

Année 2008



**CONGELATION DE LA SEMENCE DE CHIEN
PRÉALABLEMENT RÉFRIGÉRÉE : ÉTUDE
EXPÉRIMENTALE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MÉDECINE DE CRETEIL

Le

par

Paméla, Virginie FUERTES

Née le 3 Mars 1982 à Saint-Maur-des-Fossés (Val-de-Marne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : M. Alain FONTBONNE

Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : M. Pascal ARNE

Maître de conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences*</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p>
---	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérange, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la faculté de Médecine de Créteil,
Pour avoir accepté de présider le jury,
Hommage respectueux,

Au Docteur Alain FONTBONNE, de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour m'avoir proposé ce sujet, accompagnée et soutenue dans toutes les étapes de
ce travail,
Merci du fond du cœur,

Au Docteur Pascal ARNE, de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour avoir accepté d'être l'assesseur de cette thèse,
Sincères remerciements,

A Xavier, Emmanuel, Aurélien, Emeline et Karine,
Pour leur aide à la réalisation de cette étude et leur soutien,
Un grand merci,

Aux clients du CERCA et à Xavier CAUCHOIS et Ines BARTHELEMY de l'UETM,
Pour avoir accepté de participer à ce travail,
Sincères remerciements

Au service de Virologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et, en particulier,
Mathieu CHAUMIEN,
Pour m'avoir permis d'utiliser et d'accéder à leur chambre froide,
Merci

REMERCIEMENTS

A ma mère,
Qui a sacrifié tant de choses pour
moi,
Qui est toujours présente à mes
côtés,
Avec qui je partage mes moments de
joie,
Qui m'apporte son aide et son soutien
quand je perds pieds,
Aucun mot ne saurait exprimer l'amour
ni la gratitude que je ressens,
Tu seras toujours ma « maman adorée
chérie »,
Que j'aimerais éternellement,
Je te dois la vie,

A Jean-Pierre,
Pour être là à chaque instant
important de ma vie,
Tu es le père que je n'ai jamais eu,

A ma grand-mère,
Qui me manque tellement, mais
Que je garde dans mon cœur à tout
jamais,
J'espère que tu serais fière de moi,

A mon toutounet, Hermès,
Merci pour tout l'amour et le bonheur
que tu m'as apportés,
Je ne t'oublierai jamais,

A ma Puce, si loin et si près de moi
en même temps,

A Jérôme, pour ton soutien et ta
bonne humeur,
A mes compagnons d'études, Audrey,
Hélène, Thomas, Bouli, Frenz, Jack's,
Despé, Kartooch, et les autres
Pour m'avoir supporté durant toutes
ces années,
Et être restés à mes côtés.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. ELEMENTS GENERAUX.....	9
A. ANATOMIE ET ROLES DES DIFFERENTES PARTIES DU TRACTUS GENITAL MALE DU CHIEN	9
1. Les testicules	9
2. Les épидidymes	12
3. Les canaux déférents.....	12
4. La prostate	12
5. L'urètre	13
6. Les glandes de Littre	13
7. Le pénis	13
B. RECOLTE DE LA SEMENCE DE CHIEN	15
1. Récolte manuelle.....	15
a. Environnement	15
b. Matériel.....	15
c. Technique.....	17
2. Méthodes alternatives.....	17
C. EXAMEN DE LA SEMENCE CANINE	18
1. Examen macroscopique	18
a. Volume	18
b. Couleur	18
c. pH	18
2. Mobilité	19
a. Examen au microscope.....	19
b. Evaluation automatisée.....	20
3. Numération.....	21
a. Evaluation au microscope	21
b. Autres techniques	21
4. Spermocytogramme	21
a. Examen au microscope.....	21
b. Evaluation automatisée.....	25
5. Autres tests	25
a. Evaluation de la vitalité.....	25
b. Evaluation de l'intégrité membranaire	26
c. Evaluation de l'intégrité acrosomiale	27
d. Evaluation de l'état de capacitation.....	28
e. Tests d'interaction des gamètes	29

II. CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE	31
A. INDICATIONS	31
B. PRINCIPES GENERAUX	31
1. Utilisation de dilueurs	31
a. Caractéristiques et rôles des dilueurs	32
b. Composition des dilueurs	32
2. Les étapes de la congélation	35
a. Centrifugation	35
b. Dilution	35
c. Equilibration.....	36
d. Conditionnement.....	37
e. Technique de congélation	38
f. Conservation	39
g. Transport	39
3. La décongélation	39
a. Température et temps de décongélation	39
b. Dilution après décongélation	40
4. Effets de la congélation et de la décongélation sur les spermatozoïdes	40
C. APPLICATION DANS L'ESPECE CANINE	41
III. REFRIGERATION DE LA SEMENCE CANINE	43
A. INDICATIONS	43
B. PRINCIPES GENERAUX	43
1. Centrifugation	43
2. Dilution	43
a. Nécessité de l'utilisation d'un dilueur.....	43
b. Caractéristiques et rôles du dilueur	44
c. Composition des dilueurs	44
d. Réalisation de la dilution	45
3. Réfrigération.....	45
4. Transport	46
5. Utilisation	47
6. Effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes	47
C. APPLICATION DANS L'ESPECE CANINE	48
IV. ESSAIS DE CONGELATION POST-REFRIGERATION.....	51

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	55
I. OBJECTIFS	57
A. OBJECTIF GENERAL	57
B. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°1	58
C. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°2	58
D. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°3	58
II. MATERIELS ET METHODES	59
A. ANIMAUX	59
B. METHODES.....	60
1. Récolte de la semence	60
2. Examen de la semence	60
3. Dilueurs.....	62
4. Technique de congélation	63
5. Décongélation	63
6. Analyse de la semence après décongélation	63
C. PROTOCOLE.....	64
1. Expérience n°1	64
2. Expérience n°2	65
3. Expérience n°3	67
D. ANALYSE STATISTIQUE	68
III. RESULTATS	69
A. EXPERIENCE N°1	69
B. EXPERIENCE N°2	72
1. Mobilité	72
2. Intégrité acrosomiale.....	74
C. EXPERIENCE N°3	76
1. Mobilité	76
2. Intégrité acrosomiale.....	78
IV. DISCUSSION	81
A. DISCUSSION DU PROTOCOLE.....	81
B. DISCUSSION DES RESULTATS	82

CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE.....	87
ANNEXES	95
Annexe 1. Aptitude à la récolte des animaux utilisés pour nos expériences.....	97
Annexe 2. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°1	98
Annexe 3. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°2	99
Annexe 4. Intégrité acrosomiale des spermatozoïdes des éjaculats utilisés pour l'expérience n°2.....	100
Annexe 5. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°3	101
Annexe 6. Intégrité acrosomiale des spermatozoïdes des éjaculats utilisés pour l'expérience n°3.....	102

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la maîtrise de la reproduction canine s'est développée et la reproduction assistée connaît un essor grandissant.

Dans ce domaine, la conservation de la semence canine est un sujet qui a fait et fait encore l'objet de nombreuses recherches. Ces dernières ont toujours eu pour objectif de perfectionner les techniques de conservation et d'obtenir les meilleurs résultats possibles en terme de fécondité et de fertilité.

Après la première insémination de semence congelée réussie dans l'espèce canine en 1969, de nombreuses études ont permis d'optimiser les procédés de congélation de la semence canine et les techniques d'insémination artificielle.

Cependant, les chercheurs aspirent toujours à maximiser les taux de réussite, pour tenter d'atteindre les taux obtenus en reproduction naturelle, tout en simplifiant les manipulations pour rendre plus accessible et donc plus répandue la congélation de la semence canine.

En 2006, HERMANSSON et LINDE-FORSBERG ont ainsi décrit et étudié une nouvelle technique de congélation de la semence canine comprenant une étape de réfrigération préalable de 24 et 48 heures qui semble prometteuse. Leur hypothèse est que cette étape de réfrigération permettrait de transporter la semence réfrigérée jusqu'à une banque de semence qui, ensuite, la congèlerait et la conserverait.

Le Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores (CERCA) de Maisons-Alfort est l'un des quatre centres de recherche en France qui réalise des congélations de semence régulièrement. Ce centre cherche à maximiser les taux de gestations obtenus suite à des inséminations artificielles de semence congelée mais aussi à développer ses activités.

Au vu des résultats encourageants de l'étude d'HERMANSSON et de LINDE-FORSBERG (2006), nous avons émis l'hypothèse que la réfrigération de la semence préalable à sa congélation permettrait de simplifier le protocole pour les propriétaires intéressés et de vulgariser la congélation de la semence canine. En effet, si une telle technique s'avérait efficace, les propriétaires pourraient faire prélever et réfrigérer la semence de leur animal chez un vétérinaire agréé, proche de leur domicile, qui l'enverrait ensuite à une banque de semence pour la congélation. Les propriétaires réaliseraient alors une économie de temps et d'argent, ce qui pourrait rendre la congélation de la semence canine plus accessible pour une plus large clientèle. Le CERCA, comme d'autres centres de reproduction, pourrait alors voir son activité de congélation de la semence canine se développer.

Le premier objectif de notre travail est donc de déterminer si la technique étudiée par HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006) donne des résultats satisfaisants en utilisant les méthodes employées par le CERCA en routine et dans des conditions expérimentales.

Notre second objectif est de savoir si cette technique est performante lors d'une mise en conditions réelles.

Après avoir rappelé les éléments généraux de l'anatomie et de la physiologie de l'appareil reproducteur mâle du chien, nous présenterons les techniques de récolte et d'analyse de la semence canine. Nous étudierons ensuite les techniques de congélation et de réfrigération de la semence, qui existent à l'heure actuelle. Puis, nous présenterons le protocole d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG sur la réfrigération de la semence préalable à sa congélation et les résultats obtenus.

Dans une seconde partie, nous exposerons et discuterons notre travail expérimental, qui se compose de trois expériences, et qui a pour but d'étudier les effets de la réfrigération de la semence canine préalable à sa congélation sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation dans des conditions expérimentales et de terrain.

**PREMIERE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

I. ELEMENTS GENERAUX

A. ANATOMIE ET ROLES DES DIFFERENTES PARTIES DU TRACTUS GENITAL MALE DU CHIEN

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

1. Les testicules (d'après SETCHELL, 1991)

Les testicules du chien, de forme ovoïde, sont situés en région périnéale basse où ils sont protégés, de l'extérieur vers l'intérieur, par le scrotum, la tunique vaginale et l'albuginée (voir figure 1).

Chaque testicule est divisé en lobules spermatiques par des cloisons émanant de l'albuginée (voir figure 2). Chacun de ces lobules est composé de tubes séminifères, pelotonnés sur eux-mêmes, et de tissu interstitiel.

La paroi des tubes séminifères est constituée de cellules de Sertoli et de cellules germinales en différenciation (voir figure 3).

Les cellules de Sertoli assurent la protection et la nutrition des cellules germinales ainsi que la production de fluide tubulaire et d'oestrogènes. Parallèlement, les cellules germinales subissent la spermatogenèse : différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes, dont la durée moyenne est de 62 jours. A la fin de cette différenciation, les spermatozoïdes, immobiles, sont libérés dans la lumière des tubes séminifères et sont acheminés vers le *rete testis* par des contractions péristaltiques.

Le tissu interstitiel des testicules correspond à un tissu conjonctif lâche qui comprend des éléments vasculaires, lymphatiques et nerveux.

Il contient également les cellules de Leydig qui assurent la synthèse des hormones sexuelles mâles, principalement la testostérone.

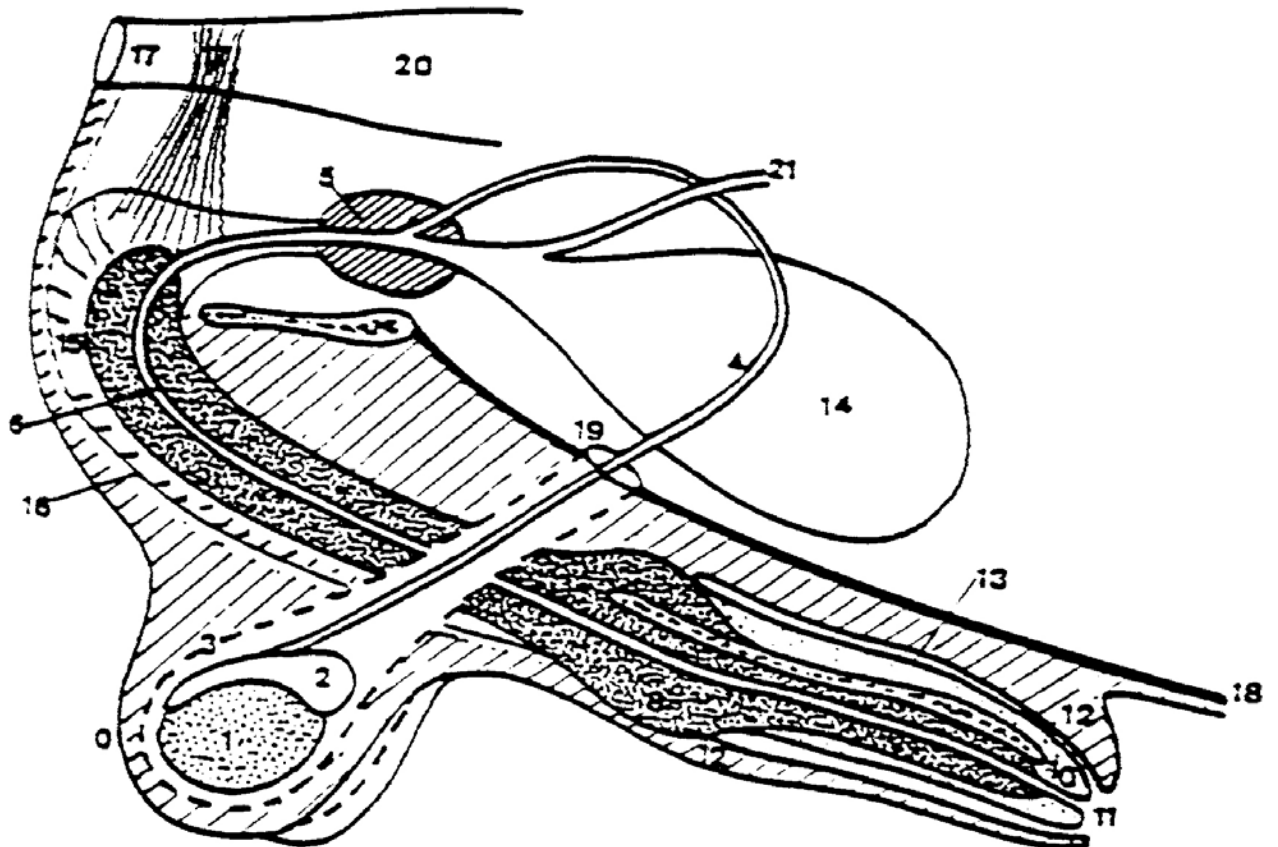
Les testicules possèdent donc deux fonctions essentielles :

- une fonction exocrine : l'élaboration des gamètes mâles ou spermatozoïdes, et
- une fonction endocrine : la production d'hormones sexuelles responsables du développement et du maintien des caractères sexuels mâles.

Ces deux fonctions s'effectuent sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus sécrète de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui stimule la sécrétion de LH (Luteinising Hormone) et de FSH (Follicula Stimulating Hormone) par l'hypophyse.

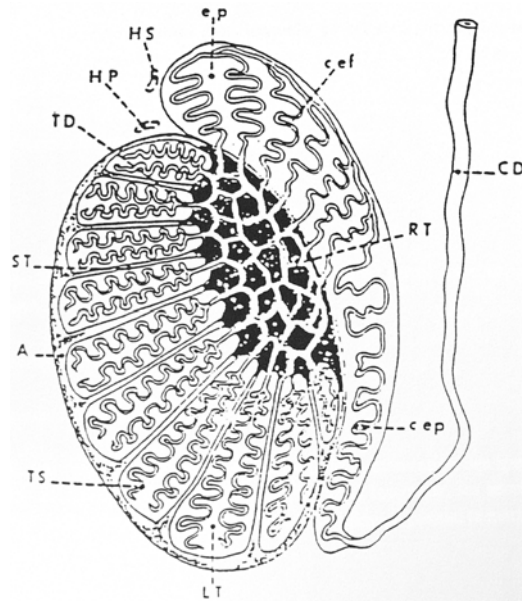
La FSH stimule la spermatogenèse alors que la LH stimule la spermiogenèse (dernière phase de la spermatogenèse), la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères et la production d'hormones sexuelles par les cellules de Leydig.

Figure 1. Schéma des organes génitaux du chien (d'après MIALOT, 1984)



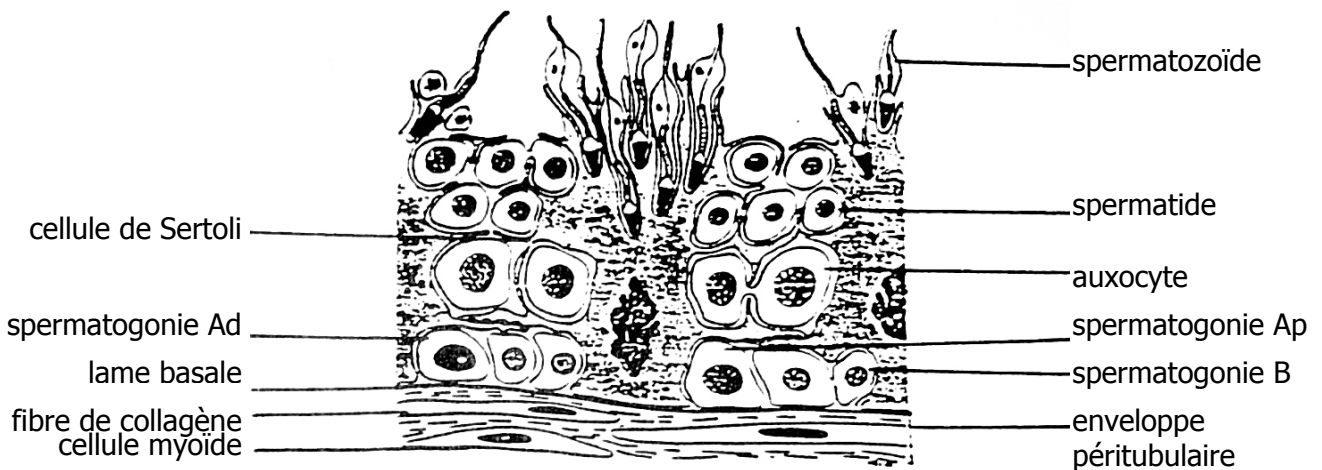
- | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 0 : Scrotum | 8 : Bulbe érectile | 16 : Muscle rétracteur du pénis |
| 1 : Testicule | 9 : Os pénien | 17 : Muscle releveur de l'anus |
| 2 : Epididyme | 10 : Gland du pénis | 18 : Sangle abdominale |
| 3 : Gaine vaginale | 11 : Orifice préputial | 19 : Anneau inguinal |
| 4 : Canal déférent | 12 : Fourreau | 20 : Rectum |
| 5 : Prostate | 13 : Cavité préputiale | 21 : Uretère |
| 6 : Urètre | 14 : Vessie | |
| 7 : Tissu érectile | 15 : Muscle bulbo-caverneux | |

Figure 2. Schéma de l'organisation du testicule et de l'épididyme (d'après BUE, 1992)



- | | |
|--------------------------|------------------------|
| A : Albuginée | HS : Hydatide sessile |
| CD : Canal déférent | LT : Lobe testiculaire |
| cef : Cônes efférents | RT : Rete testis |
| cep : Canal épидидymaire | ST : Septum testis |
| ep : Epididyme | TS : Tube séminifère |
| HP : Hydatide pédiculée | |

Figure 3. Schéma de la structure de la paroi des tubes séminifères (d'après BUE, 1992)



2. Les épидidymes (d'après SETCHELL, 1991)

Chaque épидidyme, recouvrant le testicule correspondant, comporte trois parties :

- une tête, fixée à l'extrémité antéro-inférieure du testicule par le ligament de la tête de l'épididyme,
- un corps, allongé, solidarisé à la face latérale du testicule par un court frein séreux, et
- une queue, attachée à l'extrémité caudée du testicule par le ligament de la queue de l'épididyme et par le ligament propre du testicule.

La tête de l'épididyme est composée d'amas flexueux de canaux efférents, ou canalicules, issus du *rete testis*. Ces canalicules s'anastomosent ensuite pour former un canal épидidymaire unique, constituant le reste de l'organe (voir figure 2).

La progression des spermatozoïdes à travers l'épididyme est permise par les battements des cils de l'épithélium des canalicules, par les sécrétions épithéliales et par les contractions péristaltiques de la couche fibro-musculaire entourant l'épithélium des canaux.

Les substances sécrétées par l'épithélium épидidymaire permettent également aux spermatozoïdes d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant.

La queue de l'épididyme assure le stockage des spermatozoïdes, dont la survie est permise par les sécrétions épидidymaires et la mise en anaérobiose.

Les épидidymes assurent ainsi le transport, la maturation et le stockage des spermatozoïdes.

3. Les canaux déférents (d'après VAISSAIRE, 1977)

Chaque canal déférent fait suite au conduit épидidymaire correspondant et chemine de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre (voir figure 1).

La paroi de ces canaux est composée de fibres musculaires lisses, de fibres élastiques et d'une muqueuse.

Les canaux déférents permettent de transporter les spermatozoïdes et les sécrétions épидidymaires jusqu'à l'urètre lors de l'éjaculation.

4. La prostate (d'après VAISSAIRE, 1977)

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

Son parenchyme est divisé en lobules irréguliers, composés de glandes tubulo-alvéolaires et d'un stroma riche en fibres musculaires, en vaisseaux et en nerfs.

Les sécrétions des glandes tubulo-alvéolaires sont collectées par des canalicules prostatiques qui s'abouchent dans l'urètre.

La prostate est la glande accessoire la plus importante chez le chien. Sous contrôle des androgènes, elle sécrète le liquide prostatique qui constitue la majeure partie de l'éjaculat. Ce liquide assure la dilution, le transport, la nutrition, la protection et la maturation des spermatozoïdes.

5. L'urètre (d'après VAISSAIRE, 1977)

L'urètre est un conduit génito-urinaire qui chemine de la vessie à l'extrémité du gland du pénis (voir figure 1).

Il se divise en trois parties : une partie prostatique, une partie pelvienne et une partie pénienne, et il est constitué d'une tunique musculaire, de tissu érectile et d'une muqueuse.

L'urètre a pour rôle l'acheminement des spermatozoïdes, des sécrétions épидидymaires et prostatiques jusqu'à son ostium externe, situé à l'extrémité du gland du pénis.

6. Les glandes de Littré (d'après VAISSAIRE, 1977)

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

Elles élaborent, en association avec la muqueuse urétrale, la phase urétrale ou pré-spermatique de l'éjaculat.

7. Le pénis (d'après VAISSAIRE, 1977)

Le pénis est situé en région sous-pubienne. Sa partie terminale est protégée par un repli cutanéomuqueux : le prépuce.

Le pénis se divise en trois parties :

- la racine, extrémité fixe, attachée à l'arcade ischiatique,
- le corps, cylindroïde, relativement court,
- le gland ou extrémité libre.

Le pénis est constitué de l'urètre pénien, de tissus érectiles (les corps caverneux et le corps spongieux du gland), de muscles (bulbo-spongieux, ischio-caverneux et rétracteur du pénis) et d'un os pénien (voir figures 1, 4 et 4bis).

Il s'agit de l'organe copulateur mâle.

Suite à la stimulation des zones érogènes, les fibres parasymphatiques, issues du centre médullaire sacré, provoquent la vasodilatation des artères des tissus érectiles ce qui engendre l'érection. Parallèlement, les fibres somatiques du nerf hypogastrique induisent la contraction du muscle ischio-caverneux qui empêche le retour veineux et permet le maintien de l'érection.

Dans un second temps, les influx nerveux provenant des fibres somatiques et orthosymphatiques provoquent la stimulation des glandes annexes et la contraction des fibres musculaires lisses et striées de l'ensemble de l'appareil génital ce qui permet l'éjaculation.

L'éjaculat comporte trois phases émises successivement : la phase urétrale ou pré-spermatique, la phase spermatique ou épидидymaire et la phase prostatique.

Figure 4. Schéma de la structure du pénis (d'après BARONE, 1978)

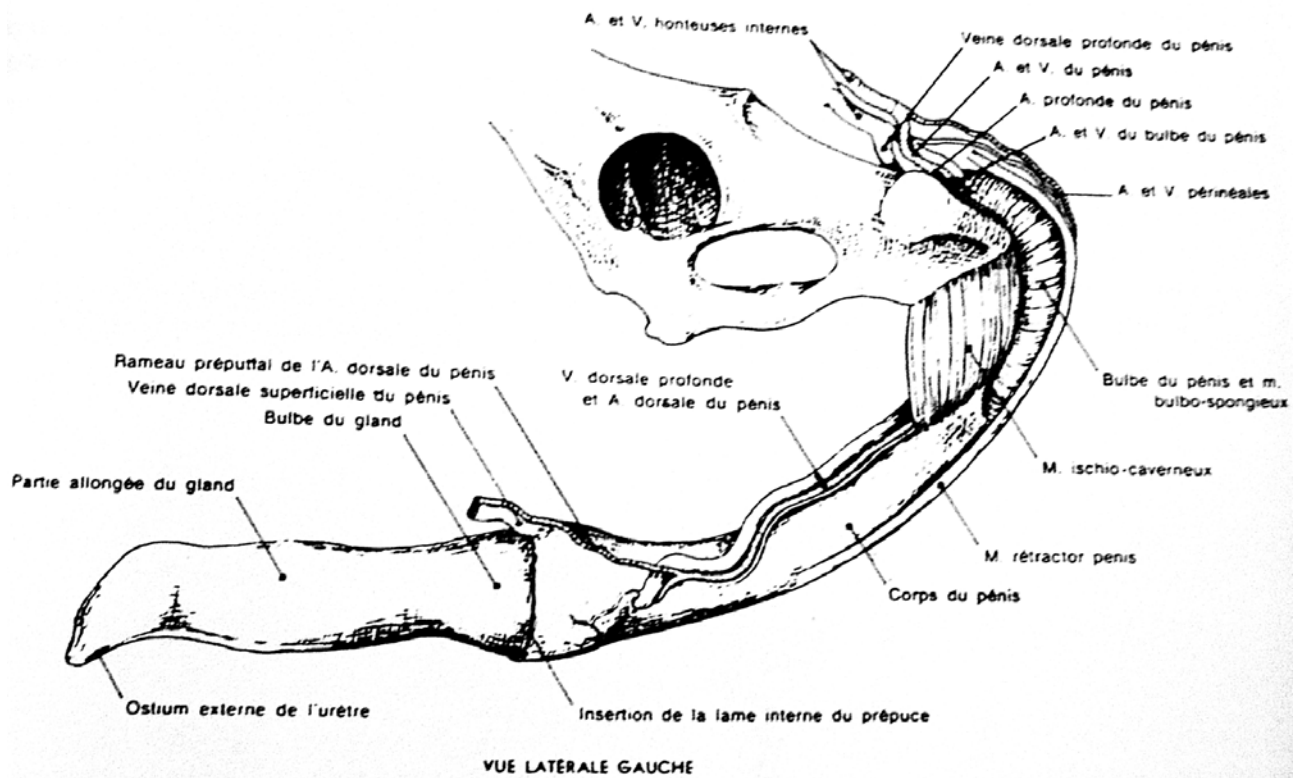
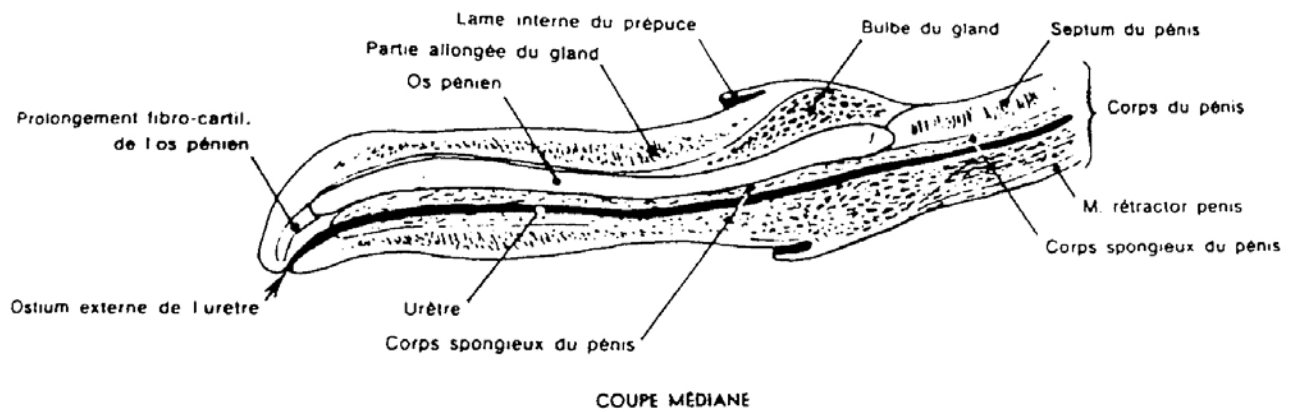


Figure 4bis. Schéma de la structure du pénis (d'après BARONE, 1978)



B. RECOLTE DE LA SEMENCE DE CHIEN

Nous n'envisagerons pas dans ce paragraphe la récolte de la semence épидидymaire, qui se réalise après une orchidectomie ou après la mort de l'animal.

1. Récolte manuelle

Il s'agit de la méthode la plus employée puisqu'elle est simple, rapide (2 à 5 minutes) et efficace.

La plupart des publications sont univoques sur la technique à utiliser et ce qui suit constitue un résumé des références bibliographiques suivantes : JOHNSTON (1991), LINDE-FORSBERG (1995), FRESHMAN (2002), FELDMAN et NELSON (2004a) et KUTZLER (2005).

a. Environnement

La récolte doit s'effectuer dans un environnement calme, en évitant toute perturbation ou tout stress pour l'animal. Le nombre de personnes présentes doit être réduit au minimum et la présence du propriétaire peut être indispensable, indifférente ou à éviter selon les animaux.

La présence d'une femelle, de préférence en chaleurs, n'est pas toujours nécessaire mais peut permettre de faciliter la récolte et d'obtenir un sperme de meilleure qualité.

Idéalement, une femelle connue du mâle doit être utilisée.

Si la femelle n'est pas en chaleurs, il est possible d'utiliser des phéromones de synthèse de femelle en chaleurs (méthyl p-hydroxybenzoate) ou des sécrétions vaginales de femelle en chaleurs, conservées congelées sur des compresses, qui seront déposées sur la vulve de la chienne.

Cette dernière doit être maintenue en position debout avec présentation de la vulve au mâle. Si elle s'avère peu coopérative, elle doit être muselée.

b. Matériel

Le matériel nécessaire se compose, en général, de trois tubes stériles gradués sur lesquels sont placés trois cônes en plastique souple ou vagins artificiels (voir photographies 1 et 2). Chaque ensemble est utilisé pour récolter chacune des trois phases de l'éjaculat.

Les tubes stériles gradués à usage unique sont préférables puisqu'ils n'ont pas besoin d'être stérilisés et qu'ils ne contiennent aucun résidu.

Les cônes en plastique présentent l'intérêt d'être atraumatiques et réutilisables. Entre chaque utilisation, il convient de les nettoyer, les désinfecter, les rincer abondamment (les désinfectants étant spermicides) et les laisser sécher (l'eau étant également spermicide).

Leur principal inconvénient est le risque de contamination par le prépuce, qui doit être minimisé en respectant le protocole présenté ci-après.

Avant utilisation, les cônes et les tubes doivent être réchauffés à 37°C pour le confort de l'animal et pour éviter aux spermatozoïdes un choc thermique trop important.

Photographie 1. Ensemble tube stérile gradué et cône en plastique souple utilisé pour récolter chaque phase de l'éjaculat (Cliché CERCA)



Photographie 2. Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine (trois tubes stériles gradués et leur cône en plastique placés dans un porte-tube métallique conservant la chaleur) (Cliché CERCA)



c. Technique

Avant la récolte, il est utile de faire uriner l'animal afin de minimiser le risque de contamination du sperme par l'urine.

La récolte se pratique le plus souvent au sol, le manipulateur se plaçant à genoux à côté du chien.

Pendant que celui-ci s'intéresse à la femelle, le manipulateur commence à masser énergiquement les bulbes érectiles à travers le prépuce. Lorsque le pénis et les bulbes érectiles commencent à enfler, la verge est décalottée jusqu'en arrière des bulbes érectiles.

Le manipulateur exerce alors une striction du pénis en arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index d'une de ses mains et introduit le pénis dans le premier cône de l'autre main. Généralement, le chien présente des mouvements du bassin et commence à éjaculer la première phase.

Lorsque les mouvements du bassin diminuent, le manipulateur doit changer de cône, tout en maintenant une pression en arrière des bulbes érectiles, car l'émission de la seconde phase débute. Le chien essaye alors de « descendre » du bras du manipulateur en levant un des postérieurs, il faut aider l'animal en ce sens et retourner le pénis à 180° vers l'arrière pour mimer le déroulement normal d'une copulation. Le manipulateur se place donc derrière l'animal pour récolter la fin de la seconde phase.

Le dernier changement de cône se fait lors du passage à l'émission de la phase prostatique qui est mis en évidence par une courte pause, par les contractions péniennes et par la production d'un liquide translucide. Il n'est pas utile de récolter la totalité de la troisième phase, celle-ci étant d'un volume important et émise sur un temps plus ou moins long.

Après la récolte, il faut vérifier que le pénis soit correctement recalotté avant de laisser partir l'animal ou de le remettre en cage afin de prévenir un éventuel paraphimosis ou des blessures péniennes.

Une autre technique consiste à récolter la première et la seconde phase dans le même tube et la troisième phase dans un deuxième tube. Cette technique est envisageable si le sperme est utilisé pour une insémination artificielle en semence fraîche ou si le sperme est centrifugé et le surnageant éliminé. En effet, les sécrétions prostatiques contenues dans la première et la troisième phases sont toxiques pour les spermatozoïdes (ROTA *et al.*, 1995 ; SIRIVAIDYAPONG *et al.*, 2001 ; TSUTSUI *et al.*, 2003).

Les tubes contenant la semence doivent être maintenus à 37°C ou, à défaut, à température ambiante en attendant l'analyse du sperme et son utilisation.

2. Méthodes alternatives

Utilisée chez d'autres espèces (félidés, bovidés...), l'électro-éjaculation est une technique très peu employée dans l'espèce canine. En effet, la récolte manuelle chez le chien est aisée et l'électro-éjaculation présente des inconvénients non négligeables : anesthésie générale, brûlures et lésions du rectum, contamination par de l'urine et éjaculation rétrograde (STIEVENART, 1997).

KUTZLER (2005) a réuni les résultats d'essais de récolte de semence suite à l'administration d'agents pharmacologiques : l'imipramine et la xylazine, d'une part, et la pilocarpine, d'autre part. Aucun de ces deux protocoles n'a montré de réelle efficacité ni d'avantage par rapport à la récolte manuelle.

C. EXAMEN DE LA SEMENCE CANINE

L'examen de la semence est une étape préalable et indispensable à toute utilisation de la semence, que ce soit pour une insémination artificielle en semence fraîche, une réfrigération ou une congélation, afin d'essayer de prévoir les capacités de fertilisation de cette semence. En effet, la plupart des auteurs reconnaissent que plus la qualité de la semence est bonne, meilleur sera potentiel de fertilisation. Ainsi, même s'il n'a pas encore été possible de démontrer une réelle corrélation entre la fertilité d'un mâle et la qualité de sa semence, il convient d'évaluer le plus de paramètres morphologiques et fonctionnels possibles pour pouvoir prévoir la capacité de fécondation des spermatozoïdes.

1. Examen macroscopique

a. Volume

Le volume de l'éjaculat est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille et de la fréquence des récoltes.

Pour chaque phase de l'éjaculat, le volume peut être compris entre :

- 1 et 5 mL pour la première phase,
- 1 et 3 mL pour la seconde phase,
- 1 et 40 mL pour la troisième phase (LINDE-FORSBERG, 1995).

b. Couleur

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 (FELDMAN et NELSON, 2004a).

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, ou
- une coloration rougeâtre, suggérant un saignement prostatique ou pénien (FRESHMAN, 2002).

c. pH

Peu déterminé en routine, le pH des deux premières phases est normalement compris entre 6,3 et 6,7 tandis que le pH de la phase prostatique est compris entre 6 et 7,4.

Une éjaculation partielle, une inflammation des testicules, de l'épididyme ou de la prostate sont des causes potentielles d'une augmentation du pH (FELDMAN et NELSON, 2004a).

2. Mobilité

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

a. Examen au microscope

Pour examiner la mobilité des spermatozoïdes au microscope, il faut observer une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle. Idéalement, l'observation doit se faire sur un microscope muni d'une platine chauffante à 37°C (voir photographie 3) pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement.

En général, cette évaluation ne nécessite pas de dilution. Toutefois, si la semence est trop concentrée, une dilution peut être réalisée avec du fluide prostatique, un dilueur ou une solution saline isotonique.

Une évaluation de la mobilité de masse au grossissement x100 peut être réalisée en première intention afin d'apprécier l'agglutination, les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note est alors affectée à l'échantillon en fonction des mouvements observés (voir tableau 1).

Tableau 1. Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (d'après GUIGARDET, 1997)

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

Une évaluation de la mobilité individuelle au grossissement x40 permettra de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ayant des mouvements fléchants (c'est-à-dire ayant des mouvements rapides et en ligne droite).

Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (LINDEFORSBERG, 1995).

Même si cette évaluation est simple, rapide et peu onéreuse, elle est très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (30 à 60 %). Les biais seront tout de même réduits si elle est toujours effectuée par la même personne expérimentée.

Photographie 3. Microscope à platine chauffante du CERCA (Cliché CERCA)



b. Evaluation automatisée

Les importantes variations liées à l'évaluation subjective de la mobilité des spermatozoïdes ont incité les chercheurs à développer des systèmes d'évaluation objectifs et standardisés, les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA (Computer-Aided Semen Analysis). 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 IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001a). 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 du déplacement latéral de la tête, l'amplitude et la fréquence des battements flagellaires.

Le SQA (Sperm Quality Analyzer) a également été validé pour son utilisation dans l'espèce canine par IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001b) et par RIJSSEJAERE *et al.* (2002).

Une cellule photométrique détecte les variations de densité optique dans un tube capillaire contenant un échantillon de la phase spermatique. Ces variations sont converties en un index de mobilité du sperme ou SMI (Sperm Motility Index). Selon la valeur de cet index, dépendant de la concentration en spermatozoïdes mobiles, le sperme peut être classé en trois catégories :

- sperme de qualité médiocre : $SMI < 100$,
- sperme de qualité moyenne : $100 < SMI < 250$, et
- sperme de bonne qualité : $SMI > 250$.

L'intérêt du SQA est son coût relativement faible par rapport aux autres systèmes CASA. Son inconvénient est qu'il sature au-dessus de 150 à 200 millions de spermatozoïdes par millilitre, certainement à cause de l'impossibilité de mouvements des spermatozoïdes dans le tube capillaire à cette concentration.

Les principaux inconvénients de ces systèmes automatisés sont leur coût, la nécessité de leur validation et de leur standardisation.

Mais, une fois standardisés, ils montrent une très grande répétabilité, avec des coefficients de variation inférieurs à 10 %. Ils s'avèrent donc très utiles pour évaluer de façon objective et précise la mobilité des spermatozoïdes.

3. Numération

Il faut noter que l'évaluation de la concentration en spermatozoïdes n'est pas représentative de la qualité de la semence car elle dépend de la séparation des trois phases de l'éjaculat. Il vaut donc mieux évaluer la quantité totale de spermatozoïdes présents dans la phase spermatique.

a. Evaluation au microscope

En routine, la numération s'effectue à l'aide d'une cellule hématimétrique : cellule de Thoma ou de Malassez.

La dilution d'une fraction de la phase spermatique avec une solution hypertonique (chlorure de sodium à 3 %) est une étape préalable qui permet d'immobiliser les spermatozoïdes. En général, une dilution au 1/100^{ème} est réalisée.

Une goutte de semence diluée est déposée entre lame et lamelle sur une cellule de Thoma ou de Malassez et les spermatozoïdes sont dénombrés en fonction de la technique relative à chaque type de cellule.

Selon le type de cellule utilisée, la dilution réalisée et le volume de la phase spermatique, la valeur calculée est extrapolée pour obtenir le nombre total de spermatozoïdes en millions.

Le nombre total de spermatozoïdes varie entre 200 millions et plusieurs milliards en fonction de l'âge, de la race et de l'activité sexuelle de l'animal.

b. Autres techniques

La numération peut également être réalisée grâce à des techniques plus modernes : la spectrophotométrie, la cytométrie de flux ou le système Hamilton-Thorne.

4. Spermocytogramme

Faire un spermocytogramme consiste à analyser la morphologie des spermatozoïdes et à déterminer le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux.

a. Examen au microscope

Pour réaliser un spermocytogramme, il faut colorer une goutte de la phase spermatique et observer 100 à 200 spermatozoïdes au microscope au grossissement x400. Il est alors possible de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux.

Différentes colorations sont utilisables : l'éosine-nigrosine, la coloration Spermac[®] et la coloration Diff Quik[®].

Pour la coloration à l'éosine-nigrosine, une goutte de phase spermatique et une goutte de colorant sont déposées sur une lame, mélangées puis étalées.

Pour les deux autres colorations, une goutte de phase spermatique est déposée sur une lame et étalée. Après séchage à l'air libre, la lame est plongée dans les différents colorants selon la technique et le temps indiqués par le fabricant.

ROOT KUSTRITZ *et al.* (1998) ont montré que, selon la technique de coloration employée, il existe des variations : chaque technique est susceptible d'augmenter artéfactuellement la proportion de certaines anomalies tout en diminuant l'importance d'autres, la proportion de spermatozoïdes normaux restant plus ou moins la même. Ces auteurs ont également démontré que d'importantes variations existent entre les opérateurs pour la répartition des anomalies, ce qui confirme la subjectivité et la variabilité inhérentes à cette évaluation au microscope.

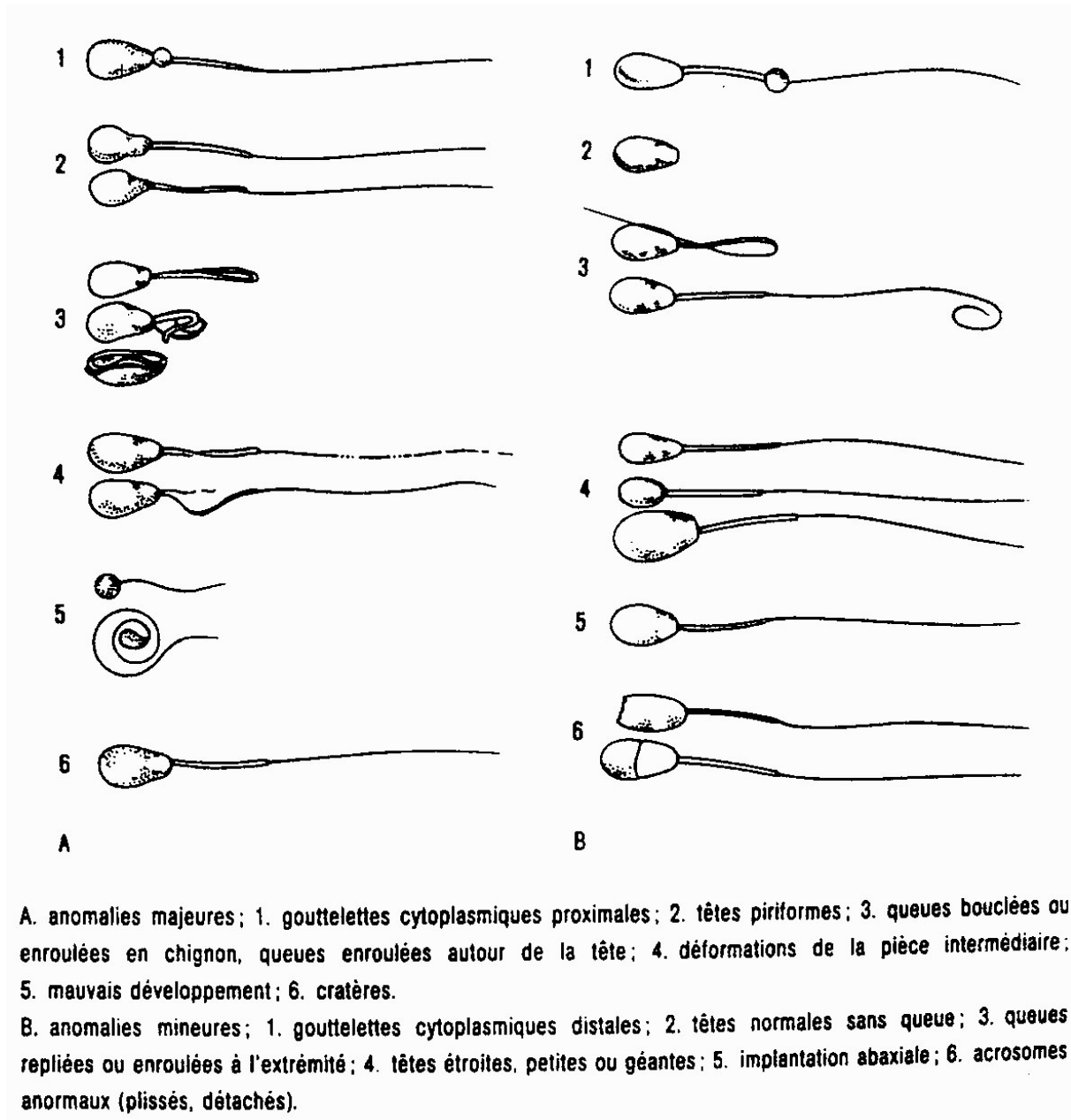
Les principales anomalies morphologiques observables sont présentées dans la figure 5 et quelques exemples sont illustrés par les photographies 4, 5 et 6.

Ces anomalies sont classées en deux catégories :

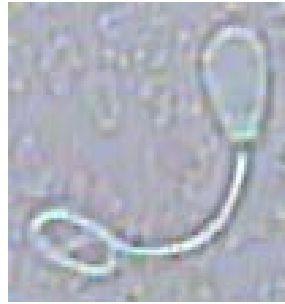
- les anomalies majeures, qui surviennent pendant la spermatogenèse et qui correspondent principalement à des anomalies de la tête, et
- les anomalies mineures, qui surviennent durant le stockage des spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, la récolte de la semence ou la préparation de la lame et qui correspondent le plus souvent à des anomalies de la pièce intermédiaire ou du flagelle.

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

Figure 5. Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes
(d'après OTT *et al.*, 1987)



Photographie 4. Spermatozoïde possédant un flagelle enroulé, coloration à l'éosine-nigrosine, grossissement x400 (Cliché CERCA)



Photographie 5. Spermatozoïde possédant une gouttelette cytoplasmique proximale, coloration à l'éosine-nigrosine, grossissement x400 (Cliché CERCA)



Photographie 6. Spermatozoïde possédant une pièce intermédiaire coudée, coloration à l'éosine-nigrosine, grossissement x400 (Cliché CERCA)



b. Evaluation automatisée

Comme pour l'évaluation de la mobilité, les chercheurs ont essayé de s'affranchir de la subjectivité et de la variabilité liées à l'évaluation au microscope de la morphologie des spermatozoïdes.

DAHLBOM *et al.* (1997) ont ainsi montré qu'un système automatisé, le Leica, peut être utile pour évaluer la morphologie des spermatozoïdes. Il permet de calculer la longueur, la largeur, la surface et la rondeur de la tête des spermatozoïdes.

Le système Hamilton-Thorne, précédemment décrit, a également été validé par RIJSSEJAERE *et al.* (2004) pour l'analyse morphométrique de la semence canine. Il permet d'obtenir des paramètres morphologiques tels que la longueur, la largeur, la surface et le périmètre de la tête des spermatozoïdes, la longueur du flagelle et le pourcentage de spermatozoïdes normaux.

L'intérêt de ces systèmes est de permettre une évaluation objective et répétable de la morphologie des spermatozoïdes, mais aussi de mettre en évidence des anomalies non décelables par un opérateur.

Cependant, ils ne permettent pour l'instant une évaluation précise que de la tête des spermatozoïdes et des référentiels de normes doivent être créés avant de pouvoir les utiliser en routine.

5. Autres tests

a. Evaluation de la vitalité

L'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est effectuée en déterminant le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans l'éjaculat.

Pour cela, la coloration éosine-nigrosine est utilisée, telle que décrite précédemment. Les spermatozoïdes vivants apparaissent colorés en bleu-vert et les spermatozoïdes morts sont colorés en rose.

Suite à l'observation de 100 à 200 spermatozoïdes, les deux populations de spermatozoïdes, vivants ou morts, sont dénombrées et le pourcentage de chaque population est calculé.

Cette technique est simple, rapide et peu onéreuse, mais elle reste subjective.

D'autres colorations existent pour différencier les spermatozoïdes vivants et morts. Les deux principaux autres colorants utilisés pour évaluer la vitalité des spermatozoïdes sont des indicateurs fluorescents de pH intracellulaire :

- le carboxy-SNARF, qui colore en orange les spermatozoïdes vivants, et
- l'hoecht 33258, qui colore en bleu clair les spermatozoïdes morts.

En général, l'un ou l'autre de ces deux colorants est utilisé en parallèle d'autres colorations fluorescentes servant à évaluer l'intégrité membranaire ou acrosomiale des spermatozoïdes. L'utilisation d'un microscope à trans-illumination rend l'évaluation très laborieuse tandis que l'utilisation de la cytométrie de flux se révèle très intéressante (PENA *et al.*, 1998a et 2001).

b. Evaluation de l'intégrité membranaire

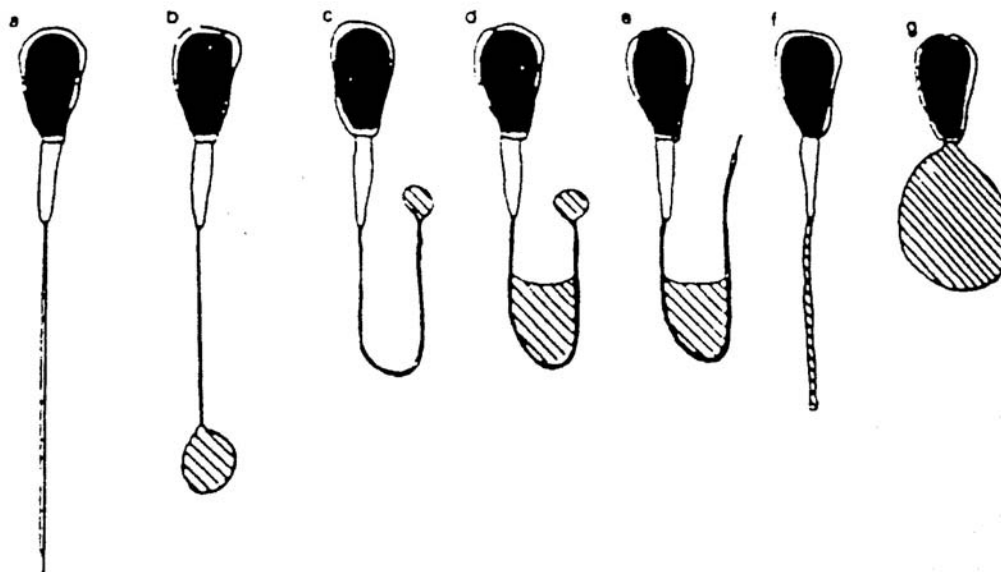
Différentes méthodes sont utilisables pour évaluer l'intégrité membranaire des spermatozoïdes. Les principales sont regroupées ci-dessous.

Test hypo-osmotique (ENGLAND et PLUMMER, 1993)

Le test hypo-osmotique permet de vérifier la fonctionnalité de la membrane plasmatisque des spermatozoïdes. Dans un milieu hypo-osmotique, les spermatozoïdes, dont la membrane plasmatisque est fonctionnelle, vont se gorger d'eau et montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement de celui-ci (voir figure 6, schémas b à g). Si la membrane plasmatisque est endommagée, elle ne permettra pas la pénétration et la rétention d'eau dans les spermatozoïdes et ces derniers vont conserver leur morphologie (voir figure 6, schéma a).

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

Figure 6. Représentation de l'apparence morphologique des spermatozoïdes ayant réagi au test hypo-osmotique (schémas b à g) et des spermatozoïdes ne réagissant pas (a) (d'après ENGLAND et PLUMMER, 1993)



Microscopie à balayage électronique (VEYER, 2002)

La microscopie à balayage électronique est une technique qui permet de visualiser avec précision la membrane plasmatisque des spermatozoïdes. Pour leur observation, les spermatozoïdes sont fixés, déshydratés et recouverts d'or. 100 à 200 spermatozoïdes sont observés et le pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane plasmatisque intacte et celui des spermatozoïdes ayant une membrane plasmatisque endommagée sont calculés.

C'est une technique très fiable mais qui s'avère être onéreuse et laborieuse, c'est pourquoi elle reste très peu utilisée.

Colorations

RIJSSELAERE *et al.* (2005) résumant les différentes colorations qui existent pour évaluer l'intégrité membranaire des spermatozoïdes.

La coloration la plus utilisée est le diacétate de carboxyfluorescéine. Il s'agit d'un composé non fluorescent qui traverse les membranes plasmiques. Dans le milieu intra-cellulaire, il est rapidement transformé par les estérases en carboxyfluorescéine, molécule fluorescente en vert, qui reste piégée à l'intérieur de la cellule si la membrane plasmique est intacte.

Les spermatozoïdes intacts vont donc émettre une fluorescence verte tandis que les spermatozoïdes ayant une membrane plasmique endommagée ne seront pas fluorescents. Cette coloration est fréquemment associée à l'utilisation de l'iodure de propidium, qui colore en rouge l'ADN et qui ne pénètre pas dans les cellules intactes. Dans ce cas, les cellules intactes émettront une fluorescence verte et les cellules endommagées seront colorées en rouge.

L'analyse de cette coloration peut se faire par observation au microscope à trans-illumination, mais cette méthode est très laborieuse et subjective.

PENA *et al.* (1998a) ont validé une technique de cytométrie de flux pour l'analyse de cette coloration, ce qui permet une évaluation objective d'un grand nombre de spermatozoïdes en peu de temps.

c. Evaluation de l'intégrité acrosomiale

Différentes techniques sont utilisées pour déterminer l'état de l'acrosome des spermatozoïdes.

Coloration éosine-nigrosine

L'intégrité acrosomiale peut être évaluée par la coloration à l'éosine-nigrosine. La technique est identique à celle employée pour l'évaluation de la vitalité. Les spermatozoïdes dont l'acrosome est intact apparaissent blancs avec un bord apical bien défini. Ceux qui ont subi la réaction acrosomiale ou qui ont perdu leur acrosome sont colorés en noir et ont un bord apical irrégulier.

Cette technique est toutefois loin d'être une technique de choix car elle est grossière et subjective même si elle reste simple, rapide et peu onéreuse.

Coloration Spermac[®]

Le statut acrosomial peut également être évalué par la coloration Spermac[®]. Après étalement d'une goutte de phase spermatique sur une lame, fixation, séchage et coloration, les spermatozoïdes sont observés au microscope au grossissement x40. Les spermatozoïdes intacts montrent un noyau coloré en rouge, un acrosome, une pièce intermédiaire et un flagelle colorés en vert et une région équatoriale colorée en vert clair. Les spermatozoïdes dont l'acrosome est altéré apparaissent gonflés et colorés en vert clair dans la région de l'acrosome. Les spermatozoïdes qui ont perdu leur acrosome ne présentent qu'une coloration rouge du noyau.

Ce procédé possède les mêmes avantages que la technique précédente tout en étant plus précis (GUIGARDET, 1997). Cependant, il reste subjectif et certains auteurs affirment que les colorations fluorescentes offrent un meilleur contraste et sont plus discriminantes que la coloration Spermac[®] (TALON, 1999 ; RIJSSELAERE *et al.*, 2005).

Colorations fluorescentes

Pour les colorations fluorescentes, des lectines, l'agglutinine de cacahuète ou l'agglutinine de *Pisum sativum*, conjuguées avec de l'isothiocyanate de fluorescéine, sont utilisées. Ces lectines se fixent spécifiquement sur le contenu acrosomial et sont rendues visibles par la fluorescence verte de l'isothiocyanate de fluorescéine. Cette coloration peut être utilisée selon deux techniques (PENA, 2004).

Si une perméabilisation préalable des membranes est réalisée (par un traitement à l'éthanol), les spermatozoïdes ayant un acrosome intact émettent une fluorescence prononcée dans la région de l'acrosome tandis que les spermatozoïdes dont l'acrosome est lésé ne fluorescent pas ou uniquement dans la région équatoriale.

Si les spermatozoïdes n'ont pas été perméabilisés, les spermatozoïdes dont l'acrosome est intact ne fluorescent pas alors que les spermatozoïdes dont la membrane acrosomiale est lésée émettent une fluorescence verte.

Cette coloration peut être combinée avec la coloration par l'iodure de propidium et par le carboxy-SNARF afin d'évaluer en même temps la vitalité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes de façon efficace (PENA *et al.*, 1999).

La chlortétracycline, un antibiotique fluorescent, est également utilisée pour déterminer l'état de l'acrosome et de capacitation des spermatozoïdes (HEWITT et ENGLAND, 1998 ; VEYER, 2002). Ce colorant permet de distinguer trois catégories de spermatozoïdes :

- les spermatozoïdes non capités et dont l'acrosome est intact, qui émettent une fluorescence intense et uniforme de la tête,
- les spermatozoïdes capités dont l'acrosome est intact, qui présentent une fluorescence intense dans la région de l'acrosome et une bande de fluorescence atténuée dans la région post-acrosomiale,
- les spermatozoïdes capités et ayant subi la réaction acrosomiale, qui présentent une fluorescence atténuée de l'ensemble de la tête avec une fine bande de forte fluorescence dans la région équatoriale.

Les études menées sur ce procédé ont montré son efficacité.

Marquage d'enzymes acrosomiales

CORTES *et al.* (2006) ont prouvé que l'intégrité acrosomiale peut être évaluée par le marquage d'enzymes acrosomiales, la pro-acrosine et l'acrosine. Le marquage de ces enzymes peut s'effectuer de deux façons :

- utilisation d'un anticorps monoclonal, dirigé contre l'acrosine humaine, qui réagit avec l'acrosine canine et qui est révélé par un anti-anticorps d'espèce conjugué à un marqueur fluorescent (Alexa 488), ou
- utilisation d'un inhibiteur de la trypsine marquée par l'Alexa 488.

Après perméabilisation des membranes, les acrosomes intacts seront fluorescents alors que les acrosomes endommagés ne seront pas fluorescents.

d. Evaluation de l'état de capacitation

Comme vu précédemment, l'état de capacitation des spermatozoïdes peut être mis en évidence par l'utilisation de la chlortétracycline (JACQUET, 2003).

Les spermatozoïdes capités peuvent également être détectés par les systèmes CASA puisqu'ils présentent une vitesse curvilinéaire et une amplitude du déplacement latéral de la tête augmentées et une linéarité diminuée (PENA, 2004).

Enfin, les techniques d'évaluation de l'acrosome peuvent permettre d'évaluer l'état de capacitation des spermatozoïdes car la réaction acrosomiale est une étape de la capacitation.

e. Tests d'interaction des gamètes

Plusieurs tests permettent d'évaluer la capacité d'interaction des spermatozoïdes avec l'ovocyte.

Test de liaison à la zone pellucide

La liaison du spermatozoïde à la zone pellucide est une étape cruciale de la fécondation de l'ovocyte.

Deux types de tests ont été expérimentés pour mettre en évidence cette liaison.

Le premier test est réalisé en utilisant des ovocytes entiers, issus d'ovario-hystérectomies. Il consiste à dénombrer le nombre de spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide en utilisant un microscope à contraste de phase ou des techniques de microscopie à fluorescence.

Le second type de test utilise des ovocytes scindés en deux et dont le cytoplasme a été excisé. Cette micro-manipulation permet d'obtenir deux héli-zones pellucides. Celles-ci sont ensuite incubées avec des spermatozoïdes, et le nombre de spermatozoïdes fixés est dénombré par observation au microscope à contraste de phase.

D'après MAYENCO-AGUIRRE et PEREZ CORTES (1998), la capacité de fixation à l'héli-zone et la fertilité sont bien corrélées.

L'avantage de cette technique, par rapport à la précédente, est qu'elle permet de comparer les capacités de fixation des spermatozoïdes d'un mâle à tester et d'un témoin en s'affranchissant des variations liées à la zone pellucide elle-même. Cette technique permet également d'utiliser des héli-zones stockées réfrigérées ou congelées, contrairement au premier test où les ovocytes doivent être frais.

L'avantage de ces tests est qu'ils pourraient permettre de prévoir la fertilité du sperme. Par contre, ils sont très laborieux et nécessitent du matériel spécifique.

Test de pénétration de l'ovocyte

Les tests de pénétration de l'ovocyte ont été développés avec succès car ils sont réalisables avec des ovocytes immatures (HEWITT et ENGLAND, 1997). Après incubation avec les ovocytes, les têtes des spermatozoïdes qui ont pénétré l'ovocyte sont dénombrées par observation au microscope avec ou sans coloration fluorescente.

Il a été établi que la pénétration des ovocytes est fortement corrélée à la mobilité des spermatozoïdes, alors qu'aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la capacité de pénétration et l'état de l'acrosome (HEWITT et ENGLAND, 1997).

Test de fécondation in vitro

Dans l'espèce canine, les tests de fécondation *in vitro* se révèlent décevants. Une des explications est la difficulté de reproduire *in vitro* la maturation ovocytaire post-ovulation. De plus, lorsque les fécondations sont réussies, le développement embryonnaire n'intervient que rarement sans qu'il y ait de véritable explication (RIJSSELAERE *et al.*, 2005).

II. CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE

A. INDICATIONS

Depuis plusieurs années, la conservation de la semence et l'insémination artificielle se sont développées et intéressent de plus en plus d'éleveurs canins.

La congélation de la semence permet de conserver pendant une durée indéfinie le potentiel génétique d'un animal. Elle offre ainsi la possibilité de transmettre ce potentiel à la descendance lorsque l'animal ne pourra plus reproduire, suite à des affections pathologiques ou à la vieillesse, ou après sa mort.

La congélation permet également de transporter la semence sur de longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle, ce qui est particulièrement stressant pour l'animal et donc néfaste au bon déroulement de l'accouplement et de la fécondation.

De plus, la législation de nombreux pays est de plus en plus contraignante pour l'introduction d'animaux sur leur territoire, avec parfois des quarantaines de plusieurs jours ce qui rend impossible un accouplement au moment le plus propice du cycle de la femelle.

La congélation et le transport de la semence permettent alors de s'affranchir de ces problèmes.

Le transport de la semence congelée permet également une dispersion incomparable de caractères génétiques intéressants.

En plus de ces avantages spécifiques, l'utilisation de semence congelée permet de bénéficier de ceux de l'insémination artificielle, c'est-à-dire :

- la réduction du risque de transmission d'agents infectieux au mâle, et
- la résolution des difficultés d'accouplement, qu'elles soient d'origine anatomique, fonctionnelle ou comportementale.

B. PRINCIPES GENERAUX

1. Utilisation de dilueurs

Pour protéger et nourrir les spermatozoïdes durant la congélation, un milieu particulier est utilisé : le dilueur ou milieu de congélation.

Il n'existe pas de consensus sur une composition de dilueur bien définie. Mais, il existe de nombreux dilueurs, commercialisés prêts à l'emploi ou faits par chaque unité de reproduction, dont la composition varie plus ou moins.

Les dilueurs peuvent être conservés dans un congélateur ordinaire.

Si du jaune d'œuf est nécessaire, il est, le plus souvent, ajouté au moment de l'utilisation ; mais, si le jaune d'œuf est déjà présent, le dilueur ne pourra être conservé congelé que deux ou trois mois (LINDE-FORSBERG, 2001).

a. Caractéristiques et rôles des dilueurs

D'après ENGLAND (1993), un dilueur doit :

- être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spermatozoïdes,
- avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation,
- avoir un pouvoir anti-oxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- avoir une activité antimicrobienne,
- posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes.

b. Composition des dilueurs

Cryoprotecteurs

Ces substances ont pour rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau.

Le glycérol est le plus utilisé des cryoprotecteurs de part le monde.

Il possède une action à la fois intra- et extra-cellulaire.

Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes.

Dans le milieu extra-cellulaire, le glycérol, dont la température de congélation est plus basse que celle de l'eau, se fixe aux molécules d'eau. Il diminue ainsi le seuil de congélation de l'eau extra-cellulaire et permet de limiter le gradient osmotique et de ralentir la vitesse de déshydratation des spermatozoïdes.

Cependant, le glycérol possède également des effets néfastes. HAY *et al.* (1997a) ont montré que le glycérol diminue la capacité de fixation aux ovocytes des spermatozoïdes. Il semblerait que le glycérol provoque une altération de l'organisation et de la viscosité du cytoplasme et une altération de la perméabilité et de la stabilité membranaire (MARTINS-BESSA *et al.*, 2006).

L'utilisation du glycérol correspond donc à un compromis entre ses effets cryoprotecteurs et ses effets toxiques. Chez le chien, FONTBONNE et BADINAND (1993a) ont montré qu'une concentration faible en glycérol (1,6 %) provoque une réduction de la mobilité après décongélation par rapport à des concentrations plus élevées. Par contre, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre l'utilisation de 3,2 ou 6,4 % de glycérol.

Les dilueurs canins actuels contiennent une concentration en glycérol allant de 3 à 9 % sans qu'une concentration optimale n'ait été reconnue.

L'éthylène glycol est une substance proche du glycérol, mais dont le poids moléculaire est plus faible ce qui lui confère une plus grande perméabilité cellulaire.

MARTINS-BESSA *et al.* (2006) et ROTA *et al.* (2006) ont étudié l'utilisation de l'éthylène glycol comme cryoprotecteur. Ces deux études n'ont pas mis en évidence d'intérêt à utiliser de l'éthylène glycol en plus ou en remplacement du glycérol.

Le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) est un cryoprotecteur intra-cellulaire qui s'est révélé moins efficace que le glycérol et qui n'est donc pas utilisé (OLAR *et al.*, 1989).

Protecteurs membranaires

Il s'agit principalement du jaune d'œuf et du lait qui sont ajoutés au dilueur car ils possèdent plusieurs propriétés intéressantes, notamment celle de protéger les membranes des spermatozoïdes.

Le jaune d'œuf est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation (ENGLAND, 1993). Néanmoins, le mécanisme de cette protection n'est pas encore totalement élucidé.

Le plus souvent, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20 %.

Le lait contient des protéines qui protègent les membranes des spermatozoïdes contre le choc thermique. ROTA *et al.* (2001) ont comparé la mobilité, la vitalité et la morphologie de l'acrosome des spermatozoïdes après décongélation en utilisant un dilueur classique et un dilueur à base de lait. Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre les deux dilueurs ce qui suggère que le lait pourrait être utilisé dans les dilueurs de congélation.

Le sodium dodécyl sulfate (SDS)

Il s'agit d'un détergent anionique dont la propriété est de solubiliser les protéines. C'est le principe actif présent dans l'Equex STM paste[®], l'Equex pasta[®] et l'Orvus ES paste[®] qui ont été récemment introduits dans la composition des dilueurs de congélation.

PENA et LINDE-FORSBERG (2000a) ont prouvé que l'ajout de 0,5 % d'Equex STM Paste[®] à un dilueur classique permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomiale et de longévité des spermatozoïdes après décongélation. Elles ont également montré que l'Equex STM paste[®] réduit les mouvements d'hyper-activation des spermatozoïdes, semblables à ceux présents lors de la capacitation, après décongélation.

De plus, STROM-HOLST *et al.* (2000) ont prouvé que l'utilisation d'1 % d'Equex STM Paste[®] améliore les capacités de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes après décongélation.

Par contre, ROTA *et al.* (1999a) n'ont pas mis en évidence de différence significative en terme de taux de gestation ou de taille de la portée entre l'ajout ou non d'Equex STM paste[®] au dilueur de congélation.

Les autres études qui ont porté sur l'utilisation d'Equex Pasta[®] ou d'Orvus ES paste[®] ne se sont pas montrées aussi encourageantes (PENA *et al.*, 2003 et NIZANSKI *et al.*, 2001).

Le mécanisme d'action du SDS n'est pas encore totalement élucidé. Une des hypothèses les plus probables est qu'il provoquerait une modification de la structure des lipoprotéines du jaune d'œuf et permettrait la solubilisation de molécules actives. Il semblerait qu'il possède également une action stabilisatrice de membranes.

Le SDS est donc de plus en plus utilisé, à une concentration de 0,5 à 1 %.

Substances tampon

Le métabolisme des spermatozoïdes engendre une acidification du milieu extra-cellulaire ce qui est toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes (ENGLAND, 1993). Des substances tampon doivent donc être utilisées afin de maintenir le pH autour de la neutralité.

Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane ou TRIS est le plus communément employé, en association avec de l'acide citrique monohydraté.

Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible.

Le jaune d'œuf et le lait possèdent également un pouvoir tampon, mais qui reste limité.

Substances nutritives

Le jaune d'œuf et/ou le lait constituent une partie des substances nutritives employées dans les dilueurs.

Cependant, afin de fournir suffisamment d'énergie aux spermatozoïdes, des sucres sont rajoutés. De plus, ces derniers permettent de maintenir la pression osmotique du milieu et possèdent une action cryoprotectrice.

Il a été démontré que les spermatozoïdes peuvent métaboliser le glucose et le fructose, deux composés présents dans le liquide séminal (RIGAU *et al.*, 2001). Les dilueurs contiennent donc soit du glucose soit du fructose.

Un éventuel avantage à utiliser l'un ou l'autre de ces deux sucres dans le dilueur de congélation, comme de réfrigération, n'a pas pu être démontré de façon consensuelle par les différents auteurs qui se sont intéressés à ce sujet (YILDIZ *et al.*, 2000 ; RIGAU *et al.*, 2001 ; IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001c ; PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004a).

Antibiotiques

Le sperme n'étant pas stérile et le dilueur pouvant être un bon milieu de culture, des antibiotiques sont utilisés pour lutter contre la prolifération bactérienne.

En général, la dihydro-streptomycine et la benzyl-pénicilline sont utilisées car elles sont bien tolérées par les spermatozoïdes (LEBLANC, 2004).

Deux exemples de dilueurs fréquemment employés sont présentés dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2. Composition d'un ensemble de dilueurs utilisés pour la congélation et la décongélation de la semence canine (LINDE-FORSBERG, 2001)

	Uppsala Equex 1	Uppsala Equex 2	Milieu de décongélation
TRIS	2,4 g	2,4 g	2,4 g
Acide citrique	1,4 g	1,4 g	1,4 g
Glucose	0,8 g	0,8 g	0,8 g
Streptomycine	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Benzyl-pénicilline	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Glycérol	3 mL	7 mL	
Equex		1 mL	
Jaune d'œuf	20 mL	20 mL	
Eau distillée	Jusqu'à 77 mL	Jusqu'à 72 mL	Jusqu'à 100 mL
pH	6,53	6,48	6,60
Osmolarité	740 mOsm	1370 mOsm	253 mOsm

Uppsala Equex 1 : premier dilueur utilisé pour l'équilibration

Uppsala Equex 2 : second dilueur, ajouté au premier, pour la congélation

Tableau 3. Composition d'un autre ensemble de dilueurs utilisés pour la congélation et la décongélation de la semence canine (LINDE-FORSBERG, 2001)

	Uppsala Equex 1 modifié	Uppsala Equex 2 modifié	Milieu de décongélation
TRIS	3,025 g	3,025 g	3,025 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
Benzyl-pénicilline	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Glycérol	3 mL	7 mL	
Equex		1 mL	
Jaune d'œuf	20 mL	20 mL	
Eau distillée	Jusqu'à 77 mL	Jusqu'à 72 mL	Jusqu'à 100 mL
pH	6,72	6,74	6,76
Osmolarité	865 mOsm	1495 mOsm	324 mOsm

Uppsala Equex 1 modifié : premier dilueur utilisé pour l'équilibration

Uppsala Equex 2 modifié : second dilueur, ajouté au premier, pour la congélation

Les dilueurs de congélation et de décongélation utilisés au CERCA ont quasiment la même composition que les dilueurs cités dans le tableau 3. La seule différence est que les dilueurs du CERCA contiennent du glucose à la place du fructose.

2. Les étapes de la congélation

Après l'examen de la semence, la seconde phase de l'éjaculat est soumise à différents traitements permettant sa congélation dans les meilleures conditions possibles. Même s'il n'existe pas de protocole reconnu par tous, les grandes étapes de la congélation sont désormais connues.

a. Centrifugation

La centrifugation de la phase spermatique de l'éjaculat, de 300 à 1000 G pendant 5 à 6 minutes, est une étape préalable qui permet d'éliminer l'excès de fluide prostatique (LINDE-FORSBERG, 1995). En effet, SIRIVAIIDYAPONG *et al.* (2001) ont montré qu'un excès de fluide prostatique a un effet délétère sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes après décongélation et que la centrifugation de la semence avant dilution est préférable.

Le CERCA a donc intégré cette étape dans son protocole de congélation.

b. Dilution

Après centrifugation, il faut diluer la semence avec un dilueur spécifique, comme vu précédemment, afin de protéger et de nourrir les spermatozoïdes au cours de la congélation et de la décongélation.

Nombre d'étapes de dilution nécessaires

La dilution peut être réalisée en une ou plusieurs étapes.

PENA et LINDE-FORSBERG (2000a) ont comparé une dilution en une étape (avant équilibration) et une dilution en deux étapes (avant équilibration et juste avant congélation).

Dans leur étude, la dilution en deux étapes s'est avérée plus performante en terme de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation qu'une dilution en une seule étape.

De même, PENA *et al.* (2001) ont montré qu'une dilution en deux étapes permet d'obtenir un meilleur taux de survie et une meilleure thermo-résistance des spermatozoïdes après décongélation.

Par contre, SILVA *et al.* (2006) et PENA *et al.* (1998b) n'ont pas mis en évidence de différence significative entre une dilution effectuée en une ou deux étapes sur les paramètres étudiés après décongélation (mobilité, vitalité, intégrité membranaire et acrosomiale, longévité, formes anormales, thermo-résistance).

Aucun consensus n'a donc pu être établi sur le nombre d'étapes de dilution à réaliser, certainement parce que la composition des dilueurs varie énormément d'une étude à l'autre, notamment la concentration en glycérol.

Mais, au CERCA, une dilution en deux étapes est pratiquée, car la technique employée est inspirée des travaux conduits par Catharina LINDE-FORSBERG.

La première ou unique étape de dilution est, en général, effectuée à température ambiante en ajoutant au goutte à goutte le (premier) dilueur, réchauffé à 37°C, à la semence, ce qui évite d'imposer aux spermatozoïdes un choc thermique trop important. Lorsqu'une seconde étape de dilution est pratiquée, elle se réalise à 4°C en ajoutant un second dilueur, refroidi à cette température, à la semence réfrigérée.

Concentration optimale en spermatozoïdes

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation.

PENA et LINDE-FORSBERG (2000b) ont comparé la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale après décongélation de spermatozoïdes dilués à différentes concentrations avant la congélation (400, 200, 100 et 50 millions de spermatozoïdes par mL). Elles ont conclu que, pour les paramètres mesurés, une concentration de 200 millions de spermatozoïdes par mL est optimale.

Ceci a été confirmé par PENA *et al.* (2001) qui ont montré que cette concentration permet d'obtenir une longévité plus importante après décongélation que des concentrations de 400, 100 et 50 millions de spermatozoïdes par mL.

VEYER (2002) a, quant à elle, obtenu de meilleurs résultats avec une concentration de 100 millions de spermatozoïdes par mL par rapport à une concentration de 50 ou 200 millions de spermatozoïdes par mL. Cependant, la composition du dilueur utilisé était différente.

Enfin, une étude plus récente (OKANO *et al.*, 2004) n'a pas permis de mettre en évidence d'influence de la concentration en spermatozoïdes sur la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes après décongélation.

La concentration idéale en spermatozoïdes avant congélation semble donc être comprise entre 100 et 200 millions de spermatozoïdes par mL.

Ainsi, au CERCA, c'est une concentration de 200 millions de spermatozoïdes par mL qui est utilisée.

c. Equilibration

Cette étape correspond à une réfrigération de la semence à 4°C avant la congélation.

Certains auteurs pensaient que l'équilibration était nécessaire pour permettre au glycérol d'agir et de pénétrer dans les cellules. Cependant, PENA *et al.* (1998b), OKANO *et al.* (2004) et SILVA *et al.* (2006) ont montré qu'il n'y a pas de différence entre l'ajout du glycérol juste avant ou 1 à plusieurs heures avant la congélation.

L'hypothèse actuellement émise, quant à l'utilité de l'équilibration, est que cette étape permettrait des remaniements membranaires nécessaires à la résistance à la congélation (OKANO *et al.*, 2004).

Le temps nécessaire de maintien de la semence à 4°C avant la congélation est sujet à discussion.

ADOUE (1991) a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre 1h30 et 2h30 d'équilibration. OLAR *et al.* (1989) n'ont pas non plus mis en évidence de différence sur la mobilité après décongélation entre 1, 2 ou 3 heures d'équilibration. OKANO *et al.* (2004) ont testé des temps allant de 0 à 26 heures, et les meilleurs résultats après décongélation sont obtenus pour un temps d'équilibration de 2 à 3 heures.

Le temps d'équilibration couramment utilisé varie donc entre 1 et 3 heures.

Au CERCA, le temps d'équilibration appliqué est d'environ 2 heures.

d. Conditionnement

Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable.

Deux principaux conditionnements sont disponibles pour congeler la semence canine : les pastilles et les paillettes.

Le conditionnement en pastilles consiste à déposer 0,1 mL de semence diluée dans une alvéole creusée dans un pain de glace carbonique à -79°C. Après 10 minutes de contact, les pastilles sont retirées de la glace et stockées dans des tubes en plastique identifiés et immergés dans de l'azote liquide à -196°C.

Cette technique, quoique simple à réaliser, présente des inconvénients : identification imparfaite et décongélation à l'intérieur de vapeurs d'azote. C'est pourquoi ce système a aujourd'hui été remplacé, dans de nombreuses banques de semence, par l'utilisation de paillettes.

Les paillettes sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton, et dont la contenance peut être de 0,25 mL, 0,5 mL ou 2,5 mL. Certains auteurs se sont intéressés à l'influence de la contenance des paillettes sur la qualité de la semence après décongélation.

VEYER (2002) n'a pas mis en évidence de différence significative entre l'utilisation de paillettes de 0,25 mL ou 0,5 mL sur la mobilité, la morphologie, la vitalité ou l'état de l'acrosome des spermatozoïdes après décongélation.

Par contre, NOTHLING et SHUTTLEWORTH (2005) ont montré que la congélation en paillettes de 0,5 mL améliore le pourcentage de spermatozoïdes mobiles 60 minutes après décongélation et réduit le nombre de spermatozoïdes dont l'acrosome est endommagé par rapport à l'utilisation de paillettes de 0,25 mL.

Pour des raisons pratiques, au CERCA, ce sont des paillettes de 0,5 mL qui sont le plus fréquemment employées.

Après avoir rempli les paillettes avec la semence, il faut former une bulle d'air à l'intérieur des paillettes pour éviter leur éclatement lors de la décongélation. L'autre extrémité de la paillette est ensuite scellée par écrasement ou par une poudre de PVC qui se polymérise au contact de l'eau.

Par rapport aux pastilles, cette technique offre les avantages d'une identification plus aisée, d'une congélation plus uniforme au sein de la paillette, d'un volume de stockage réduit et d'une décongélation plus pratique. Le principal inconvénient des paillettes est le coût du matériel nécessaire.

e. Technique de congélation

Nous n'envisagerons dans ce paragraphe que la congélation de paillettes.

De manière générale, la congélation de paillettes s'effectue en deux étapes : refroidissement dans des vapeurs d'azote à -70°C puis immersion dans l'azote liquide à -196°C .

Influence de la vitesse de refroidissement

Pour limiter les effets du choc thermique et de la cristallisation intra-cellulaire, il est nécessaire de maîtriser la vitesse de refroidissement de la semence, dépendante de la technique utilisée.

Les différentes études réalisées sur le sujet montrent qu'une vitesse de refroidissement relativement lente donne de meilleurs résultats qu'une vitesse plus rapide (HAY *et al.*, 1997b ; PENA *et al.*, 2001 ; NOTHLING et SHUTTLEWORTH, 2005 ; ROTA *et al.*, 2005).

HAY *et al.* (1997b) ont ainsi montré que la vitesse de refroidissement optimale est comprise entre -12 et $-28^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Cependant, il est difficile de déterminer avec précision la vitesse de refroidissement exercée lors de telle ou telle technique. D'après les études citées ci-dessus, l'idéal serait de placer les paillettes dans des vapeurs d'azote en les mettant entre 4 et 10 cm au-dessus de l'azote liquide pendant une dizaine de minutes, avant de les immerger dans l'azote liquide.

Influence de la position des paillettes

Lors de la congélation, les paillettes peuvent être placées verticalement ou horizontalement dans les vapeurs d'azote liquide.

TALON (1999) n'a pas mis en évidence de différence entre un placement vertical ou horizontal des paillettes sur l'intégrité de la membrane plasmique, l'état de l'acrosome et la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.

D'autres auteurs suggèrent que placer les paillettes horizontalement serait préférable mais leurs études ne permettent pas de comparer de façon fiable les deux types de position (PENA et LINDE-FORSBERG, 2000a ; PENA *et al.*, 2001).

Au CERCA, la technique de congélation mise en œuvre est la suivante : placement des paillettes verticalement à 10 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 10 minutes, puis immersion. De plus, le CERCA utilise un congélateur (voir photographie 7), au fond duquel est placé l'azote liquide, muni d'un moteur qui permet de répartir de façon uniforme les vapeurs d'azote autour des paillettes (NICOOL® Air liquide).

Photographie 7. Congélateur utilisé au CERCA (Cliché CERCA)



f. Conservation

La semence congelée peut être conservée pendant un temps indéfini dans de l'azote liquide à -196°C . Les paillettes ou les pastilles sont ainsi conservées dans des tanks contenant de l'azote liquide (voir photographie 8).

Photographie 8. Cuves d'azote liquide du CERCA (Cliché CERCA)



g. Transport

Lorsque la semence congelée doit être transportée, il est nécessaire d'utiliser un container d'azote liquide. De nos jours, la semence est envoyée dans des « conteneurs à sec » ou « dry-shippers ». Ce sont des containers dont les parois contiennent un matériau poreux qui absorbe l'azote liquide. Il n'y donc aucun risque s'ils se renversent et ne nécessitent pas d'être envoyés en tant qu'objet dangereux. Cependant, ils doivent porter la mention fragile car ils se cassent facilement lors de manipulations violentes (LINDE-FORSBERG, 2001).

3. La décongélation

a. Température et temps de décongélation

La décongélation s'effectue en plongeant directement les paillettes congelées dans un bain-marie à une certaine température pendant un temps donné.

Au cours de cette étape, il faut éviter tout contact de la semence avec l'eau car celle-ci est toxique pour les spermatozoïdes.

Même si une décongélation rapide est préconisée, le couple temps-température utilisé pour la décongélation dépend de la technique de congélation pratiquée.

Cependant, pour une même technique de congélation, de nombreuses études montrent qu'une décongélation à 70°C pendant 7 à 8 secondes donne de meilleurs résultats en terme de qualité de la semence après décongélation qu'une décongélation à 37°C pendant 15 secondes à 2 minutes (PENA et LINDE-FORSBERG, 2000a ; PENA *et al.*, 2001 ; NOTHLING et SHUTTLEWORTH, 2005).

Il semblerait donc préférable de décongeler la semence à 70°C pendant 7 à 8 secondes. Mais, il est difficile de contrôler avec précision ce faible temps de décongélation et il est plus risqué de laisser les paillettes trop longtemps à 70°C qu'à 37°C.

Au CERCA, la décongélation des paillettes s'effectue donc en les plongeant dans un bain-marie à 37°C pendant une minute.

b. Dilution après décongélation

Après décongélation, la semence est placée dans un milieu de décongélation qui permet d'apporter des substances nutritives, de modérer le pH et de diluer les substances toxiques. L'effet bénéfique de l'utilisation d'un milieu de décongélation sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes a été montré par LEBLANC (2004).

Un exemple de milieu de décongélation est présenté dans le tableau 2.

En ce qui concerne le taux de dilution à utiliser, deux études ont montré qu'une dilution de la semence décongelée par un volume de dilueur équivalent à 2 fois ou à 4 fois le volume de la semence est plus performante que l'absence de dilution ou qu'une dilution par un volume de dilueur équivalent à celui de la semence (PENA et LINDE-FORSBERG, 2000b ; PENA *et al.*, 2001).

Au CERCA, la semence décongelée est diluée au 1/2.

4. Effets de la congélation et de la décongélation sur les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont soumis à de nombreuses agressions au cours des protocoles de congélation et de décongélation :

- choc osmotique lors des étapes de dilution,
- choc thermique lors de l'étape d'équilibration,
- choc thermique, cristallisation intra-cellulaire, déshydratation et variations de pression osmotique lors de la congélation proprement dite, et
- choc thermique, réhydratation et choc osmotique lors de la décongélation.

De ce fait, la congélation et la décongélation sont susceptibles d'altérer la structure et la fonction des spermatozoïdes.

De nombreux auteurs ont étudié les effets de la congélation et de la décongélation sur les spermatozoïdes.

Ils ont montré que la congélation et la décongélation altèrent de façon significative la mobilité, la vitalité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes (STROM *et al.*, 1997 ; MOGGIA et PERROS, 1999 ; TALON, 1999 ; BURGESS *et al.*, 2001 ; VEYER, 2002).

ROTA *et al.* (1999b) ont également montré que la congélation et la décongélation engendrent une augmentation de la concentration intra-cellulaire en calcium ce qui provoque des changements structurels et fonctionnels proches de la capacitation : réaction acrosomiale et hypermotilité.

Enfin, IVANOVA *et al.* (1999) ont prouvé que la capacité de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes après décongélation est significativement diminuée.

Une fois les effets néfastes de la congélation et de la décongélation démontrés, certains de ces auteurs ont cherché à savoir quelles étapes sont les plus délétères pour les spermatozoïdes.

Les études montrent que les étapes de dilution et d'équilibration n'altèrent que de façon très limitée l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes, et que la congélation proprement dite et la décongélation sont les étapes les plus nuisibles (STROM *et al.*, 1997 ; MOGGIA et PERROS, 1999 ; TALON, 1999 ; BURGESS *et al.*, 2001).

Compte tenu de ces effets délétères de la congélation et de la décongélation sur la qualité de la semence après décongélation, il est préférable de congeler de la semence de bonne qualité afin d'espérer obtenir une semence de qualité convenable après décongélation.

Ainsi, même si NOTHLING *et al.* (1997) ont prouvé que la qualité de la semence fraîche n'est que peu utile pour prédire la mobilité de la semence après décongélation et, même si aucun consensus n'a pu être établi, la plupart des auteurs appliquent les conditions suivantes pour savoir si une semence peut être congelée ou non :

- pourcentage de spermatozoïdes mobiles supérieur à 70 %, et
- pourcentage de formes anormales inférieur à 30 à 40 %.

Ce sont ces critères qui sont appliqués par le CERCA pour déterminer si une semence est « congelable » ou non.

Il faut tout de même préciser que les effets néfastes de la congélation et de la décongélation sont plus ou moins prononcés en fonction des procédés utilisés et qu'il existe de fortes variations individuelles.

C. APPLICATION DANS L'ESPECE CANINE

La congélation de la semence canine est principalement utilisée dans le but, à plus ou moins long terme, de réaliser des inséminations artificielles (IA) avec cette semence.

Les IA de semence congelée aboutissent souvent à des taux de gestation plus faibles et à des tailles de portées réduites par rapport à des IA de semence fraîche (LINDE-FORSBERG et FORSBERG, 1989 ; OLAR *et al.*, 1989 ; LINDE-FORSBERG et FORSBERG, 1993).

Cependant, divers facteurs semblent influencer sur ces résultats.

Tout d'abord, THOMASSEN *et al.* (2001) ont montré qu'utiliser une semence de bonne qualité après décongélation (mobilité > 50 % et pourcentage de formes anormales < 20 %) donne un taux de gestation supérieur par rapport à l'utilisation d'une semence de qualité moyenne ou médiocre, sans que la taille de la portée ne soit influencée par ce paramètre.

De plus, les spermatozoïdes ayant une vitalité et une capacité de fécondation réduites après la congélation et la décongélation, il faudrait utiliser une dose inséminante plus importante avec de la semence congelée qu'avec de la semence fraîche, ce qui a été confirmé par NOTHLING *et al.* (1997).

Compte tenu de la longévité réduite des spermatozoïdes après décongélation, il est nécessaire d'effectuer un suivi rigoureux de la chienne à inséminer pour déterminer avec précision le moment le plus propice pour l'insémination. L'idéal est de réaliser l'IA lorsque l'ovocyte est mature, c'est-à-dire deux à trois jours après l'ovulation.

Il a ainsi été prouvé que la date de l'IA est un des paramètres qui influe le plus sur le taux de gestation (NOTHLING *et al.*, 1997) et qu'effectuer l'insémination au moment optimal du cycle de la chienne permet d'obtenir un meilleur taux de gestation et une portée de taille plus importante par rapport à une insémination effectuée plus tôt ou plus tard dans le cycle (THOMASSEN *et al.*, 2001).

Il a également été démontré qu'augmenter le nombre d'IA permet d'obtenir un meilleur taux de gestation et une taille de la portée plus importante (LINDE-FORSBERG *et al.*, 1999 ; THOMASSEN *et al.*, 2001).

Enfin, de nombreuses études montrent que le site d'insémination a une réelle importance sur le taux de gestation et la taille de la portée, les IA intra-utérines étant nettement plus performantes que les IA intra-vaginales (FONTBONNE et BADINAND, 1993b ; LINDE-FORSBERG *et al.*, 1999 ; ROTA *et al.*, 1999b ; THOMASSEN *et al.*, 2001).

Cette constatation s'explique par le fait, qu'après décongélation, les spermatozoïdes présentent une vitalité, une mobilité, une intégrité membranaire et acrosomiale réduites. Ils ont alors plus de difficultés à passer à travers le col de l'utérus et à atteindre l'ovocyte.

Les taux de gestation et les tailles de portées obtenus suite à des IA de semence congelée sont donc dépendants :

- de la qualité de la semence après décongélation,
- du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés,
- de la date de l'insémination,
- du nombre d'inséminations, et
- du site d'insémination.

D'après NOTHLING *et al.* (1997), la dose inséminante et la date de l'IA seraient les paramètres qui influent le plus sur le taux de gestation.

D'après les différentes références bibliographiques étudiées, le taux de gestation varie entre 30 et 100 % suite à des inséminations artificielles de semence congelée et la taille des portées obtenues varie entre 4 +/- 2,7 et 5,6 +/- 0,3 chiots (FONTBONNE et BADINAND, 1993b ; NOTHLING *et al.*, 1997 ; LINDE-FORSBERG *et al.*, 1999 ; ROTA *et al.*, 1999b ; THOMASSEN *et al.*, 2001 ; FELDMAN et NELSON, 2004b).

Lorsque les conditions optimales sont réunies, c'est-à-dire lorsque deux inséminations sont effectuées au moment le plus propice du cycle de la chienne avec de la semence de bonne qualité, le taux de gestation atteint 82 % et la taille de la portée 5,6 +/- 0,3 chiots (THOMASSEN *et al.*, 2001).

Il est donc possible d'obtenir de très bons résultats, en terme de fertilité et de fécondité, proches de ceux obtenus en inséminant de la semence fraîche voire même lors de saillies naturelles, en utilisant de la semence congelée.

Le principal problème reste qu'il est difficile de prévoir la qualité de la semence après décongélation à partir de la qualité de la semence fraîche (NOTHLING *et al.*, 1997) et que, comme pour la semence fraîche, il est impossible de prédire la capacité de fécondation des spermatozoïdes à partir de leurs caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles.

Même si la congélation de la semence canine peut donner d'excellents résultats et même si elle reste le seul moyen de conserver la semence pendant une durée indéfinie, il existe une autre technique, plus simple, de conservation de la semence canine : la réfrigération.

III. REFRIGERATION DE LA SEMENCE CANINE

La réfrigération de la semence consiste à abaisser la température de la semence, diluée ou non, à 4 ou 5°C en vue de la conserver, à cette température, pendant 24 à 48 heures.

A. INDICATIONS

La réfrigération de la semence, déjà très répandue chez les animaux de rente et les équidés, est de plus en plus utilisée dans le domaine de la reproduction canine assistée.

Elle représente un moyen de conservation et de transport de la semence à court et moyen terme avec les mêmes avantages que la congélation.

La réfrigération de la semence permet ainsi de réaliser des inséminations artificielles différées et de transporter la semence sur de grandes distances en s'affranchissant de tous les problèmes inhérents au transport d'animaux (stress, réglementation...).

De plus, la réfrigération de la semence présente des avantages par rapport à la congélation : les protocoles utilisés, tant pour la simple conservation que pour le transport, sont plus simples à réaliser, moins onéreux et moins dangereux.

Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet qu'une conservation de la semence à court ou moyen terme, contrairement à la congélation qui permet de conserver indéfiniment la semence.

B. PRINCIPES GENERAUX

1. Centrifugation

Même si SIRIVAIDYAPONG *et al.* (2001) n'ont pas mis en évidence d'effet néfaste du liquide prostatique sur la mobilité, la vitalité ou l'intégrité acrosomiale de spermatozoïdes réfrigérés à 4°C pendant 6 heures, la plupart des auteurs recommandent de centrifuger la semence afin de minimiser les risques d'effets délétères du liquide prostatique sur les spermatozoïdes réfrigérés pendant une plus longue période (LINDE-FORSBERG, 1995 ; ROTA *et al.*, 1995 ; LINDE-FORSBERG, 2001 ; PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004a ; HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006).

2. Dilution

a. Nécessité de l'utilisation d'un dilueur

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

En effet, ROTA *et al.* (1995) et TSUTSUI *et al.* (2003) ont montré que la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un dilueur qu'en l'absence de dilueur.

De plus, LINDE-FORSBERG (1995) a prouvé que des IA de semence réfrigérée avec un dilueur donnent des taux de gestation significativement plus élevés que des IA de semence réfrigérée sans dilueur.

Comme pour la congélation, il existe de nombreux dilueurs de réfrigération, commercialisés prêts à l'emploi ou préparés par chaque centre de reproduction, et dont la composition est variable. Mais, d'après l'étude d'IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001c), il semble que les dilueurs préparés extemporanément soient plus efficaces pour réfrigérer la semence canine que les dilueurs commerciaux.

b. Caractéristiques et rôles du dilueur

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

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

c. Composition des dilueurs

Substances protectrices et stabilisatrices de membranes

L'utilisation de glycérol, connu pour ses propriétés cryoprotectrices, a été suggérée par certains auteurs pour protéger et stabiliser les membranes des spermatozoïdes au cours de leur réfrigération.

Cependant, différentes études ont montré que l'utilisation de glycérol ne présente aucun intérêt lors de la réfrigération de la semence (BUE, 1992 ; HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006) et qu'il peut même avoir un effet néfaste sur les spermatozoïdes (HAY *et al.*, 1997a ; HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006).

Par contre, il est reconnu que le jaune d'œuf et le lait contiennent des protéines qui assurent une protection et une stabilisation des membranes des spermatozoïdes (FELDMAN et NELSON, 2004b).

D'ailleurs, BOUCHARD *et al.* (1990) et BUE (1992) ont montré que l'utilisation d'un dilueur à base de lait écrémé permet d'obtenir de bons résultats en terme de mobilité et de vitalité des spermatozoïdes après leur réfrigération.

IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001c) ont également montré que le jaune d'œuf permet de maintenir la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes au cours de leur réfrigération.

Substances nutritives

Le fructose, le glucose et le lactose sont parmi les substances nutritives les plus employées. PONGLOWHAPAN *et al.* (2004a) ont montré que l'ajout de sucres (glucose ou fructose) au dilueur permet de maintenir une mobilité supérieure à 70 % jusqu'à 8 jours de conservation à 5°C. Par contre, ils n'ont pas mis en évidence d'effet positif du glucose ou du fructose sur le maintien de l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes.

Concernant le type de sucre à ajouter au dilueur de réfrigération, aucun consensus n'a été établi sur l'intérêt d'utiliser le glucose plutôt que le fructose, et inversement.

Substances tampon

Comme pour la congélation, l'acide citrique monohydraté et le TRIS sont les substances les plus utilisées pour leur pouvoir tampon.

Substances anti-microbiennes

Des antibiotiques sont généralement ajoutés au dilueur afin d'éviter la multiplication bactérienne et la dispersion d'infections. Ceci est très important lors de l'utilisation de jaune d'œuf qui peut être contaminé et qui favorise la croissance bactérienne.

Les substances anti-bactériennes les plus communément employées sont la benzyl-pénicilline et la dihydrostreptomycine.

Un exemple de dilueur fréquemment employé pour la réfrigération de la semence canine est présenté dans le tableau 4, et la composition du dilueur de réfrigération utilisé au CERCA est décrite dans le tableau 5.

Tableau 4. Composition d'un dilueur de réfrigération (d'après LINDE-FORSBERG, 2001)

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

Tableau 5. Composition du dilueur de réfrigération utilisé au CERCA

TRIS	3,025 g
Acide citrique	1,7 g
Fructose	1,25 g
Pénicilline	100 000 UI
Dihydrostreptomycine	0,1 g
Jaune d'œuf	20 mL
Eau distillée	Jusqu'à 80 mL

d. Réalisation de la dilution

Lors de la dilution, il faut veiller à ce que le dilueur et la semence soient à la même température pour ne pas imposer un choc thermique important aux spermatozoïdes.

Le taux de dilution varie généralement entre 1/3 et 1/5. Mais, la dilution ne doit pas être trop importante car cela risque d'affecter la mobilité des spermatozoïdes.

3. Réfrigération

La longévité des spermatozoïdes réfrigérés dépend du dilueur employé, mais également de la vitesse de refroidissement et de la température de conservation.

La longévité des spermatozoïdes est significativement plus importante à 4°C qu'à 22°C ou à 37°C (BOUCHARD *et al.*, 1990 ; LINDE-FORSBERG, 1995). En effet, conserver la semence à 4°C permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et donc de prolonger leur longévité. De plus, la croissance bactérienne est plus importante à 22°C ou à 37°C qu'à 4°C. Pour ces différentes raisons, la semence est, en général, réfrigérée et conservée à 4°C.

Lors de la réfrigération, il ne faut pas que la vitesse de refroidissement de la semence soit trop rapide ou trop lente. Pour cela, différents protocoles existent (BUE, 1992) :

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

Selon le protocole employé, la vitesse de refroidissement est plus ou moins rapide et la semence atteint 4°C en 30 minutes à quelques heures.

Au CERCA, la semence est réfrigérée à 4°C en la plaçant dans un réfrigérateur pendant 1 à 2 heures.

Lors de la conservation de la semence réfrigérée, il faut veiller à ce que la température ne s'abaisse pas en-dessous de 4 °C.

4. Transport

Très peu de laboratoires proposent des systèmes de transport de la semence canine réfrigérée, contrairement à ce qui est disponible pour la semence équine. Les systèmes utilisés font donc appel à l'imagination de chacun et Catharina LINDE-FORSBERG a proposé deux protocoles qui sont actuellement les plus employés.

Une fois réfrigérée à 4°C, la semence, contenue dans un tube incassable, est mise dans une bouteille thermos remplie de coton hydrophile humide, ce qui a pour but de limiter les chocs thermiques et mécaniques auxquels sera soumise la semence au cours de son transport. Quelques heures avant son utilisation, cette bouteille thermos doit être placée au réfrigérateur afin qu'elle atteigne la même température que la semence (LINDE-FORSBERG, 1995).

L'autre protocole correspond à l'utilisation d'une boîte en polystyrène contenant un pain de glace. Mais, dans ce cas, il faut protéger le tube contenant la semence, avec du coton par exemple, pour qu'il ne soit pas directement en contact avec la glace au risque de faire subir aux spermatozoïdes un choc thermique trop important (LINDE-FORSBERG, 2001).

Il existe également des kits commercialisés par certains laboratoires qui se rapprochent de ce système de transport et qui contiennent tout le nécessaire pour diluer et conditionner la semence.

PINTO *et al.* (1999) ont comparé trois systèmes de transport : un système utilisé pour la semence équine, un autre utilisé spécifiquement pour la semence canine et une bouteille thermos. Les deux premiers systèmes étudiés correspondent à des kits de réfrigération de la semence, c'est-à-dire au second protocole évoqué ci-dessus.

En terme de mobilité après 48 heures de stockage, les deux premiers systèmes se sont révélés significativement plus performants que la bouteille thermos ($P < 0,05$), avec une mobilité moyenne de 51,6 +/- 5,5, 49,6 +/- 7,1 et 31,4 +/- 6 %, respectivement.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des bouteilles thermos ne maintiennent la température constante que pendant une douzaine d'heures (d'après les notices des fabricants), alors que des systèmes spécifiques de transport de semence peuvent maintenir la température constante jusqu'à 48 heures (d'après les laboratoires qui les commercialisent).

Malgré ces résultats, au CERCA, le système de transport mis en place correspond à celui de LINDE-FORSBERG (1995) car il s'avère plus pratique et moins coûteux que les autres.

5. Utilisation

Avant utilisation, la semence réfrigérée doit être réchauffée lentement à température ambiante à l'aide d'un bain-marie à 37°C et, à minima, la mobilité doit être évaluée au microscope (LINDE-FORSBERG, 1995).

6. Effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes

Lors de la réfrigération, les spermatozoïdes subissent des agressions qui sont susceptibles d'altérer leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles :

- chocs thermiques lors de leur réfrigération, de leur conservation (si la température n'est pas maintenue constante, comme lors du transport) et de leur réchauffement pour utilisation (PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004a),
- acidification du milieu extra-cellulaire (BUE, 1992),
- choc osmotique lors de la dilution (HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006), et
- chocs mécaniques lors de leur transport.

Différentes études ont cherché à déterminer les effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes.

PONGLOWHAPAN *et al.* (2004a) ont prouvé que la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes décroissent progressivement au cours de leur conservation à 5°C. De même, HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006) ont montré que la mobilité des spermatozoïdes après réfrigération est réduite. Dans leur étude, la mobilité initiale de 81,7 % passe à 60 % après 24 heures de réfrigération et à 30 % et 40 % après 48 heures en fonction du dilueur utilisé.

KUMI-DIAKA et BADTRAM (1994) ont également mis en évidence une altération, quoique non significative, de la mobilité et de l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après 24 heures de réfrigération à 5°C. Par contre, ils n'ont pas trouvé d'effet néfaste sur la vitalité ni sur l'intégrité membranaire des spermatozoïdes.

VERSTEGEN *et al.* (2005) ont montré que la mobilité des spermatozoïdes n'est pas significativement affectée par une conservation à 4°C durant les 10 premiers jours et qu'elle commence à diminuer à partir du 11^{ème} jour pour être nulle au bout de 16 ou 17 jours.

Enfin, ROTA *et al.* (1999a) ont prouvé que le pourcentage de spermatozoïdes capables de la semence réfrigérée est plus élevé que celui de la semence fraîche ; et, STROM-HOLST *et al.* (2000) ont montré que la capacité de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes est plus faible après une réfrigération de 4 jours qu'après une réfrigération d'1 jour.

En ce qui concerne la longévité des spermatozoïdes réfrigérés, elle est variable d'une étude à l'autre : 10 jours (ENGLAND et PONZIO, 1996), 16 jours (VERSTEGEN *et al.*, 2005), 17 jours (IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001c), 23 jours (PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004a).

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

VERSTEGEN *et al.* (2005) ont même réussi à conserver des spermatozoïdes à 4°C pendant 27 jours en changeant régulièrement le dilueur. Pour ce faire, ils ont réalisé un suivi quotidien de la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés et lorsque la mobilité chutait significativement, ils centrifugeaient l'échantillon, retiraient le surnageant (c'est-à-dire le dilueur) et rajoutaient à la semence un dilueur frais. Ils ont effectué ces changements de dilueurs aux 11^{ème}, 21^{ème} et 27^{ème} jours de conservation. Suite aux deux premiers changements, ils ont observé une réactivation des spermatozoïdes avec une augmentation de la mobilité mais, après le 27^{ème} jour, aucun effet bénéfique n'a pu être mis en évidence.

Il semble donc que la réfrigération altère la qualité de la semence, et ce d'autant plus que le temps de réfrigération augmente.

Cependant, les effets de la réfrigération sont moins néfastes pour les spermatozoïdes que ceux de la congélation. En effet, ENGLAND et PONZIO (1996) ont montré que la qualité de la semence (mobilité, vitalité, intégrité membranaire et acrosomiale, morphologie des spermatozoïdes) réfrigérée sur de courtes périodes (inférieures à 2 jours), est supérieure à celle de la semence congelée. Ils ont également prouvé que plus le temps de réfrigération augmente, plus la qualité de la semence se dégrade. Ainsi, après 4,9 jours de réfrigération (sans changement de dilueur), la qualité de la semence réfrigérée devient équivalente à celle de la semence congelée après décongélation.

C. APPLICATION DANS L'ESPECE CANINE

Comme la semence canine congelée, la semence réfrigérée est utilisée pour différer des inséminations artificielles. Quelques jours après la détection du pro-oestrus chez la femelle, la semence peut être récoltée, diluée, réfrigérée et transportée jusqu'au lieu où se trouve la femelle. La semence est alors conservée jusqu'à son utilisation, au moment optimal du cycle, c'est-à-dire 2 à 3 jours après l'ovulation.

Les IA de semence réfrigérée donnent des résultats variables avec un taux de gestation allant de 50 à 100 % et une taille moyenne de la portée comprise entre 3,2 et 7,2 +/- 0,6 chiots (GOODMAN et CAIN, 1993 ; LINDE-FORSBERG, 1995 ; PINTO *et al.*, 1999 ; LINDE-FORSBERG, 2000 ; LINDE-FORSBERG, 2001 ; TSUTSUI *et al.*, 2003 ; FELDMAN et NELSON, 2004b ; VERSTEGEN *et al.*, 2005).

Différents facteurs pourraient intervenir pour expliquer ces variations :

- la qualité de la semence fraîche,
- le dilueur et la méthode de réfrigération employés,
- le temps de réfrigération,
- le transport ou non de la semence,
- le nombre d'IA réalisées,
- le site d'insémination, et
- la date d'insémination.

VERSTEGEN *et al.* (2005) ont étudié l'influence du nombre d'IA effectuées et ils ont mis en évidence que réaliser deux IA permet d'obtenir un taux de gestation et une taille moyenne de la portée plus importants que lors de la réalisation d'une seule insémination.

De plus, grâce à une étude rétrospective sur 374 IA de semence réfrigérée, LINDE-FORSBERG (2000) a montré que des IA intra-utérines donnent de meilleurs résultats que des IA intra-vaginales.

Concernant le temps de réfrigération, LINDE-FORSBERG (1995) affirme que les spermatozoïdes réfrigérés conservent leur capacité de fécondation pendant 12 à 24 heures, voire plus, ce qui est, en général, suffisant pour des transports nationaux et même internationaux. PINTO *et al.* (1999) ont ainsi montré qu'il n'y a pas de différence significative sur le taux de gestation ou la taille moyenne de la portée entre des IA intra-vaginales de semence fraîche et réfrigérée pendant 24 ou 48 heures.

Cependant, compte tenu que les effets néfastes de la réfrigération sur les spermatozoïdes s'intensifient avec le temps de conservation, il semble logique d'émettre l'hypothèse que plus le temps de réfrigération augmente, plus les résultats des IA se dégradent. VERSTEGEN *et al.* (2005), qui ont utilisé de la semence réfrigérée au bout de 9 +/- 1,8 jours, ont ainsi obtenu de moins bons résultats que TSUTSUI *et al.* (2003) qui ont utilisé de la semence réfrigérée pendant 4 jours.

Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, il semble donc utile d'effectuer deux IA intra-utérines, au moment le plus optimal du cycle de la chienne, avec de la semence de bonne qualité, réfrigérée pendant la durée la plus courte possible.

Cependant, l'insémination intra-utérine et la détermination précise de la date d'insémination ne sont pas aussi indispensables pour des IA de semence réfrigérée que pour des IA de semence congelée (FELDMAN et NELSON, 2004b). En effet, si le temps de réfrigération est relativement court, la semence réfrigérée possède une qualité et une longévité supérieures à celles de la semence congelée. De plus, la dose inséminante lors d'IA de semence réfrigérée est plus importante que lors d'IA de semence congelée.

Ainsi, même dans des conditions non optimales, les IA de semence réfrigérée sont, en général, plus performantes que les IA de semence congelée (LINDE-FORSBERG, 1995 ; FELDMAN et NELSON, 2004b).

IV. ESSAIS DE CONGELATION POST-REFRIGERATION

Il n'existe que deux études portant sur la congélation de la semence canine, récoltée manuellement, préalablement réfrigérée.

VERSTEGEN *et al.* (2002) sont les premiers à avoir tenté d'analyser les effets d'une telle technique, en congelant de la semence réfrigérée à 4°C pendant plus de 3 jours. Ils ont alors observé une baisse progressive et significative du pourcentage de spermatozoïdes dont la mobilité était progressive et/ou rapide alors que la mobilité globale n'était pas significativement réduite.

Suite à cette étude, HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006) ont étudié les effets d'une réfrigération préalable de 24 ou 48 heures sur la congélation de semence canine. Ces auteurs ont analysé l'influence de cette technique sur la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation en utilisant deux dilueurs différents : l'Uppsala Equex-2 (UE-2), utilisé couramment pour la congélation, et un dilueur à base de TRIS et de jaune d'œuf (EYT), utilisé généralement pour la réfrigération. La composition et les caractéristiques de ces dilueurs sont présentées dans le tableau 6.

Comme nous nous sommes inspirés de cette étude pour réaliser nos expérimentations, nous allons la détailler.

Tableau 6. Composition des dilueurs utilisés par HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006)

	EYT/1	EYT/2	UE-2/1	UE-2/2	Dilueur de décongélation
TRIS	3,025 g	3,025 g	3,025 g	3,025 g	3,025 g
Acide citrique	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g
Fructose	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g
Jaune d'œuf	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	
Streptomycine	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Benzyl-pénicilline	0,06 g	0,06 g	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Glycérol		10 mL	3 mL	7 mL	
Equex STM paste		1 mL		1 mL	
Eau distillée	Jusqu'à 80 mL	Jusqu'à 69 mL	Jusqu'à 77 mL	Jusqu'à 72 mL	Jusqu'à 100 mL
pH	6,78	6,70	6,72	6,74	6,76
Osmolarité	325 mOsm	1934 mOsm	865 mOsm	1495 mOsm	324 mOsm

EYT/1 : dilueur à base de TRIS et de jaune d'œuf utilisé pour la réfrigération

EYT/2 : dilueur à base de TRIS et de jaune d'œuf utilisé pour la congélation

UE-2/1 : dilueur Uppsala Equex-2 utilisé pour la réfrigération

UE-2/2 : dilueur Uppsala Equex-2 utilisé pour la congélation

L'expérience d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG a été réalisée sur un mélange de 2 à 3 semences, prélevées sur différents chiens. Après centrifugation et élimination du surnageant, le mélange a été divisé en 5 parts égales.

Un cinquième du mélange a alors été congelé de façon conventionnelle :

- ajout d'un certain volume de dilueur UE-2/1 à température ambiante afin d'obtenir une concentration de 400 millions de spermatozoïdes par mL,
- équilibration à 4°C pendant 75 minutes,
- ajout d'un même volume de dilueur UE-2/2, réfrigéré à 4°C, pour obtenir une concentration finale de 200 millions de spermatozoïdes par mL,
- congélation en paillettes de 0,5 mL.

HERMANSSON et LINDE-FORSBERG ont alors divisé les 4/5 restants du mélange de semences en deux parts égales. Une partie a été diluée avec l'EYT/1 et l'autre avec l'UE-2/1, selon le même protocole que pour une congélation conventionnelle. Les deux échantillons ont alors été réfrigérés à 4°C pendant 24 heures. Après 24 heures de réfrigération, chaque échantillon a été divisé en deux parties : l'une a été congelée après ajout du dilueur EYT/2 ou UE-2/2, respectivement, et l'autre a été conservée encore 24 heures à 4°C avant d'être congelée.

HERMANSSON et LINDE-FORSBERG ont décongelé, après conservation pendant deux à cinq mois, deux paillettes pour chacun des 5 traitements en les plongeant dans un bain-marie à 70°C pendant 8 secondes et en plaçant leur contenu dans 1 mL de dilueur de décongélation. Les auteurs ont alors évalué la mobilité (en utilisant un système CASA), l'intégrité membranaire et acrosomiale (en utilisant des colorations fluorescentes) des spermatozoïdes immédiatement, 1, 2, 4 et 6 heures après décongélation.

Cette expérience a été répétée trois fois.

Les résultats principaux de cette étude sont regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7. Résultats chiffrés, exprimés en moyenne +/- écart-type, obtenus immédiatement après décongélation, de l'expérience d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006)

	Congélation conventionnelle	Congélation après 24 heures de réfrigération		Congélation après 48 heures de réfrigération	
		EYT	UE-2	EYT	UE-2
Mobilité (en %)	71,3 +/- 14,6	55,7 +/- 14,6	62,8 +/- 7,7	54,6 +/- 20,8	52,1 +/- 18,6
Intégrité membranaire (en % de spermatozoïdes intacts)	57,4 +/- 18,6	32,7 +/- 18,2	48,6 +/- 14,9	46,8 +/- 16,7	51,8 +/- 13
Intégrité acrosomiale (en % de spermatozoïdes intacts)	72,7 +/- 18,2	79,6 +/- 5,3	69,1 +/- 5,3	61,7 +/- 19,2	80,3 +/- 0,58

Au cours de cette étude, HERMANSSON et LINDE-FORSEBRG ont démontré que la mobilité des spermatozoïdes après décongélation n'est pas significativement affectée par le temps de réfrigération préalable à la congélation ni par le type de dilueur utilisé. Cependant, les meilleurs résultats de mobilité après décongélation ont été obtenus lors d'une réfrigération préalable de 24 heures dans l'Uppsala Equex-2 (voir tableau 7).

Concernant l'intégrité membranaire des spermatozoïdes après décongélation, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet significatif du temps de réfrigération préalable à la congélation ni du type de dilueur utilisé, même s'il existe une tendance à l'altération de la membrane plasmique, avec l'allongement du temps de réfrigération dans l'Uppsala Equex-2, lors de l'évaluation de l'intégrité membranaire à partir de 2 heures post-décongélation.

En terme d'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation, HERMANSSON et LINDE-FORSBERG ont montré que le temps de réfrigération préalable à la congélation n'a pas d'effet délétère significatif et que le dilueur Uppsala Equex-2 donne significativement de meilleurs résultats que le dilueur EYT pour le maintien de l'intégrité acrosomiale après décongélation.

Il semble donc que l'Uppsala Equex-2 soit plus performant que l'EYT pour la congélation de semence canine préalablement réfrigérée. Ceci peut paraître étonnant puisque l'UE-2 contient 3 % de glycérol alors que l'EYT n'en contient pas. En effet, il aurait été envisageable que, pour conserver de la semence pendant 24 à 48 heures à 4°C, un milieu contenant du glycérol soit plus néfaste pour les spermatozoïdes qu'un milieu sans glycérol. HERMANSSON et LINDE-FORSBERG explique la « supériorité » de l'UE-2 par le fait que les spermatozoïdes sont soumis à une variation moindre de l'osmolarité et de la concentration en glycérol, entre les deux étapes de dilution, avec l'UE-2 qu'avec l'EYT (voir tableau 6).

En conclusion, même s'il existe un effet néfaste, faible et non significatif, de la réfrigération préalable à la congélation sur la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation (voir tableau 7), HERMANSSON et LINDE-FORSBERG ont montré qu'il est possible de réfrigérer la semence canine pendant 1 ou 2 jours avant de la congeler sans qu'il y ait une détérioration significative de la mobilité, de l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Au vu des résultats très encourageants de cette étude, nous avons réalisé une étude similaire en utilisant des dilueurs différents et en effectuant une expérience avec transport de la semence réfrigérée, afin de confirmer (ou d'infirmer) les conclusions d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG et de déterminer si la technique de congélation de semence canine préalablement réfrigérée serait applicable en pratique.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS

Nous avons réalisé cette étude expérimentale suite à la publication d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG en 2006, détaillée précédemment.

Comme ces auteurs ont montré que la congélation de semence canine préalablement réfrigérée donne des résultats satisfaisants, nous avons souhaité tenter d'adapter leur technique aux méthodes appliquées par le CERCA.

A. OBJECTIF GENERAL

Le but de notre étude est de déterminer si une réfrigération de la semence canine pendant 24 heures avant sa congélation est applicable avec les techniques utilisées au Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores (CERCA) de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et si la qualité de la semence après décongélation est significativement altérée ou non par ce protocole par rapport à une technique de congélation usuelle, celle réalisée en routine au CERCA.

Si les résultats s'avèrent probants, c'est-à-dire si la réfrigération préalable à la congélation n'altère pas de façon significative ou trop importante la qualité de la semence après décongélation, cela pourrait constituer une avancée dans le monde de la reproduction canine assistée.

En effet, en France, il n'existe que quatre banques de semence canine, dont trois sont situées dans les Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises d'Alfort, de Nantes et de Lyon, la quatrième étant une structure privée se trouvant près de Toulouse. Ce faible nombre oblige les propriétaires intéressés par la congélation de la semence de leur animal à se rendre sur l'un de ces quatre sites, ce qui est relativement peu commode.

Par contre, la mise en pratique d'une réfrigération préalable à la congélation permettrait aux clients de faire prélever leur animal par un vétérinaire, proche de leur domicile, qui serait « agréé », c'est-à-dire qui aurait suivi un stage de formation. Celui-ci pourrait ensuite réfrigérer la semence et l'envoyer à une des quatre banques de semence canine qui la congèlerait et pourrait la conserver ou bien l'envoyer en vue d'une insémination en semence congelée.

La réfrigération de la semence préalable à la congélation permettrait donc aux clients intéressés de réaliser un gain de temps et d'argent, ce qui pourrait aboutir à une vulgarisation de la congélation de la semence canine et à un développement majeur du nombre d'échantillons et d'inséminations artificielles de semence congelée.

De même, il pourrait être possible de réaliser des échanges internationaux sur ce même principe. La semence réfrigérée serait alors envoyée dans une banque de semence à l'étranger, où des propriétaires seraient intéressés par ladite semence. Celle-ci serait alors congelée en attente de son utilisation. Ainsi, le transport de la semence pourrait se faire majoritairement sous forme réfrigérée ce qui est moins onéreux et moins dangereux que le transport de semence congelée.

B. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°1

Au cours de cette expérience, nous étudierons les effets d'une réfrigération de la semence, à 4°C pendant 24 heures, préalable à sa congélation sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation, en utilisant deux dilueurs différents et en comparant les résultats à ceux d'une technique de congélation usuelle.

Le but de l'expérience n°1 est donc d'évaluer les effets de la réfrigération préalable à la congélation sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation et de déterminer si l'un des deux dilueurs est plus performant pour ce faire.

C. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°2

Au cours de l'expérience n°2, nous allons comparer les effets de la réfrigération de la semence, à 4°C pendant 24 heures, préalable à sa congélation (en utilisant le dilueur qui se sera avéré être le plus performant dans l'expérience n°1) à ceux d'une congélation usuelle sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Le but de cette deuxième expérience est donc d'évaluer l'influence de la réfrigération préalable à la congélation non seulement sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation, mais aussi sur leur intégrité acrosomiale.

D. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE N°3

Dans l'expérience n°3, nous allons comparer les effets de la congélation de semence réfrigérée et transportée à ceux de la congélation usuelle sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Le but de cette troisième expérience est donc d'évaluer les effets de la réfrigération préalable à la congélation sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation en se plaçant dans des conditions proches de la pratique, c'est-à-dire en prenant en compte le transport de la semence.

II. MATERIELS ET METHODES

A. ANIMAUX

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé la semence de 18 chiens dont 8 sont des chiens de particuliers, clients du CERCA, et 10 sont des chiens appartenant à un laboratoire de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, le CERCA ou l'UETM (Unité d'Etudes et de Thérapies des Myopathies canines).

Ces 10 derniers chiens sont logés dans des chenils situés dans l'enceinte de l'Ecole avec un accès à une cour extérieure et une partie intérieure.

Pour chaque animal, le nom, la race, l'âge, le propriétaire, le statut de fertilité et le numéro de l'expérience pour laquelle (lesquelles) la semence a été utilisée sont répertoriés dans le tableau 8.

Tableau 8. Données sur les animaux utilisés pour chacune des 3 expériences

Nom	Race	Age	Propriétaire	Fertilité	Expérience
AJAX	Labrador	1 an	UETM	inconnue	n°1
ALCAPONE	Dogue de Bordeaux	2 ans	Client CERCA	inconnue	n°2
ALL BLACK	Beauceron	2 ans	Client CERCA	inconnue	n°2
ARKASS	Briard	1 an	Client CERCA	inconnue	n°3
BLITZ	Bull terrier	4 ans	Client CERCA	+++	n°3
MATCHO	Beauceron	10 ans	Client CERCA	++	n°2
MOMO	Labrador	10 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1 et 3
ODIN	Epagneul breton	8 ans	Client CERCA	++	n°2
OGRE	Beagle	9 ans	CERCA	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
POUF	Labrador	7 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1, 2 et 3
SPOT	Labrador	5 ans	UETM	inconnue	n°1
SPRAG	Labrador	5 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1 et 3
SUMO	Beagle	5 ans	CERCA	+++	n°2
TEDDY	Labrador	4 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1, 2 et 3
TEUF	Labrador	4 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1, 2 et 3
TEX	Labrador	4 ans	UETM	inconnue	n ^{os} 1, 2 et 3
ULAN	Dogue de Bordeaux	3 ans	Client CERCA	inconnue	n°2
WALLACE	Bouledogue anglais	2 ans	Client CERCA	++	n°3

Fertilité : ++, moyenne ; +++, excellente

B. METHODES

1. Récolte de la semence

Pour les trois expériences, nous avons récolté la semence de chaque animal manuellement, selon la technique décrite dans la première partie de notre thèse, en récupérant dans un même tube la première et la seconde phase de l'éjaculat. L'aptitude à la récolte de chaque animal est présentée dans l'annexe 1.

Avant utilisation, nous avons réchauffé les tubes et les cônes dans une étuve et nous les avons maintenus à une température de 37°C à l'aide d'un porte-tube métallique réchauffé dans l'étuve.

Nous n'avons jamais prélevé plus de 3 chiens en même temps afin que le traitement de la semence, avant l'équilibration ou la réfrigération, soit le plus rapide possible.

Lorsque nous avons récolté plusieurs fois la semence d'un même animal, nous avons effectué les prélèvements au minimum à 48 heures d'intervalle.

2. Examen de la semence

Pour chaque expérience, nous avons examiné la semence de chaque animal avant de l'utiliser. Les différentes évaluations ont toujours été effectuées par le même opérateur afin de limiter les biais liés à la subjectivité des techniques employées.

Nous avons tout d'abord mesuré le volume des deux premières phases recueillies ensemble.

Puis, nous avons évalué la mobilité en déterminant, subjectivement, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles fléchants, par observation au microscope, muni d'une platine chauffante à 37°C, d'une goutte de semence (10 µL) déposée entre lame et lamelle.

Nous avons ensuite estimé le nombre de spermatozoïdes présents dans la première et la seconde phase de l'éjaculat en utilisant une cellule hématimétrique de Thoma.

Pour ce faire, nous avons dilué 10 µL du mélange des deux premières phases avec 990 µL d'une solution de NaCl à 3 % afin d'obtenir une dilution au 1/100^{ème}. Nous avons déposé une goutte de cette semence diluée sur la cellule de Thoma et nous avons compté le nombre de spermatozoïdes présents dans les 4 carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. Nous avons ensuite extrapolé ce nombre à l'éjaculat selon la formule suivante :

Nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (en millions) = Nombre de spermatozoïdes dénombrés x 5 x volume (en mL) des deux premières phases.

Nous avons également effectué un spermocytogramme en observant 200 spermatozoïdes sur une lame de semence colorée par de l'éosine-nigrosine selon la technique décrite dans la première partie. Nous avons ainsi déterminé le pourcentage de spermatozoïdes normaux, anormaux et de ceux possédant une gouttelette cytoplasmique, une anomalie de la tête, du flagelle ou de la pièce intermédiaire.

Pour la seconde et la troisième expérience, nous avons en plus évalué l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes.

Pour ce faire, nous avons effectué la coloration Spermac[®], selon les recommandations du fabricant, comme suit :

- étalement d'une goutte de phase spermatique sur une lame,
- séchage à l'air libre,
- immersion de la lame pendant au moins 5 minutes dans le fixateur,
- rinçage à l'eau distillée et séchage à l'air libre,
- immersion de la lame dans le colorant A pendant 2 minutes,
- rinçage à l'eau distillée,
- immersion de la lame dans le colorant B pendant 1 minute,
- rinçage à l'eau distillée,
- immersion de la lame dans le colorant C pendant 1 minute,
- rinçage à l'eau distillée, et
- séchage à l'air libre.

Nous avons ensuite observé la lame au microscope et nous avons déterminé le pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre en dénombrant 100 spermatozoïdes.

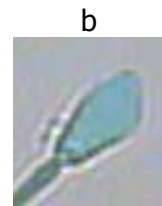
Un exemple de spermatozoïde possédant un acrosome intègre est illustré par la photographie 9 et deux exemples de spermatozoïdes possédant un acrosome endommagé sont présentés dans les photographies 10 a et b.

Photographie 9. Spermatozoïde possédant un acrosome intègre (Cliché CERCA)



Photographies 10 a et b. Spermatozoïdes possédant un acrosome endommagé (Cliché CERCA)

(a : acrosome absent, b : acrosome kystique)



Pour les différentes expériences, nous avons respecté les conditions généralement admises pour pouvoir congeler de la semence, c'est-à-dire que nous n'avons utilisé que les semences qui présentaient plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants et plus de 60 % de spermatozoïdes normaux morphologiquement.

Les résultats de l'examen des différentes semences utilisées sont présentés dans les annexes 2, 3, 4, 5 et 6.

3. Dilueurs

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé différents dilueurs (utilisés au CERCA en routine) : les deux dilueurs de congélation, dérivés de la méthode suédoise dite « Uppsala », un dilueur de réfrigération et le dilueur de décongélation Uppsala. La composition de ces dilueurs est indiquée dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9. Composition des dilueurs de congélation et de décongélation, dérivés de la méthode « Uppsala »

	Uppsala 1	Uppsala 2	Dilueur de décongélation
TRIS	3,025 g	3,025 g	3,025 g
Acide citrique	1,7 g	1,7 g	1,7 g
Glucose	1,25 g	1,25 g	1,25 g
Pénicilline	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Dihydrostreptomycine	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Eau distillée	Jusqu'à 77 mL	Jusqu'à 72 mL	Jusqu'à 100 mL
Glycérol	3 mL	7 mL	
Equex STM paste		1 mL	
Jaune d'oeuf	20 mL	20 mL	

Uppsala 1 : premier dilueur utilisé pour l'équilibration

Uppsala 2 : second dilueur, ajouté au premier, pour la congélation

Tableau 10. Composition du dilueur de réfrigération

TRIS	3,025 g
Acide citrique	1,7 g
Fructose	1,25 g
Pénicilline	100 000 UI
Dihydrostreptomycine	0,1 g
Eau distillée	Jusqu'à 80 mL
Jaune d'oeuf	20 mL

Ces dilueurs sont préparés à l'avance par la technicienne du CERCA, sans jaune d'œuf. Ils sont conditionnés en échantillons de 4 mL dans des tubes stériles et conservés congelés dans un congélateur ordinaire.

Nous avons préparé chaque dilueur le jour de leur utilisation. Quel que soit le dilueur utilisé, nous l'avons décongelé en le plongeant dans un bain-marie à 37°C pendant une quinzaine de minutes.

Pour les dilueurs de congélation et de réfrigération, qui nécessitent du jaune d'œuf, nous avons ajouté, aux 4 mL de dilueur, 1 mL de jaune d'œuf préparé le jour-même.

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

Nous avons également pris soin d'homogénéiser la semence avec le dilueur à chaque étape de dilution.

4. Technique de congélation

Nous avons effectué toutes les manipulations suivantes dans une chambre froide où la température est maintenue à 4°C. Nous avons placé l'ensemble du matériel, amené à être en contact avec la semence au cours de la congélation, dans la chambre froide au moins deux heures avant son utilisation afin qu'il soit à la même température que la semence.

Après la dernière étape de dilution, nous avons placé la semence dans des paillettes de 0,5 mL par aspiration, en prenant soin de créer quelques bulles d'air.

Nous avons ensuite obstrué l'extrémité libre de chaque paillette à l'aide d'une poudre de PVC se polymérisant dans l'eau.

Nous avons placé les paillettes verticalement, à l'aide du support prévu, dans des vapeurs d'azote pendant 10 minutes, en utilisant le congélateur employé au CERCA (NICOOOL[®] Air liquide). Au bout de 10 minutes, nous avons plongé les paillettes dans l'azote liquide contenu au fond du congélateur.

Nous avons ensuite transporté les paillettes jusqu'au CERCA, en utilisant un récipient en polystyrène rempli d'azote liquide, et nous les avons mis dans les tanks d'azote liquide où nous les avons conservées jusqu'à leur décongélation.

5. Décongélation

Lorsque cela était possible, nous avons décongelé deux paillettes par protocole et par animal.

Lors de la décongélation, nous avons plongé les paillettes dans un bain-marie à 37°C pendant une minute et nous avons placé le contenu de chaque paillette dans un tube contenant 1 mL de dilueur de décongélation Uppsala à 37°C (voir composition dans le tableau 9).

6. Analyse de la semence après décongélation

Pour les trois expériences, nous avons évalué la mobilité des spermatozoïdes immédiatement après décongélation en observant une goutte de semence entre lame et lamelle au microscope à platine chauffante.

Pour les expériences n°2 et n°3, nous avons en plus évalué l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation en observant 100 spermatozoïdes colorés par la coloration Spermac[®].

Afin de limiter les biais, chacun de ces critères a toujours été évalué par la même personne. De plus, les différentes lames ont été codées par une tierce personne avant la lecture afin que le lecteur ne sache pas quel protocole il évaluait.

C. PROTOCOLE

Pendant l'examen de la semence, nous avons conservé celle-ci à température ambiante. Nous l'avons ensuite centrifugée à 300 G pendant 10 minutes et nous avons éliminé le surnageant par aspiration à l'aide d'une pipette.

La semence ainsi centrifugée a été traitée différemment selon les expériences.

1. Expérience n°1

Nous avons réalisé la première expérience sur 14 éjaculats de 9 chiens différents.

Dans cette expérience, nous avons réparti la semence, après centrifugation et élimination du surnageant, dans trois tubes à parts égales.

Un schéma explicatif des manipulations réalisées au cours de cette expérience est présenté dans la figure 7.

Nous avons utilisé la semence du premier tube comme témoin, en la traitant de façon usuelle, c'est-à-dire en effectuant le protocole de congélation habituel du CERCA. Ce protocole sera par la suite évoqué sous le terme de « **congélation usuelle** ». Il consiste à réaliser deux étapes de dilution et à utiliser un temps d'équilibration de 2 heures en moyenne.

Nous avons donc dilué la semence, à température ambiante, avec un volume V de dilueur Uppsala 1, à température ambiante, afin d'obtenir une concentration de 400 millions de spermatozoïdes par mL en utilisant la formule suivante :

$V = [(nombre\ total\ de\ spermatozoïdes/200) - volume\ après\ centrifugation\ et\ élimination\ du\ surnageant] / 2.$

Nous avons ajouté le volume V de dilueur au goutte à goutte dans la semence et bien homogénéisé le mélange.

Nous avons ensuite placé la semence diluée, un tube de dilueur Uppsala 2 et le matériel nécessaire à la seconde étape de dilution et à la congélation dans la chambre froide à 4°C. Une fois la semence réfrigérée, l'ensemble des manipulations ont été effectuées dans la chambre froide, c'est-à-dire à 4°C.

Après deux heures d'équilibration et de réfrigération, nous avons réalisé la seconde étape de dilution en ajoutant le même volume V de dilueur Uppsala 2 à la semence, ceux-ci étant tous les deux à 4°C. Nous avons donc obtenu une concentration finale en spermatozoïdes de 200 millions par mL. Après homogénéisation, nous avons congelé la semence selon le procédé indiqué page 63.

Le protocole appliqué au deuxième tube correspond à ce que nous avons appelé « **congélation différée** ».

Nous avons effectué une première étape de dilution identique à celle de la « congélation usuelle ». Nous avons ensuite placé la semence diluée pendant 24 heures en chambre froide. Au bout de ces 24 heures, nous avons réalisé la seconde étape de dilution, toujours identique au premier protocole, avec du dilueur Uppsala 2, préparé le jour même et réfrigéré en chambre froide au moins deux heures avant son utilisation. Nous avons ensuite congelé la semence.

Nous avons effectué, avec la semence du troisième tube, un troisième protocole que nous avons nommé « **congélation post-réfrigération** ». Pour ce faire, nous avons dilué la semence au ¼ avec le dilueur de réfrigération, à température ambiante.

Nous avons ensuite placé la semence dans la chambre froide pendant 24 heures. Au bout de ces 24 heures, nous avons centrifugé la semence à 300 G pendant 10 minutes et éliminé le surnageant par aspiration à la pipette afin d'extraire le maximum de dilueur de réfrigération.

Après centrifugation et élimination du dilueur de réfrigération, nous avons dilué la semence avec un volume V' de dilueur Uppsala 1 à 4°C, la semence étant déjà à 4°C, avec $V' = [(nombre\ total\ de\ spermatozoïdes/200) - volume\ après\ centrifugation\ et\ élimination\ du\ dilueur\ de\ réfrigération] / 2$. Après deux heures d'équilibration en chambre froide, nous avons ajouté à la semence diluée un volume V' de dilueur Uppsala 2 à 4°C. Nous avons ensuite placé la semence en paillettes et nous l'avons congelée.

Remarque 1 :

Aucune centrifugeuse réfrigérée n'ayant pu être mise à notre disposition, nous avons utilisé celle du CERCA qui n'est pas réfrigérée. Il nous a donc fallu transporter la semence de la chambre froide au CERCA, puis du CERCA à la chambre froide, en passant par l'extérieur. Pour ce faire, nous avons utilisé une bouteille thermos, remplie de coton hydrophile humidifié, que nous avons placée au réfrigérateur pendant au moins 12 heures avant de l'utiliser, afin de limiter au maximum les variations de température.

Remarque 2 :

Pour le protocole de « congélation post-réfrigération », nous avons choisi de remplacer le dilueur de réfrigération par le premier dilueur de congélation Uppsala 1 avant d'ajouter le second dilueur de congélation et de congeler la semence pour éviter d'exposer les spermatozoïdes à une forte variation du taux de glycérol. En effet, le dilueur de réfrigération ne contient pas de glycérol alors que le second dilueur de congélation Uppsala 2 en contient 7 %. Une telle variation aurait fait subir aux spermatozoïdes un choc osmotique délétère (HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006).

Au cours de l'expérience n°1, nous n'avons évalué que la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.

2. Expérience n°2

Nous avons effectué cette expérience sur 11 éjaculats de 11 chiens différents.

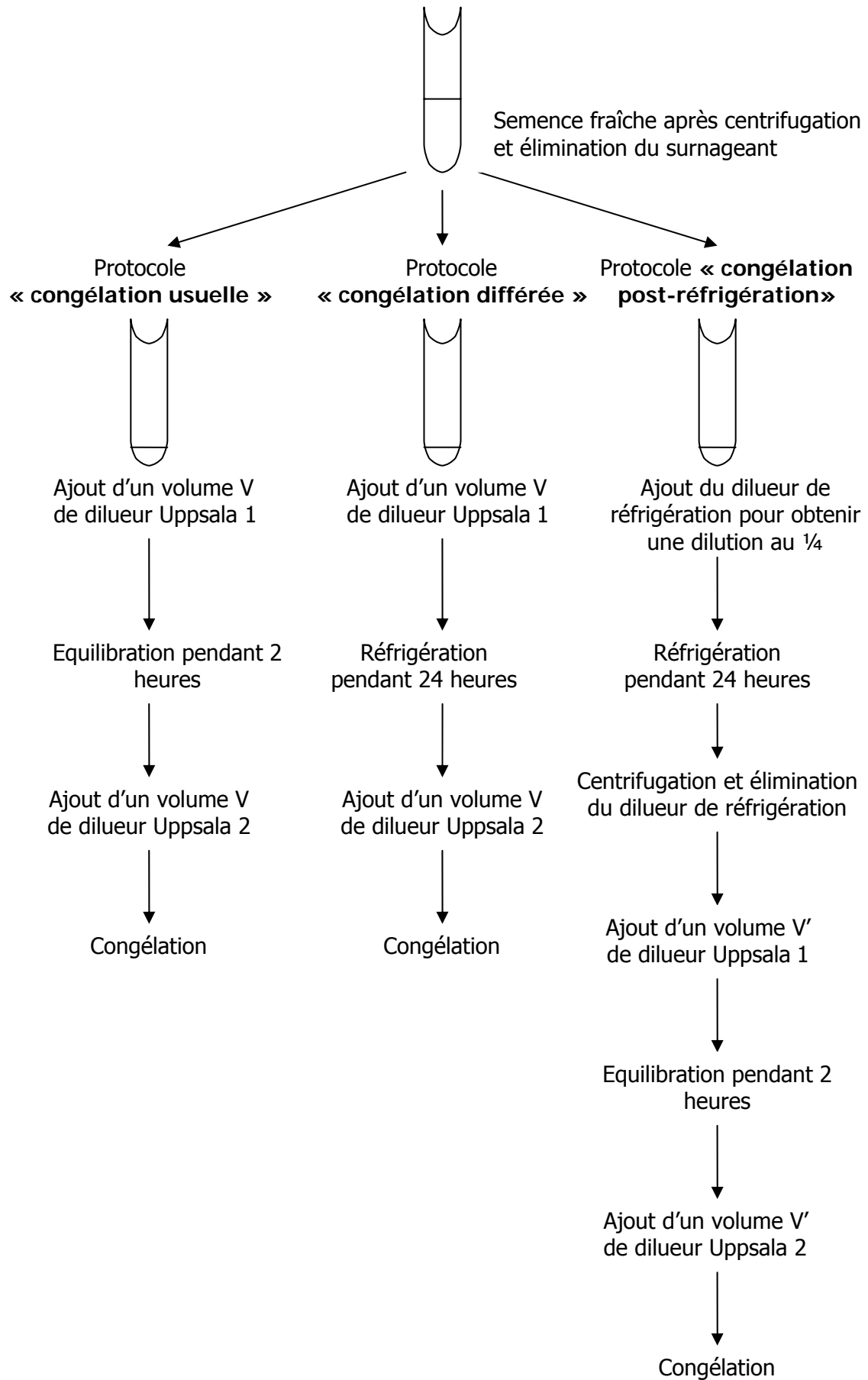
Après centrifugation, nous avons réparti la semence dans deux tubes à parts égales.

Comme pour l'expérience n°1, nous avons utilisé le premier tube comme témoin en appliquant le protocole de « congélation usuelle » à la semence.

Nous avons traité la seconde partie de la semence selon le protocole le plus performant de l'expérience n°1.

Pour l'expérience n°2, nous avons non seulement évalué la mobilité, mais aussi l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Figure 7. Schéma récapitulatif de l'expérience n°1



3. Expérience n°3

Nous avons réalisé cette expérience sur 10 éjaculats de 10 chiens différents.

Comme dans l'expérience n°2, nous avons divisé la semence en deux parts égales.

Nous avons congelé la première partie de façon usuelle, comme décrit précédemment.

Nous avons dilué l'autre partie de la semence selon la première étape de dilution du protocole le plus performant de l'expérience n°1. Nous avons placé la semence ainsi diluée en chambre froide pendant 2 heures afin qu'elle atteigne 4°C environ.

Nous avons ensuite placé le tube de semence diluée, dont nous avons testé l'étanchéité, dans un tube en plastique de 15 mL contenant 5 à 6 mL d'eau, que nous avons mis à réfrigérer pendant au moins 2 heures avant son utilisation.

Nous avons placé deux à trois tubes de 15 mL, contenant les tubes de semence diluée, dans une bouteille thermos métallique. Nous avons rempli cette dernière de coton hydrophile humidifié et nous l'avons laissée ouverte en chambre froide pendant au moins 12 heures avant de l'utiliser.

Nous avons ensuite placé la bouteille thermos dans un carton et nous l'avons stabilisée avec un matériel absorbant les chocs.

Nous nous sommes envoyé le colis ainsi préparé par envoi postal express (Chronopost®).

A réception du colis, c'est-à-dire une vingtaine d'heures après l'envoi, nous avons récupéré les tubes de semence et nous les avons placés dans la chambre froide pendant 2 heures afin que la température de la semence se stabilise à 4°C. Nous avons alors réalisé la(les) dernière(s) étape(s) de dilution du protocole correspondant (c'est-à-dire le plus performant de l'expérience n°1) avant de congeler la semence.

Nous évoquerons ce deuxième protocole sous le terme de « **congélation différée TR** » ou « **congélation post-réfrigération TR** », selon le protocole employé, TR signifiant transport.

Comme dans l'expérience n°2, nous avons évalué non seulement la mobilité, mais aussi l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

D. ANALYSE STATISTIQUE

Afin de comparer les moyennes de mobilités après décongélation et les moyennes de pourcentages de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation, nous avons utilisé un test statistique.

L'hypothèse nulle que nous avons retenu pour ce test consiste à considérer que les différences observées sont dues au hasard et qu'il n'existe pas de différence entre les différents protocoles, c'est-à-dire que la moyenne obtenue après « congélation différée », « congélation post-réfrigération » ou « congélation différée/post-réfrigération TR » est égale à celle obtenue après « congélation usuelle ».

L'hypothèse alternative correspond à considérer que les moyennes sont différentes.

Les effectifs étudiés étant inférieurs à 30, nous avons utilisé un test de Student.

Cependant, les deux ou trois catégories concernées ne peuvent pas être considérées comme indépendantes puisque nous avons appliqué, pour chaque expérience, deux à trois protocoles différents à la même semence. Nous avons donc utilisé un test de Student modifié où nous avons calculé t pour chaque comparaison selon la formule :

$$t = m_d / \sqrt{(s_d^2/n)}$$

avec

$$m_d = \sum d_i/n \text{ et } s_d^2 = \sum (d_i - m_d)^2/(n-1) \text{ où}$$

d_i est la différence entre les valeurs observées pour 2 protocoles pour un même éjaculat,
 m_d la moyenne des d_i et n le nombre d'éjaculats utilisés pour l'expérience

Nous avons choisi de rejeter l'hypothèse nulle avec un risque α de 5 %, communément pris pour référence.

En fonction du nombre de degrés de liberté, variable selon les expériences, et pour un risque α de 5 %, la valeur de t est de :

- 1,77 pour l'expérience n°1,
- 1,81 pour l'expérience n°2, et
- 1,83 pour l'expérience n°3.

Nous allons donc détailler les résultats de chaque expérience sous forme de tableaux et de graphiques et nous comparerons, pour chaque expérience, les résultats des protocoles deux à deux.

III. RESULTATS

Nous avons noté l'aptitude à la récolte de semence de chaque animal et nous l'avons reporté en annexe 1.

De même, les caractéristiques des éjaculats utilisés pour chaque expérience sont présentées en annexes :

- annexe 2 pour l'expérience n°1,
- annexes 3 et 4 pour l'expérience n°2, et
- annexes 5 et 6 pour l'expérience n°3.

A. EXPERIENCE N°1

Les résultats de l'expérience n°1 sont présentés dans le tableau 11 et dans les figures 8 et 9.

La mobilité moyenne obtenue après décongélation est de :

- 54 +/- 9 % pour la « congélation usuelle »,
- 56 +/- 9 % pour la « congélation différée », et
- 49 +/- 13 % pour la « congélation post-réfrigération ».

Les différences observées entre la « congélation usuelle » et la « congélation différée », et entre la « congélation usuelle » et la « congélation post-réfrigération » ne sont pas significatives ($P > 0,1$ et $P > 0,05$ respectivement).

Par contre, si nous comparons les résultats de la « congélation différée » et de la « congélation post-réfrigération », il existe une différence significative ($P < 0,01$).

Pour l'expérience n°2 et n°3, nous avons donc choisi d'étudier le protocole de « congélation différée ».

Tableau 11. Mobilité après décongélation (en %) obtenue pour chaque prélèvement et chaque protocole de l'expérience n°1

	Congélation usuelle	Congélation différée	Congélation post-réfrigération
AJAX	50	50	40
MOMO 1	55	70	50
MOMO 2	55	55	50
OGRE 1	45	45	45
OGRE 2	55	55	40
POUF 1	65	60	40
POUF 2	50	45	30
SPOT	40	50	30
SPRAG	65	70	55
TEDDY 1	40	60	50
TEDDY 2	70	60	65
TEUF 1	50	50	65
TEUF 2	60	70	75
TEX	50	50	45
Moyenne	54	56	49
Ecart-type	9	9	13

Figure 8. Mobilité (en %) après décongélation obtenue pour chaque prélèvement et chaque protocole de l'expérience n°1 (d'après le tableau 11)

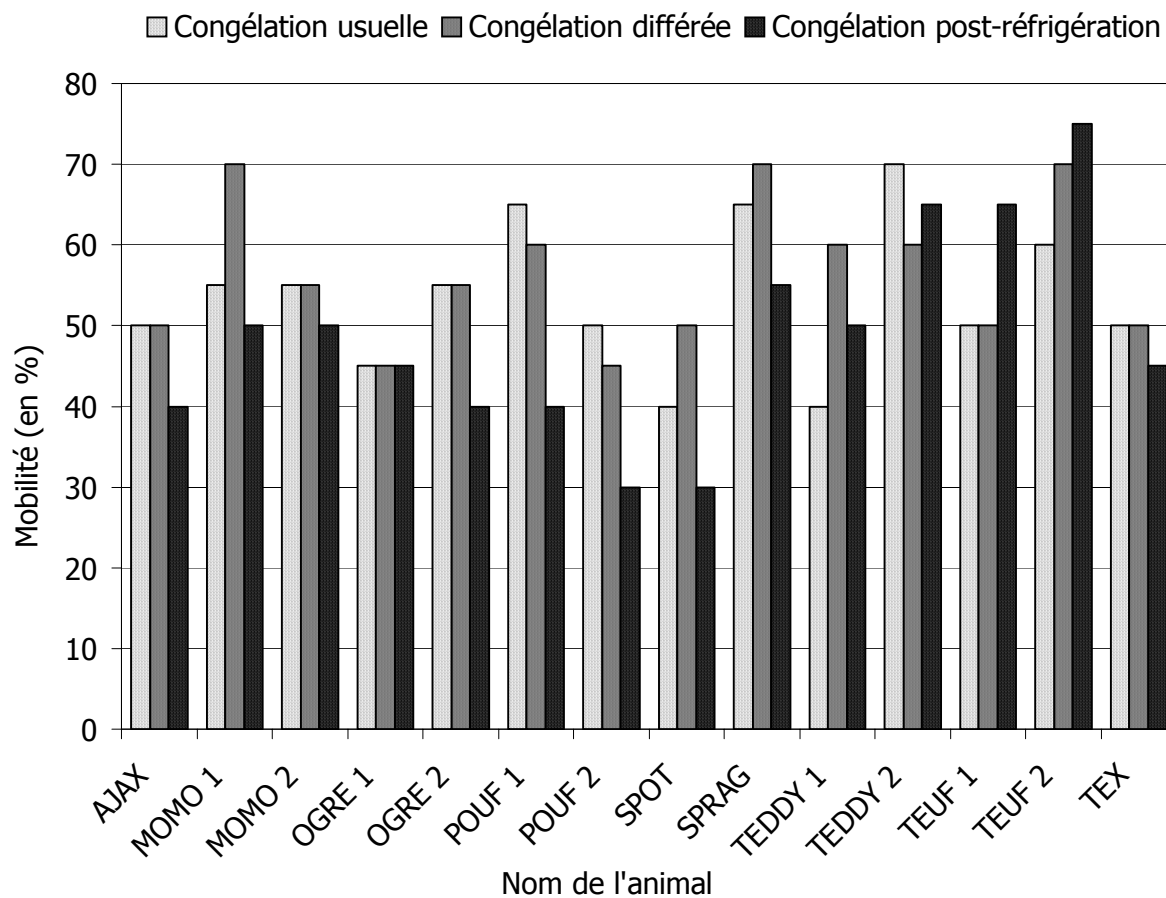
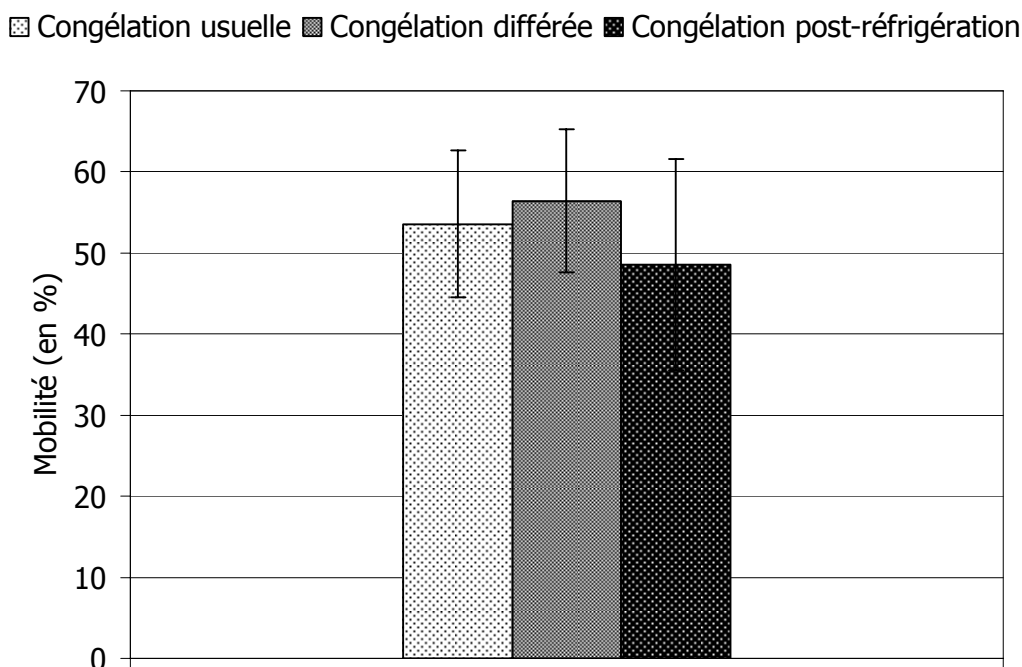


Figure 9. Comparaison de la mobilité moyenne (en %) après décongélation obtenue pour chaque protocole de l'expérience n°1 (d'après le tableau 11)



B. EXPERIENCE N°2

1. Mobilité

Les résultats de mobilité après décongélation de l'expérience n°2 sont présentés dans le tableau 12 et dans les figures 10 et 11.

La mobilité moyenne obtenue après décongélation est de :

- 59 +/- 20 % pour la « congélation usuelle », et
- 58 +/- 20 % pour la « congélation différée ».

La différence observée entre les 2 protocoles n'est pas significative ($P > 0,4$).

Tableau 12. Mobilité après décongélation (en %) obtenue pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°2

	Congélation usuelle	Congélation différée
ALCAPONE	50	50
ALL BLACK	75	75
MATCHO	30	40
ODIN	80	40
OGRE	50	80
POUF	60	45
SUMO	20	20
TEDDY	80	75
TEUF	60	75
TEX	80	75
ULAN	65	60
Moyenne	59	58
Ecart-type	20	20

Figure 10. Mobilité (en %) après décongélation obtenue pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°2 (d'après le tableau 12)

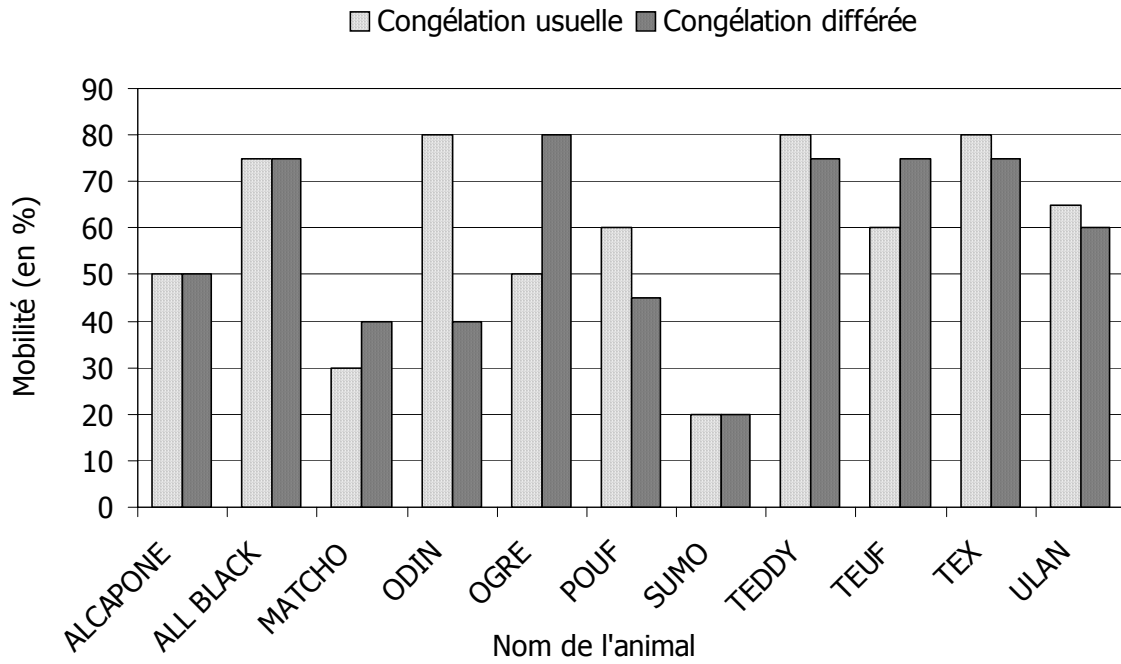
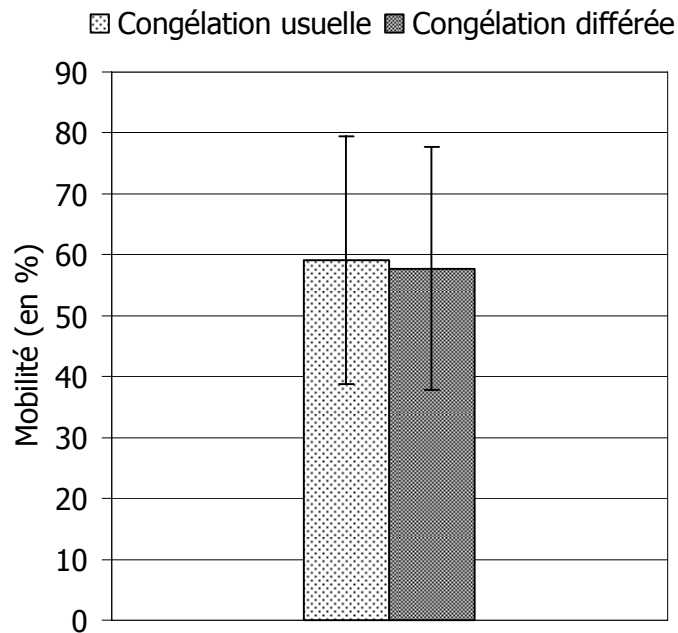


Figure 11. Comparaison de la mobilité moyenne (en %) après décongélation obtenue pour chaque protocole de l'expérience n°2 (d'après le tableau 12)



2. Intégrité acrosomiale

Les résultats d'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation de l'expérience n°2 sont regroupés dans le tableau 13 et dans les figures 12 et 13.

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation est de :

- 70 +/- 8 % pour la « congélation usuelle », et
- 70 +/- 11 % pour la « congélation différée ».

La différence observée entre les 2 protocoles n'est pas significative ($P > 0,4$).

Tableau 13. Pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°2

	Congélation usuelle	Congélation différée
ALCAPONE	74	63
ALL BLACK	75	81
MATCHO	61	63
ODIN	68	67
OGRE	71	77
POUF	54	49
SUMO	78	80
TEDDY	61	68
TEUF	67	69
TEX	83	87
ULAN	73	64
Moyenne	70	70
Ecart-type	8	11

Figure 12. Pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°2 (d'après le tableau 13)

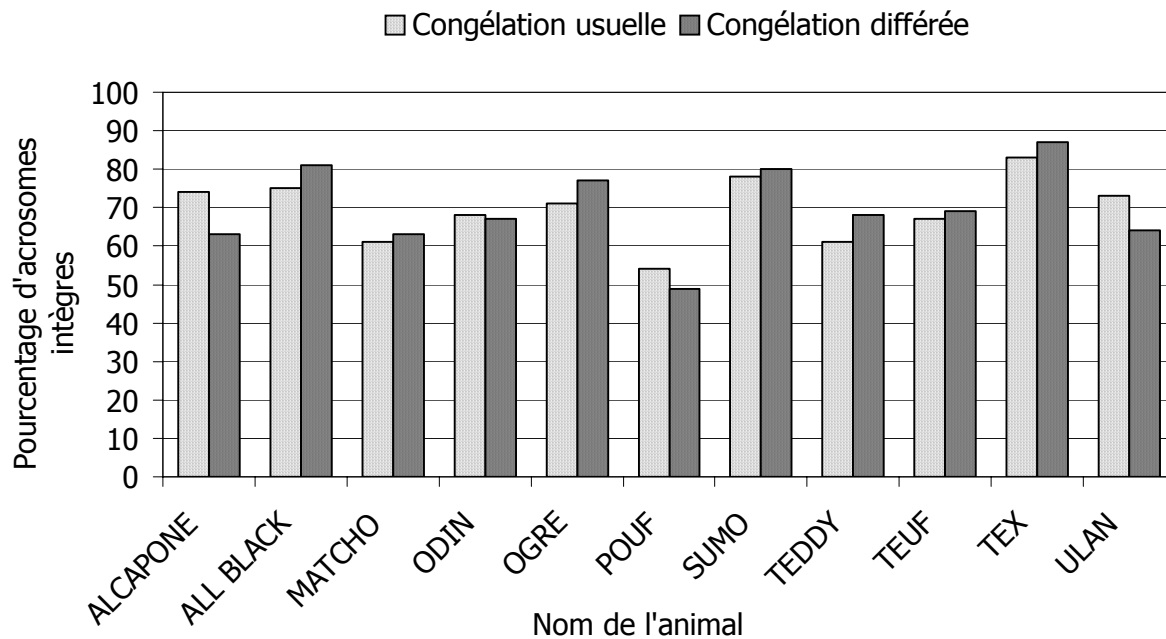
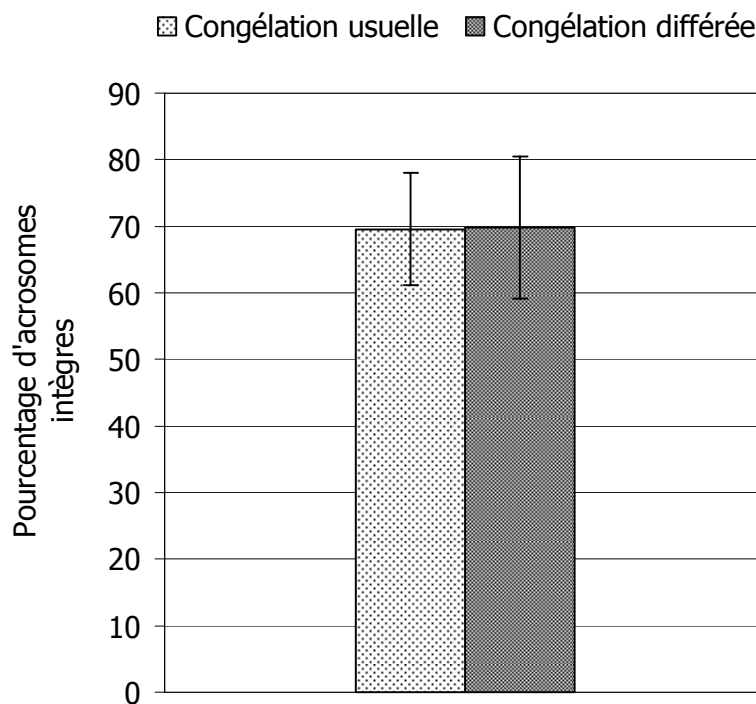


Figure 13. Comparaison du pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque protocole de l'expérience n°2 (d'après le tableau 13)



C. EXPERIENCE N°3

1. Mobilité

Les résultats de mobilité après décongélation de l'expérience n°3 sont présentés dans le tableau 14 et dans les figures 14 et 15.

La mobilité moyenne obtenue après décongélation est de :

- 57 +/- 15 % pour la congélation usuelle, et
- 48 +/- 17 % pour la congélation différée TR.

La différence observée entre les 2 protocoles est significative ($P < 0,005$).

Tableau 14. Mobilité après décongélation (en %) obtenue pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°3

	Congélation usuelle	Congélation différée TR
ARKASS	70	40
BLITZ	50	40
MOMO	50	40
OGRE	60	50
POUF	30	20
SPRAG	40	30
TEDDY	80	70
TEUF	65	65
TEX	70	70
WALLACE	50	50
Moyenne	57	48
Ecart-type	15	17

Figure 14. Mobilité (en %) après décongélation obtenue pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°3 (d'après le tableau 14)

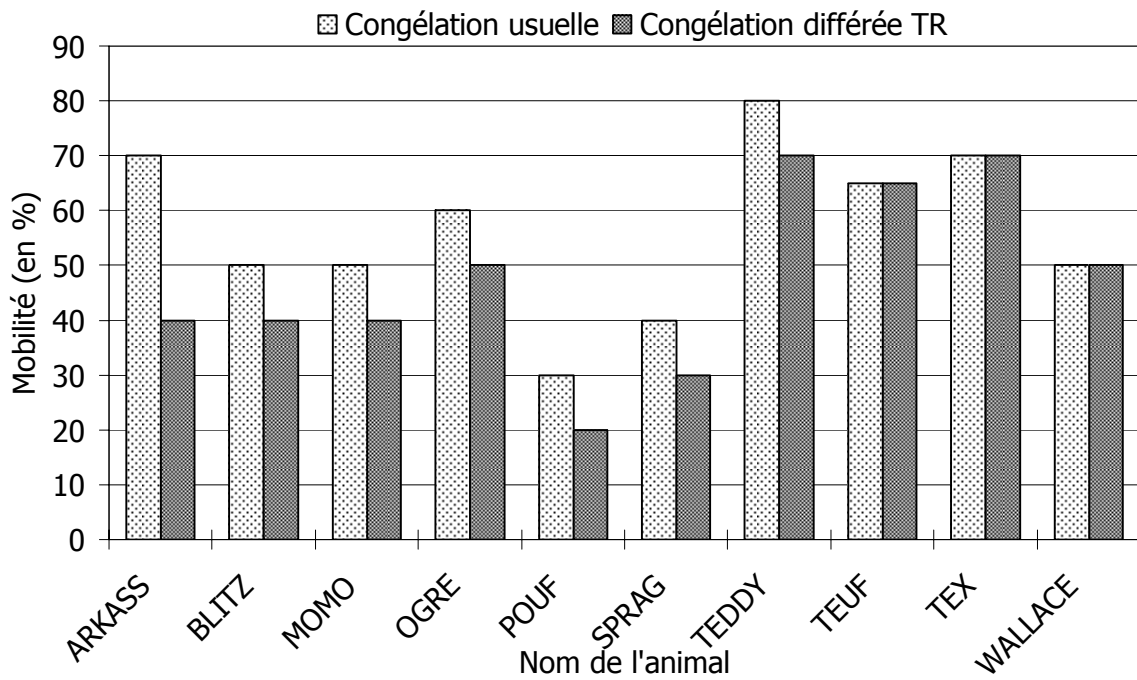
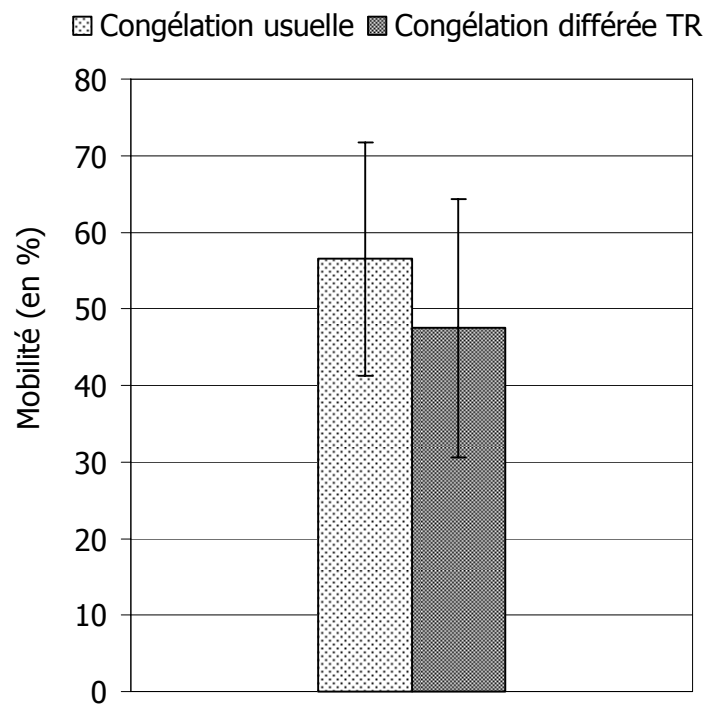


Figure 15. Comparaison de la mobilité moyenne (en %) après décongélation obtenue pour chaque protocole de l'expérience n°3 (d'après le tableau 14)



2. Intégrité acrosomiale

Les résultats des pourcentages de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation sont regroupés dans le tableau 15 et dans les figures 16 et 17.

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation est de :

- 72 +/- 8 % pour la « congélation usuelle », et
- 65 +/- 11 % pour la « congélation différée TR ».

La différence observée entre les deux protocoles est significative ($P < 0,025$).

Tableau 15. Pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°3

	Congélation usuelle	Congélation différée TR
ARKASS	71	70
BLITZ	75	69
MOMO	74	64
OGRE	74	66
POUF	66	46
SPRAG	59	60
TEDDY	77	78
TEUF	86	67
TEX	62	49
WALLACE	73	77
Moyenne		
	72	65
Ecart-type		
	8	11

Figure 16. Pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque animal et chaque protocole de l'expérience n°3 (d'après le tableau 15)

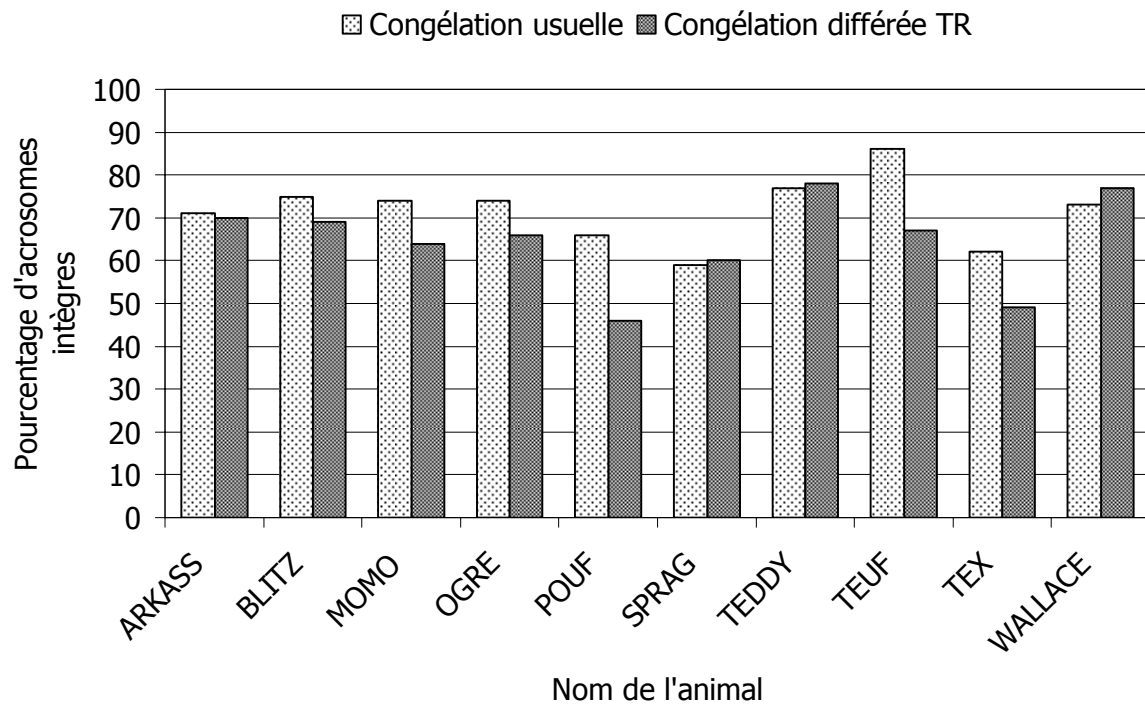
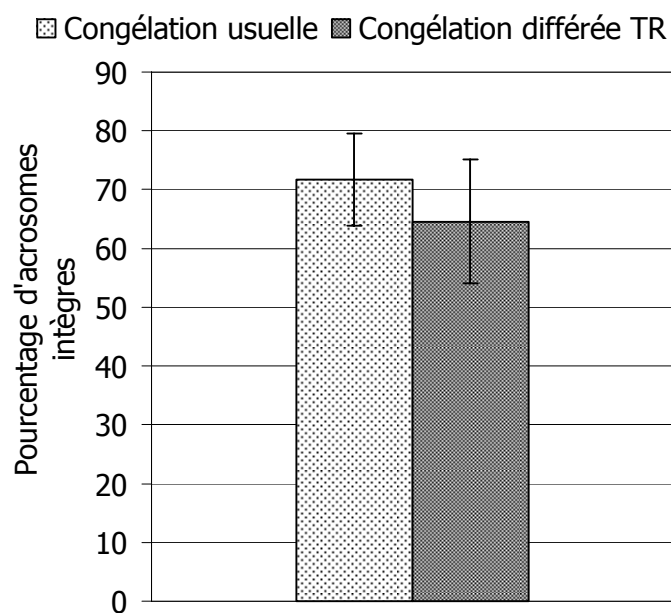


Figure 17. Comparaison du pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation obtenu pour chaque protocole de l'expérience n°3 (d'après le tableau 15)



Au bilan, notre travail permet de démontrer que, dans des conditions expérimentales (expériences n°1 et 2), une réfrigération de la semence canine, à 4°C pendant 24 heures, dans un dilueur dérivé de la méthode Uppsala, préalable à sa congélation n'affecte pas significativement la mobilité ni l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation par rapport à une technique de congélation usuelle.

Mais, lors d'une mise en conditions réelles (expérience n°3), elle altère ces deux paramètres de façon significative, avec une réduction de la mobilité et de l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation d'en moyenne 9 % et 7 %, respectivement, par rapport à une technique de congélation usuelle.

IV. DISCUSSION

A. DISCUSSION DU PROTOCOLE

Plusieurs points s'avèrent discutables quant à la réalisation de notre protocole expérimental.

Concernant la race des chiens utilisés, même si nous avons essayé d'obtenir la participation d'un maximum d'animaux de races différentes, la race de type Labrador est sur-représentée (8 chiens sur 18), ce qui a pu créer un biais dans nos résultats.

Concernant l'analyse de la semence après décongélation, nous avons évalué subjectivement la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes avec les techniques disponibles au CERCA.

Nous avons donc réalisé l'évaluation de la mobilité en déterminant le pourcentage de spermatozoïdes fléchants par observation directe au microscope. Cette technique est très subjective et il a été montré que des variations allant de 30 à 60 % existent en fonction de l'opérateur (IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001a). C'est pourquoi l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes après décongélation a toujours été effectuée par la même personne dans notre travail. De plus, afin de réduire au minimum les biais possibles, nous avons codifié les lames pour que l'opérateur ne sache pas quel protocole il était en train d'évaluer. Malgré ces précautions, il aurait été préférable d'utiliser un système CASA (non disponible au CERCA) pour évaluer la mobilité après décongélation afin d'obtenir des résultats objectifs et précis.

Pour évaluer l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation, nous avons utilisé la coloration Spermac[®]. Afin de réduire la subjectivité inhérente à cette technique, l'analyse a toujours été effectuée par le même opérateur. Cependant, l'utilisation d'une méthode plus précise et moins subjective, comme les colorations fluorescentes analysées par la cytométrie de flux, aurait été préférable (RIJSSELAERE *et al.*, 2005).

Enfin, il aurait également pu être intéressant d'évaluer les effets des protocoles testés sur d'autres paramètres comme la vitalité ou l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes après décongélation.

Donc, même si nos résultats sont encourageants, il serait nécessaire de compléter notre travail par une autre étude, qui porterait sur un nombre plus important d'animaux, de races différentes, et qui utiliserait des techniques d'analyse de la semence après décongélation plus performantes.

De plus, avant de pouvoir mettre en application un protocole de réfrigération de la semence canine préalable à sa congélation, il serait utile d'en étudier les conséquences sur la capacité de fécondation des spermatozoïdes après décongélation, par des tests d'interaction des gamètes (test de liaison à la zone pellucide ou test de pénétration de l'ovocyte) et/ou par la réalisation d'inséminations artificielles.

B. DISCUSSION DES RESULTATS

Dans l'expérience n°1, nous avons comparé les effets sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation de deux techniques de réfrigération, préalable à la congélation, différentes :

- la « congélation différée », au cours de laquelle la semence est réfrigérée pendant 24 heures dans un dilueur dérivé de la méthode dite « Uppsala », utilisé habituellement pour la congélation, et
- la « congélation post-réfrigération », au cours de laquelle la semence est réfrigérée pendant 24 heures dans un dilueur de réfrigération à base de jaune d'œuf et de TRIS.

Même si aucune de ces deux techniques n'altère significativement le paramètre étudié, par rapport à une technique de congélation usuelle, les résultats de la « congélation différée » se sont révélés significativement meilleurs que ceux de la « congélation post-réfrigération » ($P < 0,01$).

Une des explications à cette constatation pourrait être que le nombre de manipulations de la semence a été plus important pour la « congélation post-réfrigération », avec une étape de centrifugation et de dilution supplémentaires, que pour la « congélation différée ».

De plus, pour centrifuger la semence, nous avons dû la transporter de la chambre froide au CERCA, puis du CERCA à la chambre froide et nous avons utilisé une centrifugeuse non réfrigérée. Donc, même si nous avons pris toutes les précautions possibles (utilisation d'une bouteille thermos remplie de coton hydrophile humidifié et réfrigéré pour le transport de la semence), la semence du protocole « congélation post-réfrigération » a été soumise à des variations thermiques et à des chocs mécaniques, que n'a pas subis la semence du protocole « congélation différée », et qui ont pu endommager les spermatozoïdes.

Une autre explication pourrait résider dans la différence de composition des deux dilueurs que nous avons utilisés pour réfrigérer la semence pour chacun des deux protocoles.

En effet, même si les protocoles étudiés diffèrent entre le travail d'HERMANSSON et LINDE-FORSBERG (2006) et le nôtre, ces auteurs ont montré que le dilueur de type « Uppsala », qu'ils ont utilisé, permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme d'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation que le dilueur de réfrigération à base de jaune d'œuf et de TRIS qu'ils ont employé. Or, la seule différence entre ces deux dilueurs est leur concentration en glycérol, le dilueur de type « Uppsala » en contenant 3 % et le second n'en contenant pas.

Dans notre expérience n°1, la différence de composition des deux dilueurs concerne le type de sucre et le taux de glycérol. Le dilueur de type Uppsala, utilisé pour le protocole « congélation différée », contient du glucose et 3 % de glycérol alors que le second dilueur, utilisé pour le protocole « congélation post-réfrigération », contient du fructose et pas de glycérol.

Compte tenu des effets néfastes du glycérol sur les spermatozoïdes (MARTINS-BESSA *et al.*, 2006), nous aurions pu nous attendre à ce que le dilueur sans glycérol donne de meilleurs résultats. Cependant, les précédentes études n'ont pas mis en évidence d'effet délétère du glycérol sur la mobilité des spermatozoïdes lors d'une réfrigération de 24 heures (HERMANSSON et LINDE-FORSBERG, 2006) ou de 48 heures (BUE, 1992). Cependant, il convient de rappeler que la mobilité ne permet en rien de prédire la capacité de fécondation des spermatozoïdes (HAY *et al.*, 1997a).

Concernant le type de sucre, les différentes études portant sur l'utilisation du fructose plutôt que du glucose, et inversement, sont contradictoires (YILDIZ *et al.*, 2000 ; IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001c ; RIGAU *et al.*, 2001 ; PONGLOWHAPAN *et al.*, 2004a). Il semble donc qu'il n'y ait aucun avantage particulier à utiliser l'un plutôt que l'autre de ces deux sucres.

Au vu de ces données bibliographiques, nous ne pouvons pas, *a priori*, attribuer la différence significative observée, sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation, entre la « congélation différée » et la « congélation post-réfrigération » à la différence de composition du dilueur utilisé pour la réfrigération de la semence.

L'explication la plus plausible reste donc que le nombre de manipulations imposées à la semence avant sa congélation a un effet délétère sur la mobilité des spermatozoïdes après décongélation. Cependant, il n'est pas logique que la différence observée entre la « congélation différée » et la « congélation post-réfrigération » ($P < 0,01$) n'ait pas été retrouvée entre la « congélation usuelle » et la « congélation post-réfrigération » ($P > 0,05$) puisque, dans les deux cas, le protocole de « congélation post-réfrigération » comprend le même nombre et le même type de manipulations supplémentaires de la semence.

Nous pourrions expliquer cette constatation par le risque d'erreur β du test statistique, qui correspondrait à estimer qu'il n'y a pas de différence significative entre la « congélation usuelle » et la « congélation post-réfrigération » alors qu'en réalité il en existe une.

Grâce aux **expériences n°1 et n°2**, nous avons montré que, dans des conditions expérimentales et en se basant sur les techniques employées par le CERCA, il est possible de congeler de la semence canine préalablement réfrigérée, à 4°C pendant 24 heures, sans qu'il y ait un effet significatif, par rapport à une technique de congélation usuelle, sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux d'HERMANSSON et LINDEFORSERG (2006), qui ont montré qu'une réfrigération de 24 ou 48 heures de la semence canine avant congélation n'a pas d'effet significatif sur la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

D'autres études ont auparavant tenté d'analyser les effets de la réfrigération préalable à la congélation sur les spermatozoïdes de différentes espèces, avec des résultats plutôt encourageants.

Dans l'espèce canine, VERSTEGEN *et al.* (2002) ont montré que la réfrigération de la semence, à 4°C pendant plus de 3 jours, avant sa congélation n'altère pas significativement la mobilité globale des spermatozoïdes après décongélation, mais qu'il existe une baisse significative du pourcentage de spermatozoïdes fléchants. De même, PONGLOWHAPAN *et al.* (2004b) n'ont pas mis en évidence d'effet néfaste d'une réfrigération à 5°C pendant plus de 4 jours, avant congélation, de spermatozoïdes épидидymaires de chiens sur leur mobilité et leur intégrité acrosomiale après décongélation.

En ce qui concerne les autres espèces, des essais réalisés sur des spermatozoïdes épидидymaires de singe ou de porc ont montré qu'ils conservent leur capacité de fécondation après une réfrigération de 24 heures préalable à leur congélation (SANKAI *et al.*, 1997 ; KIKUCHI *et al.*, 1999). Dans l'espèce équine, CROCKETT *et al.* (2001) ont obtenu de bons résultats, en terme de mobilité après décongélation, après une réfrigération de la semence à 5°C pendant 12 heures ; mais, après 24 heures, les résultats ont été décevants.

Il semble donc que, dans des conditions expérimentales standardisées, les spermatozoïdes résistent relativement bien à une réfrigération et à une congélation combinées, ce qui confirme nos résultats.

Si dans des conditions expérimentales, nous avons obtenu de bons résultats suite à la congélation de semence canine préalablement réfrigérée, il n'en est pas de même lors de la mise en conditions réelles.

En effet, dans l'**expérience n°3**, le protocole de « congélation différée TR » a provoqué une diminution significative de la mobilité et de l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation. Par rapport à la technique de « congélation usuelle », nous avons observé, après décongélation, une réduction de 9 % de la mobilité moyenne et de 7 % du pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre.

L'expérience n°3 ne diffère de l'expérience n°2 que par l'étape de réfrigération. En effet, dans l'expérience n°3, nous avons conditionné la semence et nous lui avons fait subir un transport dans une bouteille thermos métallique pendant une vingtaine d'heures. Pour transporter la semence, nous avons choisi d'utiliser une bouteille thermos car il s'agit du système le plus communément répandu et le moins onéreux, même s'il a été démontré que ce n'est pas le plus performant (PINTO *et al.*, 1999).

Lors du transport, quelles que soient les précautions mises en place, la semence subit obligatoirement des chocs mécaniques.

Elle est également soumise à des variations de température, plus ou moins importantes en fonction du système utilisé. Selon les fabricants, une bouteille thermos métallique ne permet un maintien de la température que pendant une douzaine d'heures alors que des systèmes de transport spécifiques peuvent maintenir la température constante jusqu'à 48 heures.

A cause du transport, les spermatozoïdes subissent donc, probablement, des chocs mécaniques et thermiques, susceptibles de les endommager. Cependant, les inséminations artificielles avec de la semence réfrigérée et transportée donnent des résultats satisfaisants (GOODMAN et CAIN, 1993 ; PINTO *et al.*, 1999).

Il est donc possible que la semence puisse résister aux effets délétères du transport, mais que ceux-ci fragilisent les spermatozoïdes qui sont alors moins résistants à la congélation.

Il s'agit de l'hypothèse la plus probable pour expliquer qu'il existe une différence significative entre le protocole de « congélation usuelle » et de « congélation différée TR » dans l'expérience n°3 alors qu'il n'y en a pas entre la « congélation usuelle » et la « congélation différée » de l'expérience n°2.

Cependant, il s'agit, à notre connaissance, de la première expérience de ce type (avec mise en conditions réelles). Donc, il n'existe aucune donnée bibliographique qui nous permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Il faut tout de même noter que la différence observée dans l'expérience n°3 reste limitée et que la qualité de la semence, après décongélation, suite à sa réfrigération, son transport et sa congélation est correcte (mobilité moyenne de 48 % et pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre de 65 %).

Afin d'améliorer ces résultats, il faudrait développer et/ou tester un système de transport plus performant, qui limiterait les chocs mécaniques et thermiques au maximum.

Par exemple, il serait intéressant de réaliser une étude similaire à l'expérience n°3 en utilisant un système spécifique de transport de la semence, c'est-à-dire un kit commercialisé (de type CLONE[®], Bio-flite[®], Equitainer[®], etc), puisque PINTO *et al.* (1999) ont montré que de tels systèmes permettent de conserver une mobilité après 48 heures de conservation significativement supérieure à celle obtenue avec une bouteille thermos. Il serait également très pertinent de renouveler une expérience similaire à la nôtre en comparant plusieurs systèmes de transport afin de déterminer le plus performant d'entre eux.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que, dans des conditions expérimentales, la réfrigération de la semence canine préalable à sa congélation n'altère pas significativement la mobilité ni l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation par rapport à un procédé de congélation usuelle, et que cette nouvelle technique donne des résultats satisfaisants, en appliquant des protocoles dérivés des méthodes de congélation du CERCA.

Ainsi, en réfrigérant la semence, à 4°C pendant 24 heures, dans un dilueur de type Uppsala, avant de la congeler, nous avons obtenu une mobilité moyenne après décongélation de 56 +/- 9 % et de 58 +/- 20 % au cours de deux expériences différentes. En utilisant le même protocole, nous avons observé un pourcentage moyen de spermatozoïdes possédant un acrosome intègre après décongélation de 70 +/- 11 %.

Par contre, nous avons constaté, qu'en terme de mobilité après décongélation, l'utilisation d'un dilueur de réfrigération, à base de jaune d'œuf et de TRIS, pour conserver la semence à 4°C pendant 24 heures avant sa congélation, est moins performante que l'emploi d'un dilueur de type Uppsala.

Enfin, nous avons montré que, lors d'une mise en conditions réelles, les résultats sont encourageants, même si la réfrigération et le transport de la semence canine préalables à sa congélation ont un effet délétère, bien que modéré, sur la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation. En effet, par rapport à une technique de congélation usuelle, nous avons observé une réduction de la mobilité moyenne de 9 % et une diminution du pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intact de 7%.

Les résultats de ce travail nécessitent d'être confirmés par d'autres études portant sur un nombre d'animaux plus élevé et qui analyseraient de façon plus objective les paramètres évalués ici (système CASA, cytométrie de flux, etc), mais aussi d'autres paramètres comme la vitalité, l'intégrité membranaire ou la capacité de fécondation des spermatozoïdes après décongélation.

Si de telles études confirmaient que la réfrigération de la semence préalable à sa congélation n'a pas d'effet néfaste sur les spermatozoïdes, il serait alors nécessaire, avant de mettre en application cette technique, de réaliser des inséminations artificielles pour déterminer si les taux de gestation et les tailles des portées obtenus seraient satisfaisants.

Il faudrait également essayer de perfectionner le système de transport de la semence pour que l'effet délétère du transport, que nous avons mis en évidence, soit réduit au minimum voire aboli.

Il existe donc de nombreuses étapes nécessaires avant que la réfrigération de la semence préalable à sa congélation soit utilisable en pratique.

Mais, si tel était le cas, ce serait une grande avancée dans le monde de la reproduction canine assistée. Dans un premier temps, les propriétaires intéressés par la congélation de la semence de leur animal pourraient y voir un gain de temps et d'argent. A terme, l'application de cette nouvelle technique pourrait également permettre de vulgariser la congélation de la semence canine, et, par là-même, d'aboutir à une conservation et à une dispersion de l'ensemble du potentiel génétique de l'espèce canine. Mais, il serait alors nécessaire, pour éviter les fraudes, de mettre en place un système de contrôle fiable et rigoureux de l'identité des animaux donneurs, ce qui sera très bientôt disponible pour tous les éleveurs.

BIBLIOGRAPHIE

- **ADOUE C. (1991)** *Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin : influence de la durée d'équilibration et de la température de décongélation.* Thèse Méd. Vét., Alfort, n°100, 194 p.
- **BARONE R. (1978)** *Anatomie comparée des mammifères domestiques.* Tome 3, fascicule 2. Lyon : Vigot, 951 p.
- **BOUCHARD G., MORIS J., SIKES J. et YOUNGQUIST R. (1990)** Effect of storage, temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa mobility. *Theriogenology*, **34**, 147-157.
- **BUE P. (1992)** *Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol.* Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 81 p.
- **BURGESS C., BREDL J., PLUMMER J. et ENGLAND G. (2001)** Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 357-363.
- **CORTES C., CODELIA V., MANOSALVA I., DE LANGE J., DE LOS REYES M. et MORENO R. (2006)** Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **93**, 165-175.
- **CROCKETT E., GRAHAM J., BRUEMMER J. et SQUIRES J. (2001)** Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility : preliminary results. *Theriogenology*, **55**, 793-803.
- **DAHLBOM M., ANDERSSON M., VIERULA M. et ALANKO M. (1997)** Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer : work in progress. *Theriogenology*, **48**, 687-698.
- **ENGLAND G. (1993)** Cryopreservation of dog semen : a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 243-255.
- **ENGLAND G. et PLUMMER J. (1993)** Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 261-270.
- **ENGLAND G. et PONZIO P. (1996)** Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, **46**, 165-171.
- **FELDMAN E. et NELSON R. (2004a)** Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 930-952.
- **FELDMAN E. et NELSON R. (2004b)** Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1005-1013.

- **FONTBONNE A. et BADINAND F. (1993a)** Studies on freezing dog spermatozoa : effect of glycerol on motility after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 531-532.
- **FONTBONNE A. et BADINAND F. (1993b)** Canine artificial insemination with frozen semen : comparison of intravaginal and intrauterine insemination of semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 325-327.
- **FRESHMAN J. (2002)** Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, **17**, 104-107.
- **GOODMAN M. et CAIN J. (1993)** Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 554.
- **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.
- **HAY M., KING W., GARTLEY C., LEIBO S. et GOODROWE K. (1997a)** Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, **51** (suppl), 99-108.
- **HAY M., KING W., GARTLEY C., LEIBO S. et GOODROWE K. (1997b)** Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, **48**, 1329-1342.
- **HERMANSSON U. et LINDE-FORSBERG C. (2006)** Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, **65**, 584-593.
- **HEWITT D. et ENGLAND G. (1997)** The canine oocyte penetration assay ; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Animal Reproduction Science*, **50**, 123-139.
- **HEWITT D. et ENGLAND G. (1998)** An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science*, **51**, 321-332.
- **IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001a)** Evaluation of the « Hamilton Thorn computer-based automated system » for dog semen analysis. *Theriogenology*, **55**, 733-749.
- **IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001b)** Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology*, **55**, 1143-1158.
- **IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001c)** Long-term preservation of chilled canine semen : effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, **55**, 671-684.
- **IVANOVA M., MOLLOVA M., IVANOVA-KICHEVA G., PETROV M., DJARKOVA T. et SOMLEV B. (1999)** Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*, **52**, 163-170.

- **JACQUET M. (2003)** *Contribution à l'étude des protocoles de capacitation in vitro et de congélation des spermatozoïdes chez le chien.* Thèse Méd. Vét., Lyon, n°146, 79 p.
- **JOHNSTON S. (1991)** Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice*, **21**, 545-551.
- **KIKUCHI K., KASHIWAZAKI N., NAGAI T., NOGUCHI J., SHIMADA A. TAKAHASHI R. et al (1999)** Reproduction in pigs using frozen-thawed spermatozoa from epididymis stored at 4°C. *Journal of Reproduction and Development*, **45**, 345-350.
- **KUMI-DIAKA J. et BADTRAM G. (1994)** Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa : in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*, **41**, 1355-1366.
- **KUTZLER M. (2005)** Semen collection in the dog. *Theriogenology*, **64**, 747-754.
- **LEBLANC B. (2004)** *Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA).* Thèse Méd. Vét., Alfort, n°102, 55 p.
- **LINDE-FORSBERG C. (1995)** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, **10**, 48-58.
- **LINDE-FORSBERG C. (2000)** Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in the dog. *In : Proceedings of the 4th International Symposium on Canine and Feline Reproduction.* Oslo. p 120.
- **LINDE-FORSBERG C. (2001)** Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. *In : CONCANNON P., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C. Recent Advances in Small Animal Reproduction.* [en-ligne]. New York : International Veterinary Information Service [www.ivis.org] (consulté le 25 Février 2007).
- **LINDE-FORSBERG C. et FORSBERG M. (1989)** Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, **39** (suppl), 299-310.
- **LINDE-FORSBERG C. et FORSBERG M. (1993)** Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, **47** (suppl), 313-323.
- **LINDE-FORSBERG C., STROM-HOLST B. et GOVETTE G. (1999)** Comparison of fertility data from vaginal versus intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen : a retrospective study. *Theriogenology*, **52**, 11-23.
- **MARTINS-BESSA A., ROCHA A. et MAYENCO-AGUIRRE A. (2006)** Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, **66**, 2047-2055.
- **MAYENCO-AGUIRRE A. et PEREZ CORTES A. (1998)** Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, **50**, 195-204.

- **MIALOT JP. (1984)** *Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques.* Maisons-Alfort : Editions du Point Vétérinaire, 192 p.
- **MOGGIA S. et PERROS D. (1999)** *Contribution à la mise en évidence des altérations de l'acrosome et de la membrane des spermatozoïdes du chien lors de la congélation et de la décongélation.* Thèse Méd. Vét., Alfort, n°55, 131 p.
- **NIZANSKI W., DUBIEL A., BIELAS W. et DEJNEKA G. (2001)** Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 365-369.
- **NOTHLING J. et SHUTTLEWORTH R. (2005)** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, **63**, 1469-1480.
- **NOTHLING J., GERSTENBERG C. et VOLKMANN D. (1997)** Semen quality after thawing : correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, **51** (suppl), 109-116.
- **OKANO T., MURASE T., ASANO M. et TSUBOTA T. (2004)** Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Medical Science*, **66**, 1359-1364.
- **OLAR T., BOWEN R. et PICKETT B. (1989)** Influence of extender, cryopreservative and seminal procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, **31**, 451-461.
- **OTT R., GOFFAUX M. et THIBIER M. (1987)** Examen morphologique des spermatozoïdes. *Elevage et Insem.*, **221**, 15-20.
- **PENA A. (2004)** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, **82-83**, 209-224.
- **PENA A. et LINDE-FORSBERG C. (2000a)** Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, **54**, 859-875.
- **PENA A. et LINDE-FORSBERG C. (2000b)** Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, **54**, 703-718.
- **PENA A., QUINTELA L. et HERRADON P. (1998a)** Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, **50**, 1211-1220.
- **PENA A., BARRIO F., QUINTELA L. et HERRADON P. (1998b)** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, **50**, 163-174.
- **PENA A., JOHANNISSON A. et LINDE-FORSBERG C. (1999)** Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, **52**, 965-980.

- **PENA A., JOHANNISSON A. et 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 371-376.
- **PENA A., LUGILDE L., BARRIO M., HERRADON P. et QUINTELA L. (2003)** Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, **59**, 1725-1739.
- **PINTO C., PACCAMONTI D. et EILTS B. (1999)** Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, **52**, 609-616.
- **PONGLOWHAPAN S., ESSEN-GUSTAVSSON B. et LINDE-FORSBERG C. (2004a)** Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, **62**, 1498-1517.
- **PONGLOWHAPAN S., CHATDARONG K., SIRIVAIDYAPONG S. et LOHACHIT C. (2004b)** Freezing capacity of epididymal dog spermatozoa after cool storage for 2 or 4 days. In : *Proceeding of the 5th international symposium on canine and feline reproduction*, 4-6 Août 2004, 247-249.
- **RIGAU T., FARRE M., BALLESTER J., MOGAS T., PENA A. et RODRIGUEZ-GIL J. (2001)** Effects of glucose and fructose on mobility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, **56**, 801-815.
- **RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., MAES D. et DE KRUIF A. (2002)** Use of the Sperm Quality Analyzer (SQA II-C) for assessment of dog sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**, 158-163.
- **RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., HOFACK G., MAES D. et DE KRUIF A. (2004)** Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, **62**, 1292-1306.
- **RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., TANGHE S., CORYN M., MAES D. et DE KRUIF A. (2005)** New techniques for the assessment of canine semen quality : a review. *Theriogenology*, **64**, 706-719.
- **ROOT KUSTRITZ M., OLSON P., JOHNSTON S. et ROOT T. (1998)** The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **34**, 348-352.
- **ROTA A., STROM B. et LINDE-FORSBERG C. (1995)** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, **44**, 885-900.
- **ROTA A., IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J. et LINDE-FORSBERG C. (1999a)** Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, **51**, 1045-1058.
- **ROTA A., PENA A., LINDE-FORSBERG C. et RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (1999b)** In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*, **57**, 199-215.

- **ROTA A., FRISHLING A., VANNOZI I., CAMILLO F. et ROMAGNOLI S. (2001)** Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 377-381.
- **ROTA A., ROTA A., MARTINI M., MILANI C. et ROMAGNOLI S. (2005)** Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction, Nutrition and Development*, **45**, 29-37.
- **ROTA A., MILANI C., CABIANCA G. et MARTINI M. (2006)** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen preservation. *Theriogenology*, **65**, 1848-1858.
- **SANKAI T., SHIMIZU K., CHO F. et YOSHIKAWA Y. (1997)** In vitro fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Laboratory Animal Science*, **47**, 58-62.
- **SETCHELL B. (1991)** Male reproductive organs and semen. *In* : CUPPS P., editor. *Reproduction in domestic animals*. 4th ed. San Diego : Academic press, 221-245.
- **SILVA A., CARDOSO R. et SILVA L. (2006)** Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**, 74-78.
- **SIRIVAIIDYAPONG S., URSEM P., BEVERS M. et COLENBRANDER B. (2001)** Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 383-386.
- **STIEVENART M. (1997)** *L'électroéjaculation chez les mammifères*, *Revue bibliographique*. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°89, 199 p.
- **STROM B., ROTA A. et LINDE-FORSBERG C. (1997)** In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, **48**, 247-256.
- **STROM-HOLST B., LARSSON B., LINDE-FORSBERG C. et RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2000)** Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, **119**, 201-206.
- **TALON R. (1999)** *Contribution à l'étude de la congélation du sperme de chien : Etude des lésions de l'acrosome et de la membrane du spermatozoïde au cours des différentes étapes de la congélation*. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°75, 94 p.
- **THOMAS P., LARSEN R., BURNS J. et HAHN C. (1993)** A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, **40**, 1199-1205.
- **THOMASSEN R., FARSTAD W., KROGENAES A., FOUIGNER J. et ANDERSEN-BERG K. (2001)** Artificial insemination with frozen semen in dogs : a retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57** (suppl), 341-346.
- **TSUTSUI T., TEZUKA T., MIKASA Y., SUGISAWA H., KIRIHARA N., HORI T. et KAWAKAMI E. (2003)** Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **65**, 307-312.

- **VAISSAIRE JP. (1977)** *Sexualité et Reproduction des Mammifères Domestiques et de Laboratoire*. Paris : Maloine, 457 p.
- **VERSTEGEN J., IGUER-OUADA M., LUZ M. et ONCLIN K. (2002)** Conservation of canine semen motility parameters assessed using the Hamilton-Thorn computer assisted motility analyser and acrosome reaction integrity in semen frozen after up to 3 days conservation at 4°C (chilled). *In : 3^d EVSSAR congress*, Liège, 109-110.
- **VERSTEGEN J., ONCLIN K. et IGUER-OUADA M. (2005)** Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender : in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, **64**, 720-733.
- **VEYER E. (2002)** *Congélation de semence dans l'espèce canine : effet de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation*. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°103, 63p.
- **YILDIZ C., KAYA A., AKSOY M. et TEKELI T. (2000)** Influence of sugar supplementation of the extender on mobility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, **54**, 579-585.

ANNEXES

Annexe 1. Aptitude à la récolte des animaux utilisés pour nos expériences

Nom	Aptitude à la récolte	Expérience
AJAX	+	n°1
ALCAPONE	+	n°2
ALL BLACK	+	n°2
ARKASS	++	n°3
BLITZ	+++	n°3
MATCHO	++	n°2
MOMO	++	n ^{os} 1 et 3
ODIN	++	n°2
OGRE	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
POUF	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
SPOT	-	n°1
SPRAG	+	n ^{os} 1 et 3
SUMO	+	n°2
TEDDY	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
TEUF	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
TEX	+++	n ^{os} 1, 2 et 3
ULAN	+	n°2
WALLACE	+	n°3

Aptitude à la récolte : - récolte difficile, + récolte correcte, ++ récolte facile, +++ récolte très facile

Annexe 2. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°1

Nom	Volume (en mL)	Mobilité (en %)	Quantité totale de spermatozoïdes (en millions)	Analyse morphologique des spermatozoïdes						
				% de normaux	% d'anormaux	% de décapités	% de gouttelette cytoplasmique	% d'anomalie du flagelle	% d'anomalie de la pièce intermédiaire	% d'anomalie de la tête
AJAX	3	80	1 605	72	28	1,5	9,5	12,5	4,5	0
MOMO 1	2	80	1 650	62,5	37,5	1,5	32	3	0	1
MOMO 2	1,5	70	1 102,50	60,5	39,5	1	34,5	2,5	1	0,5
OGRE 1	4	80	1 120	85	15	1,5	4	5	4	0,5
OGRE 2	2	80	1 960	70,5	29,5	3	22,5	3	1	0
POUF 1	2,5	80	962,50	79	21	1	13	2,5	1,5	3
POUF 2	6	70	750	81,5	18,5	0,5	12,5	1,5	4	0
SPOT	4	75	620	59,5	40,5	2	29	4,5	4,5	0,5
SPRAG	1,5	90	532,50	71,5	28,5	2,5	7,5	11,5	6,5	0,5
TEDDY 1	3	80	1 680	84	16	1,5	11	0,5	2,5	0,5
TEDDY 2	2,75	90	2 337,50	88,5	11,5	0,5	1,5	2	7	0,5
TEUF 1	1,75	70	1 408,75	85,5	14,5	1,5	1	11	1	0
TEUF 2	1,5	90	1 012,50	75	25	0,5	5	12,5	6,5	0,5
TEX	1,5	80	652,50	80	20	0,5	13	4	3	1,5
Moyenne	2,64	80	1 242,41	75	24,6	1,4	14,0	5,4	3,4	0,6
Ecart- type	1,30	7	546,21	9,6	9,6	0,8	11,2	4,4	2,3	0,8

Annexe 3. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°2

Nom	Volume (en mL)	Mobilité (en %)	Quantité totale de spermatozoïdes (en millions)	Analyse morphologique des spermatozoïdes						
				% de normaux	% d'anormaux	% de décapités	% de gouttelette cytoplasmique	% d'anomalie du flagelle	% d'anomalie de la pièce intermédiaire	% d'anomalie de la tête
ALCAPONE	3,75	75	1 543	92,5	7,5	2	0,5	5	0	0
ALL BLACK	8,5	85	1 190	85,5	14,5	0,5	5,5	3	4,5	1
MATCHO	6	70	1 140	75,5	24,5	0,5	11,5	10,5	1,5	0,5
ODIN	4,6	90	759	88,5	11,5	1	1	6	3	0,5
OGRE	2,5	90	2 412,5	76	24	1,5	17	2,5	2,5	0,5
POUF	3,5	75	420	69	31	2	27	1,5	0,5	0
SUMO	1,5	80	225	64	36	1	28	3	4	0
TEDDY	3,5	80	2 100	89	11	0,5	4,5	2,5	3	0,5
TEUF	2	85	970	80,5	19,5	0,5	1,5	13,5	3	1
TEX	1,5	90	795	88,5	11,5	2	2	5	2,5	0
ULAN	4,5	85	1 777	82,5	17,5	2	1,5	7,5	4,5	2
Moyenne	3,80	82	1 212	81	19	1,2	9,1	5,5	2,6	0,5
Ecart- type	2,09	7	685,8	9,1	9,1	0,7	10,4	3,7	1,5	0,6

Annexe 4. Intégrité acrosomiale des spermatozoïdes des éjaculats utilisés pour l'expérience n°2

Nom	% d'acrosomes intègres	% d'acrosomes endommagés
ALCAPONE	79	21
ALL BLACK	88	12
MATCHO	85	15
ODIN	87	13
OGRE	88	12
POUF	78	22
SUMO	84	16
TEDDY	77	23
TEUF	85	15
TEX	90	10
ULAN	78	22
Moyenne	84	16
Ecart-type	5	5

Annexe 5. Caractéristiques des éjaculats utilisés pour l'expérience n°3

Nom	Volume (en mL)	Mobilité (en %)	Quantité totale de spermatozoïdes (en millions)	Analyse morphologique des spermatozoïdes						
				% de normaux	% d'anormaux	% de décapités	% de gouttelette cytoplasmique	% d'anomalie du flagelle	% d'anomalie de la pièce intermédiaire	% d'anomalie de la tête
ARKASS	2,7	90	1 471	85,5	14,5	1	5,5	6	0,5	1,5
BLITZ	1,75	95	621,25	89	11	0	7	2,5	1,5	0
MOMO	3	85	2 025	64	36	0	24	10	2	0
OGRE	2	90	1 140	74	26	0	16	9	0	0
POUF	5	90	625	63,5	36,5	0	32	1,0	3,5	0
SPRAG	1,75	70	385	77	23	1,5	4	14	3	0,5
TEDDY	3,75	90	1 518,75	82	18	2	2,5	4	9	0,5
TEUF	2,3	85	966	88	12	0	1	7	2,5	1,5
TEX	6,5	85	1 332,50	81,5	18,5	1	6,5	1,5	8,5	1
WALLACE	2,6	90	637	92,5	7,5	2	4,5	1	0	0
Moyenne	3,18	87	1 027,83	79,1	20,9	0,7	10,8	5,6	3,3	0,4
Ecart- type	1,63	7	528,93	10,4	10,4	0,9	10,8	4,7	3,3	0,5

Annexe 6. Intégrité acrosomiale des spermatozoïdes des éjaculats utilisés pour l'expérience n°3

Nom	% d'acrosomes normaux	% d'acrosomes endommagés
ARKASS	87	13
BLITZ	82	18
MOMO	62	38
OGRE	90	10
POUF	94	6
SPRAG	83	17
TEDDY	80	20
TEUF	89	11
TEX	82	18
WALLACE	92	8
Moyenne	84	16
Ecart-type	10	10

CONGELATION DE LA SEMENCE DE CHIEN PREALABLEMENT REFRIGEREE : ETUDE EXPERIMENTALE

NOM : FUERTES

Prénom : Paméla

Résumé :

Dans le but de développer et de vulgariser la congélation de la semence canine, nous avons étudié une technique de congélation de semence de chien préalablement réfrigérée.

Nous avons comparé les effets de cette technique à ceux d'une technique de congélation usuelle, dans des conditions expérimentales standardisées (réfrigération à 4°C pendant 24 heures) et réelles (transport de la semence réfrigérée avant congélation), en analysant la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après décongélation.

Dans des conditions expérimentales, nous avons montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux techniques ; mais, dans des conditions réelles, il existe une diminution significative de 9 % de la mobilité et de 7 % de l'intégrité acrosomiale.

Nous pouvons donc conclure que la congélation de semence canine préalablement réfrigérée semble performante, mais des études complémentaires seraient nécessaires avant de pouvoir utiliser cette nouvelle technique.

Mots clés : SEMENCE, REFRIGERATION, CONGELATION, TECHNIQUE DE CONGELATION, CARNIVORES, CHIEN

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Alain FONTBONNE

Assesseur : Dr. Pascal ARNE

Adresse de l'auteur :

Melle Paméla FUERTES

14 rue André Bollier

94100 Saint-Maur-des-Fossés

FREEZING OF CHILLED DOG SEMEN : EXPERIMENTAL STUDY

SURNAME : FUERTES

Given name : Paméla

Summary :

With intent to develop and popularize freezing of dog semen, we investigated a technique of freezing of chilled dog semen.

We compared the effects of this technique to those of an usual freezing technique, in standardized experimental conditions (chilling at 4°C during 24 hours) and real conditions (shipment of chilled semen before freezing), analysing mobility and acrosome integrity of spermatozoa after thawing.

In experimental conditions, we demonstrated that there is no significant difference between the two techniques ; but, in real conditions, there is a significant decrease of 9 % of the mobility and of 7 % of the acrosome integrity.

Therefore, we can conclude that freezing of chilled dog semen seems performant, but complementary studies will be necessary before being able to use this new technique.

Keywords : SEMEN, CHILLING, FREEZING, FREEZING METHOD, CARNIVORES, DOG

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Alain FONTBONNE

Assessor : Dr. Pascal ARNE

Author's address :

Melle Paméla FUERTES

14 rue André Bollier

94100 Saint-Maur-des-Fossés