flagelle :**

Le flagelle est l'élément moteur du spermatozoïde qui lui permet d'atteindre l'ovocyte et de pénétrer dans celui-ci. Le flagelle se divise en quatre portions : la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. (13)

- **La membrane cytoplasmique :**

La membrane cytoplasmique est constituée de lipides : des lipides liés à des éthers en grande quantité, des acides gras insaturés en quantité proportionnellement plus importante que dans la membrane cytoplasmique des cellules somatiques, des glycolipides, des phospholipides et des stérols. Contrairement aux lipides des membranes cytoplasmiques des cellules somatiques, la plupart des lipides membranaires des spermatozoïdes ne peuvent pas diffuser librement au sein de la membrane. (13)

La membrane cytoplasmique subit des changements de composition :

- au niveau lipidique : pendant le passage des spermatozoïdes dans l'épididyme et dans les voies génitales femelles (changement des proportions en cholestérol et en Phospholipides) ;
- au niveau protéique : les protéines se réorganisent pendant le passage dans l'épididyme, le passage dans le tractus génital de la femelle et au cours des dernières étapes de la capacitation et de la fécondation. (13)

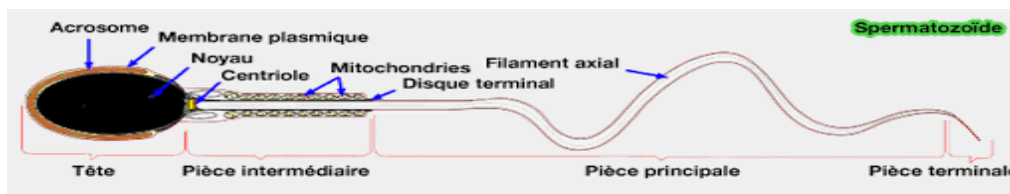


Figure 01 : Représentation schématique d'un spermatozoïde (14).

### 1.1.3. Capacitation et fécondation :

**La fécondation** est l'union du noyau d'un spermatozoïde avec le noyau de l'ovocyte au sein du cytoplasme activé de l'ovocyte (15). Elle correspond à un enchainement d'évènements. La première étape correspond à la capacitation du spermatozoïde au cours de laquelle le spermatozoïde subit des changements protéiques et lipidiques et devient **hyperactivé**(16). Avant leur capacitation, les spermatozoïdes présentent une mobilité linéaire. Après la capacitation, les spermatozoïdes acquièrent une mobilité beaucoup moins linéaire avec des mouvements de flagelles plus amples. Cette mobilité facilite la traversée de la zone pellucide particulièrement élastique chez les mammifères.

Au niveau cellulaire, **la capacitation** se caractérise par une modification des protéines et des lipides membranaires avec une diminution du ratio cholestérol sur phospholipides. La perte de cholestérol est à l'origine d'une augmentation du pH intracellulaire due à une augmentation des bicarbonates intracellulaires. Cette augmentation de pH entraîne une augmentation de la concentration en calcium et une augmentation de l'activité de l'adénylcyclase. De plus, certains récepteurs membranaires participants à l'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte sont exprimés (17).

Lorsque le gamète mâle pénètre les enveloppes de l'ovocyte, il y a fusion de la partie antérieure de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane externe de l'acrosome. C'est la **réaction acrosomique**. Cette fusion est suivie du relargage progressif des enzymes de l'acrosome et notamment des enzymes hydrolytiques qui permettent la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. (17), (13).

L'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte est suivi de la fusion de leurs membranes plasmiques et de l'entrée du spermatozoïde. Cette pénétration entraîne une activation métabolique de l'ovocyte ainsi que la **réaction corticale**. Celle-ci correspond à la digestion protéolytique des sites d'attachements des spermatozoïdes et à une modification enzymatique

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

des enveloppes de l'ovocyte ; ces changements permettent d'éviter la polyspermie. (15)

Enfin, il y a formation des pronucléi mâle et femelle et fusion des noyaux permettant l'obtention d'un **zygote diploïde**. La première division cellulaire peut alors débuter. (15)

### 1.2. La semence canine :

#### 1.2.1. Composition de la semence canine :

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (**les spermatozoïdes**) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires (**Le liquide séminal**)

**Le liquide séminal** est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles. (19)

Le liquide séminal intervient à la fois dans le transport et la nutrition des spermatozoïdes.

Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation. (19)

**L'éjaculat** de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (20).

L'éjaculat de chien est composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (tableau1). (18)

**Tableau 1:** Description des trois phases de l'éjaculat du chien (18)

	Origine	aspect	Volume	Ph	Composition
La phase pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 - 6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide Prostatique
La phase spermatique	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion Epididymaire
La phase post-spermatique	Prostatique	Clair	4 à 30 mL et plus	6.5 - 7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide Prostatique

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### 1.2.2. Récolte de la semence canine :

La méthode de récolte manuelle par **masturbation** est utilisée uniquement dans l'espèce canine et constitue la méthode de choix pour cette espèce. Elle permet une récupération facile de la semence et l'obtention d'une semence de meilleure qualité et en plus grande quantité que lors de **l'utilisation d'un vagin artificiel**, et décrite plus loin. En effet, il a été montré un effet délétère du latex du vagin artificiel sur la semence canine et, de plus, la récolte par stimulation manuelle est celle qui mime au mieux l'accouplement naturel (21)

La récolte de sperme peut avoir plusieurs objectifs :

- La réalisation d'une insémination artificielle
- La conservation du sperme : cryoconservation ou réfrigération
- L'évaluation de la qualité de la semence dans différents cas : chez un vieux chien, chez des animaux qui n'ont pas reproduit depuis longtemps, chez des mâles pour lesquels plusieurs essais de saillies/inséminations n'ont pas abouti à une gestation ou qui ont engendré de petites portées ou enfin simplement avant une saillie afin d'évaluer la qualité de la semence
- L'objectivation d'une affection : une évaluation de la semence peut être indiquée en cas d'écoulements au niveau du prépuce, d'hématospermie ou d'hématurie. (22)

### 1.3. Analyse de la semence canine :

#### 1.3.1. Techniques conventionnelles:

Les techniques conventionnelles d'analyse de la semence sont basées sur la microscopie photonique et sont mieux adaptées à l'analyse de la semence fraîche afin d'évaluer le fonctionnement testiculaire et épидидymaire (23) ainsi que l'aptitude à la congélation dans le cadre d'une évaluation initiale.

Les examens utilisés en routine sont communément appelés le spermogramme qui est l'étude du sperme au sens strict aussi bien à l'échelle macroscopique que microscopique. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité sont analysés (18)

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### 1.3.1.1. Examen Macroscopique :

#### 1.3.1.1.1. Volume de l'éjaculat :

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte. La mesure du volume donne quelques indications, elle est importante pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat mais elle n'est pas indicatrice de la qualité de la semence. (20)

Si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post-spermatique a un volume beaucoup plus important que celui des autres phases (20), (24).

#### 1.3.1.1.2. Couleur et Aspect :

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

Il est intéressant de noter que l'intensité de l'opacité de la seconde phase est corrélée à la concentration en spermatozoïdes. Ainsi, si la deuxième phase est translucide, cela suggère une azoospermie (25).

Des colorations anormales de l'une ou de plusieurs phases peuvent être observées :

- une coloration jaunâtre, évoquant une contamination par de l'urine ou du pus,
- une coloration verdâtre, mettant en évidence la présence de pus
- une coloration rougeâtre, suggérant un saignement prostatique ou pénien (26).

### 1.3.1.2. Examen Microscopique :

La mobilité des spermatozoïdes, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, doit être évaluée le plus rapidement possible, dans les 10 à 15 minutes après la récolte. Elle peut être évaluée par observation au microscope ou de façon automatisée.

Lors d'une évaluation au microscope, on observe une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle, Idéalement, l'observation doit se faire sur un microscope à contraste de phase, muni d'une platine chauffante à 37°C pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement. La mobilité est diminuée par les températures extrêmes, les diluants acides, l'urine, le pus, le sang et le lubrifiant. Il faut noter que la mobilité est augmentée à proximité des bulles d'air et est diminuée au niveau des bords de la lamelle (27), (20).

Si la semence est trop concentrée, elle est diluée dans une solution tampon saline.

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

L'évaluation de la mobilité permet également d'observer d'éventuelles agglutinations des spermatozoïdes (16).

### 1.3.1.2.1. La mobilité massale :

Elle reflète les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 2). Cette observation simple mais peu précise est révélatrice à la fois de la vitesse de progression et de la concentration des spermatozoïdes (18).

**Tableau 2 :** Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (28).

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

### 1.3.1.2.2. La mobilité progressive (individuelle) :

Le sperme est examiné au fort grossissement entre lame et lamelle afin d'apprécier le pourcentage de spermatozoïdes qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés spermatozoïdes fléchant (29), (30).

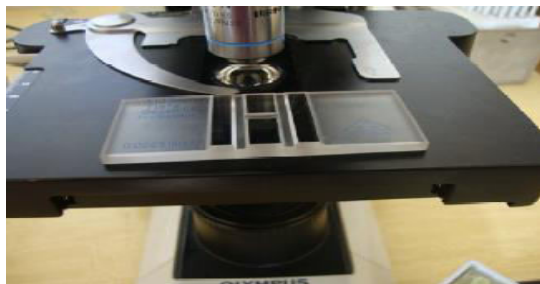
### 1.3.1.2.3. La numération spermatique :

Les méthodes manuelles sont rapides, simples et ne nécessitent pas beaucoup de matériel. Le sperme est tout d'abord dilué dans un liquide hypertonique comme du chlorure de sodium à 3% qui immobilise les spermatozoïdes. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des cellules sanguines. Si le sperme semble concentré en spermatozoïdes à l'examen microscopique au faible grossissement, une dilution au centième voire au deux centième est effectuée alors que si le sperme est peu concentré, une dilution au dixième voire au vingtième suffit. Une fois la dilution effectuée, une goutte de la

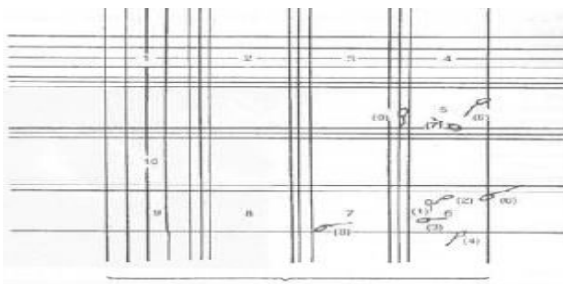


## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma. Les spermatozoïdes sont comptés selon des règles strictes et des facteurs multiplicatifs permettent d'obtenir la concentration et le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. L'interprétation de la concentration est délicate car elle dépend de la quantité de fluide prostatique récoltée lors du prélèvement. (30)



**Figure 02 :** Cellule de thoma(31)



**Figure 03 :** Le comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre (32)

### 1.3.2. Techniques non conventionnelles :

Les techniques non conventionnelles d'analyse de la semence permettent d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation (23) et d'estimer la fertilité du mâle (*in vitro*) (33). Deux techniques, capables d'être combinées dans le cadre d'une approche multiparamétrique, sont présentées ci-dessus.

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

Les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA (Computer-Aided Semen Analysis). Ces derniers permettent d'obtenir de nombreux paramètres objectifs en évaluant un très grand nombre de spermatozoïdes en très peu de temps.

Deux systèmes sont actuellement disponibles pour l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes dans l'espèce canine.

Le système Hamilton-Thorne a été validé pour son utilisation chez le chien par IGUEROUADA et VERSTEGEN (34). Il s'agit d'un analyseur d'images qui permet d'obtenir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, la vitesse moyenne, la vitesse de déplacement curvilinéaire, la vitesse de déplacement en ligne droite, la linéarité, l'amplitude et la fréquence

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

du déplacement latéral de la tête, l'amplitude et la fréquence des battements flagellaires.

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

- La motilité totale (TMOT) : ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.

- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) : Ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP > 50  $\mu\text{m}/\text{seconde}$  et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.

- Le pourcentage des spermatozoïdes statiques : Il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.

- les mouvements rapides, moyens et lents des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).

- les différentes vitesses de progression :

- La "VCL" (Velocity Curvilinear): Cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.
- La "VSL" (Velocity Straight line) : Cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet. (26) La "VAP" (Velocity Average Pathway) : Cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.
- L'ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) : Ce paramètre correspond à la distance, en  $\mu\text{m}$ , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.
- Le BCF (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (Nombre de battement par unité de temps).
- Il s'agit d'une méthode d'analyse rapide qui permet d'analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage coûteux réservé pour les centres spécialisés (32), (23), (35).

Ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur capacitation sont reconnus car ils présentent une vitesse curvilinéaire et une amplitude du déplacement latéral de la tête augmentée ainsi qu'une linéarité diminuée.

Cette méthode a donc l'avantage d'estimer plus précisément la mobilité d'un grand nombre de

# CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

spermatozoïdes en un minimum de temps, et cela de façon assez simple, après un paramétrage minutieux. De plus, elle peut être utilisée sur de la semence fraîche mais également de la semence réfrigérée ou encore congelée/décongelée (32), (23),(35).

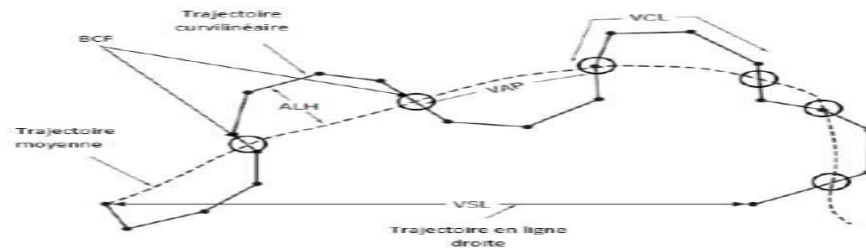


Figure 04 : représentation schématique de VAP , VCL et VSL(36).

## 1.3.2.2. La cytométrie en flux :

### 1.3.2.2.1. Définition

La cytométrie mesure les propriétés optiques d'une cellule, transportée par un liquide vecteur caractérisé par le flux, jusqu'à une source d'excitation lumineuse étant la plupart du temps un laser. En effet, elle effectue une analyse multiparamétrique, de cellules individualisées, à la vitesse de milliers d'évènements à la seconde. L'ordinateur associé calcule des statistiques sur la distribution des paramètres mesurés et les représentent sous forme d'histogramme ou cytogramme. Enfin, l'ultime fonction du Cytomètre est de séparer les sous-populations cellulaires en fonction de leurs propriétés optiques et permettre ainsi un tri cellulaire (37).

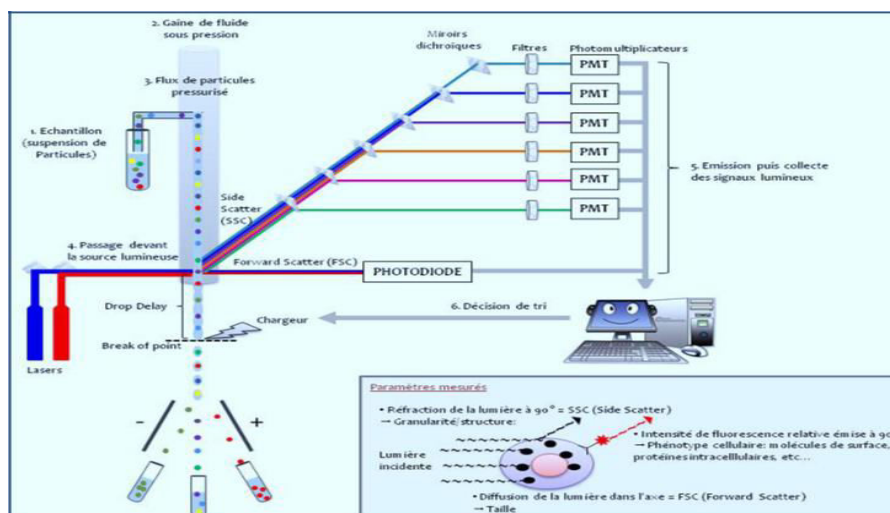
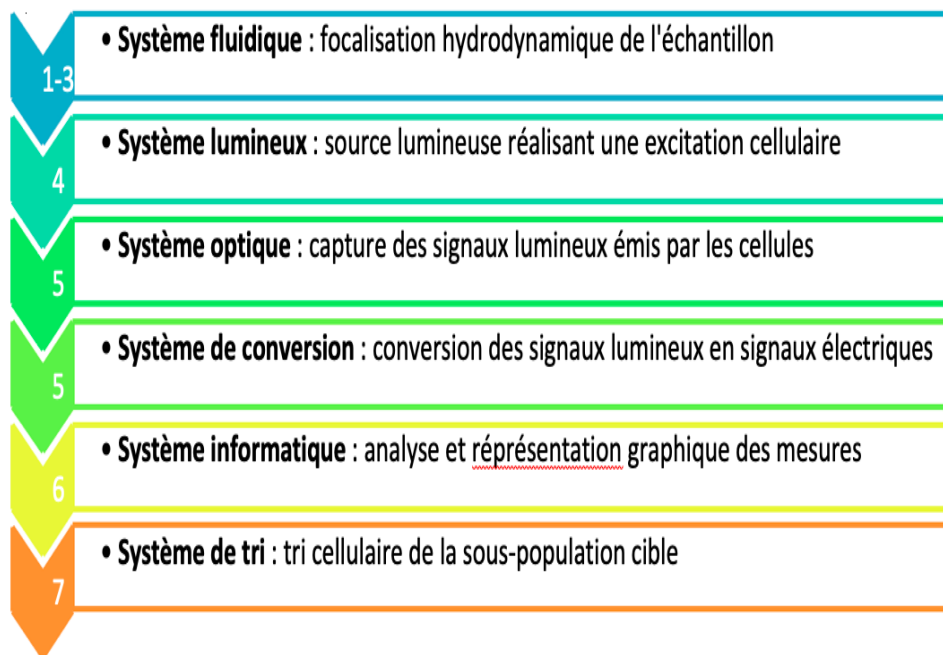


Figure 05: Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux (38).



**Figure 06** : Les différents systèmes intervenant dans le cytomètre en flux

### 1.3.2.2.2. Le système optique (Capture des signaux lumineux) :

Le système optique intervient lors du passage des cellules au niveau de la source lumineuse. Ces dernières émettent en réponse à cette excitation différents signaux lumineux qui sont collectés et dirigés vers les photo-détecteurs à l'aide d'un banc optique.

Les signaux lumineux détectés sont de différentes natures (39), (40), (41):

- FSC (Forward Scatter) : lumière diffractée aux petits angles, elle renseigne sur la taille des particules et sur la surface cellulaire.
- SSC (Side Scatter) : la lumière réfléchiée et réfractée aux grands angles, elle renseigne sur la granularité et la complexité cellulaire.

La fluorescence émise à 90°C dépend du phénotype cellulaire :

- Fluorescence émise par la cellule elle-même : auto fluorescence.
- Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome avec liaison spécifique à la cellule.

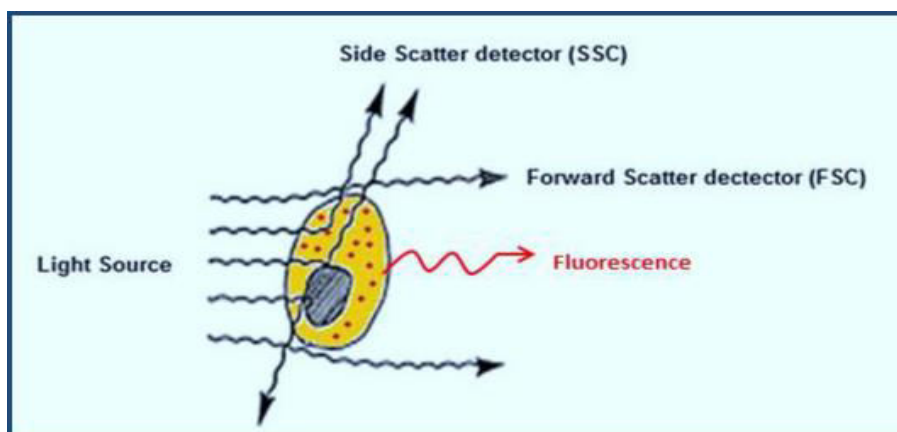


Figure 7 : Interaction de la lumière avec la cellule (42)

### 1.3.2.2.3. Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux :

Les dernières années furent riches en progrès technique pour la détermination de la fertilité de la semence. Les analyses classiques de la semence par l'étude macroscopique, et microscopique de la mobilité et de la morphologie ont comme inconvénient d'être subjectives.

Aujourd'hui le gold-standard dans les laboratoires est une analyse de la mobilité grâce à l'analyseur d'images CASA, associée à des tests de fluorescence évaluant l'intégrité fonctionnelle de la semence (43). Ces dernières sont réalisées soit à la microscopie à fluorescence, soit au cytomètre en flux. Or la cytométrie en flux possède de nombreux avantages face à la microscopie à fluorescence :

- Rapidité : une analyse de plus de 10 000 cellules en 1 minute.
- Répétabilité : analyse objective et standardisée.
- Sensibilité de détection : mise en lumière de différences subtiles au sein de la semence, notamment lors de traitement in-vitro différents (44).
- Analyse multiparamétrique, quantitative, de paramètres qualitatifs : permet de mieux cibler le pouvoir fécondant de la semence (45), (46).
- Analyse quantitative par dénombrement : mise à disposition de nombreuses données pouvant permettre une étude statistique entre les variables étudiées et la fertilité de la semence (47), (48).

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Les principaux inconvénients de cette technique sont le coût du cytomètre en flux et des colorants fluorescents. Même si la cytométrie en flux est très utilisée dans les laboratoires d'andrologie humaine, cet investissement est encore très peu réalisé en médecine vétérinaire.

Les autres inconvénients sont les réglages du Cytomètre qui doivent être réalisés minutieusement, et les risques dus aux matériels utilisés. On peut citer les risques chimiques et biologiques dus à l'origine même des échantillons. Il y a également un risque optique avec l'utilisation du laser et un risque électrique par l'utilisation de haute tension associée à une partie fluide.

### **1.3.2.2.4. Application de la cytométrie en flux dans l'analyse du spermatozoïde canin :**

De nombreuses sondes fluorescentes ont été appliquées à l'évaluation des caractéristiques spécifiques du sperme chez les chiens. La cytométrie en flux permet l'observation caractéristique des cellules telles que la taille, la forme et la fonction du spermatozoïde, qui peut être révélé par un fluorochrome ou étiquette fluorescente. L'analyse des événements détectés sur les dots plots donne des informations précises et hautement fiables sur l'intégrité de la membrane, statut acrosomique, activité mitochondriale, état de capacitation, peroxydation lipidique, apoptose et dommages à l'ADN.

- **Intégrité de la membrane :**

L'intégrité de la membrane des spermatozoïdes de chien peut être évalués à l'aide de combinaisons de différents fluorescents sondes comprenant SYBR-14 avec PI (49),(50),(51).

Viabilité membranaire des spermatozoïdes intacts présentent une fluorescence verte tandis que les cellules mortes deviennent fluorescentes en rouge

Les fluorochromes SYBR-14 / PI étaient plus sensible par rapport aux méthodes conventionnelles d'évaluation des morts vivants (49) en partie due à l'absence d'interférence des particules de graisse et autres matériel présent dans le sperme étendu. La détection d'une troisième sous-population (c'est-à-dire les spermatozoïdes moribonds) est un autre avantage (52). Cette population se compose de spermatozoïdes présentant à la fois rouge et verte fluorescence représentant un sperme légèrement endommagé à perdu sa capacité à exclure PI (53).

- **Statut acrosomal :**

Le statut acrosomal peut être évalué à l'aide de lectines, comme l'agglutinine d'arachide

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

d'*Arachis hypogaea* (PNA) ou *Pisum Sativum* agglutinine (PSA), conjuguée avec sondes fluorescentes comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), phycoérythrine (PE) ou Alexa Fluor® (54),(55),(56),(57),(52),(58). Le marquage PNA est spécifique pour le membrane acrosomale et se lie aux fragments b-galactose, tandis que le PSA marque les fractions a-mannose et a-galactose de la matrice acrosomale (48). PNA l'agglutinine semble être plus spécifique avec moins de liaison non spécifique à d'autres régions du spermatozoïde. Par conséquent, il est généralement préféré au PSA (59).

L'absence de fluorescence sur le sperme vivant est indicative d'un acrosome intact, et la fluorescence est indicative d'une perturbation acrosomique ou d'une réaction acrosomique (48).

### **1.4. Conservation et cryoprotection des spermatozoïdes canins :**

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 (60).

Le succès de la conservation du spermatozoïde 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'addition des dilueurs, le type de tampon utilisé, l'addition des stabilisants membranaires, l'ajout du cryoprotecteur proprement dit (glycérol) ainsi que la durée d'équilibration avant congélation.

#### **1.4.1. Les dilueurs 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.

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

L'adaptation empirique des dilueurs utilisés chez le bovin a initié l'emploi de tampons à base de glucose-phosphate (61) citrate (62), chloride-phosphate (63), lactose (64), Tris (tri « hydroxymethyl » aminomethane) (65) et Tris-fructose-citrate (66), (67), (68) 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 (69),(70) ,(71),(72), (73),(74).

Le tampon Tris-citrate a une action supérieure aux autres tampons pour la congélation (75) du sperme canin.

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

### **1.4.1.1. Les cryoprotecteurs proprement dit (CPA) :**

Les dilueurs de congélation 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



## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

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  $-6^{\circ}\text{C}$  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 (76).

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 (77).

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 (78). 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 (78). 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 (73), (78).

### 1.4.1.2. Les protecteurs membranaires :

Les protecteurs membranaires de refroidissement ou stabilisants membranaires sont représentés essentiellement par le JO qui est largement utilisé comme additif 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 (79), (78).

Dans la plupart des études sur la congélation du sperme canin, le jaune d'œuf entier fût utilisé

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

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.

### **1.5. Les protecteurs membranaires :**

Les agents stabilisants membranaires (80) encore appelés protecteurs membranaires de refroidissement (81), 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.

#### **1.5.1. 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 (82). Depuis, il a été exploré de façon extensive pour devenir rapidement le protecteur par excellence du spermatozoïde contre le choc de refroidissement.

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 (83) ainsi qu'une grande variabilité biologique dans sa composition tenant à plusieurs facteurs tels que la race, l'âge et la nutrition des poules (83), (84).

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 (85). 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

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Lipoproteins) (86),(88),(87),(89). 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 (90). 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 (90). Ils interfèrent également avec certains dosages biochimiques (92).

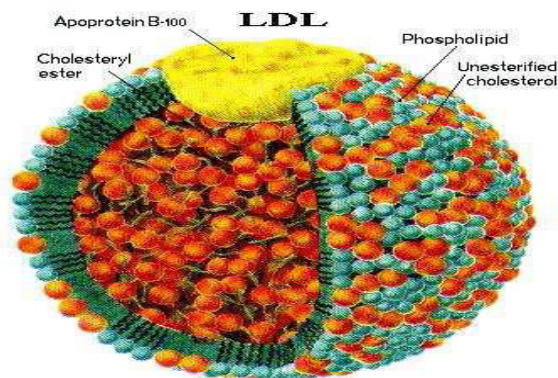
A cause de tous ces inconvénients, le JO devait être substitué dans les dilueurs de conservation de la semence. Cet impératif a donné lieu à une recherche intense pour comprendre d'abord ses mécanismes d'action et isoler les substances responsables de ses facultés cryoprotectrices. Ainsi il a été mis en évidence que les propriétés cryoprotectrices du JO sont liées aux lipoprotéines de basse densité (LDL pour Low Density Lipoproteins) qu'il contient (88), (93), (94), (3).

### **1.5.2. Les Lipoprotéines à faible densité (LDL) :**

#### **1.5.2.1. 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 (92) Les LDL présentent une densité de 0,98 (96), 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 (97).

Une suspension des LDL est considérée comme une microémulsion d'huile liquide stabilisée par une membrane de phospholipides et de protéines (98). 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 (99). Elles sont constituées d'un cœur de lipides neutres entouré par une monocouche de phospholipides et d'apoprotéines (Figure08). La taille des lipoprotéines dépendrait essentiellement des proportions de triglycérides et de stérols formant le cœur apolaire et dans une moindre mesure, de la teneur en phospholipides (100).



**Figure 08 :** Structure d'une lipoprotéine à faible densité (LDL pour low density lipoprotein)  
(101).

### 1.5.2.2. Procédés d'Extraction analytique des LDL :

Divers protocoles d'extraction des LDL à partir du JO ont été publiés (88), (102), (103) 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 (104) 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 (Figure09)

### 1.5.2.3. 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) (104) et ceux d'Amirat et ses collaborateurs (2004) (89) qui ont montré que la concentration optimale était de 8% (w/v).

Chez le chien, les travaux de Bencharif et ses collaborateurs en 2008 (105) 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 (105) 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 (106) 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 (107) ont montré en 2013 l'efficacité des LDL dans la congélation de la semence équine en supplémentant le dilueur équin (INRA 82) avec

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

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 (5) 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.

### 1.5.2.4. 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 protégeaient 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 (109), (80), (110).

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 » (112), (110), (111). Cependant, les rôles respectifs des protéines et des lipides en interaction avec la membrane plasmique ne sont pas encore clairement établis (5).

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 (113). Ce phénomène a été parfaitement étudié en semence bovine et plusieurs approches biophysiques ont permis récemment de le mettre en évidence (114), (115).

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 (116). Cependant aucune exploration biophysique d'une éventuelle interaction de ces protéines

avec les LDL n'a été faite chez le chien.

### **1.5.2.5. 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) (3).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 (117) .et de lyophilisation n'a été couronné de succès (1), (2).

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, Le plasma de jaune d'œuf (PJO), obtenu par fractionnement du JO entier (en granules et plasma), est un bon candidat.

### **1.5.3. 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) (110), (111). Il est composé des LDL (15%) et des glycoprotéines globulaires (85%) (Essentiellement  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans l'extraction des LDL pures (95), (4).

Le procédé de fractionnement du PJO a été évoqué pour la première fois par Burley et Cook en 1961 (121) puis décrit en détail par MacBee and Cotterill en 1979(122). Il s'agit d'un procédé analytique (voir Figure 9) mais très simple, basé sur une double centrifugation après dilution avec une solution saline.

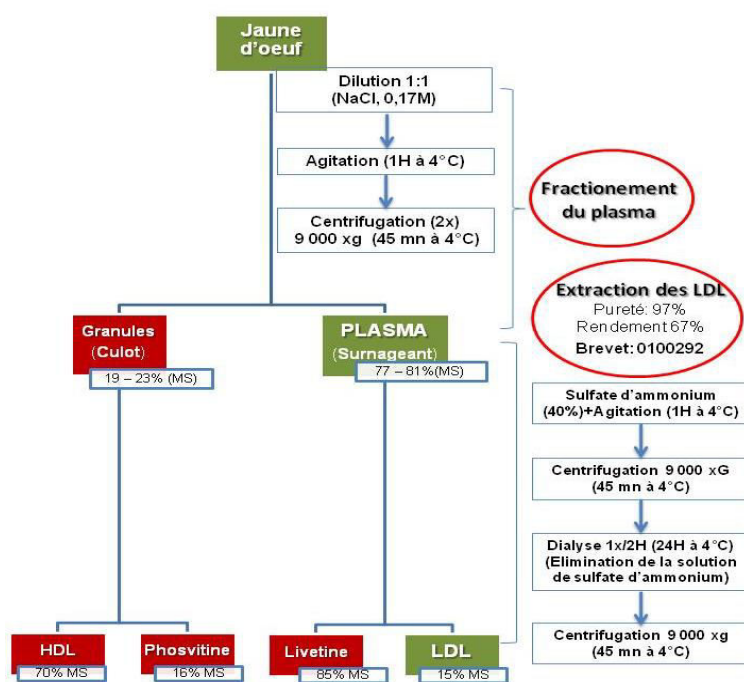
Des études récentes ont montré que le PJO naturel peut être une alternative viable au JO entier

## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

dans la cryoconservation de la semence équine (5) et canine (122).Pillet et ses collaborateurs (5) 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 industrielle des dilueurs à base de PJO.

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.

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 09 :** Procédé analytique de fractionnement du JO(122) et d'extraction des LDL (3).

**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).

### **1.6. Insémination artificielle:**

Les spermatozoïdes du sperme congelé n'ayant pas la même qualité que ceux du sperme frais ou réfrigéré, l'insémination doit répondre à deux exigences supplémentaires pour pouvoir prétendre au succès :

- la détermination encore plus précise de la fécondabilité de la chienne,
- la mise en place intra-utérine de la semence.

Le suivi du cycle œstral est le facteur le plus souvent incriminé dans les échecs d'insémination (16).

#### **1.6.1. 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. (95)

##### **1.6.1.1. 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.



## CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

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 (108).

### 1.6.1.2. 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.

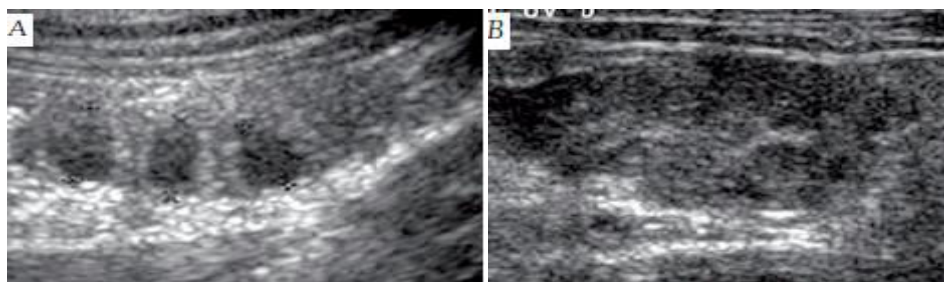
Au moment du pic de LH, on enregistre une légère augmentation de la progestérone au-dessus du niveau de base grâce au phénomène de lutéinisation pré-ovulatoire des follicules.

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 dépasse 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(16).

### 1.6.1.3. Contrôle échographique de l'ovulation :

Devenu accessible avec les progrès de l'échographie et compte tenu de la définition que l'on peut obtenir avec les appareils récents, il est maintenant possible de suivre la déhiscence des follicules ovariens en réalisant le suivi échographique des ovaires (**Figure 09**), dès que la progestéronémie a atteint le seuil correspondant à l'ovulation de la chienne (118).

dès que la progestéronémie atteint 8 ng/ml, on effectue matin et soir une échographie des ovaires et l'on insémine 48 heures après l'ovulation ainsi déterminée avec la plus grande précision possible (118).



**Figure 10** : détermination du moment de l'ovulation par le suivi échographique des ovaires : en A, les follicules mûrs sont nettement visibles avant l'ovulation, à comparer avec l'image B, recueillie après l'ovulation (119).

### **1.6.2. Insémination artificielle intra-utérine chez la chienne :**

Pendant très longtemps et pratiquement depuis les débuts de l'IA canine, le col utérin de la chienne a été considéré comme infranchissable, compte tenu de sa petite taille et de la position de son ouverture qui n'est pas située au centre de l'extrémité antérieure du vagin, mais en position antéro-supérieure. La semence congelée était inséminée par la voie vaginale : les résultats, médiocres, ne dépassaient pas 30 % de gestations avec une prolificité réduite de 20 à 40 % (64). L'insémination intra-utérine par voie chirurgicale (par laparotomie ou laparoscopie) a permis d'améliorer les résultats mais en limitant le nombre d'interventions (120). Un progrès considérable a été réalisé en 1975 avec la mise au point d'un cathéter, le cathéter de Farstad, permettant de franchir le col utérin. Son utilisation implique une certaine dextérité de l'opérateur qui doit d'une main, mobiliser le col de l'utérus par palpation trans-abdominale et de l'autre, en rechercher l'ouverture avec l'extrémité du cathéter introduit dans le vagin (74), (123). Il est très difficile, voire impossible, d'inséminer par cette méthode les chiennes de grandes races ou celles dont la sangle abdominale est très musclée ou infiltrée de graisse, ce qui exclut environ 5 à 10 % des chiennes présentées. Les résultats publiés sont remarquables puisque selon les auteurs, de 70 % à 80 % de gestations sont obtenues, l'expérience et la dextérité de l'inséminateur expliquant sans doute la différence de pourcentages (124) ; ces résultats sont cependant à comparer aux 90 % de gestations consécutives à des inséminations de semence fraîche et ce, indépendamment de la voie utilisée (125). Aujourd'hui, la fibroscopie vaginale, qui permet la parfaite visualisation du col, est la méthode de choix et d'avenir car elle facilite grandement le passage du col utérin avec la sonde de Farstad et ne nécessite pas une formation particulière de l'inséminateur ; elle est en outre applicable à toutes les races (126).

### 2.1. Objectifs :

Le présent travail vise les objectifs suivants :

- ✓ Optimiser le protocole de lyophilisation du PJO (pour obtenir une meilleure redispersibilité des particules après reconstitution) en étudiant les quatre facteurs ou paramètres suivants :
  - Vitesse de congélation : Procès rapide vs. Procès lent,
  - Durée de la dessiccation primaire : 12H, vs.24H vs. 36H
  - Durée de la dessiccation secondaire : 0H, vs.8H vs. 16H
  - Milieu de reconstitution : Solution Tris-Fructose vs. NaCl 0.9% vs. PBS,
- ✓ Évaluer la fertilité in-vitro et surtout in-vivo de la semence canine congelée dans trois dilueurs à base de 6% LDL (Dilueur de référence) et 40% de PJO liquide et lyophilisé (Concentrations optimales vérifiées dans les études précédentes).

### 2.2. Lieux d'expérience :

Notre étude a été réalisée au niveau de Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (**PBRC**) de l'université de Blida1.



**Figure 11:** Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores/Université de Blida1.

Les essais de lyophilisation du PJO ont été a été réalisés au niveau du Centre National de

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Recherche en analyse Physico-Chimique (CRAPC) de Bousmaïl.



**Figure 12:** Centre National de Recherche en analyse Physico-chimique (CRAPC) de Bousmaïl.

### 2.3. Animaux :

Vingt (20) chiens adultes, en bonne santé et de différentes races, appartenant soit à la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (**PBRC**) soit à des propriétaires particuliers ou des éleveurs conventionnés consentants de participer à l'étude, sont récoltés par stimulation manuelle à raison de 4 récoltes par chien et à intervalle d'au moins 3 jours entre deux récoltes.

Pour les tests de fertilité *in vivo*, 60 chiennes adultes, en bonne santé et de différentes races appartenant soit à la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (**PBRC**) soit à des propriétaires particuliers ou des éleveurs conventionnés consentants de participer à l'étude, ont été utilisées pour les tests de fertilité *in vivo*.

### 2.4. Préparation des dilueurs :

#### 2.4.1. Extraction des LDL :

L'extraction des LDL a été effectuée suivant la technique décrite par Moussa et ses collaborateurs en 2002 (3).

Le dilueur à base de 6% LDL a servi de milieu de référence dont l'efficacité a été démontrée auparavant (110).

#### 2.4.2. Fractionnement du plasma de jaune d'œuf :

Le PJO est préparé par fractionnement du jaune d'œuf de poule selon le protocole décrit par MacBee et Cotterill en 1979 (122). Le jaune d'œuf est dilution (1 :1) avec une solution saline à 0.9%, puis homogénéisé à 4°C à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 1heure. Deux

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

---

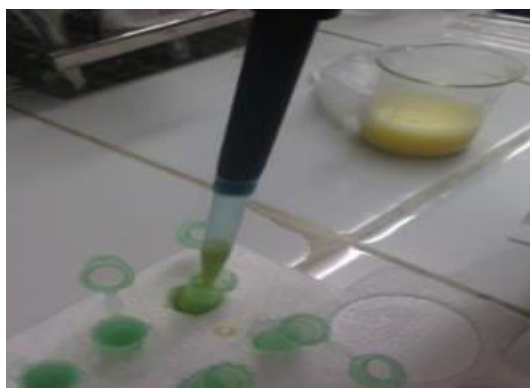
cycles de centrifugation à 12000xg pdt 1heure sont lancés et le surnageant est filtré au filtre-seringue de 0.22 $\mu$ m. Le plasma de jaune d'œuf fractionné est aliquoté en tube de 02 mL puis immédiatement acheminé sous 4°C (glacière) au laboratoire (CRAPC pour lyophilisation).



**Figure 13 :** Récolte de jaune d'œuf (8).



**Figure 14 :** Homogénéisation de jaune d'œuf(8).



**Figure 15:** Distribution de produit finale dans les Eppendorf(8).



**Figure 16:** Filtration de plasma jaune d'œuf(8).

### **2.4.3. Lyophilisation du plasma de jaune d'œuf :**

#### **2.4.3.1. Protocole de lyophilisation :**

La lyophilisation est un traitement de stabilisation qui consiste à congeler le produit puis le sécher par sublimation. Ce processus comprend trois phases principales à savoir la congélation du produit, la dessiccation primaire ou sublimation (le produit est soumis à une certaine température négative et une certaine pression du vide pendant une durée donnée) et finalement la dessiccation secondaire destinée à éliminer l'humidité résiduelle du produit (le produit est soumis à une certaine température positive et une certaine pression du vide pendant une durée donnée).

Le protocole de lyophilisation utilisé dans les études précédentes a causé une mauvaise dispersibilité des particules après reconstitution du lyophilisat. Ce protocole est basé sur un cycle de 48H divisé en trois phases :

- Congélation rapide à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 30min,
- Dessiccation primaire (Durée : 43H20min, pression du vide : 100mTorr, température :  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Dessiccation secondaire (Durée : 4H10min, pression du vide : 100mTorr, température :  $+20^{\circ}\text{C}$ ).

La première partie de notre étude, vise à optimiser le protocole de lyophilisation afin d'obtenir une meilleure qualité de dispersibilité des particules pendant la reconstitution du lyophilisat. Nous étudions quatre facteurs ou paramètres et leurs effets sur la qualité de dispersibilité. Pour chaque facteur étudié, nous réalisons plusieurs cycles de lyophilisation (chaque cycle est répliqué 3 fois) en comparant les différentes possibilités ou variations du facteur étudié :

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

---

- Effet de la vitesse de congélation du PJO : comparaison entre la congélation rapide et la congélation lente.
- Effet de la durée de la dessiccation primaire : comparaison entre trois durées (12H versus 24H versus 36H).
- Effet du temps de la dessiccation secondaire : comparaison entre trois durées (0H versus 8H versus 16H).
- Effet du milieu de reconstitution : comparaison entre trois milieux de reconstitution (Tris-Fructose versus 0.9%NaCl versus PBS)

L'évaluation de la qualité de dispersibilité des particules (remise en suspension) se fait par :

- Observation au microscope après reconstitution du lyophilisat (PJO) et appréciation de la qualité de dispersibilité (Présence ou absence de granules et agrégats de particules non dissoutes)
- Analyse informatique au système CASA (HT IVOS II) après dilution d'un échantillon de semence fraîche dans un milieu (TRIS-Fructose-Acide citrique) préparé à base du PJO lyophilisé et appréciation de la qualité du mouvement des spermatozoïdes en présence (mauvaise dispersibilité) ou absence (bonne dispersibilité) de granules et agrégats de particules non dissoutes.

A l'issue de cette étude d'optimisation, un protocole de lyophilisation, basé sur la vitesse de congélation et la durée de dessiccation primaire et secondaire les plus adaptées. Ce protocole optimisé sera utilisé dans la suite de nos expériences.

### **2.4.3.2. Mode opératoire :**

La lyophilisation est réalisée au niveau du Centra National de Recherche en Analyse Physico-chimiques (CRAPC) de Bousmaïl à l'aide d'un lyophilisateur de laboratoire (ALPHA 2-4 LSC Plus, MARTIN CHRIST) selon le mode opératoire suivant :

#### **a)-Congélation du PJO :**

La congélation du PJO a été faite selon deux méthodes :

- Congélation rapide : Mettre le PJO à la température de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pendant 2 heures.
- Congélation lente : Refroidir la PJO dans un congélateur programmable depuis la température ambiante jusqu'à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  à la vitesse de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  par minute. Ensuite laisser le PJO à cette température pour un temps additionnel de 2 heures.

Récupérer les flacons de plasma de jaune d'œuf congelé, puis les couvrir par un papier

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

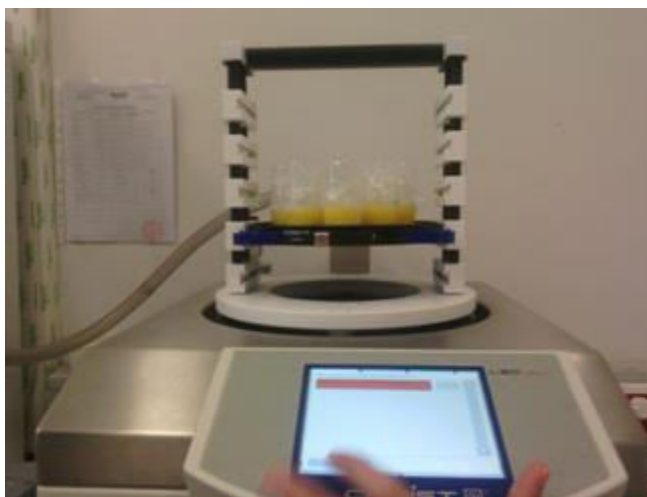
---

alimentaire poreux permettant l'élimination d'eau.

### b)-Lyophilisation primaire :

Doit se dérouler sans décongeler le produit avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace (conditionnée par la température) pour l'élimination de l'eau non liée.

Installer les flacons congelés de plasma jaune d'œuf sur le plateau le lyophilisateur (**Figure 17**), Lancer le programme :



**Figure 17** : Installation des flacons du PJO congelé sur la lyophilisateur (8).

Trois programmes sont lancés séparément, avec en commun une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100mTorr et en variant la durée comme suit :

- 12 heures
- 24 heures
- 36 heures

### c)-Lyophilisation secondaire :

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

Trois programmes sont lancés séparément, avec en commun une température de  $+20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100mTorr et en variant la durée comme suit :

- 0 heure
- 08 heures
- 16 heures





**Figure 18 :** Elimination d'eau (8)

A la fin de la procédure de lyophilisation on obtient un produit de plasma de jaune d'œuf déshydraté ou lyophilisé.



**Figure 19 :** Plasma de jaune d'œuf lyophilisé(8).

#### **2.4. Préparation des dilueurs :**

Trois dilueurs de congélation (6% LDL, 40% du plasma jaune d'œuf liquide et lyophilisé) ont été préparés à l'aide d'un diluant de base commun (tris base) augmenté respectivement de 6 % LDL ou de 40 % PJO liquide (v/v) ou lyophilisé (w/v). Le dilueur de base était composé de trihydroxyméthylamino méthane (3,026 g), d'acide citrique (1,7 g), de fructose (1,25 g), de streptomycine (0,1 g), d'enrofloxacin à 10 %, de glycérol (3,2 ml) et d'eau distillée (quantité suffisante pour 100 ml de dilueur) (9).

Le LDL 6% a été utilisé comme diluant de référence (contrôle) car il a été démontré précédemment qu'il préserve efficacement les spermatozoïdes canins. (105).

### 2.5. Récolte et évaluation initiale de la semence :

#### 2.5.1. Récolte de la semence :

Soixante(60) éjaculats sont récoltés à partir de 20chiens à raison de 3 récoltes par chien à 3 jours d'intervalle minimum. La récolte est faite par stimulation manuelle et de façon fractionnée sur trois tubes (fraction pré-spermatique, spermatique et post-spermatique) au moyen d'un cône de récolte en silicone attaché à un tube de prélèvement en pyrex gradué (graduation de 0.1mL) en présence d'une chienne en chaleur.

Les trois fractions sont évaluées, mais seulement la fraction riche en spermatozoïdes (deuxième) est utilisée.



**Figure 20 :** la récolte de sperme chez le chien(127).



**Figure 21:** Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien (pré-spermatique, spermatique, post-spermatique) (127).



**Figure 22:** Mettre les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie (127).

### 2.5.2. Evaluation initiale de la semence :

Chaque éjaculat (n=60) a été évalué immédiatement après sa collecte pour juger de sa qualité et son aptitude à la congélation au moyen de la mobilité massale, individuelle et la mesure de la concentration en spermatozoïdes.

#### 2.5.2.1. Mobilité massale :

Une goutte de sperme frais est déposée sur une lame pré-chauffée et observée immédiatement au microscope à platine chauffée (+37°C) avec un faible grossissement(x100). Les mouvements par vagues, de réunion et de dispersion des spermatozoïdes sont appréciés et une note de 0 à 5 est alors attribuée selon l'échelle de MILOVANOV.

Seulement les éjaculats avec une mobilité massale de 4 et plus sont inclus dans notre étude.

#### 2.5.2.2. Mobilité individuelle :

Une goutte de sperme dilué avec du liquide prostatique est déposée entre lame et lamelle et observée au grossissement (x400). Le pourcentage des spermatozoïdes fléchant (ayant des déplacements rapides en lignes droites) est apprécié subjectivement et une note est donnée entre 0 et 5 (0% - 100%). Seulement les éjaculats possédant une mobilité individuelle de 3 (60 – 70%) à plus sont inclus dans l'étude.



**Figure 23:** Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation (127).

#### 2.5.2.3. Mesure de la concentration des spermatozoïdes :

La concentration des spermatozoïdes a été évaluée au moyen d'un photomètre étalonné pour le sperme canin (SDM Canine, Minitub, Allemagne). Après calibrage de l'appareil, la cellule de lecture est remplie d'une goutte de sperme pur puis chargée dans l'appareil. Le résultat est rendu en quelques secondes. Cet appareil avait déjà fait l'objet d'un étalonnage externe dans notre laboratoire au regard de la technique conventionnelle recommandée par l'OMS (Cellules de type amélioré de Neubauer).

Seulement les éjaculats ayant une concentration minimale de  $200 \times 10^6$  spz/ml et une mobilité

massale de 4 et plus ont été congelés.



**Figure 24:** Le photomètre SDM1, Minitub.

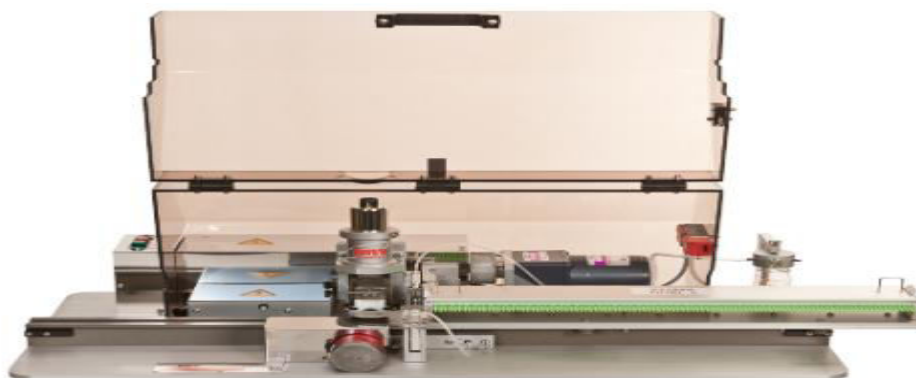
### **2.6. Dilution de la semence :**

Les trois éjaculats issus de chacun des 20 chiens récoltés (à intervalle de trois jour) sont dilués dans un bain marie à +37°C respectivement dans les trois dilueurs 6%LDL (dilueur de référence), 40% de PJO liquide et lyophilisé. En fonction du volume (V1) et de la valeur de concentration initiale (C1) de l'éjaculat, un volume calculé de dilueur est ajouté pour avoir une concentration finale (C2) de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre selon la relation  $C1 \times V1 = C2 \times V2$ .

### **2.7. Équilibration et conditionnement de la semence :**

La semence ainsi diluée, est mise en équilibration (refroidissement) à +°4C dans une vitrine réfrigérée horizontale (IMV-Technologies, Aigles, France) pendant 1 heure 30 minutes.

Après équilibration, la semence est conditionnée au moyen d'une machine à remplir et à souder (MRS I, IMV-Technologies, Aigles, France) dans des paillettes fines (0.25mL) pré-identifiées par impression (Domino jet). Une couleur de paillette est choisie pour chacun des trois dilueurs. Les paillettes remplies et soudées sont au fur et à mesure déposées sur des racks puis laissées en vitrine réfrigérées jusqu'à congélation.



**Figure 25 :** La machine de remplissage et de scellement de paille (128).

### 2.8. Congélation et décongélation de la semence

#### 2.8.1. Congélation de la semence

La congélation est faite au moyen d'un congélateur programmable (Mini Digit Cool, IMV-Technologies, Aigles, France) et d'une courbe spécifique de congélation conventionnelle pour semence canine.

Une fois la température de la cuve du congélateur a atteint +4°C, les paillettes sur racks sont transférées rapidement de la vitrine réfrigérée à la cuve du congélateur et le programme de congélation est enclenché. A la fin de ce programme (-140°C), les paillettes sont immergées dans l'azote liquide pour atteindre la température finale de -196°C et enfin stockées jusqu'à utilisation dans un container (GT40) rempli d'azote liquide et dont le niveau d'azote est contrôlé et remis à niveau régulièrement.



**Figure 26** : Le congélateur utilisé pour congeler les paillettes(128).

Puis immergé verticalement dans de l'azote liquide et stocké pendant 24 heures.



**Figure 27** : semence canine immergée dans une bonbonne d'azote liquide(128).

### 2.8.2. Décongélation des paillettes

La décongélation des paillettes se fait à la température de +37°C pendant 30 secondes dans un décongélateur de paillettes adapté (IMV, Technologies, Aigles, France).



**Figure 28** : Décongélateur de paillettes Cito.(128).

### 2.9. Evaluation de la fertilité spermatique *in vitro* :

L'exploration de la fertilité *in vitro* est faite par une nouvelle approche multiparamétrique qui associe ou confronte les données de deux techniques d'analyse très performantes et objectives à savoir l'analyse d'image (HT IVOS II) qui explore la mobilité et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes et la cytométrie de flux (EasyCyte plus II) qui explore la vitalité, l'intégrité membranaire, acrosomique et chromatique ainsi que le statut oxydatif. Le cytomètre en flux est doté d'un logiciel (EasySoft) permettant d'intégrer toutes ces données dans une approche multiparamétrique en leur appliquant des seuils de signification pour donner un bilan de fertilité spermatique *in vitro* beaucoup plus prédictif de la fertilité *in vivo*.

#### 2.9.1. Analyse spermatique assistée par ordinateur (Système HT-IVOS II®) :

Un examen de motilité par l'analyseur assisté par ordinateur (Système Hamilton Thorn -IVOS II) et une chambre d'analyse d'une profondeur de 20  $\mu\text{m}$  (Leja®, LEJA Product B. V. NETHERLANDS).

Avant d'être analysée par le système IVOS II, la semence a été diluée à la concentration de 25 millions de spermatozoïdes par millilitre au moyen d'une solution tampon commerciale (Easy Buffer B, IMV-Technologies, Aigles, France), puis mise en incubation à 37°C (Cuve MEMMERT) pendant 10 min.

L'analyse de la semence par HT-IVOS II a été faite selon le paramétrage technique adapté à la semence canine.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

---

Les paramètres analysés par ce système et utilisés dans notre étude sont :

Les pourcentages de mobilité :

- Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles (MOT)
- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PROG)

Les paramètres cinétiques :

- VCL (Velocity curvilinear,  $\mu\text{m/s}$ ) : s'exprime en micromètre par second ( $\mu\text{m/s}$ ), la VCL mesure la vitesse moyenne en temps du centroïde de la tête du spermatozoïde le long de son chemin curviligne réel. Il est calculé en trouvant la distance totale entre le premier et le dernier point de tête divisée par le temps écoulé, La VCL peut être un indicateur du dynamisme du spermatozoïde.
- VSL (Velocity straight-line,  $\mu\text{m/s}$ ) : exprimé en  $\mu\text{m/s}$ , elle est définie comme la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête de spermatozoïde le long de sa trajectoire en ligne droite entre le premier et dernier point où il a été capturé. Il est calculé en trouvant la distance totale parcourue le long du chemin linéaire divisée par le temps d'acquisition.
- VAP (Velocity average pathway,  $\mu\text{m/s}$ ) : exprimé en  $\mu\text{m/s}$ , c'est la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête du sperme le long de la trajectoire lissée, qui est construite en faisant la moyenne de plusieurs points sur la trajectoire curviligne réelle, le lissage se fait par des algorithmes de l'analyseur CASA ; ces algorithmes varient selon l'équipement, ce qui conduit à des variations de résultats entre divers systèmes et laboratoires. La VAP est calculé en divisant la longueur de la piste lissée par le temps d'acquisition.
- LIN (Linearity, %) : Linéarité du chemin curviligne, définie comme le rapport  $VSL/VCL$ .
- STR (Straightness, %) : Rectitude, définie comme le rapport  $VSL/VAP$ , qui exprime la linéarité du chemin moyen.
- WOB (Wobble, %) : Définie comme le rapport  $VAP/VCL$ , qui est une mesure de l'oscillation du chemin réel par rapport au chemin moyen.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

---

- ALH (Amplitude of lateral head displacement,  $\mu\text{m}$ ) : exprimée en  $\mu\text{m}$ , définie comme l'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde par rapport à sa trajectoire moyenne et exprimée en maximum ou en moyenne de ces déplacements ; comme les algorithmes utilisés dans le calcul de ce paramètre varient d'un équipement à l'autre, ses valeurs peuvent ne pas être comparables entre divers systèmes et laboratoires.
- BCF (Beat cross frequency, Hz) : Exprimée en Hz et fournissant la vitesse moyenne à laquelle le chemin curviligne croise le chemin moyen.



**Figure 29:** Système Hamilton-Thorn-IVOS II.(128)

### **2.9.2. Analyse spermatique par cytométrie en flux (Système EasyCyte Plus II et EasySort) :**

Un cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA) a été utilisé pour notre étude, afin d'évaluer trois paramètres spermatiques à savoir : la viabilité couplée à l'intégrité acrosomique et le statut oxydatif.

Cet appareil a l'avantage de fonctionner avec des kits rapides prêts à l'emploi sous forme de microplaques contenant des fluorochromes dosés dans les puits. Après plusieurs étapes de dilution et préparation de la semence, cette dernière est ajoutée aux fluorochromes, incubée puis directement chargée et analysée par le cytomètre.

Les deux kits utilisés dans notre étude, permettent d'évaluer :

- Le pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intact « Fluorochromes :



FITC/PNA/PI » (Viab-Acro)

- Le pourcentage des spermatozoïdes vivants oxydés (ROS) en mesurant le taux des radicaux libres intracellulaires suivants : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, ONOO



**Figure 30 :** Le cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (128).

### **2.10. Tests de fertilité *in-vivo* (Insémination artificielle intra-utérine) :**

Les cycles œstraux de 60 chiennes ont été suivis au moyens des frottis vaginaux et du dosage quantitatif de la progestérone (Mini-Vidas, Bio Mérieux) pour déterminer le moment optimum de fécondabilité (progestéronémie de 10ng/mL). L'échographie ovarienne (MyLab Class C Vet, ESOATE) a été parfois utilisée pour objectiver l'ovulation.

Pour l'insémination artificielle, ces 60 chiennes ont été réparties en 3 groupes de 20 chiennes (n=20) correspondant aux trois dilueurs étudiés (6% LDL, 40% PJO liquide et lyophilisé).

Chaque femelle a été inséminée deux fois à 24H d'intervalle en déposant dans l'utérus une dose de 200 à 300 millions de spermatozoïdes décongelés (8-12 paillettes) par voie transcervicale au moyen d'un vidéo endoscope (Télépack Vet, Storz). Une analyse d'image de la semence décongelée est pratiquée avant chaque insémination et seulement les semences ayant un pourcentage de mobilité progressive d'au moins 35% sont utilisées (seuil conventionnelle pratiquée dans tous les centre d'insémination artificielle).

Quinze jours minimum après la date d'insémination, un diagnostic échographique de la gestation est réalisés au moyen d'un échographe (My Lab Class C Vet, Esaote) répétée une à deux semaine après en cas de résultat négatif. Si une gestation est confirmée, un suivi périodique est observé jusqu'à mise bas.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES



Cystourethroscope (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.

**Figure 31:** inséminations artificielles intra-utérines sous vidéo-endoscopie (95).

### 2.11. Collecte des données et analyse statistique :

Les données produites par l'analyseur HT-IVOS II et le cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA) sont récupérées sur des tables Microsoft Excel puis préparées pour être analysées avec le logiciel statistique R.

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

Pour les tests de fertilité *in vivo*, les trois dilueurs étudiés ont été évalués comparativement en fonction du critère d'efficacité qui est le taux de gestation. D'autres critères sont envisagés si les données de suivi sont disponibles à savoir le taux de natalité et la taille de la portée (prolificité). Les données obtenues pour les trois dilueurs étudiés par insémination des trois groupes de femelles ont été portées sur une table Microsoft Excel et la différence significative entre les taux de gestation a été vérifiée par l'application d'un test statistique de signification adéquat à la situation (Test des probabilités exactes de Fisher). La significativité statistique est définie à  $P < 0.05$  et les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne).

### 3.1. Résultats et discussion :

Le jaune d'œuf de poule a été utilisé depuis longtemps dans la composition de congélation des spermatozoïdes pour son pouvoir protecteur contre le froid (129),(81).Ce pouvoir a été expliquée par l'activité cryoprotectrice des LDL (pour Low density lipoproteins) qui sont des lipoprotéines de basse densité présentes dans la fraction soluble du jaune d'œuf (3).

Ces LDL ont été extraits du JO avec succès grâce au protocole mis au point par Moussa et ses collaborateurs en 2002, et sont devenus la référence dans la composition des dilueurs de conservation des spermatozoïdes bovins (89), canins (105), équins (107).

Cependant, au fur et à mesure du temps, le protocole d'extraction des LDL s'est avéré être non transposable à l'échelle de production industrielle et incompatible aux procédés de stabilisation et stérilisation. Le plasma de jaune d'œuf (PJO) était parmi les alternatives envisageables pour remplacer les LDL.

Le plasma de 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) (2). Il est composé de LDL (85%) et de glycoprotéines globulaires (15%) (Essentiellement  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -livetines) qui peuvent être éliminées par précipitation au sulfate d'ammonium dans le protocole d'extraction des LDL (3), (4).

En 2012, Pillet et ses collaborateurs ont été les premiers à évaluer l'efficacité du PJO liquide comme substitut au jaune d'œuf entier (JO) dans la composition d'un dilueur de congélation des spermatozoïdes équins (130).

En 2015, Cornici et ses collaborateurs ont évalué avec succès l'efficacité d'une concentration de 20% de PJO liquide en substitution toujours au jaune d'œuf entier dans la congélation des spermatozoïdes canins. Ces auteurs ont utilisé d'emblée cette concentration sans aucune étude d'optimisation (6). Deux ans plus tard, Shah et ses collaborateurs ont évalué son efficacité à remplacer le jaune d'œuf entier dans la congélation des spermatozoïdes du buffle (7).

Le PJO a été lyophilisé avec succès pour la première fois en 2017 (8) et en 2019 (9) respectivement dans la réfrigération et la congélation des spermatozoïdes canins. Ces auteurs ont été également les premiers à évaluer le PJO liquide et lyophilisé en substitution aux LDL (pour Low Density Lipoproteins) et non au jaune d'œuf entier (JO) comme dans les études précédentes.

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

---

Les auteurs des études précédentes sur la lyophilisation du PJO (8), (9) se sont heurtées à une contrainte technique à savoir une mauvaise qualité de remise en suspension (redispersibilité de particules) lors de la reconstitution du PJO lyophilisé. Ceci ne semblait pas avoir d'impact sur l'efficacité cryoprotectrice du dilueur mais induisait la persistance de granules capables d'interférer avec l'analyse d'image par le système CASA. Face à ce problème, les auteurs avaient tenté plusieurs méthodes d'homogénéisation de la suspension tel que le bac à ultrason, mais sans succès (données non publiées).

Cette mauvaise redispersibilité des particules du lyophilisat a été déjà évoquée dans la littérature et la solution serait une optimisation du protocole de lyophilisation en ajustant quelques paramètres de ce procès (10).

Le protocole de lyophilisation utilisé par ces auteurs est basé sur un cycle de 48H divisé en trois phases. Une première phase de congélation rapide à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 30min, une deuxième phase de dessiccation primaire (i.e. sublimation) d'une durée, globale de 43H20min, pendant laquelle le produit congelé est soumis à une pression de vide de 100 mTorr à la température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Une troisième phase de dessiccation secondaire destinée à éliminer l'humidité résiduelle du produit en maintenant la pression du vide à 100 mTorr mais en augmentant la température à  $+20^{\circ}\text{C}$  pour une durée globale de 4H10min.

Le protocole de lyophilisation du PJO doit tenir compte du fait que les molécules bioactives à activité cryoprotectrice du PJO (i.e. LDL) qui sont des nano lipides, et être de ce fait adapté à ces nanoparticules lipidiques. En effet, au regard des données bibliographiques notamment l'étude de Howard et ses collaborateurs en 2012 sur la lyophilisation des nanoparticules des lipides solides (SLN : pour Solid Lipid nanoparticules), ce protocole utilisé précédemment serait critiquable sur plusieurs paramètres dont essentiellement la vitesse de congélation du produit et la durée globale de la dessiccation primaire mais surtout secondaire.

Ainsi, dans notre étude, nous étudions ces facteurs pouvant avoir un effet sur la redispersibilité du PJO lyophilisé (i.e. vitesse de congélation, temps de la dessiccation et milieu de reconstitution) afin de proposer un protocole optimisé qui est retenu pour la deuxième partie du travail.

En effet, l'étude du facteur vitesse de congélation du PJO pourrait suggérer qu'une vitesse lente avec une descente de la température ambiante jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$  à raison de  $0.5^{\circ}\text{C}$  par minute suivie d'un temps additionnel de 2 heures à cette température négative, est plus

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

---

adaptée (10) que la congélation rapide (mise à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 2H) utilisée dans les études précédentes (8),(9) .

Par ailleurs, l'étude du facteur durée de la dessiccation pourrait suggérer qu'un temps de 24H pour la dessiccation primaire (100mTorr /  $-20^{\circ}\text{C}$ ) et de 16H pour la dessiccation secondaire (100mTorr /  $+20^{\circ}\text{C}$ ) sont plus adaptés (137) que les durées de 43H20min et 4H10min utilisées respectivement dans les études précédentes (8),(9) .

Les valeurs de pression du vide (100mTorr) et de température de dessiccation primaire ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) et secondaire ( $+20^{\circ}\text{C}$ ) sont restées inchangées dans notre étude par rapport aux études présentes (8),(9), et semblent être adaptées au protocole de lyophilisation des nanoparticules lipidiques.

La solution de reconstitution du PJO lyophilisé ne semble avoir aucun effet sur la qualité de reconstitution du lyophilisat. Le PJO lyophilisé pourrait donc être reconstitué dans le dilueur à base de Tris-Fructose notamment dans la présentation commerciale du dilueur sous forme d'un lyophilisat en flacon.

Ainsi, dans le cadre de la préparation d'un nouveau dilueur de congélation des spermatozoïdes canins à base de plasma de jaune d'œuf lyophilisé, et afin d'obtenir une meilleure qualité de dispersibilité des particules au moment de la reconstitution, le protocole de lyophilisation optimisé serait d'une durée globale de 42H réparti en trois phases à savoir:

- Une congélation lente : le PJO est refroidi par une descente depuis la température ambiante jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$  à une vitesse de  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , puis laissé à cette température pendant un temps additionnel de 2H.
- Une dessiccation primaire (sublimation) à une température négative de  $-20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100mTorr (0.133 mbar) pendant une durée de 24H.
- Une dessiccation secondaire à une température positive de  $+20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100mTorr pendant une durée de 16H.

### **3.1.1. Evaluation de la fertilité spermatique *in vitro* (Nouvelle approche multiparamétrique) :**

Dans les toutes les études précédentes sur le PJO depuis les travaux de Pillet et ses collaborateurs en 2012 sur la congélation de la semence équine (130) jusqu'aux travaux de Belala et ses collaborateurs en 2019 (9), sur la congélation de la semence canine, l'exploration

de la fertilité *in vivo* s'est basée sur les paramètres cinétiques (CASA) et d'intégrité spermatique évalués par microscopie conventionnelle (optique ou à épi fluorescence). Cette approche conventionnelle est inévitablement entachée d'une certaine subjectivité et variabilité des résultats, dues au risque d'erreur humaine lors des diverses étapes de manipulation de la semence et des réactifs fluorochromes et également lors de l'interprétation manuelle. Dans notre étude, et pour la première fois en semence canine, l'exploration de la fertilité *in vitro* est faite par une nouvelle approche multiparamétrique qui associe ou confronte les données de deux techniques d'analyse très performantes et objectives à savoir l'analyse d'image (HT IVOS II) qui explore la mobilité et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes et la cytométrie de flux (EasyCyte plus II) qui explore la vitalité, l'intégrité membranaire, acrosomique et chromatique ainsi que le statut oxydatif. Le cytomètre en flux est doté d'un logiciel (EasySoft) permettant d'intégrer toutes ces données dans une approche multiparamétrique en leur appliquant des seuils de signification pour donner un bilan de fertilité spermatique *in vitro* beaucoup plus prédictif de la fertilité *in vivo* car le phénomène de fertilité est naturellement multifactoriel (131).

L'analyse étendue et multiparamétrique de l'intégrité membranaire, acrosomique et chromatique ainsi que l'activité mitochondriale et le statut oxydatif dans notre étude, permettrait de mieux cerner l'ensemble des facteurs de fertilité spermatique et d'apprécier et d'expliquer leurs impacts positifs ou négatifs sur la fertilité *in vivo* (taux de gestation) évaluée ultérieurement par insémination artificielle.

### **3.1.2. Evaluation de la fertilité *in vivo* par insémination artificielle :**

Dans notre étude, nous évaluons la fertilité *in vivo* après insémination artificielle intra utérine (TCI, transcervical insemination) de 60 femelles par du sperme canin congelé et décongelé dans trois dilueurs à base de 6% LDL (n=20) (Milieu de référence) et 40% de PJO liquide (n=20) et lyophilisé (n=20) (concentrations optimales vérifiées précédemment dans les travaux de (9).

Bencharif et ses collaborateurs ont rapporté en 2008 un taux de gestation de 100% en déposant dans l'utérus par voie trans-cervicale une dose de  $200 \times 10^6$  spermatozoïdes précédemment congelés dans un dilueur à base de 6% LDL à raison de deux inséminations à 24H d'intervalle chez six (06) femelles Beagleaux moments de leurs fécondabilités optimales (105).

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

---

En espèce bovine, Amirat et ses collaborateurs ont réalisé en 2004 des tests de fécondation *in vitro* en utilisant une semence bovine congelée dans un milieu à base de LDL. Le taux de clivage a été significativement plus élevé après fécondation avec une semence congelée dans les LDL comparé au milieu commercial à base de JO Optidyl®, mais aucune différence n'a été enregistrée entre les deux milieux au regard du taux de blastocyste. Ces auteurs en ont conclu que la fertilité est préservée après congélation dans le diluer à base de LDL (89).

Quant à la semence canine conservée dans un milieu à base de PJO, aucune étude de la fertilité *in vivo* n'a été réalisée avant notre présent travail. En absence de données de littérature relatives à notre espèce d'intérêt, nous étendons notre discussion aux autres espèces animales.

En effet, en espèce équine, Pillet et ses collaborateurs ont réalisé en 2011 un test de fertilité *in vivo* sur un total de 70 cycles de juments. Le taux de fertilité par cycle a été de 60% après insémination artificielle avec une semence congelée dans un milieu à base de jaune d'œuf (milieu de référence dans cette étude), comparée à la valeur de 69% pour un milieu à base de PJO liquide stérilisé, sans aucune différence significative entre les deux milieux ( $p > 0.05$ ). Ces auteurs en ont conclu que le PJO liquide et stérilisé était aussi efficace que le jaune d'œuf entier dans la congélation du sperme d'étalon. Sur la bases de leurs résultats ; un nouveau dilueur contenant du PJO liquide et stérilisé a été développé et commercialisé sous le nom d'INRA-Freeze® par la société IMV-Technologies, L'Aigle, France (5).

### 3.1.3. PJO lyophilisé :

Concernant la forme lyophilisée du PJO, aucune évaluation de la fertilité *in vivo* n'a été réalisée avant notre présent travail toutes espèces animales confondues. Par conséquent, aucune donnée n'a pu être rapportée dans la littérature à ce sujet.

Nous postulons l'hypothèse que le processus de lyophilisation optimisé dans notre étude n'interfère pas avec l'action cryoprotectrice des molécules bioactives du PJO (i.e. LDL) et permet de ce fait d'avoir une bonne fertilité *in vivo* et des taux de gestation comparables à ceux obtenu par le PJO liquide en espèce équine (130) et le milieu de référence (LDL) (105) en espèce canine.

Si ce résultat se confirme, la forme lyophilisée du PJO représentera alors une excellente alternative à la forme liquide et aux LDL avec tous les avantages de conservabilité et de stabilité et rendra ainsi la production des dilueurs à base d PJO lyophilisé tout à fait transposable à l'échelle industrielle en offrant plusieurs opportunités de présentation



commerciale telle que la présentation du dilueur sous forme d'un lyophilisat en flacon prêt à la remise en suspension juste avant utilisation.

### 3.1.4. Perspectives :

En perspective, il serait intéressant d'étudier à l'avenir l'efficacité d'une approche de lyophilisation d'un PJO stérilisé par UV – radiation qui est un procédé beaucoup plus simple et moins coûteux que la gamma ionisation utilisée dans les études précédentes (130), (9). Ainsi, le nouveau dilueur à base PJO stérilisé par UV et lyophilisé présentera l'avantage d'être efficace tout en étant parfaitement compatible aux conditions de production industrielle et aux exigences sanitaires pour le transport et la commercialisation internationale.

Dans notre étude, le PJO lyophilisé a été conservé à la température de 4°C jusqu'à son utilisation. Nous n'avons le temps d'étudier les conditions de conservabilité (Temps et température). Il serait très intéressant à l'avenir d'étudier la stabilité du PJO lyophilisé en comparant plusieurs durées (3, 6, 12 et 24 mois) et différentes températures (+4°C et +20°C) de conservation. Une telle étude, pourrait permettre de conserver le PJO lyophilisé pendant de longues durées et à température ambiante ce qui représenterait un intérêt indéniable en production de ce nouveau dilueur.

Pour évaluer l'efficacité du PJO lyophilisé, nous nous sommes basés dans notre étude sur une évaluation multiparamétrique de la fertilité *in-vitro* et *in vivo* et la lyophilisation ne semble pas interférer avec la fertilité et de ce fait avec l'action cryoprotectrice du PJO. Cependant, il serait intéressant à l'avenir d'explorer directement ces éventuelles modifications structurales des molécules bioactives (LDL) cryoprotectrices du PJO sous l'effet du processus de lyophilisation aux moyens de la microscopie électronique à transmission (TEM), la spectroscopie à infrarouge par transformée de Fourier (FTIR, pour Fourier Transformed Infrared spectroscopy), la diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering using a Malvern Nanosizer Instrument) et la granulométrie Laser (LDPSA, pour Laser Diffraction Particle Size Analyzer).

## CONCLUSION

---

A l'issue de ce travail nous concluons ce qui suit :

- ✓ Dans le cadre de la préparation d'un nouveau dilueur de congélation des spermatozoïdes canins à base de plasma de jaune d'œuf lyophilisé, et afin d'obtenir une meilleure qualité de dispersibilité des particules au moment de la reconstitution, le protocole de lyophilisation pourrait être optimisé en ajustant les paramètres suivants :
  - Une congélation lente : le PJO est refroidi par une descente depuis la température ambiante jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$  à une vitesse de  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , puis laissé à cette température pendant un temps additionnel de 2H.
  - Une dessiccation primaire (sublimation) à une température négative de  $-20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100mTorr (0.033 mbar) pendant une durée de 24H.
  - Une dessiccation secondaire à une température positive de  $+20^{\circ}\text{C}$  et une pression du vide de 100 mTorr pendant une durée de 8H.
- ✓ Le PJO ainsi lyophilisé, représenterait une bonne alternative au PJO liquide et aux LDL dans la congélation des spermatozoïdes canins en préservant avec la même efficacité les paramètres de fertilité *in vitro* (mobilité, paramètres cinétiques et différents traits d'intégrité spermatique) et de fertilité *in vivo* (taux de gestation après insémination intra-utérine transcervicale par vidéo-endoscopie).
- ✓ Cette forme lyophilisée du PJO représenterait les avantages d'une meilleure stabilité et d'une conservation prolongée rendant ainsi la production de ce nouveau dilueur tout à fait transposable à l'échelle industrielle et offrant également plusieurs opportunités de présentation commerciale telle que la présentation sous forme d'un lyophilisat en flacon qui sera reconstitué juste avant utilisation.

## RECOMMANDATIONS

---

En perspective, Il serait intéressant à l'avenir de :

- ✓ Etudier à l'avenir l'efficacité d'une approche de lyophilisation d'un PJO stérilisé par UV – radiation qui est un procédé beaucoup plus simple et moins couteux que la gamma ionisation utilisée précédemment. Ceci pourrait simplifier et réduire considérablement le coût de production de ce dilueur de congélation tout en restant conforme aux exigences sanitaires pour sa commercialisation et son transport international.
- ✓ Etudier la stabilité du PJO lyophilisé sur des longues durées (3, 6, 12, 24 mois) et à différentes températures (+4°C et +20°C) de conservation.
- ✓ Explorer directement les éventuelles modifications structurales des molécules bioactives (LDL) cryoprotectrices du PJO sous l'effet du processus de lyophilisation aux moyens des techniques suivantes :
  - Microscopie électronique à transmission (TEM).
  - Spectroscopie à infrarouge par transformée de Fourier (FTIR).
  - Diffusion dynamique de lumière (DLS, using Malvern Nanosizer Instrument).
  - Granulométrie Laser (LDPSA, pour Laser Diffraction Particle Size Analyzer)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 1-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 lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen”, *Theriogenology*, V. 75, (2011),300–307.
- 2-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.
- 3-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.
- 4-Anton, M. (2013). Egg yolk: Structures, functionalities and processes.*Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2871–2880. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6247>.
- 5-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.
- 6-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
- 7-Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017).Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves thequality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*)spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 32–40.
- 8-CHERIFI A &BENOUAHLIMA W N., (2017).Effet d’un nouveau diluant de réfrigération de sperme, à base de plasma de jaune d’œuf (P. J.O) lyophilisé, sur les paramètres spermatiques chez le chien. Thèse de de Master enSpécialité : Reproduction Animale, Université de saad dahleb blida-1 (USDB), Blida. p. 81.
- 9-Belala R, Briand-Amirat L, Martinot A, et al. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma tolow density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa.*Reprod Dom Anim.* 2019;54:1131–1138.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 10-Howard, Xiuling Lu, Michael Jay & Thomas D. Dziubla, Melissa D., (2012) "Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles" Pages 1270-1279 <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.645835>
- 11-PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. (2014) Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.
- 12-BARONE R. (2001). Chapitre II: Appareil génital mâle In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Vigot. 896p.
- 13-MILLETTE C.F. (1998). Spermatozoa. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 586-596.
- 14- DADOUNE J.-P., HADJISKY P., SIFFROI J.-P., VENDRELY E. (1990) .Appareil de reproduction masculin. In : Histologie. Collection « de la biologie à la clinique ». Flammarion Médecine Science, Paris.
- 15- SCHATTEN G. (1998) Fertilization. In : Knobil E., Neill J.P. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 2. Academic press, San Diego, 256-265.
- 16-Fontbonne, A., "Physiologie sexuelle du chien mâle. Reproduction du chien et du chat", PMCAC Edition, Paris, (1992), 19-26p.
- 17-BEDFORD J.M., CROSS N.L. (1998) Sperm Capacitation. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 597-602.
- 18-FONTBONNE A., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- 19-PRINS G.S. (1998) Semen. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
- 20-JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001) Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 21-NOAKES D.E., PARKINSON Timothy J. et ENGLAND G.C. (2009) Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth Edition. Saunders Elsevier. 961p.
- 22-KUTZLER M.A. (2005) Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64, 747-754.
- 23-PENA MARTINEZ A.I. (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83, 209-224.
- 24-ZAMBELLI D. et CUNTO M. (2006) Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 2, pp. 159-165.
- 25-FELDMAN E. et NELSON R. (2004a) Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 930-952.
- 26-FRESHMAN J.L. (2002) Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, 17, 3, 104-107.
- 27-FELDMAN E.C., NELSON R.W. (1987) Disorders of the canine male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. W.B. Saunders company, Philadelphia, 481- 524.
- 28-Milovanov, V.K., "The biology of reproduction and the artificial insemination of animals", Seljhozgiz, Moscow, (1962), 969p,
- 29-GUIGARDET V. (1997) Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome : le SPERMAC®. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°101, 96 p
- 30-FONTBONNE A. (1995) Infécondité du chien mâle. In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction*. Elviesier, Paris, Volume 5, 1-13.
- 31-BOUSENNA, S. (2013). Performances de reproduction chez les ovins Ouled Djellal : Avènement de la puberté et évolution des caractéristiques séminales chez le mâle jusqu'à l'âge de 1 an . These en vue d'obtention du diplôme de doctorat en science. Institut des sciences vétérinaires de Constantine, 210 P.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

32-BARIL, G., CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., LEBOEUF, B., ORGEUR, P., VALLET J.C. (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.FAO, Rome, Italy, 125P

33-EILTS B.E. (2005)Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation.Theriogenology, 64, 685-691.

34-IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001a) Evaluation of the « Hamilton Thorncomputer-based automated system » for dog semen analysis. Theriogenology, 55, 733-749.

35-ALLIMANT M. (2010) Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon.Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.

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

37-CAMBOURNAC, I. Goy-Thollot, J. Guillaumin, J. Ayoub, C. Pouzot-Névoret, A. Barthélemy, J. Bonnet-Garin.Épuration extrarénale lors d'insuffisance rénale aiguë : description épidémiologique, clinique et détermination de facteurs pronostiques chez 39 chiens (2012–2015) VetAgro Sup Lyon, 1, avenue Bourgelat, 69280 Marcy-l'Étoile, France .

38-Tourrel-Cuzin ,C Boutant M, Ramos OHP, Movassat J, Ilias A, et al. (2012) COUP-TFII Controls Mouse Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass through GLP-1- $\beta$ -Catenin Signaling Pathways. PLOS ONE 7(1): e30847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030847>.

39-Gilman-Sachs,Jing-QiQu',LiZhon,M.Masoom-Yasinzai\*M.Abdur-Rab<sup>2</sup>H.S.Z.Aksu<sup>1</sup>\*S.G.Reed<sup>3</sup>K.-P.Chang<sup>1</sup>.Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a Leishmania kinesin: [Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and HygieneVolume 88, Issue 5, September–October 1994, Pages 543-545https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90154-6](#)

40-RONOT et al.,2006 Applications de cytométrie en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs : La cytométrie en flux (pp.235-253) Chapter: 12 Publisher: Tec & Doc – Lavoisier

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 41-Shapiro, Jacqueline A-M. and Parzefall, M. (2005) *Examen de la théorie du contrat psychologique: questions clés relatives à la compréhension et à la recherche sur la relation d'emploi*. In: Delobbe, Nathalie, Herrbach, Olivier, Lacaze, Delphine and Mignonac, Karim, (eds.) *Comportement Organisationnel: Contrat Psychologique, Émotions Au Travail, Socialisation Organisationnelle*. De Boeck, Paris, France. ISBN 9782804149338.
- 42-University of Aberdeen– ayeSwitch[en ligne]. 2010. [Consulté le 12 aout 2020]. url : [http://2010.igem.org/FACS\\_analysis\\_of\\_fluorescent\\_proteins](http://2010.igem.org/FACS_analysis_of_fluorescent_proteins)
- 43- Nizański W, Partyka A, Rijsselaere T. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(Suppl 6):215–221. doi: 10.1111/rda.12048.
- 44- PENA A., JOHANNISSON A., LINDE-FORSBERG C. (1999) Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52, 965-980.
- 45-PetrunkinaAM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E, 2007: Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3– 17.
- 46-Petrunkina AM, Harrison RAP, 2011a: Mathematical analysis of mis-estimation of cells subsets in flow cytometry: viability staining revisited. *J Immunol Methods* 368, 71– 79.
- 47-SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, v. 84, n. 9, p. 1447-1454, 2015. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.035
- 48-Silva PF, Gadella BM, 2006: Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958– 978.
- 49- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, 2002: Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1669– 1681.
- 50- Nizanski W, 2006: Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozenthawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66, 470– 483.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 51- Cheuquemaín C, Bravo P, Treuleín F, Giojalas LC, Villegas J, Saínchez R, Risopatroín J, 2012: Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 47, 39–43
- 52- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A, 2005: New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64, 706–719.
- 53- Garner DL, Johnson LA, 1995: Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biol Reprod* 53, 276–284.
- 54-Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH, 1990: Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43, 55–64.
- 55-Penã AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C, 2001: Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil* 57(Suppl.), 371–376.
- 56-Kawakami E, Morita Y, Hori T, Tsutsui T, 2002: Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. *J Vet Med Sci* 64, 543–549.
- 57-Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2004: Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 80, 225–235
- 58-Partyka A, Nizanówski W, Łukaszewicz E, 2010: Evaluation of fresh and frozenthawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* 74, 1019–1027.
- 59-Graham JK, 2001: Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68, 239–247.
- 60-Watson, P.F., “The causes of reduced fertility with cryopreserved semen”, *Animal Reproduction Science*, V. 60–61, (2000),481–492.
- 61-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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 62-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), 304-315p.
- 63-Wales,R.G.etWhite,LG.,"Viability of diluted dog spermatozoa invitro".J.Reprod. Fertil., V.5, (1963),67-76.
- 64-Seager, S.W.J., "Successful pregnancies using frozen semen in the dog", A.A. Digest., V. 12, (1969), 6.
- 65-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.
- 66- Foote, R.H., "Extenders for freezing dog semen", Am. J. Vet. Res., V. 25, (1964), 37-40
- 67-Andersen, K., "Fertility of frozen dog semen". Acta Vet. Stand., V.13, (1972), 128- 130.
- 68-Anderson, K., « Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique », Zuchthygiene, V.10, (1975),1-4.
- 69- 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.
- 70-Linde-Forsberg,C.etForsberg,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.
- 71-Ivanova-Kicheva, M.G., Subev, M.S., Bobadov, N.D., Dacheva, D.P., Rouseva, L.A., "Effect of thawing regimens on the morpho functional state of canine spermatozoa". Theriogenology, V.44, (1995),563-569.
- 72-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.
- 73-England, G.C.W., "The cryopreservation of dog semen". Thesis, Royal Veterinary

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

College, University of London, UK, (1992) 152pp.

74-Wilson,M.S.,“Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen”, J. Reprod. Fertil., V. 47, (1993),307–11.

75-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.

76-Holt, W.V., “Basic aspects of frozen storage of semen”, Animal Reproduction Science, V.62, (2000),3-22.

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

78-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.

79-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.

80- 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.

81-Farstad, W.,“Semen cryopreservation in dogs and foxes”, Animal Reproduction Science, V. 42, (1996),251-260.

82-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.

83-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.

84-DeLeeuw,F.E.,deLeeuw,A.M.,denDaas,J.H.G.,Colenbrander,B.,Verkley,A.J., “Effects of

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing”, *Cryobiology*, V.30,(1993), 32–44

85-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.

86-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.

87-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- 152.79-

88- 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.

89-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.

90- 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.

91-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 ofbovinesemen”, *Theriogenology*, (1991),307-317.

92-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.

93-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.

94-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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 95- Belala R ., (2016). OPTIMISATION DE LA CONSERVATION DE LA SEMENCE CANINE Réfrigération et congélation. Thèse de Doctorat En sciences vétérinaires, Université de saad dahleb blida-1 (USDB), Blida. p. 204.
- 96- Garner, DL. et Johnson LA., “Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide”, *Biol Reprod.*, V. 53, (1995), 276–284.
- 97-Powrie, W.D. et Nakaï, 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.
- 98-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).
- 99-Chang, M.C., Powrie, W.D., Fennema, O., “Micro structure of egg yolk”, *J. Food Sci.*, V.42, (1977), 1193.
- 100-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.
- 101- 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
- 102-Yamauchi, K., Kurisaki, J., Sasago, K., “Polypeptide composition of hen’s yolk very low-density lipoproteins”, *Agri Biol Chem.* V. 40, (1976), 1581-6.
- 103- 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.
- 104-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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 105- 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.
- 106-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.
- 107-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.
- 108-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>
- 109-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
- 110- 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.
- 111-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.
- 112-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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 113- 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
- 114-LeGuillou,J.,Ropers,M.H.,Gaillard,C.,David-Briand,E.,vanLeeuwen-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>
- 115-Le Guillou, J., Ropers, M.H., Gaillard, C., David-Briand, E., Desherces, S.,Schmitt, E.,Bencharif,D.,Amirat-Briand,L.,Tainturier,D.,Anton,M.,“Organizationoflipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air - water interface”, *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, V.108, (2013),246-254.
- 116-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.
- 117- 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.
- 118- Fontbonne A. & Chastant S, 2004. Ovulation diagnosis attempt using ovarian ultrasonography. In *Proceedings of European Congress Barcelona*, (ed. EVSSAR), pp. 58-
- 119-DUMON Christian (2007)Insémination artificielle dans l’espèce canine: Actualités.*Bull. Acad. Vét. France*. Tome 160 - N°2
- 120- Silva, L.D.M, Onclin, K.,Snaps, F,Verstegen, J.P. 1995.Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch.; *Theriogenology* 43: 615-623.
- 121- 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.
- 122-MacBee, LE. et Cotterill, OJ., “Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins”, *J Food Sci.*, V. 44, (1979),656 –60.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

123-Linde-Forsberg, C. 2001. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In Recent advances in small Animal Reproduction (ed. P.W. Concannon & J. Verstegen), A1207.0201. England GCW, Ithaca: international Veterinary information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

124- Linde-Forsberg, C. 2000. Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in the dog. In Proceedings of the 4th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Oslo, p. 120.

125-Silva, L.D.M, Onclin, K., Lejeune, B., Verstegen, J. P.1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. The veterinary Record 138: 154-157.

126-Wilson, M. 2003 Trans-cervical endoscopic insemination in bitches. In Recent advances in small Animal Reproduction (ed. P.W. Concannon & J. Verstegen), A1232.1203. England GCW, Ithaca: international Veterinary information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

127-FDAILAINNE C., (2017). Comparaison entre deux techniques : méthode classique d'énumération avec une méthode automatisée par le sperm class analyser (SCA).Thèse de Master en Biologie Option : Reproduction Animale Université BLIDA - 1- « SAAD DAHLAB » blida. p. 60.

128-imv-technologies.( consultées le 22/08/2020 )url: <https://www.imvtechnologies.fr/>

129-ENGLAND G.C.W. (1993) ,Cryopreservation of dog semen : a review.J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 243-255.

130- 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.

131-P. Vincent, S.L. Underwood, C. Dolbec, N. Bouchard, T. Kroetsch, P. Blondin Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers Bovine Reproduction John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ (2014), pp. 685-695.



## Protocole de lyophilisation du plasma de jaune d'œuf de poule

---

### PREPARATION DU PJO liquide :

Le PJO est préparé par fractionnement du jaune d'œuf de poule selon le protocole décrit par MacBee et Cottenill (*J Food Sci.*, 44, 1979) :

*(Dilution à une solution saline à 0.9% ; homogénéisation à 4°C pdt 1h ; double centrifugation à 12000 xg pdt 1h ; filtration au filtre-seringue de 0.22µm ; conditionnement en flacon « 02mL »)*

### PRESENTATION DU PLASMA A LYOPHILISER :

La solution de plasma de jaune d'œuf préparée est aliquotée en volume de 02 mL « 20-40 flacons » puis immédiatement acheminée au laboratoire sous 4°C (glacière) pour lyophilisation.

### PROTOCOLE DE LYOPHILISATION :

#### FREEZING :

Temperature : - 20°C

During : 02 hours

Slow freezing: Room temperature shelf; cooled to -20°C at the rate: 0.5°C/min then allowed to sit at -20°C for additional 2H.



#### PRIMARY DRYING

(Déssiccation primaire ou sublimation):

Temperature : - 20°C

During : 24 hours

Vacuum\* : 100 mTorr



#### SECONDARY DRYING

(Déssiccation secondaire):

Temperature : + 20°C

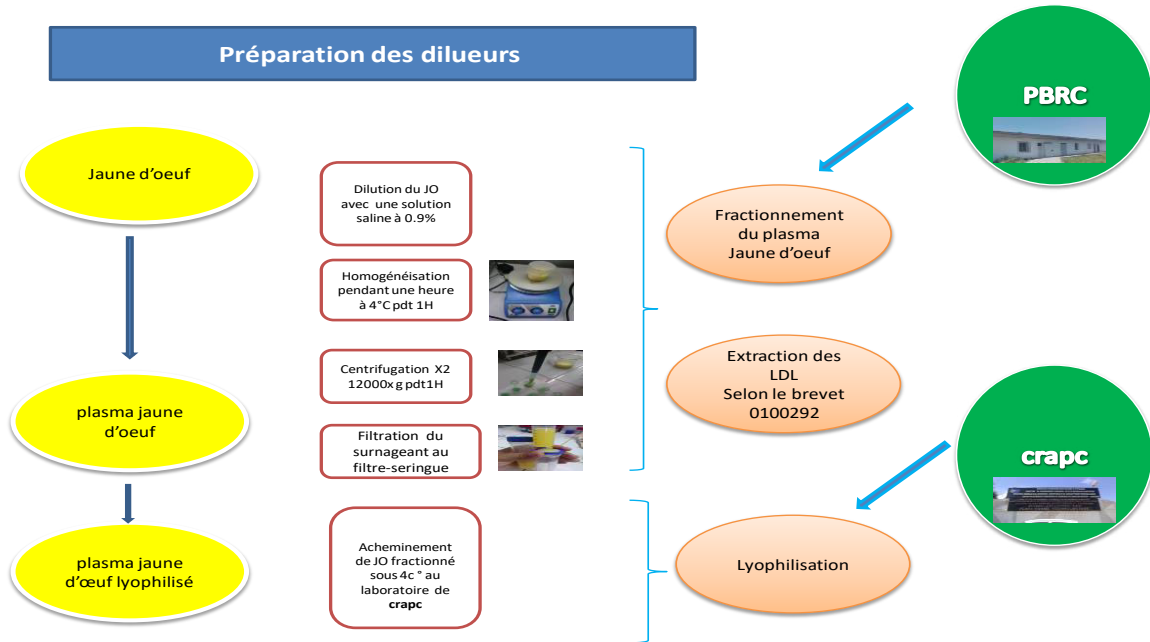
During : 16 hours

Vacuum\* : 100 mTorr

---

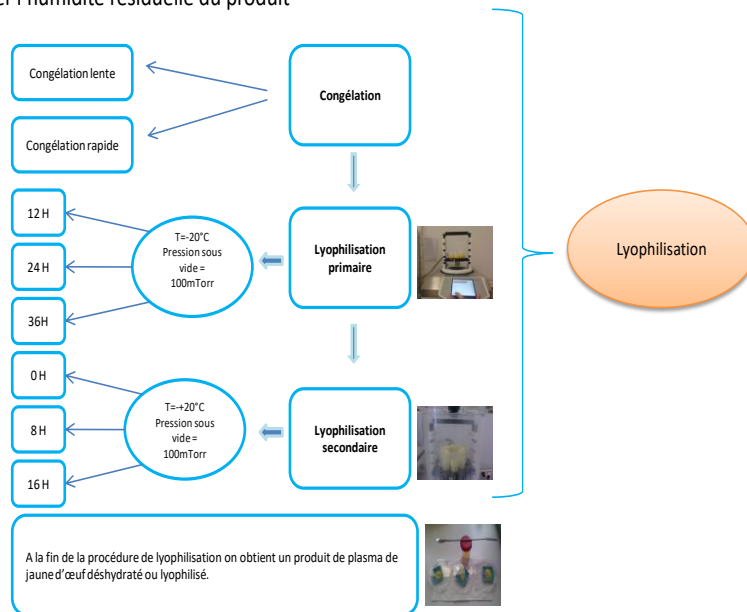
\* Vacuum : 100 mTorr = 0.13332 mbar = 13.332237 pa = 0.0001359 atm.

**Shéma du protocole expérimental (1):**



**Lyophilisation du plasma de jaune d'œuf**

La lyophilisation est un traitement de stabilisation qui consiste à congeler le produit puis le sécher par sublimation. Ce processus comprend trois phases principales à savoir la congélation du produit, la dessiccation primaire ou sublimation, la dessiccation secondaire destinée à éliminer l'humidité résiduelle du produit



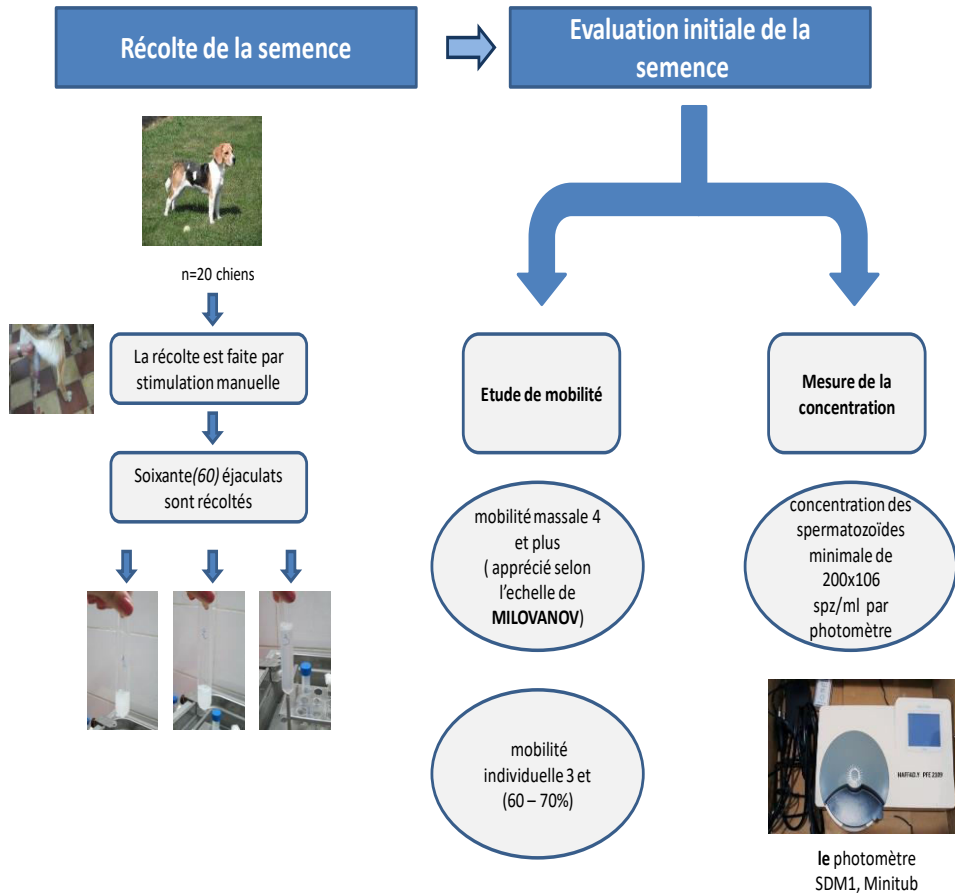
## Schéma du protocole expérimental (2):

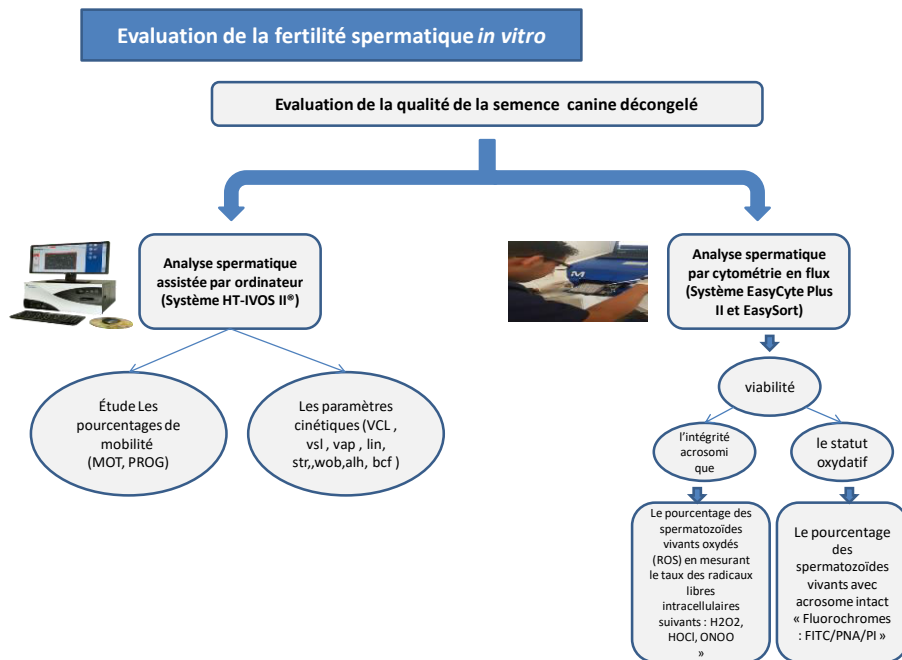
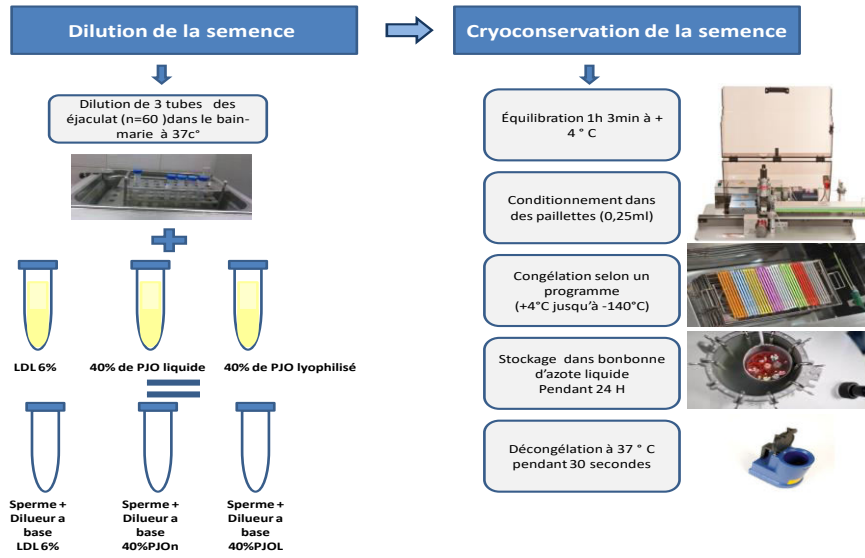
### Préparation des dilueurs finaux

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
trihydroxyméthylamino méthane	3,026 g	3,026 g	3,026 g
acide citrique	1,7 g	1,7 g	1,7 g
fructose	1,25 g	1,25 g	1,25 g
streptomycine	0,1 g	0,1 g	0,1 g
d'énrofloxacin	10 %	10 %	10 %
glycérol	3,2 ml	3,2 ml	3,2 ml
eau distillée	quantité suffisante pour 100 ml de dilueur	quantité suffisante pour 100 ml de dilueur	quantité suffisante pour 100 ml de dilueur
Type de Cryoprotecteurs ajouté	<b>LDL 6%</b>	<b>40% de PJO liquide</b>	<b>40% de PJO lyophilisé</b>



Trois dilueurs de congélation obtenus: **LDL 6%**      **40% de PJO liquide**      **40% de PJO lyophilisé**





Shéma du protocole expérimental (3):

