



HAL
open science

Etude comparative de neuf milieux de réfrigération de la semence canine à + 4°C : tests de mobilité

Emmanuel Monzinger

► **To cite this version:**

Emmanuel Monzinger. Etude comparative de neuf milieux de réfrigération de la semence canine à + 4°C : tests de mobilité. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04770975

HAL Id: dumas-04770975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04770975v1>

Submitted on 7 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2024 - Thèse n° 54

**ETUDE COMPARATIVE DE NEUF MILIEUX DE
RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE À + 4°C :
TESTS DE MOBILITÉ**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 18 septembre 2024

par

Emmanuel MONZINGER

Sous la direction de

Djémil BENCHARIF

Président du jury : **Monsieur Thomas FRÉOUR**, Directeur du service d'aide médicale à la procréation
du CHU de Nantes

Membres du jury : **Monsieur Djémil BENCHARIF**, Professeur à ONIRIS VetAgroBio

Monsieur Jean-Claude DESFONTIS, Professeur à ONIRIS VetAgroBio

ANNEE 2024 - Thèse n° 54

**ETUDE COMPARATIVE DE NEUF MILIEUX DE
RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE À + 4°C :
TESTS DE MOBILITÉ**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 18 septembre 2024

par

Emmanuel MONZINGER

Sous la direction de

Djémil BENCHARIF

Président du jury : **Monsieur Thomas FRÉOUR**, Directeur du service d'aide médicale à la procréation
du CHU de Nantes

Membres du jury : **Monsieur Djémil BENCHARIF**, Professeur à ONIRIS VetAgroBio

Monsieur Jean-Claude DESFONTIS, Professeur à ONIRIS VetAgroBio

Département **BPSA** Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN

Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)

Département **SAESP** Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER

Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ 5(Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques

Responsable : **Catherine IBISCH** – Adjoint : **Marion FUSELLIER**

Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC Stagiaire)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)

Département GPA Génie des procédés alimentaires

Responsable : **Sébastien CURET-PLOQUIN** – Adjointe : **Vanessa JURY**

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	

Département MSC Management, statistiques et communication

Responsable : **Samira ROUSSELIERE** – Adjointe : **Véronique CARIOU**

Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit :

- **Nom et prénoms de l'auteur : Emmanuel MONZINGER**
- **Année de soutenance : 2024**
- **Titre de la thèse : Étude comparative de neuf milieux de réfrigération de la semence canine à + 4°C : Tests de mobilité**
- **Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire**
- **Université de soutenance : Faculté de médecine de Nantes**
- **École de soutenance : Oniris VetAgroBio : École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation – Nantes Atlantique**
- **Nombre de pages : 300 p.**

Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et possible de sanction allant jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000 euros d'amende.

REMERCIEMENTS

À Monsieur Thomas FRÉOUR, Directeur du service d'aide médicale à la procréation du CHU de Nantes et Président du Jury

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Votre expertise reconnue dans le domaine de la reproduction ainsi que votre rigueur scientifique sont des atouts essentiels à l'évaluation de ce travail.

À Monsieur Djémil BENCHARIF, Professeur à ONIRIS VetAgroBio et Maître de Thèse

Mes remerciements les plus sincères vous sont adressés pour avoir accepté de m'encadrer pour cette thèse.

Je suis infiniment reconnaissant pour le temps que vous m'avez consacré. Vos conseils avisés m'ont permis d'approfondir mes réflexions et ont été des moteurs essentiels à la réalisation de ce travail.

À Monsieur Jean-Claude DESFONTIS, Professeur à ONIRIS VetAgroBio et Assesseur

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant qu'assesseur.

À l'entreprise HuVeSearch

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers l'entreprise HuVeSearch pour m'avoir fourni les milieux de réfrigération essentiels à la réalisation de ce travail de recherche.

À Jean-Michel GALHARRET, statisticien

Je vous adresse mes remerciements les plus profonds pour votre aide dans la réalisation de l'analyse statistique qui a grandement enrichi mon travail.

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES ANNEXES	15
TABLE DES FIGURES	17
TABLE DES TABLEAUX.....	23
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	27
INTRODUCTION	31
PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANATOMIE ET DE LA PHYSIOLOGIE DU CHIEN MÂLE	35
1) ANATOMIE DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE.....	37
a) Les testicules.....	37
i) Organisation générale	37
ii) La vascularisation et l'innervation	39
b) L'épididyme	39
c) Le cordon spermatique	39
d) Glande accessoire : la prostate.....	40
e) L'urètre.....	41
f) Le pénis.....	41
i) Organisation générale	41
ii) La musculature du pénis	42
iii) La vascularisation et l'innervation	42
2) PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GÉNITAL MALE	44
a) Le développement	44
b) La régulation hormonale	44
i) Les hormones mises en jeu	44
ii) La régulation hormonale.....	45
c) Rôles de l'épididyme	47
i) Organisation fonctionnelle	47
ii) Le transport.....	47
iii) Le stockage.....	47
iv) Élimination des cellules défectueuses.....	47
v) La protection	47
vi) Rôle antioxydant	47
vii) Rôle de sécrétion et de réabsorption des liquides luminaux	48
viii) Rôle dans la maturation	48
d) L'érection et l'éjaculation.....	48
i) L'érection	48
ii) L'éjaculation	49

1) ÉTUDE DE LA SEMENCE CANINE	55
a) Les différentes fractions de la semence canine	55
i) Fraction pré-spermatique	55
ii) Fraction spermatique	55
iii) Fraction prostatique	56
b) Composition de la semence canine	56
i) Le liquide prostatique	56
(1) Définitions	56
(2) Les constituants et leurs rôles	56
(a) Glucides	56
(b) Agents antibactériens	56
(c) Ions	56
(d) Protéines	57
(e) Acides gras	57
(f) Enzymes	57
(g) Antioxydants	57
(h) Prostasomes	57
(i) Cellules	58
(j) Autres	58
ii) Le spermatozoïde et son ultrastructure	59
(1) Généralités	59
(2) La membrane plasmique	59
(3) La tête	60
(4) La pièce connective et la pièce intermédiaire	60
(5) Le flagelle	60
c) Le fonctionnement du spermatozoïde	62
i) Le métabolisme	62
ii) Le mouvement flagellaire	64
d) La spermatogénèse	64
i) Définitions	64
ii) Considérations histologiques	65
iii) Déroulement de la spermatogénèse	66
(1) La spermatogénèse	66
(2) La spermiogénèse et la spermiation	67
e) La maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles	68
i) Généralités	68
ii) Maturation membranaire	68
iii) Modifications morphologiques	70
iv) Modification de mobilité	70
v) Acquisition de la capacité fécondante	70
f) Le transport dans les voies génitales mâles	70
g) La maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle	71
i) La capacitation	71
ii) L'hyperactivation de la mobilité	71
iii) La réaction acrosomique	72

2) LE RECUEIL DE LA SEMENCE CANINE	74
a) Les conditions	74
i) Conditions animales	74
ii) Conditions matérielles	74
iii) Conditions humaines	75
iv) Conditions environnementales	75
b) Méthode de prélèvement	76
i) Généralités	76
ii) Méthode de récolte	76
3) ÉVALUATION DE LA SEMENCE CANINE.....	79
a) Généralités sur l'examen de la semence canine.....	79
b) Examen macroscopique	79
i) Le volume.....	79
ii) L'aspect et la couleur	79
iii) Le pH	80
c) Examen microscopique	80
i) Numération de la semence	80
(1) Définitions.....	80
(2) Microscope optique : comptage manuel.....	80
(3) Systèmes informatisés.....	81
ii) Mobilité de la semence	83
(1) Définitions et principes.....	83
(2) Microscope optique : évaluation manuelle	83
(3) Systèmes informatisés.....	84
iii) Morphologie des spermatozoïdes.....	89
(1) Généralités et définitions	89
(2) Microscope optique.....	90
(3) Systèmes informatisés.....	92
iv) Évaluation des autres types cellulaires.....	93
v) Évaluation de la vitalité.....	93
(1) Intégrité de l'acrosome.....	93
(2) Intégrité membranaire	94
(3) Intégrité de l'ADN.....	96
4) LA RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE	99
a) Historique de la réfrigération de la semence canine	99
b) Principes de la réfrigération	99
c) Indications de la réfrigération	101
d) Avantages de la réfrigération	102
e) Effets de la réfrigération sur la semence canine	102
i) Généralités	102
ii) La mobilité.....	103
iii) La membrane plasmique	103
iv) L'acrosome	104
v) L'ADN	105
f) Les milieux de réfrigération de semence	106
i) Définitions et principes des milieux de réfrigération	106
ii) Les composants	106
(1) Les antimicrobiens.....	106

(2) Les agents stabilisateurs des facteurs physico-chimiques.....	107
(3) Les substrats énergétiques	107
(4) Les activateurs de mobilité	108
(5) Les antioxydants.....	109
(6) Les cryoprotecteurs	110
(a) Généralités	110
(b) Le jaune d'œuf.....	110
(c) Intérêt du LDL	112
(d) Le lait écrémé	114
(e) Autres cryoprotecteurs d'intérêt	116
(i) Les liposomes	116
(ii) Les acides aminés	117
(iii) La Lécithine de soja	117
(7) La Rosiglitazone.....	118
(a) Définitions.....	118
(b) Modes d'actions	119
(c) Effets sur les spermatozoïdes.....	120
iii) Avantages et inconvénients des dilueurs	123
g) Technique de réfrigération.....	124
i) La centrifugation	124
ii) La dilution	125
iii) La réfrigération à + 4°C	126
iv) Le conditionnement et l'expédition	127
PARTIE 3 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	131
1) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	133
2) MATÉRIEL ET MÉTHODE	134
a) Animaux.....	134
b) Critères d'inclusions et d'exclusions.....	134
c) Milieux à tester	135
i) Milieu témoin : Milieu à base de jaune d'œuf (JO)	135
(1) Composition	135
(2) Préparation.....	135
ii) Milieu jaune d'œuf supplémenté en Rosiglitazone (JO+R)	136
iii) Les autres milieux	136
d) Méthode de récolte des échantillons de sperme.....	137
e) Évaluation initiale de la semence.....	138
f) Dilution de la semence et réfrigération.....	139
g) Évaluation de la mobilité et des paramètres cinétiques	139
h) Analyse descriptive et statistique	140
3) RÉSULTATS.....	143
a) La mobilité totale	145
b) La mobilité progressive.....	154
c) La vitesse progressive moyenne (VAP).....	161
d) La vitesse en ligne droite (VSL).....	168
e) La vitesse curviligne (VCL).....	175

f)	L'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH)	182
g)	La fréquence de battement croisé (BCF)	188
h)	La linéarité (LIN)	195
i)	La rectitude (STR)	202
j)	L'Élongation.....	209
4)	DISCUSSION	213
a)	Discussion générale	213
i)	Protocole	213
(1)	Animaux	213
(2)	Dilution et réfrigération	214
(3)	Déroulement de l'analyse et procédure CASA	214
b)	Les paramètres de mobilité	217
i)	La mobilité totale.....	217
ii)	Comparaisons en regard des autres paramètres de mobilité	221
(1)	Le JO et le JO+R.....	221
(2)	Le MASTERBREEDER®.....	223
(3)	Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R	225
(4)	Le CANI EX ST®	227
(5)	Le BOTUDOG®	228
(6)	Le CHILL LT® et le CHILL ST®	228
c)	Les autres limites de cette étude	230
d)	Portée et perspectives de l'étude	231
	CONCLUSION.....	235
	BIBLIOGRAPHIE	239
	ANNEXES.....	262

TABLE DES ANNEXES

<i>Annexe 1 : Données brutes issues de l'analyse CASA</i>	<i>262</i>
<i>Annexe 2 : Vérification de la normalité des résidus de la mobilité totale</i>	<i>289</i>
<i>Annexe 3 : Vérification de la normalité des résidus de la mobilité progressive</i>	<i>290</i>
<i>Annexe 4 : Vérification de la normalité des résidus de la VAP</i>	<i>290</i>
<i>Annexe 5 : Vérification de la normalité des résidus de la VSL</i>	<i>291</i>
<i>Annexe 6 : Vérification de la normalité des résidus de la VCL</i>	<i>291</i>
<i>Annexe 7 : Vérification de la normalité des résidus de l'ALH</i>	<i>292</i>
<i>Annexe 8 : Vérification de la normalité des résidus de la BCF</i>	<i>292</i>
<i>Annexe 9 : Vérification de la normalité des résidus de la LIN</i>	<i>293</i>
<i>Annexe 10 : Vérification de la normalité des résidus de la STR</i>	<i>293</i>
<i>Annexe 11 : Vérification de la normalité des résidus de l'ÉLONGATION</i>	<i>294</i>
<i>Annexe 12 : Résumé de l'étude présentée au 25^{ème} congrès international de reproduction EVSSAR - Barcelone du 27 au 29 Juin 2024</i>	<i>295</i>

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation générale de l'appareil reproducteur du chien mâle (König et Liebich, 2020)</i>	<i>38</i>
<i>Figure 2 : Organisation interne du testicule en coupe longitudinale (Schatten et Constantinescu, 2007).....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 3 : Représentation d'un testicule de chien. A : testicule droit, vue latérale. B : testicule gauche, vue médiale (König et Liebich, 2020).....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 4 : Représentation schématique de la glande accessoire du chien mâle (König et Liebich, 2020).....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique du pénis du chien mâle (Johnston et al., 2001)</i>	<i>42</i>
<i>Figure 6 : Représentation schématique du pénis de chien mâle en section transversale (König et Liebich, 2020).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 7 : La régulation hormonale du système reproducteur du chien mâle (Cunningham et Klein, 2013)</i>	<i>46</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique des changements morphologiques du pénis de chien pendant l'érection (Linde-Forsberg, 2001).....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 9 : Les 3 phases de la récolte du sperme canin (source internet).....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 10 : Ultrastructure du spermatozoïde canin (Noakes et al., 2019)</i>	<i>61</i>
<i>Figure 11 : Représentation schématique du métabolisme des spermatozoïdes non capacités et capacités (Santoro et al., 2020)</i>	<i>63</i>
<i>Figure 12 : Mécanisme du glissement microtubulaire (Lisboa et al., 2021).....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 13 : Histologie du testicule (Noakes et al., 2019).....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 14 : Représentation schématique de l'histologie des tubes séminifères canins (Johnston et al., 2001).....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 15 : Formation des spermatozoïdes dans les cryptes des cellules de Sertoli (Noakes et al., 2019).....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 16 : Modèle d'interaction entre les épидидymosomes et les spermatozoïdes en cours de maturation épидидymaire (O'Flaherty, 2019).....</i>	<i>69</i>

<i>Figure 17 : Mode d'action suggéré des prostasomes et des épидидyosomes dans le tractus génital mâle et femelle (Aalberts et al., 2014).....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 18 : Mécanisme de la mise en place de l'hyperactivation de la mobilité (Lisboa et al., 2021).....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 19 : Représentation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes canins (Source : Internet – vetopsy.fr)</i>	<i>73</i>
<i>Figure 20 : Résumé des changements opérés lors de la maturation dans les voies génitales du mâle et de la femelle (Leahy et Gadella, 2011).....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 21 : Recours à une femelle pour stimuler le mâle (Greer, 2015).....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 22 : Manchon plastique dédié au prélèvement de la semence canine (Greer, 2015)...</i>	<i>75</i>
<i>Figure 23 : Récolte de semence dans un environnement idéal (Greer, 2015).....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 24 : Recueil manuel de semence chez un chien mâle (Noakes et al., 2019).....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 25 : Lames hématocytométriques utilisées pour le comptage cellulaire (Brito et al., 2016)</i>	<i>81</i>
<i>Figure 26 : Principe de fonctionnement de la spectrophotométrie (Brito et al., 2016).....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 27 : Représentation schématique de différentes vitesses analysées par système CASA (Verstegen et al., 2002).....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 28 : Système CASA Hamilton-Thorne IVOS (Source : Service de reproduction, OnirisVetAgroBio Nantes)</i>	<i>88</i>
<i>Figure 29 : Interface d'un analyseur de semence assisté par ordinateur (CASA) (Brito et al., 2016).....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 30 : Classification des anomalies morphologiques majeures et mineures (Noakes et al., 2019).....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 31 : Coloration au Spermac révélant les aberrations morphologiques des spermatozoïdes (Bencharif et al., 2012)</i>	<i>91</i>
<i>Figure 32 : Exemple d'une coloration au SpermBlue (Surmacz et al., 2022).....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 33 : Évaluation de l'intégrité acrosomale par le test aux lectines (Silva et Gadella, 2006)</i>	<i>94</i>

<i>Figure 34 : Illustration du comportement des spermatozoïdes normaux au cours du test de gonflement hypo-osmotique (HOST) (Source : internet).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 35 : Images microscopiques d'enroulement flagellaire au cours du HOST (Karger et al., 2014).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 36 : Évaluation de l'intégrité membranaire par microscopie à épifluorescence (Silva et Gadella, 2006).....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 37 : Effets de la réfrigération à + 4°C sur la préservation de la mobilité progressive d'échantillons de semence canine mélangés entre eux ou non (Batista et al., 2012).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 38 : Illustration du changement de phase membranaire des spermatozoïdes se produisant au cours de l'exposition au froid (Sieme et al., 2015).....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 39 : Résumé des effets du froid sur les spermatozoïdes (Leahy et Gadella, 2011).....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 40 : Représentation schématique structurelle des LDL (Source : internet).....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 41 : Mécanisme de protection médié par les LDL ou les facteurs présents dans le lait par fixation des protéines BSP (Bergeron et Manjunath, 2006).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 42 : Représentation schématique de la structure d'un liposome (Source : internet) .</i>	<i>116</i>
<i>Figure 43 : Formule chimique structurale de la glutamine (Source : wikipédia).....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 44 : Formule chimique structurale de l'énantiomère R de la rosiglitazone (Source : Wikipédia).....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 45 : Rôles et mécanismes d'action du PPARγ dans le sperme éjaculé (Santoro et al., 2020).....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 46 : Système Equitainer (Peña et al., 2006)</i>	<i>127</i>
<i>Figure 47 : Méthode de conditionnement réfrigéré (Greer, 2015).....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 48 : Boîte Minitube néopor pour le transport réfrigéré de la semence canine (Rijsselaere et al., 2011).....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 49 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Réalisation personnelle).....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 50 : Évolution des pourcentages moyens de mobilité pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>145</i>
<i>Figure 51 : Évolution du nombre d'échantillons dont la mobilité est supérieure à 30 % pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>147</i>

<i>Figure 52 : Évolution des pourcentages moyens de mobilité progressive pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>154</i>
<i>Figure 53 : Évolution moyenne des vitesses moyennes (VAP en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>161</i>
<i>Figure 54 : Évolution moyenne de la vitesse en ligne droite (VSL en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>168</i>
<i>Figure 55 : Évolution moyenne de la vitesse curviligne (VCL en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>175</i>
<i>Figure 56 : Évolution moyenne de l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH en μm) pour chaque milieu en fonction du temps.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure 57 : Évolution moyenne de la fréquence de battement croisé (BCF en Hz) pour chaque milieu en fonction du temps.....</i>	<i>188</i>
<i>Figure 58 : Évolution moyenne des pourcentages de linéarité (LIN) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>195</i>
<i>Figure 59 : Évolution moyenne de la rectitude (STR) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>202</i>
<i>Figure 60 : Évolution moyenne de l'élongation (ÉLONGATION) pour chaque milieu en fonction du temps</i>	<i>209</i>

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Résumé des principales caractéristiques de la semence canine fraîche et selon la fraction considérée (Nouri Gharajelar et al., 2016 ; Michael et al., 2009 ; Goericke-Pesch et al., 2011 ; Bartlett, 1962).....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau II : Paramètres de mobilité de la semence canine d'après une étude sur 42 chiens beagles mâles (Iguer-Ouada et Verstegen, 2001).....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau III : Désignation des chiens mâles reproducteurs récoltés.....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau IV : Composition du milieu témoin à base de jaune d'œuf à 20 %</i>	<i>135</i>
<i>Tableau V : Dénominations et principales caractéristiques des dilueurs utilisés dans cette étude</i>	<i>136</i>
<i>Tableau VI : Table d'évaluation de la mobilité massale, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (Martinot, 2016)</i>	<i>138</i>
<i>Tableau VII: Pourcentages moyens de mobilité (%) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures et nombre d'échantillons (N) par milieu et par temps dont la mobilité reste supérieure à 30 %.....</i>	<i>146</i>
<i>Tableau VIII : Évolution de la mobilité totale au cours du temps jusqu'à T96H</i>	<i>151</i>
<i>Tableau IX : Évolution de la mobilité entre les différents milieux</i>	<i>152</i>
<i>Tableau X : Pourcentages moyens des mobilités progressives mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>155</i>
<i>Tableau XI : Résultats des tests de Tukey entre les moyennes des pourcentages de mobilité progressive des différents milieux de T0H à T96H</i>	<i>158</i>
<i>Tableau XII : Moyennes des vitesses moyennes (VAP en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>162</i>
<i>Tableau XIII : des tests de Tukey entre les moyennes des vitesses moyennes (VAP) des différents milieux de T0H à T96H</i>	<i>165</i>
<i>Tableau XIV : Moyennes des vitesses en ligne droite (VSL en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>169</i>
<i>Tableau XV : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des vitesses moyennes (VSL) des différents milieux de T0H à T96H.....</i>	<i>172</i>

<i>Tableau XVI : Moyennes des vitesses curvilignes (VCL en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>176</i>
<i>Tableau XVII : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des vitesses curvilignes (VCL) des différents milieux de T0H à T96H</i>	<i>179</i>
<i>Tableau XVIII : Pourcentages moyens de l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH en μm) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures.....</i>	<i>183</i>
<i>Tableau XIX : Évolution de l'ALH au cours du temps jusqu'à T96H</i>	<i>186</i>
<i>Tableau XX : Évolution de l'ALH entre les différents milieux.....</i>	<i>186</i>
<i>Tableau XXI : Pourcentages moyens de la fréquence de battement croisé (BCF en Hz) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>189</i>
<i>Tableau XXII : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des fréquences de battements croisés (BCF) des différents milieux de T0H à T96H.....</i>	<i>192</i>
<i>Tableau XXIII : Pourcentages moyens de linéarité (LIN) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>196</i>
<i>Tableau XXIV : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des pourcentages de linéarité (LIN) des différents milieux de T0H à T96H</i>	<i>199</i>
<i>Tableau XXV : Pourcentages moyens de rectitude (STR) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>203</i>
<i>Tableau XXVI : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des pourcentages de rectitude (STR) des différents milieux de T0H à T96H</i>	<i>206</i>
<i>Tableau XXVII : Pourcentages moyens d'élongation mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures</i>	<i>210</i>
<i>Tableau XXVIII : Évolution de l'élongation au cours du temps jusqu'à T96H</i>	<i>212</i>

TABLE DES ABRÉVIATIONS

[N.D.] : *NON DISPONIBLE*

ACETYL-COA : *ACETYL-COENZYME A*

ADP : *ADENOSINE DIPHOSPHATE*

AGPI : *ACIDES GRAS POLY-INSATURES*

AGS : *ACIDES GRAS SATURES*

AKT : *PROTEINE KINASE B*

ALH : *AMPLITUDE DE DEPLACEMENT LATERAL DE LA TETE*

AMPC : *ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE*

AMPK : *PROTEINE KINASE*

ATP : *ADENOSINE TRIPHOSPHATE*

BCF : *FREQUENCE DE BATTEMENT CROISE*

BOTUDOG® : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION BOTUDOG*

BSP : *BINDER OF SPERM PROTEIN*

CANI EX LT® : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION CANI EX LT*

CANI EX LT® + R : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION CANI EX LT SUPPLEMENTE EN ROSIGLITAZONE*

CANI EX ST® : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION CANI EX ST*

CASA : *ANALYSE DU SPERME ASSISTEE PAR ORDINATEUR*

CASMA : *ANALYSE MORPHOLOGIQUE ASSISTEE PAR ORDINATEUR*

CHILL LT® : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION CANIPLUS CHILL LT*

CHILL ST® : *MILIEU DE RÉFRIGÉRATION CANIPLUS CHILL ST*

CHPPiL4R : *VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE CARRE, L'HEPATITE DE RUBARTH, LA PARVOVIROSE, LE PARAINFLUENZA, LA LEPTOSPIROSE ET LA RAGE*

COMET : *TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE*

CPSE : *ARGININE ESTERASE CANINE SPÉCIFIQUE DE LA PROSTATE*

DHT : *DIHYDROTESTOSTERONE*

DMSO : *DIMÉTHYLSULFOXYDE*

DUTP : *DESOXYURIDINE TRIPHOSPHATE*

FCI : *FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE*

FITC : *ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE*

FSH : *HORMONE DE STIMULATION FOLLICULAIRE*

GLUT : *TRANSPORTEUR PROTEIQUE MEMBRANAIRE DE GLUCOSE*

GNRH : *HORMONE DE LIBERATION DES GONADOTROPHINES HYPOPHYSIAIRES*

GPX : *GLUTATHION-PEROXYDASE*

GSH : *GLUTATHION*

HCG : *GONADOTROPHINE CHORIONIQUE HUMAINE*

HDL : LIPOPROTEINES DE HAUTE DENSITE
HE : HOMODIMERE D'ETHIDIUM
HOST : TEST DE GONFLEMENT HYPO-OSMOTIQUE
IGF-1 : INSULIN GROWTH FACTOR - 1
IP : IODURE DE PROPIDIUM
JO : MILIEU JAUNE D'ŒUF
JO+R : MILIEU JAUNE D'ŒUF SUPPLEMENTE EN ROSIGLITAZONE
LDL : LIPOPROTEINE DE BASSE DENSITE
LH : HORMONE LUTEINISANTE
LIN : LINEARITE
MASTERBREEDER® : MILIEU DE RÉFRIGÉRATION MASTERBREEDER
NAC : N-ACETYLCYSTEINE
NADH : NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE REDUIT
NADPH : NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE
PAL : PHOSPHATASE ALCALINE
PGJ2 : 15-DESOXY-Δ-12,14-PROSTAGLANDINE
PKA : PROTEINE KINASE A
PNA : LECTINE D'ARACHIDE
PPARX : PEROXISOMAL PROLIFERATOR ACTIVATED GAMMA
PSA : AGGLUTININE PISUM SATIVUM
ROS : ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE
SCSA : SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY
SGLT : COTRANSPORTEURS SODIUM/GLUCOSE
SOD : SUPEROXYDE DISMUTASE
STR : RECTITUDE
SYBR-14 : SONDE FLUORESCENTE
T3 : HORMONE THYROÏDIENNE
TRIS : TRIS(HYDROXYMETHYL)AMINOMETHANE
TUNEL : TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE DUTP NICK END LABELING
VAP : VITESSE MOYENNE
VCL : VITESSE CURVILIGNE
VSL : VITESSE EN LIGNE DROITE
ZP2 ET ZP3 : RECEPTEURS SPERMATIQUES OVOCYTAIRES

INTRODUCTION

Les biotechnologies de la reproduction suscitent un intérêt toujours plus croissant pour parfaire l'amélioration génétique des races canines. Nombre d'entre-elles s'appuient sur la procédure de réfrigération de la semence qui permet d'étendre sa viabilité et de l'expédier dans le but d'inséminer une ou plusieurs femelles qui sont géographiquement distantes du mâle.

Une fois expédié, le sperme canin, faisant preuve d'une résistance notable face au choc dû au froid, est en général déposé dans les voies génitales de la femelle dans les 48 heures après le prélèvement. Le maintien de sa qualité représente donc un enjeu majeur. Toutefois, le refroidissement n'est pas anodin et demeure dommageable pour les spermatozoïdes, une réduction de fertilité pouvant en être la conséquence à court terme.

Leur protection face au froid s'est donc très vite avérée essentielle. Des milieux de dilution composés de divers agents, dont des cryoprotecteurs comme le jaune d'œuf, permettent d'accroître leur durée de conservation et de limiter les répercussions du froid. Néanmoins, le contrôle de leur composition et de leur qualité sanitaire s'est révélé délicat. La détection des milieux les plus performants est donc fondamentale pour favoriser au mieux l'échange de matériel génétique à travers le monde.

De plus, l'évaluation de diverses molécules et l'élaboration de nouveaux milieux deviennent incontournables. La rosiglitazone, une thiazolidinedione utilisée en thérapeutique antidiabétique chez l'homme, en est la parfaite illustration. D'après plusieurs études, il semblerait qu'elle améliore la mobilité des spermatozoïdes préservés par le froid, notamment chez le bélier, l'étalon, le verrat et l'homme. Elle pourrait ainsi, un jour, entrer dans la composition des milieux de conservation de sperme canin. Aucune étude n'ayant pour l'heure été réalisée sur la semence canine réfrigérée, son évaluation préliminaire en tant qu'agent rentrant dans la composition des dilueurs permettant le maintien et la survie des spermatozoïdes à + 4°C chez le chien apparaît tout indiquée.

Le but de cette étude est de comparer l'efficacité de différents milieux commerciaux ou non sur la conservation de la semence canine réfrigérée à + 4°C. Les deux premières parties de cette étude se voudront purement bibliographique. La première s'attachera dans un premier temps à décrire l'anatomie et la physiologie du chien mâle ainsi que les caractéristiques physico-chimiques et structurelles du plasma séminal et des spermatozoïdes. La seconde partie

abordera les méthodes de récolte ainsi que les différentes modalités d'évaluation qualitatives des spermatozoïdes. Pour finir, les modalités de la réfrigération et l'intérêt des milieux seront exposés.

La troisième partie de cette étude sera expérimentale. Elle consistera à évaluer neuf milieux de dilution différents qui seront confrontés à l'aide d'une analyse de mobilité des spermatozoïdes et des paramètres cinétiques associés, en prêtant une attention particulière aux milieux supplémentés en rosiglitazone.

PARTIE 1 :

**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE
L'ANATOMIE ET DE LA PHYSIOLOGIE
DU CHIEN MÂLE**

Les organes génitaux du chien mâle sont constitués par un ensemble de structures permettant la production des spermatozoïdes, leur stockage et leur dépôt dans les voies génitales de la femelle (Noakes *et al.*, 2019).

1) ANATOMIE DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE

a) Les testicules

i) Organisation générale

Les testicules du chien pèsent entre 7 à 20 grammes selon la race, tandis que leur taille varie de 3 à 4 cm. Ils sont pairs, et composés de trois éléments fonctionnels. Le premier constitue l'espace interstitiel comptant les vaisseaux sanguins, l'innervation, les vaisseaux lymphatiques, les cellules de Leydig ainsi que le tissu de soutien conjonctif tandis que la seconde partie, basale, est composée des cellules de Sertoli et est localisée dans la paroi des tubes séminifères. Enfin, est retrouvé l'espace adluminal comprenant les spermatozoïdes séparés du reste du testicule par la barrière hémato-testiculaire (König et Liebich, 2020 ; Johnston *et al.*, 2001).

Ils sont situés en région inguinale enfermés dans le scrotum, fine couche de peau peu poilue faite de glandes sébacées et sudoripares en abondance ainsi que d'une microvascularisation garante des phénomènes de convection, de conduction et d'évaporation (König et Liebich, 2020 ; Johnston *et al.*, 2001). Cette thermorégulation favorise la déperdition de chaleur et le maintien d'une température inférieure à celle de l'organisme (Cunningham et Klein, 2013).

Les testicules sont enveloppés de différentes couches fibreuses et sereuses. Superficiellement, se trouve le dartos, fascia constitué de fibres musculaires lisses, de collagène et de fibres élastiques. La couche sous-jacente est représentée par le muscle crémaster qui permet en association avec le dartos de modifier la position du testicule dans le scrotum concourant ainsi également à la régulation thermique. Plus en profondeur se situe la tunique vaginale composée des deux feuillets du péritoine qui délimitent la cavité vaginale (Johnston *et al.*, 2001). La tunique albuginée, couche la plus profonde, constitue une capsule de fibres denses et de tissus musculaires lisses (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019).

Le parenchyme est organisé en lobules compartimentés qui sont constitués de deux à cinq tubes séminifères d'abord droits puis progressivement contournés qui débouchent sur le rete testis. Ce dernier assure le transit des spermatozoïdes jusqu'aux canaux efférents d'où ils

circulent jusqu'à la tête de l'épididyme (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001).

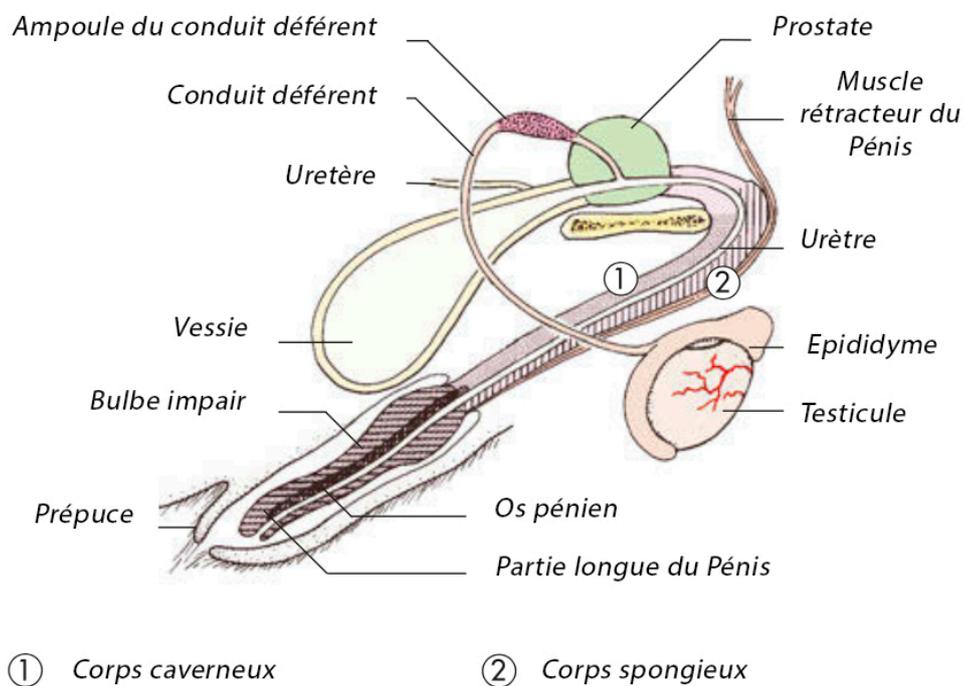


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation générale de l'appareil reproducteur du chien mâle (König et Liebich, 2020)

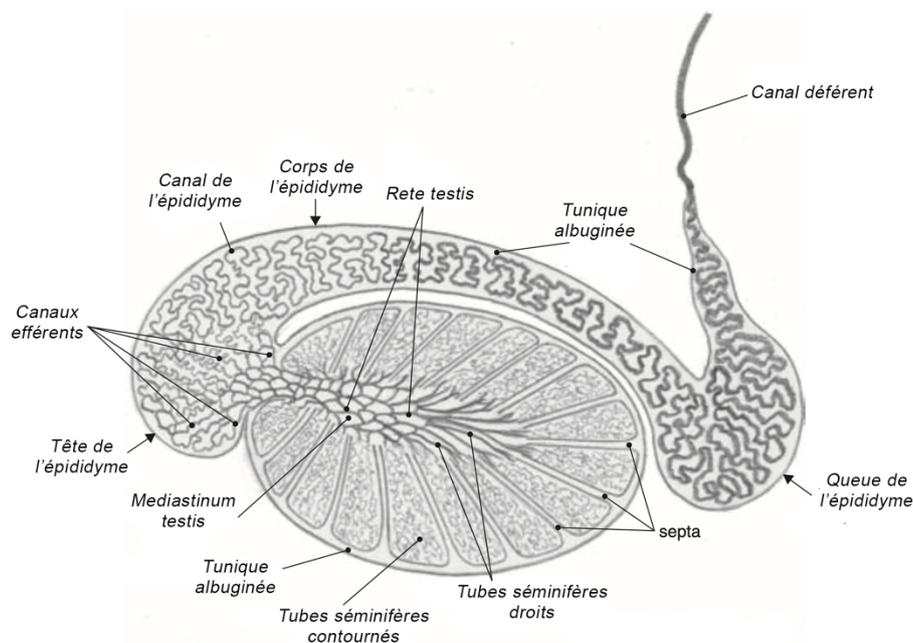


Figure 2 : Organisation interne du testicule en coupe longitudinale (Schatten et Constantinescu, 2007)

ii) La vascularisation et l'innervation

La vascularisation artérielle est assurée par les artères testiculaires spermatiques internes dérivant de l'aorte caudale. Fortement contournées, elles traversent le canal inguinal dans le cordon spermatique et circulent à la surface de l'albuginée avant de pénétrer dans le testicule.

Un réseau veineux anastomosé impliqué dans la thermorégulation forme le plexus pampiniforme. Il établit un transfert de chaleur artérioveineux à contre-courant et assure le refroidissement du sang artériel. Le sang veineux circule alors vers le cordon spermatique pour être drainé par la veine cave caudale (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001).

L'influx nerveux pénètre dans le testicule par le biais du cordon spermatique. Le nerf vague et le plexus pelvien délivrent l'influx parasympathique, tandis que l'innervation sympathique est assurée par le plexus mésentérique caudal et pelvien (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019).

b) L'épididyme

L'épididyme est un conduit cylindrique de 5 à 8 mètres de long. Attaché au testicule, il correspond à l'abouchement des canaux efférents et est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019). La tête, située au pôle cranial du testicule, draine directement les spermatozoïdes issus des tubes séminifères. Tandis que le corps longe le testicule dorso-latéralement, la queue, elle, est attachée ventro-caudalement par le ligament de la queue de l'épididyme (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019). Son épithélium pseudostratifié est composé de jonctions serrées, complexes multiprotéiques liant le cytosquelette d'actine, qui forment la barrière hémato-épididymaire (Breton *et al.*, 2019).

c) Le cordon spermatique

Le cordon spermatique contient les vaisseaux sanguins, les afférences nerveuses, les vaisseaux lymphatiques, le muscle crémaster ainsi que le canal déférent (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). Ce dernier, d'abord alambiqué puis droit, chemine dorso-médialement au testicule pour rejoindre le cordon spermatique. Il pénètre ensuite dans la cavité abdominale puis chemine dorsalement à la vessie pour atteindre dorso-médialement la prostate. C'est là qu'il s'ouvre dans l'urètre pelvien (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001).

Le canal inguinal est un passage qui relie les anneaux inguinaux profonds et superficiels et qui représente une solution de continuité entre la cavité abdominale et le testicule à travers la musculature de la paroi abdominale (Noakes *et al.*, 2019).

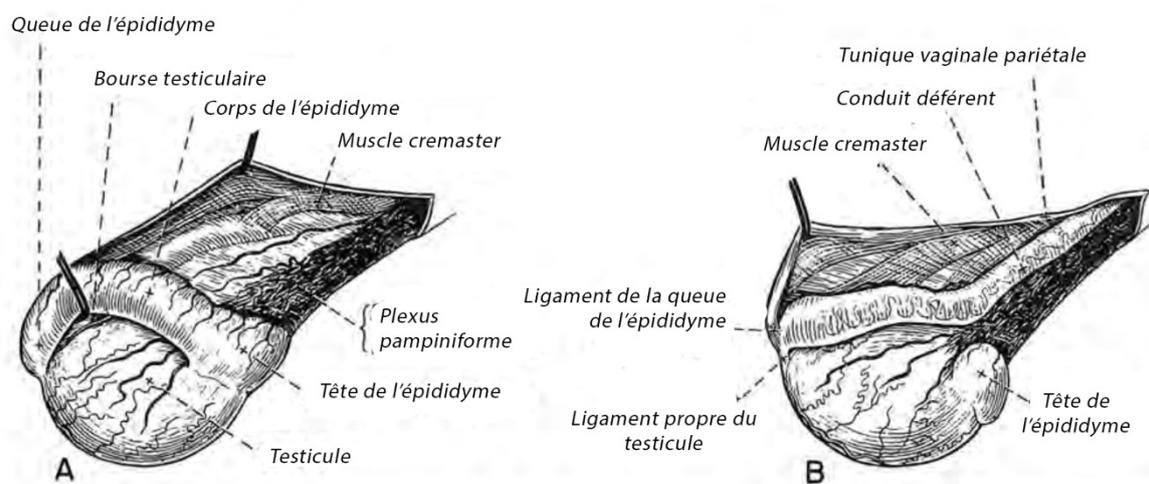


Figure 3 : Représentation d'un testicule de chien. A : testicule droit, vue latérale. B : testicule gauche, vue médiale (König et Liebich, 2020)

d) Glande accessoire : la prostate

La prostate constitue l'unique glande accessoire chez le chien. Il s'agit d'une glande exocrine de 2 à 3 cm de long, qui entoure l'urètre au niveau du col vésical. Elle est en rapport dorsalement avec le rectum, ventralement avec la symphyse pubienne et latéralement avec le bassin, bien que sa position se modifie en fonction de l'âge (Noakes *et al.*, 2019 ; Christensen, 2018 ; Leis-Filho et Fonseca-Alves, 2018 ; Johnston *et al.*, 2001).

Elle est enveloppée dans une épaisse capsule fibro-musculaire (Leis-Filho et Fonseca-Alves, 2018). Bilobée, elle présente un sillon médian fibreux. Ses deux lobes sont divisés en de nombreux lobules par des septums conjonctifs. Ils renferment des glandes tubulo-alvéolaires sécrétrices du liquide prostatique qui se déverse dans l'urètre et se mélange aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation en constituant l'essentiel du volume de l'éjaculat (Cunningham et Klein, 2013 ; Johnston *et al.*, 2001).

L'irrigation artérielle de la prostate dérive de l'artère pudendale interne. Ce sont les veines prostatiques et urétrales qui assurent le retour vers la veine iliaque interne. L'innervation sympathique est assurée par le nerf hypogastrique qui stimule l'émission des sécrétions prostatiques par contraction des fibres musculaires lisses (Leis-Filho et Fonseca-Alves, 2018 ; Johnston *et al.*, 2001).

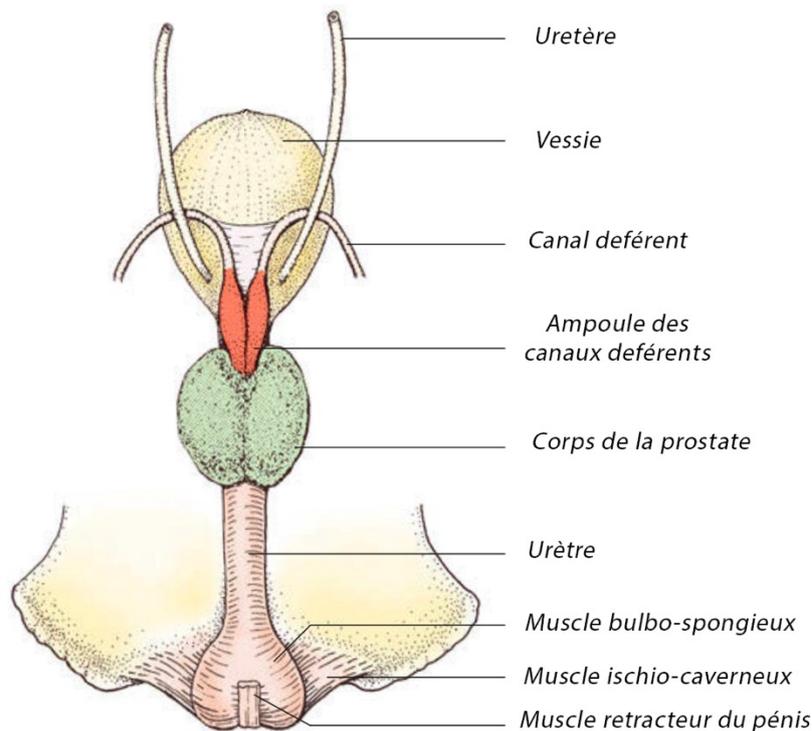


Figure 4 : Représentation schématique de la glande accessoire du chien mâle (König et Liebich, 2020)

e) L'urètre

L'urètre est un conduit qui assure l'évacuation de l'urine et du sperme. Il prend naissance à l'extrémité caudale de la vessie et s'étend jusqu'à l'extrémité du pénis. Il est classiquement divisé en 2 parties. L'urètre pelvien, partie la plus crâniale, est composée d'une région pré-prostatique issue exclusivement des voies urinaires et d'une partie prostatique caractérisée par l'abouchement du canal déférent dans la prostate. L'urètre pénien constitue la seconde partie et chemine ventralement dans le pénis (König et Liebich, 2020).

f) Le pénis

i) Organisation générale

Le pénis est de forme cylindrique et mesure de 5 à 15 cm selon la taille du chien (Cunningham et Klein, 2013 ; Linde-Forsberg, 2001). Il est situé ventralement à l'abdomen et trouve son origine au niveau de l'arc ischiatique, son extrémité libre s'étendant jusqu'à l'ombilic (König et Liebich, 2020 ; Cunningham et Klein, 2013). De type musculo-caverneux, il est composé de 3 segments à savoir la racine, le corps, et le gland. La racine est formée des corps caverneux, formations paires dorsales ainsi que du corps spongieux ventral naissant à la hauteur du bulbe pénien (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). Le corps du pénis, fait suite à la racine. L'urètre pénien y chemine encapsulé dans le corps

spongieux (Cunningham et Klein, 2013 ; Johnston *et al.*, 2001). Le gland, recouvert du prépuce, qui correspond à l'ouverture de l'urètre sur l'extérieur, est subdivisé en 2 segments que sont le bulbe du gland, extension du corps spongieux, et la partie longue du pénis (König et Liebich, 2020).

Le pénis du chien contient un os qui facilite l'intromission et qui représente une particularité anatomique de cette espèce. Il correspond à un remaniement du corps caverneux et comprend un sillon accueillant l'urètre ventralement (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Linde-Forsberg, 2001 ; Johnston *et al.*, 2001).

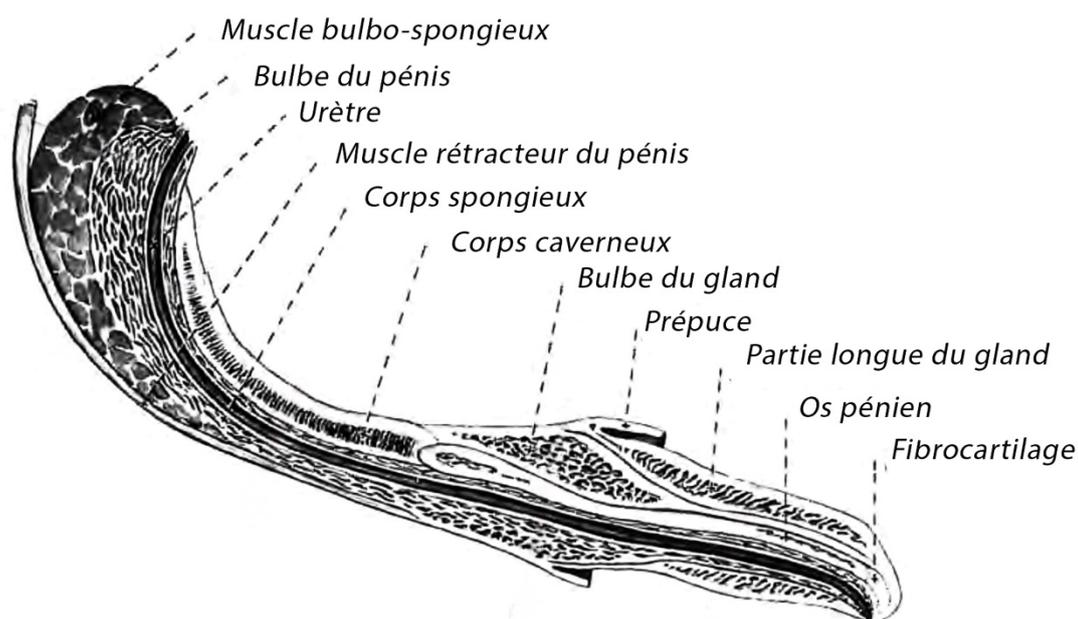


Figure 5 : Représentation schématique du pénis du chien mâle (Johnston *et al.*, 2001)

ii) La musculature du pénis

La musculature du pénis comprend trois grands types de muscles à savoir les muscles striés ischio-caverneux, le muscle lisse bulbo-spongieux et le muscle rétracteur du pénis qui assure son retour en position physiologique après le coït (König et Liebich, 2020).

iii) La vascularisation et l'innervation

Le pénis est vascularisé par les artères pudendales internes et périnéales (Johnston *et al.*, 2001). Le corps caverneux est drainé par la veine pudendale tandis que le corps spongieux l'est par l'intermédiaire de la veine dorsale du pénis (Noakes *et al.*, 2019). Son innervation sympathique est assurée par le nerf hypogastrique et son innervation parasymphatique est médiée par le nerf pelvien (Johnston *et al.*, 2001).

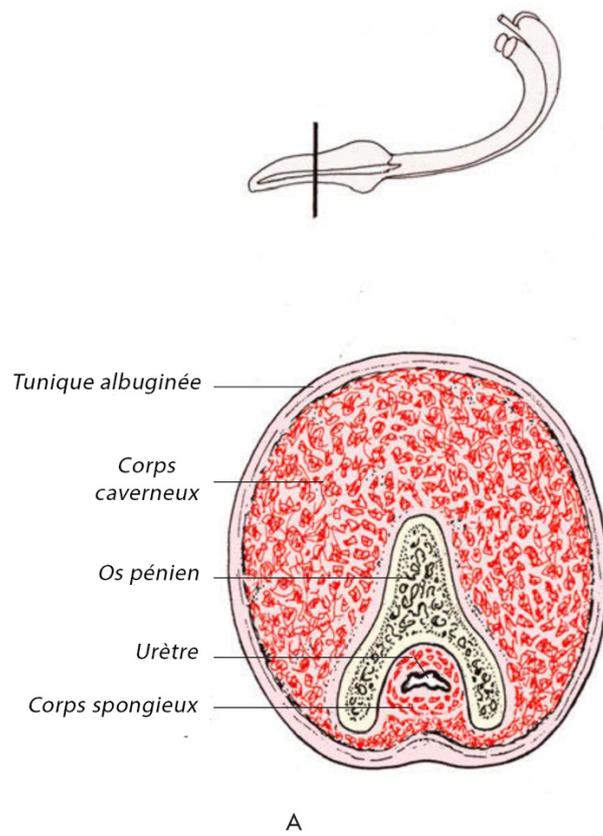


Figure 6 : Représentation schématique du pénis de chien mâle en section transversale (König et Liebich, 2020)

2) PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GÉNITAL MALE

a) Le développement

Le développement sexuel démarre tôt dans la vie foetale et se caractérise par l'existence primordiale d'une gonade bipotentielle indifférenciée (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001).

Les cellules de Sertoli qui sécrètent l'hormone antimüllérienne assurent le développement de l'appareil génital et définissent le genre de l'individu (Gerber *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001). D'autres hormones comme la FSH, la T3, l'IGF-1 et l'activine interviennent également (Yokonishi et Capel, 2021).

Les cellules de Leydig produisent la testostérone qui contribue à la différenciation des canaux de Wolff en épидидyme et en canaux déférents. Une fois convertie en 5- α -dihydrotestostérone (DHT) par la 5- α -réductase, elle assure la formation de l'urètre, de la prostate, et du scrotum ainsi que l'allongement du tubercule génital (Christensen, 2018 ; Johnston *et al.*, 2001)

Les testicules foetaux se développent caudalement aux reins. Leurs descentes à travers le canal inguinal s'effectuent passivement sous l'influence des androgènes, de l'insuline-like 3, et par l'intermédiaire de la régression du gubernaculum testis, au bout du premier mois de vie. La localisation abdominale d'un ou des deux testicules définit la cryptorchidie (Noakes *et al.*, 2019 ; Linde-Forsberg *et al.*, 2001 ; Johnston *et al.*, 2001).

La puberté représente la mise en place de l'activité sexuelle et se caractérise par l'apparition des premiers spermatozoïdes dans l'éjaculat. Les grandes races atteignent souvent la puberté après 1 an tandis que les petites races peuvent être pubères dès 6 mois (Johnston *et al.*, 2001).

b) La régulation hormonale

i) Les hormones mises en jeu

Les hormones sexuelles sont synthétisées par l'axe hypothalamo-hypophysaire et les testicules (Noakes *et al.*, 2019). L'hypothalamus sécrète de façon pulsatile la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon), un décapeptide qui agit sur l'hypophyse antérieure. Cette dernière, une fois stimulée, libère soit de la FSH (Folliculo-Stimulin-Hormon) soit de la LH (Luteinizing Hormon) (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Cunningham et Klein, 2013).

La LH, libérée lors de pulses amples de GnRH, stimule les cellules de Leydig et active notamment l'adényl-cyclase, aboutissant à la synthèse mitochondriale de testostérone. Cette dernière soutient la spermatogenèse, la maturation épидидymaire des spermatozoïdes ainsi que le développement des caractères sexuels secondaires. Dans les cellules de Sertoli et la prostate, la testostérone est en partie convertie par la 5- α -réductase en dihydrotestostérone dont l'activité androgénique est accrue (Noakes *et al.*, 2019).

La FSH sécrétée par pulse faible de GnRH, lie les récepteurs des cellules de Sertoli et stimule la synthèse d'ABP (*Androgen Biding Protein*) dont l'affinité pour les androgènes est accrue, favorisant leur concentration dans les tubes séminifères. Sous l'action de la FSH, la testostérone est convertie par l'aromatase en œstrogène, hormone qui joue un rôle notable dans la résorption des liquides séminifères (Noakes *et al.*, 2019).

ii) La régulation hormonale

La testostérone et la dihydrotestostérone entraînent une rétroaction négative sur l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure, diminuant conséquemment la sécrétion de FSH et de LH. Les œstrogènes, une fois libérés par les cellules de Sertoli régulent également cet axe, notamment la sécrétion de LH. L'inhibine est une hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli qui régule négativement la libération de FSH, mais qui favorise aussi la sécrétion de testostérone. L'activine, une autre hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli, entraîne dans son cas une rétroaction positive sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en augmentant la sécrétion de FSH par l'hypophyse antérieure (Cunningham et Klein, 2013).

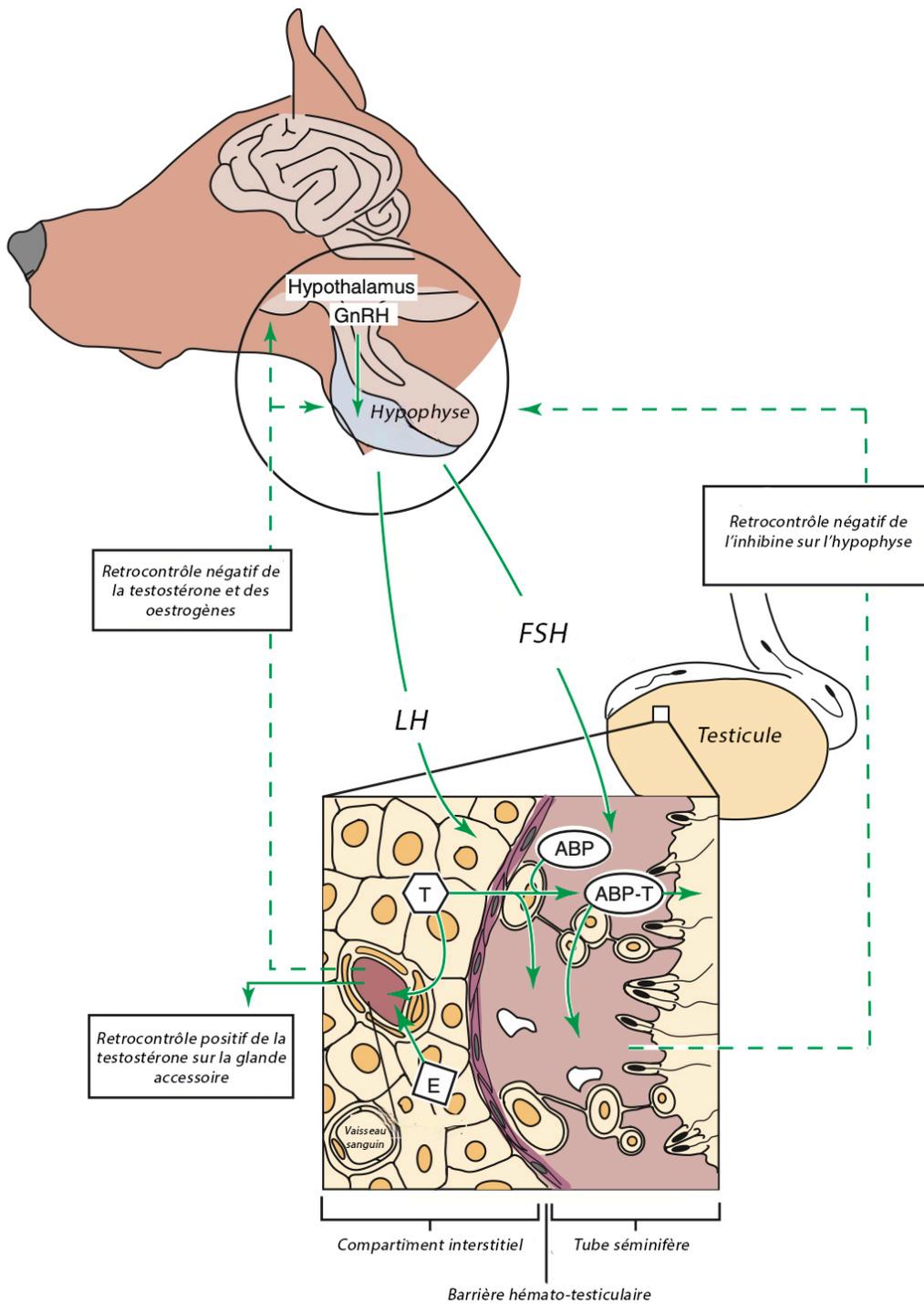


Figure 7 : La régulation hormonale du système reproducteur du chien mâle. ABP-T : protéine de liaison aux androgènes. T : testostérone. E : œstrogènes (Cunningham et Klein, 2013)

c) Rôles de l'épididyme

i) Organisation fonctionnelle

Trois structures sont couramment distinguées, à savoir le segment initial, contenant des cellules étroites, la région proximale constituée de la tête et du corps impliqués dans la maturation des spermatozoïdes et enfin la région distale composée de la queue de l'épididyme qui assure le stockage et le transport des spermatozoïdes matures (Noakes *et al.*, 2019).

ii) Le transport

Le péristaltisme épидидymaire est responsable du transport passif des spermatozoïdes. Le temps de transit de la tête à la queue est estimé entre 8 et 14 jours (Noakes *et al.*, 2019).

iii) Le stockage

L'épididyme permet le stockage des spermatozoïdes matures sur une durée qui peut s'étendre jusqu'à 15 jours. La quiescence et la survie des spermatozoïdes sont favorisées par le ralentissement du métabolisme spermatique, l'acidité et l'hyperosmolarité du milieu épидидymaire (James *et al.*, 2020 ; Sullivan *et al.*, 2005 ; Dacheux *et al.*, 2003).

iv) Élimination des cellules défectueuses

La clusterine et l'ubiquitine, activement sécrétées par l'épithélium épидидymaire marquent les cellules défectueuses et facilitent leur élimination par phagocytose (Gouletsou *et al.*, 2022 ; Chłopik et Wysokińska, 2020).

v) La protection

L'épididyme assure une tolérance vis-à-vis des spermatozoïdes auto-antigéniques, bien que des cellules immunitaires y soient néanmoins présentes en association aux bêta-défensines qui en constituent l'immunité innée (Breton *et al.*, 2019). La lactoferrine exerce des fonctions antibactériennes par chélation du fer et assure en outre des fonctions antimycosiques, antivirales, anti-inflammatoires et antinéoplasiques (Dacheux *et al.*, 2003). Enfin, la sulfoxydation des protamines protège la chromatine face aux mutations génomiques susceptibles de se produire (Noblanc *et al.*, 2011). À noter que la barrière hémato-épидидymaire renforce la protection du compartiment luminal (Breton *et al.*, 2019).

vi) Rôle antioxydant

Le métabolisme des spermatozoïdes s'intensifie lors de leur maturation, l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'anion superoxyde, le

peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyde, l'oxyde nitrique et le peroxyde nitrite est inévitable (O'Flaherty, 2019 ; Dacheux *et al.*, 2003).

Les spermatozoïdes y sont particulièrement sensibles en raison de leur composition membranaire riche en acides gras polyinsaturés. La peroxydation lipidique qui en découle conduit à une perte de fonctionnalité membranaire considérable. La fragmentation de la chromatine, la détérioration des protéines de surfaces et du cytoplasme ainsi que la diminution de la mobilité en association à l'altération des fonctions mitochondriales sont des répercussions supplémentaires de l'activité des ROS (O'Flaherty, 2019). Cependant, en faible quantité, ils demeurent essentiels aux voies de signalisations cellulaires (Breton *et al.*, 2019).

Les anti-oxydants enzymatiques sont représentés par la glutathion-peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les peroxiredoxines. Les systèmes non-enzymatiques correspondent à la vitamine C, E, et D ainsi qu'à la taurine, l'hypotaurine, et l'albumine, qui assurent le piégeage des ROS (O'Flaherty, 2019 ; Chabory *et al.*, 2010 ; Vernet *et al.*, 2004).

vii) Rôle de sécrétion et de réabsorption des liquides luminaux

L'épithélium épидидymaire permet un apport d'ions, de nutriments, de solutés, d'eau et de protéines (Breton *et al.*, 2019 ; Dacheux *et al.*, 2003). Les liquides luminaux issus des tubes séminifères sont réabsorbés par l'épithélium à hauteur de 90 % ce qui assure une remarquable concentration des spermatozoïdes, condition impérieuse pour asseoir la fertilité du mâle (James *et al.*, 2020 ; Sullivan *et al.*, 2005).

viii) Rôle dans la maturation

Les processus de maturation seront davantage détaillés dans la partie II traitant de l'étude du spermatozoïde.

d) L'érection et l'éjaculation

i) L'érection

L'érection implique le système nerveux central, le système endocrinien et le système vasculaire. La flaccidité pénienne est permise par la noradrénaline qui contracte les muscles lisses de l'artère pénienne et du corps caverneux. Lors de l'excitation sexuelle, le plexus sacré parasympathique libère du monoxyde d'azote (NO) qui relâche les fibres lisses et augmente la pression dans les corps caverneux et spongieux. La pression vaginale exercée sur le gland, parallèlement à la compression du muscle ischio-urétral, contribuent aussi à la réduction du

drainage veineux de retour. À ceci, s'ajoute une compression de la racine du pénis et du bulbe contre l'arc ischiatique par les muscles ischio-caverneux et bulbo-spongieux (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Cunningham et Klein, 2013 ; Johnston *et al.*, 2001). La stimulation sympathique sacrée permet la détumescence en stimulant la contraction des muscles lisses des corps caverneux (Johnston *et al.*, 2001). La pression chute, les corps caverneux et spongieux se vident tandis que le pénis perd en rigidité puis retourne dans le prépuce au moyen du muscle rétracteur du pénis (König et Liebich, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019).

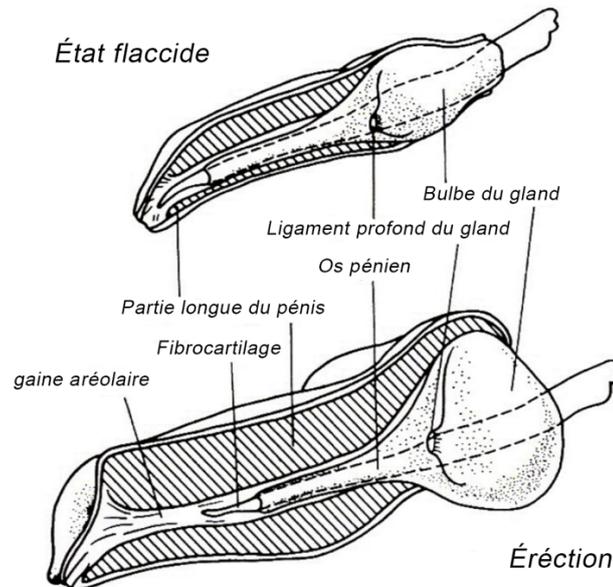


Figure 8 : Représentation schématique des changements morphologiques du pénis de chien pendant l'érection (Linde-Forsberg, 2001)

ii) L'éjaculation

L'éjaculation, se déroule en deux phases et correspond à l'émission saccadée de la semence pendant 5 à 30 minutes. La première, contrôlée par le système nerveux autonome, implique la sécrétion des glandes accessoires. La seconde, dite de propulsion, est déclenchée par les contractions du muscle bulbo-spongieux et des muscles lisses qui entourent l'urètre (Fontbonne, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019).

Il s'agit d'un réflexe spinal sacré ayant pour origine les nerfs sensitifs du gland empruntant notamment la voie du nerf dorsal pénien. Des fibres efférentes somatiques stimulent alors la contraction rythmée du muscle bulbo-spongieux faisant progresser le sperme dans l'urètre. Le système nerveux autonome prend également part à cette régulation, moyennant une stimulation dopaminergique et une inhibition sérotoninergique. Associée à ces événements,

l'orifice vésical se ferme et le sphincter externe de l'urètre se relâche par intermittence (Noakes *et al.*, 2019 ; Cunningham et Klein, 2013).

La première partie de cette étude s'est concentrée sur l'anatomie et la physiologie du chien mâle.

La seconde partie abordera la réfrigération de la semence canine. Elle débutera par une description détaillée de sa composition. Consécutivement, les différentes méthodes de collecte du sperme canin seront exposées, suivies des techniques d'évaluation quantitative et qualitative. Pour finir, il sera question de décrire le processus spécifique de réfrigération du sperme de chien.

PARTIE 2 :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE

La réfrigération apparaît à bien des égards comme une technique de choix pour satisfaire la préservation de la semence après recueil. Bien que présentant de nombreux avantages, ses répercussions ne sont pas anodines, mettant en exergue la nécessité d'étudier ses propriétés et de suivre ses caractéristiques morpho-fonctionnelles.

1) ÉTUDE DE LA SEMENCE CANINE

a) Les différentes fractions de la semence canine

i) Fraction pré-spermatique

Le sperme est émis sous forme de trois fractions. La fraction pré-spermatique ou urétrale correspond à la première fraction. Elle est émise à hauteur de 0,5 à 5 mL pendant quelques secondes lors des poussées rapides du mâle et présente un aspect clair, ne contenant que très peu de spermatozoïdes (Fontbonne, 2022 ; Johnston *et al.*, 2001).

ii) Fraction spermatique

La fraction spermatique est éjaculée en moins d'une minute et est émise au goutte-à-goutte après les poussées pelviennes du mâle (García-Vázquez *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001). Riche en spermatozoïdes et d'un volume de 1 à 4 mL, sa concentration varie de 200 à $500 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL (Surmacz *et al.*, 2022). Elle prend un aspect plus ou moins laiteux selon sa concentration en spermatozoïdes, renseignant ainsi sur l'existence d'une éventuelle oligospermie (concentration anormalement faible) (Aquino-Cortez *et al.*, 2017 ; Johnston *et al.*, 2001).

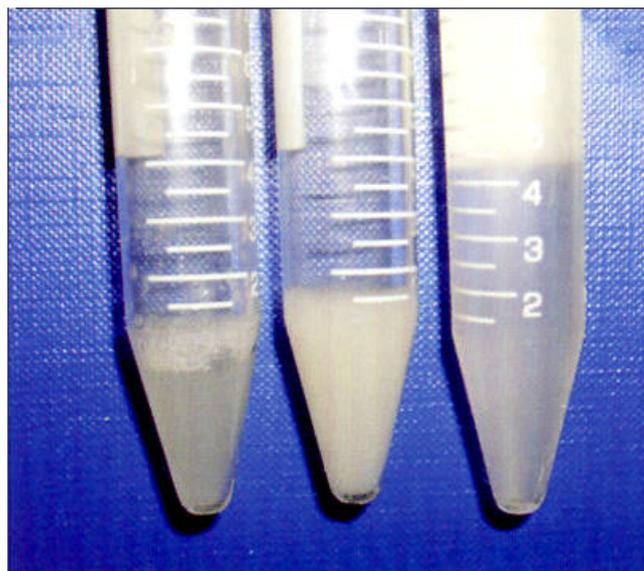


Figure 9 : Les 3 phases de la récolte du sperme canine. De gauche à droite, fraction pré-spermatique (urétrale), spermatique puis prostatique (source internet)

iii) Fraction prostatique

La durée d'émission de la troisième fraction ou fraction prostatique, peut prendre jusqu'à 30 minutes (Fontbonne, 2022 ; Feldman et Nelson, 2004). Puissante et vigoureuse, elle se produit à l'issue du retournement du mâle lorsque son pénis pivote de 180°. D'un volume conséquent et pouvant atteindre 80 mL selon les races et les individus, elle constitue près de 95 % de l'éjaculat. D'aspect clair, elle est pauvre en spermatozoïdes (Surmacz *et al.*, 2022 ; Miller *et al.*, 2020 ; García-Vázquez *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001).

b) Composition de la semence canine

i) Le liquide prostatique

(1) Définitions

Le liquide prostatique dans lequel baignent les spermatozoïdes est majoritairement constitué par les sécrétions prostatiques aqueuses auxquelles s'ajoutent les sécrétions épидидymaires. Il se mélange aux spermatozoïdes au moment de l'éjaculation pour former le sperme. Sa pression osmotique de 285 mOsmol le définit comme un milieu isotonique (Miller *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019).

(2) Les constituants et leurs rôles

(a) Glucides

Le liquide prostatique canin contient des glucides en faible concentration tels que le glucose, le fructose, le sorbitol et le mannose (Rodriguez-Gil *et al.*, 2013 ; Rigau *et al.*, 2001 ; Linde-Forsberg, 2001 ; Bartlett, 1962).

(b) Agents antibactériens

Le zinc d'origine prostatique, exerce une activité antibactérienne (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020). Sa concentration, comprise entre 10,3 et 120,6 µg/mL, y est plus élevée que dans n'importe quel autre fluide de l'organisme (Mogielnicka-Brzozowska *et al.*, 2015 ; Johnston *et al.*, 2001).

(c) Ions

Les ions ont un impact significatif sur l'osmolarité du liquide prostatique. Majoritairement composé de chlorure, de sodium, de phosphore et de cuivre, il contient également du zinc, du fer, du magnésium et du calcium. C'est dans la seconde fraction de l'éjaculat que leur concentration est la plus élevée (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001 ; England *et al.*, 1990).

(d) Protéines

Il existe plus de 250 protéines dans le liquide prostatique (Aquino-Cortez *et al.*, 2017). Elles jouent un rôle crucial dans la maturation, le transport et la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle (Viana *et al.*, 2021 ; Caballero *et al.*, 2012). Les protéines sécrétoires contenant le domaine fibronectine de type II sont un groupe comprenant les BSP (Binder of Sperm Protein). Elles participent à la formation du réservoir oviductal et protègent les spermatozoïdes en transit dans l'appareil reproducteur de la femelle. Diverses études corroborent leur omniprésence chez les mammifères (Caballero *et al.*, 2012 ; Viana *et al.*, 2021 ; Bergeron et Manjunath, 2006). Les protéines liant le zinc stabilisent la membrane plasmique et maintiennent un équilibre entre le zinc libre et le zinc lié favorisant la mobilité des spermatozoïdes (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020 ; Mogielnicka-Brzozowska *et al.*, 2015).

(e) Acides gras

Le liquide prostatique est constitué à 85 % d'acides gras saturés en particulier l'acide palmitique et l'acide stéarique, et de 15 % d'acides gras insaturés, le plus abondant étant l'acide oléique. Le cholestérol, entre 8 et 73 mg/dL, y est également présent (Díaz *et al.*, 2014 ; Lind-Forsberg, 2001).

(f) Enzymes

De nombreuses enzymes sont présentes dans la semence canine. La classe enzymatique la plus représentée est celle de l'arginine estérase spécifique de la prostate canine (CPSE) (Leis-Filho et Fonseca-Alves, 2018). Les phosphatases alcalines et acides comptent également parmi les enzymes identifiées. Elles jouent un rôle dans le métabolisme glycolytique et participent à la synthèse du fructose (Aquino-Cortez *et al.*, 2017).

(g) Antioxydants

La SOD représente l'anti-oxydant principal, mais la GPx et la catalase sont aussi présentes. À ces enzymes s'ajoutent des anti-oxydants non-enzymatiques, comme l'hypotaurine, la carnitine, la mélatonine, les caroténoïdes, la vitamine C et E (Silvestre *et al.*, 2021 ; Del Prete *et al.*, 2018).

(h) Prostrasomes

Les prostrasomes sont des vésicules extra-cellulaires de 20 à 300 nm de diamètre, libérées par la prostate. Après l'éjaculation, elles fusionnent avec la membrane des spermatozoïdes et leur transfèrent diverses substances, les impliquant directement dans leur

processus de maturation. Ils affichent également des propriétés antioxydantes et antibactériennes (Aalberts *et al.*, 2014).

(i) Cellules

Normalement acellulaire, certains types cellulaires peuvent y être présents comme des cellules épithéliales ou des érythrocytes. Les leucocytes peuvent être présents physiologiquement jusqu'à 2000 leucocytes/ μL . Les bactéries sont retrouvées dans près de 80 % des échantillons (Greer, 2015 ; Johnston *et al.*, 2001).

(j) Autres

Des cytokines et des hormones comme la prostaglandine impliquée dans l'activation de la mobilité y sont identifiées (Rodriguez-Gil *et al.*, 2013). L'acide citrique exerce quant à lui un rôle tampon et favorise la survie des spermatozoïdes (Hori *et al.*, 2017).

*Tableau I : Résumé des principales caractéristiques de la semence canine fraîche et selon la fraction considérée (d'après Nouri Gharajelar *et al.*, 2016 ; Michael *et al.*, 2009 ; Goericke-Pesch *et al.*, 2011 ; Bartlett, 1962)*

Caractéristiques	Première fraction	Seconde fraction	Troisième fraction
Durée d'émission	27s	52s	8 min
Volume	0,9 mL	2,6 mL	9,2 mL
pH	6,2	6,3	6,5
Concentration	53.10 ⁶ /mL	247.10 ⁶ /mL	10.10 ⁶ /mL
Éjaculat entier			
pH	7,2		
Volume	1 à 80 mL		
% de mobilité progressive	> 75 %		
% de spermatozoïdes vivants	> 75 %		
% d'anomalies morphologiques	< 20 %		
Comptage total	0,45 – 1,9.10 ⁶ spermatozoïdes		

ii) Le spermatozoïde et son ultrastructure

(1) Généralités

Les spermatozoïdes, cellules haploïdes spécialisées et très différenciées, ont été décrits pour la première fois par Antoni Leeuwenhoek en 1678 (Bartlett, 1962). Dans l'espèce canine, leur longueur est d'environ 70 µm (Surmacz *et al.*, 2022). Plusieurs éléments remarquables y sont distingués. La membrane plasmique assure diverses fonctions notamment dans l'interaction avec l'ovocyte. La tête contient le noyau et la chromatine condensée ainsi que l'acrosome. La pièce connective et la pièce intermédiaire sont aussi présentes, cette dernière contenant les mitochondries. Enfin, le flagelle représente le support de la mobilité (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001).

(2) La membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique, interface entre le milieu intra-cellulaire et extra-cellulaire. Elle joue un rôle crucial dans la régulation de l'équilibre osmotique. Fraîchement éjaculés, les spermatozoïdes sont transférés de l'environnement épидидymaire hyper-osmotique (420 mmol/kg) au liquide prostatique iso-osmotique (330 mmol/kg) puis à l'environnement iso-osmotique des voies génitales de la femelle (Lucio *et al.*, 2017 ; Karger *et al.*, 2014). Ce stress osmotique génère un déplacement intracellulaire d'eau et conduit à la modification du volume cellulaire, principe sur lequel repose le processus régulateur du volume cellulaire (Tsikis *et al.*, 2018 ; Karger *et al.*, 2014).

Sa composition repose sur d'importantes quantités de glycérophospholipides, de phospholipides et de cholestérol. Ce dernier renforce la rigidité membranaire et lui procure une perméabilité élevée. Néanmoins, la présence accrue d'acides gras polyinsaturés (AGPI) comme l'acide docosahexaénoïque lui confère davantage de souplesse. Cette abondance majeure toutefois la sensibilité face aux ROS de par son caractère réduit (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Lucio *et al.*, 2017 ; Angrimani *et al.*, 2017).

De nombreuses et diverses protéines transmembranaires y sont enchâssées. Certaines sont des récepteurs, d'autres des canaux ioniques ou bien des protéines enzymatiques (Gouletsou *et al.*, 2022). Des protéines non-transmembranaires assurent un soutien structurel en lien étroit avec le cytosquelette (Tapia *et al.*, 2012).

(3) La tête

Dans la tête, le noyau haploïde occupe une surface considérable (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019). L'acrosome recouvre la face antérieure du noyau et se divise en un segment antérieur correspondant à la coiffe et un segment postérieur équatorial (Noakes *et al.*, 2019 ; Aalberts *et al.*, 2014 ; Toshimori, 2003). Il s'agit d'un appareil de Golgi modifié dont l'exocytose enzymatique notamment d'acrosine permet la lyse du cumulus ovocytaire lors de la fécondation (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Tulsiani *et al.*, 1998). L'acrosome contient également diverses molécules impliquées dans l'interaction ovocyte/spermatozoïde (Toshimori, 2003).

(4) La pièce connective et la pièce intermédiaire

La pièce connective comprend le centriole proximal et médial qui synthétisent le cytosquelette et l'axonème garant de l'initiation du mouvement flagellaire (Toshimori 2003). L'axonème est formé de neuf paires de microtubules périphériques et d'une paire centrale entourée d'une gaine. Les microtubules A et B sont constitués respectivement de 13 et 9 filaments de tubuline. À la surface de chaque doublet sont régulièrement espacés des bras de dynéine internes et externes dotés d'une activité ATPasique. Les paires de microtubules sont reliées entre elles par la nexine qui assure le maintien de la structure, tandis que des ponts radiaires lient les doublets périphériques et le doublet central (Hermo *et al.*, 2010 ; Jouannet et Serres, 2013).

La pièce intermédiaire est constituée d'une gaine de 5 à 7 μm de long, riche en mitochondries disposées de manière hélicoïdale. Cette gaine encercle 9 fibres denses de longueurs variables fixées aux doublets microtubulaires axonémaux (Hermo *et al.*, 2010 ; Jouannet et Serres, 2013). L'axonème qui se poursuit dans l'intégralité du flagelle est également enveloppé au sein de cette gaine (Jouannet et Serres, 2013).

(5) Le flagelle

Le flagelle de 50 μm de long en moyenne, est le support de la mobilité. Il fait suite à la pièce intermédiaire et est constitué de la pièce principale et de la pièce terminale (Surmacz *et al.*, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Escalier et Touré, 2012 ; Jouannet et Serres, 2013). La pièce principale est associée à la pièce intermédiaire par l'annulus. Sa richesse en fibres denses décroît distalement. Elle contient une gaine fibreuse formée de deux demi-anneaux liés entre eux par des fibres longitudinales. Au sein de la pièce terminale, seul l'axonème persiste (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Escalier et Touré, 2012).

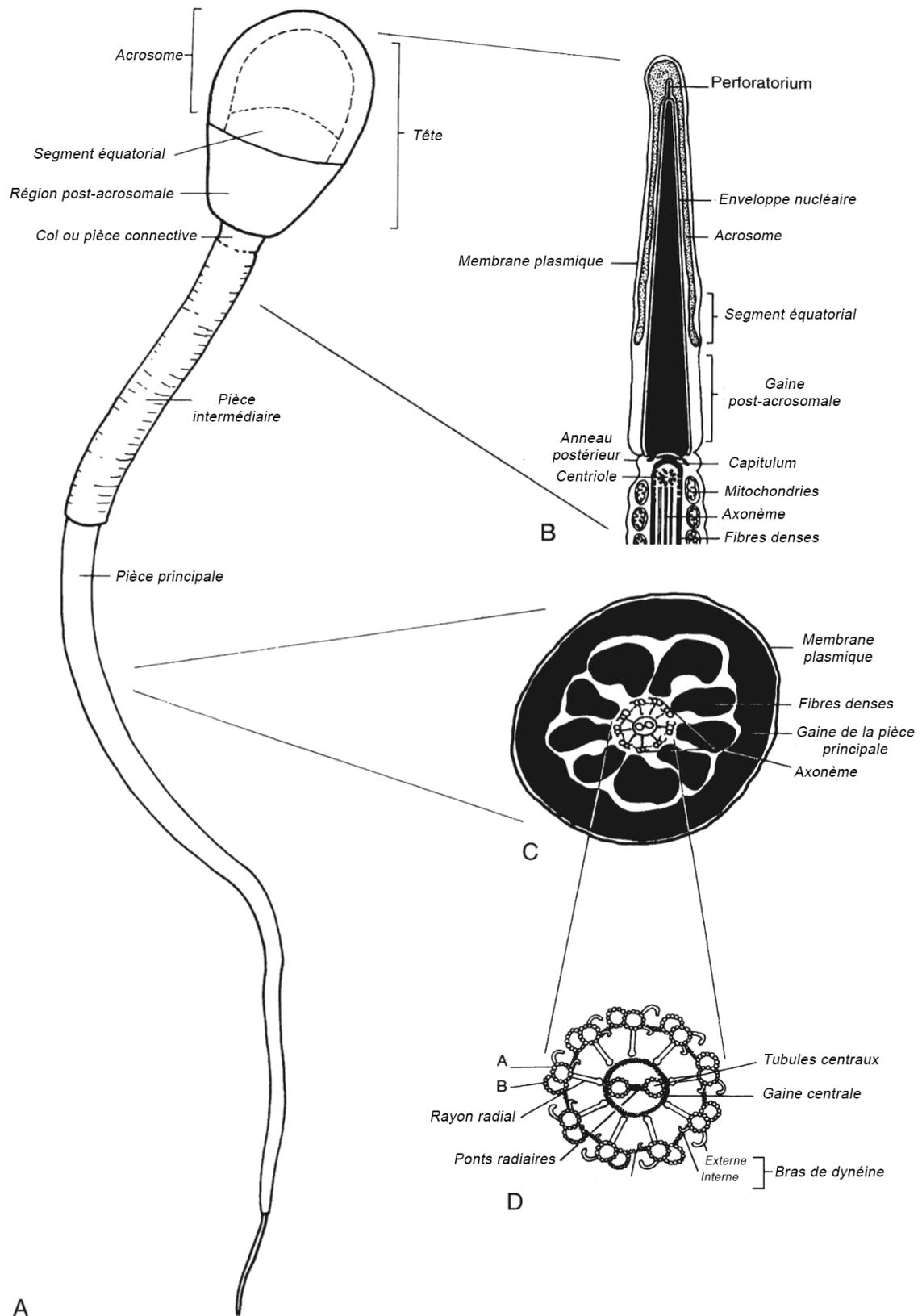


Figure 10 : Ultrastructure du spermatozoïde canin. A : aspect microscopique. B : ultrastructures de la tête et de la pièce connective. C : ultrastructure de la pièce principale et du flagelle. D : axonème flagellaire (Noakes et al., 2019)

c) Le fonctionnement du spermatozoïde

i) Le métabolisme

Le spermatozoïde présente une forte activité métabolique essentielle à sa survie, sa mobilité ainsi qu'au bon fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATPase qui module le gradient électrochimique membranaire (Silva et Gadella, 2006).

Le glucose est le principal substrat énergétique du spermatozoïde, bien qu'il métabolise aussi d'autres hexoses, tels que le fructose, le sorbitol et le mannose (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Rodriguez-Gil, 2006). Ces sources d'énergie sont présentes dans le liquide spermatique en faible quantité ainsi que dans l'appareil génital de la femelle (Rodriguez-Gil, 2006). De ce fait, les spermatozoïdes n'entrent en contact avec les sources glucidiques que postérieurement à l'éjaculation (Rigau *et al.*, 2001).

La glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative, sont préférentiellement mises à profit selon le besoin énergétique et les conditions physico-chimiques (Chłopik et Wysokińska, 2020). Les protéines de transport membranaires du glucose et du fructose, les GLUT et les SGLT, assurent l'acquisition des substrats énergétiques par la cellule. Le transporteur GLUT-3 présent en région médiane du spermatozoïde dispose d'une forte affinité pour le glucose, tandis que celle de GLUT-5 qui est présent en région péri-acrosomale est plus marquée pour le fructose ce qui implique l'existence de voies distinctes pour métaboliser le glucose et le fructose (Mueckler, 1994).

La glycolyse est une chaîne de réactions enzymatiques qui se produit dans la pièce principale. L'hexokinase phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate qui, avec le concours de diverses enzymes, est converti en pyruvate puis en Acétyl-CoA. Ce dernier favorise, dans le cycle de Krebs, l'élaboration du potentiel réducteur comme le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) utile à la phosphorylation oxydative (Chłopik et Wysokińska, 2020). En conditions anaérobies, le pyruvate est plutôt réduit en lactate pour subvenir dans une moindre mesure à la demande énergétique. Quand bien même la glycolyse ne génère que 2 molécules d'ATP, le sperme fraîchement éjaculé en contient 90 % d'origine glycolytique (Silva et Gadella, 2006). En effet, divers travaux suggèrent notamment chez la souris, que la glycolyse est une voie majeure de fourniture en ATP et que la phosphorylation oxydative mitochondriale ne constitue pas une nécessité absolue pour asseoir la fertilité du mâle (Mukai et Okuno, 2004).

La phosphorylation oxydative, source principale de production d'ATP, se déroule dans les mitochondries de la pièce intermédiaire. L'oxydation des liaisons moléculaires entraîne un

important dégagement d'énergie qui permet le fonctionnement de l'ATP-synthase générant une trentaine de molécules d'ATP (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; García-Vázquez *et al.*, 2016).

Tout au long de son existence, le spermatozoïde traverse distinctement deux phases métaboliques. Dans un premier temps, il connaît une période de maturation caractérisée par un déplacement progressif. C'est une phase anabolique, qui se distingue par une activité métabolique glycolytique et lipidique de faible intensité assurant une accumulation d'énergie (Santoro *et al.*, 2020).

La seconde phase se caractérise par un métabolisme catabolique qui consiste en une maturation fonctionnelle du spermatozoïde, où il entre progressivement dans le processus de capacitation. Les réserves accumulées en phase anabolique sont alors mises à profit et les voies métaboliques glycolytiques et lipidiques s'intensifient. Les triglycérides diminuent tandis que les réactions de β -oxydation et l'activité de l'enzyme lipase augmentent (Santoro *et al.*, 2020).

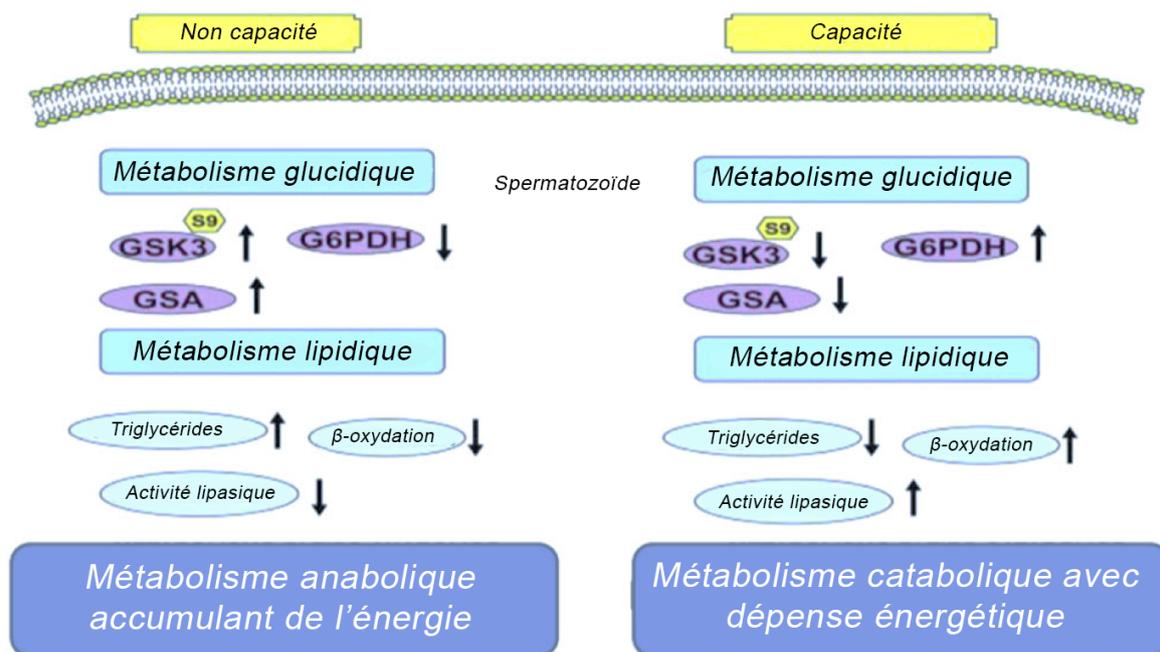


Figure 11 : Représentation schématique du métabolisme des spermatozoïdes non capités et capités. GSK3 : glycogène synthase kinase 3. G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase. GSA: glycogène-synthase (Santoro *et al.*, 2020)

ii) Le mouvement flagellaire

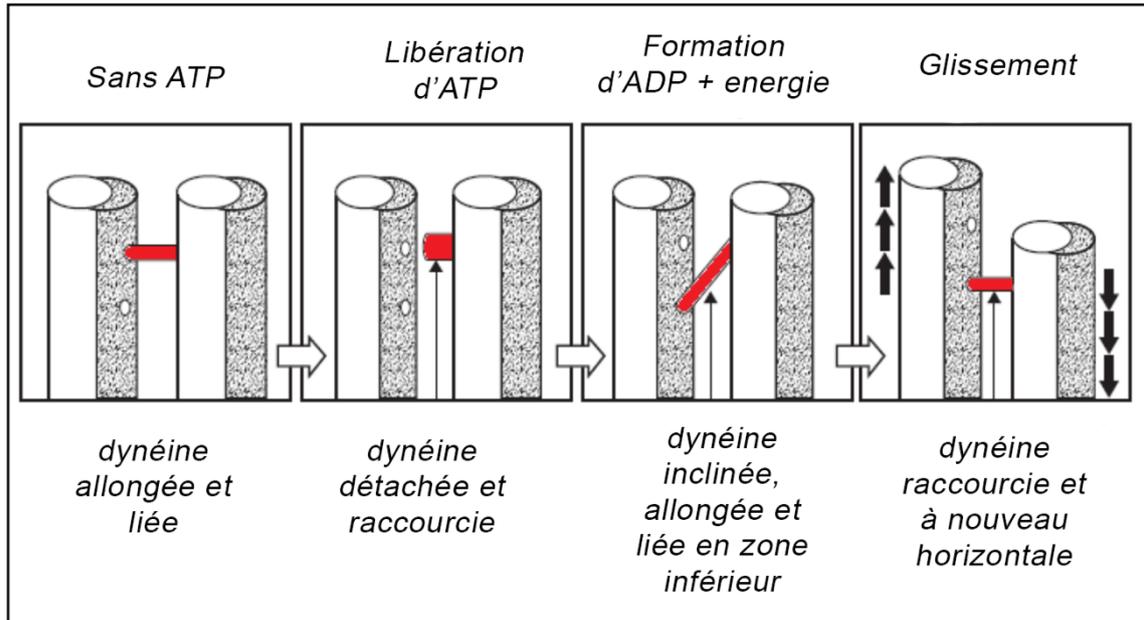


Figure 12 : Mécanisme du glissement microtubulaire (Lisboa et al., 2021)

La mobilité du spermatozoïde est soutenue par le mouvement flagellaire qui dépend de son statut énergétique (Rigau *et al.*, 2001). Elle se caractérise par une succession d'ondulations prenant naissance en regard de la pièce connective et progressant vers la pièce terminale. Cette ondulation résulte de cycles successifs de fixations et de détachements des bras de dynéines d'un doublet de microtubules sur les doublets adjacents. Ceci permet de générer une force suffisante et contribue à la courbure progressive du flagelle. Le relâchement de la dynéine sur le microtubule nécessite l'hydrolyse de l'ATP par les dynéines-ATPases dont l'activité est modulée par le pH, l'ATP, l'ADP, le Ca^{2+} et la phosphorylation oxydative (Noakes *et al.*, 2019 ; Santi *et al.*, 2013 ; Jouannet et Serres, 2013). À noter que les fibres denses accroissent la force engendrée et régulent la courbure flagellaire (Hermo *et al.*, 2010 ; Jouannet et Serres, 2013).

d) La spermatogénèse

i) Définitions

La spermatogénèse permet la production des spermatozoïdes immatures à partir des cellules-souches diploïdes qui se divisent par mitose puis par méiose. Des conditions particulières sont requises comme le maintien d'une température testiculaire inférieure de 6°C à la température corporelle (Cunningham et Klein, 2013). Sa durée est de 62 jours chez le chien (Johnston *et al.*, 2001).

ii) Considérations histologiques

Histologiquement, les tubes séminifères sont organisés en trois compartiments. Le compartiment interstitiel est formé de tissus conjonctifs collagéniques, fibroblastiques et des cellules de Leydig (Santos *et al.*, 2010). Le second compartiment, constitue la lame basale entourée de cellules contractiles myoïdes et de fibroblastes. Le compartiment luminal, composé des cellules de Sertoli et des cellules germinales, est le lieu de déroulement de la spermatogenèse (Noakes *et al.*, 2019). Les cellules somatiques de Sertoli sont cylindriques, occupent toute l'épaisseur épithéliale et leur noyau basal contient une chromatine réticulée (Santos *et al.*, 2010). Des complexes de jonctions serrées sont présents entre elles et forment la barrière hémato-testiculaire qui sépare physiquement le tube séminifère en un compartiment basal et un compartiment luminal. Les spermatogonies, petites cellules rondes de 20 µm de diamètre, présentent un faible cytoplasme et se localisent proche de la lame basale (Cunningham et Klein, 2013 ; Santos *et al.*, 2010).

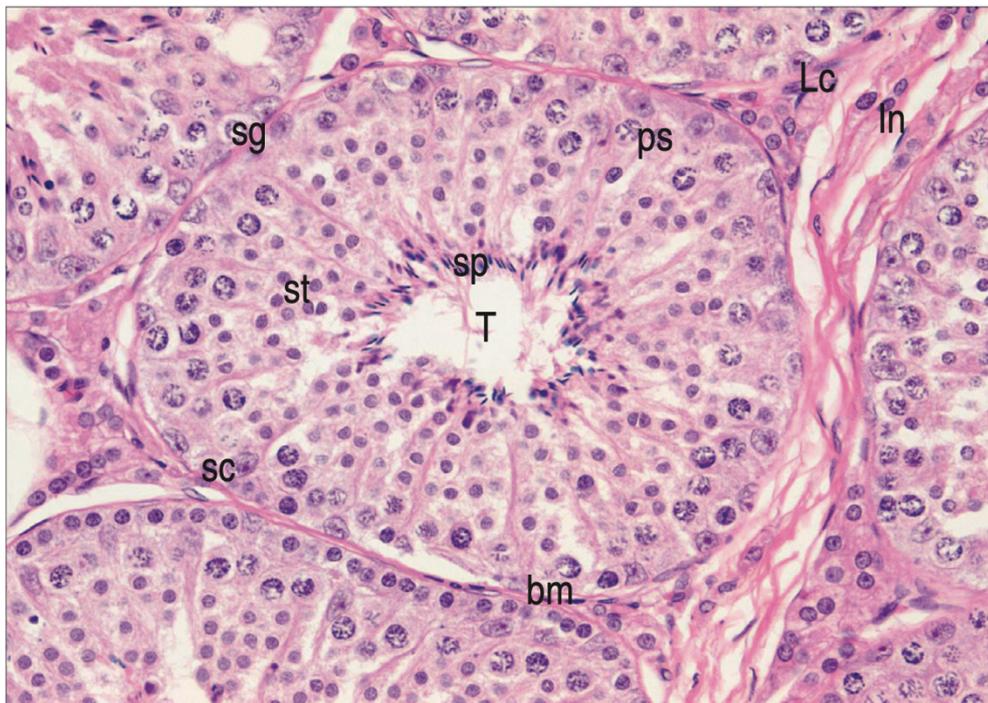


Figure 13 : Histologie du testicule. In : tissu interstitiel. Lc : cellules de Leydig. T : tubes séminifères. Sp : spermatozoïdes formés. Bm : membrane basale. Sg : spermatogonie. Sc : cellules de Sertoli. Ps : spermatocytes primaires. St : spermatides (Noakes *et al.*, 2019)

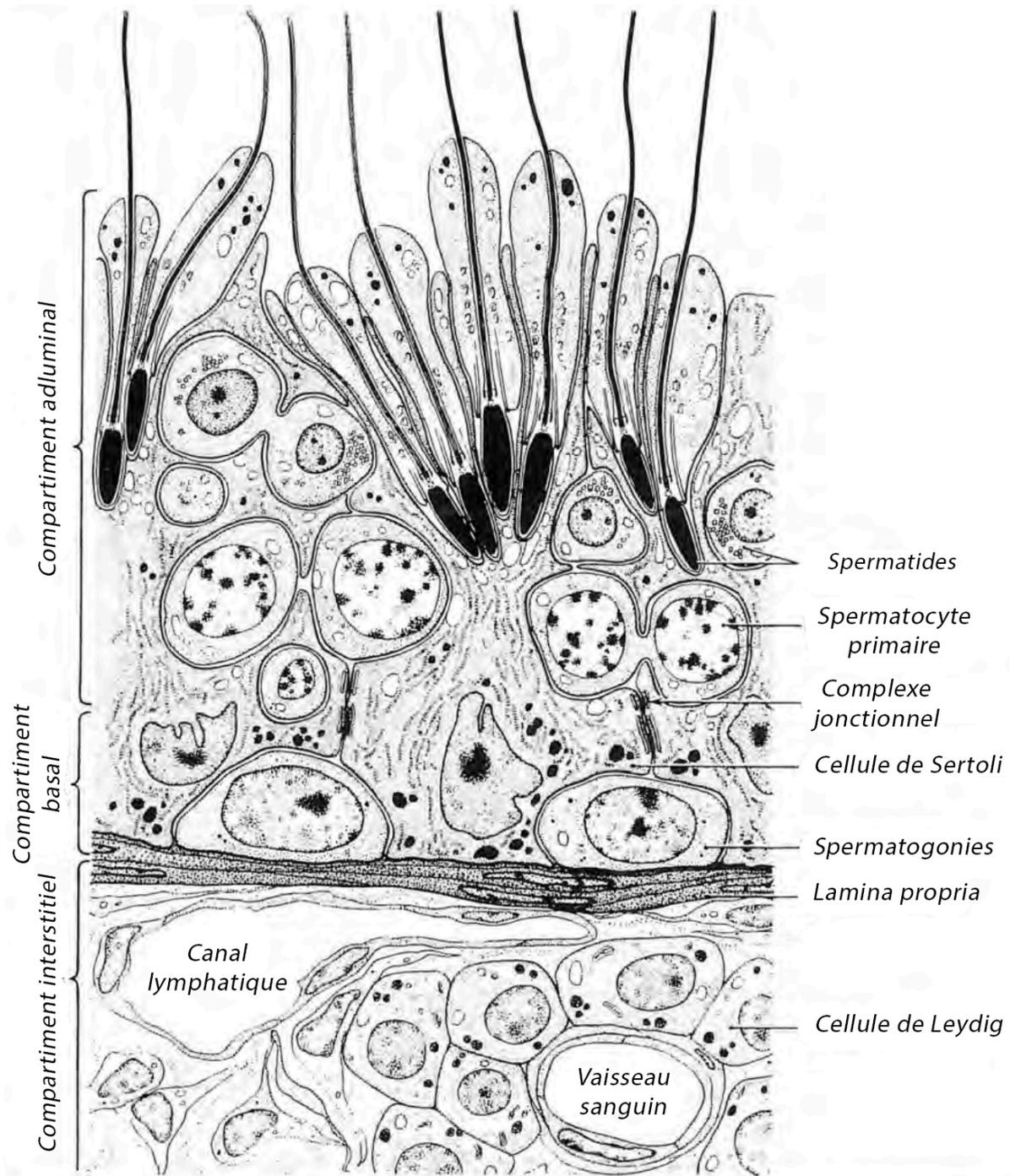


Figure 14 : Représentation schématique de l'histologie des tubes séminifères canins (Johnston et al., 2001)

iii) Déroulement de la spermatogénèse (1) La spermatocytogénèse

La spermatocytogénèse correspond à l'élaboration des spermatozoaires à partir des cellules germinales spermatogoniales qui se multiplient préalablement par mitoses pour concevoir une réserve de cellules primordiales. Elle débute par la division mitotique des cellules spermatogoniales de type A ($2n$) en spermatozoaires de type B ($2n$), puis en spermatozoaires primaires ($2n$) qui passent du compartiment basal au compartiment luminal. Ces derniers se

différencient à leur tour en spermatocytes secondaires (n) puis en spermatides (n) à l'occasion des deux divisions de méiose. Des ponts cytoplasmiques intercellulaires subsistent en raison d'une cytotéière incomplète (James *et al.*, 2020 ; Johnston *et al.*, 2001)

(2) La spermiogénèse et la spermiation

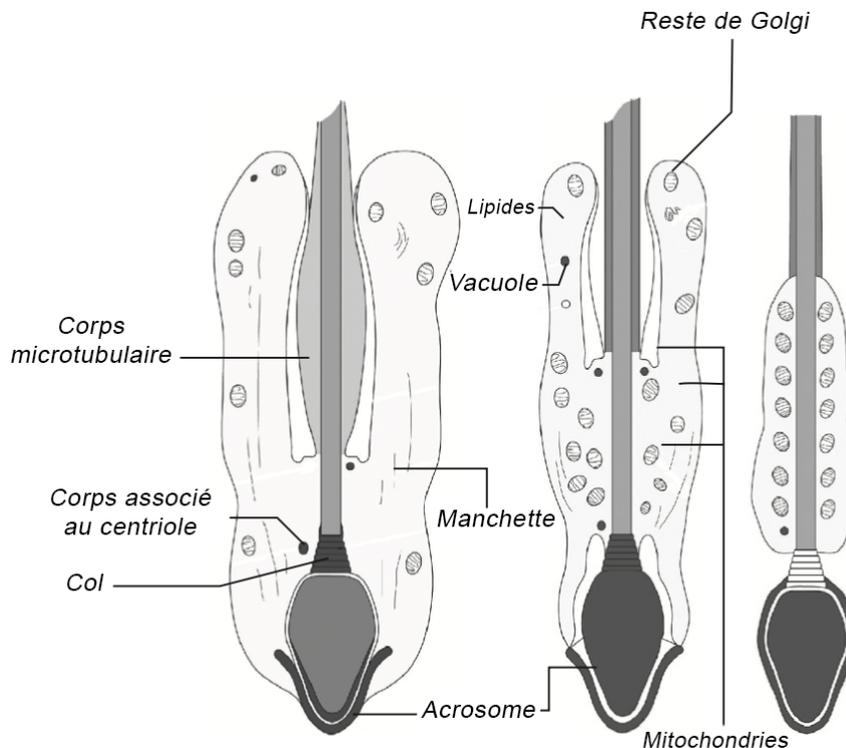


Figure 15 : Formation des spermatozoïdes dans les cryptes des cellules de Sertoli (Noakes *et al.*, 2019)

Au cours de la spermiogénèse, les spermatides se différencient en spermatozoïdes immatures. L'acrosome se forme à partir de l'appareil de Golgi puis s'allonge au-dessus du noyau tandis que la synthèse enzymatique s'accroît (Cunningham et Klein, 2013 ; Tulsiani *et al.*, 1998). Le flagelle émerge plus tardivement et s'étend à partir des centrioles. Le cytoplasme est progressivement phagocyté par les cellules Sertoli, bien qu'une gouttelette contenant le cytoplasme résiduel persiste en région flagellaire (James *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Hermo *et al.*, 2010 ; Toshimori, 2003 ; Johnston *et al.*, 2001). Les mitochondries adoptent leur position définitive dans la pièce intermédiaire, pendant que l'axonème, les fibres denses, la gaine fibreuse, le cytosquelette et la pièce de connexion sont assemblées (Tulsiani *et al.*, 1998). Enfin, le noyau s'allonge tandis que la chromatine se condense (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020). À ce stade, les spermatozoïdes immatures ont acquis leur morphologie définitive (James *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). La spermiation marque le détachement des

spermatozoïdes de l'épithélium et leur libération dans la lumière des tubes séminifères (James *et al.*, 2020).

e) La maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles

i) Généralités

Les spermatozoïdes libérés dans les tubes séminifères sont immatures, immobiles et demeurent incapables de féconder un ovocyte. Pendant une douzaine de jours, ils transitent dans l'épididyme pour y être maturés notamment dans la tête et le corps puis stockés (James *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Luvoni et Morselli, 2017). Considérant l'absence de transcription nucléaire, les spermatozoïdes immatures sont entièrement dépendants de l'environnement épидидymaire pour leur maturation (Gervasi et Visconti, 2017). Dans la tête de l'épididyme, grâce à une quantité modérée de ROS, la chromatine se condense par sulfoxydation des protamines permettant une compaction maximale de l'ADN (Noblanc *et al.*, 2011 ; Drevet, 2006 ; Vernet *et al.*, 2004).

ii) Maturation membranaire

La modification du protéome membranaire repose sur la sécrétion protéique des cellules principales qui s'associe à leur phosphorylation et à leur protéolyse. De plus, les épидидymosomes, vésicules sécrétées par les cellules principales de l'épididyme, assurent un transfert protéique membranaire supplémentaire au contact des spermatozoïdes notamment en cas de stress oxydatif (James *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; O'Flaherty, 2019 ; Gervasi et Visconti, 2017 ; Aalberts *et al.*, 2014 ; Toshimori, 2003). L'incorporation de sucres modifie la membrane, un bon exemple étant l'acide sialique dont l'ajout favorise le phénomène de capacitation (Gervasi et Visconti, 2017). L'action des glycosidases sur les glycanes est non négligeable (Toshimori, 2003). Le rapport cholestérol/phospholipides diminue et fluidifie la membrane, mais constitue un facteur sensibilisateur face aux dérivés oxygénés (Gervasi et Visconti, 2017). Les lipides peuvent également être adsorbés à la surface des spermatozoïdes par l'intermédiaire des prostasomes et des épидидymosomes (Sullivan et Saez, 2013 ; Leahy et Gadella, 2011 ; Dacheux *et al.*, 2003).

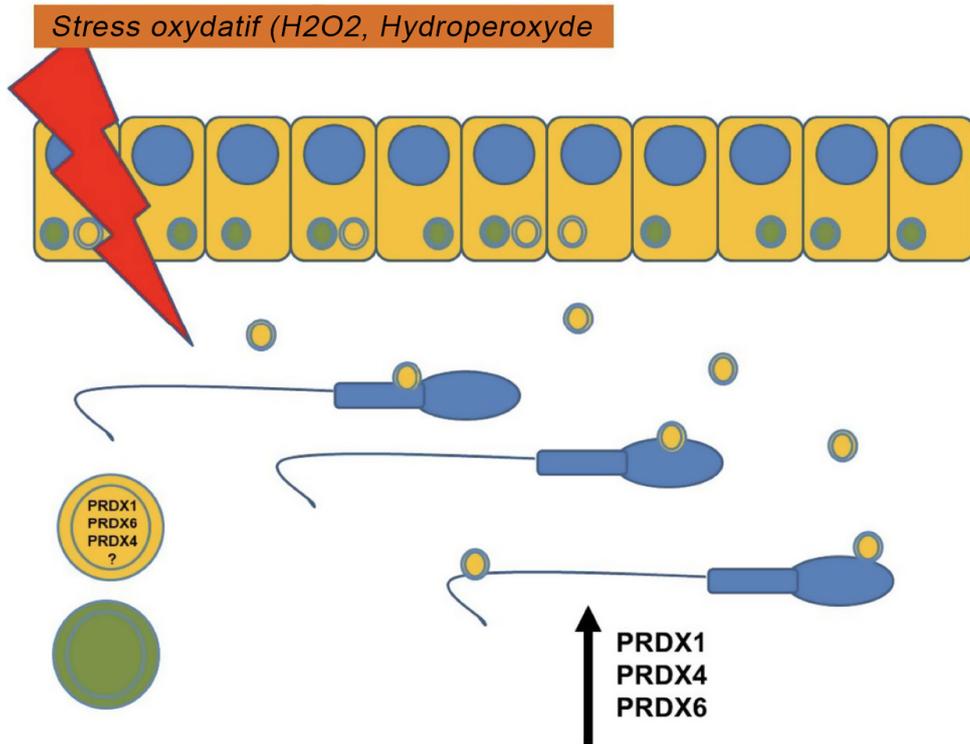


Figure 16 : Modèle d'interaction entre les épидидymosomes et les spermatozoïdes en cours de maturation épидидymaire (O'Flaherty, 2019)

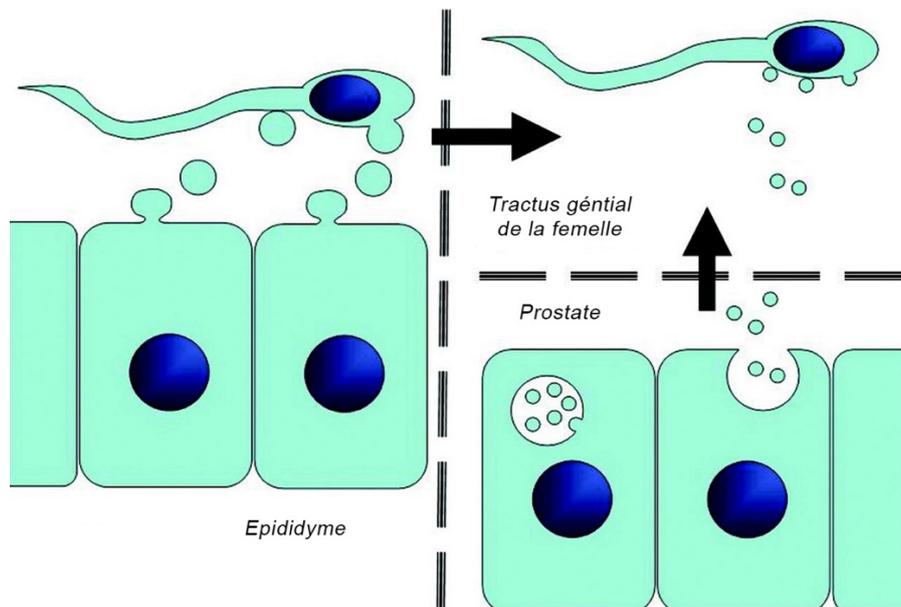


Figure 17 : Mode d'action suggéré des prostasomes et des épидидymosomes dans le tractus génital mâle et femelle (Aalberts et al., 2014)

iii) Modifications morphologiques

Après migration vers l'extrémité flagellaire, la gouttelette cytoplasmique est résorbée par les cellules claires de l'épididyme, puis excrétée au moment de l'éjaculation (James *et al.*, 2020). L'acrosome se positionne au-dessus de la membrane nucléaire et son volume s'amenuise (Varesi *et al.*, 2013). Les ROS notamment le peroxyde d'hydrogène, induisent la sulfoxydation des protéines structurales nucléaires, acrosomales et de la pièce intermédiaire ce qui affine la morphologie spermatique (Noblanc *et al.*, 2011).

iv) Modification de mobilité

La mobilité progressive, acquise suite au passage dans la queue de l'épididyme, définit un déplacement rectiligne dans une direction précise par un battement flagellaire de faible intensité (James *et al.*, 2020 ; Jouannet et Serres, 2013).

La concentration élevée en zinc ainsi que le pH acide de l'épididyme, maintiennent cependant les spermatozoïdes dans un état quiescent. Les premiers battements flagellaires ne sont initiés qu'à la faveur d'une alcalinisation, les cellules principales de la queue de l'épididyme excrétant alors des bicarbonates au moment de l'éjaculation. À ceci vient s'ajouter le mélange des spermatozoïdes au liquide prostatique alcalin. L'hypo-osmolarité qui s'y associe, permet le fonctionnement de la pompe Na^+/H^+ qui favorise l'alcalinisation intracellulaire. Ce phénomène, en association à l'action de l'adényl-cyclase sur l'ATP, augmente les taux d'APMc à l'origine de l'initiation du glissement axonémique (Lisboa *et al.*, 2021 ; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020 ; Cooper, 2011). Les prostasomes stimulent également la mobilité progressive par un transfert moléculaire et par fixation du zinc libre (Mogielnicka-Brzozowska *et al.*, 2015).

v) Acquisition de la capacité fécondante

À l'issue de la maturation, la fécondation est rendue possible par l'acquisition de facteurs de liaisons à la zone pellucide comme la protéine du récepteur du ZP3 ovocytaire (James *et al.*, 2020).

f) Le transport dans les voies génitales mâles

Une fois que les spermatozoïdes ont quitté l'épithélium séminifère, ils sont transportés jusque dans l'épididyme où leur acheminement se fonde sur le péristaltisme rythmé de l'épididyme, la ciliature cellulaire favorisant également leur progression. Stockés dans la queue

de l'épididyme, ils cheminent dans le canal déférent et dans l'urètre jusqu'à la sortie du pénis lors de l'éjaculation (James *et al.*, 2020 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Cunningham et Klein, 2013).

g) La maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle

i) La capacitation

Dans l'appareil génital de la femelle, les spermatozoïdes acquièrent un schéma de mobilité hyperactivée, la capacité à subir la réaction acrosomique et développent l'aptitude à fusionner avec la membrane ovocytaire (Aalberts *et al.*, 2014 ; Linde-Forsberg, 2001). Les spermatozoïdes qui ne sont pas capités sont incapables de se lier aux protéines ovocytaires ZP3 (Tulsiani *et al.*, 1998).

Divers remaniements membranaires se produisent après dépôt de la semence dans les voies génitales de la femelle. Une élimination des protéines épидидymaires et prostatiques se produit en association à l'action des glycosaminoglycanes de la femelle qui sont responsables d'une perte protéique substantielle supplémentaire. Les ROS en faible quantité sont impliqués dans la signalisation cellulaire de la capacitation. Le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde et l'oxyde nitrique permettent en ce sens l'oxydation des groupements thiols. Les chaînes oligosaccharidiques sont aussi remaniées ce qui facilite la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide. Tous ces événements sont déterminants dans la capacitation car ils permettent l'exposition des sites de fixation des protéines ZP3 (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020 ; Noblanc *et al.*, 2011 ; Thibault et Levasseur, 2001).

ii) L'hyperactivation de la mobilité

L'hyperactivation qui se définit comme le passage d'une mobilité progressive à un mouvement rapide asymétrique de grande amplitude et multidirectionnel, permet aux spermatozoïdes de quitter le réservoir oviductal, lieu d'acquisition de l'hyper-mobilité (Santi *et al.*, 2013 ; Linde-Forsberg, 2001). La force développée permet leur déplacement dans l'environnement visqueux des voies génitales féminines et soutient le franchissement du cumulus ovocytaire (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020 ; Aalberts *et al.*, 2014 ; Santi *et al.*, 2013 ; Thibault et Levasseur, 2001).

Sous l'influence de l'alcalinisation extra-cellulaire et de l'hyper-polarisation membranaire, le canal calcique CatSper s'ouvre, augmentant la concentration calcique intracellulaire en association à la mobilisation des réserves présentes dans les organites (Aalberts *et al.*, 2014 ; Jouannet et Serres, 2013). L'augmentation calcique stimule la production d'AMPC puis l'activation de la Protéine Kinase A (PKA) qui phosphoryle la tyrosine, permettant

l'acquisition d'une mobilité hyperactivée par accélération du glissement microtubulaire axonémique (Delgado-Bermúdez *et al.*, 2021 ; Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020 ; Aalberts *et al.*, 2014 ; Santi *et al.*, 2013 ; Rodriguez-Gil *et al.*, 2013 ; Michael *et al.*, 2009 ; Thibault et Levasseur, 2001). Une importante quantité d'ATP, obtenue par l'intense activité glycolytique, est requise (Le Couazer et Bencharif, 2021). À noter que la faible concentration en zinc du tractus féminin favorise l'hyper-activation (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020). De plus, le dépôt des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle permet leur entrée en contact avec les sources énergétiques qui promeut l'activation de ce processus (Rigau *et al.*, 2001).

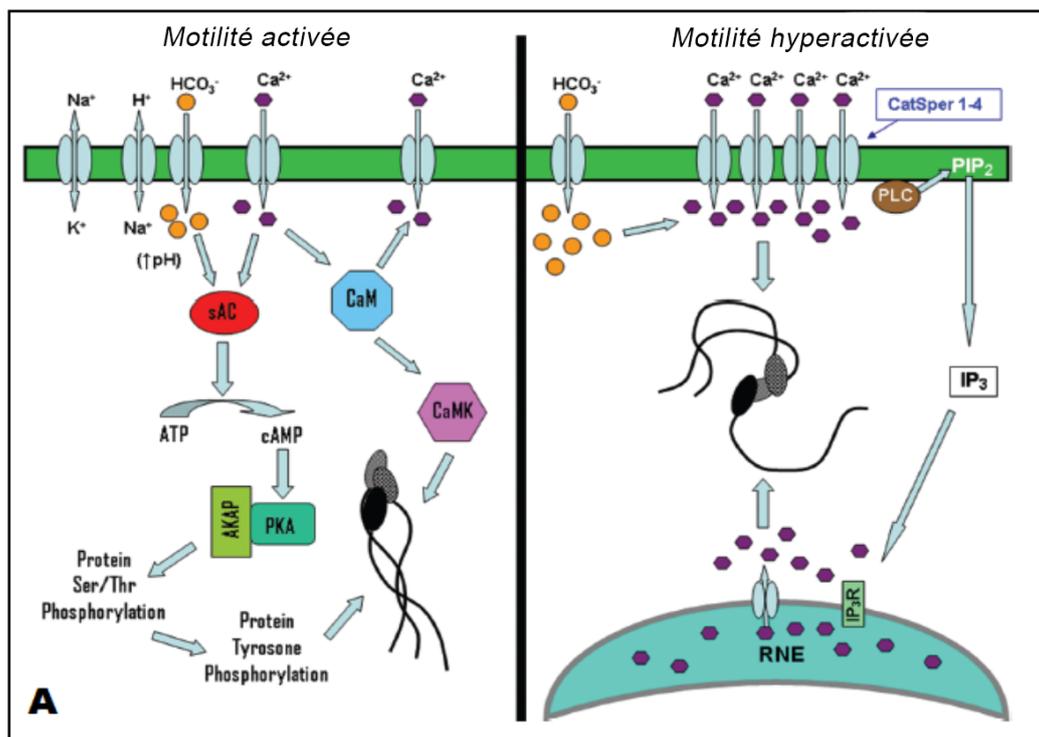


Figure 18 : Mécanisme de la mise en place de l'hyperactivation de la mobilité (Lisboa *et al.*, 2021)

iii) La réaction acrosomique

Lors de la liaison à l'ovocyte, la fusion du domaine membranaire apical et pré-équatorial avec la membrane externe de l'acrosome mène par afflux calcique à l'exocytose de son contenu (Noakes *et al.*, 2019 ; Aalberts *et al.*, 2014 ; Linde-Forsberg, 2001). La progestérone dont le récepteur est exposé par l'élimination protéique, en association à l'interaction des protéines ZP3 ovocytaires avec leurs récepteurs spermatiques, contribue à l'afflux calcique (Aalberts *et al.*, 2014). Des enzymes hydrolytiques comme la hyaluronidase ou l'acrosine sont libérées, ce qui assure la lyse du cumulus oophorus ainsi que la dissolution locale de la zone pellucide (Noakes *et al.*, 2019 ; Thibault et Levasseur, 2001). Une seconde interaction se produit avec la protéine

ZP2, consolidant l'attache du spermatozoïde et permettant sa pénétration oblique dans la zone pellucide, conduisant par la suite à la fusion des gamètes (Thibault et Levasseur, 2001).

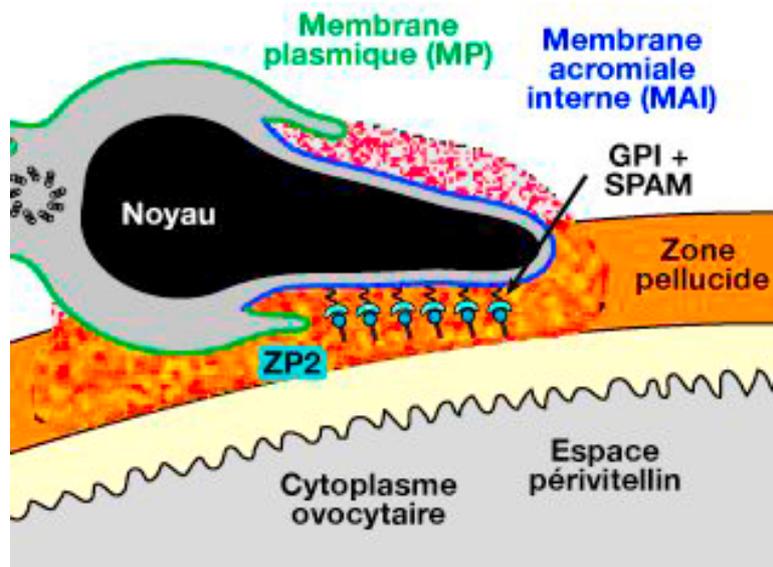


Figure 19 : Représentation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes canins (Source : Internet – vetopsy.fr)

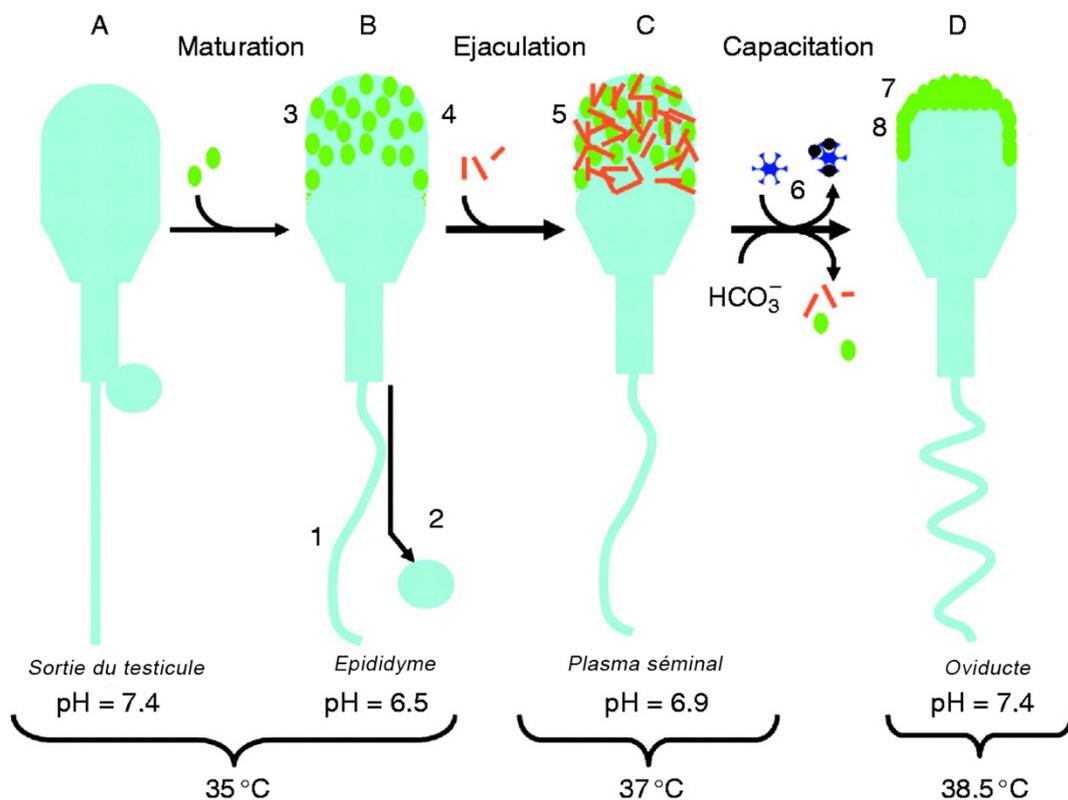


Figure 20 : Résumé des changements opérés lors de la maturation dans les voies génitales du mâle et de la femelle. 1 : spermatozoïde. 2 : perte de la gouttelette cytoplasmique. 3 : condensation de la chromatine. 4 : adsorption membranaire de protéines. 5 : adhésion des protéines du liquide prostatique. 6 : oxydation du cholestérol. 7 : agrégation des protéines épидидymaires. 8 : Migration des lipides membranaires (Leahy et Gadella, 2011)

2) LE RECUEIL DE LA SEMENCE CANINE

a) Les conditions

i) Conditions animales

Le mâle doit être seul dans la pièce sans aucun autre individu, bien qu'une chienne muselée en œstrus de même race et de même gabarit puisse être présente pour stimuler le mâle et améliorer la qualité de l'éjaculat. Sa présence ne doit cependant pas être contre-productive. Il est possible de stimuler le mâle par voie olfactive en utilisant un écouvillon imprégné des sécrétions d'une femelle en œstrus et conservé au congélateur (Greer, 2015 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). D'un point de vue sanitaire, le mâle ne doit pas avoir uriné avant le prélèvement et requiert un statut indemne de brucellose. S'il est timide, le laisser s'acclimater quelques minutes pour qu'il s'habitue à l'environnement de collecte peut être judicieux (Greer, 2015 ; Goericke-Pesch *et al.*, 2011).



Figure 21 : Recours à une femelle pour stimuler le mâle (Greer, 2015)

ii) Conditions matérielles

Des cônes collecteurs atraumatiques sont recommandés. Les gants à base de latex ou tout instrument de collecte en contenant sont proscrits, le latex étant nocif pour les spermatozoïdes. Le lubrifiant, souvent nuisible, ne doit pas non plus entrer en leur contact à l'exception de certains agents non-spermicides comme la glycérine en faible quantité. Le matériel doit être stérilisé et exempt de moisissures, de poussières et de résidus chimiques. Avant utilisation, un rinçage à l'eau distillée est préconisé pour éliminer les restes de produits désinfectants spermicides. Le matériel, y compris les tubes de centrifugation, doivent être préalablement réchauffés à + 37°C. Diverses molécules comme les prostaglandines, la GnRH et l'hCG (hormone Chorionique Gonadotrope) peuvent être administrées pour obtenir un

éjaculat de meilleure qualité. Si l'animal présente une quelconque affection ou une douleur le jour du prélèvement, il faut s'assurer qu'elle ne nuise pas à l'obtention d'un éjaculat de qualité et y remédier. La semence recueillie doit être manipulée avec le plus grand soin et les tubes doivent être correctement identifiés avec le nom de l'animal et la date du prélèvement (Fontbonne, 2022 ; Greer, 2015 ; Johnston *et al.*, 2001).



Figure 22 : Manchon plastique dédié au prélèvement de la semence canine (Greer, 2015)

iii) Conditions humaines

Le nombre de personnes présentes doit être minimisé et limité. Le port de la blouse blanche qui intimiderait le mâle doit être évité (Fontbonne, 2022). L'opérateur qui réalise le prélèvement doit être toujours le même (Greer, 2015).

iv) Conditions environnementales

L'environnement de collecte doit être calme et confortable, le sol antidérapant et propre (Johnston *et al.*, 2001). Des tapis imbibés des odeurs d'une femelle peuvent être employés pour stimuler le mâle et améliorer le confort de l'animal et de l'opérateur (Greer, 2015). La surface de la pièce doit être restreinte (Fontbonne, 2022).



Figure 23 : Récolte de semence dans un environnement idéal (Greer, 2015)

b) Méthode de prélèvement

i) Généralités

Bien que l'électro-éjaculateur soit décrit, le recueil manuel est la technique la plus utilisée (Johnston *et al.*, 2001 ; Bartlett, 1962). L'opérateur doit se munir d'un vagin artificiel lubrifié au bout duquel est fixé un tube à centrifuger. La première fraction présentant une contamination bactérienne accrue et la troisième fraction étant peu concentrée, il est préférable de procéder à la séparation des trois fractions en changeant de tube entre chacune d'elles. En effet, leur mélange entraîne une dilution des spermatozoïdes et réduit leur mobilité et leur viabilité. En cas de mélange indésirable, une dilution dans une solution saline suivie d'une centrifugation est utile pour accroître la concentration de l'échantillon (Noakes *et al.*, 2019 ; Goericke-Pesch *et al.*, 2011 ; Kutzler, 2005 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Différentes études démontrent que la qualité du sperme est améliorée si la récolte n'est pas plus fréquente que tous les 2 à 5 jours, les spermatozoïdes mûrissant plus longtemps (Noakes *et al.*, 2019 ; Feldman et Nelson, 2004 ; England, 1999). Lors de repos sexuel prolongé, la qualité décroît néanmoins, des débris cellulaires et des spermatozoïdes moribonds ou morts s'accumulant (Kustritz, 2007 ; England, 1999).

ii) Méthode de récolte

Le mâle est contenu fermement au moment du prélèvement. Le prépuce est tout d'abord rétracté puis le cône collecteur est placé au niveau de la verge de sorte que l'écoulement dans le tube se fasse sans entrer en contact avec le matériel de récolte. L'érection est obtenue par

massage des bulbes érectiles par l'opérateur agenouillé à côté du mâle. La masturbation est susceptible de provoquer une détumescence précoce chez certains chiens. Le pénis est maintenu fermement et des pressions sur les bulbes et la verge sont effectuées pour simuler les contractions des lèvres vulvaires et du vagin (Fontbonne, 2022 ; Kutzler, 2005 ; Johnston *et al.*, 2001).

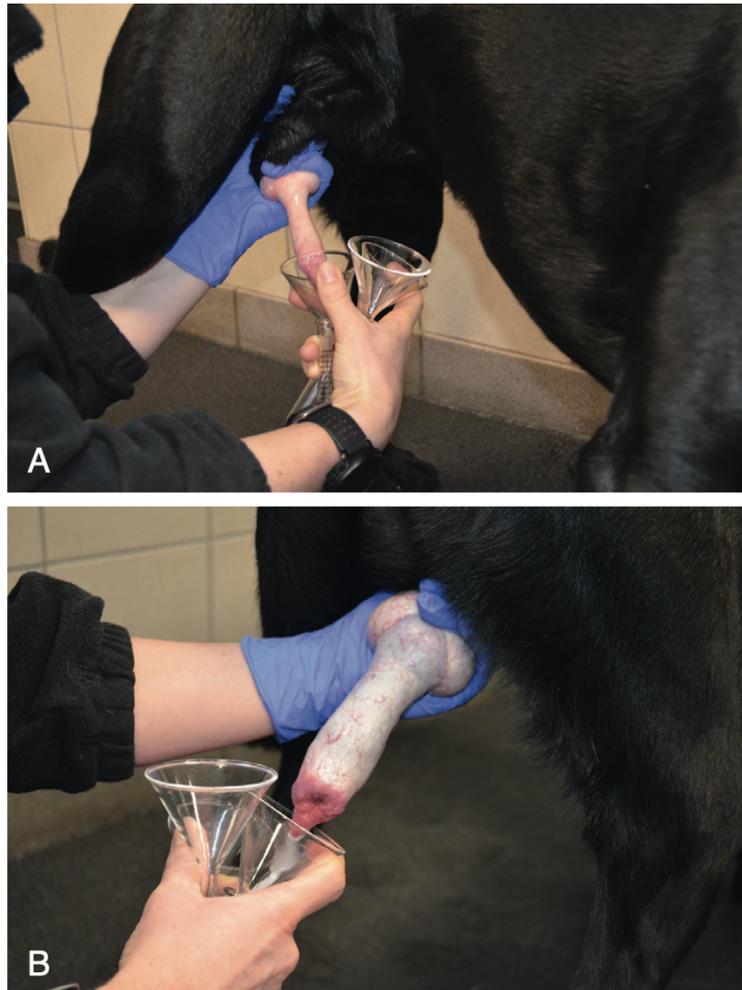


Figure 24 : Recueil manuel de semence chez un chien mâle (Noakes *et al.*, 2019)

La première fraction est émise au moment des poussées pelviennes du mâle en une cinquantaine de secondes (Fontbonne, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019). L'émission de la fraction riche en spermatozoïdes s'amorce lorsque les poussées pelviennes cessent. Bien qu'elle ne dure que quelques secondes, l'opérateur peut continuer la collecte tant qu'elle est d'aspect trouble (Noakes *et al.*, 2019 ; Feldman et Nelson, 2004). Afin de maintenir l'érection, la pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (Fontbonne, 2022). La transition vers une phase plus claire marque le passage à la troisième fraction (Feldman et Nelson, 2004). Son éjection rythmique et puissante se produit pendant la phase de verrouillage après que le mâle se soit entièrement retourné et que son pénis soit orienté horizontalement à 180°, mimant la position des deux partenaires lors de la saillie (Johnston *et al.*, 2001). Ce processus préserve l'érection,

accroît le volume éjaculé et favorise la propulsion de la semence vers l'utérus (Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Délétère pour la conservation au froid de la semence, elle doit être jetée après récolte. Toutefois, en cas d'insémination artificielle à l'aide de sperme fraîchement recueilli, elle peut être conservée. En effet, la phase urétrale est déposée dans les voies génitales en premier lieu, suivie de la phase spermatique puis prostatique (Noakes *et al.*, 2019 ; Fontbonne, 2022).

À l'issue de l'éjaculation, la pression est relâchée et le cône est délicatement retiré (Kalkan et Ucar, 2022 ; Kutzler, 2005 ; Johnston *et al.*, 2001).

3) ÉVALUATION DE LA SEMENCE CANINE

Le spermogramme évalue les propriétés macroscopiques et microscopiques des spermatozoïdes tandis que le spermocytogramme examine leurs caractéristiques morphologiques (Fontbonne, 2022).

a) Généralités sur l'examen de la semence canine

L'évaluation est effectuée immédiatement après recueil de la fraction spermatique. Elle doit être maintenue à 37°C. Le microscope doit être équipé d'une platine chauffante et d'objectifs 4x, 10x, 40x et 100x. Les lames ainsi que les colorants doivent être réchauffés au préalable (Noakes *et al.*, 2019 ; Feldman et Nelson, 2004). Une attention particulière doit être portée sur les résultats, une réduction qualitative artéfactuelle pouvant découler d'un repos sexuel prolongé, de prélèvements trop fréquents ou bien d'erreurs de manipulation, et mener à considérer à tort un animal comme peu fertile (Vázquez *et al.*, 2016 ; Kustritz, 2007 ; Johnston *et al.*, 2001). De surcroît, une atteinte profonde des testicules peut prendre plusieurs jours avant que ses répercussions ne se manifestent dans l'éjaculat (Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Les caractéristiques prises individuellement ne permettent pas de préciser le statut d'un individu, bien que la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes progressifs mobiles, ainsi que la morphologie soient bien corrélés à la fertilité (Feldman et Nelson, 2004). Ainsi, une approche plus holistique est requise afin d'apprécier la qualité de la semence dans son ensemble ainsi que son pouvoir fécondant.

b) Examen macroscopique

i) Le volume

Le volume de la phase spermatique est directement apprécié après la récolte. Le volume est généralement de l'ordre de 2 à 3 mL. Il est important de considérer à ce stade qu'il n'est pas représentatif de la fertilité. L'échec d'obtention de sperme après une tentative de récolte caractérise l'aspermie à différencier de l'oligospermie qui définit l'insuffisance d'émission de sperme malgré la persistance de l'érection et de la libido. La mesure du volume permet de calculer la concentration totale en spermatozoïdes, indicateur fortement corrélé à la fertilité (Fontbonne, 2022 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001).

ii) L'aspect et la couleur

Bien que subjective, l'aspect et la couleur permettent de détecter diverses anomalies (Noakes *et al.*, 2019 ; Feldman et Nelson, 2004). Physiologiquement, le sperme canin est d'aspect blanchâtre à opalescent et peu visqueux. Une teinte jaunâtre souligne une contamination par de l'urine (urospermie), mais peut aussi évoquer un exsudat inflammatoire

qui suggère un phénomène infectieux notamment si elle apparaît verdâtre (pyospermie). Elle devient rosée à rougeâtre en cas d'hémorragie, voire marron si elle est ancienne et d'origine prostatique. Ce phénomène est appelé hémospermie. Une hémospermie peut être transitoire et non pathologique en cas d'excitation prolongée préalablement à la saillie (Greer, 2015 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Un éjaculat clair et translucide témoigne d'une faible concentration en spermatozoïdes et définit l'azoospermie (Feldman et Nelson, 2004). Les échantillons présentant une anomalie d'aspect et de couleur sont à proscrire pour l'insémination et la conservation par réfrigération ou congélation (Fontbonne, 2022).

iii) Le pH

La mesure du pH est effectuée d'emblée après prélèvement sur un papier pH. Il est compris entre 6,3 et 6,7, mais dépend de la quantité récoltée de la fraction prostatique (Greer, 2015 ; Feldman et Nelson, 2004).

c) Examen microscopique

i) Numération de la semence

(1) Définitions

La numération détermine la richesse en spermatozoïdes d'un éjaculat. Un échantillon de sperme canin fraîchement éjaculé compte en moyenne entre 100 à 5 000.10⁶ spermatozoïdes, les grandes races présentant une concentration bien plus importante que les petites race (Fontbonne, 2022 ; Johnston *et al.*, 2001). La diminution ou l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat définit respectivement l'oligozoospermie et l'azoospermie (Fontbonne, 2022 ; Greer, 2015 ; Johnston *et al.*, 2001). Un dosage de la Phosphatase Alcaline (PAL) inférieur à 5 000 UI/L révèle une éjaculation incomplète rendant le résultat de la numération peu exploitable (Fontbonne, 2022).

(2) Microscope optique : comptage manuel

Le comptage manuel repose sur l'utilisation d'un hémocytomètre ou chambre de comptage cellulaire de type Thoma ou Malassez, composé de deux emplacements quadrillés de profondeur constante (Fontbonne, 2022 ; Johnston *et al.*, 2001). Les échantillons trop concentrés sont dilués au 1/200^{ème} par une solution saline tamponnée ou par une solution de citrate de sodium à 2,9 % (Vázquez *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001). L'immobilisation des spermatozoïdes est obtenue par l'ajout d'une solution hypertonique de NaCl à 3 % (Fontbonne, 2022). Après dépôt entre lame et lamelle, l'échantillon se distribue par capillarité dans la chambre et les spermatozoïdes sont dénombrés au bout de 5 minutes. Seuls ceux superposés aux lignes supérieures et gauches sont comptabilisés, les résultats des deux chambres étant

ensuite moyennés pour limiter les biais. Bien que fastidieuse et subjective, cette méthode demeure peu onéreuse et facile à mettre en œuvre et affiche une précision équivalente aux systèmes informatisés (Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Kustritz, 2007 ; Greer, 2015 ; Feldman et Nelson, 2004).

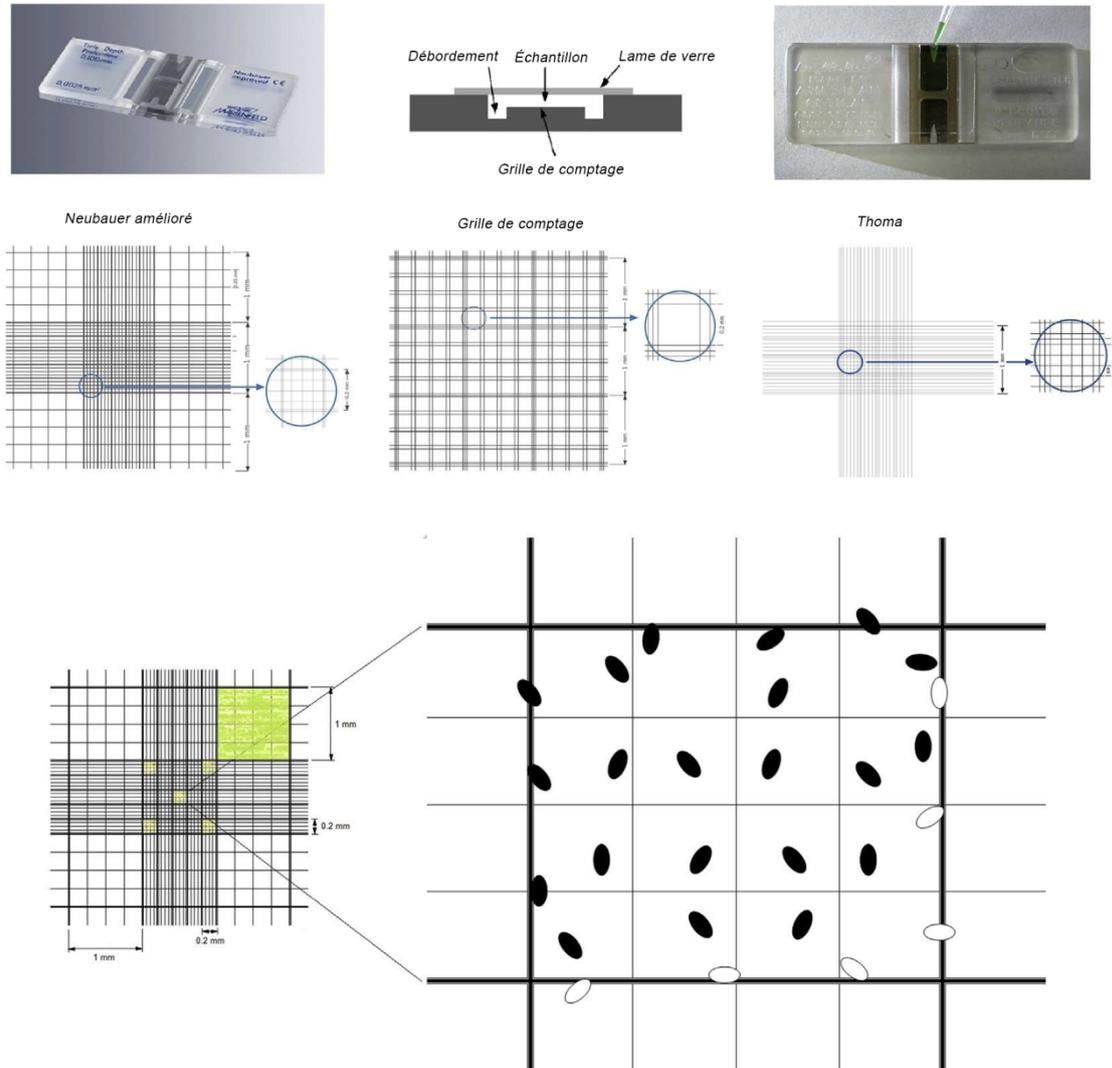


Figure 25 : Lames hémocytométriques utilisées pour le comptage cellulaire (Brito *et al.*, 2016)

(3) Systèmes informatisés

Les systèmes informatisés permettant une analyse du sperme assistée par ordinateur ou CASA (*Computer-Aided Sperm Analysis*), sont des appareils performants, rapides et dénués de subjectivité, reproductibles et qui permettent une analyse simultanée de plusieurs paramètres spermatiques (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Vázquez *et al.*, 2016 ; Rijsselaere *et al.*, 2012). Ils ont été décrits pour la première fois en 1979 par DOTT et FOSTER pour de nombreuses espèces, mais en ce qui concerne le chien, leur utilisation a été décrite plus tardivement (Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et al.*, 2003).

Divers systèmes CASA existent comme l'IVOS II Hamilton-Thorne qui se compose d'un microscope à contraste de phase, d'une platine chauffante, d'une caméra ainsi que d'un numérateur d'images raccordé à un ordinateur qui permet d'analyser les mouvements des spermatozoïdes et de reconstruire leur trajectoire (Finelli *et al.*, 2021 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Iguer-Ouada et Versteegen, 2001). Bien que de plus en plus courants, ils ne sont pas pour autant exempts d'inconvénients, leur coût prohibitif étant le principal frein à leur utilisation. L'identification de cellules inflammatoires ou épithéliales comme des spermatozoïdes ainsi qu'une concentration trop élevée (agglutination menant à une sous-estimation) contribuent au même titre que les erreurs de manipulation à fausser le dénombrement (Finelli *et al.*, 2021 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et al.*, 2003).

La cytométrie en flux est une technique de tri cellulaire qui repose sur l'exposition de cellules marquées par un fluorochrome à un faisceau laser (Brito *et al.*, 2016 ; Martínez, 2004). La fluorescence émise est détectée par l'appareil qui détermine la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes. Le NucleoCounter SP-100, employant l'iodure de propidium, a été validée chez le chien pour la numération de la semence diluée (Watts, 2019 ; Kolster, 2018 ; Brito *et al.*, 2016).

La spectrophotométrie qui mesure la densité optique d'une solution est aussi utilisable (Brito *et al.*, 2016). Reconnue comme efficace, peu onéreuse et beaucoup moins laborieuse que la mesure par hémocytomètre, elle est cependant peu adaptée à l'analyse du sperme dilué (Watts, 2019).

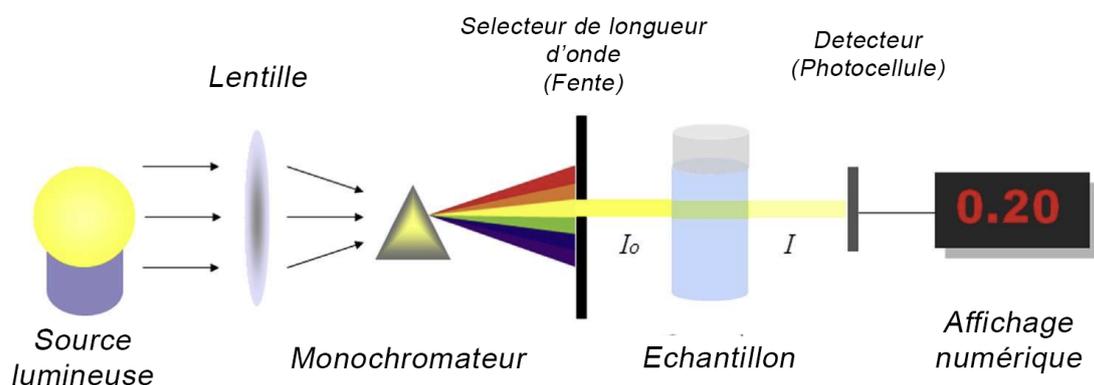


Figure 26 : Principe de fonctionnement de la spectrophotométrie (Brito *et al.*, 2016)

À noter que l'intelligence artificielle en plein essor pourrait contribuer dans un futur proche à ouvrir de nouvelles perspectives dans l'analyse de la semence (Finelli *et al.*, 2021).

ii) Mobilité de la semence

(1) Définitions et principes

L'évaluation de la mobilité est un examen dynamique qui détermine la fertilité des spermatozoïdes éjaculés (Goericke-Pesch *et al.*, 2012). Elle apparaît comme étant positivement corrélée aux taux de fécondation des ovocytes humains et animaux (Verstegen *et al.*, 2002).

Elle doit être effectuée aussitôt la semence récoltée (Bencharif *et al.*, 2013 ; Feldman et Nelson, 2004). La température de l'échantillon doit être maintenue à 37°C, toute fluctuation brusque pouvant fausser les résultats (Feldman et Nelson, 2004). Le pourcentage de mobilité progressive est positivement corrélé à l'intégrité membranaire. Une semence de bonne qualité affiche un pourcentage de mobilité totale de 70 % minimum, des valeurs inférieures définissant l'asthénozoospermie (Fontbonne, 2022 ; Martínez, 2004). La gestation ne peut être espérée que si elle est supérieure ou égale à 30 % (Tainturier *et al.*, 2013 ; Martínez, 2004).

(2) Microscope optique : évaluation manuelle

L'évaluation de la mobilité totale est l'un des paramètres le plus pertinent pour estimer la fertilité d'un mâle (Rigau *et al.*, 2001). Après recueil, une goutte peut être directement analysée au microscope à contraste de phase pour estimer la mobilité massale selon la table de MILOVANOV, des mouvements tourbillonnants assortis d'un déplacement non progressif en étant caractéristiques. Cette technique ne constitue pas une méthode fiable pour apprécier la fertilité (Bencharif *et al.*, 2013 ; Greer, 2015 ; Martínez, 2004).

Le pourcentage de spermatozoïdes fléchants est un paramètre plus précis à mesurer. Une goutte de l'échantillon est évaluée par microscopie à contraste de phase et les spermatozoïdes sont dénombrés, les déplacements non progressifs, latéraux, ou en cercles étant anormaux (Fontbonne, 2022 ; Kustritz, 2007 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). L'évaluation manuelle reste une technique intéressante, en dépit de son importante variabilité, de sa subjectivité et de son caractère fastidieux (Surmacz *et al.*, 2022). Une surestimation imputable aux erreurs de lecture et de manipulations par l'opérateur est probable et peut ébranler la justesse des résultats (Feldman et Nelson, 2004). Il a d'ailleurs été rapporté qu'une forte variabilité des mesures de mobilité existait pour un seul et même éjaculat évalué par différents opérateurs (Rijsselaere *et al.*, 2003 ; Mortimer et Tan, 1986). Il est donc préférable d'approfondir l'analyse par le biais d'un examen informatisé plus complet.

(3) Systèmes informatisés

Le système IVOS II Hamilton-Thorne est validé pour l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes canins. Il fonctionne par reconstruction des déplacements spermatiques en se basant séquentiellement sur la position de la tête du spermatozoïde d'une image à l'autre. Il permet ainsi de mettre en évidence de subtils changements dans le schéma de mobilité que l'analyse conventionnelle ne peut à elle seule détecter (Rijsselaere *et al.*, 2003). Il maintient la température et par là même des conditions optimales tout au long de l'analyse, une température de 38°C ayant été caractérisée comme permettant d'obtenir des résultats optimaux (Finelli *et al.*, 2021 ; Tanga *et al.*, 2021 ; Rijsselaere *et al.*, 2004 ; Iguer-Ouada et Verstegen, 2001).

D'une remarquable précision, ils permettent de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à déplacements progressifs ainsi qu'un ensemble de paramètres cinétiques (Tanga *et al.*, 2021 ; Van der Horst, 2020 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Kustritz, 2007 ; Rijsselaere *et al.*, 2003 ; Iguer-Ouada et Verstegen, 2001) :

- La mobilité totale exprimée en % : reflète le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes, qu'il soit progressif ou non.
- La mobilité progressive exprimée en % : détermine le pourcentage de spermatozoïdes présentant une mobilité fléchante ou progressive, avec un déplacement rapide et en ligne droite. Il s'agit de l'un des critères les plus importants à considérer car il reflète concomitamment la vitesse de progression moyenne (VAP) ainsi que la rectitude (STR).
- La vitesse moyenne (VAP) exprimée en $\mu\text{m/s}$: il s'agit de la vitesse de déplacement moyenne des spermatozoïdes dans un échantillon donné qui est calculé par l'algorithme du système CASA.
- La vitesse curviligne (VCL) exprimée $\mu\text{m/s}$: il s'agit de la distance moyenne parcourue par unité de temps mesurée à chaque instant sur toute la trajectoire du spermatozoïde.
- La vitesse en ligne droite (VSL) exprimée en $\mu\text{m/s}$: il s'agit là de la vitesse moyenne en ligne droite des spermatozoïdes mesurée entre les deux dernières positions détectées.

- L'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH) exprimée en μm : il s'agit d'une mesure de la largeur moyenne du déplacement de la tête par oscillations. Plus cette valeur est élevée, plus les battements de la tête sont importants. Elle reflète l'aptitude d'un spermatozoïde à franchir la zone pellucide de l'ovocyte.
- La linéarité (LIN) exprimée en % : il s'agit du rapport moyen entre les vitesses en ligne droite et curviligne (VSL/VCL). Elle représente la proximité de la trajectoire du spermatozoïde par rapport à une ligne droite.
- La rectitude (STR) exprimée en % : obtenue par l'intermédiaire du rapport moyen de la vitesse en ligne droite sur la vitesse moyenne (VSL/VAP). Elle représente la proximité de la trajectoire du spermatozoïde par rapport à une ligne droite. Plus elle se rapproche de 100 %, plus elle est optimale et caractérise une trajectoire rectiligne.
- La fréquence de battement croisé (BCF) exprimée en Hz : il s'agit de la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde effectue son déplacement (Hz).
- L'élongation (ÉLONGATION) exprimée en % : il s'agit d'une mesure qui évalue les dimensions de la tête des spermatozoïdes (rapport de la largeur sur la longueur).

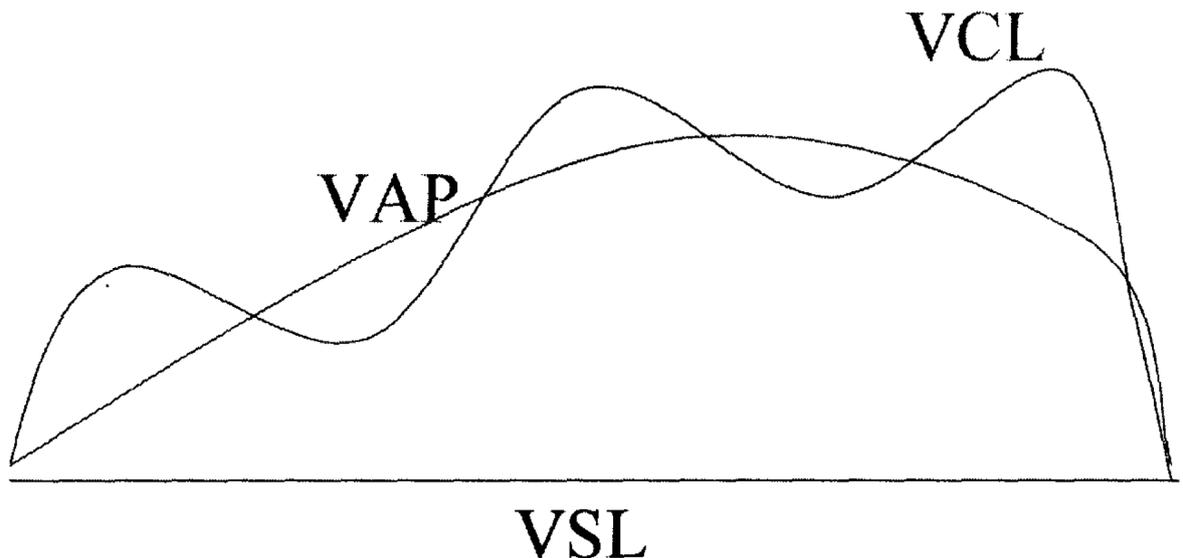


Figure 27 : Représentation schématique de différentes vitesses analysées par système CASA (Verstegen et al., 2002)

Le schéma de mobilité des spermatozoïdes peut finalement être déduit des valeurs des paramètres cinétiques mesurés. Une chute de la mobilité progressive, de la LIN et de la STR associées à un accroissement de la VCL et de l'ALH suggèrent par exemple un état de mobilité hyperactivée (Dalmazzo *et al.*, 2019 ; Rijsselaere *et al.*, 2012). Ainsi donc, les changements observés au cours de l'hyperactivation comprennent une augmentation de l'amplitude des mouvements latéraux de la tête et du flagelle, une chute de la fréquence de battement flagellaire et de la mobilité qui devient non progressive (Verstegen *et al.*, 2002).

Dès l'éjaculation, une diminution progressive de la mobilité se produit. Rigau *et al.*, en 2001, ont démontré que la mobilité des spermatozoïdes fraîchement éjaculés et conservés 1 heure à 37°C diminue en association à la VAP et à la LIN. En regard, une augmentation de la BCF se produit. L'ajout de fructose à hauteur de 1 à 10 mM permet d'accroître la LIN et de réduire la BCF de manière plus efficace que le glucose (Rigau *et al.*, 2001).

Tableau II : Paramètres de mobilité de la semence canine d'après une étude sur 42 chiens beagles mâles (d'après Iguer-Ouada et Verstegen, 2001)

	Moyenne	Minimum	Maximum
Concentration (10. ⁶ cellules/mL)	390 ± 111	332	658
Mobilité (%)	89 ± 6	73	99
Progressive (%)	61 ± 9	43	75
VAP (µm/sec)	107 ± 20	81	146
VSL (µm/sec)	88 ± 15	64	121
VCL (µm/sec)	163 ± 43	103	235
ALH (µm)	7 ± 2	4	11
BCF (Hz)	25 ± 5	17	34
Rectitude (%)	81 ± 5	67	90
Linéarité (%)	55 ± 10	37	70
Élongation (%)	65 ± 4	59	76

Dans le cadre de cette étude, il est important de noter que les paramètres cinétiques sont essentiels pour l'estimation de la qualité d'un milieu de conservation de sperme. En effet, une étude récente sur la semence canine cryoconservée a montré que la mobilité progressive, la VCL, la STR et la LIN en association sont prédictifs de la qualité du dilueur. Par exemple, la VCL des milieux les moins performants était plus faible que celle des plus performants. Les meilleurs milieux affichaient ainsi des VCL similaires à celles des chiens fertiles, alors les plus

mauvais montraient des résultats se rapprochant de celles des chiens hypofertiles (Schäfer-Somi et Tichy, 2019).

Des différences significatives entre les chiens fertiles et hypofertiles ont également été décelées pour la plupart des paramètres cinétiques avec le système Hamilton-Thorne (Rijsselaere *et al.*, 2012). D'après Verstegen *et al.*, en 2002, la semence canine d'individus fertiles et infertiles peut se différencier par l'évaluation des paramètres cinétiques et notamment de la VAP, de la VSL, de la VCL et de la BCF, qui sont suspectées d'être corrélées à la pénétration ovocytaire du spermatozoïde. À noter que selon Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001, la mobilité progressive, la VAP, la STR et l'ALH sont directement corrélés à la fertilité.

Aussi, concernant le paramètre d'élongation, une étude a montré chez l'Homme qu'il pouvait être associé à une mauvaise qualité de la semence. En effet, les échantillons qui présentaient des valeurs élevées d'élongation ont aussi affiché des paramètres de concentration, de numération, de mobilité totale et progressive significativement moins bons. D'autres études ont également mis en évidence une fragmentation de l'ADN accrue associée à un taux de fécondité plus faible possiblement liés à une activité anormale de l'acrosine (Chen *et al.*, 2019).

Les résultats peuvent néanmoins être influencés par des artefacts tels qu'un manque de contraste ou bien par la présence de saletés et de débris cellulaires (Tanga *et al.*, 2021). Mais d'autres éléments peuvent également interférer avec les résultats comme la température lors de l'évaluation. En effet, Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001, ont démontré que la mobilité des spermatozoïdes est influencée par la température lors de l'analyse, mais également que l'intégralité des paramètres cinétiques diminue à une température non corporelle (30°C contre 38°C).

D'autres éléments influencent aussi les paramètres, comme le nombre de champs évalués, la précision s'améliorant lorsque la quantité de champs évalués augmente (Verstegen *et al.*, 2002).

Le type de chambre utilisé peut également influencer la justesse des résultats, tout comme la fréquence d'acquisition des images (nombre d'images analysées par secondes) qui peut induire une augmentation de la vitesse des spermatozoïdes à mesure que la fréquence d'acquisition augmente, menant à une modification artéfactuelle de la STR, ALH, BCF, VCL et LIN. En effet, une fois reconstruite, la trajectoire calculée des spermatozoïdes est influencée par la fréquence d'acquisition. Une vitesse d'acquisition élevée trouve ainsi son intérêt dans la résolution spatio-temporelle qu'elle fournit en augmentant le nombre d'images et en

conséquence la précision de l'analyse. De manière plus générale, plusieurs paramètres cinétiques se voient impactés par cette fréquence. La concentration en spermatozoïdes est également susceptible d'influencer la VSL, VCL et VAP. En effet, le sperme canin est par nature beaucoup trop concentré et requiert une dilution avant toute analyse par système CASA dont la justesse peut être mise à mal par des défauts de lecture (superpositions, collisions). Une concentration supérieure à 100.10^6 spermatozoïdes/mL serait excessive et ne permettrait pas de satisfaire aux bonnes conditions techniques d'analyse. Il semble que le diluant utilisé pour disperser les spermatozoïdes lors de l'analyse soit également une source de variabilité (Van der Horst, 2020 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et al.*, 2003 ; Verstegen *et al.*, 2002). Rijsselaere *et al.*, en 2003, ont montré que le recours à une dilution à hauteur de 50.10^6 spermatozoïdes/mL associée à une solution saline (dépourvue de substrat énergétique ou de particules comme c'est le cas dans le jaune d'œuf) et une numérisation de 30 images à une cadence de 60 images par seconde constituent un paramétrage adéquat pour l'acquisition des résultats de mobilité.

Quoiqu'il en soit, de nombreux paramètres influençant les résultats d'analyses assistées par ordinateur ne sont pas encore entièrement compris d'autant plus qu'aucun seuil limite pour ces paramètres n'a été déterminé (Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et al.*, 2003). Il est ainsi fondamental d'interpréter les valeurs obtenues en considérant les réglages de l'appareil (Verstegen *et al.*, 2002).



Figure 28 : Système CASA Hamilton-Thorne IVOS (Source : Service de reproduction, OnirisVetAgroBio Nantes)

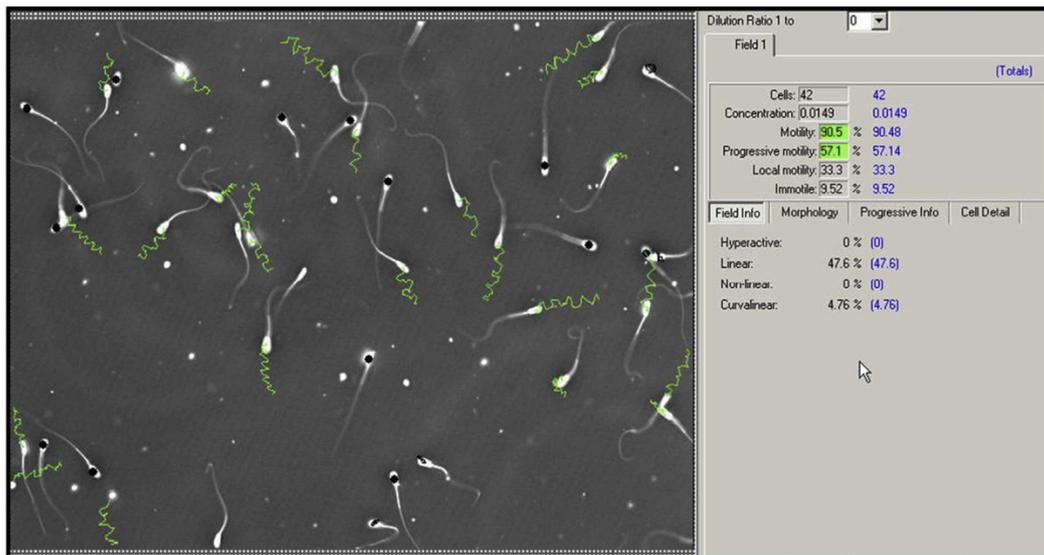


Figure 29 : Interface d'un analyseur de semence assisté par ordinateur (CASA) (Brito *et al.*, 2016)

iii) Morphologie des spermatozoïdes (1) Généralités et définitions

Une corrélation positive entre la morphologie, la fertilité et le taux de gestation, souligne l'importance d'une morphologie convenable pour féconder un ovocyte (Feldman et Nelson, 2004). L'estimation du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux est ainsi essentielle pour caractériser la fertilité d'un mâle (Noakes *et al.*, 2019 ; Núñez-Martínez *et al.*, 2005). Elle doit être au minimum de 70 %, une valeur inférieure définissant la tératozoospermie (Fontbonne, 2022 ; García-Vázquez *et al.*, 2016). La fertilité est considérée comme altérée si cette proportion chute au-delà de 60 % (Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001).

Une morphologie normale facilite la mise en place de l'hyperactivation de la mobilité ce qui permet la fécondation et assure la fertilité du mâle (Verstegen *et al.*, 2002).

Les anomalies morphologiques peuvent être classées selon leur apparition (Greer, 2015 ; Martínez, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001) :

- **soit au cours de la spermatogenèse (défaut primaire):** anomalie de forme de la tête, tête détachée, pièce intermédiaire courbée, doublement d'une partie du spermatozoïde.
- **soit au cours du transit ou bien lors de la manipulation de la semence (défaut secondaire).**

Elles peuvent aussi être classées selon leurs répercussions :

- **soit lorsqu'elles ont une incidence considérable sur la fertilité (défauts majeurs):** taille ou forme anormale de la tête, pièce médiane repliée, tête détachée, persistance de la gouttelette cytoplasmique en région proximale. Les défauts survenant dans les testicules sont également considérées comme des anomalies majeures.
- **soit lorsqu'elles n'ont aucune incidence (défauts mineurs):** queue courbée à enroulée, rétention distale de la gouttelette cytoplasmique.

Diverses atteintes pathologiques ou iatrogènes peuvent induire une morphologie aberrante, une hyperthermie, une anomalie neuroendocrinienne, une infection de l'appareil génital ou un traumatisme n'y étant pas étrangers (Martínez, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001).

À noter que la morphologie est spécifique de la race (Surmacz *et al.*, 2022). Par exemple, une étude de Soler *et al.*, en 2017, a montré que la morphométrie des spermatozoïdes du bouledogue anglais apparaît très différente de celle des autres races considérées (American Staffordshire Terrier, Chihuahua, Labrador Retriever, Ratonero Bodeguero Andaluz, Mâtin Espagnol, Berger Allemand).

(2) Microscope optique

La microscopie à fond clair est la méthode la plus simple, mais requiert divers colorants (Johnston *et al.*, 2001). L'éosine-nigrosine est une coloration supra-vitale qui distingue les cellules vivantes des cellules mortes (Kustritz, 2007). Une goutte de sperme et de colorant tiède sont mélangées sur une lame de verre préchauffée. Une appréciation morphologique de 200 spermatozoïdes est ensuite effectuée au microscope sur différents champs. Les cellules moribondes sont perméables à l'éosine et prennent une teinte rosée tandis que les vivantes apparaissent claires (Noakes *et al.*, 2019 ; Greer, 2015 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Cette coloration peut induire un choc hypotonique et une augmentation artificielle des anomalies morphologiques. L'ajout de glucose et de tampon TES-Tris ajuste l'osmolarité de la solution (Martínez, 2004).

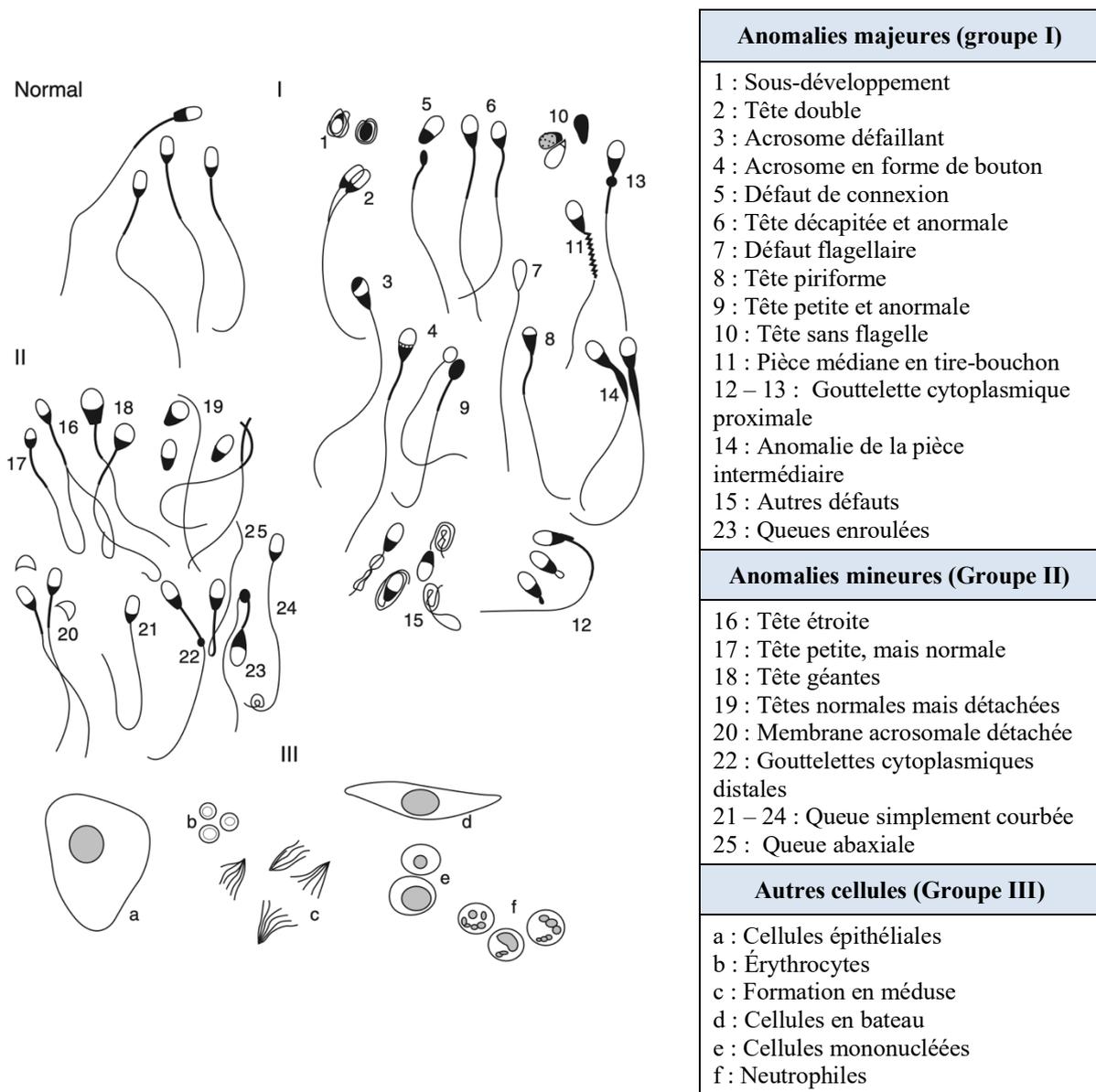


Figure 30 : Classification des anomalies morphologiques majeures et mineures (Noakes et al., 2019)

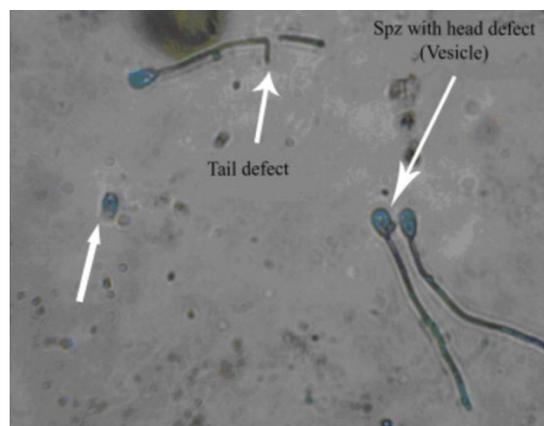


Figure 31 : Coloration au Spermac révélant les aberrations morphologiques des spermatozoïdes. Petite flèche du haut : anomalie flagellaire. Petite flèche du bas : tête décapitée. Grande flèche : anomalie acrosomale (Bencharif et al., 2012)

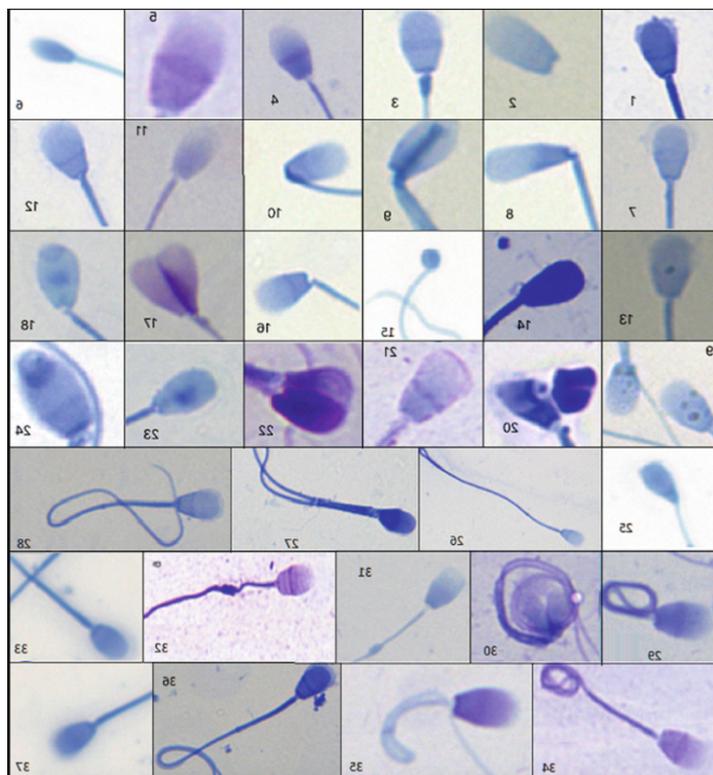


Figure 32 : Exemple d'une coloration au SpermBlue (Surmacz *et al.*, 2022)

La coloration au Giemsa modifiée, composée d'un fixateur, de la safranine et du cristal violet, laisse apparaître les spermatozoïdes violets sur un fond clair (Greer, 2015 ; Kustritz, 2007). La coloration Spermac révélant les aberrations acrosomales peut être employée au même titre que le SpermBlue ou le SpermStain ce dernier étant plus adapté pour une utilisation microscopique (Surmacz *et al.*, 2022 ; García-Vázquez *et al.*, 2016 ; Martínez, 2004). Les associations du bleu trypan et du Giemsa ou bien du bleu trypan, du Bismarck Brown et du rose Bengale sont fréquemment utilisées. Dans une moindre mesure, il est aussi possible de recourir à des sondes fluorescentes (Martínez, 2004).

L'examen au microscope à contraste de phase ou à interférence différentielle offre de meilleurs résultats, mais ces deux méthodes ne sont pas utilisées en routine (Noakes *et al.*, 2019 ; García-Vázquez *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001).

Cette technique est assortie d'une forte variabilité ainsi que d'un risque d'erreur notable, susceptible de mener à une interprétation fallacieuse (Rijsselaere *et al.*, 2004).

(3) Systèmes informatisés

L'analyse morphologique assistée par ordinateur (CASMA) relève les dimensions ainsi que les anomalies morphologiques des spermatozoïdes et permet de s'affranchir des limites de l'évaluation manuelle (Chłopik et Wysokińska, 2020 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et*

al., 2004). Son objectivité, sa précision, son caractère répétable et sa rapidité font d'elle une méthode très appréciable (Martínez, 2004 ; Dahlbom *et al.*, 1997). Certaines imperfections morphologiques liées à des défaillances génomiques imperceptibles au microscope peuvent être mises en évidence par cette technologie (Chłopik et Wysokińska, 2020). L'appareil IVOS II Hamilton-Thorne est validé pour l'analyse morphologique de la semence canine (Rijsselaere *et al.*, 2012).

La préparation des échantillons, le recours à des colorants, la présence de cellules ou de protéines en excès ainsi que l'agglutination des spermatozoïdes, peuvent mener à des imprécisions de mesures. Certaines aberrations morphologiques de la queue ou la rétention de la gouttelette cytoplasmique peuvent aussi ne pas être identifiées (Surmacz *et al.*, 2022).

iv) Évaluation des autres types cellulaires

La semence pouvant compter divers autres types cellulaires, leur détection est primordiale pour déceler toute atteinte sous-jacente. La flore bactérienne muqueuse conditionne la nature non stérile de l'éjaculat. Les bactéries les plus couramment rencontrées sont *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus sp.*, *Pasteurella multocida*, *Trueperella pyogenes*, *Marcella sp.*, *Pseudomonas sp.* et *Mycoplasma*. Des leucocytes associés à des bactéries témoignent d'un processus infectieux actif. Le spermogramme ou mise en culture d'un échantillon de sperme, représente l'examen de choix pour quantifier les organismes aérobies et anaérobies. La semence est recueillie à l'aide de tubes stériles. Une infection est probable seulement si plus de 10 000 UFC/mL (Unités Formant Colonies) de bactéries aérobies sont détectées, les anaérobies étant plus rares. La méthode de prélèvement peut être à l'origine d'une contamination secondaire notamment lorsque le matériel n'est pas nettoyé ou que le milieu de conservation n'est pas stérile. La détection d'érythrocytes, de cellules néoplasiques, épithéliales ou de débris cellulaires est aussi possible (Duračka *et al.*, 2023 ; Greer, 2015 ; Freshman, 2002 ; Johnston *et al.*, 2001).

v) Évaluation de la vitalité

(1) Intégrité de l'acrosome

L'étude de l'intégrité acrosomale est indispensable (Feldman et Nelson, 2004 ; Rijsselaere *et al.*, 2002). Le FITC/PNA utilise l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) un fluorochrome vert, combiné à la lectine d'arachide (PNA) qui se fixe spécifiquement au β -galactose de la membrane acrosomale (Tanga *et al.*, 2021 ; Nizański *et al.*, 2012). Le FITC/PSA exploite de son côté l'agglutinine *Pisum sativum* (PSA) qui s'accumule dans l'acrosome et qui révèle à la fois la région antérieure et la région équatoriale (Bencharif *et al.*, 2010 ; Silva et

Gadella, 2006). Diverses autres sondes fluorescentes peuvent être conjuguées aux lectines comme le Hoechst, l'iodure de propidium ou l'homodimère d'éthidium (Nizański *et al.*, 2012). Le principe de la coloration repose sur le dénombrement par microscopie à fluorescence des spermatozoïdes révélés par la sonde fluorescente témoin de l'intégrité acrosomale, une absence de fluorescence traduisant une perméabilité acrosomale accrue. L'acrosome est alors endommagé ou soupçonné d'avoir subi une réaction acrosomique (Tanga *et al.*, 2021 ; Bencharif *et al.*, 2013).

La coloration Spermac révèle une variété d'aberrations morphologiques acrosomales (Martínez, 2004). Le noyau se colore en rouge tandis que l'acrosome, la pièce médiane et le flagelle apparaissent verdâtres, la région équatoriale prenant une teinte plutôt vert pâle. Cette coloration est utilisable avec du sperme dilué et réfrigéré. À noter que certaines cellules telles que les leucocytes se colorent de la même manière (Feldman et Nelson, 2004).

L'éosine-nigrosine couplée à un microscope à contraste phase, le Giemsa, le bleu Trypan, le brun Bismarck et le rose Bengale sont autant d'autres colorations possibles pour la caractérisation de la fonctionnalité acrosomale (Feldman et Nelson, 2004).

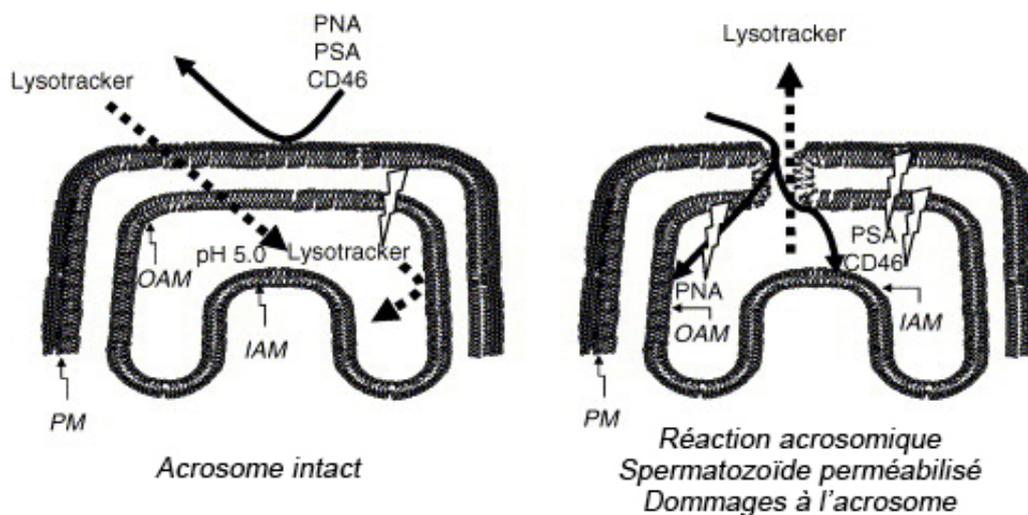


Figure 33 : Évaluation de l'intégrité acrosomale par le test aux lectines (Silva et Gadella, 2006)

(2) Intégrité membranaire

Le HOST, utilisable dans le cadre de la réfrigération permet d'apprécier l'intégrité membranaire de manière peu onéreuse (Karger *et al.*, 2014 ; Goericke-Pesch et Failing, 2013 ; Kumi-Diaka et Badtram, 1994). Il repose sur la capacité d'un spermatozoïde à adapter son volume en réponse à l'osmolarité environnante se manifestant par un gonflement et un

enroulement du flagelle (Kustritz, 2007 ; Martínez, 2004). En cas d'altérations membranaires, le volume cellulaire reste inchangé (Tsikis *et al.*, 2018 ; Martínez, 2004). Du citrate de sodium et du fructose sont mélangés à 100 mL d'eau distillée pour obtenir une solution hypo-osmotique dans laquelle les spermatozoïdes sont incubés de 1 à 60 minutes à 37°C. La quantification des spermatozoïdes présentant un gonflement cellulaire ainsi qu'un enroulement de la queue est effectué au microscope à contraste de phase (Tsikis *et al.*, 2018 ; Kustritz, 2007 ; Jeyendran *et al.*, 1992). La qualité de la semence est convenable si 60 % d'entre eux ont une membrane indemne (Jeyendran *et al.*, 1992).

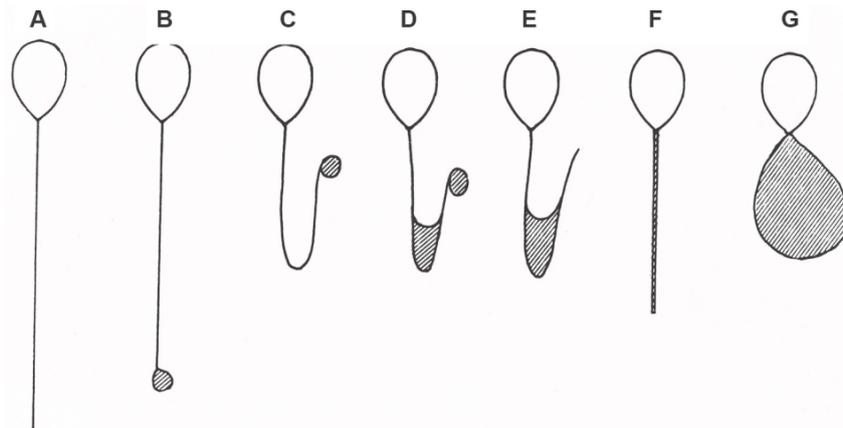


Figure 34 : Illustration du comportement des spermatozoïdes normaux au cours du test de gonflement hypo-osmotique (HOS) (Source : internet)

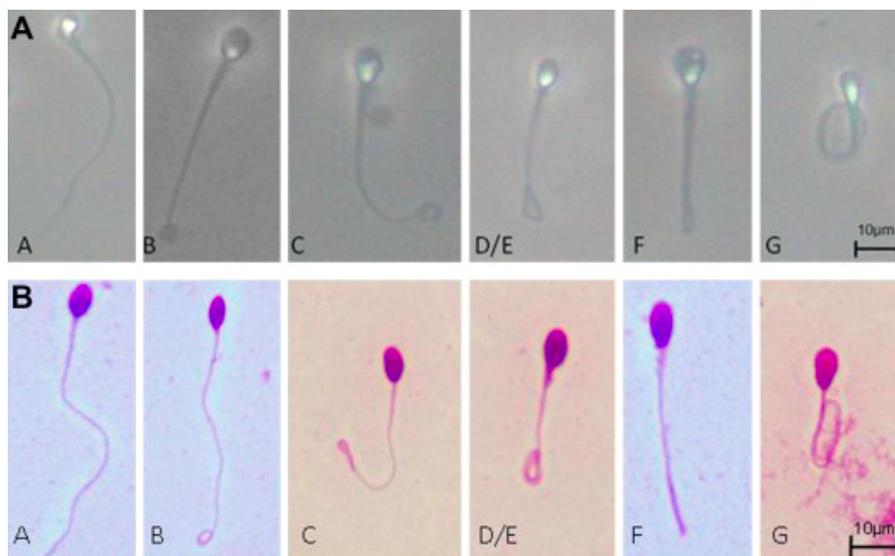


Figure 35 : Images microscopiques d'enroulement flagellaire au cours du HOS (Karger *et al.*, 2014)

La microscopie à épifluorescence repose sur la pénétration intra-cellulaire de sondes acétylées qui y restent piégées après désacylation par les estérases cellulaires (Kustritz, 2007 ; Silva et Gadella, 2006 ; Martínez, 2004). La sonde SYBR-14 est combinée soit à de l'iodure de

propidium (IP) soit à de l'homodimère d'éthidium (HE) liant l'ADN. Leur longueur d'onde d'excitation est similaire (488 nm), mais leur longueur d'émission diffère si bien que pour la combinaison SYBR-14/IP, les longueurs d'ondes d'émission sont respectivement de 515 nm (vert) et de 610 nm (rouge) ce qui permet de différencier les constituants marqués. La sonde SYBR-14, disposant de résidus acétylés, pénètre dans les cellules dont la membrane est indemne et se lie à l'ADN alors que l'IP reste cantonné au milieu extra-cellulaire. Néanmoins, en cas d'altération cellulaire, l'IP diffuse librement à travers la membrane et se fixe sur l'ADN à la place du SYBR-14. Trois populations de spermatozoïdes peuvent ainsi être détectées (Peña *et al.*, 2006 ; Silva et Gadella, 2006) :

- Les cellules vertes : les spermatozoïdes dont la membrane est physiquement intacte
- Les cellules rouges : les spermatozoïdes dont la membrane est détériorée
- Les cellules conjointement rouge et vert : fixation des deux colorants

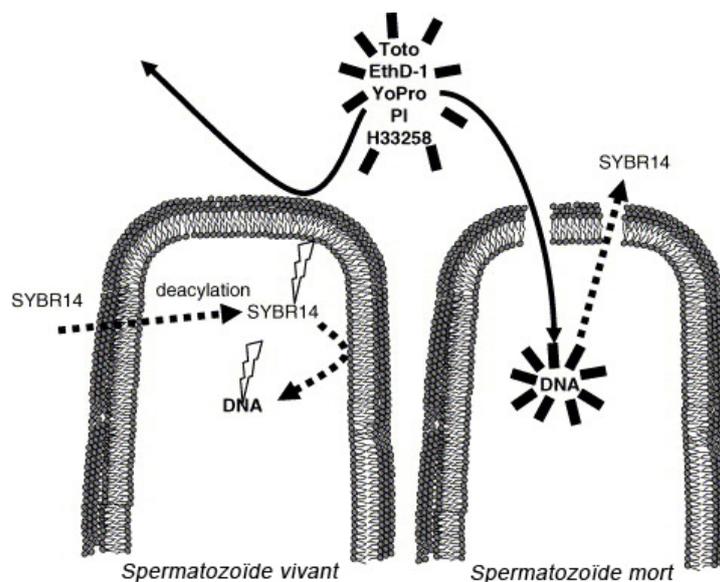


Figure 36 : Évaluation de l'intégrité membranaire par microscopie à épifluorescence (Silva et Gadella, 2006)

(3) Intégrité de l'ADN

L'évaluation de l'intégrité de l'ADN est incontournable (Tanga *et al.*, 2021). La coloration métachromatique de l'ADN par l'acridine orange est la plus fréquente (Bencharif *et al.*, 2013). Liée à l'ADN double brin, l'acridine orange émet une fluorescence verte, tandis qu'associée à l'ADN simple brin fragmenté, elle émet une fluorescence rouge. Les résultats peuvent être obtenus par microscopie à fluorescence. Bien que peu coûteuse, cette méthode est subjective et confrontée à une perte de fluorescence. La cytométrie en flux (SCSA : Sperm

Chromatin Structure Assay) qui détermine un l'indice de dénaturation de l'ADN permet de s'affranchir de ces inconvénients (Küçük, 2018 ; Núñez-Martínez *et al.*, 2005).

La technologie TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) permet de détecter les altérations de l'ADN par marquage de l'extrémité 3'-OH. Ce dernier consiste à insérer des analogues nucléotidiques dUTP (désoxyuridine triphosphate) fluorescents, moyennant l'intervention d'une enzyme la désoxynucléotidyl-transférase terminale. Une fois les spermatozoïdes marqués, ils sont analysés soit par microscopie à fluorescence, soit par cytométrie en flux (Küçük, 2018).

Une autre technique beaucoup moins fréquente consiste à réaliser une électrophorèse sur gel unicellulaire (COMET) (Küçük, 2018).

vi) Facteurs influençant les caractéristiques de la semence fraîche

La race influence la concentration en spermatozoïdes. Les individus de grands gabarits produisent un éjaculat plus concentré que les individus de petites tailles. La taille des testicules étant plus faible chez les jeunes individus, l'âge de l'animal exerce aussi un effet sur la semence (Johnston *et al.*, 2001). Chez les animaux fraîchement pubères ou âgés, elle contient un nombre élevé de spermatozoïdes anormaux. Chez les animaux âgés s'ajoute une baisse d'activité antioxydante rendant les spermatozoïdes plus sensibles aux ROS (Abah *et al.*, 2023 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Linde-Forsberg, 2001).

Un effet de la saison a également été détecté. Au printemps la qualité de la semence a tendance à s'améliorer tandis qu'une majoration des aberrations morphologiques s'objective en été. De plus, les températures ambiantes et la photopériode modulent la concentration spermatique au cours des saisons (Kustritz, 2007 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Un stress thermique contribue au déclin qualitatif de manière immédiate mais transitoire (Lyrio *et al.*, 2023).

Les apports nutritionnels non optimaux peuvent amoindrir la qualité du sperme et induire une défaillance de la spermatogenèse (Alonge *et al.*, 2019). Le zinc qui assure le maintien des concentrations en spermatozoïdes dans l'éjaculat diminue le risque d'infertilité (Allouche-Fitoussi *et al.*, 2020). Les antioxydants comme l'acide ascorbique ou le tocophérol préviennent les dommages oxydatifs, pendant que l'apport d'oméga-3, de vitamine E, de sélénium et d'acide folique améliore la fertilité (Alonge *et al.*, 2019 ; Aurich, 2008).

Les infections bactériennes ou parasitaires réduisent la mobilité et induisent des dommages membranaires, morphologiques, acrosomiques et de la chromatine voire la mort cellulaire par apoptose. Alors que la contamination par de l'urine réduit la qualité du sperme en provoquant un changement de pH, l'hémospermie conduit à une baisse du pouvoir fécondant (Ďuračka *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Rijsselaere *et al.*, 2004). Les toxiques chimiques environnementaux ainsi que les perturbateurs endocriniens sont autant d'autres facteurs d'altération (Kustritz, 2007).

4) LA RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE

a) Historique de la réfrigération de la semence canine

Les premiers essais dans le domaine de la cryobiologie datent du 17^{ème} siècle (Walters *et al.*, 2009). L'utilisation du froid pour la conservation cellulaire a suscité un intérêt croissant pour la préservation des spermatozoïdes (Lonergan, 2018 ; Walters *et al.*, 2009). Le 18^{ème} siècle fut marqué par la réalisation de la première insémination artificielle par l'abbé Lazzaro Spallanzani, ayant abouti à la naissance de 3 chiots (Noakes *et al.*, 2019 ; Walters *et al.*, 2009 ; Linde-Forsberg, 2001). Ce n'est que dans les années 1950 par la diffusion de l'élevage canin à l'échelle mondiale, que le développement de ces biotechnologies s'est accéléré avec la volonté de mettre au point des méthodes de conservation plus performantes (Bencharif *et al.*, 2013 ; Linde-Forsberg, 2001).

Les propriétés du glycérol comme agent cryoprotecteur ont été découvertes par Polge *et al.*, en 1949, tandis que la première utilisation du jaune d'œuf comme agent cryoprotecteur a été réalisée par Laurens, Malterre et Wilczynska en 1947 (Walters *et al.*, 2009 ; Bartlett, 1962). Il a fallu attendre 1954 pour que la première insémination artificielle avec du sperme réfrigéré et dilué dans un milieu de réfrigération soit décrite comme un franc succès par Harrop. C'est ainsi qu'a été démontrée l'efficacité des milieux à base de lait écrémé et de jaune d'œuf (Linde-Forsberg, 2001 ; Pinto *et al.*, 1999 ; Bartlett, 1962). Progressivement, divers autres agents ont été testés pour parfaire les méthodes de conservation (Lonergan, 2018). À titre d'exemple, les premiers milieux de dilution à base de cryoprotecteurs étaient composés d'une base de tampon phosphate rapidement remplacé par du citrate solubilisant mieux les protéines du jaune d'œuf (Noakes *et al.*, 2019).

Cela étant, bien que l'insémination artificielle soit actuellement séduisante, elle a mis du temps à s'imposer en raison de la réticence développée à son égard au sein des sociétés de races canines (Noakes *et al.*, 2019). Ce n'est qu'à partir de 1986 que des chiots nés par insémination de semence réfrigérée ont été officiellement reconnus par l'American Kennel Club (Bouchard *et al.*, 1990).

b) Principes de la réfrigération

La semence ne restant viable à température ambiante que 12 à 24 heures après récolte, sa réfrigération sous forme liquide à + 4°C apparaît comme une solution de conservation idéale, une grande variété d'études ayant montré son intérêt (Verstegen *et al.*, 2005 ; Johnston *et al.*, 2001). Batista *et al.*, en 2012, ont par exemple montré et souligné qu'après 12 heures de stockage, la mobilité progressive demeure supérieure pour les échantillons réfrigérés par

rapport à ceux conservés à 25°C. De plus, les spermatozoïdes canins sont très résistants face au choc froid, particularité rendue possible par le faible ratio entre les AGPI et les Acides Gras Saturés (AGS) de la membrane plasmique (Bouchard *et al.*, 1990).

Les spermatozoïdes sont intensément producteurs de ROS. La réfrigération ralentit l'activité métabolique et limite leur production, restreignant la dégradation cellulaire qui leur est inhérente (Lisboa *et al.*, 2021 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Chabory *et al.*, 2010 ; Verstegen *et al.*, 2005 ; Feldman et Nelson, 2004). Ainsi, lorsque la température chute de 10°C, le taux métabolique décroît de 50 % de sorte qu'à une température de 5°C le métabolisme ne soit actif plus qu'à hauteur de 5 % (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022). En plus du ralentissement de la croissance bactérienne à cette température, les réserves énergétiques se voient également préservées (Aurich, 2008 ; Decuadro-Hansen, 2004).

La mobilité et l'intégrité membranaire sont maintenues à + 4°C pendant une durée minimale de 5 jours, après quoi un déclin progressif est observé. Une baisse de capacité fécondante une semaine avant celle de la mobilité est néanmoins rapportée, suggérant que l'utilisation de la semence doit être effectuée le plus rapidement possible de préférence sous 48 heures (Peña *et al.*, 2006).

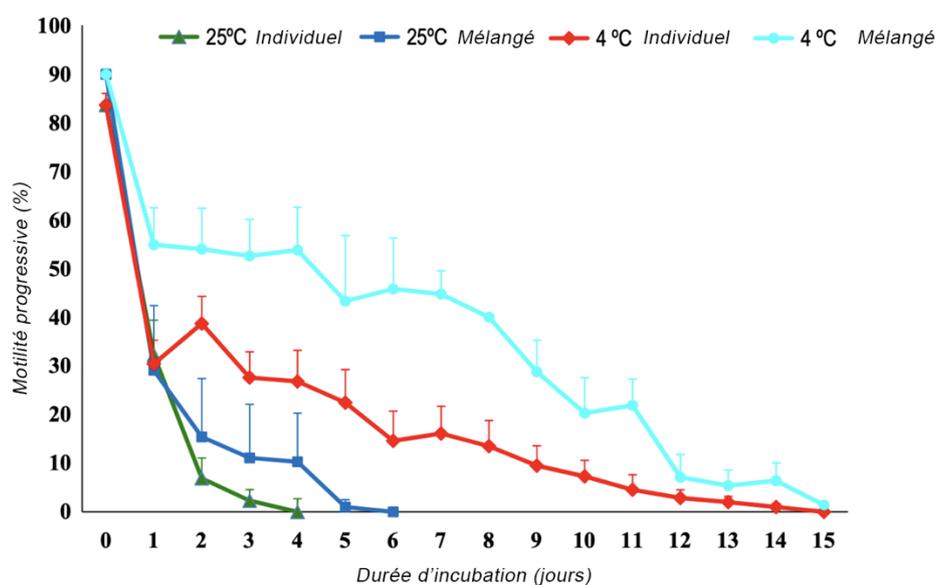


Figure 37 : Effets de la réfrigération à + 4°C sur la préservation de la mobilité progressive d'échantillons de semence canine mélangés entre eux ou non (Batista *et al.*, 2012)

c) Indications de la réfrigération

La réfrigération est indispensable pour l'élevage canin et plus particulièrement lorsqu'il est souhaité de reproduire deux individus géographiquement éloignés. La semence du mâle désiré peut être expédiée à l'international sous 48 heures, limitant ainsi le stress engendré à l'animal ainsi que la pénibilité inhérente aux déplacements des animaux (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). L'absence de contact physique qui en découle limite la transmission de maladie et plus particulière des maladies vénériennes (Sarcome de Sticker, herpès-virose canine, brucellose). Le sperme demeurant une matière virulente en cas d'infection du mâle, il peut néanmoins se comporter comme un vecteur d'agents pathogènes vers la femelle lors de son insémination (Johnston *et al.*, 2001).

Cette procédure facilite l'échange de ressources génétiques à l'échelle mondiale et satisfait le besoin de sélection, de variabilité et d'amélioration génétique. Elle favorise ainsi le brassage génétique et réduit la consanguinité responsable du maintien de certaines maladies d'origine génétique. Ce faisant, elle donne le moyen de recourir à une semence de qualité génétique supérieure (Cavalcanti *et al.*, 2023).

Le travail de reproduction est facilité par la possibilité de différer l'insémination à un moment plus opportun et de conserver la semence après récolte. La coordination du cycle reproductif des femelles peut donc être gérée de façon plus aisée par les éleveurs canins (Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). La réfrigération peut aussi servir pour retarder la congélation en cas d'expédition. En effet, il est possible d'expédier la semence de façon réfrigérée et de ne la congeler qu'une fois à destination. Ceci permet de limiter les coûts ainsi que les risques inhérents à l'exposition plus longue des spermatozoïdes à de très faibles températures réduisant de ce fait la dégradation des spermatozoïdes (Luvoni et Morselli, 2017).

En cas de décès soudain d'un individu de haute valeur génétique, les spermatozoïdes épидидymaires peuvent être récupérés puis réfrigérés ce qui favorise les programmes de reproduction et qui offre la possibilité de conserver la semence d'un individu même après son décès. Cette technique est toutefois surtout utilisée dans le cadre de la congélation. Des résultats prometteurs montrent que leur conservation à + 5°C pendant 4 jours est efficace et que leur mobilité est bien préservée (Luvoni et Morselli, 2017).

d) Avantages de la réfrigération

La réfrigération du sperme est très simple, demande peu de moyens techniques, présente l'avantage d'être peu onéreuse et d'être facilement accessible. De surcroît, la semence ainsi conservée peut être immédiatement utilisée dès sa réception (Noakes *et al.*, 2019 ; Goericke-Pesch *et al.*, 2012). Les contraintes juridiques peu rédhibitoires intrinsèques à cette méthode, en fait une alternative séduisante à la congélation (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022 ; Luvoni et Morselli, 2017 ; Rodenas *et al.*, 2014). Les doses à inséminer peuvent également être réduites grâce à l'état de conservation manifeste après 48 heures de stockage à 4°C. Cela donne l'opportunité de décupler les doses de sperme d'un seul mâle pour plusieurs femelles, bien que ceci soit aussi le cas du sperme frais et congelé dont la dilution permet d'inséminer plusieurs femelles en même temps (Bustani et Baiee, 2021). Bien que le taux de gestation à l'aide de sperme réfrigéré soit moindre qu'avec du sperme frais, il reste néanmoins satisfaisant (83,3 %) et cela même en cas d'insémination intravaginale (Hori *et al.*, 2017 ; Johnston *et al.*, 2001). De surcroît, la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin est meilleure lorsque le sperme est réfrigéré plutôt que congelé (Silvestre *et al.*, 2021).

Les chiens mâles entiers étant fréquemment sujets à l'hémospemie, Rijsselaere *et al.* (2004), ont démontré que le sperme légèrement hém-contaminé n'est pas altéré après 4 jours de réfrigération à + 4°C. Ceci suggère que la semence d'un reproducteur atteint d'un syndrome prostatique peut être réfrigérée à la différence de la congélation où la conservation d'une telle semence n'est pas envisageable en raison de la dégradation manifeste qui s'ensuit.

e) Effets de la réfrigération sur la semence canine

i) Généralités

La chute de la température entraîne un ensemble de dommages irréversibles tant au niveau fonctionnel que structurel. La durée de réfrigération est l'un des paramètres le plus intéressant à moduler pour prévenir cette dégradation (Silvestre *et al.*, 2021). À noter que la cryotolérance d'un échantillon initialement altéré peut être réduite et conduire à une sensibilité exacerbée au froid (Chłopik et Wysokińska, 2020).

Les ROS peuvent être fortement délétères au cours de la réfrigération. Certaines études ont rapporté une réduction de l'activité antioxydante notamment de la SOD, dans un contexte où les ROS continuent de s'accumuler malgré la réduction d'activité métabolique (Silvestre *et al.*, 2021 ; Del Prete *et al.*, 2018).

ii) La mobilité

Le froid est connu pour réduire la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes (Silvestre *et al.*, 2021 ; Kumi-Diaka et Badtram, 1994). Une vitesse de refroidissement trop brutale peut de surcroît modifier le schéma de mobilité (Aurich, 2008). Il est aussi possible de mettre en évidence des mouvements de types hyper-activités, la réfrigération stimulant le déclenchement prématuré des événements de capacitation (Rota *et al.*, 1999).

Pendant la réfrigération, les spermatozoïdes s'orientent vers un métabolisme anaérobie qui mène à l'accumulation d'acide lactique à l'origine d'une réduction de mobilité imputable à l'affaiblissement métabolique (Batista *et al.*, 2012 ; Kasimanickam *et al.*, 2012). La baisse de mobilité est aussi liée à l'inactivité de la pompe Na^+/K^+ ATPase qui induit une fuite d'ions intra-cellulaire (Ponglowhapan *et al.*, 2004).

Les phosphatases acides et alcalines du liquide prostatique réduisent la production d'ATP lors du stockage, menant à une chute de la mobilité (Nguyen *et al.*, 2019). Toutefois en sa présence, Mogielnicka-Brzozowska *et al.*, en 2015, ont détecté une amélioration mise sur le compte de la capacité des protéines de haut poids moléculaire du liquide prostatique à fixer le zinc, largement reconnu pour réduire la mobilité.

Dans tous les cas de figure, les défauts de mobilité aboutissent à une réduction du pouvoir fécondant (Decuadro-Hansen, 2004).

iii) La membrane plasmique

Le froid génère de multiples dégâts membranaires, et ce d'autant plus que la vitesse de refroidissement est élevée. Individu-dépendants, ces effets sont également influencés par la composition lipidique membranaire (Noakes *et al.*, 2019 ; Aurich, 2008). Kumi-Diaka et Badtram, en 1994, n'ont pas détecté de différence significative après 24 heures de stockage à + 5°C avec le sperme frais. Néanmoins, d'autres études ont observé une perte d'intégrité au-delà de 48 heures à + 5°C soulignant la nécessité de limiter la durée d'exposition au froid (Kumi-Diaka et Badtram, 1994).

Lorsque la semence est placée dans un environnement froid, un changement de phase se produit, la phase « liquide » membranaire disparaissant au profit d'une phase « gélifiée ». Cette modification graduelle provoque la séparation des phases à l'origine d'un rassemblement des phospholipides en domaines, menant à une perte de fluidité et de fonctionnalité membranaires (Noakes *et al.*, 2019).

Au cours du refroidissement, les protéines BSP du liquide prostatique chez les espèces qui en possèdent, induisent un efflux membranaire de cholestérol et des phospholipides qui favorise son remodelage, sa déstabilisation et sa perte de fonction (Caballero *et al.*, 2012). Cet effet est d'autant plus important que la concentration en BSP et le temps d'exposition sont élevés (Bencharif *et al.*, 2010). À ce phénomène s'ajoute un efflux additionnel de cholestérol causé par les basses températures (Silvestre *et al.*, 2021).

La contamination bactérienne initiale du prélèvement est une cause majeure de perméabilisation qui provoque une perte de potassium, de protéines, d'enzymes, de cholestérol, de lipides et surtout d'ATP (Noakes *et al.*, 2019 ; Aurich, 2008).

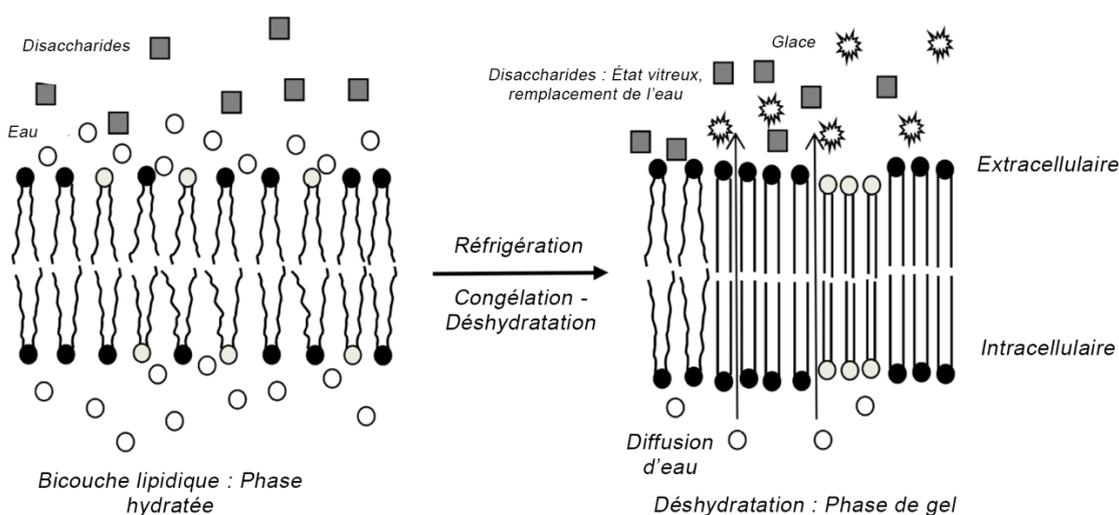


Figure 38 : Illustration du changement de phase membranaire des spermatozoïdes se produisant au cours de l'exposition au froid (Sieme *et al.*, 2015)

iv) L'acrosome

Des anomalies acrosomiques sont également des répercussions dues au choc au froid. La proportion de spermatozoïdes dont l'acrosome est intact diminue après 48 heures de réfrigération, un gonflement et une modification de sa forme se produisant et engendrant une perte de pouvoir fécondant (Treulen *et al.*, 2012 ; De Los Reyes *et al.*, 2009). Néanmoins, Verstegen *et al.*, en 2005, sont parvenu à obtenir 70 % de gestation par double insémination avec du sperme dilué et réfrigéré pendant 9 jours. Quoiqu'il en soit, la conservation prolongée mène systématiquement à une dégradation acrosomale (Goericke-Pesch *et al.*, 2012 ; Verstegen *et al.*, 2005).

Le froid est aussi responsable de la cryocapacitation. L'élévation calcique intracellulaire qu'il favorise stimule l'initiation de la réaction acrosomique, notamment renforcée en présence des BSP et réduit la capacité de liaison à la zone pellucide (Noakes *et al.*, 2019 ; Caballero *et*

al., 2012 ; De Los Reyes *et al.*, 2009 ; Linde-Forsberg, 2001). Il est également responsable d'un remaniement précoce des phospholipides membranaires qui conduisent au phénomène de cryocapacitation (Sugai *et al.*, 2023). Une fois la capacitation effective, la cryotolérance décroît et de multiples dommages peuvent survenir (Le Guillou *et al.*, 2016).

v) L'ADN

La fragmentation de l'ADN au cours du refroidissement est causée par l'accumulation continue des radicaux libres dans le milieu de stockage. Ils sont à l'origine de l'activation des voies cellulaires apoptotiques et d'une perte progressive du pouvoir fécondant (Del Prete *et al.*, 2018 ; Küçük, 2018 ; Aurich, 2008). La richesse en protamines de type 2 dans la chromatine condensée confère cependant une protection accrue face à ces événements (Chłopik et Wysokińska, 2020).

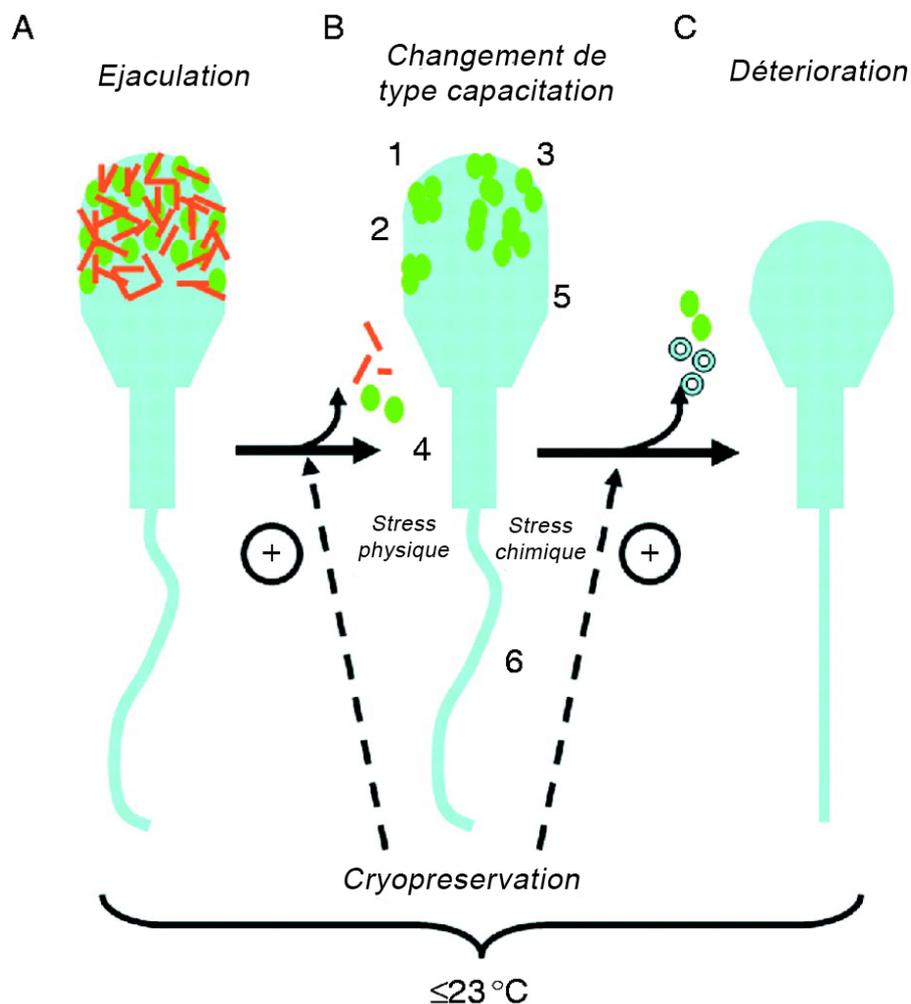


Figure 39 : Résumé des effets du froid sur les spermatozoïdes. 1 : agglutination locale de protéines membranaires. 2 : séparation de phase des lipides membranaires. 3 : perte de l'acrosome. 4 : peroxydation lipidique et apoptose. 5 : capacitation prématurée. 6 : perte de mobilité (Leahy et Gadella, 2011)

f) Les milieux de réfrigération de semence
i) Définitions et principes des milieux de réfrigération

La semence se détériore rapidement après l'éjaculation (Aurich, 2005). Le choc dû au froid étant également dommageable, il a été nécessaire de recourir à des milieux « de réfrigération » pour créer un environnement stable, protecteur et limiter les dommages cellulaires (Bustani et Baiee, 2021 ; Treulen *et al.*, 2012). La dilution dans un milieu de réfrigération consiste à diluer la fraction spermatique dans un dilueur composé de divers agents de manière à étendre sa conservation pendant au moins 24 h, bien qu'elle permette souvent une conservation à plus long terme. Compte tenu des répercussions engendrées par le froid, des agents cryoprotecteurs leurs sont adjoints (Bustani et Baiee, 2021 ; Feldman et Nelson, 2004 ; Johnston *et al.*, 2001). Le milieu protège aussi du liquide prostatique et prévient les chocs causés lors de l'expédition et du transport (Kalkan et Ucar, 2022 ; Le Guillou *et al.*, 2016 ; Feldman et Nelson, 2004).

De multiples milieux existent sur le marché. Les plus couramment employés sont composés de tampons Tris-glucose ou Tris-fructose et de 20 % de jaune d'œuf (Rodenas *et al.*, 2014). Ils requièrent une composition exacte qui limite l'agglutination des spermatozoïdes et qui favorise leur dispersion dans le milieu. Ils doivent être exempts de particules, acellulaires, translucides et ne doivent exercer aucun effet délétère sur la semence (Bustani et Baiee, 2021 ; Brito *et al.*, 2016).

ii) Les composants
(1) Les antimicrobiens

La présence de bactéries est inévitable (Ďuračka *et al.*, 2023). Elles consomment les nutriments du milieu, sont une source de métabolites toxiques ou d'endotoxines et sont à l'origine de détériorations cellulaires (Morrell et Wallgren, 2014). Les dilueurs offrant de bonnes conditions pour le développement bactérien, l'addition d'antibiotiques est d'une importance capitale. Leur faible prix de revient et leur diversité en font des ressources facilement accessibles (Ďuračka *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019).

La pénicilline, la streptomycine et la gentamicine sont fréquemment employées, bien que les mycoplasmes n'y soient pas sensibles (Becher *et al.*, 2013 ; Aurich, 2005). D'autres antibiotiques comme le ceftiofur ou les aminosides, ou bien une association de gentamicine, de lincomycine et de tylosine fournissent de bons résultats (Bustani et Baiee, 2021). En raison d'effets indésirables, l'utilisation systématique des antibiotiques doit être raisonnée (Ďuračka *et al.*, 2023).

Les peptides antimicrobiens, thermostables, déstabilisent les membranes bactériennes, mais sont cytotoxiques. Les flavonoïdes sont aussi prometteurs notamment pour lutter contre les souches bactériennes multi-résistantes (Ďuračka *et al.*, 2023 ; Morrell et Wallgren, 2014). L'utilisation des antibiotiques reste pour l'heure la seule solution envisageable pour maîtriser la croissance bactérienne, leur présence dans les milieux de réfrigération étant réglementairement requise pour les échanges intercommunautaires, bien que la centrifugation colloïdale ou monocouche Canicoll réduisent considérablement la charge bactérienne (Luño *et al.*, 2020 ; Morrell et Wallgren, 2014 ; Aurich, 2005).

(2) Les agents stabilisateurs des facteurs physico-chimiques

La pression osmotique doit être maintenue entre 300 et 325 mOsmol, bien que les milieux de réfrigération soient souvent légèrement hyper-osmotiques. Le pH quant à lui doit être compris entre 6,75 et 7,5 soit à des niveaux proches du liquide spermatique, les spermatozoïdes ne tolérant que de très légères variations acido-basiques. Le recours aux tampons est donc indispensable. Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) est le plus communément employé. Des agents zwitterioniques analogues au TRIS comme le TES ou le HEPES et des tampons potassiques comme l'hydroxyde de potassium sont également utilisables. Le citrate offre des résultats satisfaisants en solubilisant les protéines du jaune d'œuf (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). D'après Hori *et al.*, en 2017, les spermatozoïdes dilués dans un milieu Tris-citrate-fructose au jaune d'œuf présentent une mobilité de 84,3 % après 48 heures de stockage et de 80 % après 96 heures, ce qui témoigne de l'efficacité de cette combinaison.

Néanmoins, les spermatozoïdes métabolisent certains tampons comme le citrate ou le lactate. De ce fait, leur consommation en tant que substrat énergétique non glucidique réduit la capacité du milieu à réguler la pression osmotique et le pH, rendant l'environnement moins propice à la conservation. L'incorporation de ces substances doit par conséquent être finement contrôlée (Rodriguez-Gil, 2006). D'autres agents comme les sucres ou les protéines notamment rencontrées dans les cryoprotecteurs d'origines animales, participent au contrôle de l'osmolarité par l'activité osmotique qu'ils exercent (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019).

(3) Les substrats énergétiques

Les spermatozoïdes dilués requièrent un apport d'énergie pour leur survie (Johnston *et al.*, 2001). Les glucides soutiennent principalement la mobilité, mais exercent aussi des

propriétés osmotiques (Hori *et al.*, 2014 ; Ponglowhapan *et al.*, 2004). De façon générale, la concentration en glucides et notamment en monosaccharides dans les dilueurs de semence canine réfrigérée à + 4°C sont comprises entre 15 mM et 60 mM (Province *et al.*, 1984).

Le glucose, le fructose, le mannose, le dextrose, le saccharose, le tréhalose et l'arabinose sont utilisés comme source d'énergie dans les milieux pour semence réfrigérée (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001). Le glucose et le fructose sont les monosaccharides les plus courants. Le glucose, métabolisé préférentiellement au fructose, est le substrat le plus favorable. Cependant, d'après l'étude de Rigau *et al.*, en 2001, le fructose semble exercer un effet plus important que le glucose sur le métabolisme glucidique des spermatozoïdes canins. À noter cependant que le type de sucre inclus dans le milieu peut exercer des effets différentiels sur les spermatozoïdes. Il a, en effet, été déterminé que le glucose accroît les mouvements d'oscillation tandis que le fructose est à l'origine d'un mouvement plus linéaire (Rigau *et al.*, 2001).

Ponglowhapan *et al.*, en 2004, rapportent que la semence réfrigérée pendant 8 jours à + 5°C avec du glucose ou du fructose peut raisonnablement servir à l'insémination. De faibles concentrations soutiennent davantage la mobilité que des concentrations élevées (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022 ; Ponglowhapan *et al.*, 2004).

D'autres composants constituent une source substantielle d'énergie. Les substrats glucidiques contenus dans les cryoprotecteurs favorisent le métabolisme cellulaire. C'est par exemple le cas du jaune d'œuf dont la concentration en glucose varie de 3 à 4 mM (Bustani et Baiee, 2021 ; Noakes *et al.*, 2019). À noter que la lécithine introduite par l'intermédiaire du jaune d'œuf, se comporte également comme un substrat énergétique (Kmenta *et al.*, 2011). Le lactose présent dans le lait écrémé n'est pas quant à lui un support énergétique intéressant. Bien qu'il soit faiblement métabolisé, sa pénétration intracellulaire est limitée par son haut poids moléculaire et par sa nature hydrophile (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019). Les substances non glucidiques telles que le lactate, le pyruvate et le citrate constituent un apport additionnel remarquable pour la semence (Rodriguez-Gil, 2006).

(4) Les activateurs de mobilité

La mobilité des spermatozoïdes décline lors du stockage au froid (Luño *et al.*, 2022). Ce fait justifie l'incorporation d'activateurs de mobilité après réfrigération afin de stimuler leur mobilité progressive. Ils fournissent essentiellement des glucides dont la métabolisation est

rapide, comme le glucose qui est le plus utilisé dans ce contexte. Ils améliorent la qualité de la semence après réfrigération et favorisent le succès reproducteur. La métabolisation de ces substrats est effective en 10 à 15 minutes (Martínez-Barbitta et Rivera-Salinas, 2022). Les inhibiteurs des phosphodiésterases comme la papavérine, la caféine ou la pentoxifylline réduisent l'hydrolyse de l'AMPc ce qui favorise également l'activation de la mobilité. Leur concentration doit être cependant limitée à 10 mM. Au-delà, une capacitation prématurée survient diminuant les chances de fécondation (Luño *et al.*, 2022).

(5) Les antioxydants

Une supplémentation en antioxydants est fondamentale pour limiter le stress oxydatif (Michael *et al.*, 2009). La SOD, la catalase et la GPx sont les plus utilisés, l'ajout simultané offrant une protection synergique accrue (Del Prete *et al.*, 2018). Lucio *et al.*, en 2016, ont montré qu'une supplémentation en 10 mM de GSH (Glutathion) limite la réaction acrosomique spontanée. À contrario, de nombreuses dégradations mitochondriales ont été détectées lorsque sa concentration est doublée, démontrant que les antioxydants en excès sont délétères et que leurs concentrations doivent être contrôlées (Silvestre *et al.*, 2021 ; Lucio *et al.*, 2016).

La mélatonine est pourvue d'une activité antioxydante prometteuse. Les échantillons refroidis 7 jours avec 1 à 2 mM de mélatonine affichent une mobilité, un acrosome, une chromatine et une viabilité cellulaire préservés (Divar *et al.*, 2022 ; Mitjana *et al.*, 2022 ; Silvestre *et al.*, 2021).

Michael *et al.*, en 2009, ont observé que la vitamine E et B16 diminuent la quantité de ROS après 72 h de réfrigération, la semence étant cependant mieux préservée avec la vitamine E qu'avec la Vitamine B16. Ces résultats doivent être mis en confrontation avec d'autres études réalisées dans le domaine dont celle de Silvestre *et al.*, en 2021, qui ont montrées que la Vitamine E n'exerce aucun effet significatif sur le sperme réfrigéré.

Bien que la mobilité et l'intégrité membranaire soient efficacement préservées en présence de N-acétylcystéine (NAC) un acide aminé antioxydant, elle ne restreint pas pour autant la quantité de ROS dans le milieu de réfrigération (Michael *et al.*, 2010 ; Michael *et al.*, 2009).

(6) Les cryoprotecteurs

(a) Généralités

La supplémentation en cryoprotecteurs est requise pour limiter la déshydratation intracellulaire inhérente au froid et pour protéger les composants cellulaires. Ils se divisent en deux classes, à savoir les agents cryoprotecteurs pénétrants et les agents cryoprotecteurs non-pénétrants (Kalkan et Ucar, 2022 ; Sieme *et al.*, 2016). Les agents pénétrants traversent la membrane plasmique puis rejoignent le milieu intracellulaire. Le glycérol, l'éthylène glycol, le propylène glycol, et le DMSO (diméthylsulfoxyde) en sont de bons représentants. Le glycérol, dont les propriétés cryoprotectrices ont été découvertes en 1949, stabilise la membrane et préserve les capacités fécondantes lors de la congélation (Bustani et Baiee, 2021 ; Suzuki *et al.*, 2022 ; Kusum *et al.*, 2020 ; Sieme *et al.*, 2016). Les agents non-pénétrants sont des cryoprotecteurs qui ne rejoignent pas le milieu intra-cellulaire et qui comprennent des disaccharides comme le saccharose et le tréhalose ainsi que des polysaccharides et des protéines (Sieme *et al.*, 2016). Le jaune d'œuf et le lait sont des cryoprotecteurs non-pénétrants (Kusum *et al.*, 2020).

Ils ne sont cependant pas dépourvus de toxicité, raison pour laquelle leur concentration doit être restreinte au strict nécessaire (Sieme *et al.*, 2016). Un cryoprotecteur doit être de faible poids moléculaire, présenter une solubilité élevée dans l'eau ainsi qu'une faible toxicité (Nouri Gharajelar *et al.*, 2016). Lors de la dilution, certains cryoprotecteurs entraînent un stress osmotique majeur. Au contact des spermatozoïdes, une perturbation osmotique se produit et génère un déplacement d'eau transmembranaire jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint. La supplémentation en cryoprotecteurs doit par conséquent être progressive afin de limiter ce phénomène. Cet exposé se voudra essentiellement centré sur les cryoprotecteurs à base de jaune d'œuf et de lait écrémé, étant donné leur emploi fréquent lors de la réfrigération, cette dernière ne générant pas de phase de gel comme il en est question avec la congélation (Sieme *et al.*, 2016).

(b) Le jaune d'œuf

Le jaune d'œuf correspond à l'agent non-pénétrant le plus représenté dans les milieux de conservation, sa première utilisation ayant été décrite par Philips en 1939 (Bustani et Baiee, 2021 ; Johnston *et al.*, 2001). Parmi les espèces aviaires, le jaune d'œuf de poule s'est montré le plus approprié pour réfrigérer la semence canine (Nazeri *et al.*, 2023). Les principaux lipides qui le composent sont l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et la phosphatidylcholine. Des LDL, des glucides, des protéines, des minéraux et la lécithine figurent

également parmi ses constituants (Bustani et Baiee, 2021 ; Johnston *et al.*, 2001). Les protéines assurent le maintien des phospholipides membranaires sous forme soluble ce qui favorise les interactions entre les LDL et la membrane plasmique (Nguyen *et al.*, 2019).

Le mode d'action du jaune d'œuf demeure pour l'heure spéculatif, mais plusieurs éléments sont désormais admis. Premièrement, sa composition en LDL, en lécithine ainsi qu'en certaines protéines joue un rôle cryoprotecteur majeur (Noakes *et al.*, 2019 ; Bergeron et Manjunath, 2006). Secondairement, sa composition permet un approvisionnement considérable en phospholipides, cholestérol, ainsi qu'en acides gras polyinsaturés, ce qui permet de réduire les dommages membranaires et acrosomaux (Bustani et Baiee, 2021).

Une concentration de 20 % a été maintes fois rapportée comme efficace pour préserver la survie des spermatozoïdes et les paramètres fonctionnels pendant au moins 48 heures (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Del Prete *et al.*, 2018). Des concentrations excessives sont cependant délétères soulignant l'intérêt d'une incorporation raisonnée (Gil *et al.*, 2011). D'après Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001, la supplémentation de milieux commerciaux avec du jaune d'œuf améliore la mobilité après 6 jours de stockage au froid. L'utilisation de cet agent a aussi fait preuve d'un rôle significatif dans la protection de l'intégrité mitochondriale et s'est révélée indispensable pour limiter le déclenchement spontané de la réaction acrosomique (Feldman et Nelson, 2004 ; Iguer-Ouada et Verstegen, 2001).

En revanche, le recours continué au jaune d'œuf a mis en exergue certains inconvénients lui ayant trait (Bencharif *et al.*, 2012). D'origine animale, il peut se comporter comme vecteur d'agents infectieux en cas de contamination initiale et ainsi concourir à la diffusion de maladies. Il est donc susceptible de contaminer une femelle par la voie de l'insémination (Suzuki *et al.*, 2022 ; Bencharif *et al.*, 2012). De surcroît, il constitue un milieu de culture riche en nutriments favorable à la croissance bactérienne notamment mycoplasmique (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Suzuki *et al.*, 2022 ; Bencharif *et al.*, 2012). En raison des réglementations internationales en vigueur, le risque biologique inhérent à l'utilisation du jaune d'œuf entrave les échanges de matériel génétique à l'échelle mondiale (Axnér et Lagerson, 2016).

Les concentrations de ses composants sont individu-dépendantes et de nature à varier au cours du temps, l'abondance relative de chacun d'entre eux étant de plus sous l'influence des modalités d'élevage des poules pondeuses. Sa constitution non constante rend la

standardisation qualitative des milieux de réfrigération à base de jaune d'œuf peu concevable (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Bencharif *et al.*, 2012).

Certaines altérations des fonctions métaboliques et cinétiques des spermatozoïdes sont imputables à divers composants du jaune d'œuf telles que les lipoprotéines de haute densité (HDL) ou bien les granules de jaune d'œuf qui inhibent la respiration mitochondriale des spermatozoïdes. Ces dernières interfèrent de surcroît avec les analyseurs automatisés tels que l'IVOS II (Neves *et al.*, 2014 ; Bencharif *et al.*, 2012). En raison de sa viscosité, il peut de plus être à l'origine d'une réduction de la mobilité progressive (Johnston *et al.*, 2001). À ces effets vient s'ajouter l'acidification du milieu, délétère pour les spermatozoïdes (Cavalcanti *et al.*, 2023).

Les composés tels que la progestérone ou le calcium présents dans le jaune d'œuf concourent aussi à l'initiation prématurée de la réaction acrosomique (Bencharif *et al.*, 2010 ; Aurich, 2008). Certains auteurs tempèrent néanmoins ce propos en soutenant qu'il n'a pas pour effet d'accroître les manifestations acrosomiques prématurées et que malgré la présence de ces composants, il assure la préservation de l'intégrité acrosomale (Aurich, 2008 ; Feldman et Nelson, 2004).

(c) Intérêt du LDL

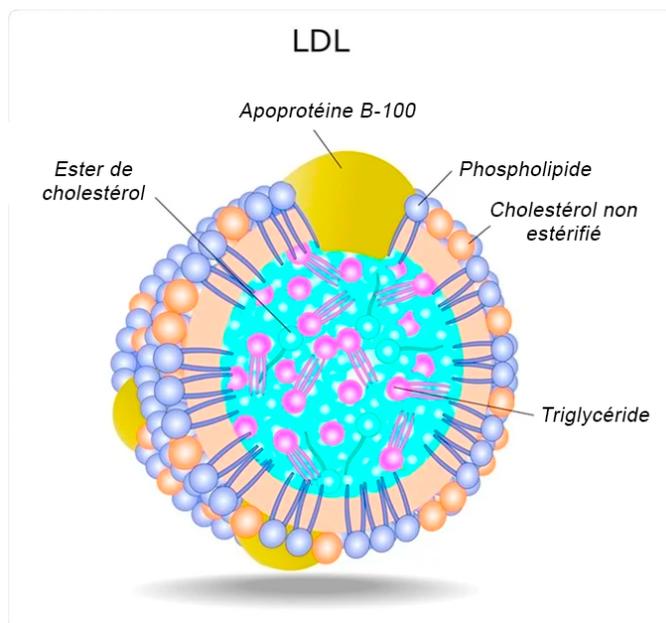


Figure 40 : Représentation schématique structurelle des LDL (Source : internet)

Les lipoprotéines de basse densité ou LDL, se sont imposés pour la dilution du sperme (Noakes *et al.*, 2019 ; Bencharif *et al.*, 2013). Atténuant la transition de phase liquide à cristalline, ils stabilisent la membrane plasmique et constituent un film protecteur autour du spermatozoïde qui contribue au renouvellement des phospholipides dégradés ou perdus au cours du stockage (Noakes *et al.*, 2019 ; Sieme *et al.*, 2015 ; Tainturier *et al.*, 2013).

Les LDL font état d'une affinité considérable pour les BSP notamment grâce à la phosphatidylcholine de leur couche externe. Chez le taureau, ils neutralisent ces protéines et protègent les spermatozoïdes face à leurs effets délétères (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Le Guillou *et al.*, 2016 ; Tainturier *et al.*, 2013 ; Bergeron et Manjunath, 2006). D'après Bergeron et Manjunath (2006), les LDL sont de meilleurs cryoprotecteurs que les liposomes, en raison de leur affinité plus marquée pour les BSP.

Bencharif *et al.*, en 2013, ont mis en évidence que les milieux à base de 6 % de LDL améliorent significativement l'intégrité acrosomale et membranaire par rapport à ceux composés de jaune d'œuf. Impliqués dans l'atténuation de la phosphorylation de la tyrosine, ils limitent de fait l'induction précoce de la réaction acrosomique (Mahiddine et Kim, 2021 ; Bencharif *et al.*, 2012).

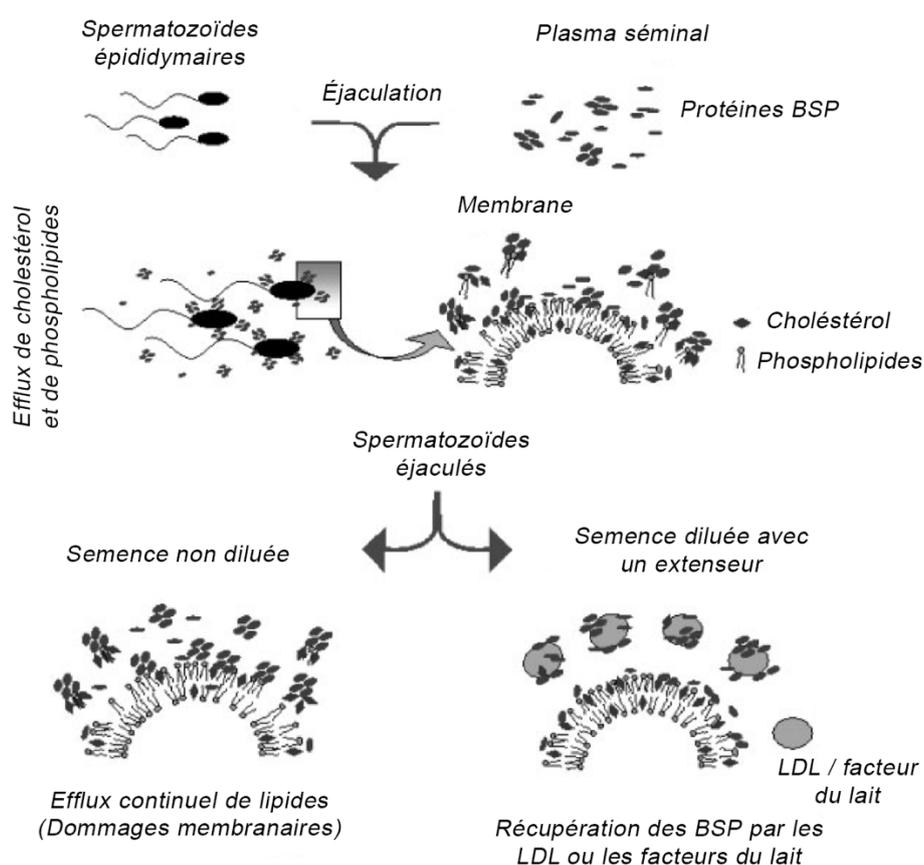


Figure 41 : Mécanisme de protection médié par les LDL ou les facteurs présents dans le lait par fixation des protéines BSP (Bergeron et Manjunath, 2006)

Varela Junior *et al.*, en 2009, ont déterminé que des concentrations croissantes jusqu'à 10 % de LDL maintiennent une mobilité supérieure par rapport au milieu à base de jaune d'œuf après 96 h de stockage à 5°C. De la même manière, le milieu à base de 6 % de LDL testé par Bencharif *et al.*, en 2013, préserve mieux la mobilité que le milieu de jaune d'œuf après 4 jours à 4°C. La mobilité était respectivement de 52,2 % contre 44,2 % chez 100 % des chiens, ces valeurs chutant respectivement à 33,6 % et 26,4 % après 7 jours de réfrigération chez 50 % des chiens. Ces éléments témoignent de l'efficacité du LDL à maintenir une mobilité supérieure à 30 % par rapport au jaune d'œuf (Bencharif *et al.*, 2013). Différentes études corroborent le fait que les LDL constituent une alternative efficace et préférable au jaune d'œuf, bien que leur extraction industrielle routinière reste pour l'heure difficile (Mahiddine et Kim, 2021).

La technique d'extraction des LDL atteint 97 % de pureté offrant un contrôle plus précis et plus rigoureux des concentrations incorporées dans les milieux, à l'inverse du jaune d'œuf entier pour lequel les concentrations en lipoprotéines sont variables (Neves *et al.*, 2014 ; Tainturier *et al.*, 2013). De plus, la purification des LDL permet d'éliminer les éléments indésirables du jaune d'œuf comme les granules, les lipoprotéines de haute densité (HDL) et la progestérone (Neves *et al.*, 2014 ; Bencharif *et al.*, 2013 ; Bencharif *et al.*, 2012).

L'origine animale des LDL fait toutefois peser le risque d'une diffusion d'agents pathogènes et plus particulièrement de salmonellose et/ou de prion (Tainturier *et al.*, 2013).

(d) Le lait écrémé

Le lait fait partie des cryoprotecteurs non-pénétrants les mieux connus (Noakes *et al.*, 2019). Il a initialement été utilisé comme milieu de dilution puis s'est ensuite largement imposé comme agent cryoprotecteur (Peña *et al.*, 2006). Le lait entier est composé d'eau (87,5 %), de glucides dont le lactose (4,6 %), de lipides (3,7 %), de protéines (3,2 %) et de minéraux (0,8 %). Il est constitué, de façon analogue au jaune d'œuf, de lipides et de lipoprotéines élaborées à partir de phosphatidylcholine (Manjunath, 2012 ; Bergeron et Manjunath, 2006).

Toutefois, le lait écrémé, pourtant dépourvu de lipides et de lipoprotéines, préserve les spermatozoïdes de façon tout aussi efficace que le lait entier, ce qui sous-tend l'implication d'autres substances protectrices (Bergeron et Manjunath, 2006). Les micelles de caséines telle que la phosphocaséinate qui représentent 80 % des protéines du lait, ont affiché des résultats intéressants pour la préservation de la semence de bélier, de taureau, et d'étalon stockée à 4°C (Lisboa *et al.*, 2021 ; Manjunath, 2012 ; Bergeron et Manjunath, 2006). Les caséines, limitant notamment la fuite membranaire de phospholipides et étant également capables de lier les BSP,

sont ainsi considérées comme la principale fraction cryoprotectrice du lait écrémé (Mahiddine et Kim, 2021 ; Bergeron et Manjunath, 2006). La β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine sont des protéines du lactosérum qui agissent de manière identique et qui contribuent à cette protection (Lisboa *et al.*, 2021 ; Manjunath, 2012). La semence conservée avec du lait écrémé présente aussi une résistance accrue face au choc osmotique et ce grâce à la présence de lactose (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Bustani et Baiee, 2021 ; Songsasen *et al.*, 2002). Le lait tient enfin un rôle tampon soutenu par les protéines le constituant (Bustani et Baiee, 2021).

L'action du jaune d'œuf pour préserver la mobilité a été décrite comme étant supérieur par rapport au lait écrémé, expliquant son utilisation plus fréquente (Johnston *et al.*, 2001). Toutefois, par rapport au jaune d'œuf, le lait écrémé est plus facile à obtenir, de meilleure disponibilité et moins coûteux. Il s'agit d'une alternative appréciable pour préserver la mobilité, la vitalité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes entreposés à 4°C (Mahiddine et Kim, 2021 ; Abe *et al.*, 2018). Bien que ces éléments soient appréciables, le lait n'est pas employé dans le cadre de la réfrigération du sperme canin en raison de sa moindre protection face au jaune d'œuf. Il est important de souligner que les milieux à base de phosphocaséinate de calcium sont fréquemment mis à profit pour conserver la semence d'étalon, à l'inverse du chien.

Il existe divers milieux à base de lait tels que l'INRA-96 ou celui de type Kenny. Initialement développés pour la semence équine, ils se sont tous deux montrés bénéfiques pour diluer la semence canine (Cavalcanti *et al.*, 2023 ; Gil *et al.*, 2011 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Pinto *et al.*, 1999). Cavalcanti *et al.*, en 2023, ont déterminé que l'INRA-96 conserve une mobilité supérieure à 80 % après 2 jours de stockage, tandis que Bencharif *et al.*, en 2013, ont démontré que cette mobilité s'effondre en dessous de 30 % au-delà de 4 jours de conservation.

L'extraction des phosphocaséinates ou des β -lactoglobulines offre un contrôle satisfaisant de leur concentration dans les milieux de réfrigération. Le déploiement de cette alternative répond spécifiquement à la demande croissante de produits qui ne sont plus d'origine animale, posant un problème d'un point de vue sanitaire et réglementaire (Lisboa *et al.*, 2021 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Axner et Lagerson, 2016 ; Bergeron et Manjunath, 2006). Le lait entier contenant des enzymes et des protéines spermicides comme la lacténine, il nécessite un traitement thermique préalable entre 92° et 95°C (Johnston *et al.*, 2001).

(e) Autres cryoprotecteurs d'intérêt
(i) Les liposomes

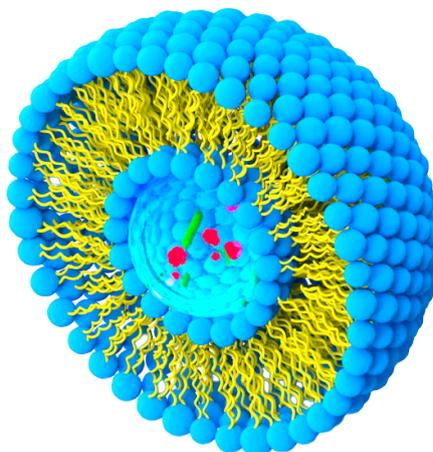


Figure 42 : Représentation schématique de la structure d'un liposome (Source : internet)

Les liposomes constituent une alternative remarquable à l'utilisation des cryoprotecteurs d'origine animale (Noakes *et al.*, 2019). Il s'agit de formations lipidiques de 20 nm à plusieurs μm , structurées en bicouches délimitant une interface entre deux espaces aqueux (Lorin *et al.*, 2004). Composés de phospholipides et de cholestérol, ils sont en mesure d'opérer un transfert de lipides vers les membranes spermatisées. Ce faisant, ils assurent le soutien structurel de la membrane et favorisent la résilience de la semence face au choc thermique et à la peroxydation lipidique (Sieme *et al.*, 2016).

L'utilisation des liposomes de phosphatidylcholine à une concentration de 2 % après 4 jours de réfrigération à 4°C affiche des résultats optimaux chez le taureau, quand bien même leur affinité pour les protéines BSP est moindre que celle des LDL. Des concentrations allant de 4 à 10 % se sont aussi révélées efficaces.

À noter qu'une incorporation démesurée à hauteur de 20 % est susceptible d'altérer la mobilité de la semence canine (Belala *et al.*, 2016 ; Bergeron et Manjunath, 2006).

Faisant preuve d'une protection importante plus particulièrement lorsqu'ils sont riches en lipides insaturés, ils peuvent aisément se substituer au jaune d'œuf et au LDL tous deux d'origine animale et non dénués de risques sanitaires (Sieme *et al.*, 2016 ; Belala *et al.*, 2016 ; Tainturier *et al.*, 2013).

(ii) Les acides aminés

Les acides aminés sont bénéfiques lors de la réfrigération de la semence canine. La glutamine et la proline préviennent la dénaturation des enzymes et sont garantes de la préservation de l'intégrité membranaire. La glutamine peut aussi se comporter comme un substrat énergétique au sein des spermatozoïdes par son intervention dans le cycle de Krebs (Bencharif *et al.*, 2013).

Bencharif *et al.*, en 2013, ont observé qu'un milieu à base de LDL + 20 mM de glutamine fournit des résultats supérieurs aux dilueurs contenant uniquement 6% de LDL. De plus, le milieu LDL complétement en glutamine s'est avéré être le plus intéressant pour maintenir la mobilité supérieure à 30 % après 7 jours de réfrigération à + 4°C. Une concentration déraisonnable en glutamine peut toutefois produire un stress osmotique préjudiciable. Les acides aminés ne peuvent cependant pas se substituer aux cryoprotecteurs classiques, mais viennent en compléments de ces derniers. La glutamine présente notamment un effet synergique avec le glycérol (Bencharif *et al.*, 2013).

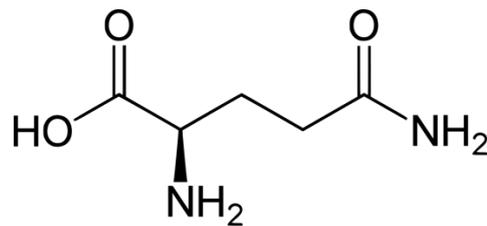


Figure 43 : Formule chimique structurale de la glutamine (Source : wikipédia)

(iii) La Lécithine de soja

Constituée d'une fraction lipoprotéique de basse densité, la lécithine de soja exerce un effet cryoprotecteur majeur à l'égard de la membrane. Elle est composée de 65 % de phospholipides et de triglycérides (Mahiddine et Kim, 2021 ; Dalmazzo *et al.*, 2019). Des préparations commerciales contenant la lécithine ont été développées pour conserver la semence notamment de béliers, d'équidés, et de bovidés. Un bon exemple de milieu en contenant correspond à l'AndroMed (Axner et Lagerson, 2016). Son utilisation n'étant pas d'origine animale, elle limite de ce fait le risque sanitaire (Bustani et Baiee, 2021).

D'après l'étude de Kmenta *et al.*, en 2011, la lécithine de soja incorporée à hauteur de 0,8 %, en association à la catalase, protège davantage les spermatozoïdes canins réfrigérés à 5°C pendant 8 jours que le milieu TRIS-jaune d'œuf. D'autres travaux soulignent en revanche

qu'il existe une protection plus limitée, sa nature amphiphile concourant à la formation de gouttelettes qui réduisent son caractère protecteur.

Dans le cadre de la congélation du sperme canin, la lécithine incorporée à hauteur de 1 à 2 % n'apporte aucun bénéfice qualitatif après décongélation par rapport au jaune d'œuf (Mahiddine et Kim, 2021). Toutefois, lorsque sa concentration s'élève à 0,01, 0,05 ou 0,1 %, elle permet d'offrir une protection du sperme canin congelé similaire à celle du jaune d'œuf (Dalmazzo *et al.*, 2018). Ces découvertes sont à confronter aux données récoltées dans une autre étude de Dalmazzo *et al.*, en 2019, qui a démontré que la lécithine de soja utilisée à ces mêmes concentrations n'est pas en mesure de maintenir une viabilité identique des spermatozoïdes par rapport au jaune d'œuf.

Une surabondance de phosphatidylcholine imputable à une quantité démesurée de lécithine de soja est responsable d'une capacitation prématurée et favorise la réduction de la mobilité et de l'activité mitochondriale. Les résultats obtenus par Dalmazzo *et al.*, en 2018, corroborent ces observations et montrent qu'une capacitation prématurée se produit et se traduit par un pourcentage de spermatozoïdes progressifs et une STR plus faibles. En outre, son incorporation disproportionnée est une cause de dommages attribuée à la viscosité du milieu qui en découle. Son rôle bénéfique n'est donc pas consensuel, bien qu'il soit admis qu'une concentration minimale de 0,1 % de lécithine de soja soit à minima requise (Dalmazzo *et al.*, 2019 ; Nguyen *et al.*, 2019 ; Dalmazzo *et al.*, 2018 ; Kmenta *et al.*, 2011).

(7) La Rosiglitazone

(a) Définitions

La Rosiglitazone, agoniste sélectif des récepteurs PPAR γ (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor gamma), fait partie de la classe des thiazolidinediones (Losano et Daigneault, 2023). Elle est utilisée en thérapeutique humaine pour contrôler la glycémie des individus diabétiques en augmentant la sensibilité à l'insuline des tissus adipeux, musculaires, et hépatique ainsi qu'en facilitant l'absorption intracellulaire du glucose par ces tissus. Il a aussi été rapporté qu'en sa présence, le stockage musculaire du glycogène est favorisé. Elle est plus largement connue pour ses propriétés antifibrotiques, anti-inflammatoires et pour limiter l'hypertension artérielle (Vidal, 2024 ; Mehdipour *et al.*, 2022).

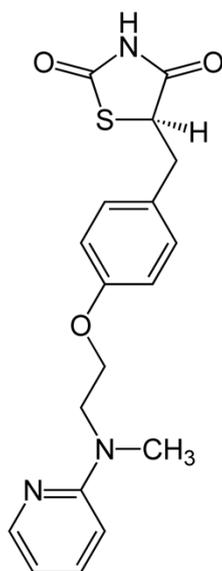


Figure 44 : Formule chimique structurale de l'énantiomère R de la rosiglitazone (Source : Wikipédia)

(b) Modes d'actions

La rosiglitazone se lie au PPAR γ de manière analogue à la 15-désoxy- Δ -12,14-prostaglandine J2 ou PGJ2 qui constitue son agoniste naturel. Cette interaction active le PPAR γ en tant que facteur de transcription génique, mais également comme un élément impliqué dans diverses autres fonctions cellulaires. Ce récepteur est fortement exprimé et impliqué dans le tractus génital de la femelle et du mâle, notamment dans l'épididyme. À titre d'exemple, son activation chez le mâle permet la régulation de la stéroïdogénèse et influence l'état morpho-fonctionnel des cellules de Leydig (Losano et Daigneault, 2023 ; Santoro *et al.*, 2020). Ainsi donc, ce récepteur agit sur l'intégralité du système reproducteur, tant dans sa régulation métabolique et son fonctionnement global que dans sa structure.

Le PPAR γ accroît premièrement le métabolisme glucidique ce qui concourt à l'accumulation du glucose-6-phosphate qui, entrant dans la glycolyse ou dans la voie des pentoses-phosphates, mène à la synthèse accrue d'ATP et de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Plus spécifiquement, en s'accumulant, ce dernier facilite l'élimination des ROS et soutient l'équilibre oxydo-réducteur par la voie des pentoses-phosphates (Santoro *et al.*, 2020).

Le PPAR γ activé est aussi engagé dans la stimulation du métabolisme lipidique. La signalisation qui en découle s'accompagne de l'augmentation des β -oxydations lipidiques, de l'accroissement de l'activité de l'enzyme lipase, d'une augmentation des HDL ainsi que d'une

réduction des LDL circulants et d'une chute de la triglycéridémie (Losano et Daigneault, 2023 ; Mehdipour *et al.*, 2022 ; Santoro *et al.*, 2020).

La stimulation du PPAR γ prend aussi part à l'accumulation de la protéine kinase B ou AKT phosphorylée qui aboutit à la baisse d'activité des voies apoptotiques médiées par les caspases ainsi qu'à la stimulation de la mobilité (Santoro *et al.*, 2020 ; Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2019).

Des modifications membranaires peuvent enfin survenir postérieurement à l'activation du PPAR γ . Elles se caractérisent par un efflux de cholestérol ainsi qu'une phosphorylation de la tyrosine (Santoro *et al.*, 2020).

(c) Effets sur les spermatozoïdes

La protéine PPAR γ a été détectée dans les spermatozoïdes humains et animaux et joue de ce fait un rôle essentiel sur leurs fonctions et l'expression de la fertilité masculine (Losano et Daigneault, 2023). C'est pourquoi la rosiglitazone suscite un intérêt croissant pour la conservation de la semence animale, notamment pour son rôle prépondérant dans la flexibilité métabolique non génomique (Mehdipour *et al.*, 2022).

L'activité transcriptionnelle du spermatozoïde éjaculé étant inexistante ou presque en raison de la condensation de l'ADN, le PPAR γ agit comme un facteur de transcription non génomique permettant de fournir des réponses rapides de l'ordre de quelques minutes. Le PPAR γ interagit donc avec d'autres éléments que l'ADN, en l'occurrence avec des seconds messagers extranucléaires.

Considérant la modulation de la résistance cellulaire à l'insuline, il a été émis l'hypothèse que la rosiglitazone favorise la pénétration intra-cellulaire du glucose dans les spermatozoïdes. Ainsi, l'incubation des spermatozoïdes d'étalon et de verrat avec de la rosiglitazone a montré une majoration de l'utilisation métabolique du glucose (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Swegen *et al.*, 2016).

La rosiglitazone induit aussi la substitution de la phosphorylation oxydative par la voie glycolytique dont l'activité s'intensifie en sa présence (Wang *et al.*, 2019 ; Swegen *et al.*, 2016). Cette flexibilité métabolique permet une production d'énergie accrue rapidement disponible pour les spermatozoïdes (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2019).

Il a aussi été suggéré que la rosiglitazone favorise la mobilité par l'amplification de la glycolyse qu'elle génère (Mehdipour *et al.*, 2022). Chez le bélier, Mehdipour *et al.*, en 2022, ont détecté une amélioration de la mobilité totale, de la mobilité progressive et de la vitesse moyenne des spermatozoïdes cryoconservés avec de la rosiglitazone. Swegen *et al.*, en 2016, ont pour leur part relevé une hausse de mobilité après une période de conservation à 37°C dans un milieu supplémenté en rosiglitazone. De manière analogue, Wang *et al.*, en 2019, ont observé que le sperme de verrat conservé à 17°C pendant 7 jours avec 50 µM de rosiglitazone préserve adéquatement la mobilité. Des manifestations similaires ont été identifiées chez l'Homme (Wang *et al.*, 2019).

L'intégrité membranaire et acrosomale du sperme de bélier après congélation avec 60 µM de rosiglitazone est assurée par son aptitude à former une surface protectrice autour de la membrane. Wang *et al.*, en 2019, ont fait des observations similaires et ont conclu que la rosiglitazone contribue à protéger la membrane des spermatozoïdes de verrat (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019).

L'activité mitochondriale et la production d'ATP du sperme de bélier sont également améliorées en présence de rosiglitazone, d'autant plus qu'elle exerce un rôle protecteur intéressant les mitochondries (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019 ; Swegen *et al.*, 2016).

La phosphorylation de l'AKT est impliquée dans les voies de signalisation de la survie cellulaire. À l'inverse, une déphosphorylation de cette protéine conduit à l'activation des facteurs pro-apoptotiques comme la pro-caspase 3 inactive qui est clivée en caspase 3 active (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2019). Ortiz-Rodriguez *et al.*, en 2019, ont ainsi rapporté qu'en présence de rosiglitazone, la phosphorylation de l'AKT est maintenue à des niveaux élevés qui empêchent l'activation de la caspase 3 dans les spermatozoïdes d'étalon cryoconservés. Mehdipour *et al.*, en 2022, ont noté que la complémentation d'un milieu de réfrigération avec 60 µM de rosiglitazone restreint la mort cellulaire médiée par la caspase 3. Wang *et al.*, en 2019, ont de façon identique rapporté que la semence de verrat conservée à 17°C était mieux préservée lors d'une incubation dans un environnement supplémenté avec 50 µM de rosiglitazone.

Enfin, l'implication de la rosiglitazone dans la réduction des ROS est largement établie. L'étude de Mehdipour *et al.*, en 2022, suggère que 60 µM de rosiglitazone protège les spermatozoïdes notamment par la capacité de ses groupements phényles et pyridines à se comporter comme des piègeurs de radicaux libres. Chez le rat, elle est responsable de la réduction des anions superoxydes en inhibant la NADPH oxydase. En ce sens, l'activation de

la protéine kinase (AMPK) par la rosiglitazone est à l'origine d'une réduction du stress oxydatif en inhibant la NADPH oxydase (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019).

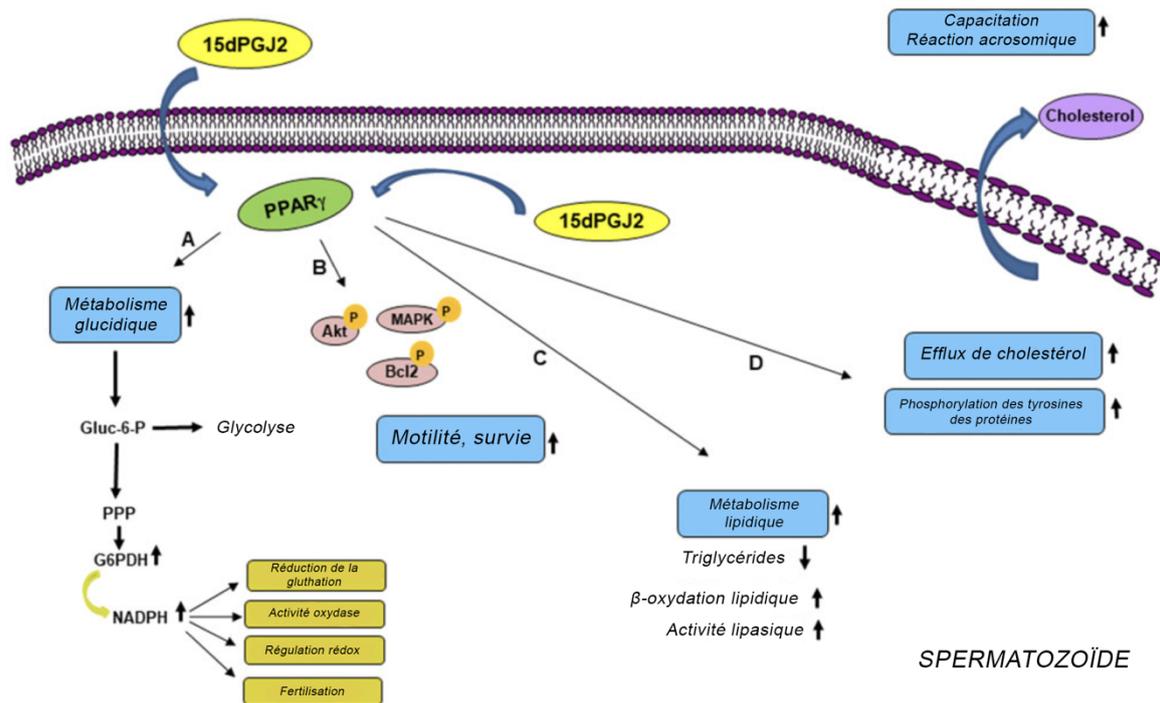


Figure 45 : Rôles et mécanismes d'action du PPAR γ dans le spermatozoïde. Gluc-6-P : glucose-6-phosphate. PPP : voie des pentoses phosphates. 15dPGJ2 : 15-désoxy- Δ -12,14-prostaglandine J2. G6PDH : glucose-6-phosphate dehydrogenase. PPAR γ : peroxisomal proliferator activated gamma (Santoro *et al.*, 2020)

En présence de rosiglitazone, le métabolisme lipidique du spermatozoïde s'intensifie également menant à un accroissement de l'activité lipase et des réactions de β -oxydations associées à une réduction de la concentration en triglycérides (Santoro *et al.*, 2020).

Enfin, la stimulation du PPAR γ semble conduire à un efflux en cholestérol et à une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine, éléments clés du processus de capacitation. Ainsi donc, la rosiglitazone peut être impliquée dans un accroissement des manifestations de capacitation (Santoro *et al.*, 2020).

Une concentration plus élevée en rosiglitazone de l'ordre de 100 μ M tend néanmoins à ne pas procurer d'effet bénéfique supplémentaire en regard de la protection acrosomale et membranaire. À contrario, une cytotoxicité cellulaire est suspectée de se produire à partir d'une certaine concentration (Wang *et al.*, 2019).

iii) Avantages et inconvénients des dilueurs

La dilution permet de fractionner l'échantillon ainsi utilisable pour plusieurs inséminations, soit répétées sur la même femelle pendant sa période d'œstrus, soit sur plusieurs femelles différentes. Ce faisant, elle contribue à l'échange d'ADN ainsi qu'à l'amélioration génétique canine (Noakes *et al.*, 2019). La dilution diminue aussi la quantité de certains facteurs délétères dans l'échantillon comme certains facteurs présents dans le liquide prostatique. Néanmoins chez le taureau, les protéines BSP étant impliquées dans la formation du réservoir oviductal et dans la capacitation, leur dilution peut secondairement compromettre la fertilité (Bergeron et Manjunath, 2006). Une perte de certains facteurs protecteurs peut aussi être la conséquence d'une dilution excessive, donnant lieu à la dépréciation qualitative de l'échantillon (Caballero *et al.*, 2012). Les enzymes et substances antioxydantes du liquide prostatique en sont un bon exemple, la réduction de leur concentration protectrice pouvant mener à une sensibilité accrue des spermatozoïdes face aux dérivés oxygénés. Cet état de fait est toutefois largement compensé par l'incorporation d'antioxydants dans les milieux de réfrigération (Vieira *et al.*, 2018).

La composition en agents cryoprotecteurs influe considérablement sur la conservation des spermatozoïdes. En raison des phospholipides présents dans le milieu, leur assimilation au sein de la membrane peut aboutir à des remaniements structurels indésirables (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017). Aussi, une concentration trop faible en LDL ne permet pas de neutraliser convenablement les BSP chez le taureau (Bergeron et Manjunath, 2006). Il a ainsi été proposé par Bergeron et Manjunath, en 2006, de doubler le volume du milieu ou d'augmenter la concentration en jaune d'œuf pour fournir un soutien adapté aux spermatozoïdes. Cependant, le pourcentage de viabilité et de mobilité se réduit drastiquement lorsque la dilution ou la concentration en cryoprotecteurs sont immodérées, des effets cytotoxiques majeurs étant à l'œuvre (Sieme *et al.*, 2016 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Garner *et al.*, 1997). Les cryoprotecteurs comme le jaune d'œuf sont également composés d'éléments visqueux qui réduisent la vitesse et la mobilité spermatique (Johnston *et al.*, 2001).

Leur composition reposant sur la base d'un environnement nutritif, les milieux de réfrigération peuvent être le siège d'une croissance bactérienne indésirable (Ďuračka *et al.*, 2023). En outre, les paramètres physico-chimiques tels que le pH, l'oxygène, la température et l'activité de l'eau sont autant de facteurs limitant le développement bactérien dans un milieu de conservation (Luño *et al.*, 2020).

Les milieux de réfrigération commerciaux, dont la composition est constante, mais bien souvent inconnue, permettent de comparer de manière fiable et répétable les travaux de recherches effectués, mais constituent néanmoins une source de dépenses conséquente. C'est pourquoi leur élaboration est couramment faite manuellement en laboratoire, méthode qui permet de surcroît de donner accès à l'expérimentateur à sa composition exacte. Cette façon de procéder demeure chronophage et nécessite un savoir-faire et une technicité exemplaire, les erreurs de manipulation menant à des dégâts considérables, un échec de la reproduction ou à des pertes économiques majeures (Goericke-Pesch et Failing, 2012 ; Pinto *et al.*, 1999).

g) Technique de réfrigération

i) La centrifugation

Lors du prélèvement, le fractionnement de l'éjaculat est rarement couronné de succès ou est réservé aux spécialistes, le mélange des fractions étant le plus souvent inéluctable (Peña *et al.*, 2006). Le recours à la centrifugation avant dilution à des vitesses de l'ordre de 2500 tours/min pendant 5 minutes permet d'éliminer le liquide prostatique et de concentrer les spermatozoïdes de l'échantillon (Ďuračka *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Sieme *et al.*, 2016 ; Greer *et al.*, 2015). Une force de 720 g maximum pendant 5 minutes est associée à un minimum de dégradation cellulaire, bien que des valeurs comprises en 420 et 900 g pendant 5 à 10 minutes soient rapportées comme acceptables (Sugai *et al.*, 2023 ; Rijsselaere *et al.*, 2002). Bien que la réfrigération de la semence soit possible en présence du liquide prostatique, son élimination améliore sensiblement sa qualité (Noakes *et al.*, 2019). Le recours à la centrifugation par coussin comme le gradient de Percoll peut être utile pour purifier un éjaculat contenant des cellules sanguines ou présentant une contamination bactérienne anormale (Ďuračka *et al.*, 2023 ; Rijsselaere *et al.*, 2004). Bien que cette technique soit efficace, 25 % des spermatozoïdes les plus fléchants sont en général perdus dans le surnageant (Aurich, 2008). La force appliquée peut cependant être dommageable pour la membrane plasmique et altérer la mobilité ainsi que l'intégrité acrosomale (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017). La remise en suspension de l'échantillon doit aussi s'effectuer avec délicatesse (Aurich, 2008). Il est cependant déconseillé de recourir à cette procédure après réfrigération (Sugai *et al.*, 2023).

L'élimination du liquide prostatique entraîne cependant la disparition de facteurs protecteurs qu'il contient comme les antioxydants (Treulen *et al.*, 2012). La GSH voit par conséquent sa concentration réduite jusqu'à 68 % bien que cette perte soit compensée par la supplémentation du milieu en antioxydants (Silvestre *et al.*, 2021 ; Lucio *et al.*, 2016). Au cours de la centrifugation, il est toutefois établi que les ROS ont aussi tendance à s'accumuler

(Ďuračka *et al.*, 2023). De surcroît, les prostasomes du liquide prostatique favorisent l'activation de la mobilité par fixation du zinc libre (Mogielnicka-Brzozowska *et al.*, 2015).

Une technique plus performante de centrifugation sur coussin a été développée. Elle consiste à appliquer une force de 1000 g pendant 20 minutes sur un tube qui contient une solution dense se déposant au fond du tube. Elle forme ainsi une couche dense qui empêche les spermatozoïdes de s'agglutiner et d'être compressés au fond du flacon. Aussi séduisante soit-elle, cette technique demeure très peu employée à l'heure actuelle chez le chien, mais reste de règle chez l'étalon (Aurich, 2008).

ii) La dilution

Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension par ajout du milieu de réfrigération réchauffé à +37°C (Noakes *et al.*, 2019 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Linde-Forsberg, 2001). La dilution doit être effectuée le plus rapidement possible, la semence se dégradant en peu de temps à température ambiante (Decuadro-Hansen, 2004).

Le rapport de dilution employé varie généralement d'une part de semence pour deux à cinq parties de dilueur (Peña *et al.*, 2006 ; Johnston *et al.*, 2001). Les éjaculats faiblement concentrés doivent être dilués avec une quantité plus modérée de dilueur (Bergeron et Manjunath, 2006). D'après Sugai *et al.*, en 2023, une concentration de 200.10^6 spermatozoïdes/mL a montré de bons résultats pour préserver la semence canine pendant 24 heures et notamment l'intégrité membranaire malgré l'élimination presque totale du liquide prostatique. Une dilution à hauteur 20.10^6 spermatozoïdes/mL est également apparue comme appropriée en permettant une préservation correcte des paramètres de mobilité à + 5°C bien que Sugai *et al.*, en 2023, aient détecté de moins bons résultats à cette concentration après 24 heures de stockage réfrigéré et élimination du liquide prostatique. Dans l'idéal, le nombre de spermatozoïdes total doit s'élever au minimum à 150.10^6 (Sugai *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Bouchard *et al.*, 1990). Le degré de dilution à appliquer est influencé par la concentration initiale en spermatozoïdes ainsi que par le volume final requis pour l'insémination variant de 4 à 10 mL, une insémination avec une quantité trop importante pouvant conduire à un reflux et à une diminution du nombre de spermatozoïdes inséminés. Une dilution trop importante peut être à l'origine d'une modification de l'osmolarité conduisant à un dysfonctionnement prématuré des spermatozoïdes d'autant plus qu'il a été démontré qu'une dilution excessive de l'ordre de 1 part de semence contre 32 parts de dilueur ait été rapportée comme réduisant significativement la mobilité progressive (Sugai *et al.*, 2023 ; Peña *et al.*, 2006 ; Linde-Forsberg, 2001 ; Johnston *et al.*, 2001). À des taux de dilution trop élevés, même l'ajout de substrat énergétique ne permet

pas de préserver l'intégrité de la membrane plasmique car la dilution excessive des facteurs du liquide prostatique réduit la stabilisation des lipides membranaires (Sugai *et al.*, 2023). A noter que la quantité totale de spermatozoïdes nécessaire au succès d'une l'insémination artificielle chez la chienne a été estimée à hauteur de $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes (Gill *et al.*, 1970).

La dilution doit être progressive et délicate en déposant le milieu goutte à goutte dans le tube contenant le sperme. Ces précautions limitent la survenue de dommages inhérents au choc osmotique et thermique. Le tube est ensuite fermé hermétiquement puis emballé dans un parafilm. Les bouchons en caoutchoucs sont à éviter en raison de leurs effets spermicides (Fontbonne, 2022 ; Johnston *et al.*, 2001). Afin de garantir une bonne traçabilité, le flacon doit être correctement identifié et porter au minimum la date de récolte, les noms du propriétaire et de l'animal ainsi que son numéro d'identification (Fontbonne, 2022 ; Greer, 2015).

iii) La réfrigération à + 4°C

La réfrigération est mise en œuvre après dilution en immergeant le tube dans un verre d'eau par la suite placé dans d'un réfrigérateur classique (Fontbonne, 2022). Cette disposition limite le refroidissement brutal (Peña *et al.*, 2006 ; Feldman et Nelson, 2004). La vitesse à laquelle la semence est portée à 4°C est un facteur essentiel à moduler pour limiter les retentissements du choc dû au froid sur les spermatozoïdes (Rodenas *et al.*, 2014 ; Decuadro-Hansen, 2004). Le refroidissement de 0,3 à 1°C/min sur une durée de 60 à 120 minutes préserve au mieux les paramètres spermatiques (Rodenas *et al.*, 2014 ; Peña *et al.*, 2006). Elle ne doit pas pour autant être réalisée de manière trop lente, une vitesse de 0,1°C/min aboutissant à une détérioration plus marquée par rapport à des vitesses de réfrigération de l'ordre de 1 à 0,3°C/min (Bencharif *et al.*, 2013).

Selon l'étude de Rodenas *et al.*, en 2014, le refroidissement rapide de 2,25°C/min, préserve adéquatement la mobilité après 96 h à + 4°C. Il est suggéré que le refroidissement rapide constitue une alternative appropriée à la réfrigération lente en amenant sa durée de réalisation à seulement 8 minutes contre 2 h avec des vitesses lentes (Rodenas *et al.*, 2014).

iv) Le conditionnement et l'expédition

Le tube identifié est placé dans un sac scellé puis conditionné pour l'expédition. Il doit obligatoirement être enveloppé dans une importante couche de coton pour éviter la mise en contact directe de la semence avec le pain de glace sous peine de la voir se congeler et se détériorer (Greer, 2015). La semence doit demeurer à une température stable de 4 ou 5°C pendant le transport et être utilisée dans les 48 heures (Peña *et al.*, 2006 ; Feldman et Nelson, 2004).

Le sperme canin peut être expédié de deux manières différentes, soit dans un contenant de capacité calorifique suffisante, soit par du matériel commercial spécifiquement conçu à cet effet (Johnston *et al.*, 2001). La technique d'envoi classique utilise une boîte polystyrène compartimentée dans laquelle sont entreposés des pains de glace (Fontbonne, 2022 ; Tainturier *et al.*, 2013). Il est aussi possible de recourir à une boîte en polystyrène non compartimentée dans laquelle sont disposés des paquets de glace surmontés de sacs réfrigérés, le tout recouvert de papier journal. Le tube est ensuite déposé sur le journal évitant son contact direct avec la glace et limitant un choc dû au froid important (Greer, 2015 ; Linde-Forsberg, 2001). Le flacon peut aussi être placé dans un thermos refroidi à 4°C 2 heures auparavant en cas de températures extérieures défavorablement élevées (Greer, 2015 ; Tainturier *et al.*, 2013). Pour garantir le maintien d'une température proche de 4°C, le fond de la bouteille peut être rempli de glace au-dessus de laquelle est placée une couche de coton qui empêche le gel de l'échantillon (Linde-Forsberg, 2001 ; Tainturier *et al.*, 2013).



Figure 46 : Système Equitainer (Peña *et al.*, 2006)

Les systèmes commerciaux plus onéreux, comme le kit Minitube à base de néopor qui garantit le maintien de la température pendant 48 heures ou bien l'Equitainer développé initialement pour l'expédition de la semence équine réfrigérée, sont tout à fait appropriés pour

l'expédition des prélèvements canins (Colombo *et al.*, 2022 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Rijsselaere *et al.*, 2011 ; Peña *et al.*, 2006 ; Linde-Forsberg, 2001). D'après Lopes *et al.*, en 2009, le système Equitainer dont la réfrigération est certifiée pendant 72 heures, permet une meilleure préservation qualitative après 3 jours de stockage par rapport aux boîtes en polystyrène ou aux thermos. Cunha *et al.*, en 2014, ont cependant détecté des variations conséquentes de température au sein des boîtes de transport, notamment en cas de fortes chaleurs extérieures, soulignant la nécessité d'acheminer le colis le plus rapidement possible.

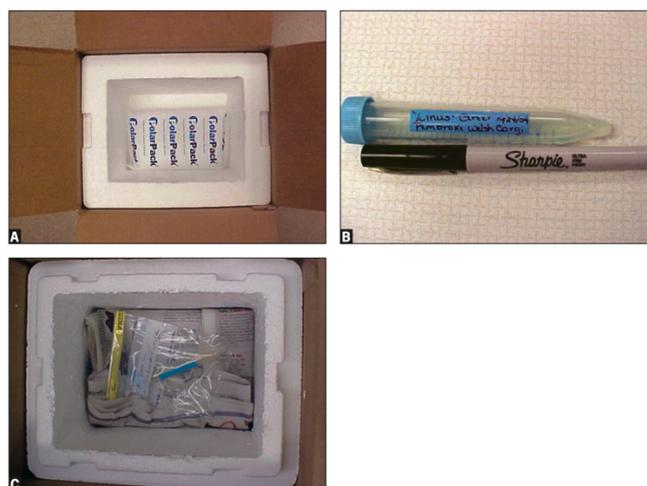


Figure 47 : Méthode de conditionnement réfrigéré. A : boîte d'expédition polystyrène. B : tube étiqueté. C : conditionnement final (Greer, 2015)

Le certificat vétérinaire faisant état de l'état de santé de l'animal et de la qualité de sa semence ainsi que les documents ayant trait à l'animal, doivent être placés dans le colis (Fontbonne, 2022 ; Greer, 2015 ; Peña *et al.*, 2006). La boîte est ensuite correctement refermée une fois le contenu solidement calé (Greer, 2015).

L'expédition de la semence se déroule généralement en moins de 48 h par l'intermédiaire d'un coursier, d'un service postal, ou bien d'une compagnie aérienne dans le cas de destinations lointaines (Colombo *et al.*, 2022 ; Greer, 2015 ; Tainturier *et al.*, 2013 ; Rijsselaere *et al.*, 2011). Il est de rigueur de s'enquérir des conditions de prise en charge par la compagnie de transport, certaines d'entre-elles n'assurant pas le transport de matières biologiques (Greer, 2015). La réglementation en vigueur dans le pays de destination doit aussi être vérifiée afin que l'importation de sperme réfrigéré soit effectuée dans un cadre légal, bien que les restrictions soient beaucoup moins nombreuses que celles inhérentes au sperme congelé (García-Vázquez *et al.*, 2016 ; Goericke-Pesch *et al.*, 2012). Ces exigences sont souvent transposées à partir du Règlement de la Fédération Cynologique Internationale (FCI) (García-

Vázquez *et al.*, 2016). Des tests sérologiques pour la Brucellose et la Leptospirose sont souvent requis (Rijsselaere *et al.*, 2011). Le principal défaut de ce mode d'échange réside dans la non honorabilité des délais de livraison qui conduisent à des retards d'inséminations ou bien à des échecs de reproduction (Greer, 2015).

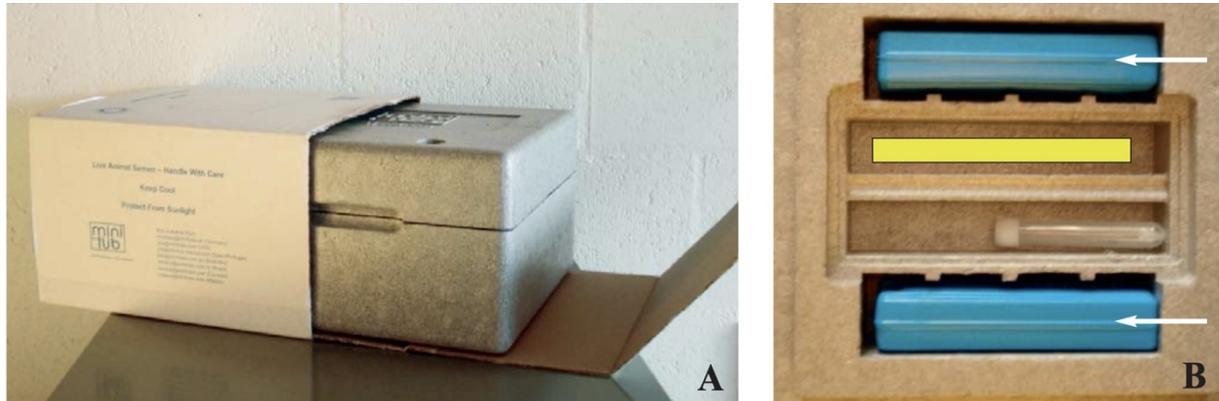


Figure 48 : Boîte Minitube néopor pour le transport réfrigéré de la semence canine. Barre jaune : échantillon. Flèches blanches : pains de glace (Rijsselaere et al., 2011)

Au cours de cette seconde partie, il a donc été question de présenter les caractéristiques de la semence canine ainsi que les modalités de récolte et de processus de la réfrigération de la semence canine.

La suite de cette étude portera sur la troisième partie qui consistera en une analyse expérimentale comparative de neuf milieux de réfrigération de semence canine à + 4°C.

PARTIE 3 :
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les méthodes de reproduction font l'objet d'un développement croissant afin de satisfaire les besoins de l'élevage canin. L'élaboration de milieux de réfrigération plus efficaces représente un enjeu crucial pour améliorer la qualité de la semence réfrigérée et accroître le succès reproducteur. Face à cette nécessité, de très nombreux dilueurs contenant différents cryoprotecteurs ont été conçus et sont d'ores et déjà présents sur le marché. La plupart d'entre eux sont en réalité un compromis audacieux entre les avantages et les inconvénients inhérents à leur composition conduisant à la nécessité de déterminer les plus performants d'entre eux.

Cette étude a ainsi pour premier but de comparer divers milieux actuellement disponibles dans le commerce ou non et de déterminer ceux qui parviennent à conserver le plus efficacement possible les paramètres de mobilité des spermatozoïdes canins stockés à + 4°C pendant 192 heures.

Le second intérêt de cette étude visait à mettre en exergue le bénéfice et l'influence potentiels de la rosiglitazone sur la semence canine réfrigérée, cette molécule ayant montré une efficacité notable pour conserver la semence de bélier, d'étalon et de verrat. À ce jour, aucune étude visant à évaluer les effets de cette molécule sur la semence canine diluée et réfrigérée n'a pour l'heure été réalisée. Le manque de données à ce sujet justifie ainsi pleinement son évaluation dans le cadre de cette étude.

À préciser également que pour chacun de ces objectifs, il était question de porter une attention toute particulière aux paramètres évalués entre 24 et 72 heures de stockage, ces durées représentant le délai nécessaire à l'expédition de la semence puis à son dépôt au niveau du vagin ou de l'utérus d'une femelle en œstrus.

2) MATÉRIEL ET MÉTHODE

a) Animaux

Tableau III : Désignation des chiens mâles reproducteurs récoltés

CHIENS	ÂGE	RACE	NOMBRE DE PRÉLÈVEMENTS
Nostromo	6 ans	Rottweiler	3
Parker	3 ans	Terre-neuve	1
Rowdy		Corgi	2
Stormfire	18 mois	American Staffordshire terrier	3
Hermès			1
Tom	3 ans		1
Stan	2 ans	Staffie	1
Spirit			2
Vasco	2 ans	Beagle	1
Voice			
Virus			
Lockness	6-7 ans	Border Collie	1
Apollo	2 ans et 6 mois		2
TOTAL			20

Dans le cadre de cette étude, 20 éjaculats ont été prélevés auprès de 13 chiens mâles reproducteurs de races et d'âges différents.

Tous les animaux sont issus d'élevages localisés à proximité de l'agglomération nantaise. Avant toute inclusion à l'étude et tout prélèvement, un examen clinique exhaustif a été effectué afin de s'assurer de l'absence d'anomalie sous-jacente non détectée au préalable.

b) Critères d'inclusions et d'exclusions

Pour être inclus dans cette étude, les reproducteurs devaient être pubères, fertiles, âgés au minimum de 12 mois et maximum de 7 ans, présenter un bon état de santé sans maladie intercurrente, ne pas avoir reçu de traitement au cours des 3 mois précédents le recueil y compris la vaccination. S'agissant d'individus reproducteurs, leur statut vaccinal CHPPiL4R (Maladie de Carré, Hépatite de Rubarth, Parvovirose, Parainfluenza, Leptospirose, Rage) et antiparasitaire notamment la vermifugation sont cependant à jour.

Aussi, immédiatement après chaque prélèvement, la mobilité massale est examinée afin de s'assurer qu'elle atteigne au minimum 4/5 sur l'échelle de MILOVANOV, au même titre que la mobilité qui ne peut être inférieure à 30 %. La concentration de la fraction spermatique doit être au minimum de $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL afin que le mâle soit retenu.

c) Milieux à tester

Au total, neuf milieux de dilution ont été comparés dans cette étude.

i) Milieu témoin : milieu à base de jaune d'œuf (JO) (1) Composition

Le milieu à base de jaune d'œuf à 20 % constitue le témoin positif de cette étude. Pour la suite de ce travail, il sera désigné par la mention « JO ». Sa composition figure dans le tableau IV.

Tableau IV : Composition du milieu témoin à base de jaune d'œuf à 20 %

COMPOSANTS	QUANTITÉS
TRIS	3,026 g
Acide citrique	1,7 g
Fructose	1,25 g
Pénicilline / Streptomycine prêt à l'emploi	10 mL
Jaune d'œuf à 20 %	20 mL
Eau distillée	QSP 100 mL

(2) Préparation

Le milieu à base de jaune d'œuf a été préparé à partir d'œuf de poule. Considérant les effets délétères de la membrane vitelline et du blanc d'œuf lors de l'entreposage au froid, seul le jaune d'œuf doit être conservé pour la préparation du milieu témoin. L'extraction du jaune d'œuf est obtenue en séparant manuellement le jaune et le blanc. Par la suite, le jaune d'œuf est asséché sur un papier buvard afin d'éliminer les résidus du blanc d'œuf puis la membrane vitelline est ponctionnée à l'aide d'une seringue d'insémination artificielle et le jaune est aspiré. L'opération est répétée autant que nécessaire jusqu'à obtenir 20 mL de jaune d'œuf pur.

Une fois les différents éléments mélangés et le milieu de 100 mL préparé dans un bécher stérile, des aliquotes de 5 mL sont prélevés et placés dans des flacons de 5 mL congelés à -180°C.

ii) Milieu jaune d'œuf supplémenté en Rosiglitazone (JO+R)

Un milieu à base de jaune d'œuf complétement en rosiglitazone est aussi préparé. Il est obtenu en ajoutant 50 µM de rosiglitazone dans un milieu à base de 20 % de jaune d'œuf identique au milieu témoin (JO). Il y sera fait référence sous la mention « JO+R ». Il est préparé de façon identique au milieu témoin JO, à l'exception près qu'il est élaboré pour un volume final de 250 mL auquel sont ajoutés 4,46 mg de rosiglitazone. Des aliquotes de 5 mL sont ensuite préparées puis congelées à - 180°C.

iii) Les autres milieux

Les autres milieux employés sont compilés dans le tableau IV. Ils sont au nombre de 7 et correspondent à des milieux à vocation commerciale issus de différents laboratoires.

Seuls le CANI EX LT®, CANI EX ST® et MASTERBREEDER® ne sont pas disponibles dans le commerce.

L'accès aux données de composition reste cependant très restreint. Ci-après, sont exposées les quelques caractéristiques auxquelles il est possible d'avoir accès.

Tableau V : Dénominations et principales caractéristiques des dilueurs utilisés dans cette étude

DÉNOMINATION	LABORATOIRE	CARACTÉRISTIQUES THÉORIQUES
CaniPlus Chill ST® <i>(Abrégé CHILL ST®)</i>	Minitube	<ul style="list-style-type: none">• Contient des antibiotiques• Sans protéines animales• Préserve 70 % de mobilité pendant 5 jours
CaniPlus Chill LT® <i>(Abrégé CHILL LT®)</i>		<ul style="list-style-type: none">• Contient des antibiotiques• Sans protéines animales• Préserve 70 % de mobilité pendant 10 jours
CANI-EX (LT/ST) En développement <i>Non présent sur le marché</i>	HuVeSearch	<ul style="list-style-type: none">• 22,5 g de poudre micronisée (250 mL)• Pronexcell et Lipex• Protéines / lipides de soja et de lait de vache• Pénicilline (0,04 g/L) + Gentamicine (0,2 g/L)• Préservation pendant 3 jours• Conservation à court terme

<p>Canis EX LT® + R <i>Non présent sur le marché</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> • Milieu CANI EX LT® supplémenté à hauteur de 50 µM de rosiglitazone • Fournis par l'entreprise sous forme de poudre à solubiliser dans 20 mL d'eau déminéralisée à 30°C
<p>BOTUDOG Turbo® <i>(Abrégé BOTUDOG®)</i></p>	<p>Botupharma</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Jaune d'œuf + Glycérol • Poudre à diluer • Caséines
<p>MASTERBREEDER® En développement <i>Non présent sur le marché</i></p>	<p>Masterbreeder</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Conservation pendant 10 jours

Les Pronexcell sont des mélanges de protéines purifiées qui protègent les spermatozoïdes face aux effets néfastes du liquide prostatique, du choc dû au froid et de l'agrégation cellulaire. Les Lipex quant à eux sont des mélanges lipidiques qui tiennent un rôle anti-oxydant, stabilisateur de la membrane plasmique et qui stimulent la mobilité au cours de la réfrigération (HuVeSearch, 2021).

d) Méthode de récolte des échantillons de sperme

Pour des raisons évidentes d'organisation et de disponibilité des donneurs, les prélèvements de sperme ont été effectués sur différentes périodes entre les mois de mai et juillet 2023. La technique employée a été décrite dans la partie II de la deuxième sous-partie. Le recueil s'est appuyé sur l'utilisation d'un vagin artificiel. Tous les échantillons ont été prélevés par un même manipulateur qualifié en la matière.

Le recueil est effectué dans un environnement calme, en ayant eu soin d'éliminer toute source de stress potentielle et en limitant le nombre de personnes dans la pièce. La présence d'une femelle en chaleur a été utile pour s'assurer de la réussite de la procédure. Avant la récolte, matériel et tubes en plastique à usage unique ont été préchauffés dans une étuve à 37°C.

Certains mâles ont été récoltés plusieurs fois. Pour ce faire, les prélèvements ont été effectués à 48 heures d'intervalle afin que la récolte n'induisse pas une altération artificielle de la qualité de la semence. Le tableau III rassemble tous les chiens prélevés ainsi que le nombre d'échantillons récoltés.

Les trois fractions ont été séparées pour conserver exclusivement la fraction spermatique, riche en spermatozoïdes. Pour ce faire, les tubes de récolte ont été changés à

chaque étape de l'éjaculation. La distinction du passage de la phase spermatique à prostatique étant délicate, le mélange des fractions demeure souvent inévitable. Ainsi, pour palier à cet écueil, le tube de prélèvement de la phase spermatique a été systématiquement changé avant la fin de son émission, permettant le recueil d'une fraction presque pure ne requérant aucune centrifugation. Une fois la fraction spermatique isolée, les flacons ont été placés au bain-marie à 37°C afin de limiter la dégradation post-éjaculatoire à température ambiante.

e) Évaluation initiale de la semence

Sans délai, l'échantillon est analysé afin de vérifier que l'éjaculat réponde aux critères d'inclusions.

Une goutte de la fraction spermatique a été déposée à l'aide d'une micropipette sur une lame préchauffée à 37°C puis a été analysée par microscopie optique au grossissement 100x. L'appréciation de la mobilité massale initiale (T0H) s'est appuyée sur l'échelle de MILOVANOV (Martinot, 2016).

Tableau VI : Table d'évaluation de la mobilité massale, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (Martinot, 2016)

0	Absence totale de mouvements, spermatozoïdes morts
1	Aucun mouvement d'ensemble Discrète mobilité individuelle
2	Mouvement d'ensemble circulaire
3	Mobilité décrite en cercle centrée sur les spermatozoïdes
4	Mouvement d'ensemble Vagues rondes qui se déplacent
5	Mouvement d'ensemble en vague Mobilité fléchante

Une analyse informatisée à l'aide de l'analyseur d'image IVOS II (Hamilton-thorne) a ensuite été effectuée pour déterminer la mobilité progressive et les paramètres cinétiques initiaux associés, ainsi que la concentration de l'échantillon.

Afin de s'assurer de l'étalement correct des spermatozoïdes sur la lame et de limiter le risque d'erreur inhérent à l'appareil, cette évaluation s'est portée sur un volume d'échantillon dilué au quart avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline) portée à une température de 37°C. Un

volume de 20 μL est ensuite déposé sur une lame de microscope elle aussi préchauffée à 37°C puis placée dans l'appareil pour analyse.

f) Dilution de la semence et réfrigération

Les milieux de réfrigération à tester, préalablement conservés au froid, sont réchauffés dans un bain-marie à 37°C. Concomitamment, neuf cryotubes sont préparés pour chaque échantillon puis sont identifiés avec les noms du milieu et de l'animal. Un volume de 100 μL de chaque échantillon de semence est incorporé dans chaque tube après s'être assuré que les critères d'inclusions ont été respectés. Une fois la concentration initiale de l'échantillon déterminée, la dilution est effectuée en rajoutant le volume de chaque dilueur nécessaire dans chacun des cryotubes de façon à obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes/mL.

Les paramètres cinétiques initiaux (T0H) sont alors immédiatement analysés par système CASA. Comme précédemment, une dilution au quart est entreprise en déposant 20 μL de chaque cryotube dans des tubes Eppendorf contenant 60 μL du milieu pur respectif sans sperme préchauffé à 37°C. Un volume de 20 μL est ensuite déposé sur une lame de microscope chauffée à 37°C puis analysée à l'IVOS.

Les neuf cryotubes sont finalement placés verticalement dans une vitrine réfrigérante et conservés à + 4°C.

g) Évaluation de la mobilité et des paramètres cinétiques

Au préalable, chaque cryotube est soumis au vortex pendant quelques secondes afin d'homogénéiser la préparation et de répartir les spermatozoïdes dans l'ensemble du milieu.

Toutes les 24 heures, une quantité de 20 μL de chaque cryotube est alors mélangée dans un tube Eppendorf avec 60 μL du milieu pur respectif préchauffé à 37°C. Le tube ainsi préparé est réchauffé pendant 10 minutes dans une étuve à 37°C. Un volume de 20 μL y est ensuite prélevé après homogénéisation puis immédiatement analysé à l'IVOS II sur une lame réchauffée à 37°C. À noter que l'intégralité des manipulations s'effectue dans la vitrine réfrigérante, environnement dont la température est contrôlée et maintenue à + 4°C.

Les analyses sont effectuées toutes les 24 heures, soit à T24H, T48H, T72H, T96H, T120H, T144H, T168H, T192H.

Les échantillons dont les spermatozoïdes présentent une mobilité supérieure à 30 % sont conservés pour les analyses des jours suivants. En revanche, ceux dont la mobilité devient inférieure à 30 %, ne sont conservés que dans le cas où la mobilité réévaluée le lendemain redeviendrait supérieure à 30 %. Dans le cas contraire, le milieu est écarté.

Les paramètres cinétiques analysés sont les suivants :

- Les mobilités totales et progressives exprimées en %
- La vitesse moyenne progressive (VAP) exprimée en $\mu\text{m/s}$
- La vitesse en ligne droite (VSL) exprimée en $\mu\text{m/s}$
- La vitesse curviligne (VCL) exprimée $\mu\text{m/s}$
- L'amplitude de déplacement latérale de la tête (ALH) exprimée en μm
- La fréquence de battement croisé (BCF) exprimée en Hz
- La linéarité (LIN) exprimée en %
- La rectitude (STR) exprimée en %
- L'élongation (ÉLONGATION) exprimée en %

h) Analyse descriptive et statistique

Les données brutes ont été regroupées dans un classeur Excel et les analyses statistiques ont été menées sur le logiciel R.

Pour étudier l'effet du milieu de réfrigération et du temps, un modèle ANOVA (*Analysis Of Variance*) à effets mixtes a été réalisé pour chaque variable d'intérêt (mobilité totale, mobilité progressive, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN et ÉLONGATION) afin de tester l'effet global des moyennes de Y sur chacun des facteurs.

Si on désigne par Y l'un de ces variables d'intérêts, d'un point de vue mathématique le modèle s'écrit pour un chien i dans le milieu j au temps k :

$$Y_{ijk} = \mu + \mu_i + \alpha_j * Milieu_j + \beta_k * Temps_k + \gamma_{jk} * (Milieu * Temps)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dans ce modèle :

1. μ correspond à la réponse moyenne de Y.
2. μ_i est une variable aléatoire normale centrée et de variance σ_μ^2 . Cette variable modélise la différence de réponse moyenne de Y entre tous les chiens qui composent l'échantillon.
3. α_j quantifie l'effet du milieu j.
4. β_k quantifie l'effet du temps k.
5. γ_{jk} quantifie l'effet croisé du milieu j et du temps k.
6. ε_{ijk} sont les résidus, on suppose qu'ils sont distribués normalement de moyenne 0 et de variance σ^2

Il est supposé dans cette modélisation que les effets aléatoires et les résidus sont distribués selon une loi Normale, et qu'ils sont indépendants les uns des autres. Ces deux derniers points seront vérifiés au moyen de graphiques présents en annexes.

Il est donc question de voir si une variable Y évolue en fonction du temps, en fonction du milieu ou bien en fonction de ces deux facteurs. L'hypothèse formulée est donc la suivante :

H0 : moyenne (*Milieu j*₁) = ... = moyenne (*Milieu j*₉)

H1 : moyenne (*Milieu j*₁) \neq ... \neq moyenne (*Milieu j*₉)

Si les résultats statistiques sont significatifs alors H0 est rejeté et H1 accepté avec un niveau de confiance de 95 %, soit un seuil α de 5 %. Il apparaît donc dans ce cas qu'au moins une des moyennes est différente des autres.

L'intérêt de l'étude est la comparaison de l'évolution au cours du temps entre les différents milieux (c'est-à-dire la significativité de l'interaction Milieu*Temps dans le modèle ANOVA à effets mixtes). Lorsque cette interaction n'est pas significative, il sera question de s'intéresser à la significativité des effets principaux de chacun des deux facteurs.

Dans ce cadre, des tests post-hocs (comparaison des moyennes deux à deux) à l'aide d'un test de Tukey seront mis en œuvre pour savoir s'il existe des moyennes identiques (différences non significatives) ou d'autres non identiques (différences significatives).

Le test de Tukey permet de prendre en compte la multiplicité des tests et en particulier de contrôler l'erreur de première espèce du test. Il est nécessaire de considérer que les résultats ne concerneront que les données obtenues jusqu'à T96H. En effet, pour les mesures suivantes, le nombre d'observations n'est plus suffisant pour fournir des résultats représentatifs.

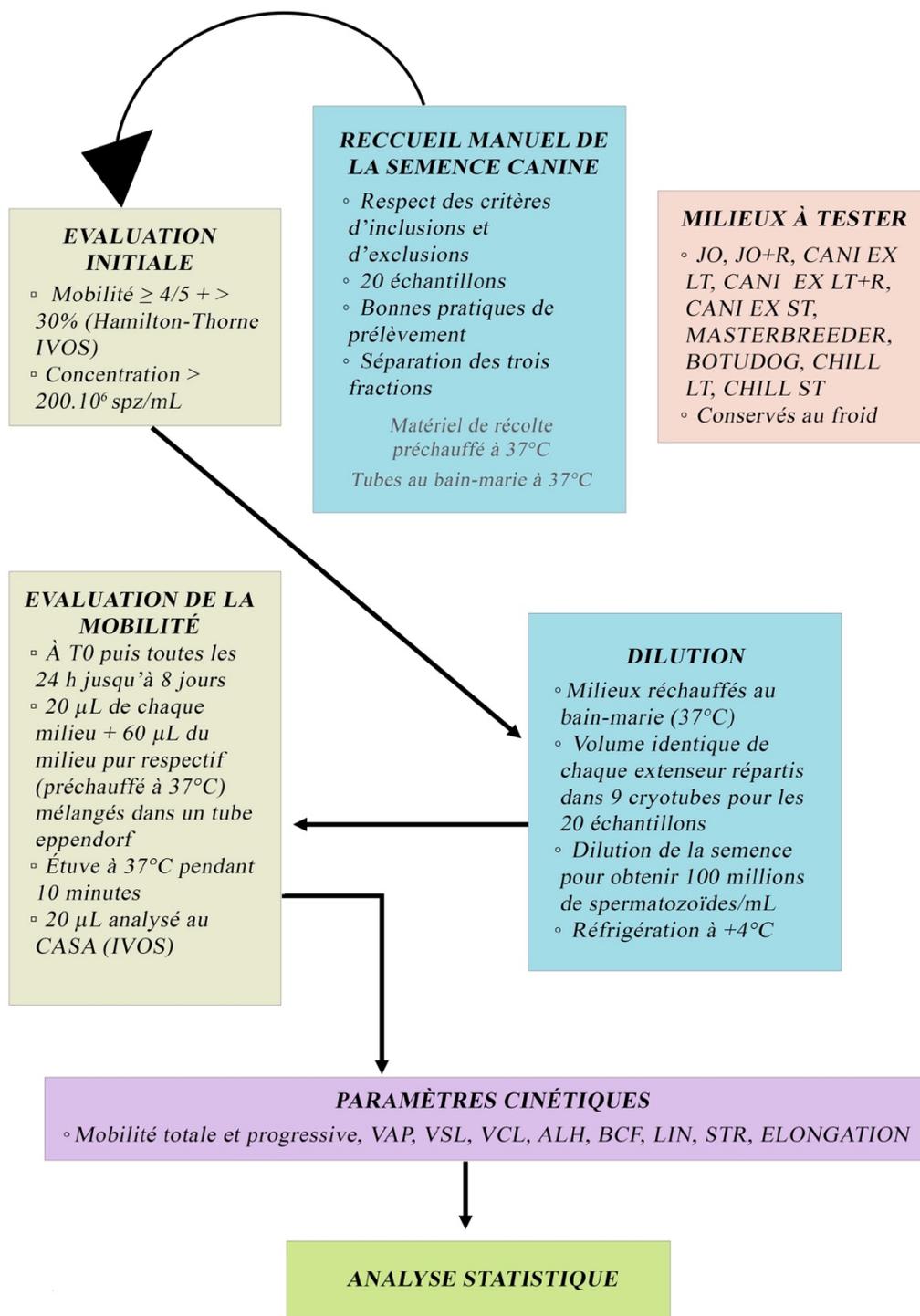


Figure 49 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental (Réalisation personnelle)

3) RÉSULTATS

Un seuil minimal de 30 % de mobilité totale est considéré comme un critère absolu pour réaliser une insémination artificielle par dépôt de la semence dans les voies génitales d'une femelle en chaleur et espérer une gestation. Par conséquent, comme déjà souligné dans la partie 2 « matériel et méthode », le choix a été fait d'écarter au fil du temps tout échantillon présentant une mobilité totale inférieure à ce seuil. Cette méthode a cependant entraîné une disparité croissante entre les groupes au cours de l'étude.

La perte d'homogénéité progressive entre les groupes qui en découle rend ainsi la comparaison statistique entre les milieux compliquée voire impossible au-delà d'un certain point. Par conséquent, l'analyse statistique se limitera aux 96 premières heures (4^{ème} jour), car une perte de représentativité se manifesterait après cette période. En effet, la diminution du nombre d'observations dans les jours suivants compromettrait la fiabilité des résultats statistiques.

Une analyse descriptive comparative des moyennes sera toutefois effectuée au préalable afin de déterminer les tendances globales qui se dégageront pour chaque paramètre et pour chaque milieu.

Cette étude consistant en l'évaluation des paramètres de mobilité de chaque milieu toutes les 24 heures pendant 8 jours, les analyses descriptives et statistiques se sont principalement concentrées sur les 72 premières heures. Cette période est cruciale car elle correspond au délai habituel d'expédition et d'utilisation de la semence réfrigérée pour l'insémination d'une femelle en œstrus. C'est donc durant cette période que l'efficacité des dilueurs est la plus pertinente à évaluer. Néanmoins, l'expérience ayant duré 8 jours, l'analyse descriptive des milieux s'est également portée sur le dernier jour (T192H) pour obtenir une vue d'ensemble sur la durée totale de l'étude.

Une exception est cependant à noter concernant le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R qui présentent une absence de valeurs au-delà de T168H. En effet, l'intégralité des échantillons a été écartée après cette date en raison d'une mobilité totale devenue inférieure à 30 % à T192H pour l'intégralité des échantillons.

Cette approche permet d'évaluer à la fois l'efficacité des milieux de réfrigération testés sur les premiers jours, essentielle pour l'utilisation pratique de la semence, et leur performance sur une durée prolongée.

Enfin, une attention particulière sera premièrement portée sur les 4 milieux d'intérêts de cette étude, à savoir le milieu CANI EX LT® et le JO, ainsi que leur homologue complétement en rosiglitazone. En second plan seront succinctement décrits les autres milieux évalués dans le cadre de ce travail.

a) La mobilité totale

La mobilité totale est représentée par la moyenne des pourcentages de spermatozoïdes mobiles des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Un seuil de 30 % de mobilité a été fixé, limite au-delà de laquelle la semence n'est plus considérée comme acceptable. Une fois inférieure, l'échantillon est écarté. Aucune valeur de mobilité n'a donc été relevée en dessous de 30 %. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de déterminer quels milieux préservent le plus d'échantillons avec une mobilité supérieure à 30 % et de caractériser ceux qui maintiennent les pourcentages de mobilité les plus élevés. Les tableaux VII, VIII et IX ainsi que les figures 50 et 51 résument les résultats obtenus.

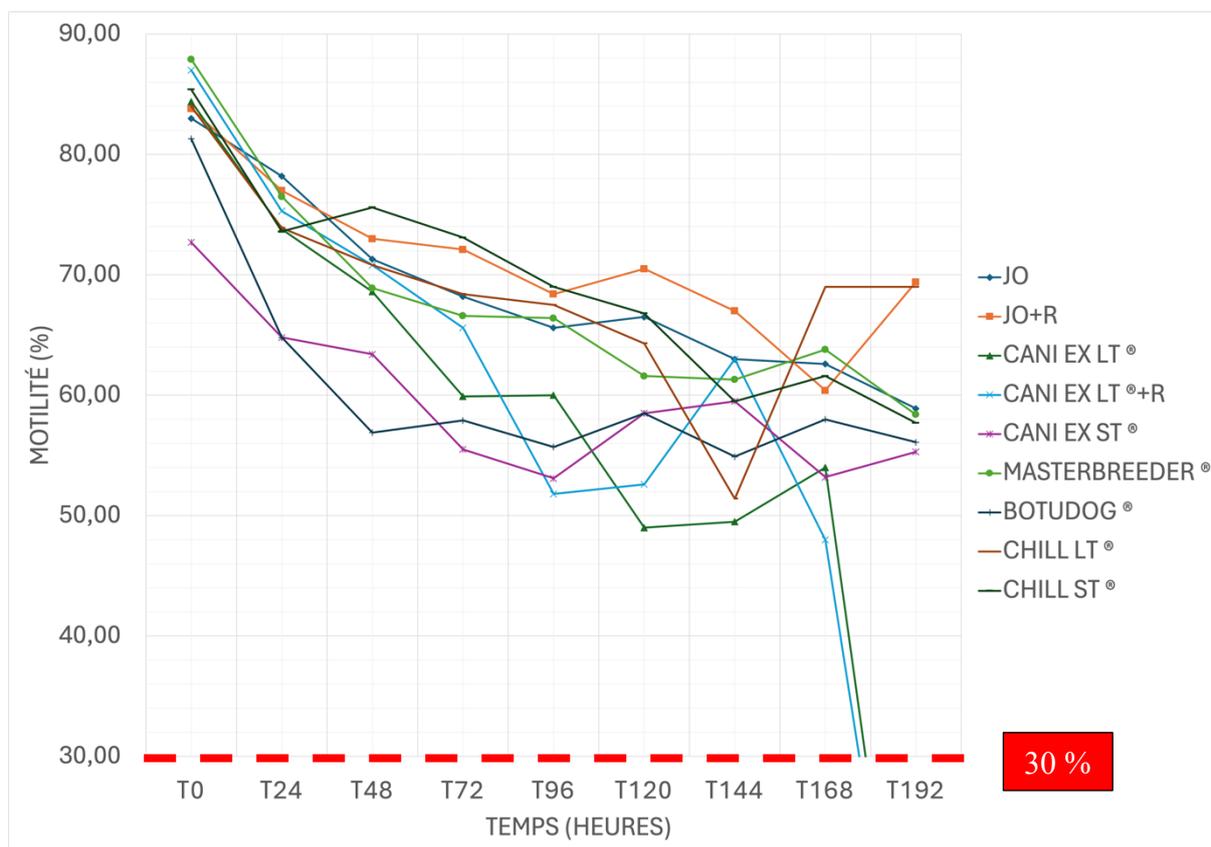


Figure 50 : Évolution des pourcentages moyens de mobilité pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau VII: Pourcentages moyens de mobilité (%) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures et nombre d'échantillons (N) par milieu et par temps dont la mobilité reste supérieure à 30 %. Pour chaque temps, les 2 plus grands nombres d'échantillons conservant une mobilité supérieure à 30 % sont surlignés en vert et les 2 préservant le plus faible nombre d'échantillons supérieurs à 30 % sont surlignés en rouge. Pour T192H, seul le plus grand nombre d'échantillons maintenus avec une mobilité supérieure à 30 % est retenu.

TEMPS	% MOBILITÉ et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	%	88.7	83	83.8	84.4	87	72.7	87.9	81.3	84	85.4
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	%		78.2	77.0	73.8	75.3	64.8	76.5	64.8	73.9	73.6
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	%		71.3	73.0	68.6	70.8	63.4	68.9	56.9	70.8	75.6
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	%		68.2	72.1	59.9	65.6	55.5	66.6	57.9	68.4	73.1
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	%		65.6	68.4	60	51.8	53.1	66.4	55.7	67.5	69
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	%		66.5	70.5	49	52.6	58.5	61.6	58.5	64.3	66.8
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	%		63	67	49,5	63	59.5	61.3	54.9	51.4	59.5
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	%		62.6	60.4	54	48	53.2	63.8	58	69	61.6
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	%		58.9	69.4	< 30	< 30	55.3	58.4	56.1	68	57.7
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

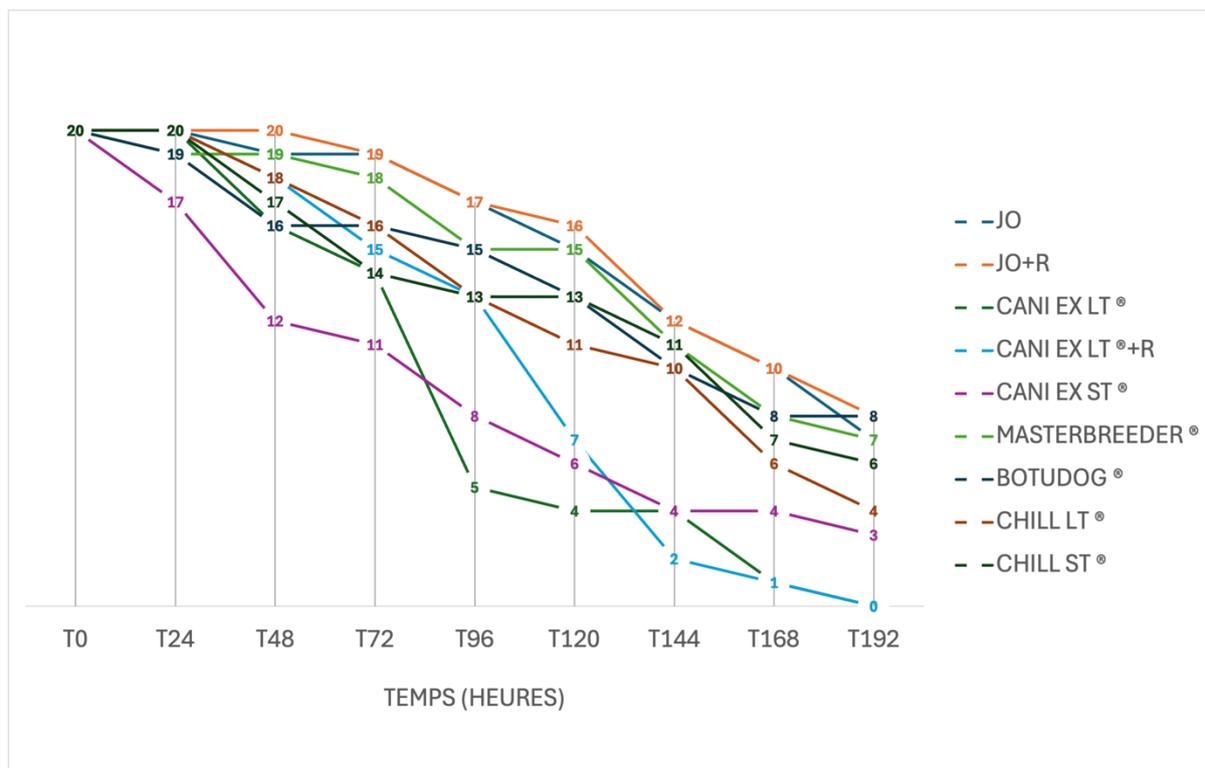


Figure 51 : Évolution du nombre d'échantillons dont la mobilité est supérieure à 30 % pour chaque milieu en fonction du temps

- **Analyse descriptive du nombre d'échantillons préservés avec une mobilité supérieure à 30 % :**

De façon générale, la figure 51 montre que les dilueurs JO, JO+R, MASTERBREEDER®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® maintiennent le plus d'échantillons avec une mobilité supérieure à 30 %, le JO+R étant le dilueur qui affiche les meilleurs résultats. Le CANI EX ST®, le CANI EX LT®, et le CANI EX LT®+R présentent pour leur part les résultats les plus faibles bien que le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R présentent des valeurs sensiblement similaires aux dilueurs précédents jusqu'à T72H.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R voient leurs nombres d'éjaculats chuter de manière très importante. En effet, le CANI EX LT® baisse drastiquement entre T72H (14) et T96H (5) pendant que le CANI EX LT®+R baisse aussi considérablement, mais seulement à partir de T96H (13) jusqu'à T120H (7) puis T144H (2).

Seul le CANI EX ST® montre des résultats beaucoup plus faibles dès T24H. Il chute à 12 échantillons dès le deuxième jour mais fini quand même par devenir supérieur au CANI EX LT® à partir de T96H et au CANI EX LT®+R à partir de T144H.

D'après le tableau VII, les milieux JO+R et BOTUDOG® conservent le plus d'échantillons avec un pourcentage de mobilité supérieur à 30 % après T192H (8 échantillons

pour chacun). Le JO+R est le seul à maintenir jusqu'à 20 échantillons à T48H. Entre T48H et T168H, ce sont surtout le JO, JO+R et MASTERBREEDER® qui présentent les meilleurs résultats, bien que ce dernier soit discrètement plus en marge. Presque aucune différence n'est relevée entre le JO et le JO+R excepté à T48H, T120H et T192H où le JO+R conserve 1 échantillon de plus que le JO.

À T24H, seuls le CANI EX ST®, le BOTUDOG® et le MASTERBREEDER® présentent une diminution du nombre d'échantillons (respectivement 17, 19 et 19 éjaculats), tandis que les autres milieux en maintiennent l'intégralité. Le CANI EX LT®, CANI EX ST® et BOTUDOG® en conservent le moins à T48H respectivement 16, 12 et 16 éjaculats, tandis qu'entre T72H et T120H ce sont le CANI EX LT® et le CANI EX ST® qui montrent les résultats les moins satisfaisants. À partir de T144H voire déjà T120H, le CANI EX LT®+R vient s'ajouter aux milieux précédents en montrant des performances moindres. À T192H la mobilité des spermatozoïdes chute en dessous de 30 % pour l'intégralité des échantillons du CANI EX LT® et du CANI EX LT® +R, entraînant l'absence de données à ce temps de mesure pour ces milieux.

Bien que le JO et JO+R paraissent similaires, ce dernier donne des résultats légèrement supérieurs au JO. À noter que le CANI EX LT®+R offre aussi des résultats supérieurs au CANI EX LT®. En effet, jusqu'à T120H, le CANI EX LT®+R conserve plus d'échantillons (7) que le CANI EX LT® (4) et chute plus tardivement. Ainsi, le CANI EX LT®+R à T96H préserve encore 13 éjaculats alors que le CANI EX LT® n'en conserve plus que 5. Dans l'ensemble, la tendance semble montrer que les dilueurs supplémentés en rosiglitazone conservent plus d'échantillons que leurs homologues non complémentés. Cette observation est surtout frappante pour le CANI EX LT®+R et le CANI EX LT® de T48H à T96H ainsi que pour le JO+R par rapport au JO à T48H, T120H et T192H.

Ainsi, le JO+R et secondairement le JO offrent les meilleurs résultats pour conserver la mobilité supérieure à 30 %. Le MASTERBREEDER®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® présentent des résultats intermédiaires. Le CANI EX ST®, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R affichent des performances réduites sur toute la durée d'étude, ces deux derniers ne conservant aucun échantillon au-delà de T168H et le CANI EX ST® montrant des résultats déjà plus en marges dès T48H.

Les milieux complémentés en rosiglitazone offrent de meilleurs résultats par rapports à leur homologue qui n'en contiennent pas.

- **Analyse comparative descriptive des pourcentages de mobilité du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO+R et le JO paraissent donner de hautes valeurs de mobilité totale qui sont plus élevées que celles du CANI EX LT® et CANI EX LT®+R. Le milieu témoin JO donne le plus souvent des valeurs inférieures au JO+R notamment de T48H à T144H et également à T192H.

Considérant l'absence d'échantillon après T168H, les valeurs de mobilité totale ne sont pas disponibles à T192H pour le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R. Même s'ils donnent de hautes valeurs de mobilité à T0H, notamment le CANI EX LT®+R, ils présentent des résultats plus faibles au-delà, bien que le CANI EX LT®+R diminue plus tardivement et montre des résultats supérieurs au CANI EX LT® jusqu'à T72H, données à nuancer avec le nombre d'échantillons maintenus et comparés.

Ainsi, le JO+R et le JO semblent offrir des résultats supérieurs au CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

Les milieux complémentés en rosiglitazone semblent afficher des résultats plus élevés que leurs homologues non supplémentés.

- **Analyse comparative descriptive des pourcentages de mobilité de tous les dilueurs :**

Dans l'ensemble, trois groupes semblent se distinguer. Le JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT®, et CHILL ST® apparaissent avec résultats élevés et similaires.

Le JO+R montre des valeurs qui font partie des plus élevées sur presque toute la durée d'étude et qui apparaissent supérieures à tous les autres milieux de T120H (70,5 %) à T144H (67 %) et également à T192H (69,4 %). À T72H (72,1 %), il est uniquement plus faible que le CHILL ST® (73,1 %).

Le CHILL ST® quant à lui offre les valeurs de mobilité les plus élevées de T48H (75,6 %) jusqu'à T96H (69 %). Au-delà de T120H, il devient inférieur au JO, JO+R et MASTERBREEDER® et montre à T192H (57,7 %) des résultats plus faibles que le JO (58,9

%), JO+R (69,4 %), MASTERBREEDER® (58,4 %) et CHILL LT® (68 %). À noter qu'il préserve un nombre d'échantillons différent des autres milieux qui a chuté au long de l'étude (6 à T192H).

Le CHILL LT® (68,4 %) donne des résultats uniquement inférieurs au JO+R (72,1 %), et CHILL ST® (73,1 %) à T72H, pendant qu'il affiche le résultat le plus élevé à T192H (68 %) après le JO+R (69,4 %). Il présente un décrochage à T144H (51,4 %) mais qui remonte à T168H (69 %). Il ne préserve cependant à ce moment-là plus que 6 échantillons tandis que d'autres dilueurs en contiennent encore entre 7 et 10.

Le MASTERBREEDER® est le plus élevé à T0H (87,9 %), mais semble globalement légèrement plus en marges que le JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® au-delà, même s'il affiche des résultats faisant partie des plus élevés. À T72H (66,6 %), il est inférieur au CHILL LT® (68,4 %), JO+R (72,1 %) et CHILL ST® (73,1 %). A T192H (58,4 %), il est uniquement inférieur au JO (58,9 %), JO+R (69,4 %) et CHILL LT® (68 %), résultat à nuancer avec le nombre d'échantillons conservés qui n'est plus que de 7.

Deuxièmement, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® montrent les résultats les plus faibles par rapport aux autres milieux jusqu'à T72H (respectivement 55,5 % et 57,9 %). Initialement, le CANI EX ST® (72,7 %) est déjà très inférieur aux autres dilueurs dont les mobilités sont toutes supérieures à 80 % à T0H. Le BOTUDOG® pour sa part chute fortement pendant les 2 premiers jours (56,9 % à T48H, soit la plus faible valeur mesurée ce jour-là). Ils se stabilisent par la suite autour de 55 %, bien qu'ils demeurent inférieurs aux milieux précédents à T192H (respectivement 55,3 % et 56,1 %), résultats à opposer au nombre d'échantillons qu'ils maintiennent (respectivement 3 et 8) à ce moment-là, en comparaison des autres dilueurs.

Enfin, le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R, donnent les résultats globalement plus faibles. Même s'ils semblent similaires au premier groupe à T0H, ils chutent rapidement, respectivement à 59,9 % à partir de T72H (résultat uniquement supérieur au CANI EX ST® et au BOTUDOG®) et à 51,8 % à partir de T96H (le plus faible), bien que le CANI EX LT®+R remonte à T144H (63 %). Le pourcentage de mobilité de ce dernier chute finalement à 48 % à T168H soit le plus faible après 7 jours de réfrigération tandis que le CANI EX LT® est à peine plus élevé. Ils ne contiennent cependant plus que 1 échantillon à T168H alors qu'il en reste davantage pour les autres milieux (10 pour le JO et le JO+R). Ils sont les seuls à présenter une mobilité totale inférieure à 30 % pour tous les échantillons à partir de T192H.

Ainsi, le JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT®, et CHILL ST® semblent donner les pourcentages de mobilité les plus élevés, le JO+R affichant à priori des résultats supérieurs, tandis que le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG® apparaissent avec des résultats plus en marges. Cependant, le nombre d'échantillons conservé est à prendre pleinement en considération car chaque milieu n'en préserve pas la même quantité au cours du temps.

- **Modélisation statistique des pourcentages de mobilité en fonction du milieu et du temps :**

Considérant le nombre d'échantillons trop faible au-delà de T96H, l'analyse des corrélations entre chaque milieu n'a pu se porter que jusqu'au 4^{ème} jour, soit T96H. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu n'est pas significatif ($p = 0.1009$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H peut être considérée comme équivalente dans les différents milieux. L'effet du temps et l'effet du milieu sont cependant significatifs (respectivement $p < 0.001$ et $p < 0.001$).

L'interaction entre les deux facteurs étant non significative, l'étude indépendante de l'effet principal de chacun d'eux est requise. Les résultats sont résumés dans les tableaux VIII et IX.

Tableau VIII : Évolution de la mobilité totale au cours du temps jusqu'à T96H. Les termes de la diagonale correspondent à la moyenne de la mobilité (moyenne calculée sur tous les milieux). Les termes en dessous de la diagonale correspondent à la différence des moyennes entre les deux temps de mesure et les termes au-dessus de la diagonale sont les p-valeurs du test de Tukey correspondant à la différence de moyenne.

MOBILITÉ	T0H	T24H	T48H	T72H	T96H
T0H	[81,9]	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
T24H	10.41	[71,5]	0.0006	<.0001	<.0001
T48H	16.02	5.61	[65,9]	0.0395	<.0001
T72H	20.15	9.74	4.13	[61,8]	0.1409
T96H	23.82	13.41	7.80	3.67	[58,1]

Le tableau VIII fournit les résultats de l'évolution de la mobilité en fonction du temps. La baisse de mobilité est significative dans tous les milieux à tous les temps de mesure jusqu'à T72H, mais ne l'est plus à T96H.

Tableau IX : Évolution de la mobilité entre les différents milieux. Les termes de la diagonale correspondent à la moyenne de la mobilité (moyenne calculée sur tous les temps jusqu'à T96H). Les termes en dessous de la diagonale correspondent à la différence des moyennes entre les deux milieux et les termes au-dessus de la diagonale sont les p-values du test de Tukey correspondant à la différence de moyenne.

MOBILITÉ	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT+R	CANI EX ST	MASTER-BREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO	[71.5]	0.985	0.2562	0.4939	<.0001	1.0000	<.0001	0.9909	1.0000
JO+R	-1.848	[73.4]	0.0201	0.0584	<.0001	0.9419	<.0001	0.5981	0.9939
CANI EX LT	4.818	6.666	[66.7]	1.0000	0.0013	0.4152	0.0737	0.8392	0.2417
CANI EX LT+R	3.905	5.753	- 0.913	[67.6]	<.0001	0.6874	0.0115	0.9715	0.4698
CANI EX ST	13.61	15.47	8.797	9.709	[57.9]	< 0.0001	0.8950	<.0001	<.0001
MASTER-BREEDER	0.489	2.337	-4.328	- 3.416	- 13.125	[71.0]	<.0001	0.9991	1.0000
BOTUDOG	10.74	12.58	5.918	6.830	- 2.879	10.246	[60.8]	0.0001	<.0001
CHILL LT	1.756	3.604	- 3.062	- 2.150	- 11.859	1.266	- 8.980	[69.8]	0.9857
CHILL ST	- 0.18	1.666	- 4.999	4.087	- 13.796	0.671	- 10.917	- 1.937	[71.7]

Le tableau IX fournit les résultats de la différence de mobilité en fonction du milieu. Le JO et le JO+R affichent tous deux des différences significatives avec le CANI EX ST® et le BOTUDOG®. De plus, le JO+R montre également des résultats significativement supérieurs au CANI EX LT®.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R donnent des résultats tous deux significativement supérieurs au CANI EX ST®, mais le CANI EX LT®+R donne aussi des résultats significativement plus élevés que le BOTUDOG®, ce qui n'est pas le cas du CANI EX LT®.

Le CHILL LT® et le CHILL ST® donnent des résultats significativement supérieurs au CANI EX ST® et BOTUDOG®.

Le CANI EX ST® affiche ainsi une mobilité totale significativement inférieure à tous les dilueurs excepté le BOTUDOG®. Il montre des différences de moyennes très importantes qui vont notamment jusqu'à 15,47 avec le JO+R.

Le BOTUDOG® apparaît également significativement plus faible que tous les dilueurs à l'exception du CANI EX LT® et CANI EX ST®. Il affiche des différences très importantes mais moindres que le CANI EX ST®.

En résumé, le JO+R et le BOTUDOG® préservent le plus d'échantillons avec une mobilité totale supérieure à 30 % après T192H. Cependant, le JO, JO+R et secondairement le MASTERBREEDER®, offrent les meilleurs résultats avant T168H. Le BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST affichent dans l'ensemble des résultats intermédiaires.

Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R préservent le moins d'échantillons avec une mobilité supérieure à 30 % à l'issue de l'étude, pendant que le CANI EX ST® affiche les résultats les plus faibles dès le deuxième jour.

Les milieux complémentés en rosiglitazone semblent montrer des résultats supérieurs pour préserver la mobilité supérieure à 30 % par rapport à leur homologue qui n'en contiennent pas.

Les milieux complémentés en rosiglitazone semblent montrer des pourcentages de mobilité totale supérieurs à leur homologue qui n'en contiennent pas. Aucune différence significative n'a cependant été trouvée entre le JO et le JO+R d'une part, et entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

Le JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® donnent les pourcentages de mobilité les plus élevés. Aucune différence significative n'a cependant été trouvée entre eux. Le JO+R affiche le plus de différences significatives qui sont par ailleurs les plus importantes avec les dilueurs les moins bons, ce qui sous-tend une tendance à être le plus performant.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R, montrent des résultats plus faibles au-delà de T72H. Le CANI EX ST® et secondairement le BOTUDOG® offrent des résultats qui paraissent les plus faibles notamment sur les trois premiers jours et dont les différences avec la plupart des autres milieux sont très significatives jusqu'à T96H.

b) La mobilité progressive

La mobilité progressive est représentée par la moyenne des pourcentages de spermatozoïdes progressifs des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de mobilité progressive n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de déterminer les milieux qui préservent les pourcentages de mobilité progressive les plus élevés. Les tableaux X et XI ainsi que la figure 52 résument les résultats obtenus.

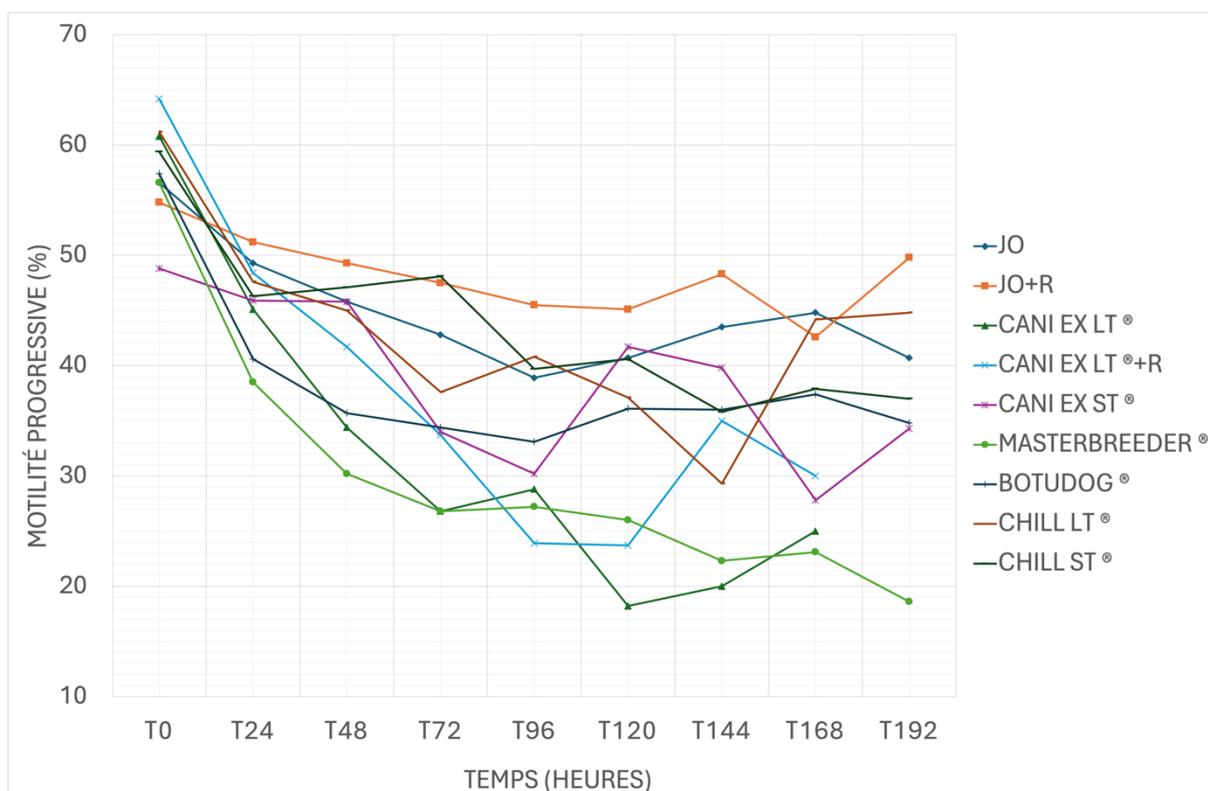


Figure 52 : Évolution des pourcentages moyens de mobilité progressive pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau X : Pourcentages moyens des mobilités progressives mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	% MOBILITÉ et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO + R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	%	58,3	56,6	54,8	60,8	64,2	48,8	56,6	57,4	61,2	59,4
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	%		49,3	51,2	45,1	48,4	45,9	38,5	40,6	47,6	46,3
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	%		45,8	49,3	34,4	41,7	45,8	30,2	35,7	45	47,1
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	%		42,8	47,5	26,8	33,7	34	26,8	34,4	37,6	48,1
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	%		38,9	45,5	28,8	23,9	30,2	27,2	33,1	40,8	39,7
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	%		40,7	45,1	18,2	23,7	41,7	26	36,1	37,1	40,6
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	%		43,5	48,3	20	35	39,8	22,3	36	29,3	35,8
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	%		44,8	42,6	25	30	27,8	23,1	37,4	44,2	37,9
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	%		40,7	49,8	[N.D]	[N.D]	34,3	18,6	34,8	44,8	37
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive des pourcentages de mobilité progressive du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO et le JO+R donnent des résultats élevés sur presque toute la durée d'étude bien que le JO+R apparaisse avec un pourcentage de spermatozoïdes progressifs plus élevé de T24H (51,2 %) à T144H (48,3 %) et également à T192H (49,8 %). À noter qu'ils conservent presque toujours le même nombre d'échantillons.

Considérant l'absence d'échantillon après T168H, les valeurs de mobilité progressive ne sont pas disponibles à T192H pour le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R qui donnent d'ailleurs des résultats systématiquement plus faibles que le JO et JO+R. Le CANI EX LT®+R présente des résultats qui semblent la plupart du temps supérieurs à son homologue non

complémenté. Il lui est supérieur jusqu'à T72H (33,7 % contre 26,8 %) et entre T120H (23,7 % contre 18,2 %) et T168H (30 % contre 25 %), bien que le nombre d'échantillons comparés soit différent. Les valeurs moyennes du CANI EX LT® et du CANI EX LT®+R remontent à partir de T120H, mais son nombre d'éjaculats décroît considérablement au-delà de T96H.

Ainsi, le JO+R et le JO montrent des résultats de mobilité progressive supérieurs au CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

Les milieux complémentés en rosiglitazone offrent de meilleurs résultats par rapports à leur homologue qui n'en contiennent pas.

- **Analyse comparative descriptive des pourcentages de mobilité progressive de tous les dilueurs :**

Tous les milieux affichent une forte décroissance initiale à l'exception du JO, JO+R et du CANI EX ST®.

Le JO+R présente la meilleure stabilité et montre des résultats presque systématiquement supérieurs aux autres milieux, passant de 54,8 % à T0H à 49,8 % à T192H. Seul le CHILL ST® (48,1 %) affiche une valeur légèrement supérieure à T72H (47,5 %), bien que le nombre d'échantillons comparés soit différent (14 pour le CHILL ST® contre 19 pour le JO+R).

Le CHILL ST® présente des résultats très élevés sur les premiers jours (valeur la plus élevée à T72H (48,1 %)), mais plus intermédiaires ensuite. Il chute à 37 % à T192H, valeur inférieure au JO (40,7 %), JO+R (49,8 %) et CHILL LT® (44,8 %), bien qu'il n'y ait pas le même nombre d'échantillons surtout à la fin de l'expérimentation.

Le CHILL LT® présente des résultats similaires aux meilleurs dilueurs jusqu'à T48H et conserve une mobilité progressive de 37,6 % à T72H seulement inférieure au JO (42,8 %), au JO+R (47,5 %) et au CHILL ST® (48,1 %). Fluctuant à partir de T96H, il remonte à 44,8 % à T192H, valeur uniquement inférieure au JO+R (49,8 %), mais ne possède plus que 4 échantillons au bout des 8 jours d'expérience contre le double pour le JO+R.

Le BOTUDOG® dont le résultat initial est similaire à la plupart des milieux, décroît fortement par la suite. À T48H jusqu'à T72H, son taux de spermatozoïdes progressifs (35,7 %) est inférieur à celui de tous les dilueurs sauf le CANI EX LT® (34,4 %) et le MASTERBREEDER® (30,2 %). Il se stabilise jusqu'à T192H (34,8 %), valeur moins élevée que celle du JO (40,7 %), JO+R (49,8 %), CHILL LT® (44,8 %) et CHILL ST® (37 %).

Le CANI EX ST® présente le résultat le plus faible à T0H (48,8 %), valeur déjà inférieure au JO+R à T192H (49,8 %). En revanche, il reste relativement stable jusqu'à T48H (45,8 %), avant de décroître jusqu'à 30,2 % à T96H. À T72H, ce milieu apparaît inférieur au CANI EX LT® (26,8 %), CANI EX LT®+R (33,7 %) et MASTERBREEDER® (26,8 %). Il fluctue considérablement par la suite, mais voit son nombre d'échantillons restants (3) diminuer et affiche à T192H (34,3 %), une mobilité progressive uniquement inférieure au MASTERBREEDER® (18,6 %).

Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et MASTERBREEDER® donnent des résultats inférieurs. Le MASTERBREEDER®, malgré de hauts pourcentages de spermatozoïdes progressifs à T0H (56,6 %), décroît fortement pour donner les plus faibles résultats de T24H (38,5 %) à T72H (26,8 %) et entre T168H (23,1 %) et T192H (18,6 %). La diminution du taux ralentie à partir de T72H, mais les pourcentages suivants demeurent faibles par rapport aux autres dilueurs jusqu'à 192H.

Le CANI EX LT® décroît aussi notablement au-delà de T24H. Il est le plus faible dilueur à T72H (26,8 %) et continue à chuter rapidement jusqu'à T96H (28,8 %) pour devenir inférieur au MASTERBREEDER® de T120H (18,2 %) à T144H (20 %), valeurs les plus faibles observées. À T168H (25 %), il remonte légèrement pour être uniquement supérieur au MASTERBREEDER® (23,1 %), mais ne présente plus que d'un seul échantillon.

Le CANI EX LT®+R, qui présente pourtant la valeur de mobilité progressive la plus haute à T0H (64,2 %), baisse rapidement et de façon constante jusqu'à T96H à 23,9 %, valeur la plus faible ce jour. À T72H (33,7 %) il affiche déjà des résultats moins hauts que le JO (42,8 %), JO+R (47,5 %), CANI EX ST® (34 %), BOTUDOG® (34,4 %), CHILL LT® (37,6 %) et CHILL ST® (48,1 %). Au-delà de T120H, il devient plus fluctuant et remonte pour atteindre 30 % à T168h, valeur uniquement supérieure au CANI EX LT® (25 %), CANI EX ST® (27,8 %) et MASTERBREEDER® (23,1 %), bien que cette légère augmentation soit à confronter au faible nombre d'éjaculats qu'il préserve (1).

Ainsi, le JO+R offre les valeurs de mobilité progressive qui semblent les plus élevées par rapport à tous les autres milieux.

Le JO, le CANI EX ST®, le BOTUDOG®, le CHILL LT® et CHILL ST® paraissent donner des résultats de mobilité progressive intermédiaires, mais bien supérieurs à ceux du CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R, et le MASTERBREEDER® qui apparaissent inférieurs.

- **Modélisation statistique des pourcentages de mobilité progressive en fonction du milieu et du temps :**

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.0001$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du temps et l'effet du milieu sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.0001$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de mobilité progressive est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XI.

Tableau XI : Résultats des tests de Tukey entre les moyennes des pourcentages de mobilité progressive des différents milieux de T0H à T96H

<i>T0H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					P < 0,05 (0.0170)	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T24H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T48H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0290)	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.018)	NS	NS	P <0,05 (0.0025)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0486)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	P <0,05 (0.0099)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0022)	NS	NS	P <0,05 (0.0211)	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (<0,0001)	P <0,05 (0.0255)	P <0,05 (0.0169)	P <0,05 (0.0005)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0009)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	P <0,05 (0.0104)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	P <0,05 (0.0199)	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0789)	P <0,05 (0.0002)	P <0,05 (0.0262)	P <0,05 (0.0211)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

À T0H, le CANI EX ST® apparaît significativement inférieur au CANI EX LT®+R.

Le JO apparaît significativement supérieur au MASTERBREEDER® de T48H à T72H, mais également au CANI EX LT® à T72H et au CANI EX LT®+R à T96H.

Le JO+R est significativement plus élevé que le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et MASTERBREEDER® de T72H à T96H, mais est aussi significativement supérieur au CANI EX LT® et MASTERBREEDER® à T48H.

Le CHILL ST® présente des résultats significativement supérieurs au CANI EX LT® et MASTERBREEDER® de T48H à T72H.

En résumé, le JO+R et le CANI EX LT®+R semblent donner des valeurs de mobilité progressive plus élevées que leurs homologues non complétés sur toute la durée d'étude. Aucune différence significative n'a cependant été mise en évidence entre le JO et JO+R d'une part, et le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part. À noter que le CANI EX LT®+R devient significativement inférieur au JO+R plus tardivement que le CANI EX LT®.

Le JO+R a tendance à donner les résultats les plus élevés. En association au JO et secondairement au CHILL ST®, ils affichent des différences significatives jusqu'à T96H avec le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et MASTERBREEDER®, le JO+R en montrant le plus grand nombre. Il n'existe cependant aucune différence significative entre le JO, JO+R et CHILL ST®.

De plus, aucune différence statistiquement significative n'a été détectée jusqu'à T96H avec tous les autres dilueurs pour le BOTUDOG® et le CHILL LT®, les laissant apparaître comme des milieux plutôt intermédiaires.

Le MASTERBREEDER®, le CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R et le CANI EX ST® affichent des résultats plus faibles qui apparaissent globalement et significativement inférieurs au JO, JO+R et CHILL ST® jusqu'à T96H.

c) La vitesse progressive moyenne (VAP)

La vitesse progressive moyenne est représentée par la moyenne des vitesses progressives des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de VAP n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur VAP. Les tableaux XII et XIII ainsi que la figure 53 résument les résultats obtenus.

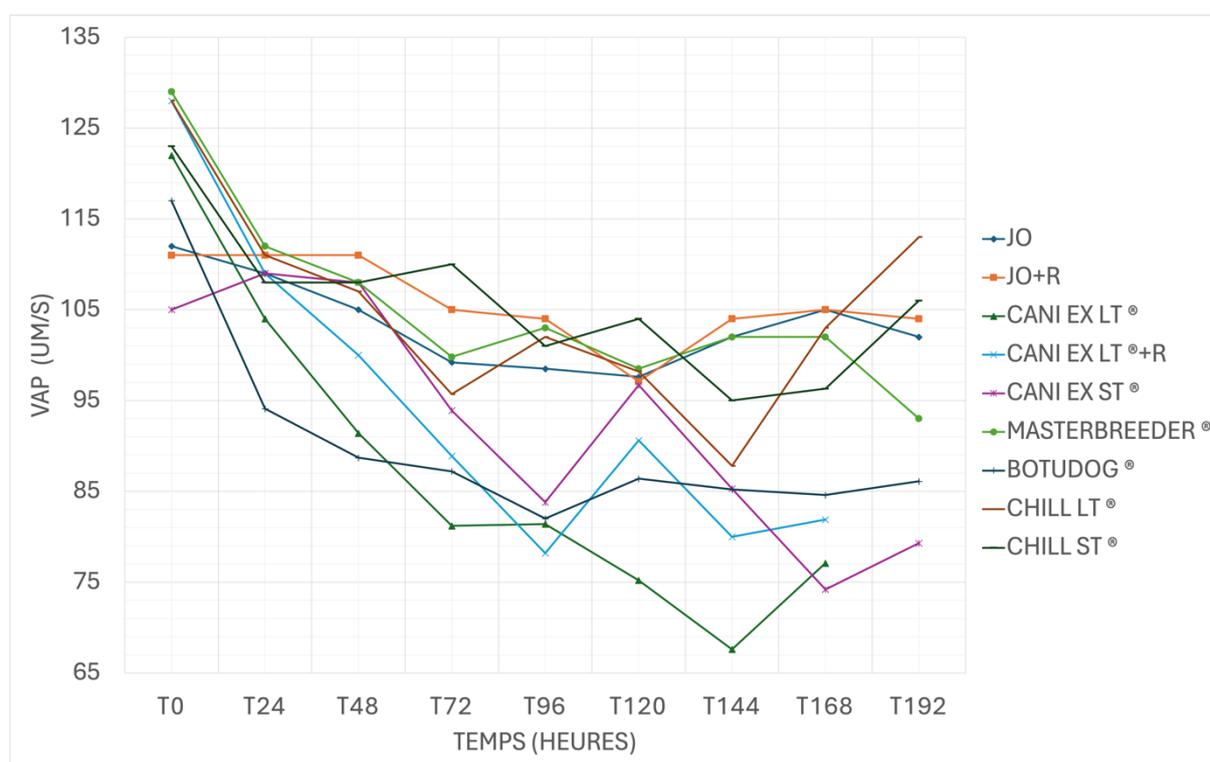


Figure 53 : Évolution moyenne des vitesses moyennes (VAP en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XII : Moyennes des vitesses moyennes (VAP en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	VAP et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT+ R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	$\mu\text{m/s}$	124	112	111	122	128	105	129	117	128	123
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	$\mu\text{m/s}$		109	111	104	109	109	112	94,1	111	108
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	$\mu\text{m/s}$		105	111	91,4	100	108	108	88,7	107	108
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	$\mu\text{m/s}$		99,2	105	81,2	88,9	93,9	99,8	87,2	95,7	110
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	$\mu\text{m/s}$		98,5	104	81,4	78,2	83,8	103	82	102	101
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	$\mu\text{m/s}$		97,6	97,1	75,2	90,6	96,7	98,5	86,4	98,2	104
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	$\mu\text{m/s}$		102	104	67,6	80	85,3	102	85,2	87,8	95
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	$\mu\text{m/s}$		105	105	77,1	81,9	74,2	102	84,6	103	96,3
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	$\mu\text{m/s}$		102	104	[N.D]	[N.D]	79,3	93	86,1	113	106
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de la VAP du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO et le JO+R donnent de hautes valeurs de VAP tout au long de l'expérience, mais ce dernier présente des résultats supérieurs au JO à presque tous les temps de mesure, bien que relativement proches. Ces deux milieux donnent des résultats largement supérieurs au CANI EX LT® à partir de T24H et au CANI EX LT®+R à partir de T48H.

Considérant l'absence d'échantillon après T168H, les valeurs de VAP ne sont pas disponibles à T192H pour le CANI EX LT® et CANI EX LT®. Le CANI EX LT®+R apparaît avec des résultats presque systématiquement supérieurs au CANI EX LT® à l'exception de T96H, bien que leurs valeurs semblent proches.

Ainsi, les dilueurs JO et JO+R donnent des résultats qui semblent nettement plus élevés que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R.

Les milieux complétés en rosiglitazone offrent de meilleurs résultats par rapports à leur homologue qui n'en contiennent pas.

- **Analyse comparative descriptive de la VAP de tous les dilueurs :**

Tous les milieux affichent une forte décroissance de la VAP entre T0H et T48H sauf le JO, le JO+R et le CANI EX ST®.

Le JO et le JO+R donnent de hautes valeurs de VAP tout au long de l'expérience bien qu'elles soient cependant moins élevées à T0H. Le JO+R permet une réduction lente de la VAP, maintenue de surcroît identique jusqu'à T48H. À T72H (105 µm/s), il offre des résultats uniquement inférieurs au CHILL ST® (110 µm/s) pendant qu'à T192H (104 µm/s), ils semblent inférieurs au CHILL LT® (113 µm/s) et CHILL ST® (106 µm/s). À noter toutefois que le nombre d'échantillons comparés est faible et différent entre les milieux.

Le CHILL ST®, très stable entre T24H et T72H, présente des valeurs faisant partie des plus élevées notamment les premiers jours. Il donne le résultat le plus élevé à T72H (110 µm/s) et T120H (104 µm/s), apparaît supérieur au JO de T48H à T120H et montre des résultats supérieurs au JO (102 µm/s) et au JO+R (104 µm/s) à T192H (106 µm/s), mais ne conserve plus que 6 échantillons alors que le JO et le JO+R en conservent respectivement 7 et 8.

Le MASTERBREEDER® et le CHILL LT® affichent aussi des valeurs de VAP élevées sur les 8 jours d'expérience. Ils montrent les vitesses moyennes les plus importantes à T0H (respectivement 129 µm/s et 128 µm/s) qui décroissent de manière identique jusqu'à T120H (environ 98 µm/s).

Le MASTERBREEDER® (99,8 µm/s), est uniquement inférieur au JO+R (105 µm/s) et au CHILL ST® (110 µm/s) à T72H. À T192H (93 µm/s), il chute légèrement et devient inférieur au JO (102 µm/s), JO+R (104 µm/s), CHILL LT® (113 µm/s) et CHILL ST® (106 µm/s), bien que le nombre d'échantillons comparés soit faible et différent entre les milieux.

La VAP du CHILL LT® (95,7 µm/s) est inférieure au JO (99,2 µm/s), JO+R (105 µm/s), CHILL ST® (110 µm/s) et MASTERBREEDER® (99,8 µm/s) à T72H. À partir de là, il est plus fluctuant et affiche la VAP la plus haute à T192H (113 µm/s) alors qu'elle avait chuté à

87,8 $\mu\text{m/s}$ à T144H. Ces manifestations sont à opposer au nombre d'éjaculats qui diminuent toutes les 24 heures. De plus, ses résultats demeurent moins élevés que le MASTERBREEDER® de T0H à T144H.

Le CANI EX ST® évolue de façon similaire aux autres milieux jusqu'à T48H, mais montre cependant la plus faible VAP à T0H (105 $\mu\text{m/s}$). À T72H (93,9 $\mu\text{m/s}$), il est seulement supérieur au BOTUDOG® (87,2 %), CANI EX LT® (81,2 %) et CANI EX LT®+R (88,9 %). Fluctuant à partir de T96H, il devient le plus faible milieu à T192H (79,3 $\mu\text{m/s}$), mais ne conserve plus que 3 échantillons.

Le BOTUDOG® chute très rapidement le premier jour, bien qu'il se stabilise par la suite. À T72H, sa VAP (87,2 $\mu\text{m/s}$) est seulement supérieure au CANI EX LT® (81,2 $\mu\text{m/s}$). Il reste très en marge à T192H (86,1 $\mu\text{m/s}$) et apparaît uniquement supérieur au CANI EX ST® (79,3 $\mu\text{m/s}$), mais conserve un nombre d'éjaculats différent des autres milieux qui a diminué au cours du temps.

Le CANI EX LT® fait partie des plus faibles milieux dès T24H et le CANI EX LT®+R® dès T48H. Le CANI EX LT® décroît très fortement jusqu'à T72H (81,2 $\mu\text{m/s}$) soit la valeur la plus faible mesurée ce jour-là. À T168H (77,1 $\mu\text{m/s}$), il est inférieur à tous les milieux testés sauf le CANI EX ST® (74,2 $\mu\text{m/s}$).

Le CANI EX LT®+R décroît aussi fortement de T0H (128 $\mu\text{m/s}$) à T96H (78,2 $\mu\text{m/s}$). À T72H (88,9 $\mu\text{m/s}$), il donne une VAP seulement supérieure au CANI EX LT® (81,2 $\mu\text{m/s}$) et au BOTUDOG® (87,2 $\mu\text{m/s}$) pendant qu'à T168H (81,9 $\mu\text{m/s}$), il présente une valeur uniquement supérieure au CANI EX ST® (74,2 $\mu\text{m/s}$) et au CANI EX LT® (77,1 $\mu\text{m/s}$).

À noter que le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R augmentent de nouveau à T168H, observation à confronter à leurs très faibles nombres d'échantillons conservés (1).

Ainsi, les milieux JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST®, affichent les résultats de VAP les plus élevés et semblent globalement similaires.

Les milieux CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG® semblent apparaître avec des valeurs plus en marges que les milieux précédents.

- Modélisation statistique de la VAP en fonction du milieu et du temps :

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.0001$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du temps et l'effet du milieu sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.005$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de VAP est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XIII.

Tableau XIII : des tests de Tukey entre les moyennes des vitesses moyennes (VAP) des différents milieux de T0H à T96H

T0H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0449)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0305)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					P < 0,05 (0.0018)	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						P < 0,05 (0.0006)	NS	P < 0,05 (0.0040)	P < 0,05 (0.0308)
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T24H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P < 0,05 (0.0334)	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T48H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0228)	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0071)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0149)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (0.0216)	NS	NS
BOTUDOG								NS	P <0,05 (0.0050)
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0079)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0002)	P <0,05 (0.0299)	P <0,05 (0.0447)	NS	P <0,05 (0.0172)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (0.0032)	NS	NS	P <0,05 (0.0003)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0387)
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	P <0,05 (0.0275)
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	P <0,05 (0.0100)	P <0,05 (0.0408)	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0175)	P <0,05 (0.0004)	P <0,05 (0.0031)	NS	P <0,05 (0.0040)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (0.0123)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (0.0002)	NS	P <0,05 (0.0110)	P <0,05 (0.0158)
CANI EX ST						P <0,05 (0.0021)	NS	P <0,05 (0.0404)	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (0.0027)	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

À T0H, la VAP du CANI EX ST® est significativement plus faible que celle du CANI EX LT®+R, du MASTERBREEDER®, du CHILL LT® et du CHILL ST®. Le JO et le JO+R donnent également une VAP significativement inférieure à celle du MASTERBREEDER®.

À T24H, le BOTUDOG® est significativement inférieur au MASTERBREEDER®.

À T48H, le CANI EX LT® affiche une VAP significativement inférieure au JO+R et au CHILL ST®. Aussi, le BOTUDOG® apparaît avec des résultats significativement plus faibles que le JO+R, MASTERBREEDER® et CHILL ST®.

À T72H, la VAP du JO est significativement supérieure à celle du CANI EX LT®. Le JO+R montre également des résultats significativement plus élevés que le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG®. Le MASTERBREEDER® présente aussi un résultat significativement plus important que le CANI EX LT®. Enfin, le CHILL ST® montre des valeurs de VAP significativement supérieures à celles du CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et BOTUDOG®.

À T96H, le JO et le JO+R offrent des résultats significativement supérieurs au CANI EX LT®+R et CANI EX ST®.

À T96H, le JO, JO+R, MASTERBREEDER® et CHILL LT® affichent des résultats significativement plus élevés que le CANI EX LT®+R et que le CANI EX ST®. Le JO+R montre des résultats significativement supérieurs au CANI EX LT® et BOTUDOG®. Le MASTERBREEDER® montre aussi un résultat significativement plus important que le CANI EX LT® et le BOTUDOG®. Enfin, le CHILL ST® donne une vitesse progressive moyenne significativement supérieure au CANI EX LT®+R.

En résumé, le JO+R et le CANI EX LT®+R semblent donner des valeurs de VAP plus élevées que leurs homologues non complémentés en rosiglitazone, bien qu'aucune différence significative n'ait été mise en évidence entre le JO et JO+R d'une part, ni entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

Les milieux JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® donnent les résultats les plus élevés, mais le JO+R affiche le plus de différences significatives avec les dilueurs les moins performants jusqu'à T96H. Presque aucune différence significative n'a cependant été trouvée entre ces cinq milieux.

Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et BOTUDOG® affichent des résultats plus faibles dès T24H voire T48H. En association au CANI EX ST® à partir de T72H, ils présentent des valeurs de VAP inférieures régulièrement et significativement plus faibles que ceux du JO, JO+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® jusqu'à T96H.

d) La vitesse en ligne droite (VSL)

La vitesse en ligne droite est représentée par la moyenne des vitesses en ligne droite des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Une fois inférieure, l'échantillon est écarté. Comme précédemment, aucune valeur de VSL n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur VSL. Les tableaux XIV et XV ainsi que la figure 54 résument les résultats obtenus.

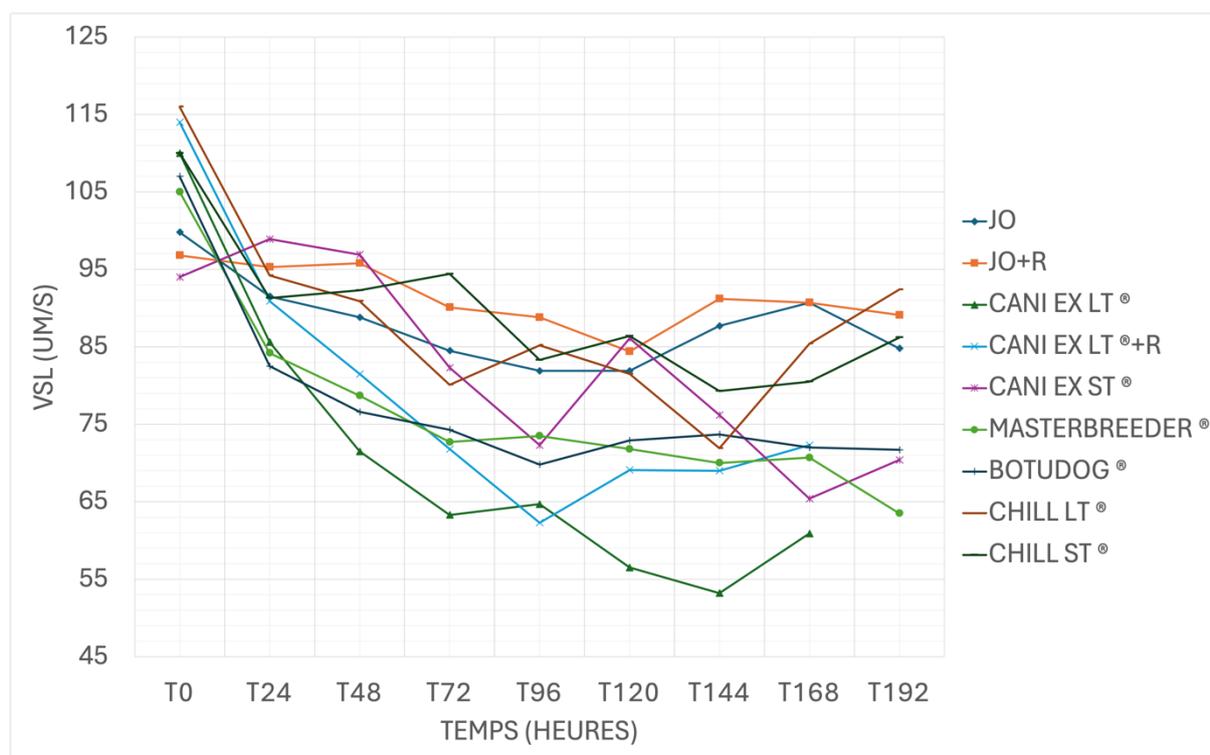


Figure 54 : Évolution moyenne de la vitesse en ligne droite (VSL en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XIV : Moyennes des vitesses en ligne droite (VSL en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	VSL et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT+ R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	$\mu\text{m/s}$	107,9	99,8	96,8	110	114	94	105	107	116	110
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	$\mu\text{m/s}$		91,5	95,3	85,6	90,9	98,9	84,2	82,5	94,2	91,3
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	$\mu\text{m/s}$		88,8	95,8	71,5	81,5	96,9	78,7	76,6	90,9	92,3
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	$\mu\text{m/s}$		84,5	90,1	63,3	71,8	82,3	72,7	74,3	80,1	94,4
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	$\mu\text{m/s}$		81,9	88,8	64,7	62,3	72,3	73,5	69,8	85,2	83,3
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	$\mu\text{m/s}$		81,9	84,4	56,5	69,1	86,1	71,8	72,9	81,5	86,4
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	$\mu\text{m/s}$		87,7	91,2	53,2	69	76,2	70	73,7	71,9	79,3
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	$\mu\text{m/s}$		90,7	90,7	60,9	72,3	65,4	70,7	72	85,4	80,5
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	$\mu\text{m/s}$		84,4	89,1	[N.D]	[N.D]	70,4	63,5	71,7	92,4	86,2
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de la VSL du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO+R et le JO montrent des valeurs élevées tout au long de l'expérience. Les résultats du JO+R sont systématiquement supérieurs à ceux du JO, sauf à T0H.

Considérant l'absence d'échantillon après T168H, les valeurs de VSL ne sont pas disponibles à T192H pour le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R, qui montrent des résultats beaucoup plus faibles que le JO et JO+R. Le CANI EX LT®+R demeure cependant systématiquement supérieur au CANI EX LT®, excepté à T96H.

Ainsi, les dilueurs JO et JO+R donnent des résultats qui semblent nettement plus élevés que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R.

Les milieux complétés en rosiglitazone offrent des résultats supérieurs par rapports à leur homologue qui n'en contiennent pas.

- **Analyse comparative descriptive de la VSL de tous les dilueurs :**

Le JO+R et le CANI EX ST® sont les seuls milieux stables de T0H à T48H. Ils présentent cependant les plus faibles valeurs de VSL à T0H, mais qui deviennent toutes deux supérieures à celles des autres milieux entre T24H et T48H. Le CANI EX ST® décroît cependant au-delà. À T72H (82,3 µm/s), sa VSL est inférieure au JO (84,5 µm/s), JO+R (90,1 µm/s) et CHILL ST® (94,4 µm/s) et fluctue davantage ensuite. Sa VSL n'est plus que de 70,4 µm/s à T192H soit l'une des plus faibles enregistrées ce jour-là, mais ne conserve plus que 3 échantillons à cette date.

Le JO+R présente des résultats faisant partie des plus élevés. À T72H (90,1 µm/s), seul le CHILL ST® (94,4 µm/s) lui est supérieur, mais ce dernier ne conserve plus que 14 éjaculats contre 19 pour le JO+R. Par ailleurs, il présente les valeurs les plus élevées à T96H, T144H et T168H. À T192H (89,1 µm/s), ses résultats sont seulement inférieurs à ceux du CHILL LT® (92,4 µm/s) dont le nombre d'échantillons préservés (4) est plus faible que le JO+R (8).

Le JO à T72H (84,5 µm/s) est seulement inférieur au JO+R (90,1 µm/s) et au CHILL ST® (94,4 µm/s). À T192H (84,4 µm/s), il apparaît comme l'un des dilueurs les plus élevés, seulement inférieur au JO+R (89,1 µm/s), CHILL LT® (92,4 µm/s) et CHILL ST® (86,2 µm/s), résultat à nuancer avec le nombre d'échantillons conservés (7).

Le CHILL ST® présente également de hautes valeurs de VSL. Il donne le résultat le plus élevé à T72H (94,4 µm/s) et à T120H (86,4 µm/s) et offre une valeur faisant partie des plus élevées à T192H (86,2 µm/s), uniquement inférieure au JO+R (89,1 µm/s) et CHILL LT® (92,4 µm/s). À noter qu'il ne conserve plus que 6 échantillons à ce moment-là et que les autres milieux ne conservent pas le même nombre d'éjaculats.

Le CHILL LT®, bien que supérieur aux autres dilueurs à T0H (116 µm/s), chute jusqu'à T72H à 80,1 µm/s, résultat moins élevé que le JO (84,5 µm/s), le JO+R (90,1 µm/s), le CANI

EX ST® (82,3 µm/s), et le CHILL ST® (94,4 µm/s). Il présente ensuite une évolution fluctuante qui mène pourtant à 92,4 µm/s à T192H soit la valeur la plus élevée enregistrée à cette date, observation à confronter au nombre de milieux restant qui est faible (4) et différent des autres testés.

Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, MASTERBREEDER® et BOTUDOG® affichent les plus faibles valeurs de VSL notamment entre T24H et T72H, bien que leurs résultats à T0H soient similaires aux autres milieux.

Le MASTERBREEDER® et le BOTUDOG® évoluent de façon très similaire mais sont associés à une décroissance notable jusqu'à T72H (respectivement 72,7 µm/s et 74,3 µm/s), où ils apparaissent uniquement supérieurs au CANI EX LT® (63,3 µm/s) et CANI EX LT®+R (71,8 µm/s). Leur VSL se stabilise par la suite respectivement à 63,5 µm/s et 71,7 µm/s à T192H, soit des valeurs très inférieures au JO (84,4 µm/s), JO+R (89,1 µm/s), CHILL LT® (92,4 µm/s) et CHILL ST® (86,2 µm/s). À noter que le BOTUDOG® et le MASTERBREEDER® préservent respectivement 8 et 7 échantillons à T192H.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R donnent des résultats élevés entre T0H et T24H mais chutent fortement au-delà. Le CANI EX LT® baisse fortement jusqu'à T72H (63,3 µm/s), valeur la plus faible observée à ce moment-là. Il apparaît globalement inférieur à tous les autres dilueurs entre T48H (71,5 µm/s) et T168H (60,9 µm/s). Le CANI EX LT®+R, l'un des plus élevés à T0H (114 µm/s), décroît très rapidement jusqu'à T96H (62,3 µm/s), soit la valeur la plus faible mesurée à cet instant. À T72H (71,8 µm/s), il est inférieur à tous les autres excepté au CANI EX LT® (63,3 µm/s). À T168H (72,3 µm/s), il reste toujours bien inférieur au CHILL LT® (85,4 µm/s), CHILL ST® (80,5 µm/s), JO (90,7 µm/s) et JO+R (90,7 µm/s). La nuance est à faire avec le fait qu'il ne conserve à ce moment-là plus que 1 seul échantillon au même titre que le CANI EX LT®.

Ainsi, le JO, JO+R et le CHILL ST® montrent des résultats globalement similaires qui semblent plus élevés que les autres milieux.

Le CANI EX ST® et le CHILL LT® donnent des valeurs fluctuantes, pendant que le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, MASTERBREEDER® et BOTUDOG® présentent des résultats qui ont tendance à être plus faibles, le CANI EX LT® affichant les valeurs les moins élevées au-delà de T24H.

- **Modélisation statistique de la VSL en fonction du milieu et du temps :**

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.0001$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du temps et l'effet du milieu sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.0001$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de VSL est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XV.

Tableau XV : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des vitesses moyennes (VSL) des différents milieux de T0H à T96H

T0H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	P < 0,05 (0.0407)	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0437)	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					P < 0,05 (0.0081)	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	P < 0,05 (0.0089)	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T24H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T48H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0460)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0011)	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0343)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0261)	P <0,05 (0.0014)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	P <0,05 (0.0398)
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0010)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (<0,0001)	P <0,05 (0.0134)	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	P <0,05 (<0,0001)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0219)
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	P <0,05 (0.0138)	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0139)	P <0,05 (0.0003)	P <0,05 (0.0313)	NS	P <0,05 (0.0179)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	P <0,05 (0.0282)	P <0,05 (0.0363)
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

À T0H, les VSL du CANI EX LT®+R et du CHILL LT® sont significativement plus élevées que pour le JO+R et le CANI EX ST®.

Le JO+R apparaît significativement supérieur au CANI EX LT® et BOTUDOG® de T48H à T96H, mais également au CANI EX LT®+R de T72H à T96H et au CANI EX ST® à T96H.

Le JO est significativement supérieur au CANI EX LT® de T48H à T72H et au CANI EX LT®+R à T96H.

Le CHILL LT® et le CHILL ST® sont significativement plus élevés que le CANI EX LT® à T48H et que le CANI EX LT®+R à T96H. Enfin, le CHILL ST® apparaît significativement supérieur au BOTUDOG® à T48H, ainsi qu'au CANI EX LT® et CANI EX LT®+R à T72H.

En résumé, le JO+R et le CANI EX LT®+R semblent donner des valeurs de VSL plus élevées que leurs homologues non complétés en rosiglitazone, bien qu'aucune différence significative n'ait été mise en évidence entre le JO et JO+R d'une part, ni entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

Le JO, JO+R, CHILL LT® et le CHILL ST® apparaissent avec les résultats les plus élevés. Aucune différence significative n'a été détectée entre eux. Cependant, le JO+R affiche, notamment à T96H, le plus de différences significatives avec les milieux présentant les valeurs de VSL les plus faibles.

Le CANI EX ST®, MASTERBREEDER® et BOTUDOG® semblent plus intermédiaires. Tandis que le MASTERBREEDER® n'est pas significativement différent des autres dilueurs jusqu'à T96H, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® apparaissent avec des résultats significativement plus faibles que le JO+R entre T48H et T96H. À noter que le CANI EX ST® présente néanmoins des valeurs élevées en début d'expérience. Le BOTUDOG® et le MASTERBREEDER® décrivent enfin un profil d'évolution similaire.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R affichent des résultats plus en marges. Le CANI EX LT® montre le plus de différences significatives jusqu'à T96H notamment avec le JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST®, ainsi que les plus faibles valeurs de VSL à partir de T48H.

e) La vitesse curviligne (VCL)

La vitesse curviligne correspond à la moyenne des vitesses curvilignes des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de VCL n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur VCL. Les tableaux XVI et XVII ainsi que la figure 55 résument les résultats obtenus.

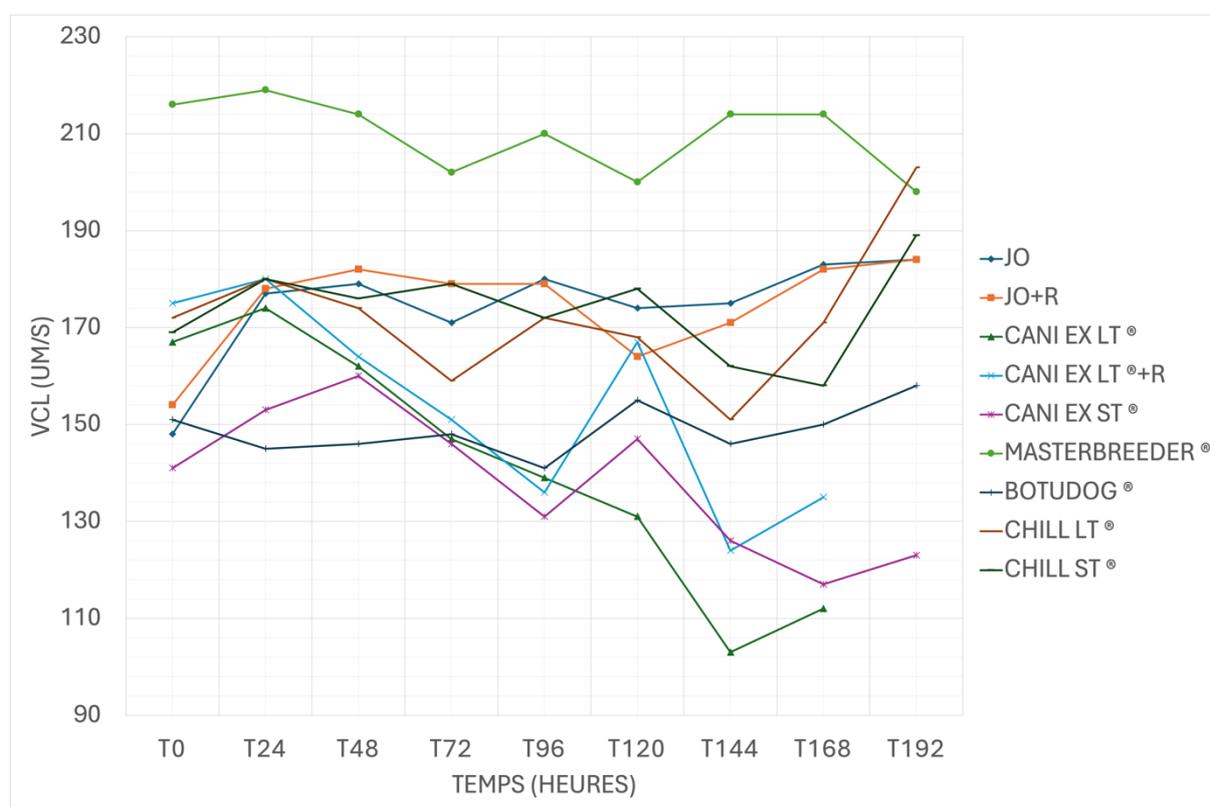


Figure 55 : Évolution moyenne de la vitesse curviligne (VCL en $\mu\text{m/s}$) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XVI : Moyennes des vitesses curvilignes (VCL en $\mu\text{m/s}$) mesurées pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	VCL et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT+ R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	$\mu\text{m/s}$	174,5	148	154	167	175	141	216	151	172	169
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	$\mu\text{m/s}$		177	178	174	180	153	219	145	180	180
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	$\mu\text{m/s}$		179	182	162	164	160	214	146	174	176
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	$\mu\text{m/s}$		171	179	147	151	146	202	148	159	179
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	$\mu\text{m/s}$		180	179	139	136	131	210	141	172	172
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	$\mu\text{m/s}$		174	164	131	167	147	200	155	168	178
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	$\mu\text{m/s}$		175	171	103	124	126	214	146	151	162
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	$\mu\text{m/s}$		183	182	112	135	117	214	150	171	158
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	$\mu\text{m/s}$		184	184	[N.D]	[N.D]	123	198	158	203	189
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de la VCL du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO et le JO+R semblent similaires tout au long de l'étude. Cependant, le JO+R offre des VCL supérieures au JO de T0H à T72H, tandis que de T96H à T168H, c'est le JO qui semble donner les résultats les plus élevés. Ils affichent à T192H des résultats équivalents (184 $\mu\text{m/s}$).

Considérant l'absence d'échantillon pour le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R après T168H, les valeurs de VCL ne sont pas disponibles à T192H. Bien que présentant une VCL relativement élevée de T0H à T24H, ils deviennent très inférieurs au JO et JO+R au-delà. Leurs résultats apparaissent similaires de T0H à T96H, mais le CANI EX LT® semble beaucoup plus faible à partir de T120H et presque toujours inférieur au CANI EX LT®+R. Une

augmentation soudaine à T120H (167 $\mu\text{m/s}$) est objectivée pour le CANI EX LT®+R, mais ne reflète pas une réelle supériorité car il faut considérer que son nombre d'échantillons diminue au cours du temps.

Ainsi, les dilueurs JO et JO+R donnent des résultats plus élevés que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R. Le JO+R semble donner des résultats supérieurs au JO de T0H à T72H, tandis que de T96H à T168H, c'est le JO qui lui semble supérieur.

Le CANI EX LT®+R apparaît presque systématiquement supérieur au CANI EX LT®.

- **Analyse comparative descriptive de la VCL de tous les dilueurs :**

Il semble se distinguer trois groupes. Le MASTERBREEDER® affiche de loin les résultats les plus élevés tout au long de l'expérience, sauf à T192H (198 $\mu\text{m/s}$) où la VCL du CHILL LT® (203 $\mu\text{m/s}$) lui devient légèrement supérieure, mais ne conserve plus que 4 échantillons alors que le MASTERBREEDER® en préserve 7.

Le JO, le JO+R, le CHILL LT® et le CHILL ST® montrent de hautes valeurs qui semblent globalement similaires.

Le JO et le JO+R affichent des VCL faibles à T0H (respectivement 148 $\mu\text{m/s}$ et 154 $\mu\text{m/s}$) qui augmentent respectivement à partir de T24H à 177 $\mu\text{m/s}$ et à 178 $\mu\text{m/s}$. À T72H (171 $\mu\text{m/s}$), le JO est seulement inférieur au JO+R (179 $\mu\text{m/s}$), MASTERBREEDER® (202 $\mu\text{m/s}$) et CHILL ST® (179 $\mu\text{m/s}$) tandis que le JO+R (179 $\mu\text{m/s}$) apparaît uniquement inférieur au MASTERBREEDER® (202 $\mu\text{m/s}$). Ils montrent des résultats faisant partie des plus élevés à T192H (184 $\mu\text{m/s}$), mais toujours inférieurs à ceux du MASTERBREEDER® (198 $\mu\text{m/s}$), et du CHILL LT® (203 $\mu\text{m/s}$) et CHILL ST® (189 $\mu\text{m/s}$).

Le CHILL ST® (169 $\mu\text{m/s}$) et le CHILL LT® (172 $\mu\text{m/s}$) sont initialement supérieurs au JO (148 $\mu\text{m/s}$) et JO+R (154 $\mu\text{m/s}$). À T72H, la VCL du CHILL ST® (179 $\mu\text{m/s}$) est la plus élevée derrière le MASTERBREEDER® (202 $\mu\text{m/s}$), mais fluctue davantage à partir de T96H. Elle finit par croître fortement à T192H pour devenir même supérieur au JO et JO+R (184 $\mu\text{m/s}$), résultats à nuancer avec la diminution du nombre d'échantillons (6 pour le CHILL LT®).

Le CHILL LT® est discrètement plus en marge par rapport aux milieux précédents. À T72H (159 $\mu\text{m/s}$), il est uniquement supérieur au CANI EX LT® (147 $\mu\text{m/s}$), CANI EX

LT®+R (151 µm/s), CANI EX ST® (146 µm/s) et BOTUDOG® (148 µm/s). Fluctuant tout au long de l'expérience, il remonte considérablement à T192H (203 µm/s), valeur la plus importante ce jour-là, bien que le nombre d'échantillons soit faible et variable entre les milieux (4 pour le CHILL LT® contre 8 pour le JO+R).

Le CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® apparaissent avec des résultats inférieurs aux milieux précédents.

Le BOTUDOG® semble relativement faible dès T0H (151 µm/s) mais demeure stable dans l'ensemble. Entre T24H (145 µm/s) et T48H (146 µm/s) ses résultats sont les plus faibles. À T72H (148 µm/s) sa VCL est l'une des plus faibles après le CANI EX LT® (147 µm/s) et le CANI EX ST® (146 µm/s). Il remonte légèrement à 158 µm/s à T192H, soit la valeur la plus faible après le CANI EX ST® (123 µm/s).

Le CANI EX ST® montre les plus faibles valeurs de VCL à T0H (141 µm/s) et de T72H (146 µm/s) à T96H (131 µm/s). Fluctuant, il décroît jusqu'à 123 µm/s à T192H, valeur la plus faible mesurée bien qu'il ne lui reste que 3 échantillons.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R présentent de faibles VCL au-delà de T24H. À T72H, ils affichent tous deux des VCL faisant partie des valeurs les plus basses. Le CANI EX LT® est le plus faible dilueur à partir de T120H. À T168H, le CANI EX LT®+R (135 µm/s) est seulement supérieur au CANI EX ST® (117 µm/s) et CANI EX LT® (112 µm/s) mais il faut rappeler qu'ils conservent très peu d'échantillons (1) à T168H.

Ainsi, le MASTERBREEDER® affiche les VCL les plus élevées et ce, à presque tout instant de mesure.

Les milieux JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® montrent des valeurs de VCL intermédiaires qui semblent similaires, bien que le CHILL LT® paraisse discrètement plus en marge.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R sont inférieurs aux dilueurs précédents à partir de T48H pendant que le CANI EX ST® et le BOTUDUDOG® demeurant faibles sur toute la durée de l'expérience.

Modélisation statistique de la VCL en fonction du milieu et du temps :

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0,005$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du temps et l'effet du milieu sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de VCL est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XVII.

Tableau XVII : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des vitesses curvilignes (VCL) des différents milieux de T0H à T96H

T0H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					P <0,05 (0.0207)	P <0,05 (0.0017)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0005)	P <0,05 (0.0002)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T24H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0011)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P <0,05 (0.0018)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (0.0003)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (0.0043)	P <0,05 (0.0362)	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0027)	P <0,05 (0.0039)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T48H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT +R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0286)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0406)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (0.0002)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0066)	P <0,05 (0.0826)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT +R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	P <0,05 (0.0699)	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	P <0,05 (0.0121)	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0006)	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT +R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	P <0,05 (0.0060)	P <0,05 (0.0006)	P <0,05 (0.0448)	P <0,05 (0.0237)	NS	NS
JO+R			NS	P <0,05 (0.0077)	P <0,05 (0.0007)	P <0,05 (0.0432)	P <0,05 (0.0246)	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	P <0,05 (0.0086)	P <0,05 (0.0138)
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0128)	P <0,05 (0.0073)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

Le CANI EX ST® donne un résultat significativement inférieur au CANI EX LT®+R à T0H.

Le MASTERBREEDER® est significativement supérieur à tous les milieux de T0H à T24H, et à T96H. Il apparaît également significativement supérieur à tous les milieux excepté le JO+R à T48H et à tous les milieux sauf le JO, JO+R et CHILL ST® à T72H.

Le JO et le JO+R sont significativement supérieurs au CANI EX ST® de T72H à T96H, mais sont aussi significativement plus élevés que le CANI EX LT®+R et le BOTUDOG® à

T96H, ce dernier étant aussi significativement inférieur au JO+R à T48H, et également significativement plus faible que le CANI EX LT®+R à T24H.

Enfin, le CHILL LT® et le CHILL ST® sont significativement supérieurs au CANI EX ST® à T96H.

En résumé, le CANI EX LT®+R est presque systématiquement supérieur au CANI EX LT®, alors que le JO+R ne montre une supériorité à son homologue non complété que jusqu'à T72H. Aucune différence significative n'a été trouvée entre le JO et le JO+R d'une part, ni entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part. Le JO et JO+R apparaissent seulement significativement plus élevés que le CANI EX LT®+R à T96H.

Le MASTERBREEDER® montre les résultats les plus élevés et présente des différences significatives avec presque tous les milieux à tous les temps de mesures.

Le JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® donnent des résultats similaires, aucune différence significative n'ayant été trouvée entre eux, bien que le CHILL LT® paraisse discrètement plus en marge. Ils maintiennent de hautes valeurs de VCL, mais qui demeurent significativement inférieures à celles du MASTERBREEDER®. En association à ce dernier, le JO et le JO+R montrent le plus de différences significatives avec le CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG®, notamment à T96H.

Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG® donnent de faibles VCL significativement inférieures à celles du MASTERBREEDER®, mais aussi au JO et JO+R notamment à T96H, le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R n'affichant de faibles valeurs qu'au-delà de T48H. Néanmoins, il est à préciser que le CANI EX LT® ne présente aucune différence significative avec les autres dilueurs à l'exception du MASTERBREEDER®. De manière générale, aucune différence significative n'a été trouvée entre eux.

f) L'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH)

L'amplitude de déplacement latéral de la tête correspond à l'intensité de déplacement de la tête des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur d'ALH n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur ALH. Les tableaux XVIII, XIX et XX ainsi que la figure 56 résument les résultats obtenus.

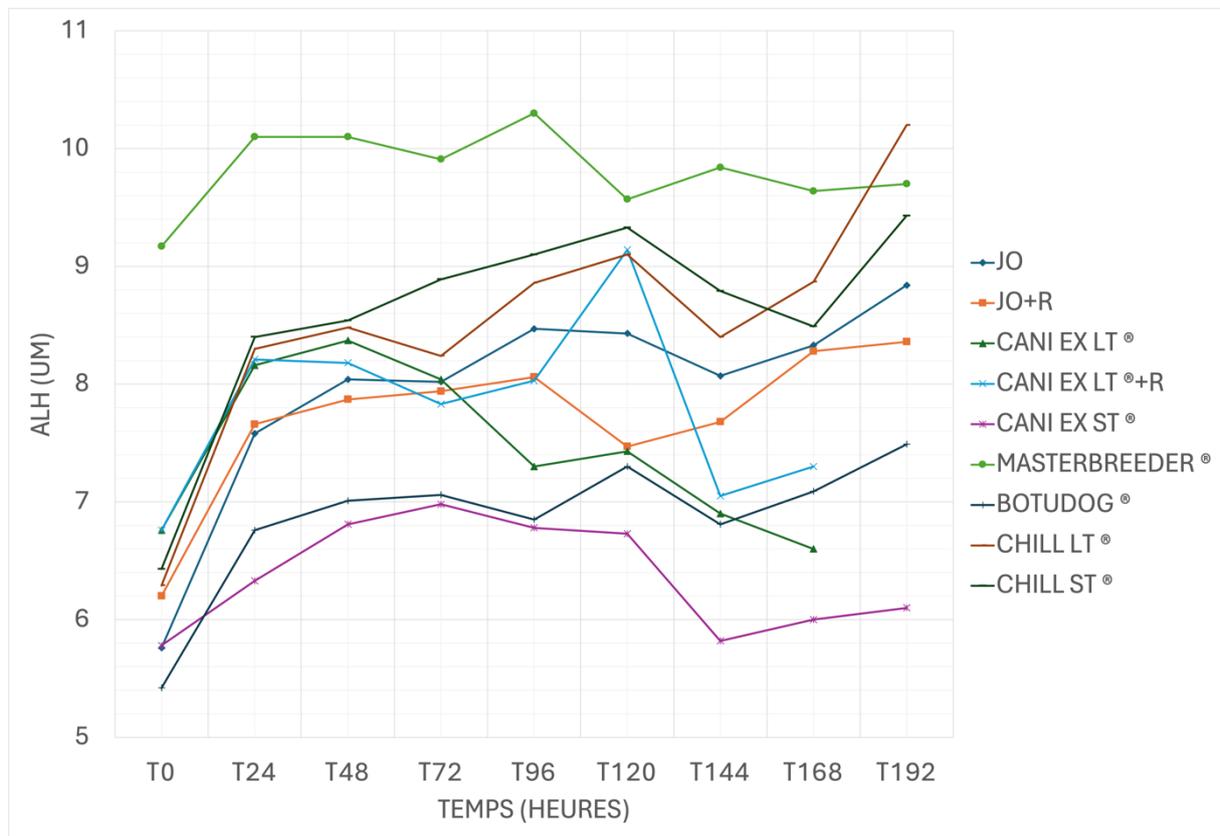


Figure 56 : Évolution moyenne de l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH en µm) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XVIII : Pourcentages moyens de l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH en μm) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	μm et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT+ R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	μm	6,55	5,76	6,2	6,76	6,76	5,78	9,17	5,42	6,29	6,43
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	μm		7,58	7,66	8,16	8,21	6,33	10,1	6,76	8,3	8,4
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	μm		8,04	7,87	8,37	8,18	6,81	10,1	7,01	8,48	8,54
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	μm		8,02	7,94	8,04	7,83	6,98	9,91	7,06	8,24	8,89
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	μm		8,47	8,06	7,3	8,03	6,78	10,3	6,85	8,86	9,1
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	μm		8,43	7,47	7,43	9,14	6,73	9,57	7,3	9,1	9,33
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	μm		8,07	7,68	6,9	7,05	5,82	9,84	6,81	8,4	8,79
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	μm		8,33	8,28	6,6	7,3	6	9,64	7,09	8,87	8,49
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	μm		8,84	8,36	[N.D]	[N.D]	6,1	9,7	7,49	10,2	9,43
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de l'ALH du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO et JO+R semblent très similaires jusqu'à T72H. Le JO présente cependant des valeurs supérieures à partir de T48H.

Considérant l'absence d'échantillon pour le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R après T168H, les valeurs d'ALH ne sont pas disponibles à T192H. Ces deux milieux semblent plus élevés que JO et JO+R jusqu'à T48H. Ils leur deviennent ensuite inférieurs au-delà de T72H, bien que le CANI EX LT®+R augmente fortement à T120H. Cependant, le nombre d'échantillons que ce dernier conserve chute drastiquement de T96H à T120H (passage de 13

à 7 éjaculats). Ils donnent des résultats semblables jusqu'à T72H, mais le CANI EX LT® baisse au-delà et présente alors des valeurs moins élevées que le CANI EX LT®+R.

Ainsi, aucune véritable tendance ne semble se dégager de ces résultats. Le JO+R paraît inférieur au JO à partir de T48H, pendant que le CANI EX LT®+R montre des résultats supérieurs à son homologue non complété en rosiglitazone au-delà de T72H.

- **Analyse comparative descriptive de l'ALH de tous les dilueurs :**

Comme précédemment, trois groupes se détachent à nouveau. Tous les milieux augmentent fortement de T0H à T24H, sauf le CANI EX ST® dont l'accroissement est plus modéré. Le MASTERBREEDER® donne les résultats les plus élevés tout au long de l'étude excepté à T192H (9,7 µm) où il est légèrement surpassé par le CHILL LT® (10,2 µm).

Le JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CHILL LT® et CHILL ST® affichent des ALH supérieures au CANI EX ST® et au BOTUDOG®, mais très inférieures au MASTERBREEDER®.

Le CHILL ST® semble montrer les résultats les plus élevés après le MASTERBREEDER®. Il présente une ALH supérieure à tous les autres milieux excepté le MASTERBREEDER® de T24H (8,4 µm) à T144H (8,79 µm). À T192H, il montre une ALH de 9,43 µm qui est seulement inférieure à celle du MASTERBREEDER® (9,7 µm) et du CHILL LT® (10,2 µm). Cependant, le nombre d'échantillon restant est faible et non identique (6 éjaculats conservés pour le CHILL LT®).

Le CHILL LT® affiche des ALH qui paraissent similaires au CHILL ST®, mais qui lui sont néanmoins inférieures jusqu'à T144H. À T72H, son ALH est de 8,24 µm, soit une valeur uniquement inférieure au MASTERBREEDER® (9,91 µm) et CHILL ST® (8,89 µm). À T192H (10,2 µm), il présente la valeur la plus élevée observée, mais ne conserve cependant plus que 4 échantillons au bout de l'étude.

Le JO et le JO+R apparaissent moins élevés que les milieux précédents. Leurs ALH sont inférieures à celles du MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® sur les 8 jours d'étude. À T72H, le JO (8,02 µm), présente des résultats inférieurs au MASTERBREEDER® (9,91 µm), CANI EX LT® (8,04 µm), CHILL LT® (8,24 µm) et CHILL ST® (8,89 µm) mais

supérieurs au JO+R (7,94 μm). À T192H, l'ALH du JO (8,84 μm) et du JO+R (8,36 μm) est inférieure à celle du MASTERBREEDER® (9,7 μm), du CHILL LT® (10,2 μm), et du CHILL ST® (9,43 μm), mais le nombre d'échantillons qu'ils préservent sont différents des autres milieux.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R montrent des ALH qui semblent similaires aux JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® respectivement jusqu'à T72H et T120H, mais qui deviennent cependant plus faibles au-delà. À T72H, le CANI EX LT® (8,04 μm) est uniquement inférieur au MASTERBREEDER® (9,91 μm), CHILL LT® (8,24 μm) et CHILL ST® (8,89 μm), mais chute cependant fortement ensuite et devient même à T168H (6,6 μm) inférieur au BOTUDOG® (7,09 μm), mais encore supérieur au CANI EX ST® (6 μm), bien qu'il ne préserve plus qu'un unique échantillon.

Le CANI EX LT®+R à T72H (7,83 μm) est supérieur au CANI EX ST® (6,98 μm) et BOTUDOG® (7,06 μm) mais inférieur aux autres et chute modérément jusqu'à 7,3 μm à T168H, soit l'une des valeurs les plus faibles mesurées seulement supérieure au CANI EX LT® (6,6 μm), CANI EX ST® (6 μm) et BOTUDOG® (7,09 μm), bien qu'il ne conserve lui aussi plus qu'un unique échantillon.

Le CANI EX ST® et le BOTUDOG® donnent les résultats les plus faibles. Le CANI EX ST® présente les plus faibles valeurs de T24H à T192H. Le BOTUDOG® affiche quant à lui une ALH (7,06 μm) initialement la plus basse (5,42 μm) et qui devient uniquement supérieure au CANI EX ST® (6,98 μm) à T72H. À T192H, son résultat (7,49 μm) apparaît uniquement supérieur au CANI EX ST® (6,1 μm) bien que le nombre d'échantillons ait baissé et soit différent entre les milieux comparés, d'autant plus qu'il n'existe aucune donnée pour le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

Ainsi, le MASTERBREEDER® montre les valeurs d'ALH les plus élevées.

Le JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CHILL LT® et CHILL ST® donnent des résultats inférieurs au MASTERBREEDER®, mais semblent supérieurs à ceux que présentent le BOTUDOG® et le CANI EX ST®, ce dernier affichant les valeurs d'ALH les plus faibles.

- **Modélisation statistique de l'ALH en fonction du milieu et du temps** :

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu n'est pas significatif ($p = 0.1182$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H est équivalente dans les différents milieux. L'effet du milieu et du temps est cependant significatif (respectivement $p < 0.001$ et $p < 0.05$).

Étant donné l'absence d'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de d'ALH est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XIX et XX.

Tableau XIX : Évolution de l'ALH au cours du temps jusqu'à T96H. Les termes de la diagonale correspondent à la moyenne de la mobilité (moyenne calculée sur tous les milieux). Les termes en dessous de la diagonale correspondent à la différence des moyennes entre les deux temps de mesure et les termes au-dessus de la diagonale sont les p-valeurs du test de Tukey correspondant à la différence de moyenne.

MOBILITÉ	T0H	T24H	T48H	T72H	T96H
T0H	[6.44]	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001
T24H	- 1.4767	[7.91]	0.9533	0.9922	0.8837
T48H	- 1.7022	- 0.2255	[8.14]	0.9989	0.9992
T72H	- 1.6172	- 0.1405	0.0850	[8.05]	0.9874
T96H	- 1.7829	- 0.3062	- 0.0808	- 0.1658	[8.22]

Tableau XX : Évolution de l'ALH entre les différents milieux. Les termes de la diagonale correspondent à la moyenne de la mobilité (moyenne calculée sur tous les temps jusqu'à T96H). Les termes en dessous de la diagonale correspondent à la différence des moyennes entre les deux milieux et les termes au-dessus de la diagonale sont les p-values du test de Tukey correspondant à la différence de moyenne.

MOBILITÉ	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT+R	CANI EX ST	MASTER-BREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO	[7.56]	1.000	0.9811	0.9976	0.0019	<.0001	0.0266	0.8608	0.4372
JO+R	0.049	[7.51]	0.9510	0.9897	0.0035	<.0001	0.0446	0.7657	0.3268
CANI EX LT	-0.284	-0.333	[7.84]	1.0000	<.0001	<.0001	0.0014	1.0000	0.9785
CANI EX LT+R	-0.203	-0.252	0.0805	[7.76]	0.0002	<.0001	0.0031	0.9987	0.9034
CANI EX ST	1.181	1.132	1.4649	1.3844	[6.38]	< 0.0001	0.9893	<.0001	<.0001
MASTER-BREEDER	-2.425	-2.473	-2.1409	-2.2214	-3.6057	[9.98]	<.0001	<.0001	<.0001
BOTUDOG	0.910	0.861	1.1939	1.1135	-0.2709	3.3348	[6.65]	0.0002	<.0001
CHILL LT	-0.393	-0.442	-0.1095	-0.1899	-1.5743	2.0314	-1.3034	[7.95]	0.9989
CHILL ST	-0.578	-0.627	-0.2946	-0.3751	-1.7595	1.8463	-1.4885	-0.1851	[8.14]

Le tableau XIX fournit les résultats de l'évolution de l'ALH en fonction du temps. Les résultats soulignent que les ALH sont significativement plus faibles à T0H par rapport à T24H, T48H, T72H et T96H.

Le tableau XX fournit les résultats de la différence d'ALH en fonction du milieu jusqu'à T96H. Le MASTERBREEDER® apparaît significativement supérieur à tous les milieux.

Le CANI EX ST® présente des résultats significativement plus faibles que tous les milieux excepté le BOTUDOG®.

Enfin, le BOTUDOG® montre des valeurs d'ALH significativement plus faibles que tous les milieux à l'exception du CANI EX ST®.

Le MASTERBREEDER® donne les valeurs d'ALH les plus élevées qui sont significativement supérieures à celles de tous les milieux jusqu'à T96H.

Le CHILL ST®, avec en second plan le CHILL LT®, montrent les plus hautes valeurs d'ALH après le MASTERBREEDER®. Ils présentent des résultats significativement plus élevés que le CANI EX ST® et le BOTUDOG® qui sont par ailleurs les milieux affichant les ALH les plus faibles.

En revanche, aucune différence significative n'a été trouvée entre le JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CHILL LT® et CHILL ST®, permettant de les considérer comme similaires. Les milieux complétés en rosiglitazone ne semblent donc pas spécifiquement montrer de différences avec leurs homologues non complétés.

Enfin, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® présentent des résultats très inférieurs aux autres milieux qui leur apparaissent significativement plus faibles.

g) La fréquence de battement croisé (BCF)

La fréquence de battement croisé correspond à la fréquence à laquelle les têtes des spermatozoïdes effectuent leurs déplacements dans les 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de BCF n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur BCF. Les tableaux XXI et XXII ainsi que la figure 57 résument les résultats obtenus.

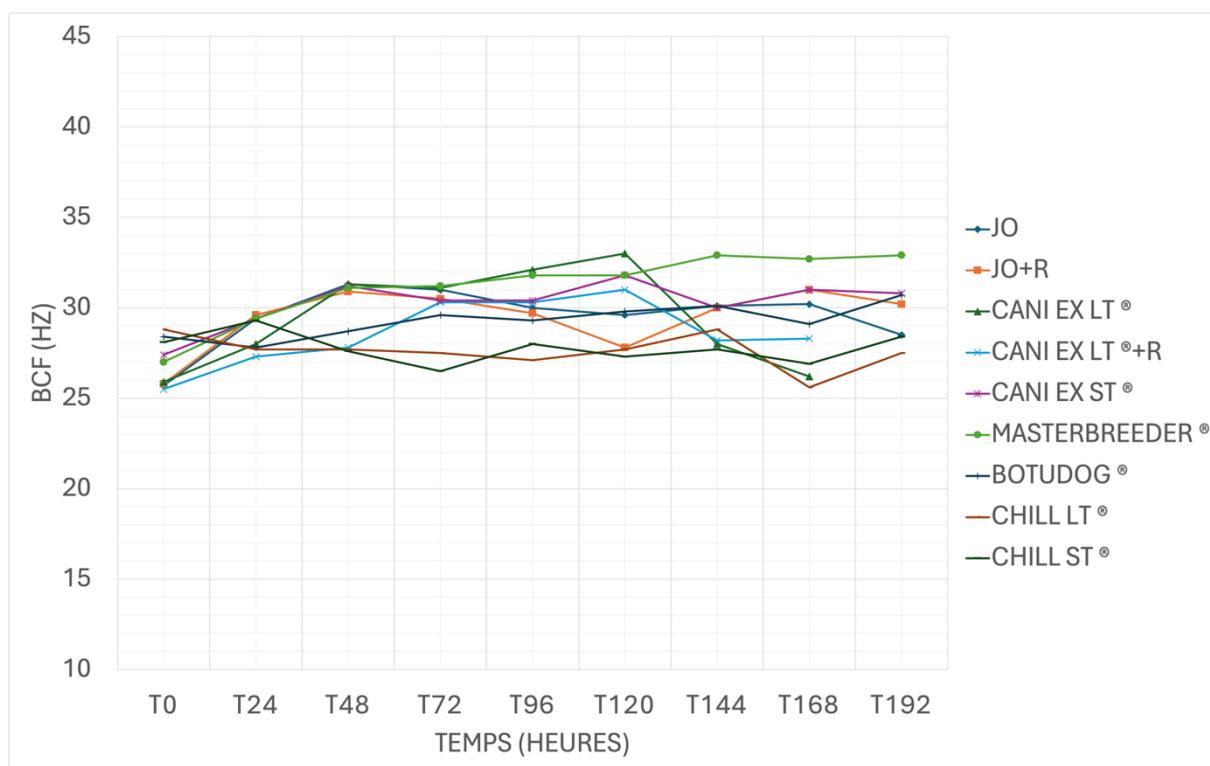


Figure 57 : Évolution moyenne de la fréquence de battement croisé (BCF en Hz) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XXI : Pourcentages moyens de la fréquence de battement croisé (BCF en Hz) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	Hz et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO + R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	Hz	29,24	25,7	25,8	25,9	25,5	27,4	27	28,4	28,8	28,1
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	Hz		29,4	29,6	28	27,3	29,4	29,4	27,8	27,7	29,3
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	Hz		31,3	30,9	31,3	27,8	31,2	31,1	28,7	27,7	27,6
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	Hz		31	30,5	31,1	30,3	30,4	31,2	29,6	27,5	26,5
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	Hz		30	29,7	32,1	30,3	30,4	31,8	29,3	27,1	28
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	Hz		29,6	27,8	33	31	31,8	31,8	29,8	27,7	27,3
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	Hz		30,1	30	28	28,2	30	32,9	30,1	28,8	27,7
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	Hz		30,2	31	26,2	28,3	31	32,7	29,1	25,6	26,9
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	Hz		28,5	30,2	[N.D]	[N.D]	30,8	32,9	30,7	27,5	28,4
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de la BCF du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO et le JO+R affichent des résultats qui semblent globalement équivalents sur toute la durée d'étude.

Considérant l'absence d'échantillon pour le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R après T168H, les valeurs de BCF ne sont pas disponibles à T192H. Le CANI EX LT® donne des valeurs élevées qui paraissent supérieures à celles du CANI EX LT®+R de T0H à T120H. Ils affichent tous deux des résultats semblables au-delà, mais il est important de préciser que le nombre d'échantillons comparés n'est plus le même entre les milieux et qu'il est beaucoup plus faible pour ces deux dilueurs (1) que pour le JO et le JO+R (10) à T168H.

Ainsi, peu de différences semblent apparaître à première vue entre le JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, bien que le CANI EX LT® semble plus élevé sur les premiers jours.

- **Analyse comparative descriptive de la BCF de tous les dilueurs :**

Le MASTERBREEDER® présente systématiquement des résultats faisant partie des plus élevés entre T24H et T192H et montre les valeurs les plus hautes à partir de T144H (32,9 Hz) jusqu'à T192H (32,9 Hz). À T72H (31,2 Hz), il figure comme le milieu le plus élevé. Il est aussi nécessaire de mentionner qu'il ne préserve plus que 7 éjaculats à la fin de l'expérience.

Le CANI EX ST® donne des valeurs faisant partie des plus élevées. À T72H, sa BCF (30,4 Hz) est inférieure au JO (31 Hz), JO+R (30,5 Hz), CANI EX LT® (31,1 Hz) et MASTERBREEDER® (31,2 Hz). À T192H, il montre la plus haute BCF (30,8 Hz) après le MASTERBREEDER® (32,9 Hz), mais il ne contient plus que 3 échantillons alors que d'autres milieux en conservent jusqu'à 8.

Le JO et le JO+R affichent des résultats très similaires jusqu'à T96H. À T72H, la BCF du JO+R (30,5 Hz) est uniquement inférieure à celle du JO (31 Hz) CANI EX LT® (31,1 Hz) et MASTERBREEDER® (31,2 Hz). À T192H, le JO (28,5 Hz) affiche une BCF plus faible, qui devient notamment inférieure au JO+R (30,2 Hz), CANI EX ST® (30,8 Hz), MASTERBREEDER® (32,9 Hz) et BOTUDOG® (30,7 Hz). Le nombre d'échantillons comparés demeure néanmoins faible et différent, le JO+R en conservant 8 alors que le JO en maintient 7.

Le BOTUDOG® montre des valeurs intermédiaires. À T72H, sa BCF (29,6 Hz) est néanmoins seulement supérieure à celle du CHILL LT® (27,5 Hz) et du CHILL ST® (26,5 Hz) tandis qu'à T192H (30,7 Hz), il apparaît uniquement inférieur au CANI EX ST® (30,8 Hz) et au MASTERBREEDER® (32,9 Hz).

Le CANI EX LT® montre de hautes valeurs entre T48H (31,3 Hz) et T120H (33 Hz) et les plus élevées de T96H (32,1 Hz) à T120H (33 Hz). À T72H (31,1 Hz), il est seulement inférieur au MASTERBREEDER® (31,2 Hz), mais chute notablement après T120H pour devenir uniquement supérieur (26,2 Hz) au CHILL LT® (25,6 Hz) à T168H.

Le CANI EX LT®+R semble inférieur à tous les autres milieux à T0H (25,5 Hz), mais apparaît plus intermédiaire par la suite. À T72H, il donne une BCF (30,3 Hz) uniquement

supérieure au BOTUDOG® (29,6 Hz), CHILL LT® (27,5 Hz) et CHILL ST® (26,5 Hz). Il chute jusqu'à 28,3 Hz à T168H, soit l'une des plus faibles valeurs observées après le CANI EX LT® (26,2 Hz), le CHILL LT® (25,6 Hz) et le CHILL ST® (26,9 Hz), mais ne conserve plus qu'un seul échantillon à cette date alors que les autres milieux en préservent davantage.

Le CHILL LT® et le CHILL ST® présentent des résultats similaires mais plus faibles dans l'ensemble. Le CHILL LT® montre à T72H un résultat (27,5 Hz) uniquement supérieur au CHILL ST® (26,5 Hz) et devient même la valeur la plus faible mesurée à T96H (27,1 Hz) ainsi qu'entre T168H (25,6 Hz) et T192H (27,5 Hz). Le CHILL ST® donne pour sa part la moins haute BCF entre T48H (27,6 Hz) et T72H (26,5 Hz), ainsi qu'entre T120H (27,3 Hz) et T144H (27,7 Hz). À T192H (28,4 Hz), il apparaît uniquement supérieur au CHILL LT® (27,5 Hz). Ces deux dilueurs maintiennent cependant de moins en moins d'échantillons au cours du temps.

Ainsi, peu de différences semblent apparaître entre le JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST®, MASTERBREEDER® et BOTUDOG®, bien que le MASTERBREEDER® paraisse le plus élevé à partir de T120H. Les moins hautes valeurs de BCF sont obtenues avec le CHILL LT® et le CHILL ST®.

- **Modélisation statistique de la BCF en fonction du milieu et du temps** :

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.0001$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du milieu et l'effet du temps sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.01$ et $p < 0.005$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse de deux à deux des moyennes des valeurs de BCF est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XXII.

Tableau XXII : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des fréquences de battements croisés (BCF) des différents milieux de T0H à T96H

T0H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0391)	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0162)	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T24H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T48H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	P < 0,05 (0.0235)	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				P < 0,05 (0.0211)	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0293)	P < 0,05 (0.0144)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	P < 0,05 (0.0469)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T72H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0099)
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0431)
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0241)	P < 0,05 (0.0039)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	NS	P < 0,05 (0.0093)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0128)	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						NS	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							NS	P < 0,05 (0.0168)	NS
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

Le CHILL LT® apparaît significativement supérieur au JO et CANI EX LT®+R à T0H. Il devient significativement inférieur au CANI EX LT® de T48H à T96H ainsi qu'au MASTERBREEDER® à T96H.

Le CHILL ST® est significativement plus faible que le CANI EX LT® et le MASTERBREEDER® de T48H à T72H, mais montre également une infériorité significative par rapport au JO et JO+R à T72H.

Enfin, le JO et le CANI EX LT® montrent des résultats significativement supérieurs au CANI EX LT®+R à T48H.

En résumé, presque aucune différence significative n'a été trouvée entre le JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R. Ces milieux semblent donc similaires dans l'ensemble pour la BCF. Aucun de ces milieux ne présente d'ailleurs de résultat significativement différent du CANI EX ST®, MASTERBREEDER® et BOTUDOG®, les plaçant comme similaires.

Toutefois, le MASTERBREEDER®, qui affiche des résultats faisant partie des plus élevés, apparaît significativement supérieur au CHILL ST® de T48H à T72H et au CHILL LT® à T96H.

Le CANI EX LT® affiche aussi de hautes valeurs de BCF entre T48H et T120H dont les différences avec le CHILL LT® sont significatives de T48H à T96H et avec le CHILL ST® de T48H et T72H. Néanmoins, il chute fortement au-delà de T120H jusqu'à des valeurs inférieures.

Le CHILL LT® et le CHILL ST® semblent plus faibles et présentent des résultats significativement inférieurs au JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et MASTERBREEDER® selon le temps considéré.

h) La linéarité (LIN)

La linéarité correspond à la proximité de la trajectoire des spermatozoïdes par rapport à une ligne droite dans les 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de LIN n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur LIN. Les tableaux XXIII et XXIV ainsi que la figure 58 résument les résultats obtenus.

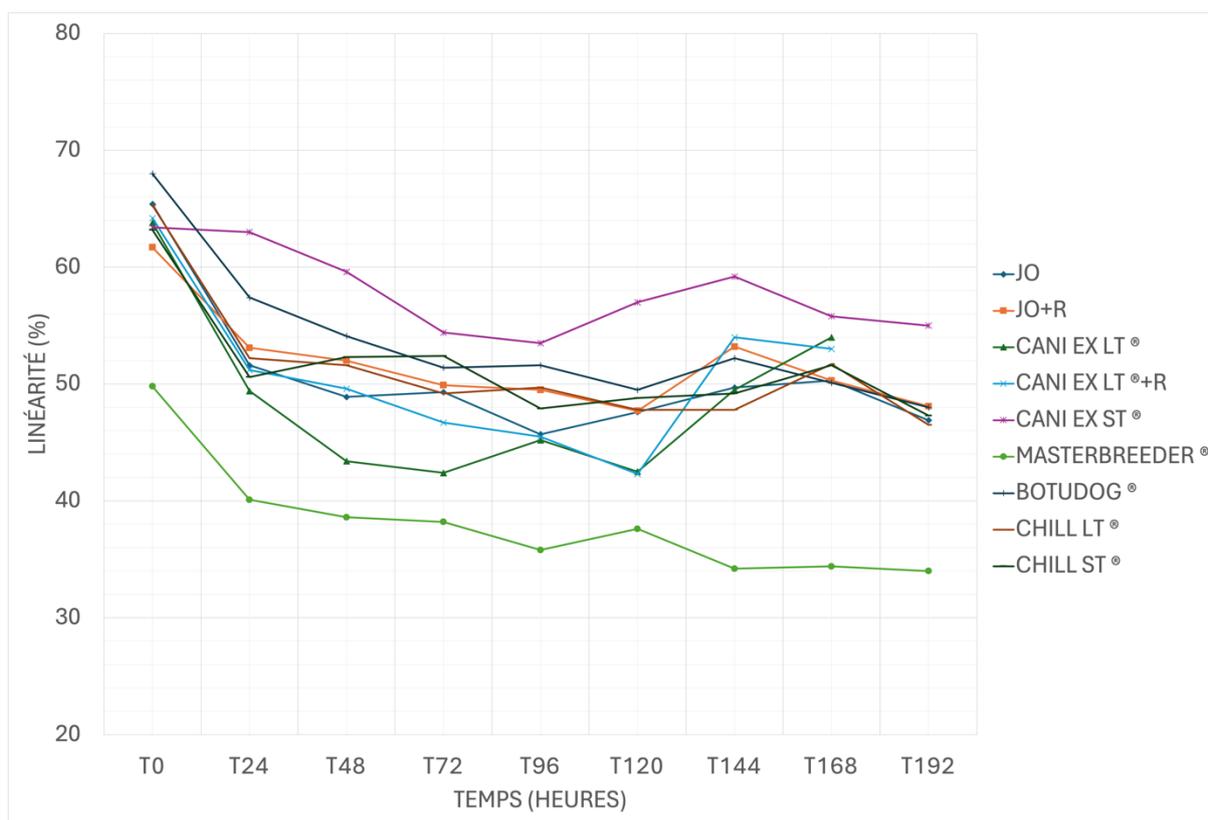


Figure 58 : Évolution moyenne des pourcentages de linéarité (LIN) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XXIII : Pourcentages moyens de linéarité (LIN) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	% LIN et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO + R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	%	59,05	65,4	61,7	63,8	64,2	63,4	49,8	68	65,3	63,2
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	%		51,6	53,1	49,4	51,2	63	40,1	57,4	52,2	50,6
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	%		48,9	52	43,4	49,6	59,6	38,6	54,1	51,6	52,3
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	%		49,3	49,9	42,4	46,7	54,4	38,2	51,4	49,2	52,4
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	%		45,7	49,5	45,2	45,5	53,5	35,8	51,6	49,7	47,9
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	%		47,6	47,7	42,5	42,3	57	37,6	49,5	47,8	48,8
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	%		49,7	53,2	49,5	54	59,2	34,2	52,2	47,8	49,2
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	%		50,3	50,3	54	53	55,8	34,4	50,1	51,7	51,6
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	%		46,9	48,1	[N.D]	[N.D]	55	34	48	46,5	47,3
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de la LIN du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO+R affiche des valeurs qui semblent légèrement plus élevées que celles de son homologue non complémenté en rosiglitazone sur presque toute la durée d'étude.

Considérant l'absence d'échantillon pour le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R après T168H, les valeurs de LIN ne sont pas disponibles à T192H. Ils fournissent des résultats plus en marges que le JO et le JO+R entre T24H et T120H, bien que le CANI EX LT®+R semble donner des résultats proches de ceux du JO jusqu'à T96H. Ils augmentent fortement au-delà de T120H et présentent alors des valeurs similaires au JO et JO+R, mais ne contiennent plus beaucoup d'échantillons et surtout beaucoup moins que le JO et JO+R. Le CANI EX LT®

en contient 4 à T120H et le CANI EX LT®+R seulement 7, alors que le JO et le JO+R en ont respectivement 15 et 16. La linéarité du CANI EX LT® est par ailleurs presque systématiquement inférieure à celles qu'affiche le CANI EX LT®+R, sauf à T120H et à T168H.

Ainsi, les dilueurs JO et JO+R donnent des résultats plus élevés que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R.

Les milieux supplémentés en rosiglitazone semblent offrir des résultats plus élevés que leurs homologues non complémentés.

- **Analyse comparative descriptive de la LIN de tous les dilueurs :**

Pour la LIN, 4 groupes peuvent être distingués. Le CANI EX ST® est le plus élevé de T24H à T192H. Il se caractérise par une importante stabilité jusqu'à T24H contrairement aux autres milieux qui chutent tous fortement à T24H.

Le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® affichent des valeurs globalement proches et intermédiaires, mais moins élevées que le CANI EX ST®.

Le BOTUDOG® montre des résultats qui paraissent dans l'ensemble les plus élevés après le CANI EX ST®. Excepté ce dernier, sa LIN est la plus haute de T24H (57,4 %) à T48H (54,1 %) et de T96H (51,6 %) à T120H (49,5 %). À T72H, sa LIN (51,4 %) est seulement inférieure à celle du CANI EX ST® (54,4 %) et du CHILL ST® (52,4 %) tandis qu'à T192H (48 %), elle est uniquement plus faible que le JO+R (48,1 %) et CANI EX ST® (55 %), bien qu'il préserve 8 échantillons, et que les autres milieux en conservent moins, sauf le JO+R.

Le JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® donnent des résultats très similaires de T0H à T192H bien que le JO semble présenter des résultats légèrement plus faibles notamment entre T48H et T96H. À T72H, le CHILL ST® (52,4 %) apparaît uniquement inférieur au CANI EX ST® (54,4 %), pendant que le BOTUDOG® (51,4 %), le JO+R (49,9 %), le JO (49,3 %), et le CHILL LT® (49,2 %) donnent respectivement des résultats de moins en moins élevés. À T192H, leurs résultats sont très proches et sont compris entre 46,5 % et 48,1 %, soit des valeurs uniquement inférieures au CANI EX ST® (55 %).

Le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R, bien qu'affichant des LIN similaires aux autres milieux (sauf le MASTERBREEDER®) à T0H (respectivement 63,8 % et 64,2 %), fournissent

de T24H à T120H les plus faibles valeurs. Le CANI EX LT®+R apparaît cependant avec des résultats plus élevés à T72H (46,7 %) que le CANI EX LT® (42,4 %) et le MASTERBREEDER® (38,2 %). De plus, même si inférieur, le CANI EX LT®+R affiche des valeurs qui demeurent relativement proches de celles du JO jusqu'à T96H.

Le MASTERBREEDER® de son côté donne des valeurs nettement inférieures par rapport aux autres dilueurs à tous les temps de mesures.

Ainsi, le CANI EX ST® présente les valeurs LIN les plus élevées sur toute la durée étudiée, sauf à T0H.

Le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® montrent des résultats similaires dans l'ensemble et apparaissent avec des résultats inférieurs à ceux du CANI EX ST®, bien que le BOTUDOG® semble présenter des valeurs globalement plus importantes et le JO des LIN légèrement plus faibles.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R affichent des valeurs encore plus faibles, mais toujours supérieures à celles du MASTERBREEDER®, dont la LIN est très inférieure à tous les autres milieux et ce, à tous les temps de mesures.

- **Modélisation statistique de la LIN en fonction du milieu et du temps** :

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.05$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du milieu et l'effet du temps sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.0001$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse de deux à deux des moyennes des valeurs de LIN est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XXIV.

Tableau XXIV : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des pourcentages de linéarité (LIN) des différents milieux de T0H à T96H

<i>T0H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (<0,0001)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T24H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0006)	P < 0,05 (0.0002)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	P < 0,05 (0.0058)	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (0.0057)	P < 0,05 (0.0474)	NS	NS
CANI EX LT + R					P < 0,05 (0.0003)	P < 0,05 (0.0003)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P < 0,05 (<0,0001)	NS	P < 0,05 (0.0011)	P < 0,05 (0.0001)
MASTERBREEDER							P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (0.0009)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T48H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P < 0,05 (0.0011)	NS	NS	NS
JO+R			P < 0,05 (0.0124)	NS	NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P < 0,05 (<0,0001)	NS	P < 0,05 (0.0008)	P < 0,05 (0.0246)	P < 0,05 (0.0078)
CANI EX LT + R					NS	P < 0,05 (0.0012)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P < 0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (<0,0001)	P < 0,05 (<0,0001)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0469)	NS	NS	P <0,05 (0.0002)	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0208)	NS	NS	P <0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P <0,05 (0.0024)	NS	P <0,05 (0.0109)	NS	P <0,05 (0.0032)
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0,0001)	P <0,05 (0.0010)	P <0,05 (<0,0001)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0060)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P <0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0,0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0,0001)	P <0,05 (0.0006)	P <0,05 (0.0019)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

Le MASTERBREEDER® donne des résultats significativement inférieurs à tous les milieux de T0H à T24H. Il apparaît également significativement plus faible que tous les autres milieux excepté le CANI EX LT® à T48H, et significativement plus faible que tous les milieux sauf le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R de T72H à T96H.

Le CANI EX ST® est significativement plus élevé que tous les autres milieux à l'exception du BOTUDOG® à T24H et apparaît également significativement plus important que le CANI EX LT® de T48H à T72H.

Le CANI EX LT® montre des valeurs significativement plus faibles que le BOTUDOG® de T24H à T72H. Ses résultats sont aussi significativement inférieurs au JO+R et CHILL ST® de T48H à T72H. Il est enfin, significativement moins haut que le CHILL LT® à T48H et que le JO à T72H.

En résumé, le JO+R et le CANI EX LT®+R semblent supérieurs à leurs homologues non complétés en rosiglitazone sur presque toute la durée d'étude. Aucune différence significative n'est cependant mise en évidence entre le JO et JO+R d'une part, ni entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

Le CANI EX ST® donne les résultats les plus élevés dont les différences avec le MASTERBREEDER® sont significatives au moins jusqu'à T96H. Il montre également des résultats significativement supérieurs à tous les milieux sauf le BOTUDOG® à T24H et uniquement avec le CANI EX LT® de T48H et T72H.

Le MASTERBREEDER® donne des résultats très inférieurs aux autres dilueurs à tout instant de l'expérience, et affiche des différences significatives avec presque tous les milieux au moins jusqu'à T96H.

Il n'existe aucune différence significative entre le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST®. Ils présentent cependant certains résultats significativement inférieurs au CANI EX ST® et significativement supérieurs au MASTERBREEDER®. Ils semblent offrir des résultats plus élevés que le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R présentent quant à eux les résultats les plus faibles après le MASTERBREEDER® bien que seul le CANI EX LT® apparaisse significativement plus faible que le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® entre T24H à T72H. Ils sont de plus les seuls à ne plus être significativement supérieurs au MASTERBREEDER® à partir d'un certain temps. En effet, le CANI EX LT® ne lui est plus significativement supérieur à partir de T48H et le CANI EX LT®+R à partir de T72H. À noter que le nombre d'échantillons comparés n'est pas le même selon l'instant de mesure considéré.

i) La rectitude (STR)

La rectitude correspond au rapport de la VSL sur la VAP des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur de STR n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur STR. Les tableaux XXV et XXVI ainsi que la figure 59 résument les résultats obtenus.

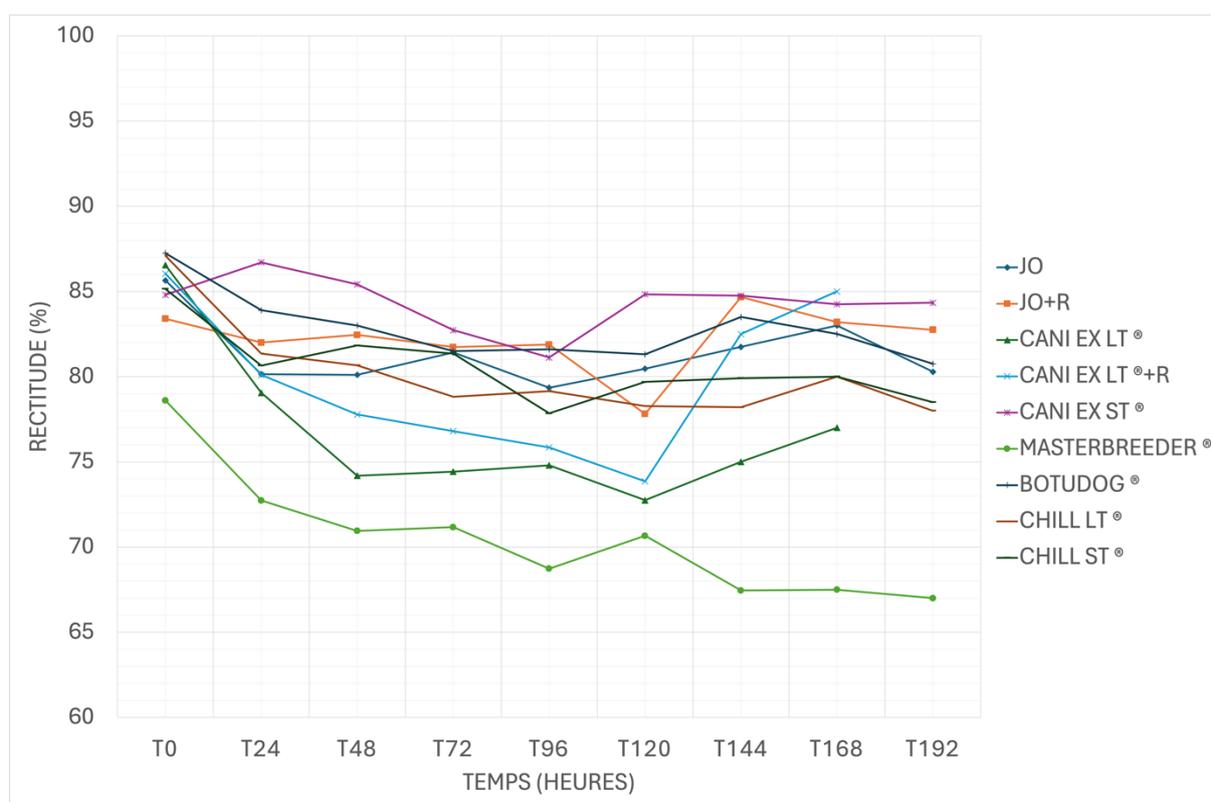


Figure 59 : Évolution moyenne de la rectitude (STR) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XXV : Pourcentages moyens de rectitude (STR) mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	% STR et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO +R	CANI EX LT	CANI EX LT+ R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	%	81,7	85,7	83,4	86,6	86,1	84,8	78,6	87,3	87,1	85,2
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	%	80,2	82	79,1	80,1	86,7	72,7	83,9	81,4	80,7	
	N =	20	20	20	20	17	19	19	20	20	
T48H	%	80,1	82,5	74,2	77,8	85,4	70,9	83	80,7	81,8	
	N =	19	20	16	18	12	19	16	18	17	
T72H	%	81,4	81,7	74,4	76,8	82,7	71,2	81,5	78,8	81,4	
	N =	19	19	14	15	11	18	16	16	14	
T96H	%	79,4	81,9	74,8	75,9	81,1	68,7	81,6	79,2	77,9	
	N =	17	17	5	13	8	15	15	13	13	
T120H	%	80,5	77,8	72,8	73,9	84,8	70,7	81,3	78,3	79,7	
	N =	15	16	4	7	6	15	13	11	13	
T144H	%	81,8	84,7	75	82,5	84,8	67,5	83,5	78,2	79,9	
	N =	12	12	4	2	4	11	10	10	11	
T168H	%	83	83,2	77	86	84,3	67,5	82,5	80	80	
	N =	10	10	1	1	4	8	8	6	7	
T192H	%	80,3	82,8	[N.D]	[N.D]	84,3	67	80,8	78	78,5	
	N =	7	8	0	0	3	7	8	4	6	

- **Analyse comparative descriptive de la STR du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Le JO+R semble supérieur au JO de T24H à T96H et de T144H à T192H, mais présente un décrochage à T120H (77,8 %).

Considérant l'absence d'échantillon pour le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R après T168H, les valeurs de STR ne sont pas disponibles à T192H. Ils présentent des résultats presque systématiquement plus faibles que le JO et le JO+R. À noter que le CANI EX LT®+R paraît offrir une rectitude plus haute que le CANI EX LT®, excepté à T0H. De plus, le CANI EX LT® chute de façon très franche jusqu'à T48H (74,2 %) alors que le CANI EX LT®+R décroît plus modérément jusqu'à T120H (73,9 %).

Ainsi, les milieux complémentés en rosiglitazone offrent presque systématiquement des résultats supérieurs à leur homologue non complémenté.

Ils donnent des résultats qui paraissent supérieurs au CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

- **Analyse comparative descriptive de la STR de tous les dilueurs :**

Pour la rectitude, 3 groupes semblent se distinguer. Le CANI EX ST® offre les résultats les plus élevés sur presque toute la durée de l'étude, bien qu'inférieurs à certains milieux à T0H, T96H et T168H. Il montre une supériorité face à tous les autres milieux de T24H (86,7 %) à T72H (82,7 %), de T120H (84,8 %) à T144H (84,8 %) et enfin à T192H (84,3 %), bien que son nombre d'échantillons ne soit plus que de 3 éjaculats.

Viennent ensuite le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® qui montrent des résultats proches légèrement inférieurs au CANI EX ST®. Le BOTUDOG® affiche globalement des résultats faisant partie des plus élevés sur toute la durée d'étude. Il semble être le plus élevé à T0H (87,3 %). Excepté le CANI EX ST®, il reste supérieur aux autres milieux jusqu'à T48H (83 %) ainsi qu'à T120H (81,3 %). À T72H, sa STR (81,5 %) est uniquement inférieur au JO+R (81,7 %) et au CANI EX ST® (82,7 %). À T192H (80,8 %), il est seulement inférieur au CANI EX ST® (84,3 %) et JO+R (82,8 %), mais le nombre d'échantillons demeure faible et différent entre les milieux (8 éjaculats pour le BOTUDOG® à T192H).

Le JO+R affiche la STR initiale la plus faible (83,4 %) après le MASTERBREEDER® (78,6 %), bien qu'il apparaisse ensuite avec une rectitude similaire au JO, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® sur toute la durée d'étude, sauf à T120H où un décrochage est observé (77,8 %) mais qui remonte ensuite jusqu'à T192H (82,8 %) valeur uniquement inférieure au CANI EX ST® (84,3 %). À T72H (81,7 %) il est uniquement inférieur au CANI EX ST® (82,7 %). Il présente de plus la valeur la plus élevée à T96H (81,9 %). Il est important de rappeler que le JO+R perd des échantillons et qu'il n'en dispose plus que de 8 en fin d'expérience.

Le CHILL LT® et le CHILL ST® donnent des résultats proches dans l'ensemble, légèrement moins élevés que le JO, JO+R, CANI EX ST® et BOTUDOG®. À T72H, le CHILL LT® (78,8 %) montre une valeur seulement supérieure au CANI EX LT® (74,4 %), CANI EX LT®+R (76,8 %) et MASTERBREEDER® (71,2 %) tandis que le CHILL ST® apparaît

légèrement plus élevé (81,4 %). À T192H, ils sont tous deux très proches et seulement supérieurs au MASTERBREEDER® (67 %), le CHILL ST® (78,5 %) affichant une valeur très légèrement supérieure au CHILL LT® (78 %).

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R présentent des résultats inférieurs aux milieux précédents de T24H à T120H, mais qui demeurent supérieurs au MASTERBREEDER® tout au long de l'expérience. Le CANI EX LT® chute rapidement jusqu'à T48H (74,2 %) pendant que le CANI EX LT®+R décroît plus modérément jusqu'à T120H (73,9 %). Quoiqu'il en soit, ils présentent tous deux des résultats inférieurs au JO, JO+R, CANI EX ST®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® de T24H à T120H, mais augmentent fortement au-delà. En effet, le CANI EX LT® (77 %) croît jusqu'à T168H, mais reste inférieur à tous les autres milieux excepté le MASTERBREEDER® (67,5 %), tandis que le CANI EX LT®+R augmente beaucoup plus et présente le résultat le plus élevé à T168H (86 %). Ces faits sont à nuancer avec le nombre d'échantillons qui décroît au cours du temps (4 pour le CANI EX LT® et 7 pour le CANI EX LT®+R contre 15 et 16 pour le JO et JO+R).

Enfin, le MASTERBREEDER® présente des résultats très inférieurs à tous les autres dilueurs à chaque instant de mesure, bien que le nombre d'échantillons conservé soit différent des autres dilueurs (7).

Ainsi, le CANI EX ST® semble montrer les résultats les plus élevés.

Le JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® affichent des résultats qui paraissent globalement proches et supérieurs au CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et MASTERBREEDER®. Ces trois derniers dilueurs semblent plus en marges que les milieux précédents, le MASTERBREEDER® donnant les pourcentages de rectitude qui sont de loin les plus faibles.

- **Modélisation statistique de la STR en fonction du milieu et du temps :**

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu est significatif ($p < 0.001$), ce qui signifie que la différence de mobilité entre T0H et T96H n'est pas équivalente dans les différents milieux. L'effet du milieu et l'effet du temps sont aussi significatifs (respectivement $p < 0.0001$ et $p < 0.0001$).

Étant donné l'interaction entre les facteurs « Milieu » et « Temps », l'analyse deux à deux des moyennes des valeurs de STR est nécessaire. Les résultats sont résumés dans les tableaux XXVI.

Tableau XXVI : Résultats des tests statistiques de corrélations linéaires entre les moyennes des pourcentages de rectitude (STR) des différents milieux de T0H à T96H

T0H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (0.0016)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	P <0,05 (0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (0.0004)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (0.0083)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0040)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T24H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	P <0,05 (0.0091)	P <0,05 (0.0011)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P <0,05 (0.0010)	P <0,05 (0.0100)	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					P <0,05 (0.0110)	P <0,05 (0.0008)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	P <0,05 (0.0279)
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0002)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

T48H	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0292)	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0003)	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0143)	P <0,05 (0.0010)
CANI EX LT + R					P <0,05 (0.0209)	P <0,05 (0.0058)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (<0.0001)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T72H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	P <0,05 (0.0027)	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
JO+R			P <0,05 (0.0014)	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	P <0,05 (0.0035)	NS	P <0,05 (0.0053)	NS	P <0,05 (0.0067)
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (0.0430)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0009)	P <0,05 (<0.0001)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

<i>T96H</i>	JO	JO+R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
JO		NS	NS	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
JO+R			NS	NS	NS	P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
CANI EX LT				NS	NS	NS	NS	NS	NS
CANI EX LT + R					NS	P <0,05 (0.0209)	NS	NS	NS
CANI EX ST						P <0,05 (<0.0001)	NS	NS	NS
MASTERBREEDER							P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (<0.0001)	P <0,05 (0.0003)
BOTUDOG								NS	NS
CHILL LT									NS
CHILL ST									

Le MASTERBREEDER® est significativement inférieur à tous les autres milieux à T24H, mais également à tous les autres temps de mesures excepté le JO+R à T0H et de T48H à T96H à l'exception du CANI EX LT®.

Le CANI EX ST® présente à T24H des résultats significativement supérieurs au JO, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R et CHILL ST®, pendant qu'à T48H, il montre aussi des différences significatives avec le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R.

Enfin, de T48H à T72H, le CANI EX LT® est significativement moins haut que tous les milieux sauf par rapport au CANI EX LT®+R et MASTERBREEDER® à T48H et vis-à-vis du CANI EX LT®+R, MASTERBREEDER® et CHILL LT® à T72H.

En résumé, les milieux complétés en rosiglitazone semblent offrir des résultats plus élevés que leur homologue qui n'en contiennent pas. Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le JO et le JO+R d'une part, et entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

Le CANI EX ST® donne les valeurs de STR les plus élevées qui sont significativement supérieures au MASTERBREEDER® de T0H à T96H. Elles apparaissent également avec une supériorité significative par rapport au JO, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et CHILL ST®.

Les milieux JO, JO+R, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® semblent légèrement plus faibles. Certains d'entre eux présentent d'ailleurs des résultats significativement plus faibles que le CANI EX ST® jusqu'à T96H. Il n'existe en outre aucune différence significative entre ces cinq milieux.

Le CANI EX LT® et CANI EX LT®+R offrent des valeurs moins importantes, mais toujours supérieures au MASTERBREEDER®. Ce dernier affiche les résultats les plus faibles, presque toujours significativement inférieur à la totalité des dilueurs jusqu'à T96H. Cela étant, le CANI EX LT® ne montre plus aucune différence significative avec le MASTERBREEDER® à partir de T48H. Le CANI EX LT® présente de surcroît des différences significatives avec le JO, JO+R, CANI EX ST®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST® entre T48H et T72H, à l'inverse du CANI EX LT®+R qui en affiche uniquement avec le CANI EX ST® à T48H.

j) L'Élongation

L'ÉLONGATION évalue les dimensions de la tête des spermatozoïdes des 20 échantillons en fonction des jours dans chacun des milieux. Comme précédemment, aucune valeur d'ÉLONGATION n'a été relevée en dessous de 30 % de mobilité totale. Ainsi donc, le nombre d'échantillons pour un milieu donné décroît au cours du temps en fonction de sa capacité à maintenir une mobilité supérieure à 30 %.

Il est ainsi question de comparer les milieux selon leur ÉLONGATION. Les tableaux XXVII et XXVIII ainsi que la figure 60 résument les résultats obtenus.

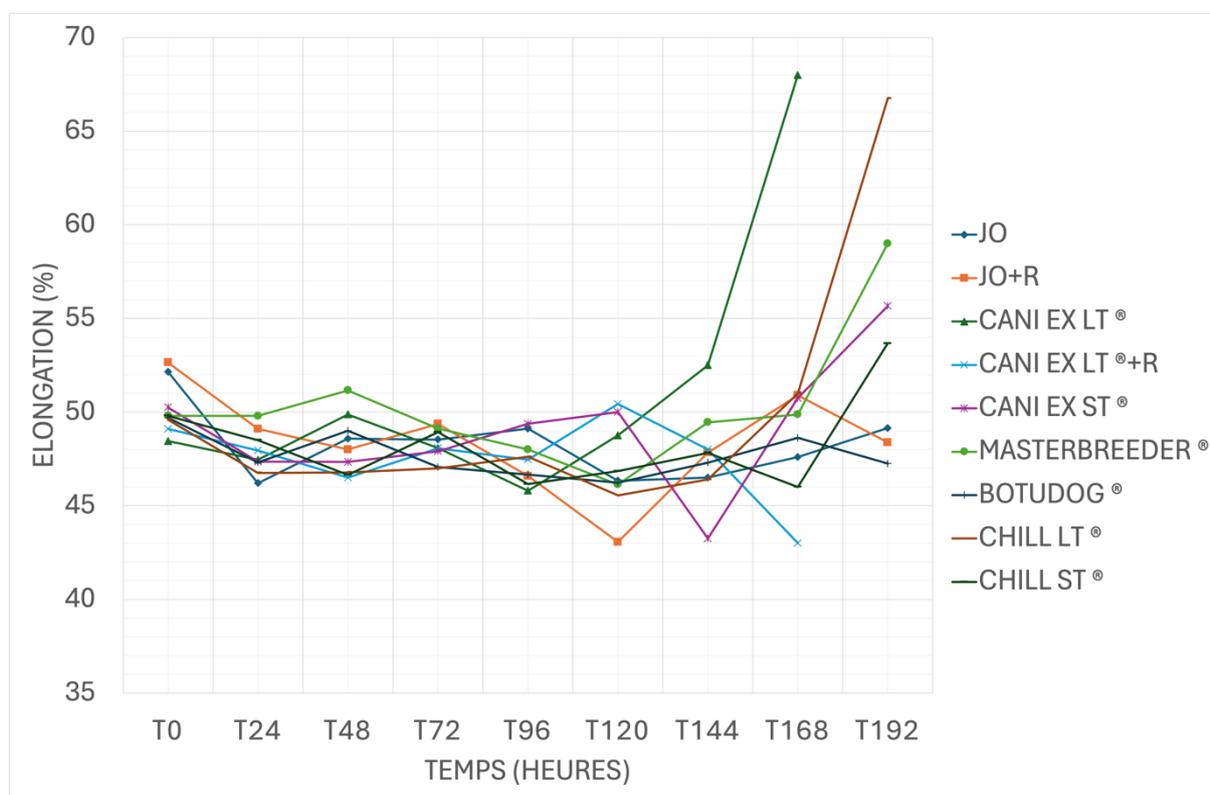


Figure 60 : Évolution moyenne de l'élongation (ÉLONGATION) pour chaque milieu en fonction du temps

Tableau XXVII : Pourcentages moyens d'élongation mesurés pour chaque milieu toutes les 24 heures jusqu'à 192 heures

TEMPS	% Élongation et NB > 30% (N)	SEMENCES FRAÎCHES À T0H	MILIEUX								
			JO	JO + R	CANI EX LT	CANI EX LT + R	CANI EX ST	MASTERBREEDER	BOTUDOG	CHILL LT	CHILL ST
T0H	%	50,75	52,2	52,65	48,5	49,1	50,3	49,8	49,7	49,6	49,8
	N =	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T24H	%		46,2	49,1	47,5	47,9	47,4	49,8	47,3	46,8	48,5
	N =		20	20	20	20	17	19	19	20	20
T48H	%		48,6	48	49,9	46,5	47,3	51,2	49	46,8	46,6
	N =		19	20	16	18	12	19	16	18	17
T72H	%		48,5	49,4	48,1	48,1	47,9	49,1	47,1	47	48,9
	N =		19	19	14	15	11	18	16	16	14
T96H	%		49,1	46,6	45,8	47,5	49,4	48	46,7	47,6	46,2
	N =		17	17	5	13	8	15	15	13	13
T120H	%		46,3	43,0	48,8	50,1	50	46,1	46,2	45,5	46,8
	N =		15	16	4	7	6	15	13	11	13
T144H	%		46,5	47,8	52,5	48	43,3	49,5	47,3	46,4	47,8
	N =		12	12	4	2	4	11	10	10	11
T168H	%		47,6	50,9	68	43	50,8	49,9	48,6	51	46
	N =		10	10	1	1	4	8	8	6	7
T192H	%		49,1	48,4	[N.D]	[N.D]	55,7	59	47,3	66,8	53,7
	N =		7	8	0	0	3	7	8	4	6

- **Analyse comparative descriptive de l'ÉLONGATION du JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R :**

Ces quatre milieux semblent globalement similaires jusqu'à T96H, mais fluctuent davantage au-delà. Le JO demeure stable tout au long de l'étude, alors que le JO+R chute à T120H et affiche une valeur plus faible de 43 % contre 46,3 % pour le JO. À T168H, ils présentent des résultats proches, mais voient également le nombre d'échantillons qu'ils conservent diminuer au cours du temps.

Le CANI EX LT®+R au-delà de T120H affiche des résultats qui évoluent dans le sens inverse du CANI EX LT®. Il chute à 43 % à T168H pendant que le CANI EX LT® croît très

fortement jusqu'à 68 %, bien que le nombre d'échantillons qu'ils maintiennent décroît très fortement au cours du temps.

Ainsi, aucune différence ne semble se manifester entre le JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R jusqu'à T96H, bien qu'ils semblent plus fluctuants au-delà.

- **Analyse comparative descriptive de l'ÉLONGATION de tous les dilueurs :**

De T0H à T144H, presque tous les milieux semblent similaires. En revanche, une forte augmentation de l'élongation est mise en évidence à partir de T120H jusqu'à T168H pour le CANI EX LT® dépassant largement tous les autres (68 %). Il conserve cependant de moins en moins d'échantillons au cours du temps et n'en préserve plus qu'un seul à T168H.

Le CANI EX ST®, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® augmentent aussi à T192H, le CHILL LT® affichant de loin la plus haute valeur à ce moment-là par rapport aux autres (66,8 %). Cependant, le nombre d'échantillons baisse également pour chacun de ces dilueurs.

Tous les milieux semblent globalement donner des résultats similaires jusqu'à T144H. Le JO, JO+R et le BOTUDOG® apparaissent équivalents au-delà pendant que le CANI EX LT® croît et que le CANI EX LT®+R décroît considérablement à T168H. Le CANI EX ST®, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST® augmentent drastiquement à T192H, le nombre d'éjaculats comparés demeurant cependant différent au cours du temps.

- **Modélisation statistique de l'ÉLONGATION en fonction du milieu et du temps :**

Afin de définir si ces observations sont significatives, une modélisation statistique est requise. Considérant le test ANOVA, il apparaît que l'effet croisé entre le temps et le milieu n'est pas significatif ($p = 0,3391$), ce qui signifie que la différence d'élongation entre T0H et T96H est équivalente dans les différents milieux. L'effet du milieu est lui aussi non significatif ($P = 0,0685$), tandis que l'effet du temps apparaît pour sa part significatif ($P < 0.0001$).

L'interaction entre les deux facteurs étant non significative, l'étude indépendante de l'effet principal du paramètre « Temps » est requis. Les résultats sont résumés dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Évolution de l'élongation au cours du temps jusqu'à T96H. Les termes de la diagonale correspondent à la moyenne des valeurs d'élongation (moyenne calculée sur tous les milieux). Les termes en dessous de la diagonale correspondent à la différence des moyennes entre les deux temps de mesure et les termes au-dessus de la diagonale sont les p-valeurs du test de Tukey correspondant à la différence de moyenne)

MOBILITÉ	T0H	T24H	T48H	T72H	T96H
T0H	[50.0]	0.0371	0.2116	0.2132	0.0590
T24H	2.5715	[47.5]	0.9470	0.9588	1.0000
T48H	1.9163	- 0.6552	[48.1]	1.0000	0.9542
T72H	1.9494	- 0.6221	0.0331	[48.1]	0.9637
T96H	2.5951	0.0237	0.6788	0.6457	[47.4]

D'après les résultats d'analyse statistique, le paramètre d'élongation évolue de façon significativement différente entre T0H et T24H pour l'intégralité des milieux.

En résumé, aucune différence significative n'a été trouvée entre le JO et le JO+R d'une part, ni entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R d'autre part.

L'élongation est statistiquement équivalente entre les dilueurs au moins jusqu'à T96H. Cependant, leur évolution est significativement différente pour l'intégralité des milieux de T0H à T24H. Bien que le CANI EX LT® augmente considérablement à T168H et que le CANI EX ST®, le MASTERBREEDER®, le CHILL LT® et le CHILL ST® croissent de façon importante à T192H, le nombre d'échantillons qu'ils conservent diminue et n'est pas équivalent au cours du temps.

4) DISCUSSION

a) Discussion générale

Le but de cette étude était de comparer les paramètres de mobilité de neuf milieux pendant 8 jours de réfrigération à + 4°C. Les paramètres étudiés étaient la mobilité totale, la mobilité progressive, la VAP, la VSL, la VCL, l'ALH, la BCF, la LIN, la STR et l'ÉLONGATION.

i) Protocole

(1) Animaux

Un total de 13 chiens mâles de 18 mois à 7 ans ont été prélevés pour cette étude de façon à limiter l'effet de l'âge sur les résultats puisqu'il est bien établi que l'âge des animaux influence la qualité de la semence canine (Johnston *et al.*, 2001). L'âge maximal d'inclusion a été fixé à 7 ans en raison de l'augmentation des anomalies morphologiques rapportée à partir de 8 ans (Mickelsen *et al.*, 1993). Quoiqu'il en soit, la mobilité totale de tous les échantillons allait de 80 % à 95 %, témoignant de la qualité notable de l'ensemble des éjaculats récoltés.

Certains d'entre eux sont prélevés à plusieurs reprises de manière à obtenir une cohorte de 20 échantillons. Lorsque le sperme d'un individu a été récolté plusieurs fois, les récoltes ont été espacées de 48 heures de façon à ne pas altérer la qualité de la semence. Le prélèvement répété de semence sur un individu unique peut cependant introduire un biais en cas d'altération de son sperme (Noakes *et al.*, 2019 ; Feldman et Nelson, 2004 ; England, 1999). C'est par exemple le cas du seul individu de race Rottweiler qui a donné sa semence à 3 reprises. Ainsi, en cas d'altération initiale de sa semence, son inclusion à l'étude aurait pu conduire à des modifications indésirables de tous les paramètres étudiés potentialisant les risques d'erreurs.

Il est bien établi que la race influence considérablement la qualité d'un éjaculat (Johnston *et al.*, 2001). Or, une hétérogénéité du nombre d'individus par race existe dans cette étude. En effet, les races Rottweiler et Terre-Neuve ne sont représentées que par un unique individu tandis que celle des American Staffordshire Terrier comprend au total 5 échantillons provenant de 3 individus différents. Toutefois, l'incorporation de ces échantillons dans les milieux a concerné l'intégralité des dilueurs à tester, ce qui ne posait en définitive aucun problème.

(2) Dilution et réfrigération

Dans cette étude, la concentration finale après dilution a été définie à $100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL. Diverses études concluent de façon divergente et équivoque sur les rapports de dilution à appliquer, chacune étant dépendante des facteurs expérimentaux propres. En général, les taux de dilution de l'ordre de $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL. Des taux de dilution trop importants sont cependant connus pour réduire la survie des spermatozoïdes or, dans le cas présent, la dilution appliquée demeure raisonnable car elle a toujours consisté en une part de semence contre une à cinq parts de dilueur (Sugai *et al.*, 2023 ; Noakes *et al.*, 2019 ; Bencharif *et al.*, 2013 ; Peña *et al.*, 2006 ; Johnston *et al.*, 2001).

L'étude nécessite le prélèvement d'une certaine quantité d'échantillon toutes les 24 heures afin de la soumettre à l'analyse CASA, ce qui peut mener à la mise en contact de la semence avec une température inadéquate susceptible de fausser les résultats. Une attention bien particulière a néanmoins été portée sur ce point, les manipulations ayant toutes été effectuées dans de la vitrine réfrigérante.

La vitesse de dilution est l'un des paramètres les plus importants à considérer. Elle doit être lente et réalisée au goutte-à-goutte afin de limiter l'incidence du changement d'environnement se manifestant principalement par un choc osmotique. Ainsi, la méthode n'étant pas standardisée, il est possible que plusieurs échantillons aient été dilués trop rapidement, compromettant la qualité du milieu concerné et faussant ses résultats (Fontbonne, 2022).

(3) Déroulement de l'analyse et procédure CASA

Les milieux ont été évalués par système CASA toutes les 24 heures pendant 8 jours. L'appareil Hamilton-Thorne IVOS II est validé pour l'évaluation de la mobilité chez le chien ce qui en fait un outil fort adapté pour cette étude (Rijsselaere *et al.*, 2003). Cependant, bien qu'il soit exempt de subjectivité grâce à son automatisation, des erreurs humaines en amont (erreurs de prélèvements, mauvaises manipulations, contamination d'échantillons, erreurs dans la préparation des milieux, erreurs de dilution lors de l'analyse...) ont pu être commises faussant ainsi possiblement tous les résultats.

Toutes les mesures ont néanmoins été prises de façon à limiter les biais et les inexactitudes. C'est la raison pour laquelle un échantillon dont la mobilité totale est trouvée inférieure à 30 % a systématiquement été retesté 24 heures plus tard. Ceci a permis de détecter

de potentielles anomalies et de s'assurer de l'exactitude des résultats, notamment pour la mobilité totale, paramètre qui conditionnait la poursuite des analyses pour l'échantillon en question. Dans certains cas, des valeurs à nouveau supérieures à 30 % ont été obtenues le lendemain, démontrant que la valeur de la veille était erronée. Cette valeur a alors été éliminée et remplacée par celle du surlendemain. Ceci a offert de réduire les biais en un sens, mais a aussi introduit une imprécision de l'autre, concourant de ce fait à une perte de puissance statistique. Ces manifestations n'ont toutefois concerné qu'une infime partie des échantillons.

En revanche, le fait d'exclure les milieux dont la mobilité devient inférieure à 30 % rehausse inévitablement les moyennes en raison de la préservation des valeurs les plus élevées. C'est ce qui explique en partie que des variations très nettes sont observées, surtout au-delà de T72H. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le nombre d'échantillons exclus est important. Le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R et le CANI EX ST® sont ainsi, les dilueurs pour lesquels l'exclusion des échantillons est la plus importante. Le CANI EX LT®+R passe de ce fait de 13 éjaculats à T96H à 7 à T120H. Cette manifestation demeure non isolée et se répète pour tous les paramètres au cours de l'étude et pour les différents milieux. De surcroît, l'exclusion des échantillons au cours du temps conduit à la constitution de groupes hétérogènes contraignant à nouveau l'analyse des résultats. C'est la raison pour laquelle elle a été fréquemment nuancée avec le nombre d'échantillons préservés et comparés.

Dès lors, il légitime de s'interroger sur le degré de représentativité de certains résultats. Si les échantillons n'avaient pas été exclus et si les effectifs avaient été homogènes, les dilueurs auraient pu être plus aisément comparés entre eux et l'analyse aurait pu gagner en puissance statistique. Ainsi, des différences significatives auraient possiblement pu être détectées. C'est aussi une des raisons pour lesquelles l'analyse statistique n'a pu être faite au-delà de T96H empêchant de comparer statistiquement les données des quatre derniers jours, les effectifs étant trop faibles au-delà. Cela étant, cette manière de procéder a permis de mettre en lumière la supériorité de certains dilueurs, et notamment ceux complétés en rosiglitazone pour préserver la mobilité des spermatozoïdes canins supérieure à 30 %.

Toutefois, ce ne sont pas toujours uniquement les moyennes qui varient et qui sont rehaussées par l'exclusion des milieux au cours du temps, mais ce sont aussi parfois les échantillons qui augmentent d'un moment à l'autre. Ainsi, si les valeurs sont analysées et suivies individuellement, il se trouve que des accroissements sporadiques se manifestent pour certains échantillons dont la valeur de la veille était en réalité plus faible. Par exemple, la LIN de l'éjaculat 7 (chien « Stan ») dans le CANI EX LT®+R passe de 29 % à T120H à 55 % à

T144H. Cette augmentation soudaine de la linéarité pourrait éventuellement s'expliquer par la composition du milieu qui favoriserait l'amélioration des paramètres de mobilité. Néanmoins, il est aussi probable que des erreurs de mesure imputables au manipulateur (contamination, erreur de dilution...) ou bien à l'appareil, soient à l'origine de ce type d'observations. En effet, étant donné qu'il reste de moins en moins d'échantillons au cours du temps, la moindre inexactitude pourrait immédiatement se répercuter sur la moyenne et conduire à une augmentation soudaine 24 heures plus tard.

Dans la présente étude, la concentration finale des spermatozoïdes dans chaque milieu de réfrigération était de $100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL. Cependant, Rijsselaere *et al.*, en 2003, ont montré que les spermatozoïdes doivent être dilués à hauteur de $50 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL pour être correctement analysés par le système informatisé. Ainsi, en l'état, la concentration en spermatozoïdes dans chaque dilueur apparaissait inadaptée et susceptible de conduire à des imprécisions de lecture (collisions de spermatozoïdes, superposition). La préparation pour l'analyse CASA prévoyait donc une dilution du milieu d'origine au quart soit une concentration de $25 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL au lieu de $100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL, ce qui correspond à une dilution au demi par rapport à celle recommandée par Rijsselaere *et al.*, en 2003. Étant plus importante, la précision de la mesure s'en trouvait donc améliorée (Van der Horst, 2020 ; Rijsselaere *et al.*, 2012 ; Rijsselaere *et al.*, 2003 ; Verstegen *et al.*, 2002).

La dilution à $25 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL pour l'analyse CASA a donc été réalisée avec le milieu pur respectif. Des études ont cependant montré que le choix du diluant employé lors de l'analyse dans l'appareil CASA pouvait influencer les résultats obtenus et qu'il s'avérait plus judicieux d'utiliser une solution saline ou du PBS. Il est donc pertinent de penser que le recours à un unique diluant aurait pu être plus adapté pour accroître la justesse des résultats. À l'inverse, la dilution à l'aide du milieu pur respectif peut aussi être considérée comme avantageuse puisqu'elle offre la possibilité de s'affranchir du risque d'interférence et de variation lié à une modification subite d'environnement spermatique évitant ainsi l'obtention de résultats erronés. Toutefois, l'analyse ayant été effectuée immédiatement après la dilution, ce fait permet de considérer l'influence du dilueur comme négligeable (Rijsselaere *et al.*, 2003)

En raison de la composition inconnue de certains milieux de réfrigération, l'interprétation des résultats avec prudence est de rigueur, eu égard aux interférences avec l'appareil de mesure CASA que leurs composants sont en mesure de provoquer. C'est par exemple le cas du jaune d'œuf dont les granules peuvent créer des artefacts en regard des données acquises par l'IVOS II (Neves *et al.*, 2014 ; Bencharif *et al.*, 2012).

b) Les paramètres de mobilité

i) La mobilité totale

Premièrement, il est important de commenter les résultats obtenus vis-à-vis de l'analyse statistique de Tukey sur le facteur temps. Il est apparu que la mobilité totale décroît significativement et de manière identique dans tous les milieux entre tous les temps de mesures jusqu'à T72H. Ce fait est important à noter car il met en exergue que la mobilité totale diminue de façon non négligeable sur les trois premiers jours, période la plus importante à considérer car il s'agit du délai requis pour expédier et acheminer une semence réfrigérée destinée à être déposée dans le vagin ou l'utérus d'une femelle en œstrus. Ces observations se manifestent cependant sur l'intégralité des milieux, dont la décroissance de mobilité est de surcroît statistiquement identique entre eux à tous les temps de mesure. Il est donc nécessaire de définir quels milieux préservent globalement le mieux la mobilité totale des spermatozoïdes réfrigérés.

Globalement, il existe deux groupes de milieux pour maintenir la mobilité totale supérieure à 30 %. Il y a ceux qui voient leur nombre d'échantillons chuter progressivement et de façon globalement similaire, à savoir le JO, JO+R, MASTERBREEDER®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST®, et ceux qui chutent beaucoup plus drastiquement et qui présentent dans l'ensemble des résultats plus en marges comme le CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R et le CANI EX ST®.

D'après les résultats, le JO+R et le BOTUDOG® sont les deux meilleurs milieux pour conserver la mobilité supérieure à 30 % après huit jours de réfrigération à + 4°C. Le JO+R est le seul milieu qui conserve l'intégralité des échantillons pendant les deux premiers jours. Considérant qu'il s'agit du même délai pour expédier et acheminer la semence réfrigérée, ce milieu apparaît en ce sens très approprié pour favoriser le succès reproducteur.

Concernant le BOTUDOG®, il n'est cependant pas le plus performant lorsque toute la durée d'étude est prise en compte. En effet, ce sont plutôt le JO, le JO+R et le MASTERBREEDER® qui montrent les meilleurs résultats sur la majeure partie de l'étude (jusqu'au septième jour), bien que ce dernier affiche une efficacité moindre le premier jour. Plus spécifiquement, le BOTUDOG® présente des résultats plus en marges le premier jour (comme le MASTERBREEDER® cependant), le deuxième jour et reste plus intermédiaire le troisième jour ainsi qu'entre le cinquième et le sixième jour. La composition des milieux prend sans nul doute une part importante dans les différences observées par rapport à l'infériorité du BOTUDOG® en regard des 3 précédents milieux.

Cependant, d'autres milieux affichent des résultats bien plus en marges vis-à-vis du nombre d'échantillons maintenus avec une mobilité supérieure à 30 %. En effet, le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R sont les moins performants une fois les huit jours de réfrigération écoulés, étant donné qu'ils sont les seuls à avoir des valeurs de mobilité qui deviennent inférieures à 30 % au huitième jour pour l'intégralité de leurs échantillons. Néanmoins, entre le deuxième et le cinquième jour, ce sont en réalité le CANI EX LT® et le CANI EX ST® qui conservent le moins d'éjaculats, le CANI EX ST® étant le seul à donner des résultats beaucoup plus faibles que les autres sur les trois premiers jours. Le CANI EX LT®+R quant à lui, vient s'ajouter à ce tableau plus tardivement, soit à partir du cinquième voire sixième jour.

En regard des pourcentages de mobilité totale, le CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® semblent afficher des valeurs de mobilité qui ont tendance à être plus faibles que les autres milieux, résultats qui viennent corroborer leur infériorité pour maintenir la mobilité au-dessus de 30 %.

L'analyse ANOVA suivie du test de Tukey a permis de souligner que le CANI EX ST® et le BOTUDOG® présentent le plus de différences significatives notamment avec le JO, JO+R, CANI EX LT®+R, MASTERBREEDER®, CHILL LT® et CHILL ST®. Le CANI EX ST® apparaît comme le dilueur montrant le plus de différences significatives avec les autres milieux. Cependant, l'absence de différence significative entre le BOTUDOG® et le CANI EX ST® vient confirmer que ces deux milieux sont, en définitive, bien similaires vis-à-vis des résultats de mobilité totale, bien que le BOTUDOG® paraisse légèrement plus performant. Aussi, le CANI EX ST® et le BOTUDOG® semblent beaucoup plus en marges et ce, dès le début de l'étude, alors que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R présentent des résultats corrects au moins jusqu'au deuxième jour. Ces deux derniers milieux ne montrent d'ailleurs que peu de différences significatives avec les autres dilueurs, à la différence du CANI EX ST® et du BOTUDOG®, bien que l'analyse statistique ne se soit portée que jusqu'au quatrième jour.

L'analyse des données révèle ainsi que le JO+R se distingue par des performances de mobilité totale supérieures tout au long de l'expérience. Il maintient non seulement un nombre élevé d'échantillons avec une mobilité dépassant 30 %, mais préserve également des pourcentages de mobilité totale élevés. En comparaison, bien que le BOTUDOG® conserve aussi un nombre important d'échantillons avec une mobilité supérieure à 30 % au huitième jour, ses pourcentages de mobilité sont nettement inférieurs et significativement plus faibles que ceux du JO+R au moins jusqu'au quatrième jour de l'étude.

Comme évoqué précédemment, le CANI EX LT® supplémenté en rosiglitazone est plus performant que celui qui ne l'est pas d'une part pour préserver la mobilité supérieure à 30 %, notamment sur les trois à quatre premiers jours, mais également au regard des pourcentages de mobilité totale. En effet, le CANI EX LT®+R semble donner des résultats plus élevés que le CANI EX LT®. De plus, ce dernier baisse très fortement entre le deuxième et le troisième jour alors que le CANI EX LT®+R décroît plus tardivement, se maintient au moins pendant les quatre premiers jours et reste supérieur au CANI EX LT® jusqu'au cinquième jour. D'un point de vue statistique, il est apparu que le CANI EX LT®+R affiche des résultats significativement supérieurs au BOTUDOG® (qui lui fait partie des dilueurs les moins performants pour maintenir la mobilité totale), alors que son homologue non supplémenté en rosiglitazone ne présente aucune différence significative avec le BOTUDOG®. Ceci renseigne sur la similarité entre le CANI EX LT® et le BOTUDOG®, mais indique également indirectement que le CANI EX LT®+R donne des résultats supérieurs au CANI EX LT®. De cette observation, découle le fait que, bien qu'il n'existe aucune différence significative entre le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R, ce dernier apparaît dans l'ensemble plus performant pour maintenir la mobilité totale que le CANI EX LT®.

De façon analogue, le JO+R qui présente une mobilité totale plus importante que celle du JO, permet aussi de conserver plus d'échantillons que le JO avec une mobilité dépassant 30 % et ce, malgré l'absence de différence significative entre eux. Cependant, à la différence du JO, le JO+R montre des résultats qui ont tendance à apparaître plus élevés que tous les autres milieux et présente le plus de différences significatives avec les milieux les moins performants. De plus, il est significativement supérieur au CANI EX LT®, alors que ce n'est pas le cas du JO, ce qui soutient l'idée d'une supériorité manifeste du JO+R par rapport au JO. Ces observations peuvent également s'expliquer par des différences de composition et notamment par la présence de la rosiglitazone dont l'utilisation a montré un bénéfice notable sur la mobilité des spermatozoïdes dans d'autres espèces que chez le chien.

Chez le ver rat et l'étalon, elle favorise la pénétration du glucose dans les spermatozoïdes et assure une modulation métabolique qui accroît l'activité glycolytique au profit d'une production accrue de glucose. De façon complémentaire, elle tient un rôle protecteur à l'égard des mitochondries des spermatozoïdes de bélier et augmente l'activité mitochondriale et la production d'ATP lorsque leur environnement direct est supplémenté en rosiglitazone (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019 ; Swegen *et al.*, 2016). Ainsi, cette molécule anti-diabétique, qui favorise l'utilisation cellulaire du glucose pourrait, chez le chien, majorer

l'utilisation métabolique du glucose et conduire à un accroissement des pourcentages de mobilité (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Swegen *et al.*, 2016).

Il a déjà été constaté chez le bélier qu'une amélioration de la mobilité totale des spermatozoïdes cryoconservés se produit sous l'action de la rosiglitazone (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Swegen *et al.*, 2016). Wang *et al.*, en 2019, ont aussi observé une amélioration de la mobilité du sperme de verrat conservé à 17°C pendant 7 jours et supplémenté à hauteur de 50 µM de rosiglitazone. Des concentrations de rosiglitazone allant 50 à 60 µM ont aussi fourni des résultats encourageants allant dans le sens d'une réduction de la mort cellulaire et du stress oxydatif (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019). À noter que la concentration de rosiglitazone utilisée dans la présente étude était de 50 µM que ce soit pour le JO+R ou le CANI EX LT®+R ce qui correspond aux concentrations utilisées usuellement.

Ces divers éléments, pris en association, pourraient ainsi expliquer les meilleurs résultats du CANI EX LT®+R et du JO+R par rapport à leurs homologues non complémentés (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2019). Néanmoins, il reste tout de même important de garder à l'esprit que la plupart des études réalisées dans ce cadre portent en réalité sur la congélation et non pas la réfrigération. Il est de plus nécessaire que les concentrations de glucose incorporées au milieu soient suffisantes pour que la rosiglitazone puisse jouer son rôle. La concentration en glucose incorporée dans les milieux testés demeure en revanche inconnue et ne permet donc pas de s'exprimer davantage sur ce point. Des concentrations en glucides plus élevées auraient peut-être permis d'augmenter davantage les différences entre les valeurs de mobilité et de mettre en évidence des différences significatives.

Concernant le MASTERBREEDER®, il fait partie des dilueurs les plus performants pour maintenir la mobilité totale. Bien qu'elle soit légèrement plus en marge, aucune différence significative n'a pourtant été décelée avec les meilleurs dilueurs. De plus, il présente des résultats significativement plus élevés que le CANI EX ST® et le BOTUDOG®. Ainsi donc, à l'image du JO+R, il fait partie des milieux qui conservent le plus d'échantillons avec une mobilité supérieure à 30 % et dont les pourcentages de mobilité sont relativement élevés qui plus est. Le fabricant assure cependant une conservation de la mobilité totale pendant 10 jours. D'après les résultats obtenus, il s'avère que la mobilité totale devient inférieure à 70 % à partir du deuxième jour, témoignant qu'il ne permet pas d'atteindre le niveau de préservation escompté (Fontbonne, 2022).

Le CHILL LT® et le CHILL ST® décrivent des résultats intermédiaires à partir du deuxième jour vis-à-vis du nombre d'échantillons conservés avec une mobilité supérieure à 30

%. Lorsque les pourcentages de mobilité sont analysés, ils semblent faire partie des milieux les plus performants pour conserver la mobilité totale, mais ne montrent aucune différence significative avec eux. Il apparaît aussi que le CHILL LT® devient inférieur à 70 % à partir du troisième jour alors qu'il devrait avoir la capacité théorique de maintenir un pourcentage de mobilité supérieur à 70 % pendant dix jours.

Le CHILL ST® est pour sa part censé conserver une mobilité supérieure à 70 % pendant au minimum cinq jours. Néanmoins, son pourcentage de mobilité devient inférieur à 70 % après le troisième jour démontrant que ce milieu n'affiche pas non plus les résultats escomptés.

Entre ces deux milieux, il semble que les différences des moyennes par rapport à tous les milieux soient plus importantes avec le CHILL ST® qu'avec le CHILL LT®. Ces différents éléments sous-tendent donc que le CHILL ST® est plus performant que le CHILL LT® pour maintenir la mobilité totale.

En regard des pourcentages de mobilité totale, aucune différence significative n'a été trouvée entre le JO, le JO+R, le MASTERBREEDER®, CHILL LT® et le CHILL ST®, démontrant que ces dilueurs sont sensiblement similaires pour ce paramètre et qu'ils affichent des résultats proches, au moins jusqu'au quatrième jour. Ces données restent cependant toujours à nuancer avec le nombre d'échantillons comparés qui décroît au cours du temps.

ii) Comparaisons en regard des autres paramètres de mobilité

(1) Le JO et le JO+R

Le milieu le plus performant pour maintenir la mobilité progressive est le JO+R. En effet, ses valeurs restent très stables tout au long de l'étude et montrent le plus de différences significatives avec les milieux les moins performants. Aucune différence significative n'a cependant été détectée avec le JO, le BOTUDOG®, le CHILL LT® et le CHILL ST®, soutenant la similarité entre ces dilueurs.

Dans l'ensemble, le JO et le JO+R affichent de bons résultats à l'égard de la plupart des paramètres étudiés. De façon générale, très peu de différences significatives ont pu être constatées entre le JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST®. En revanche, de nombreuses différences significatives ont été relevées avec le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST®, MASTERBREEDER® et BOTUDOG® selon les paramètres considérés.

Le JO+R semble aussi donner de meilleurs résultats que le JO pour les paramètres de VAP, de VSL, LIN, et d'ALH. Étant donné qu'il affiche les meilleurs résultats de mobilité progressive, les valeurs apparentes plus faibles d'ALH par rapport au JO sont cohérentes

soulignant que la mobilité dans le milieu supplémenté en rosiglitazone est bien progressive avec des mouvements de tête peu amples. De surcroît, l'étude de Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001, sur la semence fraîche de 42 chiens beagles mâles, a permis d'établir des valeurs de référence. Concernant la LIN, la STR, la VCL et l'ALH, leurs valeurs moyennes rapportées sont respectivement de l'ordre de 55 %, 81 %, 163 $\mu\text{m/s}$ et 7 μm . Ainsi, l'intégralité des paramètres cinétiques affichés par ce dilueur supplémenté en rosiglitazone est conforme à cette référence. Ces résultats soulignent bien que le mouvement est linéaire et progressif et que les spermatozoïdes ne sont pas entrés dans un statut d'hyperactivation.

Cette conclusion vient se confronter aux effets potentiellement indésirables de la rosiglitazone qui n'ont finalement pas été observés pour ce milieu. En effet, des manifestations de capacitation prématurée de type hyperactivation sont possibles notamment par activation de la phosphorylation de la tyrosine kinase et stimulation de l'efflux membranaire de cholestérol qui sont des éléments clés de ce processus (Santoro *et al.*, 2020).

Concernant la VCL, la BCF et l'ÉLONGATION, les résultats semblent varier sans qu'aucune tendance ne puisse véritablement s'en dégager. Quoiqu'il en soit, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le JO et le JO+R quel que soit le paramètre considéré.

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R affichent des manifestations similaires au JO et JO+R. En effet, bien qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence entre eux, les résultats issus de l'analyse descriptive sous-tendent que le CANI EX LT®+R est plus performant que le CANI EX LT® et permet régulièrement de conserver les paramètres cinétiques à des valeurs correctes plus longtemps que le CANI EX LT®+R. Il existe aussi certains paramètres pour lesquels le CANI EX LT® compte davantage de résultats significativement moins bons avec les autres milieux que le CANI EX LT®+R. De plus, la STR du CANI EX LT® apparaît avec d'importantes différences significatives au cours du temps, ce qui n'est pas le cas du CANI EX LT®+R. Enfin, la mobilité progressive, la VAP et la VSL du CANI EX LT®+R deviennent significativement inférieures au JO+R plus tardivement que le CANI EX LT®. Ces observations viennent renforcer les considérations précédentes. Aussi, la LIN du CANI EX LT®, qui semble plus faible que celle du CANI EX LT®+R, devient plus précocement que le CANI EX LT®+R non significativement supérieure au MASTERBREEDER®. Là encore, la prise en compte du nombre d'échantillons est importante car elle conditionne la représentativité des résultats, le CANI EX LT® ne conservant plus que 5 éjaculats à T96H contre 13 pour le CANI EX LT®+R.

Malgré ces observations non significatives, la différence apparente peut à nouveau être attribuée à la présence de la rosiglitazone. Premièrement, les hypothèses formulées précédemment tiennent lieu de première réponse à ces manifestations. Secondairement, s'ajoutent à cela les résultats obtenus par Mehdipour *et al.*, en 2022, qui indiquent qu'une amélioration de la mobilité progressive et de la VAP des spermatozoïdes de bélier cryoconservés se produit en présence de rosiglitazone. Ces données correspondent aux manifestations objectivées dans cette présente étude. En revanche, les résultats du JO et du JO+R pourraient aussi être interprétés à la lumière de la composition du JO non complémenté en rosiglitazone. Il est bien admis que la viscosité du JO est en mesure de réduire la mobilité progressive (Johnston *et al.*, 2001). Ainsi, la plus faible mobilité du JO, imputable à cette viscosité, pourrait être compensée par la supplémentation en rosiglitazone qui permettrait une amélioration du taux de spermatozoïdes progressifs. Enfin, le JO+R présente aussi davantage de différences significatives vis-à-vis du JO par rapport aux milieux moins performants que le JO.

L'efficacité de la complémentation en rosiglitazone semble toutefois relativement discrète. Le CANI EX LT®+R paraît effectivement donner de meilleurs résultats que son homologue non complémenté, mais présente tout de même des valeurs en marges par rapport aux meilleurs milieux et ce, pour la plupart des paramètres étudiés. En effet, la mobilité progressive, la VAP, la VSL et la VCL finissent par exemple par devenir significativement plus faibles que le JO ou le JO+R à partir d'un certain temps, ce qui indique et renforce l'idée que le CANI EX LT®+R ne maintient pas suffisamment les taux de spermatozoïdes progressifs, ni leurs paramètres de vitesse. Ainsi donc, la supplémentation en rosiglitazone n'apporte que peu d'amélioration au CANI EX LT®, milieu déjà peu performant. De ce fait, il peut être formulé l'hypothèse que l'ajout de rosiglitazone ne permettrait à priori pas de compenser l'absence d'efficacité initiale d'un dilueur, bien que le CANI EX LT® paraît toutefois donner des résultats corrects les deux premiers jours.

(2) Le MASTERBREEDER®

Concernant le MASTERBREEDER®, il est l'un des milieux les plus performants pour maintenir la mobilité totale, mais affiche des pourcentages de mobilité progressive beaucoup plus en marges caractérisés par une décroissance très franche et rapide. D'un point de vue statistique, des différences significatives sont régulièrement observées pour ce paramètre avec le JO, JO+R et le CHILL ST® notamment entre le deuxième et le quatrième jour. La mesure

de la VAP suggère que le MASTERBREEDER® conserve des vitesses élevées et statistiquement similaires au JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST®.

Considérant que la mobilité progressive correspond à un mouvement rectiligne, ceci signifie que la mobilité des spermatozoïdes du MASTERBREEDER® est bien maintenue, mais avec un schéma du mouvement modifié (James *et al.*, 2020 ; Jouannet et Serres, 2013).

L'analyse concomitante de la LIN, de la STR, de la VCL et de l'ALH suggère en réalité un état de mobilité hyperactivée. En effet, la LIN et la STR du MASTERBREEDER® apparaissent significativement inférieures à la presque totalité des autres dilueurs à presque tous les temps de mesures, et même dès la dilution initiale des spermatozoïdes. En ce qui concerne la VCL et l'ALH, elles apparaissent significativement supérieures à presque tous les autres milieux à tous les temps de mesures. De plus, les résultats recueillis pour le MASTERBREEDER® s'écartent notablement des valeurs de références établies par Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001.

Ainsi, sont donc relevés d'une part une augmentation de la vitesse des spermatozoïdes associée à des mouvements latéraux de la tête plus amples et d'autre part, une baisse du pourcentage de mobilité progressive qui souligne que les mouvements des spermatozoïdes deviennent non linéaires ce qui s'objective également par les valeurs relevées de STR et de LIN. De plus, l'importante BCF du MASTERBREEDER® qui est de surcroît régulièrement significativement plus élevée que le CHILL LT® et le CHILL ST® entre le deuxième et le troisième jour montre également que la tête des spermatozoïdes dilués dans ce milieu se déplace intensément, corroborant de ce fait les résultats d'hyperactivation constatés.

Ces résultats laissent donc envisager que le MASTERBREEDER® favorise les phénomènes de capacitation et conduit très rapidement, dès la dilution, à un état d'hyperactivation de la mobilité. Il est à ce titre déjà bien établi que le milieu de réfrigération peut influencer l'état de capacitation des spermatozoïdes (Iguer-Ouada et Verstegen, 2001).

Les manifestations observées ici pourraient s'expliquer par la composition du MASTERBREEDER®. D'une part, le froid étant en mesure d'induire une cryocapacitation, un défaut de protection contre le choc thermique inhérent à une constitution inadaptée du dilueur pourrait tenir lieu de première réponse à ce phénomène. Il est aussi possible que les constituants mêmes de ce dilueur en soient la cause directe, bien qu'il soit encore plus probable que ces deux facteurs agissent en synergie et soient responsables de ces observations (Silvestre *et al.*, 2021 ; Rota *et al.*, 1999 ; Kumi-Diaka et Badtram, 1994).

Par conséquent, même si les spéculations formulées ici ne sont que théoriques, il est possible qu'une accumulation rapide de ROS par défaut et/ou excès d'antioxydants, associée à un milieu très alcalin proche de celui du tractus génital de la femelle puisse fournir les conditions idéales à l'origine de la capacitation précoce objectivée dans cette étude pour ce milieu (Silvestre *et al.*, 2021 ; Lucio *et al.*, 2016 ; Jouannet et Serres, 2013 ; Noblanc *et al.*, 2011 ; Thibault et Levasseur, 2001).

Il a été démontré par Schäfer-Somi et Tichy, en 2019, que la mobilité progressive en association à la VCL, la STR et la LIN sont prédictifs de la qualité du milieu réfrigération, ce qui souligne l'intérêt d'avoir analysé concomitamment l'évolution de ces paramètres au cours du temps. Ainsi, à la lumière de ces résultats, le MASTERBREEDER® semble être un milieu moins performant que les autres.

(3) Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R

Le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R sont dans l'ensemble plus en marges. Au regard de ce qui a été précédemment constaté pour la mobilité totale et qui les plaçait comme les moins performants, les autres paramètres cinétiques analysés corroborent aussi cette idée.

Les paramètres cinétiques des spermatozoïdes y sont globalement faibles. Cette observation s'objective notamment par les faibles valeurs de mobilité totales déjà évoquées, mais également par les faibles taux de spermatozoïdes progressifs et les faibles valeurs de VAP, de VSL et de VCL.

En effet, elles sont à plusieurs reprises, significativement plus faibles que celles du JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST®, mais seulement à partir du troisième ou quatrième jour. Cette observation soutient que ces deux milieux de réfrigération ne parviennent pas à maintenir adéquatement la mobilité ainsi que les paramètres cinétiques à partir d'un certain temps.

Cependant, bien qu'ils soient significativement moins performants que les autres, ils n'induisent pas pour autant des modifications du statut de mobilité de type hyperactivation, comme c'est le cas pour le MASTERBREEDER®. Ainsi, leurs VCL et leurs ALH demeurent faibles et significativement inférieures à celles du MASTERBREEDER®. Concernant la STR et la LIN, les pourcentages affichés par ces deux milieux sont aussi faibles, mais demeurent significativement supérieurs à ceux du MASTERBREEDER® bien que cela ne soit le cas que sur le premier jour seulement pour la LIN. Il en est de même pour leur STR qui apparaît

significativement plus élevée que le MASTERBREEDER®, mais seulement le premier jour pour le CANI EX LT®. Ces données attestent de la même manière que ces dilueurs voient leurs résultats se dégrader au cours du temps, mais de façon plus importante pour le CANI EX LT®. À ce titre, il est de rigueur de mentionner que le nombre d'échantillons qui diminue au cours du temps et la non-homogénéité entre les milieux peuvent rendre ces considérations moins représentatives.

Ces données permettent finalement d'infirmier l'existence d'une hyperactivation, bien que la BCF soit élevée et significativement supérieure au CHILL LT® et au CHILL ST®. Ceci soutient tout de même que la tête des spermatozoïdes se meut à des fréquences élevées.

Leurs valeurs se rapprochent dans l'ensemble des références établies par Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001. D'après ce qui a été décrit par Schäfer-Somi et Tichy, en 2019, eu égard des faibles valeurs de mobilité progressive, de VCL, de STR et de LIN, ces deux produits de réfrigération peuvent ainsi être considérés comme moins compétitifs pour maintenir la mobilité des spermatozoïdes au-delà des trois premiers jours de réfrigération en comparaison des meilleurs dilueurs testés au cours de cette étude. Ils demeurent cependant utilisables sur les deux voire trois premiers jours car leurs résultats sur cet intervalle de temps (durée généralement requise pour expédier la semence jusqu'à sa destination finale) restent corrects, et plus particulièrement pour le CANI EX LT®+R qui maintient souvent plus longtemps ses paramètres que le CANI EX LT®. Ils sont certes moins bons que les autres milieux à l'échelle de l'étude dans son ensemble, mais demeurent suffisants pour espérer une gestation car ils maintiennent tout de même entre 14 et 15 échantillons avec une mobilité supérieure à 30 % au troisième jour de réfrigération ainsi que des résultats de mobilité totale et progressive qui restent acceptables, d'autant plus qu'aucune manifestation de capacitation prématurée ne semble s'y produire.

Pour affiner l'interprétation des résultats, il est essentiel de mentionner qu'il existe une variabilité dans la significativité des comparaisons inter-milieux. En effet, certains paramètres qui diffèrent de façon frappante entre deux milieux à un temps précis selon l'analyse descriptive, n'apparaissent finalement pas, d'après l'analyse statistique, significativement différents. À l'inverse, d'autres résultats qui semblent de prime abord clairement similaires s'avèrent en définitive, selon l'analyse statistique, significativement différents. C'est par exemple le cas pour le CANI EX LT® dont la VCL au quatrième jour n'apparaît pas significativement inférieure à celles du JO+R, alors que le BOTUDOG® présente une VCL plus élevée qui est pourtant significativement différente du JO+R.

Ces observations se répètent au cours de l'étude et peuvent être attribuées à la diminution du nombre d'échantillons au cours du temps pour chaque milieu et à l'hétérogénéité du nombre d'éjaculats qui en découle. De ce fait, étant donné que le CANI EX LT® contient moins d'échantillons (5) que le BOTUDOG® (15), malgré son infériorité manifeste, aucune différence significative n'est mise en évidence. Si les échantillons avaient été conservés, une différence significative aurait éventuellement pu être trouvée permettant d'améliorer la précision de certains résultats.

Ainsi donc, ces deux milieux fournissent des résultats convenables uniquement sur les deux à trois premiers jours. Au même titre que le CANI EX ST®, la mobilité des spermatozoïdes ne semble pas y être grandement favorisée, le déplacement y étant peu progressif et relativement lent au regard des dilueurs les plus performants surtout au-delà des trois premiers jours. Ils montrent, notamment pour le CANI EX LT®, davantage de résultats significativement moins bons que le CANI EX ST® par rapport aux meilleurs milieux en ce qui concerne les paramètres de mobilité progressive, de VAP, de VSL et de STR.

(4) Le CANI EX ST®

Il apparaît comme le dilueur le moins performant pour maintenir la mobilité totale des spermatozoïdes canins. À cela vient s'ajouter la mobilité progressive, la VAP, la VSL et la VCL qui paraissent plus faibles et régulièrement significativement inférieures aux meilleurs dilueurs, notamment le JO+R voire le JO, CHILL LT® et CHILL ST®.

Cependant, il est intéressant de noter que l'ALH, la STR et la LIN évoluent de façon inverse au MASTERBREEDER®. Premièrement, les faibles valeurs d'ALH soutiennent l'absence de manifestations de type hyperactivation. Secondairement, la LIN et la STR du CANI EX ST® donnent les valeurs les plus élevées dont certaines sont significativement supérieures aux autres milieux, bien que cela ne soit valable qu'en début d'expérience et que l'analyse statistique ne se soit pas poursuivie au-delà du quatrième jour. À noter que la STR et la LIN mesurées correspondent bien aux valeurs de référence de Iguer-Ouada et Verstegen, en 2001, alors que les résultats de VAP, VSL, VCL et d'ALH s'écartent de façon notable de ces données.

Par conséquent, en comparaison aux meilleurs dilueurs, et en considérant qu'il affiche aussi des taux de mobilité totale qui sont significativement plus faibles que la plupart des autres milieux, il peut être émis comme hypothèse qu'il ne favorise que peu la mobilité des spermatozoïdes, lesquels s'y déplacent de façon moins rectiligne à une vitesse moindre avec

des mouvements de la tête très peu amples, bien que cela ne soit valable qu'à partir du troisième voire quatrième jour. Cependant, comme mentionné plus haut, il présente des résultats plus favorables que le CANI EX LT® et le CANI EX LT®+R, bien que leurs résultats de mobilité totale soient pour leur part plus favorables que ceux du CANI EX ST®.

Ces différences peuvent là encore être attribuées à la composition du milieu qui n'est que peu favorable à la mobilité des spermatozoïdes.

(5) Le BOTUDOG®

Le BOTUDOG® n'affiche aucune différence significative avec les autres milieux en ce qui concerne la mobilité progressive, ce qui le place comme un dilueur intermédiaire à cet égard.

Autrement, ce milieu montre régulièrement des résultats significativement moins élevés par rapport au JO, JO+R, voire au CHILL LT® et CHILL ST® notamment pour les paramètres de VAP, VSL, VCL, et d'ALH.

De plus, il présente des résultats significativement plus élevés que ceux du MASTERBREEDER® pour la LIN et la STR à tous les temps de mesures et significativement plus faibles pour la VCL et la VAP. Ces éléments suggèrent ainsi qu'il ne conduit pas à des manifestations de type capacitation prématurée à l'inverse du MASTERBREEDER®.

Ainsi, en considérant les résultats de mobilité totale, ce milieu favorise moyennement la mobilité des spermatozoïdes dont le déplacement est moyennement progressif. De surcroît, les spermatozoïdes présentent une vitesse moindre, attestée par les faibles résultats de VAP, VSL et de VCL.

Des différences de compositions peuvent également expliquer ces observations.

(6) Le CHILL LT® et le CHILL ST®

Le CHILL LT® et le CHILL ST® montrent un profil d'évolution similaire pour la plupart des paramètres étudiés.

Le CHILL ST® affiche de bonnes performances pour conserver une mobilité de type progressive et présente des différences significatives avec les milieux de réfrigération les moins bons tels que le CANI EX LT® et MASTERBREEDER®, bien que l'analyse statistique se soit restreinte uniquement aux quatre premiers jours. Le CHILL LT® apparaît discrètement

plus en marge puisque qu'aucune différence significative n'a été détectée avec les milieux les moins performants.

Ces deux milieux se distinguent pour les autres paramètres cinétiques par le fait que leur VAP, VSL et VCL soient, aux côtés du JO et du JO+R, meilleurs que celle des moins bons milieux.

Cependant, leur ALH est élevée et supérieure à celle du JO (milieu témoin), mais demeure en réalité significativement moins élevée que celle du MASTERBREEDER®. Elle augmente très fortement au-delà du septième jour, mais cette observation peut être attribuée à l'exclusion des échantillons au fur et à mesure du temps. En effet, à partir du septième jour, il ne reste respectivement que 6 et 7 échantillons pour le CHILL LT® et le CHILL ST®. Cependant, bien que leur ALH apparaisse significativement supérieure au CANI EX ST® et au BOTUDOG®, aucune différence significative n'a été trouvée avec le JO, JO+R, CANI EX LT® et CANI EX LT®+R jusqu'au quatrième jour.

À l'inverse, la BCF dont ils font preuve apparaît à plusieurs reprises significativement plus faible que celle du MASTERBREEDER® et du CANI EX LT®. De surcroît, leur VCL est également significativement inférieure à celle du MASTERBREEDER®. Ces données infirment donc l'hypothétique capacitation prématurée au sein de ces deux dilueurs.

Ainsi, bien qu'un statut de mobilité de type hyperactivée soit craint, cette hypothèse est infirmée après prise en compte de l'intégralité des paramètres, notamment la BCF qui démontre que l'intensité du mouvement de la tête des spermatozoïdes est de faible intensité, à l'inverse du MASTERBREEDER®. Ces observations pourraient s'expliquer par une composition chimique spécifique, dont les détails précis ne sont pas connus.

D'après l'étude de Goericke-Pesch *et al.*, en 2012, il s'est avéré que le CHILL LT® offre de meilleurs résultats après 10 jours de réfrigérations à + 4°C, par rapport au Jaune d'Œuf-Tris et à l'Uppsala Equex-2. Les résultats de la présente étude soutiennent ainsi pareillement le fait que ce dilueur soit également très performant.

Ces deux milieux permettent donc de conserver adéquatement la mobilité des spermatozoïdes, avec un mouvement progressif et rapide sans pour autant générer les manifestations de capacitation prématurée du MASTERBREEDER®. Comme l'absence de résultats significativement différents l'ont montré à maintes reprises, ils paraissent sensiblement équivalents au JO et JO+R.

c) Les autres limites de cette étude

Premièrement, il aurait été possible d'approfondir cette étude en mettant en œuvre des tests de vitalité. En effet, l'ensemble du spermogramme est requis pour apprécier la qualité ainsi que le pouvoir fécondant de la semence canine (Feldman et Nelson, 2004). Par exemple, l'évaluation de l'intégrité membranaire est essentielle car positivement corrélée à la mobilité progressive. Étant donné que la membrane se détériore au-delà de 48 heures de stockage à +5°C et que les paramètres sont souvent corrélés entre eux, c'est donc sur une approche plus globale que le protocole aurait pu se fonder (Martínez, 2004).

Comme précédemment évoqué, l'accès restreint à la composition des dilueurs constitue une importante limite à cette étude. Il n'est pas possible d'exclure que certains composés présents dans les plus mauvais milieux de réfrigération soient à l'origine des résultats défavorables obtenus pour ces derniers.

Considérant les manifestations laissant suspecter l'initiation d'une capacitation prématurée dans le MASTERBREEDER®, une analyse plus ciblée de la vitalité des spermatozoïdes et notamment de l'intégrité de l'acrosome aurait là aussi été particulièrement pertinente afin de mettre en évidence les modifications et altérations potentielles inhérentes à cet état d'hyperactivation, notamment en regard de l'acrosome.

Une telle évaluation aurait aussi été appropriée afin de mettre en exergue les éventuels effets protecteurs et bénéfiques de la rosiglitazone déjà documentés sur la semence de verrat, tant sur le plan de l'intégrité membranaire et acrosomale que sur la survie cellulaire (Mehdipour *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2019).

Concernant l'évaluation de la rosiglitazone il aurait aussi été intéressant de tester des concentrations légèrement supérieures. Néanmoins, il convient de noter que des concentrations excessives de l'ordre de 100 µM peuvent entraîner des effets délétères en lien avec la cytotoxicité cellulaire suspectée d'apparaître à partir d'une certaine concentration (Wang *et al.*, 2019). En revanche, avant d'envisager des concentrations plus élevées, il serait nécessaire d'évaluer au préalable sa cytotoxicité cellulaire potentielle. À l'instar de la notable résistance des spermatozoïdes canins face au choc dû au froid, il se pourrait qu'ils tolèrent des concentrations plus élevées, de l'ordre de 70 à 90 µM voire davantage. Cela pourrait permettre de révéler des différences plus frappantes qui pourraient devenir significatives.

d) Portée et perspectives de l'étude

Les conclusions de ce travail apportent des éclaircissements concernant les différents milieux pour la réfrigération de la semence canine à + 4°C, pour certains disponibles sur le marché, et ouvrent vers de nouvelles perspectives prometteuses.

Parmi ceux évalués, le milieu JO+R se révèle comme le plus efficace et le plus adapté pour conserver la semence canine par réfrigération. Secondairement, l'étude confirme l'efficacité du jaune d'œuf et vient démontrer que le CHILL LT® et le CHILL ST® permettent d'offrir eux aussi de bons résultats.

À l'inverse, les données indiquent que le CANI EX LT®, le CANI EX LT®+R, CANI EX ST®, MASTERBREEDER® et BOTUDOG® ne préservent pas les spermatozoïdes de façon aussi satisfaisante qu'espérée et ne répondent pas aux exigences qualitatives attendues sur le long terme. En revanche, leurs résultats convenables sur le court terme (2-3 jours), ne contre-indiquent cependant pas leur utilisation.

Les données acquises au cours de cette étude apportent ainsi des éléments objectifs et utiles pour que l'opérateur puisse choisir le milieu de conservation le plus adapté pour la conservation par réfrigération du sperme canin.

De plus, les premiers résultats obtenus à la suite de l'ajout de la rosiglitazone sont encourageants et laissent entrevoir le potentiel de cette molécule pour améliorer la conservation de la semence canine. Son incorporation semble ainsi se montrer comme un nouvel axe de recherche prometteur sur la préservation de la semence canine.

En ce sens, mener des recherches supplémentaires est essentiel pour confirmer ou infirmer le potentiel bénéfique de cette molécule chez le chien. Il serait ainsi intéressant d'évaluer son effet en supplémentant divers milieux à base de jaune d'œuf avec des concentrations croissantes en rosiglitazone afin de déterminer si son utilisation apporte un bénéfice significatif sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes canins.

Aussi, il pourrait être envisageable de tester son incorporation dans plusieurs milieux de réfrigération préexistants sur le marché et à différentes gammes de concentration. La réalisation de tests de mobilité et de vitalité tout en portant une attention particulière à l'intégrité de l'acrosome et de la membrane plasmique s'avérerait très utile pour de définir les modalités d'utilisation les plus optimales chez le chien.

Dans la continuité de cette étude, il serait pertinent d'évaluer les bénéfices de la rosiglitazone sur tous les milieux testés. À l'image de l'étude de Iguer-Ouada et Versteegen, en 2001, qui a montré que la supplémentation de dilueurs commerciaux avec du jaune d'œuf améliore la mobilité, il serait envisageable de procéder de façon identique avec la rosiglitazone. Compte tenu de l'état d'hyperactivation observé dans le MASTERBREEDER®, et sachant que la mobilité progressive des spermatozoïdes de bélier cryoconservés s'améliore en présence de rosiglitazone, l'utilisation de cette molécule avec ce milieu pourrait éventuellement s'avérer utile pour réduire les manifestations d'hyperactivation (Mehdipour *et al.*, 2022).

Toutefois, il est suggéré que la rosiglitazone peut induire un efflux membranaire de cholestérol ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine, deux événements responsables de la capacitation. Ces données seront donc à confronter avec les résultats d'une telle expérimentation, car son emploi pourrait en outre être contre-indiqué avec ce milieu qui provoque déjà une hyperactivation dès la dilution (Santoro *et al.*, 2020). Quoiqu'il en soit, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'étayer toutes ces hypothèses.

De plus, à l'exemple de ce qui a déjà été effectué chez l'étalon, le verrat, le bélier et l'Homme, il serait intéressant d'apprécier secondairement l'effet de la rosiglitazone sur les différents aspects du métabolisme du spermatozoïde canin, à savoir l'utilisation métabolique du glucose par les spermatozoïdes, l'activité mitochondriale et la production d'ATP, la réduction de l'activation des facteurs pro-apoptotiques ainsi que la réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces études seraient utiles pour caractériser et préciser les bénéfices ainsi que les modes d'action de la rosiglitazone sur les spermatozoïdes canins.

Au-delà, il pourrait être pertinent d'évaluer les effets de la concentration en glucose ou en fructose dans des dilueurs déjà supplémentés en rosiglitazone. Cette analyse complémentaire permettrait de définir la meilleure association entre la rosiglitazone et le glucose au sein de ces milieux.

Enfin, ces travaux devraient être conduits à la fois dans le cadre de la réfrigération et de la congélation afin d'évaluer de façon la plus exhaustive possible son bénéfice et d'optimiser les différentes méthodes de conservation de la semence canine.

En définitive, aboutir à des réponses concrètes sur ce sujet est fondamental, car la rosiglitazone pourrait dans un futur proche être exploitée pour développer des milieux de

réfrigération commerciaux performants et innovants en matière de préservation de semence canine, tant réfrigérée que congelée.

Le processus d'autorisation et de commercialisation de dilueurs de sperme canin complétés en rosiglitazone est cependant complexe et requiert des démarches administratives afin de mettre en conformité l'usage d'une molécule à usage thérapeutique humain pour la conservation par réfrigération ou la congélation de la semence canine.

CONCLUSION

La réfrigération de la semence est une technique de reproduction assistée en constante évolution, justifiant le développement continu de nouveaux milieux de réfrigération et d'agents cryoprotecteurs.

Cette étude visait principalement à comparer neuf milieux de réfrigération à + 4°C, incluant des produits disponibles sur le marché ainsi que d'autres en phase de développement industriel. Un autre objectif était d'évaluer l'intérêt de la rosiglitazone en tant qu'agent cryoprotecteur pour préserver la mobilité et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes canins réfrigérés.

L'incorporation de rosiglitazone, avait déjà montré des résultats prometteurs dans le cadre de conservation de la semence congelée ou réfrigérée de différentes espèces, notamment le verrat, l'étalon, le bélier et l'Homme, mais son utilisation chez le chien n'avait jusqu'alors jamais été étudiée.

Bien qu'aucune différence significative n'ait été détectée, les résultats semblent suggérer que l'utilisation de la rosiglitazone à une concentration de 50 µM pourrait s'avérer bénéfique pour la conservation du sperme canin, en améliorant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes réfrigérés.

La comparaison des neuf milieux de réfrigération a permis de confirmer l'intérêt du jaune d'œuf (JO) pour la conservation de la semence canine réfrigérée à + 4°C sur une période prolongée et a aussi révélé des résultats très encourageants pour le CHILL LT® et le CHILL ST®.

En revanche, parmi les dilueurs évalués, le CANI EX LT® et son homologue complémenté en rosiglitazone (CANI EX LT®+R), le CANI EX ST®, et le BOTUDOG® se sont montrés moins performants sur le long terme, bien que leurs résultats restent acceptables sur les deux à trois premiers jours.

Enfin, les résultats du MASTERBREEDER® soulignent que les spermatozoïdes entrent immédiatement, c'est-à-dire dès la dilution, dans un état de capacitation prématurée, objectivé par l'hyperactivation de la mobilité qui s'y produit.

Les données issues de cette étude offrent aux professionnels de la reproduction animale des indications utiles pour la sélection des dilueurs les plus adaptés pour la réfrigération du sperme canin. De plus, les premiers résultats concernant l'utilisation de la rosiglitazone chez le chien sont très prometteurs et incitent à poursuivre les recherches pour confirmer ses bénéfices potentiels et sa contribution ou non à l'amélioration du succès reproducteur.

Pour conclure, ce travail de recherche contribue notablement à accroître les connaissances sur les milieux de réfrigération de la semence canine et permet d'envisager des pistes séduisantes pour optimiser les techniques de réfrigération, notamment au travers d'une potentielle future incorporation de la rosiglitazone aux milieux de réfrigération de semence canine.

BIBLIOGRAPHIE

1. AALBERTS, STOUT, et STOORVOGEL, 2014. Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*. 1 janvier 2014. Vol. 147, n° 1, pp. R1-R14. DOI [10.1530/REP-13-0358](https://doi.org/10.1530/REP-13-0358).
2. ABAH, FONTBONNE, PARTYKA, NIZANSKI, 2023. Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research? *Veterinary Research Communications*. septembre 2023. Vol. 47, n° 3, pp. 1125-1137. DOI [10.1007/s11259-023-10159-1](https://doi.org/10.1007/s11259-023-10159-1).
3. ABE, YOKOZAWA, UMEMIYA-SHIRAFUJI, MOUMOUNI, SUWA et SUZUKI, 2018. Fertilizing ability of canine spermatozoa cryopreserved with skim milk-based extender in a retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. février 2018. Vol. 53, n° 1, pp. 237-242. DOI [10.1111/rda.13098](https://doi.org/10.1111/rda.13098).
4. ALLOUCHE-FITOUSSI, BREITBART, 2020. The Role of Zinc in Male Fertility. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 octobre 2020. Vol. 21, n° 20, pp. 7796. DOI [10.3390/ijms21207796](https://doi.org/10.3390/ijms21207796).
5. ALONGE, MELANDRI, LEOCI, LACALANDRA, CAIRA et AIUDI, 2019. The Effect of Dietary Supplementation of Vitamin E, Selenium, Zinc, Folic Acid, and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Sperm Motility and Membrane Properties in Dogs. *Animals*. février 2019. Vol. 9, n° 2, pp. 34. DOI [10.3390/ani9020034](https://doi.org/10.3390/ani9020034).
6. ANGRIMANI, LOSANO, LUCIO, VEIGA, LANDIM, NICHI et VANNUCCHI, 2017. Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Animal Reproduction Science*. juin 2017. Vol. 181, pp. 50-56. DOI [10.1016/j.anireprosci.2017.03.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.014).
7. AQUINO-CORTEZ, PINHEIRO, LIMA, SILVA, MOTA-FILHO, MARTINS, RODRIGUEZ-VILLAMIL, MOURA et SILVA, 2017. Proteomic characterization of canine seminal plasma. *Theriogenology*. juin 2017. Vol. 95, pp. 178-186. DOI [10.1016/j.theriogenology.2017.03.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.016).
8. AURICH, 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. octobre 2005. Vol. 89, n° 1-4, pp. 65-75. DOI [10.1016/j.anireprosci.2005.06.025](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025).

9. AURICH, 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*. septembre 2008. Vol. 107, n° 3-4, pp. 268-275. DOI [10.1016/j.anireprosci.2008.04.015](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015).
10. AXNÉR, et LAGERSON, 2016. Cryopreservation of Dog Semen in a Tris Extender with 1% or 2% Soya Bean Lecithin as a Replacement of Egg Yolk. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2016. Vol. 51, n° 2, pp. 262-268. DOI [10.1111/axé1/rda.12675](https://doi.org/10.1111/axé1/rda.12675).
11. BARTLETT, 1962a. STUDIES ON DOG SEMEN. *Reproduction*. 1 avril 1962. Vol. 3, n° 2, pp. 173-189. DOI [10.1530/jrf.0.0030173](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0030173).
12. BARTLETT, 1962b. STUDIES ON DOG SEMEN. *Reproduction*. 1 avril 1962. Vol. 3, n° 2, pp. 190-205. DOI [10.1530/jrf.0.0030190](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0030190).
13. BATISTA, SANTANA, ALAMO, GONZÁLEZ, NIÑO, CABRERA et GRACIA, 2012. Effects of incubation temperature and semen pooling on the viability of fresh, chilled and freeze-thawed canine semen samples. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2012. Vol. 47, n° 6, pp. 1049-1055. DOI [10.1111/j.14390531.2012.02014.x](https://doi.org/10.1111/j.14390531.2012.02014.x).
14. BECHER, SPERGSE, AURICH, ZOTTLER, AURICH et SCHÄFER-SOMI, 2013. Cooled Storage of Canine Semen: in vitro Effects of Different Concentrations of an Antibiotic Combination on Growth of Mollicutes. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013. Vol. 48, n° 6, pp. 961-966. DOI [10.1111/rda.12194](https://doi.org/10.1111/rda.12194).
15. BELALA, DELAY, AMIRAT, ROPERS, GUILLOU, ANTON, SCHMITT, THORIN, MICHAUD, KAIDI, TAINTURIER et BENCHARIF, 2016. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 °C. *Animal Reproduction Science*. 1 mai 2016. Vol. 168, pp. 100-109. DOI [10.1016/j.anireprosci.2016.02.032](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.032).
16. BENCHARIF, AMIRAT-BRIAND, GARAND, ANTON, SCHMITT, DESHERCES, DELHOMME, LANGLOIS, BARRIÈRE, DESTRUMELLE, VERAMUNOZ et TAINTURIER, 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*. 1 juin 2010. Vol. 119, n° 3, pp. 305-313. DOI [10.1016/j.anireprosci.2010.01.009](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.01.009).

17. BENCHARIF, AMIRAT-BRIAND, GARAND, ANTON, SCHMITT, DESHERCES, DELHOMME, LANGLOIS, BARRIÈRE, DESTRUMELLE, VERAMUNOZ et TAINTURIER, 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science*. 1 août 2012. Vol. 93, n° 1, pp. 440-447. DOI [10.1016/j.rvsc.2011.06.027](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.027).
18. BENCHARIF, AMIRAT-BRIAND, LE GUILLOU, GARAND, ANTON, SCHMITT, DESHERCES, DELHOMME, LANGLOIS, DESTRUMELLE, VERAMUNOZ, BARRIÈRE et TAINTURIER, 2013. Canine-chilled sperm: study of a semen extender made with low-density lipoproteins from hen egg yolk supplemented with glutamine. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2013. Vol. 48, n° 2, pp. 258-266. DOI [10.1111/j.1439-0531.2012.02142.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02142.x).
19. BENCHARIF, AMIRAT, PASCAL, ANTON, SCHMITT, DESHERCES, DELHOMME, LANGLOIS, BARRIÈRE, LARRAT et TAINTURIER, 2010. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2010. Vol. 45, n° 2, pp. 189-200. DOI [10.1111/j.1439-0531.2008.01198.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01198.x).
20. BENCHARIF, LAMIA, LE GUILLOU, VIALTELLE, ANTON, SCHMITT, DESHERCES, BARRIERE, et TAINTURIER, 2013. Refrigeration of canine sperm at + 4°C: Comparative study of four different extenders for the refrigeration of canine sperm at + 4°C: LDL, Tris egg yolk, Equex®, and INRA96®. *Revue de Medecine Veterinaire*. 1 mai 2013. Vol. 164, pp. 252-262.
21. BERGERON et MANJUNATH, 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*. octobre 2006. Vol. 73, n° 10, pp. 1338-1344. DOI [10.1002/mrd.20565](https://doi.org/10.1002/mrd.20565).
22. BOUCHARD, MORRIS, SIKES et YOUNGQUIST, 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. juillet 1990. Vol. 34, n° 1, pp. 147-157. DOI [10.1016/0093-691x\(90\)90586-i](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90586-i).
23. BRETON, NAIR et BATTISTONE, M. A., 2019. Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*. septembre 2019. Vol. 7, n° 5, pp. 631-643. DOI [10.1111/andr.12632](https://doi.org/10.1111/andr.12632).

24. BRITO, ALTHOUSE, AURICH, CHENOWETH, EILTS, LOVE, LUVONI, MITCHELL, PETER, PUGH et WABERSKI, 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*. juin 2016. Vol. 85, n° 9, pp. 1507-1527. DOI [10.1016/j.theriogenology.2016.01.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002).
25. BUSTANI et BAIEE, 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*. mai 2021. Vol. 14, n° 5, pp. 1220-1233. DOI [10.14202/vetworld.2021.1220-1233](https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233).
26. CABALLERO, PARRILLA, ALMIÑANA, DEL OLMO, ROCA, MARTÍNEZ et VÁZQUEZ, 2012. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juin 2012. Vol. 47 Suppl 3, pp. 12-21. DOI [10.1111/j.1439-0531.2012.02028.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02028.x).
27. CAVALCANTI, PEREIRA, BEZERRA, MOREIRA, DA SILVA, MATOS, JORGE-NETO et SILVA, Alexandre Rodrigues, 2023. Short-term preservation of canine sperm-binding ability and other metrics using the INRA-96 in comparison to Tris-egg yolk extender. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. septembre 2023. Vol. 58, n° 9, pp. 1320-1329. DOI [10.1111/rda.14448](https://doi.org/10.1111/rda.14448).
28. CHABORY, DAMON, LENOIR, HENRY-BERGER, VERNET, CADET, SAEZ et DREVET, 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*. avril 2010. Vol. 88, n° 4, pp. 1321-1331. DOI [10.2527/jas.2009-2583](https://doi.org/10.2527/jas.2009-2583).
29. CHEN, F., GAO, L., ZHOU, H., GUO, L., CHEN, Q., GAN, Y., SUN, X., LI, Q. et WANG, K., 2019. The association between sperm head elongation and semen quality. *Andrology*. novembre 2019. Vol. 7, n° 6, pp. 840-845. DOI [10.1111/andr.12619](https://doi.org/10.1111/andr.12619).
30. CHŁOPIK et WYSOKIŃSKA, 2020. Canine spermatozoa-What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. février 2020. Vol. 55, n° 2, pp. 113-126. DOI [10.1111/rda.13596](https://doi.org/10.1111/rda.13596).
31. CHRISTENSEN, 2018. Canine Prostate Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. juillet 2018. Vol. 48, n° 4, pp. 701-719. DOI [10.1016/j.cvsm.2018.02.012](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.012).

32. COLOMBO, MORSELLI, FRANCHI, SCHÄFER-SOMI et LUVONI, 2022. Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals: an open access journal from MDPI*. 23 mars 2022. Vol. 12, n° 7, pp. 816. DOI [10.3390/ani12070816](https://doi.org/10.3390/ani12070816).
33. COOPER, 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*. janvier 2011. Vol. 13, n° 1, pp. 130-138. DOI [10.1038/aja.2010.97](https://doi.org/10.1038/aja.2010.97).
34. CUNHA, HENNING, URHAUSEN, BEYERBACH et GÜNZEL-APEL, 2014. A commercial box for dog semen transport: What happens inside when the environmental temperature is increasing? *Animal Reproduction Science*. 10 juin 2014. Vol. 147, n° 1, pp. 86-92. DOI [10.1016/j.anireprosci.2014.03.019](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.03.019).
35. CUNNINGHAM et KLEIN, (éd.), 2013. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St. Louis, Mo : Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4377-2361-8.SF768 .T49 2013
36. DACHEUX, GATTI et DACHEUX, 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*. 1 mai 2003. Vol. 61, n° 1, pp. 7-17. DOI [10.1002/jemt.10312](https://doi.org/10.1002/jemt.10312).
37. DAHLBOM, ANDERSSON, VIERULA et MLANKO, 1997. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology* [en ligne]. septembre 1997. Vol. 48, n° 4. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.1016/s0093-691x\(97\)00284-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00284-7). Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728163/>
38. DALMAZZO, DE SOUZA RAMOS ANGRIMANI, Daniel, LOSANO, ROCHA, SOBRINHO, CHINAIT GURGEL, MONTEIRO PACHECO, MINAZAKI, CRUSCO, NICHI et BARNABE, 2019. Insights into soy lecithin and egg yolk-based extenders for chilling canine spermatozoa. *Zygote (Cambridge, England)*. février 2019. Vol. 27, n° 1, pp. 17-24. DOI [10.1017/S0967199418000576](https://doi.org/10.1017/S0967199418000576).
39. DALMAZZO, LOSANO, ROCHA, TSUNODA, ANGRIMANI, MENDES, ASSUMPCÃO, NICHI et BARNABE, 2018. Effects of Soy Lecithin Extender on Dog Sperm Cryopreservation. *Animal Biotechnology*. 3 juillet 2018. Vol. 29, n° 3, pp. 174-182. DOI [10.1080/10495398.2017.1334662](https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1334662).

40. DE LOS REYES, PALOMINO, DE LANGE, ANGUITA et BARROS, 2009. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. *Animal Reproduction Science*. janvier 2009. Vol. 110, n° 1-2, pp. 37-45. DOI [10.1016/j.anireprosci.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.010).
41. DECUADRO-HANSEN, 2004. La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 1 octobre 2004. Vol. 32, n° 10, pp. 887-893. DOI [10.1016/j.gyobfe.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2004.09.003).
42. DELGADO-BERMÚDEZ, RECUERO, LLAVANERA, MATEO-OTERO, SANDU, BARRANCO, RIBAS-MAYNOU et YESTE, 2021. Aquaporins Are Essential to Maintain Motility and Membrane Lipid Architecture During Mammalian Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9, pp. 656438. DOI [10.3389/fcell.2021.656438](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.656438).
43. DÍAZ, INOSTROZA, RISOPATRÓN, SANCHEZ et SEPÚLVEDA, 2014. Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia*. mars 2014. Vol. 46, n° 2, pp. 194-197. DOI [10.1111/and.12070](https://doi.org/10.1111/and.12070).
44. DIVAR, AZARI, MOGHEISEH et GHAHRAMANI, 2022. Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. *BMC veterinary research*. 5 mars 2022. Vol. 18, n° 1, pp. 86. DOI [10.1186/s12917-022-03186-8](https://doi.org/10.1186/s12917-022-03186-8).
45. DREVET, 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 16 mai 2006. Vol. 250, n° 1-2, pp. 70-79. DOI [10.1016/j.mce.2005.12.027](https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027).
46. ĎURAČKA, BENKO, CHŇAPEK et TVRDÁ, 2023. Strategies for Bacterial Eradication from Human and Animal Semen Samples: Current Options and Future Alternatives. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 6 août 2023. Vol. 23, n° 15, pp. 6978. DOI [10.3390/s23156978](https://doi.org/10.3390/s23156978).
47. ENGLAND, 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*. 15 octobre 1999. Vol. 52, n° 6, pp. 981-986. DOI [10.1016/S0093-691X\(99\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00187-9).
48. ENGLAND, ALLEN et MIDDLETON, 1990. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science*. 1 juillet 1990. Vol. 49, n° 1, pp. 66-70. DOI [10.1016/S0034-5288\(18\)31048-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31048-8).

49. ESCALIER et TOURÉ, 2012. Malformations de l'appareil flagellaire du spermatozoïde impliquées dans l'infertilité chez l'homme. *médecine/sciences*. 1 mai 2012. Vol. 28, n° 5, pp. 503-511. DOI [10.1051/medsci/2012285015](https://doi.org/10.1051/medsci/2012285015).
50. FELDMAN et NELSON, 2004. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd ed. St. Louis, Mo : Saunders. ISBN 978-0-7216-9315-6.SF992.E53 F45 2004
51. FINELLI, LEISEGANG, TUMALLAPALLI, HENKEL et AGARWA, 2021. The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Translational Andrology and Urology*. juillet 2021. Vol. 10, n° 7, pp. 3069-3079. DOI [10.21037/tau-21-276](https://doi.org/10.21037/tau-21-276).
52. FONTBONNE, 2022. ÉTAPE 3 : PRÉLÈVEMENT, EXAMEN ET RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE DE CHIEN - Le Point Vétérinaire n° 430 du 01/06/2022. *Le Point Vétérinaire.fr* [en ligne]. 2022. [Consulté le 11 mars 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article/n-430/etape-3-prelevement-examen-et-refrigeration-de-la-semence-de-chien.html>
53. FRESHMAN, 2002. Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. août 2002. Vol. 17, n° 3, pp. 104-107. DOI [10.1053/svms.2002.34326](https://doi.org/10.1053/svms.2002.34326).
54. GARCÍA-VÁZQUEZ, GADEA, MATÁS et HOLT, 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*. 2016. Vol. 18, n° 6, pp. 844-850. DOI [10.4103/1008-682X.186880](https://doi.org/10.4103/1008-682X.186880).
55. GARNER, THOMAS et ALLEN, 1997. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *Journal of Andrology*. 1997. Vol. 18, n° 3, pp. 324-331.
56. GERBER, HEINRICH et BREHM, 2016. Blood–testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. *Reproduction*. 1 février 2016. Vol. 151, n° 2, pp. R15-R27. DOI [10.1530/REP-15-0366](https://doi.org/10.1530/REP-15-0366).
57. GERVASI et VISCONTI, 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*. mars 2017. Vol. 5, n° 2, pp. 204-218. DOI [10.1111/andr.12320](https://doi.org/10.1111/andr.12320).

58. GIL, FIERRO, BENTANCUR et OLIVERA-MUZANTE, 2011. Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* [en ligne]. juin 2011. Vol. 46, n° 3. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.1111/j.1439-0531.2010.01697.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01697.x). Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20880159/>
59. GILL, KAUFMAN, FOOTE et KIRK, 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *American Journal of Veterinary Research*. octobre 1970. Vol. 31, n° 10, pp. 1807-1813.
60. GOERICKE-PESCH, et FAILING, 2013. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac®. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2013. Vol. 48, n° 2, pp. 213-217. DOI [10.1111/j.1439-0531.2012.02134.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02134.x).
61. GOERICKE-PESCH, KLAUS, FAILING et WEHREND, 2012. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science*. 1 novembre 2012. Vol. 135, n° 1, pp. 97-105. DOI [10.1016/j.anireprosci.2012.08.032](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.032).
62. GOERICKE-PESCH, WEISS et WEHREND, 2011. Bacteriological findings in different fractions of canine ejaculates showing normospermia, teratozoospermia or azoospermia. *Australian Veterinary Journal*. 2011. Vol. 89, n° 8, pp. 318-322. DOI [10.1111/j.1751-0813.2011.00808.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00808.x).
63. GOULETSOU, TSANGARIS, KATSAROU, BOURGANOU, BARBAGIANNI, VENIANAKI, BOUROUTZIKA, ANAGNOSTOPOULOS, FTHENAKIS et KATSAFADOU, 2022. Proteomics Evaluation of Semen of Clinically Healthy Beagle-Breed Dogs. *Veterinary Sciences*. 15 décembre 2022. Vol. 9, n° 12, pp. 697. DOI [10.3390/vetsci9120697](https://doi.org/10.3390/vetsci9120697).
64. GREER, 2015. *Canine reproduction and neonatology: a practical guide for veterinarians, veterinary staff, and breeders*. Jackson, WY : Teton NewMedia. ISBN 978-1-59161-041-0.
65. HERMO, PELLETIER, CYR et SMITH, 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microscopy Research and Technique*. avril 2010. Vol. 73, n° 4, pp. 320-363. DOI [10.1002/jemt.20784](https://doi.org/10.1002/jemt.20784).

66. HORI, MASUDA, KOBAYASHI et KAWAKAMI, 2017. Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. août 2017. Vol. 52, n° 4, pp. 655-660. DOI [10.1111/rda.12963](https://doi.org/10.1111/rda.12963).
67. HORI, YOSHIKUNI, KOBAYASHI et KAWAKAMI, 2014. Effects of Storage Temperature and Semen Extender on Stored Canine Semen. *The Journal of Veterinary Medical Science*. février 2014. Vol. 76, n° 2, pp. 259-263. DOI [10.1292/jvms.13-0303](https://doi.org/10.1292/jvms.13-0303).
<https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6053f7783717068b46cc/pdf/animreprod-9-4-809.pdf>
68. IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001. Evaluation of the « Hamilton Thorn computer-based automated system » for dog semen analysis. *Theriogenology*. 1 février 2001. Vol. 55, n° 3, pp. 733-749. DOI [10.1016/s0093-691x\(01\)00440-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00440-x).
69. IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* [en ligne]. 15 janvier 2001. Vol. 55, n° 2. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.1016/s0093-691x\(01\)00435-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00435-6). Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11233792/>
70. JAMES, CARRELL, ASTONI, JENKINS, YESTE et SALAS-HUETOS, 2020. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 29 juillet 2020. Vol. 21, n° 15, pp. 5377. DOI [10.3390/ijms21155377](https://doi.org/10.3390/ijms21155377).
71. JEYENDRAN, VAN DER VEN et ZANEVELD, 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*. 1992. Vol. 29, n° 2, pp. 105-116. DOI [10.3109/01485019208987714](https://doi.org/10.3109/01485019208987714).
72. JOHNSTON, ROOT KUSTRITZ et OLSON, 2001. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, Pa : Saunders. ISBN 978-0-7216-5607-6.
73. JOUANNET et SERRES, 2013. Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. *médecine/sciences*. 1 février 2013. Vol. 11, pp. 555. DOI [10.4267/10608/2245](https://doi.org/10.4267/10608/2245).
74. KALKAN et UCAR, 2022. Semen Collection, Cryopreservation and Artificial Insemination in Dogs. *J. Health Sci. Inst.*, 7(1):61-69, 2022. . 29 avril 2022. Vol. 7, pp. 61-69.

75. KARGER, ARLT, HAIMERL et HEUWIESER, 2014. A systematic review of studies performing the hypo-osmotic swelling test to evaluate the quality of canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. février 2014. Vol. 49, n° 1, pp. 1-6. DOI [10.1111/rda.12216](https://doi.org/10.1111/rda.12216).
76. KASIMANICKAM, KASIMANICKAM, MEMON et ROGERS, 2012. Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5°C. *Animal Reproduction Science*. décembre 2012. Vol. 136, n° 1-2, pp. 139-145. DOI [10.1016/j.anireprosci.2012.10.024](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.024).
77. KMENTA, STROHMAYER, MÜLLER-SCHLÖSSER et SCHÄFER-SOMI, 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*. 1 avril 2011. Vol. 75, n° 6, pp. 1095-1103. DOI [10.1016/j.theriogenology.2010.11.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.018).
78. KOLSTER, 2018. Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. juillet 2018. Vol. 48, n° 4, pp. 533-545. DOI [10.1016/j.cvsm.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.003).
79. KÖNIG et LIEBICH, (éd.), 2020. *Veterinary anatomy of domestic animals: textbook and colour atlas*. 7th, updated and extended edition. Stuttgart ; New York : Georg Thieme Verlag. ISBN 978-3-13-242933-8.SF761 .V48 2020
80. KÜÇÜK, 2018. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Turkish Journal of Urology*. janvier 2018. Vol. 44, n° 1, pp. 1-5. DOI [10.5152/tud.2018.49321](https://doi.org/10.5152/tud.2018.49321).
81. KUMI-DIAKA et BADTRAM, 1994. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*. 1994. Vol. 41, n° 7, pp. 1355-1366. DOI [10.1016/0093-691x\(94\)90187-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90187-n).
82. KUSUM, 2020. Effect of Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Dog Semen: A Review. *Journal of Animal Research* [en ligne]. 25 décembre 2020. Vol. 10, n° 6. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.30954/2277-940X.06.2020.2](https://doi.org/10.30954/2277-940X.06.2020.2). Disponible à l'adresse : <https://ndpublisher.in/admin/issues/JARv10n6b.pdf>
83. KUTZLER, 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. août 2005. Vol. 64, n° 3, pp. 747-754. DOI [10.1016/j.theriogenology.2005.05.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.023).

84. LE COUAZER et BENCHARIF, Djemil, 2021. Are AKAP4 and proAKAP4 Found in Canine Semen? Preliminary Results. *Aspects of Nanotechnology*. 15 mars 2021. Vol. 3. DOI [10.36959/758/542](https://doi.org/10.36959/758/542).
85. LE GUILLOU, ROPERS, GAILLARD, DAVID-BRIAND, VAN LEEUWEN-IBARROLA, DESHERCES, SCHMITT, BENCHARIF, AMIRAT-BRIAND, ANTON et TAINTURIER, 2016. Sequestration of bovine seminal plasma proteins by different assemblies of phosphatidylcholine: A new technical approach. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 1 avril 2016. Vol. 140, pp. 523-530. DOI [10.1016/j.colsurfb.2015.11.034](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.034).
86. LEAHY et GADELLA, 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*. 1 décembre 2011. Vol. 142, n° 6, pp. 759-778. DOI [10.1530/REP-11-0310](https://doi.org/10.1530/REP-11-0310).
87. LEIS-FILHO et FONSECA-ALVES, 2018. Anatomy, Histology, and Physiology of the Canine Prostate Gland. In : . pp. 1-14. ISBN 978-1-78985-705-4.
88. LINDE FORSBERG, 2001. Biology of Reproduction of the Dog and Modern Reproductive Technology. *The Genetics of the Dog*. 1 janvier 2001.
89. LISBOA, MAZZUCHINI, PAPA et DELL'AQUA, 2021. SPERM ENERGY METABOLISM: Vias metabólicas do espermatozoide. *Veterinária Notícias* [en ligne]. 30 juin 2021. Vol. 27, n° 2. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.14393/VTN-v27n2-2021-54736](https://doi.org/10.14393/VTN-v27n2-2021-54736). Disponible à l'adresse : <https://seer.ufu.br/index.php/vetnot/article/view/54736>
90. LONERGAN, 2018. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 1 janvier 2018. Vol. 12, pp. s4-s18. DOI [10.1017/S175173111800071X](https://doi.org/10.1017/S175173111800071X).
91. LOPES, SIMÕES, FERREIRA, MARTINS-BESSA et ROCHA, 2009. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Animal Reproduction Science*. 1 mai 2009. Vol. 112, n° 1, pp. 158-163. DOI [10.1016/j.anireprosci.2008.04.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.003).
92. LORIN, FLORE, THOMAS et BRASSEUR, [2004]. Les liposomes : description, fabrication et applications. Disponible à l'adresse : <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=17402&file=1&pid=14095>

93. LOSANO et DAIGNEAULT, 2023. Pharmacological perturbation of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma alters motility and mitochondrial function of bovine sperm. *Andrology*. janvier 2023. Vol. 11, n° 1, pp. 155-166. DOI [10.1111/andr.13308](https://doi.org/10.1111/andr.13308).
94. LUCIO, BRITO, ANGRIMANI, BELAZ, MORAIS, ZAMPIERI, LOSANO, ASSUMPCÃO, NICHI, EBERLIN et VANNUCCHI, 2017. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2017. Vol. 52 Suppl 2, pp. 208-213. DOI [10.1111/rda.12860](https://doi.org/10.1111/rda.12860).
95. LUCIO, SILVA, REGAZZI, ANGRIMANI, NICHI, ASSUMPCÃO et VANNUCCHI, 2016. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. *Cryobiology*. avril 2016. Vol. 72, n° 2, pp. 135-140. DOI [10.1016/j.cryobiol.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.001).
96. LUÑO, GONZÁLEZ, MARTÍNEZ, GONZÁLEZ, OLACIREGUI et GIL, 2022. Specific phosphodiesterase type-10 inhibitor, papaverine, added after the cooling period improves canine sperm quality. *Animal Biotechnology*. juin 2022. Vol. 33, n° 3, pp. 519-525. DOI [10.1080/10495398.2020.1811714](https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1811714).
97. LUÑO, SERVIÁN, MARTÍNEZ, BOROBIA, GONZÁLEZ et GIL, 2020. Correlation of Prostatic Artery Blood Flow Assessed by Doppler Ultrasonography with Semen Characteristics in Beagle Dogs. *Animals: an open access journal from MDPI*. 9 novembre 2020. Vol. 10, n° 11, pp. 2077. DOI [10.3390/ani10112077](https://doi.org/10.3390/ani10112077).
98. LUVONI et MORSELLI, 2017. Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great potential. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2017. Vol. 52 Suppl 2, pp. 197-201. DOI [10.1111/rda.12820](https://doi.org/10.1111/rda.12820).
99. LYRIO, LAZARO, SONEGHETI, MOULIN, COSLOP, SARTO, LOUREIRO et FAVORETOG, 2023. Effects of heat stress on sperm quality of French Bulldogs. *Theriogenology*. 15 mars 2023. Vol. 199, pp. 131-137. DOI [10.1016/j.theriogenology.2023.01.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.023).
100. MAHIDDINE et KIM, 2021. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. *Animals*. juillet 2021. Vol. 11, n° 7, pp. 1930. DOI [10.3390/ani11071930](https://doi.org/10.3390/ani11071930).

101. MANJUNATH, [2012]. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. In : *Animal reproduction*. pp. 809-915. Disponible à l'adresse : <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6053f7783717068b46cc>
102. MARTÍNEZ-BARBITTA et RIVERA SALINAS, 2022. Evaluation of Chilled Dog Semen Extended With Sperm Activator. *Frontiers in Veterinary Science*. 11 février 2022. Vol. 8, pp. 764750. DOI [10.3389/fvets.2021.764750](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.764750).
103. MARTÍNEZ, 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*. juillet 2004. Vol. 82-83, pp. 209-224. DOI [10.1016/j.anireprosci.2004.04.024](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.024).
104. MARTINOT, Aline, 2016. *Étude comparative de deux milieux à base de plasma de jaune d'œuf de poule liquide et lyophilisé dans la congélation du sperme de chien*.
105. MEHDIPOUR, DAGHIGH-KIA, NAJAFI, MEHDIPOUR et MOHAMMADI, 2022. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing. *Scientific Reports*. 17 août 2022. Vol. 12, n° 1, pp. 13981. DOI [10.1038/s41598-022-18298-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-18298-2).
106. MICHAEL, ALEXOPOULOS, PONTIKI, HADJIPAVLOU-LITINA, SARATSI, VERVERIDIS et BOSCO, 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. mai 2009. Vol. 112, n° 1-2, pp. 119-135. DOI [10.1016/j.anireprosci.2008.04.007](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.007).
107. MICHAEL, ALEXOPOULOS, PONTIKI, HADJIPAVLOU-LITINA, SARATSI, VERVERIDIS et BOSCO, 2010. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2010. Vol. 45, n° 2, pp. 201-207. DOI [10.1111/j.1439-0531.2008.01202.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01202.x).
108. MICKELSEN, MEMON, ANDERSON et FREEMAN, 1993. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*. février 1993. Vol. 39, n° 2, pp. 553-560. DOI [10.1016/0093-691x\(93\)90397-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90397-n).

109. MILLER, SCHLOSSER, PALAZZOLO, VERONESI, EBERINI et GIANAZZA, 2020. Some more about dogs: Proteomics of neglected biological fluids. *Journal of Proteomics*. 30 avril 2020. Vol. 218, pp. 103724. DOI [10.1016/j.jprot.2020.103724](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103724).
110. MITJANA, AUSEJO, MENDOZA, MIGUEL, TEJEDOR, GARRIDO et FALCETO, 2022. Photoperiod and Melatonin Supplementation: Variable Effects on the Quality of Chilled Dog Semen. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. Vol. 9, pp. 956630. DOI [10.3389/fvets.2022.956630](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.956630).
111. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, KOWALSKA, FRASER et KORDAN, 2015. Proteomic Characterization of Zinc-Binding Proteins of Canine Seminal Plasma. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2015. Vol. 50, n° 6, pp. 1017-1021. DOI [10.1111/rda.12629](https://doi.org/10.1111/rda.12629).
112. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, STRZEŻEK, WASILEWSKA et KORDAN, 2015. Prostatomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juin 2015. Vol. 50, n° 3, pp. 484-491. DOI [10.1111/rda.12516](https://doi.org/10.1111/rda.12516).
113. MORRELL et WALLGREN, 2014. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens*. décembre 2014. Vol. 3, n° 4, pp. 934-946. DOI [10.3390/pathogens3040934](https://doi.org/10.3390/pathogens3040934).
114. MORTIMER et TAN, 1986. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human Reproduction (Oxford, England)*. août 1986. Vol. 1, n° 5, pp. 299-303. DOI [10.1093/oxfordjournals.humrep.a136409](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136409).
115. MUECKLER, 1994. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry*. 1 février 1994. Vol. 219, n° 3, pp. 713-725. DOI [10.1111/j.1432-1033.1994.tb18550.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18550.x).
116. MUKAI et OKUNO, 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*. août 2004. Vol. 71, n° 2, pp. 540-547. DOI [10.1095/biolreprod.103.026054](https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026054).

117. NAZERI, NIASARI-NASLAJI, GHASEMZADEH-NAVA et PANAH, 2023. The effect of varying concentrations of chicken plasma egg yolk and glycerol on the viability of canine sperm following short and long-term preservation. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2023. Vol. 24, n° 1, pp. 6-13. DOI [10.22099/IJVR.2022.43403.6339](https://doi.org/10.22099/IJVR.2022.43403.6339).
118. NEVES, HENEINE et HENRY, 2014. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. juin 2014. Vol. 66, pp. 769-777. DOI [10.1590/1678-41626184](https://doi.org/10.1590/1678-41626184).
119. NGUYEN, PONCHUNCHOOVONG, KUPITTAYANANT et KUPITTAYANANT, 2019. Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. *Veterinary Medicine and Science*. août 2019. Vol. 5, n° 3, pp. 345-360. DOI [10.1002/vms3.158](https://doi.org/10.1002/vms3.158).
120. NIŻAŃSKI, PARTYKA, et RIJSSELAERE, 2012. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2012. Vol. 47 Suppl 6, pp. 215-221. DOI [10.1111/rda.12048](https://doi.org/10.1111/rda.12048).
121. NOAKES, PARKINSON et ENGLAND, (éd.), 2019. *Veterinary reproduction and obstetrics*. Tenth edition. Edinburgh, Scotland : Elsevier. ISBN 978-0-7020-7233-8.SF887 .V48 2019
122. NOBLANC, KOCER, CHABORY, VERNET, SAEZ, CADET, CONRAD et DREVET, 2011. Glutathione Peroxidases at Work on Epididymal Spermatozoa: An Example of the Dual Effect of Reactive Oxygen Species on Mammalian Male Fertilizing Ability. *Journal of Andrology*. 2011. Vol. 32, n° 6, pp. 641-650. DOI [10.2164/jandrol.110.012823](https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012823).
123. NOURI GHARAJELAR, SADRKHANLOO, ONSORI et SABERIVAND, 2016. A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary Research Forum*. 2016. Vol. 7, n° 3, pp. 235-239.
124. NÚÑEZ-MARTINEZ, MORAN et PEÑA, 2005. Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2005. Vol. 40, n° 6, pp. 537-543. DOI [10.1111/j.1439-0531.2005.00628.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00628.x).

125. O'FLAHERTY, 2019. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*. septembre 2019. Vol. 7, n° 5, pp. 662-668. DOI [10.1111/andr.12630](https://doi.org/10.1111/andr.12630).
126. ORTIZ-RODRIGUEZ, SILVA, MASOT, REDONDO, GAZQUEZ, TAPIA, GIL, ORTEGA-FERRUSOLA et PEÑA, 2019. Rosiglitazone in the thawing medium improves mitochondrial function in stallion spermatozoa through regulating Akt phosphorylation and reduction of caspase 3. *PLOS ONE*. 5 juillet 2019. Vol. 14, n° 7, pp. e0211994. DOI [10.1371/journal.pone.0211994](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211994).
127. PEÑA, NÚÑEZ-MARTÍNEZ et MORÁN, 2006. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. octobre 2006. Vol. 41 Suppl 2, pp. 21-29. DOI [10.1111/j.1439-0531.2006.00766.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00766.x).
128. PINTO, PACCAMONTI et EILTS, 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*. septembre 1999. Vol. 52, n° 4, pp. 609-616. DOI [10.1016/S0093-691X\(99\)00156-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00156-9).
129. PONGLOWHAPAN, ESSÉN-GUSTAVSSON et LINDE FORSBERG, 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*. novembre 2004. Vol. 62, n° 8, pp. 1498-1517. DOI [10.1016/j.theriogenology.2004.02.014](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.014).
130. PRETE, CIANI, TAFURI, PASOLINI, VALLE, PALUMBO, ABBONDANTE, CALAMO, BARBATO, GUALTIERI, TALEVI et COCCHIA, 2018. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. *Journal of Veterinary Science*. 30 septembre 2018. Vol. 19, n° 5, pp. 667-675. DOI [10.4142/jvs.2018.19.5.667](https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.5.667).
131. PROVINCE, AMANN, PICKETT et SQUIRES, 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*. 1 octobre 1984. Vol. 22, n° 4, pp. 409-415. DOI [10.1016/0093-691X\(84\)90461-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90461-8).
132. RAMOS ANGRIMANI, NICHI, LOSANO, LUCIO, LIMA VEIGA, FRANCO et VANNUCCHI, 2017. Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017. Vol. 8, pp. 18. DOI [10.1186/s40104-017-0148-6](https://doi.org/10.1186/s40104-017-0148-6).

133. RIGAU, FARRÉ, BALLESTER, MOGAS, PEÑA et RODRÍGUEZ-GIL, 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 15 septembre 2001. Vol. 56, n° 5, pp. 801-815. DOI [10.1016/s0093-691x\(01\)00609-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00609-4).
134. RIJSSELAERE, 2011. Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* [en ligne]. 20 juin 2011. Vol. 80, n° 3. [Consulté le 12 mars 2024]. DOI [10.21825/vdt.87276](https://doi.org/10.21825/vdt.87276). Disponible à l'adresse : <https://openjournals.ugent.be/vdt/article/id/87276/>
135. RIJSSELAERE, VAN SOOM, HOFLACK, MAES et DE KRUIF, 2004. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*. 1 octobre 2004. Vol. 62, n° 7, pp. 1292-1306. DOI [10.1016/j.theriogenology.2004.01.005](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.005).
136. RIJSSELAERE, VAN SOOM, MAES et DE KRUIF, 2002. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 1 avril 2002. Vol. 57, n° 6, pp. 1669-1681. DOI [10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5).
137. RIJSSELAERE, VAN SOOM, MAES et KRUIF, 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*. 1 novembre 2003. Vol. 60, n° 8, pp. 1553-1568. DOI [10.1016/S0093-691X\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00171-7).
138. RIJSSELAERE, VAN SOOM, MAES et NIZANSKI, 2012. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2012. Vol. 47 Suppl 6, pp. 204-207. DOI [10.1111/rda.12057](https://doi.org/10.1111/rda.12057).
139. RIJSSELAERE, VAN SOOM, MAES, VERBERCKMOES et DE KRUIF, 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. mai 2004. Vol. 61, n° 7-8, pp. 1589-1602. DOI [10.1016/j.theriogenology.2003.09.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.008).
140. RODENAS, PARRILLA, ROCA, MARTINEZ et LUCAS, 2014. Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates. *Theriogenology*. 1 septembre 2014. Vol. 82, n° 4, pp. 621-626. DOI [10.1016/j.theriogenology.2014.05.022](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.022).

141. RODRIGUEZ-GIL, 2006. Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. octobre 2006. Vol. 41 Suppl 2, pp. 11-20. DOI [10.1111/j.1439-0531.2006.00765.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00765.x).
142. RODRIGUEZ-GIL, 2013. Energy Management of Mature Mammalian Spermatozoa. In : LEMMA, Alemayehu (éd.) [en ligne]. InTech. 9 janvier 2013. [Consulté le 12 mars 2024]. ISBN 978-953-51-0920-4. Disponible à l'adresse : <http://www.intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/energy-management-of-mature-mammalian-spermatozoa>
143. ROOT KUSTRITZ, 2007. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 1 août 2007. Vol. 68, n° 3, pp. 329-337. DOI [10.1016/j.theriogenology.2007.04.017](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.017).
144. Rosiglitazone : substance active à effet thérapeutique, VIDAL [en ligne]. [Consulté le 12 mars 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/rosiglitazone-21808.html>
145. ROTA, PEÑA, LINDE-FORSBERG et RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*. 15 décembre 1999. Vol. 57, n° 3-4, pp. 199-215. DOI [10.1016/s0378-4320\(99\)00056-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00056-1).
146. SÁNCHEZ-CALABUIG, MAILLO, BELTRÁN-BREÑA, DE LA FUENTE MARTÍNEZ, GALERA-CARRILLO, PÉREZ-GUTIÉRREZ et PÉREZ-CEREZALES, 2017. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reproductive Biology*. 1 septembre 2017. Vol. 17, n° 3, pp. 233-238. DOI [10.1016/j.repbio.2017.05.007](https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.05.007).
147. SANTI, ORTA, SALKOFF, VISCONTI, DARSZON et TREVIÑO, 2013. K⁺ and Cl⁻ Channels and Transporters in Sperm Function. *Current topics in developmental biology*. 2013. Vol. 102, pp. 385-421. DOI [10.1016/B978-0-12-416024-8.00014-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00014-3).
148. SANTORO, DE AMICIS, AQUILA et BONOFIOLIO, 2020. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression along the male genital system and its role in male fertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 1 septembre 2020. Vol. 35, n° 9, pp. 2072-2085. DOI [10.1093/humrep/deaa153](https://doi.org/10.1093/humrep/deaa153).

149. SANTOS, MARCOS et CANIATTI, 2010. Cytologic study of normal canine testis. *Theriogenology*. 15 janvier 2010. Vol. 73, n° 2, pp. 208-214. DOI [10.1016/j.theriogenology.2009.07.030](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.030).
150. SCHÄFER-SOMI et TICHY, 2019. Canine post-thaw sperm quality can be predicted by using CASA, and classification and regression tree (CART)-analysis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. mars 2019. Vol. 22, n° 1, pp. 51-59. DOI [10.24425/pjvs.2018.125607](https://doi.org/10.24425/pjvs.2018.125607).
151. SCHATTEN et CONSTANTINESCU, (éd.), 2007. *Comparative reproductive biology*. 1st ed. Ames, Iowa : Blackwell Pub. ISBN 978-0-8138-1554-1.SF871 .C56 2007
152. SIEME, OLDENHOF et WOLKERS 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 1 juin 2016. Vol. 169, pp. 2-5. DOI [10.1016/j.anireprosci.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004).
153. SIEME, OLDENHOF et WOLKERS, 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. septembre 2015. Vol. 50 Suppl 3, pp. 20-26. DOI [10.1111/rda.12594](https://doi.org/10.1111/rda.12594).
154. SILVA et GADELLA, 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 15 mars 2006. Vol. 65, n° 5, pp. 958-978. DOI [10.1016/j.theriogenology.2005.09.010](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010).
155. SILVESTRE, YÁNIZ, PEÑA, SANTOLARIA et CASTELLÓ-RUIZ, 2021. Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 8 juillet 2021. Vol. 10, n° 7, pp. 1096. DOI [10.3390/antiox10071096](https://doi.org/10.3390/antiox10071096).
156. SOLER, ALAMBIAGA, MARTÍ, GARCÍA-MOLINA, VALVERDE, CONTELL et CAMPOS, 2017. Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian Journal of Andrology*. 2017. Vol. 19, n° 2, pp. 149-153. DOI [10.4103/1008-682X.189207](https://doi.org/10.4103/1008-682X.189207).
157. SONGSASEN, MURTON, PACCAMONTI, EILTS, GODKE et LEIBO, 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*. février 2002. Vol. 44, n° 1, pp. 79-90. DOI [10.1016/S0011-2240\(02\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00009-3).

158. STANGER, VO, YOVICH et ALMAHBOBI, 2010. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reproductive BioMedicine Online*. 1 octobre 2010. Vol. 21, n° 4, pp. 474-484. DOI [10.1016/j.rbmo.2010.06.026](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.026).
159. STEIN, PELLIN, STEINBERG, et CHUN, 2010. Treatment of Feline Gastrointestinal Small-Cell Lymphoma With Chlorambucil and Glucocorticoids. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2010. Vol. 46, n° 6, pp. 413-417.
160. SUGAI, WERRE, CECERE et BALOGH, 2023. Comparing different sperm concentrations for optimizing cooled semen use in the dog. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023. Vol. 10, pp. 1339840. DOI [10.3389/fvets.2023.1339840](https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1339840).
161. SULLIVAN et SAEZ, 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*. 1 juillet 2013. Vol. 146, n° 1, pp. R21-R35. DOI [10.1530/REP-13-0058](https://doi.org/10.1530/REP-13-0058).
162. SULLIVAN, SAEZ, GIROUARD et FRENETTE, 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2005. Vol. 35, n° 1, pp. 1-10. DOI [10.1016/j.bcmd.2005.03.005](https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.005).
163. SURMACZ, NIWINSKA, KAUTZ, GIZINSKI et FAUNDEZ, 2022. Comparison of two staining techniques on the manual and automated canine sperm morphology analysis. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juin 2022. Vol. 57, n° 6, pp. 678-684. DOI [10.1111/rda.14100](https://doi.org/10.1111/rda.14100).
164. SUZUKI, WATANABE, ABE, 2022. Assisted reproductive techniques for canines: preservation of genetic material in domestic dogs. *Journal of Reproduction and Development*. 2022. Vol. 68, n° 1, pp. 1-11. DOI [10.1262/jrd.2021-111](https://doi.org/10.1262/jrd.2021-111).
165. SWEGEN, LAMBOURNE, AITKEN et GIBB, 2016. Rosiglitazone Improves Stallion Sperm Motility, ATP Content, and Mitochondrial Function. *Biology of Reproduction*. novembre 2016. Vol. 95, n° 5, pp. 107. DOI [10.1095/biolreprod.116.142687](https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142687).
166. TAINTURIER, BENCHARIF, BRIAND et TOPIE, 2013. Production et conservation de la semence animale. . 2013.

167. TANGA, QAMAR, RAZA, BANG, FANG, YOON et CHO, 2021. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. *Animal Bioscience*. août 2021. Vol. 34, n° 8, pp. 1253-1270. DOI [10.5713/ab.21.0072](https://doi.org/10.5713/ab.21.0072).
168. TAPIA, MACIAS-GARCIA, MIRO-MORAN, ORTEGA-FERRUSOLA, SALIDO, PEÑA et APARICIO, 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juin 2012. Vol. 47 Suppl 3, pp. 65-75. DOI [10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x).
169. THIBAUT et LEVASSEUR, 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Nouv. éd... ref. Paris : INRA Ellipses. ISBN 978-2-7380-0971-5.571.8
170. TOSHIMORI, 2003. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique*. 1 mai 2003. Vol. 61, n° 1, pp. 1-6. DOI [10.1002/jemt.10311](https://doi.org/10.1002/jemt.10311).
171. TREULEN, SÁNCHEZ et RISOPATRÓN, 2012. Effects of seminal fluid fractions on plasma and acrosome membrane integrity and mitochondrial membrane potential determined by flow cytometry in chilled canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2012. Vol. 47, n° 6, pp. 1043-1048. DOI [10.1111/j.1439-0531.2012.02011.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02011.x).
172. TSIKIS, REYNAUD, FERCHAUD et DRUART, 2018. Seminal plasma differentially alters the resistance of dog, ram and boar spermatozoa to hypotonic stress. *Animal Reproduction Science*. juin 2018. Vol. 193, pp. 1-8. DOI [10.1016/j.anireprosci.2018.01.012](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.012).
173. TULSIANI, ABOU-HAILA, LOESER et PEREIRA, 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research*. 1 mai 1998. Vol. 240, n° 2, pp. 151-164. DOI [10.1006/excr.1998.3943](https://doi.org/10.1006/excr.1998.3943).
174. VAN DER HORST, 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science*. septembre 2020. Vol. 220, pp. 106350. DOI [10.1016/j.anireprosci.2020.106350](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106350).

175. VARELA JUNIOR, CORCINI, ULGUIM, ALVARENGA, BIANCHI, CORRÊA, LUCIA et DESCHAMPS, 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science*. 1 octobre 2009. Vol. 115, n° 1, pp. 323-327. DOI [10.1016/j.anireprosci.2008.11.002](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.002).
176. VARESI, VERNOCCHI, FAUSTINI et LUVONI, 2013. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 26 février 2013. Vol. 55, n° 1, pp. 17. DOI [10.1186/1751-0147-55-17](https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17).
177. VERNET, AITKEN et DREVET, 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 15 mars 2004. Vol. 216, n° 1-2, pp. 31-39. DOI [10.1016/j.mce.2003.10.069](https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069).
178. VERSTEGEN, IGUER-OUADA et ONCLIN, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 1 janvier 2002. Vol. 57, n° 1, pp. 149-179. DOI [10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).
179. VERSTEGEN, ONCLIN, et IGUER-OUADA, 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*. août 2005. Vol. 64, n° 3, pp. 720-733. DOI [10.1016/j.theriogenology.2005.05.035](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.035).
180. VIANA, RIBEIRO, CARVALHO, MEMILI, MOURA et MACHADO-NEVES, 2021. Functional attributes of seminal proteins in bull fertility: a systematic review. *Reproduction*. 1 avril 2021. Vol. 161, n° 4, pp. 459-475. DOI [10.1530/REP-20-0392](https://doi.org/10.1530/REP-20-0392).
181. VIEIRA, LOSANO, ANGRIMANI, KAWAI, BICUDO, RUI, DA SILVA, ASSUMPÇÃO et NICHI, 2018. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*. 1 mars 2018. Vol. 108, pp. 39-45. DOI [10.1016/j.theriogenology.2017.11.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.020).
182. WALTERS, BENSON, WOODS et CRITSER, 2009. The history of sperm cryopreservation. In : PACEY, Allan A. et TOMLINSON, Mathew J. (éd.), *Sperm Banking: Theory and Practice* [en ligne]. Cambridge : Cambridge University Press. pp. 1-17. [Consulté le 12 mars 2024]. ISBN 978-0-521-61128-2. Disponible à l'adresse : <https://www.cambridge.org/core/books/sperm-banking/history-of-sperm-cryopreservation/8B2E9F9E97CBCC20CD704ACBBAD69FAF>

183. WANG, YANG, GUO, WANG, SUN, WANG, SUN, SUN, YUE et ZHOU, 2019. Protective influence of rosiglitazone against time-dependent deterioration of boar spermatozoa preserved at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. août 2019. Vol. 54, n° 8, pp. 1069-1077. DOI [10.1111/rda.13469](https://doi.org/10.1111/rda.13469).
184. WATTS, 2019. Development of a fluorescent computer-assisted spermatozoal quantification method and a comparison of results for manual counting with a haemocytometer and computer-assisted semen analysis in dogs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. novembre 2019. Vol. 54, n° 11, pp. 1477-1488. DOI [10.1111/rda.13553](https://doi.org/10.1111/rda.13553).
185. YOKONISHI et CAPEL, 2021. Differentiation of fetal sertoli cells in the adult testis. *Reproduction*. 1 août 2021. Vol. 162, n° 2, pp. 141-147. DOI [10.1530/REP-21-0106](https://doi.org/10.1530/REP-21-0106).

ANNEXES

Annexe 1 : Données brutes issues de l'analyse CASA

CHIEN	NOM	TEMPS	MILIEU	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	ÉLONGATION	MOBILITÉ	MOBILITÉ PROGRESSIVE
1	parker	0	AUCUN	111,3	100,3	148	5,6	27,5	88	67	41	81	65
2	nostromo	0	AUCUN	155,4	128,7	204,4	6,8	25,1	80	63	48	98	68
3	apollo	0	AUCUN	95,4	80,9	135,1	5,6	32,1	81	58	49	91	55
4	rowdy	0	AUCUN	143,6	119,7	208,5	7,4	33,5	79	55	59	95	61
5	stormfire	0	AUCUN	117,8	97,2	172,9	7	30	75	53	46	81	43
6	hermes	0	AUCUN	143,2	121,5	197,7	6,8	30,8	80	59	63	80	53
7	stan	0	AUCUN	151,7	130,7	206,8	6,8	34,7	83	62	42	94	67
8	tom	0	AUCUN	128,7	111,8	177,6	6,6	18,6	84	62	57	96	70
9	spirit	0	AUCUN	135,2	112,1	189,6	6,3	33,4	79	58	46	95	59
10	nostromo	0	AUCUN	108	87	159,7	6,6	30	75	52	42	89	47
11	stormfire	0	AUCUN	159,5	132,5	252,7	8,7	34,5	80	52	47	96	67
12	VASCO	0	AUCUN	69,8	56,7	108,8	6,3	26	78	52	46	85	35
13	VOICE	0	AUCUN	113,2	92,2	166,9	7	27,1	76	51	60	93	48
14	VIRUS	0	AUCUN	106,6	94,7	146,6	6	28,4	84	61	53	89	59
15	SPIRIT	0	AUCUN	138,8	120,2	183,3	6,6	27,1	82	62	50	90	61
16	NOSTROMO	0	AUCUN	133,9	114,8	174,9	6,3	25,2	81	63	67	94	64
17	STORMFIRE	0	AUCUN	165,2	155,1	206,4	6,2	24,3	92	75	62	93	83
18	LOCKNESS	0	AUCUN	114,4	107,1	162,3	5,7	35,1	91	65	43	68	60
19	APOLLO	0	AUCUN	71,6	62,5	110,2	5,6	28,4	85	57	47	80	44
20	ROWDY	0	AUCUN	115,9	98,4	177,9	7,1	33	81	54	47	86	57
1	parker	0	BOTUDOG	113,7	106,4	156,3	5,4	33,2	91	68	41	59	51
2	nostromo	0	BOTUDOG	147,8	136,3	172,6	5,2	23,2	91	78	56	96	83
3	apollo	0	BOTUDOG	76,3	62,6	117,8	6	31	77	51	48	85	35
4	rowdy	0	BOTUDOG	106,7	82,4	182,6	7,9	29,5	74	44	52	92	50
5	stormfire	0	BOTUDOG	98,2	89,8	128,7	4,8	28,6	85	67	47	58	37
6	hermes	0	BOTUDOG	143,5	134,3	166,6	4,9	25,9	90	76	60	86	68
7	stan	0	BOTUDOG	143,5	135,7	177,9	5,6	29,9	92	74	42	88	72
8	tom	0	BOTUDOG	113,1	104,2	137,6	5,2	23,9	88	71	55	79	56
9	spirit	0	BOTUDOG	136,8	127,3	172,8	5,6	34,1	89	71	47	87	70
10	nostromo	0	BOTUDOG	127,9	118,9	155,4	5,4	23,8	90	73	44	79	61
11	stormfire	0	BOTUDOG	155,5	146,2	182,1	4,9	30	92	79	50	91	80
12	VASCO	0	BOTUDOG	68,7	59,8	95,3	5	26,6	83	59	51	81	35
13	VOICE	0	BOTUDOG	98,5	84,6	139,2	5,9	31,6	80	57	47	86	47
14	VIRUS	0	BOTUDOG	75,6	64,1	110,2	5,2	31	80	56	43	84	39
15	SPIRIT	0	BOTUDOG	138,8	131,6	162,9	5	29,1	91	76	46	82	64
16	NOSTROMO	0	BOTUDOG	136,6	128,3	159,2	5	21,3	91	78	49	86	72
17	STORMFIRE	0	BOTUDOG	134,2	127,7	157	4,3	31,7	92	78	57	79	65
18	LOCKNESS	0	BOTUDOG	128,7	122,2	165,4	5,2	33,6	93	73	50	66	56
19	APOLLO	0	BOTUDOG	73,8	66,6	100,4	4,9	23,5	88	67	53	78	45
20	ROWDY	0	BOTUDOG	124,8	113,6	175,1	7,1	27	88	64	56	84	61
1	parker	0	CANI EX LT	113,4	103,2	157,4	6,2	24,3	89	66	37	68	57
2	nostromo	0	CANI EX LT	154,8	138,4	189,4	6,8	18,7	88	73	44	98	81
3	apollo	0	CANI EX LT	99,7	84	138,7	6,2	21,8	81	59	47	92	56

4	rowdy	0	CANI EX LT	141	112,7	215,3	8,7	24,1	77	52	54	96	60
5	stormfire	0	CANI EX LT	112	100,7	145,1	6,4	22,5	86	67	43	86	57
6	hermes	0	CANI EX LT	142,1	130,9	176,6	6,2	24,8	88	71	52	86	66
7	stan	0	CANI EX LT	150,7	142,6	197	6,9	29,8	91	70	46	89	75
8	tom	0	CANI EX LT	115,3	106,3	148,7	6,9	22,5	88	68	53	78	57
9	spirit	0	CANI EX LT	155,3	142,7	220	7,2	35,8	90	64	46	85	72
10	nostromo	0	CANI EX LT	119,9	105,7	174,3	7,6	23,6	84	60	63	83	60
11	stormfire	0	CANI EX LT	165,1	158,9	199,1	5,9	27,4	96	80	47	90	87
12	VASCO	0	CANI EX LT	68,3	57,4	110,5	6	29,2	81	52	49	83	38
13	VOICE	0	CANI EX LT	123,8	114,9	169,1	6,8	30,7	89	64	47	90	63
14	VIRUS	0	CANI EX LT	96	86,5	147,8	6,5	31,6	89	57	39	87	61
15	SPIRIT	0	CANI EX LT	130,7	115,4	172	6,7	24,1	83	64	46	89	62
16	NOSTROMO	0	CANI EX LT	123,6	103,7	173	7,2	21	80	60	43	93	64
17	STORMFIRE	0	CANI EX LT	158,9	153,4	195	6	28	95	78	56	84	78
18	LOCKNESS	0	CANI EX LT	127,2	118,1	198,4	8	29,7	91	60	59	55	49
19	APOLLO	0	CANI EX LT	77,8	65,9	127,2	6,6	26,3	82	53	48	83	47
20	ROWDY	0	CANI EX LT	62,8	54,3	92,3	6,4	22,5	83	59	50	73	27
17	STORMFIRE	0	CANI EX LT+D	149	140,3	181,6	5,7	25,9	92	75	58	88	75
1	parker	0	CANI EX LT+R	114,7	104,9	157,9	6,5	21,9	89	67	39	72	62
2	nostromo	0	CANI EX LT+R	155,5	141,2	189	6,7	19,6	89	74	46	97	83
3	apollo	0	CANI EX LT+R	95,3	81,7	131,1	5,9	22,8	82	61	57	90	55
4	rowdy	0	CANI EX LT+R	144,4	115,2	218,5	8,7	22	77	53	67	97	63
5	stormfire	0	CANI EX LT+R	115,4	103,2	150,5	6,5	21	85	66	44	82	58
6	hermes	0	CANI EX LT+R	149,7	138,8	182,9	6,1	24,5	89	73	54	90	72
7	stan	0	CANI EX LT+R	133,9	118,9	173,9	6,6	23,2	85	66	50	92	68
8	tom	0	CANI EX LT+R	122,6	112,2	157,3	6,5	23,7	88	68	44	85	62
9	spirit	0	CANI EX LT+R	151,9	139,9	213,1	6,9	37,2	88	64	46	82	66
10	nostromo	0	CANI EX LT+R	124,9	109,2	170,1	6,8	22,4	84	63	42	87	62
11	stormfire	0	CANI EX LT+R	163,9	156,6	199,8	6	27,9	95	79	46	93	88
12	VASCO	0	CANI EX LT+R	88,4	69,5	138,6	6,4	25	76	51	42	92	48
13	VOICE	0	CANI EX LT+R	118,8	110,4	164,9	6,7	31	89	63	47	90	64
14	VIRUS	0	CANI EX LT+R	112,3	103,9	151,7	6,1	25,8	90	66	51	85	65
15	SPIRIT	0	CANI EX LT+R	131,5	118	173,8	6,8	24,2	85	64	47	86	60
16	NOSTROMO	0	CANI EX LT+R	145,6	139	193,2	6,9	27,1	94	73	47	89	82
18	LOCKNESS	0	CANI EX LT+R	125,6	113,7	188,8	7,4	30,2	88	60	55	65	54
19	APOLLO	0	CANI EX LT+R	74,6	63,6	117	6,1	27,8	83	55	50	86	45
20	ROWDY	0	CANI EX LT+R	136,8	104,3	241	10	26,9	73	43	50	92	52
1	parker	0	CANI EX ST	112,5	105	158,8	5,8	29,9	92	67	44	72	64
2	nostromo	0	CANI EX ST	139,5	127,7	165,3	6,2	16	90	77	44	97	84
3	apollo	0	CANI EX ST	67,1	52	121,7	7,2	30,7	73	42	46	63	23
4	rowdy	0	CANI EX ST	120,3	99,4	174,3	6,9	28,4	79	55	49	92	57
5	stormfire	0	CANI EX ST	100,8	93,1	124,8	4,6	24,3	86	70	55	72	44
6	hermes	0	CANI EX ST	150	142,5	176	5,2	26,5	93	78	53	85	73
7	stan	0	CANI EX ST	144,5	133,1	174,9	5,3	29,2	90	74	50	89	72
8	tom	0	CANI EX ST	112,5	104,3	138,3	5,2	24,4	89	71	52	78	55
9	spirit	0	CANI EX ST	115,4	96,2	156,1	5,7	30,5	79	59	47	89	55
10	nostromo	0	CANI EX ST	110,3	99,7	145,4	6,1	22,8	85	65	44	74	54
11	stormfire	0	CANI EX ST	161,7	154,2	189	4,9	31,3	95	82	54	91	84
12	VASCO	0	CANI EX ST	45,3	36,3	76,2	6,1	28,1	78	50	46	32	8

13	VOICE	0	CANI EX ST	85	72,7	119	5,7	25,7	81	58	49	80	41
14	VIRUS	0	CANI EX ST	56,7	47,3	90,8	5,1	28	79	52	49	32	13
15	SPIRIT	0	CANI EX ST	103,1	89,9	138,7	5,5	28,3	82	62	55	83	52
16	NOSTROMO	0	CANI EX ST	49,1	40,2	76,3	5,6	29,7	80	53	52	51	15
17	STORMFIRE	0	CANI EX ST	142,5	134,5	167,3	4,5	29,8	92	78	52	81	68
18	LOCKNESS	0	CANI EX ST	114,7	106,8	162,2	5,9	32,4	91	64	60	67	54
19	APOLLO	0	CANI EX ST	56,1	46,2	87,9	6,4	25,9	79	53	53	56	15
20	ROWDY	0	CANI EX ST	113,9	98,2	168,4	7,6	25,7	83	57	51	70	45
1	parker	0	CHILL LT	115,4	107,6	163,3	5,9	31	92	66	38	65	58
2	nostromo	0	CHILL LT	163,5	149,2	201,1	6,2	26,7	90	74	49	92	79
3	apollo	0	CHILL LT	93,8	80,1	134,7	6	28	82	58	42	88	53
4	rowdy	0	CHILL LT	141,2	112,7	214,4	8,2	28,8	75	51	55	95	56
5	stormfire	0	CHILL LT	117,8	107,2	156,7	6,1	26	84	64	53	64	39
6	hermes	0	CHILL LT	148,2	138,3	182	5,9	26,7	90	73	50	88	69
7	stan	0	CHILL LT	151,8	141,9	196,5	6,3	33,2	91	70	51	88	73
8	tom	0	CHILL LT	119,8	109,5	157,5	6,5	24,8	87	66	49	86	59
9	spirit	0	CHILL LT	152	141,5	207,2	6,6	37	91	67	52	82	68
10	nostromo	0	CHILL LT	135,9	122,9	181,6	6,4	27,7	87	66	64	84	64
11	stormfire	0	CHILL LT	163,7	153,9	198,6	5,8	28,7	93	77	47	92	84
12	VASCO	0	CHILL LT	81,6	74,1	107,8	4,8	26	88	66	55	87	55
13	VOICE	0	CHILL LT	105,7	87,6	160,4	7	31,6	77	51	42	90	48
14	VIRUS	0	CHILL LT	111,7	105,3	141,5	4,9	32,2	92	71	41	88	65
15	SPIRIT	0	CHILL LT	151,5	144,8	196,4	6,6	31,4	93	71	60	89	77
16	NOSTROMO	0	CHILL LT	133,6	113,5	172,8	6,2	24,6	80	62	50	94	59
17	STORMFIRE	0	CHILL LT	152,8	147,7	180,2	5,2	28,7	95	80	44	83	75
18	LOCKNESS	0	CHILL LT	118,1	110,4	173,3	6,5	32,9	91	63	42	52	44
19	APOLLO	0	CHILL LT	71,9	65,4	102,2	5,2	22,8	90	66	51	83	49
20	ROWDY	0	CHILL LT	124,8	96,8	218,6	9,5	28	74	44	57	90	50
1	parker	0	CHILL ST	111,8	102,8	159,5	5,9	30,4	90	64	59	74	61
2	nostromo	0	CHILL ST	129,8	99,6	205,3	8,1	22,2	74	49	40	98	58
3	apollo	0	CHILL ST	91	73,4	139,4	6,4	26,7	77	53	46	90	49
4	rowdy	0	CHILL ST	145	117,1	217,2	8,2	28,7	76	52	46	95	58
5	stormfire	0	CHILL ST	121,6	108,2	164,9	6,2	26,9	84	64	46	83	53
6	hermes	0	CHILL ST	143,6	133,1	172,7	5,7	23,4	90	74	50	85	68
7	stan	0	CHILL ST	137,4	129,9	171,3	5,6	29,4	91	73	45	81	65
8	tom	0	CHILL ST	119,3	109,6	155	6,5	25,2	88	67	44	86	61
9	spirit	0	CHILL ST	141,2	122,3	201,1	7,4	33,2	81	58	44	88	60
10	nostromo	0	CHILL ST	134	121,6	179,6	6,4	29	87	66	46	77	58
11	stormfire	0	CHILL ST	163,5	156,2	197,7	5,9	27,6	95	79	59	92	87
12	VASCO	0	CHILL ST	79,2	70,9	109,2	5,1	27,7	86	63	54	85	48
13	VOICE	0	CHILL ST	119,4	103,3	170,3	6,8	31	81	57	45	89	54
14	VIRUS	0	CHILL ST	108,3	101,3	138	4,7	33,1	90	69	72	92	66
15	SPIRIT	0	CHILL ST	144,2	134,1	183,5	6,3	30,7	89	69	44	83	61
16	NOSTROMO	0	CHILL ST	140,6	125,8	172,7	5,9	23,4	85	69	48	91	66
17	STORMFIRE	0	CHILL ST	127	109,6	168,1	6,2	27,5	82	62	61	93	63
18	LOCKNESS	0	CHILL ST	118,9	110,3	166,6	6,4	32,9	89	64	42	59	47
19	APOLLO	0	CHILL ST	68,5	60,3	102,4	5,6	23,7	87	61	50	77	42
20	ROWDY	0	CHILL ST	125,3	105,3	213	9,3	29,8	81	50	55	89	62
1	parker	0	JO+R	111	103,1	146,4	5,7	24,2	91	70	46	74	63

2	nostromo	0	JO+R	132,1	110,5	190	8,4	22,4	80	57	50	92	64
3	apollo	0	JO+R	66	49,7	119,4	6,5	29,1	73	43	58	78	27
4	rowdy	0	JO+R	104,6	84,3	173	7,9	25,4	77	48	61	93	56
5	stormfire	0	JO+R	125,9	119,9	149,3	4,5	24,5	93	78	52	50	43
6	hermes	0	JO+R	147,3	133,5	183,6	6,1	26,5	85	69	51	92	67
7	stan	0	JO+R	129,3	120,6	172,3	6,3	32,4	89	66	45	88	62
8	tom	0	JO+R	110	100,5	141,1	6	23,2	87	67	54	86	57
9	spirit	0	JO+R	117,1	105,1	149,3	5,3	27,2	87	69	52	86	67
10	nostromo	0	JO+R	107	90,4	144,2	6,1	22,4	80	61	49	85	53
11	stormfire	0	JO+R	120,4	90,2	200,9	7,9	25,7	71	46	46	92	49
12	VASCO	0	JO+R	83,9	76	111,4	5,1	25	88	66	53	89	56
13	VOICE	0	JO+R	101,3	90,6	132,5	5,2	27,7	85	64	59	88	51
14	VIRUS	0	JO+R	92,1	82,4	120,3	4,7	29,2	86	66	58	87	55
15	SPIRIT	0	JO+R	99,8	74,5	169,7	7,9	22,9	71	44	49	90	42
16	NOSTROMO	0	JO+R	136,9	123	170	6,1	22,8	87	70	50	89	69
17	STORMFIRE	0	JO+R	113,3	98	155,7	6	24,6	83	62	55	89	62
18	LOCKNESS	0	JO+R	117,5	108,7	156,6	5,4	31,6	89	68	49	59	47
19	APOLLO	0	JO+R	75	67,7	101,4	4,9	23,4	89	67	53	78	49
20	ROWDY	0	JO+R	133	107,3	201,2	8	26,5	77	53	63	91	56
1	parker	0	MASTERBREEDER	122,7	111,2	183,3	7,4	28,2	88	60	39	63	53
2	nostromo	0	MASTERBREEDER	155,4	132,7	229	9,6	20,3	84	59	49	98	79
3	apollo	0	MASTERBREEDER	93,8	65,2	198,4	8,9	31,1	68	33	49	91	38
4	rowdy	0	MASTERBREEDER	117,6	69,4	225,3	9,3	20,6	56	30	46	95	19
5	stormfire	0	MASTERBREEDER	105,6	58,7	234,1	11,6	29,4	57	28	64	82	16
6	hermes	0	MASTERBREEDER	153,5	131	239,9	10,1	24,5	83	55	47	95	72
7	stan	0	MASTERBREEDER	150,3	120,6	292,8	12,2	27,5	78	42	59	93	64
8	tom	0	MASTERBREEDER	129,6	104,9	245,6	10,8	30,1	79	43	44	90	62
9	spirit	0	MASTERBREEDER	147,1	117,6	270,7	11,5	29,2	77	44	46	92	62
10	nostromo	0	MASTERBREEDER	131,6	114,1	184,5	8,2	23,4	82	59	52	89	64
11	stormfire	0	MASTERBREEDER	160,3	139,9	279,8	10,7	29,7	87	52	53	96	84
12	VASCO	0	MASTERBREEDER	103,3	91	151,1	6,9	26,5	84	58	52	91	61
13	VOICE	0	MASTERBREEDER	113,2	78,6	216,6	9,7	27,1	67	36	50	95	39
14	VIRUS	0	MASTERBREEDER	134,1	124	187,2	7,2	27,8	90	65	47	90	76
15	SPIRIT	0	MASTERBREEDER	143,3	116,4	226,9	9,2	29,3	77	49	52	95	59
16	NOSTROMO	0	MASTERBREEDER	141,2	118,8	198,4	7,5	25,7	80	59	44	93	64
17	STORMFIRE	0	MASTERBREEDER	150,3	138,7	200,3	7,2	28,7	88	68	51	88	72
18	LOCKNESS	0	MASTERBREEDER	130,2	118,5	188,4	7,2	25,3	89	63	47	64	54
19	APOLLO	0	MASTERBREEDER	82	73,1	129,2	6,5	25,2	87	58	55	83	57
20	ROWDY	0	MASTERBREEDER	114,4	84,9	237,7	11,7	31,4	71	36	50	75	37
1	parker	0	R	106,5	100,1	143	5,6	22,8	92	70	44	64	57
2	nostromo	0	R	111,1	88,3	168,2	7,1	19,3	77	54	51	96	61
3	apollo	0	R	76,1	66,9	106,5	5,6	22,8	86	63	49	89	51
4	rowdy	0	R	108,5	89,9	163,1	7,2	26,4	79	54	62	91	58
5	stormfire	0	R	113,8	102,3	144,8	5,1	23,3	86	69	52	62	44
6	hermes	0	R	142,4	132,9	171,1	5,1	28,6	90	74	49	84	66
7	stan	0	R	136,5	127,6	169,6	5,2	28,9	90	73	46	84	67
8	tom	0	R	110,9	100,5	142	5,8	23,3	86	66	54	84	55
9	spirit	0	R	141,4	131,7	178	5,7	31,8	90	72	51	77	62
10	nostromo	0	R	124,1	107,6	164,3	6,2	25,5	82	63	56	88	60

11	stormfire	0	R	138,8	120,3	180,3	6,2	25,4	82	64	48	86	59
12	VASCO	0	R	81,1	70,6	111,5	5,3	25,9	84	61	53	91	53
13	VOICE	0	R	107,4	100,1	137,2	5,4	29,6	90	69	59	88	58
14	VIRUS	0	R	82,7	74,1	108	4,6	28,2	86	65	64	88	51
15	SPIRIT	0	R	129,4	119,5	163,3	5,8	28,8	88	68	51	80	57
16	NOSTROMO	0	R	112,1	98,3	141,2	5,6	19,6	84	68	49	89	63
17	STORMFIRE	0	R	113,1	99,9	147,9	5,5	25,4	84	66	58	86	61
18	LOCKNESS	0	R	119,3	112,1	155,2	5,2	31,8	91	70	48	64	52
19	APOLLO	0	R	64,6	55,8	89,7	4,8	20,7	86	65	51	73	36
20	ROWDY	0	R	119,8	98,3	182,8	8,2	26	80	54	48	96	62
1	parker	24	BOTUDOG	131,9	113,7	230,7	10,1	25,6	86	52	38	41	36
2	nostromo	24	BOTUDOG	113,2	98,4	174,6	7,5	24,8	84	58	42	80	60
3	apollo	24	BOTUDOG	65,5	55,8	108,6	6,2	27,5	82	53	50	66	31
4	rowdy	24	BOTUDOG	111,7	93,9	204,4	9,2	30	81	48	49	78	51
5	stormfire	24	BOTUDOG	106,5	93,5	168,9	6,9	27,4	86	59	47	87	61
6	hermes	24	BOTUDOG	110,8	101	155,9	6,1	30,2	88	65	51	82	63
7	stan	24	BOTUDOG	106,2	95,9	163	6,7	29,6	87	60	41	75	57
8	tom	24	BOTUDOG	97,2	86,6	144,4	6,7	28,1	85	59	45	61	40
9	spirit	24	BOTUDOG	110,8	96,2	174,7	7,8	29,5	82	53	47	74	49
10	nostromo	24	BOTUDOG	95,6	84,9	126	6,2	22	83	63	44	50	31
11	stormfire	24	BOTUDOG	137,3	126,1	184,6	6,2	29,9	90	69	54	88	76
12	VASCO	24	BOTUDOG	53,9	44,9	84,9	5,4	26	80	53	44	65	19
13	VOICE	24	BOTUDOG	65,7	50,4	118,9	7,3	32,7	73	41	45	68	23
14	VIRUS	24	BOTUDOG	52,1	43,1	88,4	6,5	30,7	80	49	50	41	10
15	SPIRIT	24	BOTUDOG	80,2	68,7	127,2	6,3	29,7	81	54	48	57	30
16	NOSTROMO	24	BOTUDOG	101,1	93,2	127,4	5,5	22	88	71	41	46	34
17	STORMFIRE	24	BOTUDOG	113,9	105,5	151,7	5,6	30,9	90	68	59	69	53
18	LOCKNESS	24	BOTUDOG	84,4	76,4	129,2	5,6	26,9	88	62	40	29	21
19	APOLLO	24	BOTUDOG	42,5	36	65	5,4	24,6	83	58	58	46	9
20	ROWDY	24	BOTUDOG	92,3	79,9	149,7	6,9	26,7	85	57	46	58	38
1	parker	24	CANI EX LT	100,4	79,9	176,3	9,2	28	76	45	58	47	27
2	nostromo	24	CANI EX LT	136,1	116,7	192,1	9,2	18,6	84	62	41	94	75
3	apollo	24	CANI EX LT	72,5	57,3	146,2	7,4	33,9	76	40	56	80	36
4	rowdy	24	CANI EX LT	137,1	112,8	244,6	10,2	28,4	80	48	47	90	61
5	stormfire	24	CANI EX LT	141,2	117,1	249,6	10,4	28,2	81	50	45	50	39
6	hermes	24	CANI EX LT	111,3	101,1	159,6	6,8	26,1	86	62	42	80	60
7	stan	24	CANI EX LT	118,6	101,8	185,2	7,5	27,9	81	55	46	83	57
8	tom	24	CANI EX LT	100,3	82,7	176,6	8,9	27,5	80	48	45	73	43
9	spirit	24	CANI EX LT	127,4	103	207,5	9,1	26,6	77	50	44	83	52
10	nostromo	24	CANI EX LT	93	67,7	191,3	9,5	31,6	70	35	49	57	23
11	stormfire	24	CANI EX LT	132,6	120,8	184,2	7,6	22,4	89	67	43	88	74
12	VASCO	24	CANI EX LT	68,4	49,6	142,2	6,8	37,7	71	35	49	82	29
13	VOICE	24	CANI EX LT	93,7	74,4	158,8	8	27,3	76	47	44	87	46
14	VIRUS	24	CANI EX LT	93,9	80	157,9	7,4	28,7	81	50	52	87	55
15	SPIRIT	24	CANI EX LT	105,7	84,1	162,3	8	22,9	75	52	56	88	49
16	NOSTROMO	24	CANI EX LT	114,9	96,6	192,4	9	24,6	81	51	50	85	63
17	STORMFIRE	24	CANI EX LT	115	103,7	162,1	7,1	25,3	86	63	43	81	59
18	LOCKNESS	24	CANI EX LT	107,9	85,2	201	9,7	29	78	44	47	48	29
19	APOLLO	24	CANI EX LT	50,5	39,9	96,9	5,2	31,6	78	44	45	47	14

20	ROWDY	24	CANI EX LT	50,2	38,4	95,4	6,3	33,1	75	41	47	47	11
1	parker	24	CANI EX LT+R	103,1	86,5	174,1	8,9	23,7	81	52	40	49	33
2	nostromo	24	CANI EX LT+R	141,9	125,2	195,2	9	18,6	86	65	62	94	79
3	apollo	24	CANI EX LT+R	72,6	58,2	151,9	7,5	33,3	78	39	46	69	34
4	rowdy	24	CANI EX LT+R	134,7	113,4	226,1	9,6	28,3	81	51	45	87	63
5	stormfire	24	CANI EX LT+R	131,9	86,8	301,5	11,5	34,4	66	30	55	34	11
6	hermes	24	CANI EX LT+R	131,6	122,8	175,4	6,5	27,9	90	69	57	84	69
7	stan	24	CANI EX LT+R	130,9	115,8	199,6	8	27,9	85	59	54	82	62
8	tom	24	CANI EX LT+R	98,4	82,9	156,6	7,9	26,9	80	52	45	78	47
9	spirit	24	CANI EX LT+R	120,6	98,2	189,2	9	26,2	76	50	45	78	47
10	nostromo	24	CANI EX LT+R	96,9	83,8	147	7,1	25	83	58	43	78	52
11	stormfire	24	CANI EX LT+R	139,2	127,5	191	7,4	22,4	90	69	45	88	79
12	VASCO	24	CANI EX LT+R	74,6	60,4	139,6	7,1	32	78	44	39	81	41
13	VOICE	24	CANI EX LT+R	100,2	88,8	151,7	7,2	27,3	85	56	40	86	56
14	VIRUS	24	CANI EX LT+R	81,3	62,1	148,7	7,5	31,5	72	41	43	78	35
15	SPIRIT	24	CANI EX LT+R	124,1	108,4	177,8	8,5	22,9	83	59	65	85	58
16	NOSTROMO	24	CANI EX LT+R	105,2	84,8	194,9	8,9	26,4	78	44	45	81	52
17	STORMFIRE	24	CANI EX LT+R	106,1	91,5	158	7,3	23,1	82	58	43	82	57
18	LOCKNESS	24	CANI EX LT+R	119,7	100,7	203,5	9,6	23,8	82	51	43	58	45
19	APOLLO	24	CANI EX LT+R	49,6	37,5	99,9	5,4	34,8	75	40	58	54	13
20	ROWDY	24	CANI EX LT+R	114,3	83,1	224,7	10,3	29,6	71	36	46	80	34
1	parker	24	CANI EX ST	99,8	91,1	144,2	6,8	21,8	89	63	40	31	24
2	nostromo	24	CANI EX ST	147	136,2	179,7	6,6	19,9	91	75	45	91	78
3	apollo	24	CANI EX ST	77,2	68,6	119,7	6,6	29,2	85	56	54	49	24
4	rowdy	24	CANI EX ST	130,8	116,7	197	8,1	31,5	86	58	49	81	60
5	stormfire	24	CANI EX ST	110,5	102,8	154,6	6,7	26,6	90	66	48	47	37
6	hermes	24	CANI EX ST	145,2	137	175,7	5	35,8	92	76	42	81	68
7	stan	24	CANI EX ST	134	122,8	175,8	5,9	31,7	88	68	50	86	67
8	tom	24	CANI EX ST	100,4	89,9	140,6	5,8	32,3	87	63	45	68	46
9	spirit	24	CANI EX ST	130,6	116,3	180,8	6,7	31,6	85	62	46	77	58
10	nostromo	24	CANI EX ST	90,4	80,8	127,5	5,8	26,4	84	60	42	46	29
11	stormfire	24	CANI EX ST	144,7	135,4	181,3	5,6	31,7	91	74	47	88	76
12	VASCO	24	CANI EX ST	38,4	30,8	69,5	6,3	31,3	78	46	53	21	3
13	VOICE	24	CANI EX ST	67,8	57,2	104,9	6,3	29,4	80	53	49	72	30
14	VIRUS	24	CANI EX ST	64,8	59	97	5,2	30,4	88	60	44	38	20
15	SPIRIT	24	CANI EX ST	111,2	101,6	145,6	5,8	30,2	86	66	58	65	46
16	NOSTROMO	24	CANI EX ST	46,3	33,4	92	8,1	33,5	67	38	45	20	4
17	STORMFIRE	24	CANI EX ST	118,4	98,7	195,1	8,3	31	79	51	49	76	48
18	LOCKNESS	24	CANI EX ST	82,8	77,1	114,1	4,6	32,2	90	66	44	39	27
19	APOLLO	24	CANI EX ST	38,8	33,2	59,7	5,1	27,1	85	57	50	25	3
20	ROWDY	24	CANI EX ST	103,2	90,5	162,1	7,8	27,6	83	54	53	67	43
1	parker	24	CHILL LT	102	83,9	166,7	8,5	25,5	79	50	41	39	23
2	nostromo	24	CHILL LT	148,7	130,2	217,9	9,2	21,7	86	61	65	97	83
3	apollo	24	CHILL LT	79,1	61,1	160,4	8,7	33,4	73	38	39	71	31
4	rowdy	24	CHILL LT	137,7	112,9	247	10,4	30	79	46	51	91	60
5	stormfire	24	CHILL LT	123,3	107,2	221	10,9	26	84	50	50	37	32
6	hermes	24	CHILL LT	125,9	110,5	196,1	8,4	28,9	84	55	48	83	61
7	stan	24	CHILL LT	132,3	114,3	211,5	8,3	31,7	83	54	42	90	65
8	tom	24	CHILL LT	100,7	82,6	181,1	9	31	77	45	44	73	42

9	spirit	24	CHILL LT	140,5	123,1	208	8,5	26,3	84	59	44	87	66
10	nostromo	24	CHILL LT	111,2	93,9	178,9	8,2	26,3	80	52	46	74	47
11	stormfire	24	CHILL LT	130,4	117,5	191,6	7,4	26,3	88	63	46	86	70
12	VASCO	24	CHILL LT	77,3	61,5	134,9	7,1	30,4	77	45	47	84	37
13	VOICE	24	CHILL LT	95	80,1	148,6	7	30,2	79	50	49	92	51
14	VIRUS	24	CHILL LT	88,3	74,5	146,3	7,3	32,4	79	48	44	70	38
15	SPIRIT	24	CHILL LT	129,4	119,6	193,7	8,2	22,9	91	63	45	79	65
16	NOSTROMO	24	CHILL LT	122,1	97,7	175,9	7,9	22,5	75	54	42	91	52
17	STORMFIRE	24	CHILL LT	114,8	105	163,6	6,5	29,5	88	63	47	75	55
18	LOCKNESS	24	CHILL LT	108,2	93,6	178,8	8,9	24	84	53	51	38	27
19	APOLLO	24	CHILL LT	40,9	34,9	63,7	5,1	25,1	84	57	47	46	9
20	ROWDY	24	CHILL LT	104,9	80,2	211,2	10,5	29,3	73	37	47	75	39
1	parker	24	CHILL ST	108,8	83,9	187,9	8,7	32,1	74	44	36	37	22
2	nostromo	24	CHILL ST	147,1	128,9	219,2	9,1	23,7	86	59	46	96	78
3	apollo	24	CHILL ST	88	72,4	172,6	7,6	32,8	79	42	54	83	51
4	rowdy	24	CHILL ST	135,2	110,8	253,6	10,8	31,7	79	44	51	92	62
5	stormfire	24	CHILL ST	119,3	105,4	187,4	9,9	27,7	84	55	78	71	57
6	hermes	24	CHILL ST	134,7	124,1	174	6,4	26,3	88	69	46	87	68
7	stan	24	CHILL ST	127,1	105,6	220,6	8,7	32	79	48	52	89	58
8	tom	24	CHILL ST	105,4	90,1	178	8,6	29,4	81	50	46	78	49
9	spirit	24	CHILL ST	125,5	105,9	194,5	8,4	29,4	79	53	53	78	50
10	nostromo	24	CHILL ST	105,3	88,4	176,6	8,3	27,4	79	49	42	70	44
11	stormfire	24	CHILL ST	98,4	82,7	180	9	31,1	80	45	45	64	42
12	VASCO	24	CHILL ST	69,4	54,1	131,7	7,4	33,4	75	41	41	78	30
13	VOICE	24	CHILL ST	101,7	90,3	153	7	31	84	55	40	86	52
14	VIRUS	24	CHILL ST	85,6	69,8	145,8	7,5	33,1	76	45	48	70	33
15	SPIRIT	24	CHILL ST	112	100,6	161,1	7,6	26,4	85	59	47	72	47
16	NOSTROMO	24	CHILL ST	124,6	107,3	193,3	8,2	27,1	83	55	40	85	64
17	STORMFIRE	24	CHILL ST	87	72,5	151	8	32,2	79	49	43	60	31
18	LOCKNESS	24	CHILL ST	119,8	106,2	191,8	8,9	22,3	87	57	48	45	37
19	APOLLO	24	CHILL ST	41,8	35,8	66,8	6	28,7	84	56	62	48	8
20	ROWDY	24	CHILL ST	122,9	92,1	255,9	11,8	28,6	72	36	52	82	43
1	parker	24	JO+R	121,6	101	225,3	10,3	26,5	81	46	44	58	43
2	nostromo	24	JO+R	139,6	123,8	197,7	7,8	24,7	87	63	45	92	77
3	apollo	24	JO+R	84,4	68,3	179,2	8,6	33,9	78	37	40	69	39
4	rowdy	24	JO+R	139,8	117,6	248,4	10,3	30,6	81	47	48	89	65
5	stormfire	24	JO+R	135,9	125,2	232	9	33	89	54	63	40	36
6	hermes	24	JO+R	137,3	130,1	169,7	5,5	29,3	91	73	44	87	70
7	stan	24	JO+R	129	110,7	213	8,4	31,8	83	52	43	90	66
8	tom	24	JO+R	111,2	98,3	166,4	7,1	30,8	84	57	51	79	53
9	spirit	24	JO+R	117	92,4	191	8,3	31	73	46	55	83	43
10	nostromo	24	JO+R	107,9	96	155,2	6,4	27,8	85	61	44	82	59
11	stormfire	24	JO+R	146,9	131,7	206,7	7	32,2	87	64	44	88	71
12	VASCO	24	JO+R	62,1	47,6	120,2	7	32,2	75	40	47	64	24
13	VOICE	24	JO+R	81,9	62,5	149,1	7,7	31,5	73	41	47	84	37
14	VIRUS	24	JO+R	88,9	73,6	152,5	7	32,5	79	47	42	71	42
15	SPIRIT	24	JO+R	95,1	80,8	142,6	7	25,3	80	55	54	74	43
16	NOSTROMO	24	JO+R	98,7	78,7	168,5	7,8	27	76	47	59	86	51
17	STORMFIRE	24	JO+R	115	105,3	156,5	6,1	30	88	66	61	76	59

18	LOCKNESS	24	JO+R	119,4	105,8	187,7	7,7	29,4	86	56	49	70	56
19	APOLLO	24	JO+R	70,2	64,4	96,7	4,6	27,2	90	66	52	76	45
20	ROWDY	24	JO+R	119,1	92,3	209,4	9,6	25,5	74	44	50	81	45
1	parker	24	MASTERBREEDER	108,3	74,8	207,4	11,1	32,8	67	36	41	53	20
2	nostromo	24	MASTERBREEDER	131,9	97,9	242,4	11,3	24,1	73	43	45	97	56
3	apollo	24	MASTERBREEDER	101,6	71,6	262,1	11	34,9	70	28	55	76	32
4	rowdy	24	MASTERBREEDER	131	83	277,2	12,1	29,5	60	30	54	89	23
5	stormfire	24	MASTERBREEDER	122,8	73,4	282,8	9,1	37	59	27	62	43	9
6	hermes	24	MASTERBREEDER	129,2	98,6	224,3	9,9	27	73	44	43	90	49
7	stan	24	MASTERBREEDER	131,8	92,6	293,9	13,1	28,8	69	33	47	91	41
8	tom	24	MASTERBREEDER	114,9	80,3	252,7	12,4	31	68	32	55	78	33
9	spirit	24	MASTERBREEDER	126,2	88,7	243,1	11,8	27,2	68	37	53	81	33
10	nostromo	24	MASTERBREEDER	116,2	90,5	197,8	10,1	25,3	74	46	58	85	48
11	stormfire	24	MASTERBREEDER	143	109,3	301	13,3	26,8	76	38	45	92	58
12	VASCO	24	MASTERBREEDER	84,8	66,4	165,6	8,1	32,9	74	39	41	84	41
13	VOICE	24	MASTERBREEDER	101,3	69,5	195,7	9,3	32,3	65	34	55	88	30
14	VIRUS	24	MASTERBREEDER	119,6	107,7	199,7	8,6	29,8	87	53	45	89	76
15	SPIRIT	24	MASTERBREEDER	127,5	110,7	200,5	8,9	28,1	82	53	49	70	47
16	NOSTROMO	24	MASTERBREEDER	115,4	96,8	182,1	8,2	25,7	80	53	54	83	56
17	STORMFIRE	24	MASTERBREEDER	74,6	65	110	5,3	28	83	58	51	56	33
18	LOCKNESS	24	MASTERBREEDER	96,7	79	184,3	9,6	28,6	77	42	44	28	17
19	APOLLO	24	MASTERBREEDER	55,4	45,1	107,9	6,3	29,1	80	43	47	67	27
20	ROWDY	24	MASTERBREEDER	100,9	77,5	223	11,7	28,4	74	34	46	41	20
1	parker	24	R	119	104,3	216	9,6	25,6	86	49	37	58	51
2	nostromo	24	R	137,6	118,4	200,8	7,9	24,6	84	60	44	94	74
3	apollo	24	R	90,4	74,8	174,6	7,5	33,3	81	43	45	84	55
4	rowdy	24	R	114,9	81,5	239,2	11	27,9	68	34	55	87	38
5	stormfire	24	R	99,6	73,5	181,6	8,5	33,3	67	39	47	61	26
6	hermes	24	R	142,8	134,7	177,8	5,7	30,3	91	73	43	86	73
7	stan	24	R	112,2	81,5	244,8	11	26,6	71	34	42	81	42
8	tom	24	R	110,3	98,1	167,6	7,1	31,3	85	56	45	80	55
9	spirit	24	R	122,6	100	199,3	8,2	31,3	76	48	46	76	45
10	nostromo	24	R	117,3	106,8	160,6	6,3	27,1	87	65	41	81	63
11	stormfire	24	R	146,6	131,2	210	7,3	34	87	62	45	87	71
12	VASCO	24	R	68,7	55,6	126,6	6,2	34,1	78	43	48	83	38
13	VOICE	24	R	84,7	69,3	142,8	6,7	33,5	77	46	55	89	43
14	VIRUS	24	R	77,8	60,4	144,1	7,7	31,9	74	41	48	69	31
15	SPIRIT	24	R	132,8	122,3	177,8	6,8	30,6	87	65	46	76	55
16	NOSTROMO	24	R	96,2	78	144,6	6,5	25,7	76	53	48	76	44
17	STORMFIRE	24	R	119,9	110,9	155,9	5,7	29,8	89	69	46	73	56
18	LOCKNESS	24	R	109,2	90	196	8,9	25,8	80	47	46	71	49
19	APOLLO	24	R	70,9	64,8	98,3	4,5	26,8	89	65	48	75	43
20	ROWDY	24	R	101,6	74,1	180,9	8,4	24	70	41	49	78	34
1	parker	48	BOTUDOG	130,9	110,7	243,7	10,4	24,6	84	49	55	37	31
2	nostromo	48	BOTUDOG	107	84,5	216,8	9,3	27,8	77	42	52	80	52
3	apollo	48	BOTUDOG	60,4	50,3	109,4	7,3	28,5	80	48	58	52	19
4	rowdy	48	BOTUDOG	104,1	84	205,3	9,5	30,7	79	43	42	70	44
5	stormfire	48	BOTUDOG	100,6	85,3	185,6	7,6	28,8	84	51	52	74	50
6	hermes	48	BOTUDOG	102,2	92,7	157,1	6,4	30,9	88	60	42	76	57

7	stan	48	BOTUDOG	99,4	87,3	171,2	7,5	31,1	85	52	40	74	56
8	tom	48	BOTUDOG	81,4	72,1	129,3	6,2	32,3	84	54	46	49	30
9	spirit	48	BOTUDOG	112,3	95,3	190,1	8,5	30,6	81	50	56	71	48
10	nostromo	48	BOTUDOG	90,6	82,4	119,2	5,7	22,9	86	65	55	46	30
11	stormfire	48	BOTUDOG	125,4	117,1	166,8	5,7	30,4	91	71	50	86	75
12	VASCO	48	BOTUDOG	55,7	40,2	111,9	8,5	33,2	70	37	48	34	7
13	VOICE	48	BOTUDOG	66,6	55,7	107,5	6	30,7	79	50	48	48	19
14	VIRUS	48	BOTUDOG	53	44,9	88,2	5,9	29	81	52	42	30	9
15	SPIRIT	48	BOTUDOG	91,1	84,4	119,9	5,4	26,5	89	67	55	54	37
16	NOSTROMO	48	BOTUDOG	85,1	74,1	118,1	5,9	25,3	83	61	42	55	33
18	LOCKNESS	48	BOTUDOG	71,1	59	125,5	6	28,3	82	50	56	7	4
19	APOLLO	48	BOTUDOG	39,2	32,8	59,6	5,2	23,9	83	56	43	30	4
20	ROWDY	48	BOTUDOG	82,7	69,7	153,2	7,5	30	82	50	57	49	28
17	STORMFIRE	48	BOTUDOG	97,5	91,5	125,8	4,7	28,5	91	70	48	67	49
1	parker	48	CANI EX LT	43,5	31,8	93,7	5,7	32,5	70	34	58	16	2
2	nostromo	48	CANI EX LT	118,1	90,6	189,9	9,2	24,7	74	49	64	94	53
3	apollo	48	CANI EX LT	55,7	42,5	119,3	6,6	36,1	74	38	44	61	18
4	rowdy	48	CANI EX LT	132,5	107,5	241,6	10,5	30,3	78	45	48	87	57
5	stormfire	48	CANI EX LT	76,6	43,3	160,8	11,5	38,9	54	25	46	38	4
6	hermes	48	CANI EX LT	63	48,8	127,6	8	35,9	73	38	47	42	15
7	stan	48	CANI EX LT	114,3	99,9	188	8,3	29,3	84	54	43	77	60
8	tom	48	CANI EX LT	86	70,9	170,7	9,5	30,4	80	43	44	42	23
9	spirit	48	CANI EX LT	119,3	93,6	201,9	10,5	25,6	74	46	55	78	45
10	nostromo	48	CANI EX LT	71,5	52,7	134,9	6,8	35,5	71	39	41	45	15
11	stormfire	48	CANI EX LT	120,5	103,1	198,9	9	25,3	82	53	44	77	58
12	VASCO	48	CANI EX LT	53,2	36,6	123,1	6,1	40,3	69	31	49	64	13
13	VOICE	48	CANI EX LT	65,7	48,4	116,7	5,7	35,1	72	42	51	80	27
14	VIRUS	48	CANI EX LT	92,6	74,1	171,7	8,7	31,1	77	42	65	75	40
15	SPIRIT	48	CANI EX LT	112,9	91,7	164	9,6	21,9	78	55	49	74	41
16	NOSTROMO	48	CANI EX LT	73,2	53,8	122,9	6	33,7	70	43	57	80	31
17	STORMFIRE	48	CANI EX LT	107	86,2	164,8	7,9	26,1	77	52	51	84	51
18	LOCKNESS	48	CANI EX LT	86,6	66,6	153,1	7	33,4	76	44	38	16	8
19	APOLLO	48	CANI EX LT	45,4	33,9	94,9	8,4	32,7	67	33	44	4	1
20	ROWDY	48	CANI EX LT	34,2	27	63,9	5,1	30,7	78	44	49	25	3
1	parker	48	CANI EX LT+R	63,3	51,5	110,1	8	33,5	76	44	38	14	5
2	nostromo	48	CANI EX LT+R	127,2	104,1	195,5	9,3	21,1	80	55	41	92	65
3	apollo	48	CANI EX LT+R	60,1	46,6	126,3	7,7	34,5	75	38	48	55	18
4	rowdy	48	CANI EX LT+R	117,2	95	210,9	9,8	30	77	45	51	87	54
5	stormfire	48	CANI EX LT+R	62,9	46,5	106,7	7,5	28,8	71	48	61	33	11
6	hermes	48	CANI EX LT+R	138,1	125,4	189,5	8,1	22,7	88	66	44	85	71
7	stan	48	CANI EX LT+R	122,3	104,4	197,4	8,5	27,7	82	54	55	78	57
8	tom	48	CANI EX LT+R	87,9	74,6	153,3	7,9	30,3	81	49	45	64	40
9	spirit	48	CANI EX LT+R	128,2	106,9	206,4	9,6	25,8	80	52	49	84	58
10	nostromo	48	CANI EX LT+R	77,1	63,1	122,8	7	26,1	78	51	45	64	33
11	stormfire	48	CANI EX LT+R	125,6	110,3	185,1	8	24,1	85	60	43	83	64
12	VASCO	48	CANI EX LT+R	75,5	55,8	142,1	6,9	32,2	74	41	44	65	27
13	VOICE	48	CANI EX LT+R	80,1	64,5	125,7	7,4	25,7	78	50	44	74	34
14	VIRUS	48	CANI EX LT+R	88,9	69,6	154	7,5	31,2	75	45	40	67	35
15	SPIRIT	48	CANI EX LT+R	117,5	94,8	169,5	9,5	22	77	54	47	77	44

16	NOSTROMO	48	CANI EX LT+R	83	63,2	137,2	6,9	30,7	72	46	41	75	34
17	STORMFIRE	48	CANI EX LT+R	102,5	82	164,4	7,7	28,8	77	50	51	83	51
18	LOCKNESS	48	CANI EX LT+R	97,3	79,7	163,6	8,7	27,1	79	49	38	36	22
19	APOLLO	48	CANI EX LT+R	39,4	30,4	79,4	4,7	33,5	77	39	46	24	4
20	ROWDY	48	CANI EX LT+R	108,9	80,5	197,6	9,2	31,6	71	40	50	73	32
1	parker	48	CANI EX ST	83,7	72	132,1	8,3	25,6	81	53	67	16	10
2	nostromo	48	CANI EX ST	141,5	127,2	195,9	7,7	23,8	88	65	45	87	72
3	apollo	48	CANI EX ST	76	65,9	135,2	7,4	28,9	82	47	46	10	5
4	rowdy	48	CANI EX ST	130,1	115,7	200,9	8,4	32,4	85	56	45	82	61
5	stormfire	48	CANI EX ST	88,7	78,1	148,2	7,5	27,6	86	56	51	38	26
6	hermes	48	CANI EX ST	115,9	107,6	157,4	5,6	37,1	89	66	48	66	51
7	stan	48	CANI EX ST	130,1	120	176,5	6,1	32,9	89	66	42	80	67
8	tom	48	CANI EX ST	83,6	76,2	125,4	5,4	33,6	88	59	45	63	41
9	spirit	48	CANI EX ST	130,5	117	183,4	6,7	33,8	86	62	45	77	61
10	nostromo	48	CANI EX ST	88,7	80,1	121	5,5	24,7	86	65	44	47	32
11	stormfire	48	CANI EX ST	135,4	126,5	177,9	5,6	36,2	91	70	46	84	71
12	VASCO	48	CANI EX ST	53,1	36,6	123,1	6,1	40,2	69	31	49	21	4
13	VOICE	48	CANI EX ST	35,3	28	69,9	9	31,3	76	43	51	8	1
14	VIRUS	48	CANI EX ST	71,1	54,5	108,7	9,6	25,1	66	43	34	0	0
15	SPIRIT	48	CANI EX ST	70,6	63,1	101	5,3	28,4	84	59	52	33	16
16	NOSTROMO	48	CANI EX ST	51,2	35,8	93,2	10,3	24,9	65	40	41	10	2
17	STORMFIRE	48	CANI EX ST	88,4	66,4	178,6	10,1	35,7	69	36	54	45	17
18	LOCKNESS	48	CANI EX ST	25,6	14,9	39,9	0	19,9	64	41	67	0	0
19	APOLLO	48	CANI EX ST	31	26,4	51,1	12,9	28,8	84	53	49	4	0
20	ROWDY	48	CANI EX ST	96,2	85,3	150,4	7,8	28,5	84	55	51	59	35
1	parker	48	CHILL LT	96,1	76,5	166,1	9,8	26,8	76	45	40	22	11
2	nostromo	48	CHILL LT	140,9	117,9	213,6	9,5	21,4	82	56	43	94	72
3	apollo	48	CHILL LT	78,2	60,8	164,8	8,6	34,7	74	36	49	63	27
4	rowdy	48	CHILL LT	145,3	121	254,4	10,5	31,1	80	48	45	89	63
5	stormfire	48	CHILL LT	98,6	61,9	181,5	9,4	39,3	59	32	67	27	7
6	hermes	48	CHILL LT	119,7	104,1	193,4	8,6	28,5	84	54	43	75	56
7	stan	48	CHILL LT	127,4	108,7	211,2	9	28,6	82	52	55	86	63
8	tom	48	CHILL LT	109,4	93,5	198,1	9,2	31,5	82	47	50	63	43
9	spirit	48	CHILL LT	116,3	93,4	192,9	9,2	28,5	75	47	49	79	43
10	nostromo	48	CHILL LT	108	97,3	153,1	7,6	22,8	85	61	51	69	50
11	stormfire	48	CHILL LT	123,9	107,2	206	8,9	28,5	84	55	48	80	61
12	VASCO	48	CHILL LT	75,4	61,2	133,2	7,4	29,8	78	45	47	84	40
13	VOICE	48	CHILL LT	97,5	85,6	136,4	6,8	24,1	83	59	41	83	50
14	VIRUS	48	CHILL LT	59,8	44,4	112,3	7,6	32,4	71	39	45	60	16
15	SPIRIT	48	CHILL LT	104	87,4	154,4	8,2	24,8	78	53	45	75	42
16	NOSTROMO	48	CHILL LT	124,2	111,9	161,8	7,2	20,5	86	67	40	84	64
17	STORMFIRE	48	CHILL LT	141,5	131,5	190,6	7,3	27,9	90	68	44	74	63
18	LOCKNESS	48	CHILL LT	113,4	98,4	187,9	9,5	24,6	84	53	49	30	24
19	APOLLO	48	CHILL LT	34,9	28,7	60,2	6,3	29,5	81	50	49	30	3
20	ROWDY	48	CHILL LT	107,4	83,1	215,1	11,2	30,2	73	38	49	56	30
1	parker	48	CHILL ST	65,2	52,8	115,6	7,1	29,9	73	40	60	9	4
2	nostromo	48	CHILL ST	138,2	114,8	222,4	10	23,1	81	53	44	94	71
3	apollo	48	CHILL ST	68,4	52,3	150,4	8,3	36	73	35	48	44	15
4	rowdy	48	CHILL ST	147,9	121,2	264,4	11,1	29,8	79	46	53	90	61

5	stormfire	48	CHILL ST	32,1	14,4	81	0	40,8	45	18	72	6	0
6	hermes	48	CHILL ST	125,1	112,5	176,4	7,7	25,6	86	62	41	84	63
7	stan	48	CHILL ST	136,5	120,7	213,5	8,9	27	86	58	47	85	66
8	tom	48	CHILL ST	105	90,3	191,6	9,2	33,9	82	46	43	59	40
9	spirit	48	CHILL ST	132,1	110,8	218,8	9,7	26,2	81	51	45	85	61
10	nostromo	48	CHILL ST	104,7	90,8	149,8	7,6	23,2	82	59	42	67	44
11	stormfire	48	CHILL ST	90,7	74,9	178	9,9	31	79	42	45	39	23
12	VASCO	48	CHILL ST	74,7	61,1	129,2	7,2	28,7	79	47	41	83	42
13	VOICE	48	CHILL ST	97	86,5	134,4	7	24,5	85	60	51	86	48
14	VIRUS	48	CHILL ST	88,1	77,9	137,7	7,2	28,8	84	54	38	71	41
15	SPIRIT	48	CHILL ST	126,7	114,6	171,9	8	22,6	86	64	56	79	56
16	NOSTROMO	48	CHILL ST	128,9	114,2	174,5	8,1	20,8	85	64	47	85	66
17	STORMFIRE	48	CHILL ST	109,7	96,2	172,2	8	27,4	83	56	52	73	50
18	LOCKNESS	48	CHILL ST	118,1	103	208,5	9,9	24,3	85	51	44	24	19
19	APOLLO	48	CHILL ST	36	30,2	60,4	5,5	29,2	83	52	52	27	3
19	APOLLO	48	CHILL ST	126,3	100,2	254,6	11,7	31	77	40	48	81	51
1	parker	48	JO+R	133	120,9	207,7	8,5	24,9	90	61	45	50	44
2	nostromo	48	JO+R	129,6	107,7	228,4	9,2	28,7	81	48	44	91	68
3	apollo	48	JO+R	80,7	61,7	177,6	8,5	32,1	74	34	42	74	36
4	rowdy	48	JO+R	128,6	102,6	249,2	10,9	29,4	77	41	49	85	52
5	stormfire	48	JO+R	129,7	120,7	203	8	28,1	92	63	69	48	45
6	hermes	48	JO+R	129,1	117,7	181,5	6,5	32,8	87	64	52	85	67
7	stan	48	JO+R	132,1	114,3	214,7	8,1	33,7	83	53	44	81	60
8	tom	48	JO+R	107,2	91,3	190,4	8,6	33,2	81	47	46	72	49
9	spirit	48	JO+R	129,7	107,8	228,3	9,7	30,4	80	47	45	78	56
10	nostromo	48	JO+R	106,3	94,7	152,5	6,5	28,5	84	61	44	80	56
11	stormfire	48	JO+R	146,6	137,1	207,2	6,6	36,6	92	66	58	88	79
12	VASCO	48	JO+R	73,2	58,2	143,5	7,5	34,5	77	40	47	73	35
13	VOICE	48	JO+R	75,1	59	134,8	7,8	31,4	74	41	47	70	29
14	VIRUS	48	JO+R	62,4	46,7	121,6	7,8	32,4	72	38	44	51	17
15	SPIRIT	48	JO+R	108,8	99,1	151,1	6,4	31,9	85	60	47	73	45
16	NOSTROMO	48	JO+R	123,5	112,4	180,2	6,6	31,6	88	62	43	83	68
17	STORMFIRE	48	JO+R	120,5	108,7	167	6,2	31	86	64	46	78	58
18	LOCKNESS	48	JO+R	114,1	100,8	188,1	8,1	29,2	86	54	52	61	48
19	APOLLO	48	JO+R	56	46,8	93,4	6	29,3	81	51	49	57	20
20	ROWDY	48	JO+R	130,1	107,4	229,4	9,9	28,5	79	46	47	81	54
1	parker	48	MASTERBREEDER	91	61,1	176,3	7,7	36,3	66	34	54	43	11
2	nostromo	48	MASTERBREEDER	135,6	95,7	261,1	11,9	25,1	70	38	54	95	44
3	apollo	48	MASTERBREEDER	105	74,5	264	11,6	34,7	69	28	55	63	27
4	rowdy	48	MASTERBREEDER	137,7	89,8	342	15	30,5	64	27	62	84	27
5	stormfire	48	MASTERBREEDER	119,3	66,2	270,3	10,4	40,5	55	24	66	40	5
6	hermes	48	MASTERBREEDER	127,4	96,6	224,5	10,6	27,9	74	44	61	89	50
7	stan	48	MASTERBREEDER	134,2	94,4	294	13,2	30,9	68	33	42	88	38
8	tom	48	MASTERBREEDER	120,7	77,2	264,4	11,8	34,1	62	30	51	75	21
9	spirit	48	MASTERBREEDER	129,7	91,7	254,8	12,2	26,5	68	37	47	74	32
10	nostromo	48	MASTERBREEDER	107,8	82,4	184,1	9,3	27	72	45	47	80	41
11	stormfire	48	MASTERBREEDER	135,9	97,9	286,8	13	30	71	35	48	83	42
12	VASCO	48	MASTERBREEDER	85,8	64,8	174,5	8,9	33,1	71	35	46	78	35
13	VOICE	48	MASTERBREEDER	92,8	78,7	168,5	8,2	35,4	78	43	64	69	36

14	VIRUS	48	MASTERBREEDER	104,5	79,4	198,8	9,5	32	71	38	45	78	37
15	SPIRIT	48	MASTERBREEDER	95,3	77	167,3	9,8	32,4	73	42	49	46	20
16	NOSTROMO	48	MASTERBREEDER	110,4	91,5	165,2	8,1	25,2	77	53	42	76	46
17	STORMFIRE	48	MASTERBREEDER	83,8	78,5	109,3	4,5	31,2	91	68	46	48	31
18	LOCKNESS	48	MASTERBREEDER	111,4	92	231	11,3	27,8	81	40	52	23	16
19	APOLLO	48	MASTERBREEDER	44	34,5	84,6	5,6	27,4	78	42	47	38	9
20	ROWDY	48	MASTERBREEDER	87,7	63,1	179,5	10,8	30,1	70	37	46	63	21
1	parker	48	R	69	58,6	118,8	8,5	30,2	80	48	49	48	18
2	nostromo	48	R	128,9	103,5	241,1	9,7	27,9	79	44	43	92	66
3	apollo	48	R	77,3	56	185,6	8,9	32,2	71	30	49	67	28
4	rowdy	48	R	125,1	97,5	250,6	11,1	29,7	75	38	53	87	51
5	stormfire	48	R	127,9	123	180,2	6,9	27,5	96	68	48	26	26
6	hermes	48	R	130,8	120,3	186,3	6,8	33,7	89	64	47	84	70
7	stan	48	R	123,5	105,1	215,4	8,8	29,6	82	49	40	81	61
8	tom	48	R	114	99	190,7	8,4	31,9	83	50	55	79	54
9	spirit	48	R	124,7	98,6	226,1	10	28,5	76	44	46	79	49
10	nostromo	48	R	113,1	101	158,5	6,2	29,1	85	62	42	80	59
11	stormfire	48	R	151,3	142,1	214	6,9	35,6	93	67	49	88	84
12	VASCO	48	R	72,4	54,8	153,9	8,2	36	73	35	49	73	31
13	VOICE	48	R	76,5	57,9	145,3	8,5	31,1	71	38	52	65	26
14	VIRUS	48	R	54,6	39,6	112,9	7,4	33,6	69	35	53	31	9
15	SPIRIT	48	R	115	102,9	158,2	6,3	30,5	84	61	48	75	49
16	NOSTROMO	48	R	73,8	53,5	143,6	8,3	29,5	69	38	48	44	18
17	STORMFIRE	48	R	137,2	129,6	175,5	5,5	35,7	91	71	52	73	60
18	LOCKNESS	48	R	120,3	108	202,6	8,3	29,6	89	54	51	66	58
19	APOLLO	48	R	64	56,4	98,9	5,3	30,4	85	56	45	63	29
20	ROWDY	48	R	125	103,6	217,8	9,7	30,3	78	46	52	79	50
1	parker	72	BOTUDOG	116,1	95,4	219,9	10,3	28	82	45	42	34	22
2	nostromo	72	BOTUDOG	104,2	88,4	177,1	7,8	26,4	83	52	41	74	54
3	apollo	72	BOTUDOG	58,3	47	123,7	7,6	33,8	77	39	50	50	17
4	rowdy	72	BOTUDOG	98,3	77,5	208,9	9,7	30,1	76	39	58	72	41
5	stormfire	72	BOTUDOG	78	58,2	168,2	8,4	32,8	72	36	48	69	30
6	hermes	72	BOTUDOG	81	70	133	6,6	31,9	83	53	52	70	40
7	stan	72	BOTUDOG	90,1	75,8	167,5	7,3	29,9	82	47	38	73	50
8	tom	72	BOTUDOG	40,9	26,7	87,7	7,3	34,9	66	32	53	3	0
9	spirit	72	BOTUDOG	111,9	100,3	160,1	6,6	28,4	85	60	48	66	47
10	nostromo	72	BOTUDOG	84,8	73,4	126,3	5,8	25,5	82	58	43	41	24
11	stormfire	72	BOTUDOG	120,2	113,1	164	5,8	31,5	92	70	45	79	69
12	VASCO	72	BOTUDOG	51,9	40,9	94,7	6,8	32,5	76	43	44	39	10
13	VOICE	72	BOTUDOG	61	49,4	105,9	5,8	31,7	77	47	43	40	15
14	VIRUS	72	BOTUDOG	51,2	44	78,3	4,8	27,5	81	54	64	19	7
15	SPIRIT	72	BOTUDOG	74	64,5	110,7	5,5	28,1	82	56	47	60	29
16	NOSTROMO	72	BOTUDOG	96,8	90,6	122	5,6	22,1	91	72	40	50	38
17	STORMFIRE	72	BOTUDOG	92	83,1	131,1	5,6	29,5	86	62	58	64	41
18	LOCKNESS	72	BOTUDOG	77,9	64,3	132	6,5	18,8	80	50	47	3	2
19	APOLLO	72	BOTUDOG	42,3	36,2	64,7	5,6	25,5	84	58	53	21	4
20	ROWDY	72	BOTUDOG	76,1	61,6	154,3	7,8	30,7	78	44	56	46	24
1	parker	72	CANI EX LT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	nostromo	72	CANI EX LT	107,7	83,2	169,1	9	23,4	74	50	53	86	47

3	apollo	72	CANI EX LT	34,6	20,9	92,4	4,1	27	60	28	51	7	0
4	rowdy	72	CANI EX LT	80,9	61,7	169,6	9	37,3	72	35	49	69	28
5	stormfire	72	CANI EX LT	42,6	30,5	104,2	5,5	38,4	72	31	47	48	5
6	hermes	72	CANI EX LT	58,9	44,5	114	7,4	33,3	73	41	42	18	5
7	stan	72	CANI EX LT	62,4	49	124,9	7,7	34,2	75	39	47	36	13
8	tom	72	CANI EX LT	94,8	79,9	171,5	9,3	28,6	81	47	49	63	38
9	spirit	72	CANI EX LT	118,1	94,2	195,3	10,8	24,1	76	48	50	69	41
10	nostromo	72	CANI EX LT	75,7	58,4	130,4	7,9	29,9	74	45	44	37	17
11	stormfire	72	CANI EX LT	95,8	75,2	187,6	10	31,1	74	41	54	64	33
12	VASCO	72	CANI EX LT	46,8	33,4	106	5,4	38,6	70	33	52	49	9
13	VOICE	72	CANI EX LT	45,9	34,7	88,4	6,2	30,1	74	41	42	46	8
14	VIRUS	72	CANI EX LT	58,6	44,4	117,4	6,3	36,1	74	37	40	56	17
15	SPIRIT	72	CANI EX LT	95,5	70,9	150,2	8,3	28,1	71	46	55	71	29
16	NOSTROMO	72	CANI EX LT	91,4	70,2	153,6	8,3	30,9	74	45	49	59	29
17	STORMFIRE	72	CANI EX LT	121,2	100,5	187,6	8,9	25,1	81	55	42	85	61
18	LOCKNESS	72	CANI EX LT	80,4	62,2	137,7	7,1	34,1	74	45	56	7	3
19	APOLLO	72	CANI EX LT	40,1	27,8	79,6	6	27,3	69	39	48	10	1
20	ROWDY	72	CANI EX LT	47,4	31,2	96,1	7,3	18,6	59	35	45	1	0
1	parker	72	CANI EX LT+R	25,5	14,3	69,9	0	33,6	57	29	43	3	0
2	nostromo	72	CANI EX LT+R	97,4	76,8	166,8	8,6	26,7	75	46	47	80	46
3	apollo	72	CANI EX LT+R	45,1	31,5	89,9	5,5	28,4	68	37	46	14	2
4	rowdy	72	CANI EX LT+R	117,5	96,1	213,7	10,1	30,3	78	44	50	81	51
5	stormfire	72	CANI EX LT+R	59,1	40,3	100,5	5,4	38,2	66	41	60	48	12
6	hermes	72	CANI EX LT+R	66	53,7	116,1	7,3	31	78	46	41	24	9
7	stan	72	CANI EX LT+R	110,1	98,8	172,4	8	26,1	87	58	40	73	57
8	tom	72	CANI EX LT+R	40,9	33,1	68,9	6,6	25,4	77	47	43	14	2
9	spirit	72	CANI EX LT+R	141,9	124,2	209,9	9,8	22,9	86	59	48	79	63
10	nostromo	72	CANI EX LT+R	78,5	64,2	120,5	6,8	27,3	78	54	53	67	34
11	stormfire	72	CANI EX LT+R	99,8	83,6	178,2	8,9	28,9	80	48	46	57	37
12	VASCO	72	CANI EX LT+R	59,7	42,9	123,1	6,2	36,7	73	37	53	63	19
13	VOICE	72	CANI EX LT+R	68,9	54,7	115,2	7,6	25,2	77	47	43	68	27
14	VIRUS	72	CANI EX LT+R	71,3	53,4	135,6	6,8	36,5	73	38	55	57	19
15	SPIRIT	72	CANI EX LT+R	119,8	103,2	192,9	11,8	22,5	84	53	48	61	42
16	NOSTROMO	72	CANI EX LT+R	65,8	47,9	116,9	6,4	35,2	69	41	47	64	21
17	STORMFIRE	72	CANI EX LT+R	100,7	82	155,3	7,5	28,4	78	52	43	78	50
18	LOCKNESS	72	CANI EX LT+R	84,5	67,2	136,7	6,8	28,6	76	49	41	21	11
19	APOLLO	72	CANI EX LT+R	57,8	44,1	96,8	5,7	31,1	76	47	52	8	3
20	ROWDY	72	CANI EX LT+R	76,5	54,5	147,5	6,3	38,9	70	37	47	57	18
1	parker	72	CANI EX ST	27,4	18,8	69,9	0	24,6	65	31	55	4	0
2	nostromo	72	CANI EX ST	122,9	106,5	188	7,6	26,8	84	56	42	86	66
3	apollo	72	CANI EX ST	62,9	54,4	112	7	33,5	79	45	69	3	1
4	rowdy	72	CANI EX ST	114,9	100,9	188,2	8,8	31	83	52	54	71	49
5	stormfire	72	CANI EX ST	48,8	37,5	92,9	5,8	32,2	74	41	49	8	2
6	hermes	72	CANI EX ST	56,5	45,7	98,5	6,3	27,7	72	43	40	3	1
7	stan	72	CANI EX ST	123,4	113,6	168,4	6,1	34,4	89	66	40	74	59
8	tom	72	CANI EX ST	49,5	43,9	78,9	5,1	30,3	86	55	51	31	10
9	spirit	72	CANI EX ST	132,2	119,6	183,2	7	29,6	87	63	46	76	59
10	nostromo	72	CANI EX ST	87,7	79,9	124,9	5,7	28	87	62	47	42	29
11	stormfire	72	CANI EX ST	110,6	101,6	165,3	6,1	34,9	89	61	48	68	55

12	VASCO	72	CANI EX ST	44	38,7	58,3	6,2	24,3	82	62	41	0	0
13	VOICE	72	CANI EX ST	52	38,8	90,5	10,7	28	71	42	52	2	0
14	VIRUS	72	CANI EX ST	26,2	21,7	37,5	0	22,8	81	64	52	0	0
15	SPIRIT	72	CANI EX ST	60,4	51,4	95,1	6,8	27,6	81	52	58	21	8
16	NOSTROMO	72	CANI EX ST	47,4	39,3	73,9	4,9	14,6	79	52	35	4	1
17	STORMFIRE	72	CANI EX ST	105,1	88,3	189	9	33,4	78	45	52	47	26
18	LOCKNESS	72	CANI EX ST	23,4	10,5	31	0	0	45	34	53	0	0
19	APOLLO	72	CANI EX ST	35,2	25,8	64,2	2,2	23,7	72	43	44	0	0
20	ROWDY	72	CANI EX ST	69,3	53,7	126,9	8,3	30,7	74	43	49	34	12
1	parker	72	CHILL LT	23,5	14,7	73	0	37,9	62	20	52	2	0
2	nostromo	72	CHILL LT	127,8	104,3	217,3	9,8	24,1	80	49	41	93	68
3	apollo	72	CHILL LT	59,5	42,8	138,7	8,9	34,2	69	32	47	25	6
4	rowdy	72	CHILL LT	140,6	116,1	259,4	11,5	30,7	79	45	46	85	58
5	stormfire	72	CHILL LT	53,7	32,7	107,5	0	37	62	31	50	7	0
6	hermes	72	CHILL LT	93,8	76,8	173,8	9,6	31,3	77	43	56	65	35
7	stan	72	CHILL LT	33,9	24,4	70,7	2,1	21,7	71	36	36	1	0
8	tom	72	CHILL LT	104,1	91,1	174,5	8,6	29,6	84	52	45	68	45
9	spirit	72	CHILL LT	132,4	115,3	202,3	9,5	23,1	84	57	48	66	50
10	nostromo	72	CHILL LT	98,7	85	144,2	7,9	22,2	82	58	54	67	43
11	stormfire	72	CHILL LT	75	56,4	151,7	9,6	34,2	71	38	52	55	20
12	VASCO	72	CHILL LT	49,8	34,3	106,9	8,1	38	67	33	52	44	7
13	VOICE	72	CHILL LT	78,2	61	134,5	8	28,3	74	44	43	77	32
14	VIRUS	72	CHILL LT	84,8	73,8	135,9	7,4	28,1	83	52	47	71	40
15	SPIRIT	72	CHILL LT	121	104,7	169,7	8,2	22,9	82	59	46	79	52
16	NOSTROMO	72	CHILL LT	123,4	111,2	156,1	7,5	17,1	86	69	41	81	63
17	STORMFIRE	72	CHILL LT	139	127,6	192,3	7,5	26,5	89	67	49	79	66
18	LOCKNESS	72	CHILL LT	87,9	72,2	157,8	9,6	27,6	78	46	51	16	9
19	APOLLO	72	CHILL LT	35,8	29,4	60,6	5,9	28,4	82	52	49	42	4
20	ROWDY	72	CHILL LT	93,1	69,7	194,9	10,6	33,5	70	34	47	41	18
1	parker	72	CHILL ST	33,7	19,5	73,4	0	28,1	56	28	39	5	0
2	nostromo	72	CHILL ST	136,9	120,1	191,8	8,9	20,1	86	63	54	94	77
3	apollo	72	CHILL ST	54,8	40,4	126,8	8,7	34,6	69	33	58	17	4
4	rowdy	72	CHILL ST	135,6	110,8	261,2	11,6	30,5	79	42	47	85	58
5	stormfire	72	CHILL ST	39,9	27,5	94,3	5,2	45,2	64	26	69	9	2
6	hermes	72	CHILL ST	83	66,5	160,7	9,5	32,2	76	41	50	47	23
7	stan	72	CHILL ST	126	111,5	193,1	8,5	25	86	58	39	85	66
8	tom	72	CHILL ST	99,5	88,3	159,3	7,8	29,3	85	55	45	67	45
9	spirit	72	CHILL ST	132,3	113,8	207,8	10	23,8	82	55	56	75	53
10	nostromo	72	CHILL ST	104,3	88,5	156,8	8	23,4	81	56	42	56	37
11	stormfire	72	CHILL ST	41,1	31,4	88,3	9,4	28,1	71	34	43	5	1
12	VASCO	72	CHILL ST	69	54,4	129,3	7,4	31,2	76	42	42	75	31
13	VOICE	72	CHILL ST	93,1	80,4	137,8	7,7	23,9	81	55	57	83	46
14	VIRUS	72	CHILL ST	89,8	77,3	156,4	8,8	31,4	79	46	54	55	30
15	SPIRIT	72	CHILL ST	132,3	120,5	175,3	8,3	21,1	88	67	57	80	62
16	NOSTROMO	72	CHILL ST	117	102,7	163,8	8,2	21,1	83	61	44	80	59
17	STORMFIRE	72	CHILL ST	109,5	97,3	163,9	7,7	27,3	84	58	44	71	48
18	LOCKNESS	72	CHILL ST	107,9	92,6	190,9	11	25,6	81	49	59	12	8
19	APOLLO	72	CHILL ST	39	32,7	66,5	6,6	28,9	82	51	47	28	3
20	ROWDY	72	CHILL ST	117,9	89,3	252,5	12,1	31	73	35	54	70	38

1	parker	72	JO+R	114,8	98,9	213,9	10,1	27,6	83	46	64	37	30
2	nostromo	72	JO+R	136,7	121,1	201,3	7,6	27,2	87	61	44	92	77
3	apollo	72	JO+R	76	58,5	171,7	8	31,5	74	34	49	63	31
4	rowdy	72	JO+R	119,2	93,1	244,7	11,3	25	76	38	48	77	47
5	stormfire	72	JO+R	71,3	53,4	164,4	9,8	30,5	72	35	64	16	7
6	hermes	72	JO+R	85,8	69,8	164,6	8,8	31,3	76	41	59	64	35
7	stan	72	JO+R	125,5	108	216,3	8,4	32,9	83	50	50	82	62
8	tom	72	JO+R	103,5	89,7	182,5	8,6	31,7	83	49	52	64	45
9	spirit	72	JO+R	132,1	116,9	199,4	8	32,5	83	57	47	81	59
10	nostromo	72	JO+R	97,9	84,9	156,4	6,9	29,6	82	54	42	75	51
11	stormfire	72	JO+R	135,1	121	225,3	8,8	31,9	88	54	51	83	72
12	VASCO	72	JO+R	71,4	59,9	131,6	6,8	33,9	80	44	42	72	37
13	VOICE	72	JO+R	85,7	74,5	129,3	6,3	31,7	81	53	47	75	37
14	VIRUS	72	JO+R	84,3	70,8	149,6	7,3	33	80	45	41	61	34
15	SPIRIT	72	JO+R	123,6	111,7	172,4	7	30,3	85	60	57	80	55
16	NOSTROMO	72	JO+R	90,5	73,8	149,9	6,9	28,6	77	49	55	79	45
17	STORMFIRE	72	JO+R	136	126	194,5	6,8	37,4	91	64	51	82	70
18	LOCKNESS	72	JO+R	110,5	96,2	191,7	8,4	27,9	85	51	46	54	43
19	APOLLO	72	JO+R	60,7	54,5	89,7	4,7	29,1	87	60	46	67	30
20	ROWDY	72	JO+R	110,2	82,7	208,1	10,1	27,1	72	39	47	82	42
1	parker	72	MASTERBREEDER	70,4	44,3	150,3	8,8	37,1	63	28	40	39	4
2	nostromo	72	MASTERBREEDER	128,8	96,2	236,8	10,9	25,2	74	43	51	93	52
3	apollo	72	MASTERBREEDER	89,9	60,6	237,6	10,4	36,7	66	26	52	67	19
4	rowdy	72	MASTERBREEDER	135	88,6	335,2	14,3	30,7	65	27	56	79	24
5	stormfire	72	MASTERBREEDER	62,1	39,5	140,1	9,3	35,5	70	39	46	43	4
6	hermes	72	MASTERBREEDER	127,3	95,1	224,7	10,4	26,8	73	44	51	88	47
7	stan	72	MASTERBREEDER	130,2	90,2	285,7	13,3	30,6	67	32	45	86	36
8	tom	72	MASTERBREEDER	117,8	79,8	259	11,7	33,1	67	31	49	65	20
9	spirit	72	MASTERBREEDER	128,5	91,6	263,4	13,1	28,8	68	35	61	73	30
10	nostromo	72	MASTERBREEDER	110,9	83,6	194,3	9,4	26,5	72	44	45	78	40
11	stormfire	72	MASTERBREEDER	126,6	83,2	263,8	11,8	32,8	63	32	47	83	29
12	VASCO	72	MASTERBREEDER	88,5	61,3	181,5	9	33,6	65	32	43	77	27
13	VOICE	72	MASTERBREEDER	99,8	78,7	199,7	9,6	34,9	73	37	55	78	41
14	VIRUS	72	MASTERBREEDER	98	82,4	186	9,1	31,8	79	43	42	59	37
15	SPIRIT	72	MASTERBREEDER	87	69,7	154,8	9	33,7	74	42	45	34	14
16	NOSTROMO	72	MASTERBREEDER	104,3	85,6	164,3	8,1	26,1	76	50	56	74	43
17	STORMFIRE	72	MASTERBREEDER	51,5	46,2	76	4,1	28,2	87	60	53	25	10
18	LOCKNESS	72	MASTERBREEDER	86,6	67,2	182,2	10,5	29,6	75	37	47	27	12
19	APOLLO	72	MASTERBREEDER	40,1	32,4	77,6	6	29,6	79	43	47	30	6
20	ROWDY	72	MASTERBREEDER	88,3	61,1	199,8	10,7	33,3	66	31	47	27	9
1	parker	72	R	86,3	73,7	164,2	10,2	29,8	86	54	59	49	26
2	nostromo	72	R	133	117,1	211,7	8,1	29,2	86	56	59	91	75
3	apollo	72	R	76,2	58,3	174,4	8,3	31,2	74	33	44	65	34
4	rowdy	72	R	101,5	73,2	228,6	11,9	26,6	69	32	45	66	27
5	stormfire	72	R	46,5	32,3	87,7	10,2	15,5	69	45	54	19	3
6	hermes	72	R	77,2	61,8	153,4	8,5	29,7	75	40	54	44	22
7	stan	72	R	123,8	104,9	218,8	9	31,2	82	48	42	82	61
8	tom	72	R	110,4	100,2	168,2	7,2	33,7	87	57	49	77	54
9	spirit	72	R	130,2	118,9	191,1	7,6	31,9	88	60	47	70	55

10	nostromo	72	R	99,5	86,7	158,8	6,9	29,8	84	54	40	73	52
11	stormfire	72	R	126,5	113,9	214,5	8,7	31	88	53	47	81	70
12	VASCO	72	R	73,6	60,6	152,4	7,6	34,8	79	39	43	55	29
13	VOICE	72	R	67	49,5	135,9	8,6	32,9	70	35	47	50	16
14	VIRUS	72	R	68,8	59,7	119	7,4	32,7	84	52	51	73	31
15	SPIRIT	72	R	105,6	93,7	154,3	6,9	31,1	83	56	56	76	44
16	NOSTROMO	72	R	109,9	98,2	172,3	7	31,5	86	56	46	76	58
17	STORMFIRE	72	R	138,7	128,8	192,5	6,5	36,8	91	66	46	84	71
18	LOCKNESS	72	R	108,8	93,7	174,2	7,4	29	83	53	43	60	43
19	APOLLO	72	R	61	53,7	94,4	5,1	30,1	86	57	56	65	28
20	ROWDY	72	R	87,6	59,8	173,2	9,5	26,4	66	35	48	58	18
1	parker	96	BOTUDOG	95,6	82,1	172,8	8,5	23,4	83	48	43	36	28
2	nostromo	96	BOTUDOG	98,5	81,5	189	8,2	28,4	81	46	42	74	52
3	apollo	96	BOTUDOG	61,1	50,2	119,9	7,2	31,5	78	42	45	43	15
4	rowdy	96	BOTUDOG	95,3	74,4	203,7	9,6	29,1	77	39	54	73	42
5	stormfire	96	BOTUDOG	64,7	44,9	144,7	7,1	36,1	69	36	48	58	17
6	hermes	96	BOTUDOG	83,6	75,4	128,5	5,9	30,9	87	60	50	69	45
7	stan	96	BOTUDOG	82,8	67,7	163,4	7,8	30,8	80	44	43	73	45
8	tom	96	BOTUDOG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	96	BOTUDOG	110,4	97,2	178,4	7,7	31,4	84	54	48	67	47
10	nostromo	96	BOTUDOG	84,7	77,9	115,6	5,4	25,5	87	66	42	30	20
11	stormfire	96	BOTUDOG	107,7	99,4	150,1	5,7	30	89	67	48	78	63
12	VASCO	96	BOTUDOG	52,2	44,5	87,1	5,6	29,9	81	51	44	32	11
13	VOICE	96	BOTUDOG	58,3	48,9	94,9	5,4	30	79	52	44	29	11
14	VIRUS	96	BOTUDOG	36,9	27,3	79,7	7,5	37,8	72	35	57	3	0
15	SPIRIT	96	BOTUDOG	72,3	64,4	104,1	5	27,4	85	60	47	59	36
16	NOSTROMO	96	BOTUDOG	85,1	77,6	114,6	5,8	23,1	87	66	51	42	29
17	STORMFIRE	96	BOTUDOG	73,3	61	117,4	6	29,8	80	53	48	63	31
19	APOLLO	96	BOTUDOG	44,4	37,9	68,8	5,5	24	84	57	46	20	5
20	ROWDY	96	BOTUDOG	63,2	49	124,5	7,3	32,2	76	42	47	38	15
1	parker	96	CANI EX LT	24,9	16,7	62,9	0	53,3	67	27	39	0	0
2	nostromo	96	CANI EX LT	129	118,5	171,6	6,3	27	89	68	50	84	71
3	apollo	96	CANI EX LT	39,4	27,7	95,5	10	31	67	28	45	6	0
4	rowdy	96	CANI EX LT	71,1	53,7	142,5	8,7	34,5	71	36	44	55	20
5	stormfire	96	CANI EX LT	27	21,7	47,7	5,6	27,1	85	54	65	11	1
6	hermes	96	CANI EX LT	46,5	34,8	84,4	6,5	20,9	73	44	43	8	2
7	stan	96	CANI EX LT	40,3	30	81,7	7,2	26,5	74	44	48	4	0
8	tom	96	CANI EX LT	58,1	49,2	110,9	8,6	26	81	44	50	2	1
9	spirit	96	CANI EX LT	86,5	66,1	160	9,9	29,3	73	40	44	26	10
10	nostromo	96	CANI EX LT	68,6	54,4	114,3	7,5	27,8	75	47	41	15	6
11	stormfire	96	CANI EX LT	69,9	50,3	144	8,7	32,7	68	36	43	61	20
12	VASCO	96	CANI EX LT	40,1	28,6	90,7	8,2	32,8	70	32	46	17	1
13	VOICE	96	CANI EX LT	47,7	33	97,6	9,8	30,5	66	34	48	7	1
14	VIRUS	96	CANI EX LT	39,4	28,4	96,5	5,7	37,1	70	30	44	27	3
15	SPIRIT	96	CANI EX LT	90,4	64,8	150,4	7,3	32,7	70	43	47	66	25
16	NOSTROMO	96	CANI EX LT	60,2	42,5	107,6	6,5	31,8	67	39	45	26	6
17	STORMFIRE	96	CANI EX LT	46,8	36,2	86,1	5,5	33,5	76	43	45	34	8
1	parker	96	CANI EX LT+R	20,4	17	30,8	0	30	83	55	48	0	0
2	nostromo	96	CANI EX LT+R	75,1	59,2	123,8	7,7	28,2	76	48	43	41	18

3	apollo	96	CANI EX LT+R	39	29,7	88,9	8,1	37,1	69	32	47	6	1
4	rowdy	96	CANI EX LT+R	113,4	91,4	209,1	10,3	30,9	77	43	46	74	45
5	stormfire	96	CANI EX LT+R	42,6	32,2	82,3	3,4	32	72	43	63	8	2
6	hermes	96	CANI EX LT+R	63,6	51,3	108,6	6,7	31,8	78	48	43	51	20
7	stan	96	CANI EX LT+R	101,1	89,3	161,2	7,8	27,1	85	55	42	69	50
8	tom	96	CANI EX LT+R	45,7	26	84	0	35,4	61	30	53	1	0
9	spirit	96	CANI EX LT+R	103,8	83,4	183,2	10,2	28,1	75	44	44	53	30
10	nostromo	96	CANI EX LT+R	78,3	66,2	115,1	6,6	23,9	80	57	40	61	35
11	stormfire	96	CANI EX LT+R	90,8	73,1	177,1	9,8	31	77	42	46	35	19
12	VASCO	96	CANI EX LT+R	36,9	25	88,9	7,9	35,6	67	30	48	11	1
13	VOICE	96	CANI EX LT+R	52,1	40,3	89,4	6,1	29,3	77	46	50	47	11
14	VIRUS	96	CANI EX LT+R	60,1	44,8	120,6	6,6	37,4	72	37	61	44	12
15	SPIRIT	96	CANI EX LT+R	108,7	84,5	171,5	9,5	25,7	75	48	50	69	36
16	NOSTROMO	96	CANI EX LT+R	66,8	49,7	117,7	7	34,8	71	42	59	40	13
17	STORMFIRE	96	CANI EX LT+R	63,3	49,2	107,9	5,8	34,4	75	45	44	57	22
18	LOCKNESS	96	CANI EX LT+R	70,5	55,8	108,9	5,9	27,4	74	49	36	2	0
20	ROWDY	96	CANI EX LT+R	39,2	27,9	83,2	10,3	31,8	68	36	49	3	0
1	parker	96	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	nostromo	96	CANI EX ST	77	54,8	146,3	7,8	30,6	67	37	51	75	25
3	apollo	96	CANI EX ST	47,4	42,2	79,6	5,9	31	85	55	41	5	2
4	rowdy	96	CANI EX ST	95	80,6	169,6	9	25,6	81	46	44	40	27
5	stormfire	96	CANI EX ST	28,8	23,5	64,9	0	24,7	81	38	47	2	0
6	hermes	96	CANI EX ST	71,8	65,2	99,8	4,5	32,9	87	62	57	50	27
7	stan	96	CANI EX ST	119,4	111	159,4	5,6	33,4	90	68	52	75	61
8	tom	96	CANI EX ST	49,9	43,3	90,1	5,9	33	82	46	45	8	3
9	spirit	96	CANI EX ST	111,2	98,4	165,6	7	32,9	84	58	44	61	44
10	nostromo	96	CANI EX ST	49,6	38,9	89,3	6,1	31,1	75	44	42	23	6
11	stormfire	96	CANI EX ST	94,2	85,8	140,8	6	35,4	87	59	45	60	43
12	VASCO	96	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	VOICE	96	CANI EX ST	40,9	38,9	48,9	2,2	3,3	93	78	36	0	0
14	VIRUS	96	CANI EX ST	44,5	41,1	54	4,2	0	92	77	35	0	0
15	SPIRIT	96	CANI EX ST	50,2	41,2	77,9	5,5	25	79	53	49	32	10
16	NOSTROMO	96	CANI EX ST	21,6	11,2	46,9	0	0	52	24	29	0	0
17	STORMFIRE	96	CANI EX ST	46,5	35,9	86,8	5,6	27,6	75	46	49	27	6
20	ROWDY	96	CANI EX ST	51,7	41,3	90,3	8,8	27	74	45	53	20	5
1	parker	96	CHILL LT	57,4	46,3	91,4	6,1	20,3	74	44	37	0	0
2	nostromo	96	CHILL LT	126,9	105,2	206,6	9,5	22,7	81	52	43	91	68
3	apollo	96	CHILL LT	21	15,2	46,7	0	18,9	72	35	55	1	0
4	rowdy	96	CHILL LT	131,1	104,3	260,7	12,3	30,5	76	39	49	79	48
5	stormfire	96	CHILL LT	25,6	16,2	90,3	0	25,4	62	20	46	2	0
6	hermes	96	CHILL LT	100,3	85,8	173,3	9	29,1	82	50	45	54	36
7	stan	96	CHILL LT	98	72,9	189,4	9,8	30	70	39	50	81	36
8	tom	96	CHILL LT	91,7	77,9	180,2	9,6	33,9	80	43	49	27	17
9	spirit	96	CHILL LT	119,5	97,3	193,3	10,2	24,8	77	50	45	72	43
10	nostromo	96	CHILL LT	100,4	87,4	146,2	7,4	22,8	83	59	42	62	42
11	stormfire	96	CHILL LT	98,7	81	195,3	10,5	31,2	78	43	46	45	27
12	VASCO	96	CHILL LT	69,8	54,1	131	7,1	30,5	76	43	52	78	32
13	VOICE	96	CHILL LT	51,2	38,2	93,2	7,4	31,6	72	41	58	43	9
14	VIRUS	96	CHILL LT	91,9	80,5	152,9	8,3	28,3	83	50	59	64	38

15	SPIRIT	96	CHILL LT	83,4	67,8	133,9	7,7	26,4	76	50	45	55	27
16	NOSTROMO	96	CHILL LT	116,8	101,2	159,5	7,9	20,6	83	62	39	75	53
17	STORMFIRE	96	CHILL LT	142,3	132,4	202,8	8,1	23,5	92	68	46	78	71
18	LOCKNESS	96	CHILL LT	80,9	64,9	137,7	8,5	26,7	75	46	50	1	0
19	APOLLO	96	CHILL LT	47,1	34,8	87,8	9,2	24,4	72	42	46	5	1
20	ROWDY	96	CHILL LT	71	53,6	137,5	8,5	31,5	72	39	46	25	9
1	parker	96	CHILL ST	83,7	66,4	133,8	6,6	25,5	78	49	40	4	2
2	nostromo	96	CHILL ST	120,9	91,2	234,8	11,1	27,3	73	40	41	87	50
3	apollo	96	CHILL ST	36,4	23,4	89,5	6,8	32,4	63	30	37	3	0
4	rowdy	96	CHILL ST	123,9	97,3	247,5	11,9	31,7	74	38	46	76	46
5	stormfire	96	CHILL ST	23,8	16,5	50,2	0	26,9	70	43	59	9	0
6	hermes	96	CHILL ST	93,7	76,9	179,2	9,5	31,6	77	42	48	46	27
7	stan	96	CHILL ST	121,1	105,3	201,1	9,2	25,6	85	54	40	83	65
8	tom	96	CHILL ST	96,7	81,8	198,3	10,6	32,5	81	41	53	9	6
9	spirit	96	CHILL ST	119,2	98,5	206,1	10,3	27,2	78	48	46	68	45
10	nostromo	96	CHILL ST	99,6	85,2	150,3	7,9	24,3	81	56	41	62	40
11	stormfire	96	CHILL ST	38,5	25,7	91,3	8,1	32,6	65	29	56	5	0
12	VASCO	96	CHILL ST	48,6	32,3	99	8	39,4	67	33	49	20	3
13	VOICE	96	CHILL ST	84,3	73,6	130,9	7,9	25,3	83	54	42	76	40
14	VIRUS	96	CHILL ST	83,3	68	150,5	9,1	30,8	75	42	52	52	24
15	SPIRIT	96	CHILL ST	127,2	115,4	172,9	8,4	20,2	88	65	52	80	61
16	NOSTROMO	96	CHILL ST	112,4	97,9	153,6	7,8	20,2	82	62	50	75	53
17	STORMFIRE	96	CHILL ST	92,5	77,6	156,6	8,3	29,4	80	50	48	61	37
19	APOLLO	96	CHILL ST	39,4	31,6	74,4	7	30,3	78	44	53	10	1
20	ROWDY	96	CHILL ST	86,3	63,2	158,5	8,9	31,3	69	39	45	66	25
1	parker	96	JO+R	78,9	68,6	124,6	7,3	24	84	54	44	16	12
2	nostromo	96	JO+R	130,3	112,3	216,2	8,6	28,4	84	53	44	89	71
3	apollo	96	JO+R	66,7	51	154	8,2	32,2	74	33	43	55	23
4	rowdy	96	JO+R	111,3	84,7	234,4	11,2	25,8	74	36	44	71	41
5	stormfire	96	JO+R	77,6	61,5	176,1	9	29,8	75	35	48	9	5
6	hermes	96	JO+R	118,1	109,7	164,5	6,2	29,9	88	64	44	79	61
7	stan	96	JO+R	123,7	106,4	221,5	9,2	31,1	83	48	48	80	60
8	tom	96	JO+R	64,8	58,1	145,7	14,4	10	94	67	53	0	0
9	spirit	96	JO+R	120,1	98,4	218,2	9,7	27,7	80	46	44	71	49
10	nostromo	96	JO+R	108,9	97,9	156,7	6,1	29	86	62	40	79	60
11	stormfire	96	JO+R	132,3	119,6	213,9	8,2	33,3	89	57	49	85	74
12	VASCO	96	JO+R	62,3	48,7	132,9	7,6	35,3	75	36	55	48	19
13	VOICE	96	JO+R	52,8	38,2	114,9	9,1	33,4	69	33	54	11	3
14	VIRUS	96	JO+R	81,1	68,7	146,6	7,5	32,2	81	45	42	64	35
15	SPIRIT	96	JO+R	134	122,3	187,9	7,1	30,8	88	63	58	76	59
16	NOSTROMO	96	JO+R	108,9	93,4	176,9	7,4	29,8	82	52	47	82	59
17	STORMFIRE	96	JO+R	127,5	119,2	167,9	6	32,9	90	69	47	81	67
18	LOCKNESS	96	JO+R	102,3	86,7	197,5	9,3	28,1	83	44	46	56	44
19	APOLLO	96	JO+R	56,6	46,4	103,8	6,2	29,8	80	47	47	30	11
20	ROWDY	96	JO+R	104,8	76,1	231,8	11,3	24,4	71	33	50	61	29
1	parker	96	MASTERBREEDER	70,2	47,9	149,6	9,8	35,6	66	31	40	30	7
2	nostromo	96	MASTERBREEDER	126,2	90,5	229,7	10,9	25,6	70	41	47	91	43
3	apollo	96	MASTERBREEDER	93	61,9	237,8	10,8	36,1	64	26	43	58	19
4	rowdy	96	MASTERBREEDER	130,4	85,8	322,6	13,9	33,4	64	27	59	81	25

5	stormfire	96	MASTERBREEDER	44,9	28,7	141,8	6,3	47,3	63	21	48	24	2
6	hermes	96	MASTERBREEDER	124	90,1	217,2	10,3	27,9	71	43	57	87	44
7	stan	96	MASTERBREEDER	130,9	89,5	285	13,1	31,2	67	32	46	82	32
8	tom	96	MASTERBREEDER	117,4	70,2	248,2	10,1	37,1	58	28	47	69	15
9	spirit	96	MASTERBREEDER	125,8	88,8	251,8	12,6	26,9	68	36	49	75	31
10	nostromo	96	MASTERBREEDER	106,3	81,1	179	8,6	26,8	73	46	44	76	40
11	stormfire	96	MASTERBREEDER	104,4	70,6	218,9	11,2	32,8	64	33	54	67	23
12	VASCO	96	MASTERBREEDER	73,6	56,2	162,4	8,6	35,3	72	34	53	53	22
13	VOICE	96	MASTERBREEDER	44,1	32,6	98,4	6,9	34,8	70	34	44	46	8
14	VIRUS	96	MASTERBREEDER	94,2	75,5	194,2	9,4	33,3	76	38	42	57	33
15	SPIRIT	96	MASTERBREEDER	55,2	44,1	117,1	7,1	36	73	37	58	13	4
16	NOSTROMO	96	MASTERBREEDER	108,7	85,7	180,5	8,8	26,2	74	47	42	72	40
17	STORMFIRE	96	MASTERBREEDER	95,3	75,6	180,3	9,9	33,5	74	41	53	52	26
19	APOLLO	96	MASTERBREEDER	42,9	30,9	81,8	6,9	29,1	70	39	52	5	1
20	ROWDY	96	MASTERBREEDER	70,1	49,1	144,7	9,1	31,8	67	35	47	16	4
1	parker	96	R	130,5	117,3	147,3	11,3	8,6	88	76	19	0	0
2	nostromo	96	R	126,8	107,6	218,6	8,7	28,4	83	50	46	89	70
3	apollo	96	R	52,8	33,7	133	9,2	28,7	63	26	46	16	3
4	rowdy	96	R	108,6	83,2	232,8	11,4	25,9	74	36	47	69	37
5	stormfire	96	R	117,6	109,6	171,4	6,3	38,2	92	64	62	9	9
6	hermes	96	R	108,6	95,5	183	8,1	32,3	84	52	43	69	51
7	stan	96	R	113,7	90	234,9	10,3	28,1	77	39	41	79	51
8	tom	96	R	97,6	79,7	205,6	9,9	30,8	77	38	48	26	17
9	spirit	96	R	104,4	64,1	235,1	11,9	25,3	61	29	52	62	14
10	nostromo	96	R	106,7	97	153,1	6,1	28,8	87	62	42	77	60
11	stormfire	96	R	111,2	97,7	204,8	8,8	28,2	86	48	49	67	54
12	VASCO	96	R	64,4	50,5	144,2	8	35,2	75	34	53	43	17
13	VOICE	96	R	47,9	34,3	105,7	8	33,3	68	33	54	11	2
14	VIRUS	96	R	89	77,5	161,2	7,4	34,7	83	46	45	67	43
15	SPIRIT	96	R	120,7	109,9	172,2	7	32,4	86	61	52	73	52
16	NOSTROMO	96	R	88	67,8	166,1	8,3	28	74	41	60	67	36
17	STORMFIRE	96	R	113,5	104	160,1	6,4	32	87	63	48	79	58
18	LOCKNESS	96	R	104,4	90,9	189,1	8,5	28,6	85	49	44	50	39
19	APOLLO	96	R	66,2	57,3	114	6,3	32	84	50	55	42	20
20	ROWDY	96	R	103,2	84,9	179,3	8,9	26,5	78	46	56	65	40
1	parker	120	BOTUDOG	108,1	87,8	206,9	9,8	26,9	80	44	38	37	27
2	nostromo	120	BOTUDOG	97,3	80,5	178,6	8	28,2	80	47	41	72	50
3	apollo	120	BOTUDOG	55,2	44	108,4	7,2	32	75	41	50	42	13
4	rowdy	120	BOTUDOG	95,1	76	204,1	9,5	29,3	77	39	52	68	40
5	stormfire	120	BOTUDOG	100,3	78,5	210	8,9	30,4	76	40	48	85	52
6	hermes	120	BOTUDOG	78,3	68,5	129,9	6,3	32,4	83	52	49	54	31
7	stan	120	BOTUDOG	83,9	68,6	169,4	7,8	30,3	79	43	38	74	44
8	tom	120	BOTUDOG	34,3	29,7	54,4	0	30	80	50	24	0	0
9	spirit	120	BOTUDOG	109,7	95,1	179,2	7,6	32	83	53	45	69	48
10	nostromo	120	BOTUDOG	102,6	94,5	137,3	5,3	25,6	90	71	46	16	13
11	stormfire	120	BOTUDOG	95	87,2	141,7	5,7	30,6	89	63	44	73	56
12	VASCO	120	BOTUDOG	54,2	46,6	96,5	5,7	31,4	83	48	41	27	9
13	VOICE	120	BOTUDOG	49,2	38,3	90,2	6,6	33,4	75	44	44	26	7
14	VIRUS	120	BOTUDOG	53	44,3	96,1	5,8	32,9	80	47	50	10	4

15	SPIRIT	120	BOTUDOG	60	50,6	93,6	5,3	29	81	54	56	49	21
16	NOSTROMO	120	BOTUDOG	78,6	69,7	119,7	6,2	26,2	85	59	42	33	23
17	STORMFIRE	120	BOTUDOG	80,8	72,8	120,3	5,4	30,7	86	60	50	63	39
19	APOLLO	120	BOTUDOG	39,3	32,6	61,3	3,6	26,8	81	54	54	9	1
20	ROWDY	120	BOTUDOG	80,6	68,7	148,8	7,2	29,2	83	49	48	41	25
2	nostromo	120	CANI EX LT	86,8	65,2	136,3	7,4	28,1	72	47	43	67	28
4	rowdy	120	CANI EX LT	61,9	46,8	124,2	8,4	35	71	36	43	37	11
6	hermes	120	CANI EX LT	36,1	23,2	82,8	0	33,8	63	32	47	1	0
7	stan	120	CANI EX LT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	tom	120	CANI EX LT	56,9	42,9	116,2	0	25,7	80	39	50	0	0
9	spirit	120	CANI EX LT	62,4	48,4	110,7	9,5	20,9	76	47	49	15	4
10	nostromo	120	CANI EX LT	67,3	58,8	98,3	5,8	26,4	83	59	44	16	8
11	stormfire	120	CANI EX LT	67,2	48,8	135,2	8,8	28,1	70	39	43	6	2
12	VASCO	120	CANI EX LT	40,3	28,7	98,2	10,6	35,1	67	30	48	2	0
13	VOICE	120	CANI EX LT	37,4	26	78,7	6,9	32,2	68	34	50	10	1
14	VIRUS	120	CANI EX LT	36,1	22,9	80,1	8,5	25,1	63	32	43	11	1
15	SPIRIT	120	CANI EX LT	54,4	39,7	100	6	36	73	41	55	38	8
16	NOSTROMO	120	CANI EX LT	45,4	33	101	8,3	31,5	70	32	48	2	0
17	STORMFIRE	120	CANI EX LT	97,7	74,3	165	7,9	32,7	75	46	54	54	26
2	nostromo	120	CANI EX LT+R	54,4	43,6	91,8	6,3	32,1	78	48	45	7	2
4	rowdy	120	CANI EX LT+R	101,4	83,4	181,8	9,6	32	78	45	51	72	41
6	hermes	120	CANI EX LT+R	54,2	42,9	90,8	7,6	24,2	74	48	44	14	3
7	stan	120	CANI EX LT+R	125,8	82,7	288	13,3	33	64	29	52	80	28
8	tom	120	CANI EX LT+R	34,2	27,3	70,9	11,1	22,6	80	43	45	2	0
9	spirit	120	CANI EX LT+R	97,4	78,7	162,5	9,4	26,4	77	48	46	42	24
10	nostromo	120	CANI EX LT+R	58,8	47,8	103,7	7,2	27	73	45	37	6	2
11	stormfire	120	CANI EX LT+R	67,2	55,2	120,1	8,5	23,3	77	47	53	18	8
12	VASCO	120	CANI EX LT+R	45,2	34	76,8	5,3	14,8	71	45	46	2	0
13	VOICE	120	CANI EX LT+R	42,2	31,9	79	6,5	31,4	74	41	47	31	4
14	VIRUS	120	CANI EX LT+R	43,3	30,3	93,6	5	33,7	68	34	43	14	2
15	SPIRIT	120	CANI EX LT+R	93,4	68,8	157,8	9,9	30,9	72	43	67	50	20
16	NOSTROMO	120	CANI EX LT+R	45,6	30,1	90,6	7,2	30,5	62	33	58	10	1
17	STORMFIRE	120	CANI EX LT+R	108,3	91,5	183,1	9,4	29,3	82	50	45	61	41
18	LOCKNESS	120	CANI EX LT+R	23,5	17,9	56,5	0	34	76	39	41	0	0
20	ROWDY	120	CANI EX LT+R	66	46,4	118	5,9	34,2	70	40	45	32	8
2	nostromo	120	CANI EX ST	119,3	109,4	160,4	5,8	29,8	89	67	43	82	68
4	rowdy	120	CANI EX ST	113,4	100	184,8	8,5	29,6	85	53	46	71	52
6	hermes	120	CANI EX ST	52,5	45,2	89,8	4,7	33	81	50	45	17	6
7	stan	120	CANI EX ST	101,3	92,1	139,6	5,4	32,2	87	65	51	70	51
8	tom	120	CANI EX ST	35,5	27,4	71	5,9	32,5	71	38	51	2	0
9	spirit	120	CANI EX ST	91	79,3	143,3	6,9	32,3	83	53	47	51	34
10	nostromo	120	CANI EX ST	46,1	38,3	73	4,9	27,3	78	51	57	15	4
11	stormfire	120	CANI EX ST	90,9	81,8	141,8	6,3	36	86	57	53	45	32
12	VASCO	120	CANI EX ST	38,2	35,2	49	8,7	18	89	68	36	0	0
13	VOICE	120	CANI EX ST	53,3	47,6	79,1	7,6	3,5	81	56	32	1	0
14	VIRUS	120	CANI EX ST	209	203	215,9	8,1	0	97	94	48	0	0
15	SPIRIT	120	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	NOSTROMO	120	CANI EX ST	26,2	22,4	30,1	0	0	86	75	49	0	0
17	STORMFIRE	120	CANI EX ST	47,7	31,4	83,3	5	15,1	70	47	38	3	0

20	ROWDY	120	CANI EX ST	64,2	54,1	112,7	7,5	31,2	79	47	60	32	13
2	nostromo	120	CHILL LT	129,7	113,4	184,3	8,9	19,6	85	62	39	92	74
4	rowdy	120	CHILL LT	134,1	110,2	256,1	11,8	32,5	78	42	45	83	56
6	hermes	120	CHILL LT	95,7	81,2	161,6	8,4	29	81	50	62	72	45
7	stan	120	CHILL LT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	tom	120	CHILL LT	83,9	68,4	170,5	9,6	34,4	78	40	52	7	4
9	spirit	120	CHILL LT	124,4	99	225,4	11,2	27,2	76	45	47	69	44
10	nostromo	120	CHILL LT	93,3	76,9	157,8	8,3	26	78	49	41	45	26
11	stormfire	120	CHILL LT	92,8	72,6	190,8	10,7	33,7	73	37	43	29	14
12	VASCO	120	CHILL LT	70,1	55,2	144,9	8,3	31,7	77	39	47	67	27
13	VOICE	120	CHILL LT	54,5	41,8	104,3	9,5	28,8	72	40	46	4	1
14	VIRUS	120	CHILL LT	70,9	57,9	124,2	7,8	30	76	44	41	49	19
15	SPIRIT	120	CHILL LT	110	94,9	156,8	8,4	22,4	82	58	43	75	49
16	NOSTROMO	120	CHILL LT	71,5	52,5	124,5	8,1	30,5	68	41	44	28	9
17	STORMFIRE	120	CHILL LT	126,5	114	206,9	9,4	26,9	88	56	46	70	58
18	LOCKNESS	120	CHILL LT	53	41,5	88	9,6	24,7	78	52	46	1	0
19	APOLLO	120	CHILL LT	39,5	32,8	66,8	5,4	31,5	82	50	60	4	1
20	ROWDY	120	CHILL LT	73	56,8	149,7	10,1	33,4	74	37	48	17	6
2	nostromo	120	CHILL ST	127,8	108,2	183	8,7	19,9	83	60	47	91	68
4	rowdy	120	CHILL ST	130	105,5	248,3	11,5	31,4	77	42	42	80	52
6	hermes	120	CHILL ST	87,2	73,3	152,2	8,2	31	81	49	45	65	38
7	stan	120	CHILL ST	120,7	105	191,6	8,9	24,3	85	57	44	87	68
8	tom	120	CHILL ST	81,1	66,4	170,2	9,7	33,1	78	43	43	4	2
9	spirit	120	CHILL ST	112,8	89,9	214,5	11,4	28,2	76	43	49	52	30
10	nostromo	120	CHILL ST	94,2	77,3	155,8	8,8	25,5	77	49	51	53	31
11	stormfire	120	CHILL ST	41	28,7	93,7	12,2	25,2	67	32	49	2	0
12	VASCO	120	CHILL ST	67,9	50,8	145,3	8,1	33,9	74	36	42	65	21
13	VOICE	120	CHILL ST	71,4	61,4	115,1	8,1	24,8	82	52	56	72	32
14	VIRUS	120	CHILL ST	77	64,5	136	8,2	29,8	79	45	41	47	21
15	SPIRIT	120	CHILL ST	121,3	108,7	167,4	8,7	20,5	86	64	54	77	58
16	NOSTROMO	120	CHILL ST	106,3	87	176,6	9,2	26,3	79	49	47	53	32
17	STORMFIRE	120	CHILL ST	126	111,3	221,4	10,3	28,6	85	51	45	63	49
19	APOLLO	120	CHILL ST	36,4	30	64,3	5,5	30,1	79	47	57	6	1
20	ROWDY	120	CHILL ST	107,4	80,2	211,4	11,2	31,2	72	38	46	64	28
1	parker	120	JO+R	128,6	118	189,9	8,3	22,3	90	63	40	56	51
2	nostromo	120	JO+R	134,4	120,9	189,9	7,2	27	88	64	43	90	75
3	apollo	120	JO+R	76,8	65	145,2	7	33,3	81	44	46	75	43
4	rowdy	120	JO+R	55,9	39,8	107,4	7,2	19,6	69	41	42	4	1
6	hermes	120	JO+R	101,5	93,4	150,1	6,4	30,6	88	62	42	74	56
7	stan	120	JO+R	121,8	108,7	198,4	8,1	32,2	86	54	44	82	65
8	tom	120	JO+R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	120	JO+R	105,2	86,3	200,4	10,5	29,5	80	45	49	71	42
10	nostromo	120	JO+R	98,7	84,9	169	7,5	29,8	83	50	47	72	51
11	stormfire	120	JO+R	133,6	120,8	232,1	9,2	31,8	89	53	46	75	68
12	VASCO	120	JO+R	64,6	52,3	134,6	7,6	34,9	78	38	43	58	25
13	VOICE	120	JO+R	53,3	40,6	111,1	7,9	31,3	73	36	50	6	2
14	VIRUS	120	JO+R	83,3	73,1	146,8	7,1	33,9	84	48	49	71	42
15	SPIRIT	120	JO+R	108,5	95	165,7	7,3	31,4	83	55	53	72	46
16	NOSTROMO	120	JO+R	95,6	76,1	180	8,3	27,8	77	42	43	68	42

17	STORMFIRE	120	JO+R	133,4	124,1	197,4	7,3	34,3	91	63	53	75	66
18	LOCKNESS	120	JO+R	76,8	65,7	140,6	8,3	30,9	81	46	52	6	3
19	APOLLO	120	JO+R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	ROWDY	120	JO+R	112,2	91,4	217,1	10,5	25,6	78	41	49	74	49
1	parker	120	MASTERBREEDER	66,8	44,5	155,8	7,6	38,9	64	26	40	31	4
2	nostromo	120	MASTERBREEDER	120,8	90	212,7	10,2	26,2	72	44	44	84	44
3	apollo	120	MASTERBREEDER	95,6	66,3	256,3	10,4	34,4	69	27	47	47	18
4	rowdy	120	MASTERBREEDER	127,7	84,7	321,1	13,6	31,1	65	27	45	80	25
6	hermes	120	MASTERBREEDER	117,8	88,2	193,3	9,1	26,6	73	48	44	86	48
7	stan	120	MASTERBREEDER	88,9	79	132,2	6,7	26,1	85	59	43	60	39
8	tom	120	MASTERBREEDER	102,8	56,7	232,4	9,5	37,6	54	25	54	70	12
9	spirit	120	MASTERBREEDER	113,8	78,4	229,9	11,9	29	68	37	55	77	25
10	nostromo	120	MASTERBREEDER	108,4	79,9	187,6	8,9	27,3	72	44	42	75	35
11	stormfire	120	MASTERBREEDER	114,7	78,9	233,9	10,2	33,7	68	35	58	68	25
12	VASCO	120	MASTERBREEDER	71,4	50,2	156,9	8,3	37,4	67	31	43	54	16
13	VOICE	120	MASTERBREEDER	62,2	49,5	127,3	8,4	35,3	73	37	44	40	12
14	VIRUS	120	MASTERBREEDER	96,4	75,3	204,1	10,2	33,3	74	36	43	49	27
15	SPIRIT	120	MASTERBREEDER	51,4	39,7	115,1	8,8	33,9	73	35	49	11	2
16	NOSTROMO	120	MASTERBREEDER	98,6	79,9	178,6	9	27,6	78	46	42	66	40
17	STORMFIRE	120	MASTERBREEDER	91,9	75,7	176,6	9,6	32,7	78	42	48	37	20
19	APOLLO	120	MASTERBREEDER	39,5	30,5	79	10,8	26,3	73	39	50	4	1
20	ROWDY	120	MASTERBREEDER	72,5	50,1	160,7	10,1	34	65	31	47	29	8
2	nostromo	120	R	133,4	120,2	192,3	7,3	28,9	88	63	46	89	75
4	rowdy	120	R	92,7	69,6	195	11,2	27,6	73	37	44	74	32
6	hermes	120	R	98,1	88,1	151,9	6,6	32,5	86	58	42	70	47
7	stan	120	R	108	84,2	226,3	10,2	25,9	76	38	43	73	45
8	tom	120	R	87,7	70	184,5	10,1	29,8	75	38	56	50	26
9	spirit	120	R	89,9	69,7	175,6	10,6	28	78	46	45	80	31
10	nostromo	120	R	99,9	85,4	174,1	7,5	29,6	82	50	43	65	48
11	stormfire	120	R	125,5	112,1	219,7	9,1	31,5	87	51	50	75	64
12	VASCO	120	R	34,8	20,2	90,4	0	22	60	24	43	0	0
13	VOICE	120	R	73	62,7	126,1	6,7	33	80	46	44	67	32
14	VIRUS	120	R	70,4	56,5	137,9	7,8	33,1	77	40	49	36	16
15	SPIRIT	120	R	105,5	91,6	166,4	7,9	28,7	82	53	45	69	44
16	NOSTROMO	120	R	86,5	66,7	169,7	8,5	26,6	74	40	46	54	30
17	STORMFIRE	120	R	133	123	193,8	7,1	34,3	91	63	43	76	65
18	LOCKNESS	120	R	74,8	61,7	140,3	8,9	29,2	77	44	46	20	10
19	APOLLO	120	R	56,9	49,6	95,9	5,8	29,9	84	51	46	50	18
20	ROWDY	120	R	103,5	79,6	199,6	10	25,1	74	40	53	69	38
1	parker	144	BOTUDOG	29,9	19,8	80,3	0	43,1	65	24	32	1	0
2	nostromo	144	BOTUDOG	95,7	83,7	152,3	6,5	28,2	85	56	42	63	46
3	apollo	144	BOTUDOG	42,6	34,7	77,5	5,4	31,6	79	46	50	27	5
4	rowdy	144	BOTUDOG	82,9	73,6	133,8	6,2	30,5	85	56	43	48	30
5	stormfire	144	BOTUDOG	95,5	81	174,8	8	30,8	82	49	52	55	37
6	hermes	144	BOTUDOG	78,1	68,9	121,5	6,2	32	84	56	43	57	31
7	stan	144	BOTUDOG	93,2	80,9	166,9	7,3	29,7	85	51	52	70	53
8	tom	144	BOTUDOG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	144	BOTUDOG	104,4	90,1	176,6	7,8	31,7	82	51	44	69	48
10	nostromo	144	BOTUDOG	74,7	68,4	105,1	5,1	26,5	88	64	49	20	13

11	stormfire	144	BOTUDOG	78,8	69,5	123,1	5,6	30,2	85	58	49	57	35
12	VASCO	144	BOTUDOG	46,1	37,9	87,1	5,4	35,1	79	44	54	21	5
13	VOICE	144	BOTUDOG	48,7	41	78,8	4,4	28,5	81	53	50	18	5
14	VIRUS	144	BOTUDOG	52,2	46	92,8	6	30,9	85	51	45	5	2
15	SPIRIT	144	BOTUDOG	60,8	53,5	97	5,3	27,7	85	56	43	32	17
16	NOSTROMO	144	BOTUDOG	69,4	63,3	122,1	6,1	24,3	88	52	49	12	9
17	STORMFIRE	144	BOTUDOG	78,5	65,5	154	7,5	31,7	80	43	60	50	32
19	APOLLO	144	BOTUDOG	39,3	33,3	67	4,9	27,6	82	49	45	10	2
20	ROWDY	144	BOTUDOG	83,9	70,6	163,7	7,7	28,7	82	46	45	48	31
2	nostromo	144	CANI EX LT	92,3	74	130,9	7,5	24,2	77	56	42	58	33
4	rowdy	144	CANI EX LT	43	32,5	74,2	6,3	31,7	73	43	63	41	7
6	hermes	144	CANI EX LT	71,4	62,3	100,9	6,2	26,5	82	62	41	2	1
7	stan	144	CANI EX LT	37,7	33,5	63,2	2,8	10	88	56	34	1	0
8	tom	144	CANI EX LT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	144	CANI EX LT	43,1	31,3	69,9	3,5	12,5	71	47	52	3	0
10	nostromo	144	CANI EX LT	36	25,9	65,8	3,7	31,3	69	37	62	1	0
11	stormfire	144	CANI EX LT	73,7	60,5	146,6	8	27,4	77	41	54	2	1
12	VASCO	144	CANI EX LT	63,5	49,1	102,2	7,8	14,6	76	55	40	3	1
13	VOICE	144	CANI EX LT	35,6	27,4	72,7	5,9	25	74	39	52	10	1
14	VIRUS	144	CANI EX LT	25,6	17,2	77	0	28,8	71	45	34	0	0
15	SPIRIT	144	CANI EX LT	45,9	31,3	96	4,1	38,4	70	35	46	5	0
17	STORMFIRE	144	CANI EX LT	53	28,7	93,9	4,1	27,2	64	36	47	1	0
2	nostromo	144	CANI EX LT+R	23,5	23,5	28,5	0	0	100	83	38	0	0
4	rowdy	144	CANI EX LT+R	69,3	58,8	107,1	7	28,7	81	53	56	64	31
6	hermes	144	CANI EX LT+R	50,4	40,9	91,2	6,2	31,7	77	47	49	7	2
7	stan	144	CANI EX LT+R	90,8	79,3	141,7	7,1	27,8	84	55	40	62	39
8	tom	144	CANI EX LT+R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	144	CANI EX LT+R	78,8	63,4	137,5	9,6	27,4	77	45	53	21	8
10	nostromo	144	CANI EX LT+R	67,4	55,7	108,5	7,1	27,5	79	51	51	23	10
11	stormfire	144	CANI EX LT+R	75,4	60	143,7	8,3	31,8	78	43	47	10	5
12	VASCO	144	CANI EX LT+R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	VOICE	144	CANI EX LT+R	32,8	23,9	64,3	5,3	29,1	72	38	67	11	1
14	VIRUS	144	CANI EX LT+R	29,5	20	77,4	0	30,9	68	27	36	1	0
15	SPIRIT	144	CANI EX LT+R	58,9	40,4	123	5,8	42,2	68	34	45	24	3
16	NOSTROMO	144	CANI EX LT+R	44,2	28,8	97,1	15,5	40,5	66	30	56	1	0
17	STORMFIRE	144	CANI EX LT+R	46,3	35,1	89,9	4,8	33,5	75	40	53	13	3
18	LOCKNESS	144	CANI EX LT+R	24,2	18,7	65,9	0	33,8	77	31	54	0	0
20	ROWDY	144	CANI EX LT+R	51,4	38,1	93,5	6,4	33,7	73	40	48	17	3
2	nostromo	144	CANI EX ST	100,2	92,7	126,8	5,3	24	89	71	41	77	61
4	rowdy	144	CANI EX ST	33,5	24,5	64,7	7,1	33,4	71	38	57	20	2
6	hermes	144	CANI EX ST	40,2	33,4	70,9	4,3	31,5	81	49	47	19	4
7	stan	144	CANI EX ST	77	69,2	110,8	4,6	32,3	85	60	41	71	41
8	tom	144	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	144	CANI EX ST	70	57,8	118,7	6,9	30,2	78	48	46	30	15
10	nostromo	144	CANI EX ST	41,5	33,1	73,9	6,1	29	77	44	38	3	1
11	stormfire	144	CANI EX ST	93,9	84,9	146,6	6,5	33,4	87	58	45	60	42
12	VASCO	144	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	VOICE	144	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	VIRUS	144	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

15	SPIRIT	144	CANI EX ST	25	14,3	56,6	0	22,2	57	26	62	0	0
16	NOSTROMO	144	CANI EX ST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	STORMFIRE	144	CANI EX ST	36,9	28,8	68,3	7	28,1	77	44	55	3	1
20	ROWDY	144	CANI EX ST	49,9	39,3	91,8	7,2	30,3	76	43	49	18	5
2	nostromo	144	CHILL LT	126,3	113,4	162,9	8	15,7	88	70	39	92	79
4	rowdy	144	CHILL LT	123,6	107,1	209,9	10,3	26,7	84	51	61	75	55
6	hermes	144	CHILL LT	75,5	65	117,4	6,9	28,4	82	55	44	51	27
7	stan	144	CHILL LT	136,9	122,2	145,9	5,7	0	89	84	23	0	0
8	tom	144	CHILL LT	87,9	73,8	187,9	11,3	32	80	41	63	2	1
9	spirit	144	CHILL LT	104,7	81,6	190,6	11,1	28,1	74	43	49	43	21
10	nostromo	144	CHILL LT	89,4	72,4	147,9	8	26,6	78	51	46	46	26
11	stormfire	144	CHILL LT	78,7	57,2	165,2	10,9	32,6	68	34	48	19	6
12	VASCO	144	CHILL LT	50,5	35,9	113,1	8	38,1	69	32	41	31	6
13	VOICE	144	CHILL LT	59,6	49,5	96,7	6,5	28,3	80	51	59	51	21
14	VIRUS	144	CHILL LT	78,9	65,7	140,7	8,7	28,6	78	45	42	52	24
15	SPIRIT	144	CHILL LT	76,9	58,6	144,2	8	33,4	76	42	43	39	16
16	NOSTROMO	144	CHILL LT	93,1	70	181,7	8,5	34,1	73	38	40	34	18
17	STORMFIRE	144	CHILL LT	54	42,7	108,1	7,5	32	76	40	52	2	1
18	LOCKNESS	144	CHILL LT	45,6	38,3	68,9	5,1	19,5	84	60	40	2	0
19	APOLLO	144	CHILL LT	45,1	38,9	78,7	7	29,2	84	51	56	2	1
20	ROWDY	144	CHILL LT	72,9	56,3	153,6	9,9	31,6	73	35	51	13	5
2	nostromo	144	CHILL ST	125,8	112	163	8,2	16	87	69	42	92	77
4	rowdy	144	CHILL ST	124,1	104	206,7	10,2	26	80	50	52	82	55
6	hermes	144	CHILL ST	84,3	73,2	131,9	7,5	28	83	55	41	60	33
7	stan	144	CHILL ST	117,9	105	183,8	8,8	23,3	87	59	41	82	66
8	tom	144	CHILL ST	49	36	95,9	9,3	30,8	68	39	49	5	1
9	spirit	144	CHILL ST	80,7	60,6	156,9	10,6	32,9	70	39	46	25	10
10	nostromo	144	CHILL ST	93,6	76,6	151,6	8,2	26,9	79	52	57	58	33
11	stormfire	144	CHILL ST	44,2	34,3	81,9	10,7	24,7	72	41	49	2	0
12	VASCO	144	CHILL ST	49,5	35,5	112,7	6,8	37,7	70	32	45	39	7
13	VOICE	144	CHILL ST	65,7	56,1	104,9	7,3	25,6	82	52	48	55	23
14	VIRUS	144	CHILL ST	85,7	73,2	161,7	9,6	27,4	80	44	60	45	23
15	SPIRIT	144	CHILL ST	90,5	71	169,1	9,3	32,5	76	43	48	46	23
16	NOSTROMO	144	CHILL ST	74,3	54,4	132,3	6,9	34,3	71	42	39	29	11
17	STORMFIRE	144	CHILL ST	92,3	76,5	170,4	8,9	30,3	80	46	46	44	27
19	APOLLO	144	CHILL ST	40,8	37,5	60	4,5	26,3	90	63	50	1	0
20	ROWDY	144	CHILL ST	115,4	89,6	225,6	11,9	30,9	75	39	46	51	27
1	parker	144	JO+R	90,7	81	141,1	6,7	28,1	84	56	53	7	5
2	nostromo	144	JO+R	140,8	129,6	185,4	6,5	26,6	90	70	45	89	77
3	apollo	144	JO+R	74,5	65,9	122,8	6,2	31,5	85	53	42	76	45
4	rowdy	144	JO+R	114,6	98,8	188,6	8,2	30,6	82	51	49	81	59
6	hermes	144	JO+R	95,8	88,5	135,7	6	31	89	63	41	75	53
7	stan	144	JO+R	128,8	114,7	205,5	7,8	33,8	86	55	46	82	64
8	tom	144	JO+R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	spirit	144	JO+R	109,3	88,4	219,5	10,2	26,7	79	41	48	44	30
10	nostromo	144	JO+R	97,8	86,9	157,6	6,9	30,1	85	55	40	68	50
11	stormfire	144	JO+R	136,5	121	238,2	9,5	31,7	88	52	49	72	63
12	VASCO	144	JO+R	46,6	33,8	103,9	7,2	33,3	70	34	51	13	2
13	VOICE	144	JO+R	39,8	27,4	80,3	4,9	26,4	65	36	56	0	0

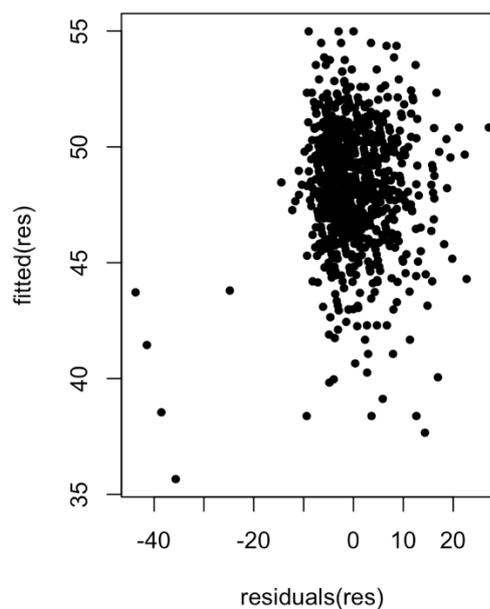
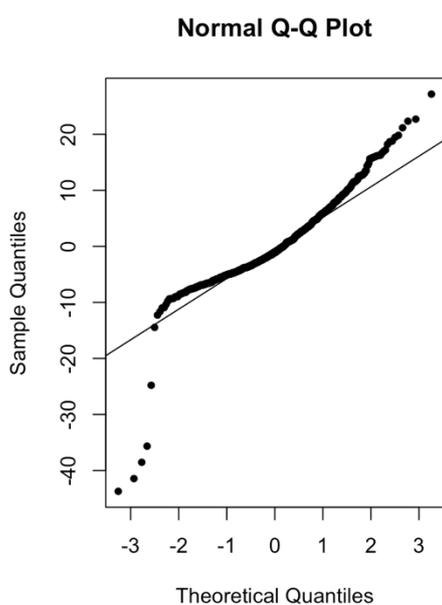
14	VIRUS	144	JO+R	60,8	48	126	8,7	34	74	36	52	23	8
15	SPIRIT	144	JO+R	80,1	67,6	138,8	8,3	29	79	48	59	51	26
16	NOSTROMO	144	JO+R	62,1	46,6	133,5	8,8	20,9	74	39	60	2	1
17	STORMFIRE	144	JO+R	94,9	83,1	155,3	7,6	31,2	83	53	54	65	43
18	LOCKNESS	144	JO+R	78,1	61,2	154	8,9	31,3	79	42	53	4	2
19	APOLLO	144	JO+R	59,1	52,4	109,9	5,9	30,5	86	48	55	34	18
20	ROWDY	144	JO+R	111,7	97,4	195,5	9	26,9	84	49	46	67	52
1	parker	144	MASTERBREEDER	41,5	27,7	114,7	4,9	40,5	66	26	49	11	1
2	nostromo	144	MASTERBREEDER	110,5	78,2	203,1	9,9	28	69	40	45	80	32
3	apollo	144	MASTERBREEDER	71,5	50,3	189,8	10,4	38,9	68	27	51	22	5
4	rowdy	144	MASTERBREEDER	117,4	77,3	307,6	13,5	31,6	66	26	53	63	18
6	hermes	144	MASTERBREEDER	118,7	91,4	199,8	9,9	26,7	74	47	48	80	45
7	stan	144	MASTERBREEDER	115,4	78,3	256,6	12,1	32,7	66	31	49	67	22
8	tom	144	MASTERBREEDER	103	53,4	236	8	41,9	52	23	50	57	7
9	spirit	144	MASTERBREEDER	114,6	76,8	226,9	10,5	29,9	65	35	50	56	17
10	nostromo	144	MASTERBREEDER	100,3	72,1	177,2	8,4	30,6	69	42	47	73	31
11	stormfire	144	MASTERBREEDER	98,8	67	205,8	9,6	34,8	68	34	44	61	21
12	VASCO	144	MASTERBREEDER	71,8	51,9	171,9	8,9	37,9	68	29	57	53	17
13	VOICE	144	MASTERBREEDER	43,3	32,6	101,9	7,9	36,1	71	32	51	23	4
14	VIRUS	144	MASTERBREEDER	73,9	50,8	180,9	8,3	39,5	68	28	43	40	10
15	SPIRIT	144	MASTERBREEDER	78,1	55,6	188,5	13,1	34,4	73	32	46	5	1
16	NOSTROMO	144	MASTERBREEDER	92,5	72,5	185,4	9,1	28,7	77	41	58	44	25
17	STORMFIRE	144	MASTERBREEDER	53,8	36,7	121,5	7,6	24,4	69	35	44	11	2
19	APOLLO	144	MASTERBREEDER	39,2	29,5	84,3	6	33,1	74	37	58	20	3
20	ROWDY	144	MASTERBREEDER	68,1	40,4	188	12,2	38,2	57	21	58	10	1
2	nostromo	144	R	138,8	124,7	184,1	6,7	26,8	88	67	44	91	75
4	rowdy	144	R	116,7	102,4	185,5	7,7	32,3	84	54	46	79	58
6	hermes	144	R	88,8	80,6	129,2	6	30	86	61	44	74	48
7	stan	144	R	128,1	113,7	201,2	7,9	33,2	86	56	49	78	63
8	tom	144	R	101,8	85,8	229,5	10,7	27,2	82	39	51	3	2
9	spirit	144	R	105,6	79,7	232,2	12	25,9	74	36	50	54	31
10	nostromo	144	R	95	83,8	156,7	7,1	30,1	85	53	43	69	51
11	stormfire	144	R	128,6	113,2	227,5	9,1	31,8	86	50	49	71	59
12	VASCO	144	R	47,1	34,7	116,5	8	34,9	72	31	58	8	2
13	VOICE	144	R	62,8	50,6	120,8	7,5	34,7	76	40	47	43	16
14	VIRUS	144	R	74	59,9	151,6	8	28,4	77	39	42	39	19
15	SPIRIT	144	R	80,6	67,9	137,1	7,8	28,8	78	47	45	25	12
16	NOSTROMO	144	R	72,1	56,5	138,6	8	28,4	74	41	48	36	17
17	STORMFIRE	144	R	122,3	113	190,9	7,4	35,2	90	58	47	60	51
18	LOCKNESS	144	R	98,2	78,7	194,5	11,1	26,9	79	40	47	1	1
19	APOLLO	144	R	59,1	51,7	117,6	6,5	31,9	86	45	44	28	12
20	ROWDY	144	R	93,6	74,1	179,7	9,4	24,9	75	41	49	62	34
2	nostromo	168	BOTUDOG	93,1	82,4	144,8	6,2	28,5	85	58	50	63	45
4	rowdy	168	BOTUDOG	95	78,7	183,9	8,3	29,1	81	45	42	64	44
6	hermes	168	BOTUDOG	84,2	71,6	133,6	6,2	25,2	82	54	58	83	47
7	stan	168	BOTUDOG	89,6	77,2	155,9	7	29,6	84	51	38	65	48
9	spirit	168	BOTUDOG	96,6	81	176,9	8,2	29,5	81	47	43	65	43
11	stormfire	168	BOTUDOG	67,9	58,5	116,4	6,3	29,5	83	52	48	42	22
15	SPIRIT	168	BOTUDOG	59,9	52,5	108,5	5,5	30,7	85	51	63	17	8

17	STORMFIRE	168	BOTUDOG	77	65,1	151,3	7,8	30,3	83	45	47	51	33
20	ROWDY	168	BOTUDOG	73,4	61,9	136,6	6,7	31,1	81	49	63	31	17
2	nostromo	168	CANI EX LT	77,1	60,9	112,2	6,6	26,2	77	54	68	54	25
4	rowdy	168	CANI EX LT	43,6	29,4	91,9	9,4	31,1	69	36	46	6	1
4	rowdy	168	CANI EX LT+R	54,7	43,9	93,6	7,9	29,3	75	46	46	24	8
7	stan	168	CANI EX LT+R	81,9	72,3	134,9	7,3	28,3	85	53	43	48	30
10	nostromo	168	CANI EX LT+R	49,1	38,2	81,4	5,3	26	74	47	44	12	3
15	SPIRIT	168	CANI EX LT+R	25	16,9	77,5	0	50,8	67	22	48	0	0
2	nostromo	168	CANI EX ST	50,8	44	76,8	4,8	27,1	83	57	53	28	10
7	stan	168	CANI EX ST	83,4	77,2	118,2	4,9	34,1	89	63	60	66	45
9	spirit	168	CANI EX ST	82,6	71,2	137,5	7,3	30,1	82	52	44	46	29
11	stormfire	168	CANI EX ST	80,2	69,4	135,2	7	32,5	83	51	46	47	27
2	nostromo	168	CHILL LT	120,4	104,9	159,7	7,7	17,2	85	66	39	93	74
4	rowdy	168	CHILL LT	126,3	101,8	250,2	12,5	30,8	76	39	60	71	43
6	hermes	168	CHILL LT	95,8	85,8	129,1	5,7	19,7	87	65	60	86	61
9	spirit	168	CHILL LT	109,7	85,6	203,4	11,6	27,7	74	43	53	48	25
10	nostromo	168	CHILL LT	87,5	70,9	145,5	7,6	29,3	79	52	51	59	32
12	VASCO	168	CHILL LT	50,5	37,6	117,1	9	33	74	34	45	8	1
13	VOICE	168	CHILL LT	77,2	63,6	139,4	8,1	28,9	79	45	43	57	30
14	VIRUS	168	CHILL LT	39,3	26,7	81,2	8,4	29,4	67	36	41	5	1
15	SPIRIT	168	CHILL LT	88,1	70,2	160,7	9,7	30	78	44	49	24	12
16	NOSTROMO	168	CHILL LT	72,4	54,9	129,4	6	36,1	77	44	38	17	7
2	nostromo	168	CHILL ST	118,7	105,6	150,2	7,5	15,8	87	71	40	89	74
4	rowdy	168	CHILL ST	125,9	101,6	243,2	12,1	31,4	77	41	43	67	40
6	hermes	168	CHILL ST	81,4	69,7	119,1	6,6	26,4	82	57	45	66	38
7	stan	168	CHILL ST	118,1	103,9	181	9,2	22,1	85	59	51	68	53
10	nostromo	168	CHILL ST	90,4	72,6	153,5	8	29,6	77	48	47	49	26
12	VASCO	168	CHILL ST	23,9	18,9	42,1	0	0	80	50	44	0	0
13	VOICE	168	CHILL ST	69,8	57,7	126,4	8,3	28,1	79	45	43	53	24
14	VIRUS	168	CHILL ST	34,7	29,6	59,2	4,9	28,6	87	57	42	13	1
15	SPIRIT	168	CHILL ST	91	72,6	160,2	9,6	24,4	78	47	50	22	11
16	NOSTROMO	168	CHILL ST	79	56,1	143,2	6,2	39,5	70	40	54	25	9
17	STORMFIRE	168	CHILL ST	105	86,3	194,4	9,2	28,3	81	46	48	29	19
20	ROWDY	168	CHILL ST	69,9	52,5	131,9	7,7	34,7	73	40	53	27	10
2	nostromo	168	JO+R	119,4	103,4	192,4	7,8	31,8	83	53	52	85	63
3	apollo	168	JO+R	75,9	67	135,5	6,7	34,3	85	49	51	70	42
4	rowdy	168	JO+R	119,2	102,3	217,3	9,7	30,7	82	46	47	71	54
5	stormfire	168	JO+R	96,7	84,8	181	7,8	28,6	87	53	45	59	49
6	hermes	168	JO+R	91,2	82,5	135,5	5,9	31,8	87	60	58	75	50
7	stan	168	JO+R	123,5	111	194	7,5	32,5	86	57	61	78	61
9	spirit	168	JO+R	104,3	82,9	211,7	10,6	27,4	77	40	53	31	21
10	nostromo	168	JO+R	92	80,3	158,1	7,3	30,3	84	52	47	72	51
11	stormfire	168	JO+R	118,1	97,6	242,2	10,8	29,9	80	41	49	48	35
14	VIRUS	168	JO+R	56,1	43,5	110,5	8,6	30,4	72	38	52	8	2
15	SPIRIT	168	JO+R	54	43,6	102	6,9	32,8	78	40	40	1	0
17	STORMFIRE	168	JO+R	116,2	107,4	182	8	31,1	89	58	46	42	33
19	APOLLO	168	JO+R	60,9	52,8	117	6,8	30,1	82	43	46	8	4
20	ROWDY	168	JO+R	87,5	72,2	153,2	8,5	30,4	79	47	45	32	16
2	nostromo	168	MASTERBREEDER	100,2	68,2	198	8,8	34,6	67	35	66	72	21

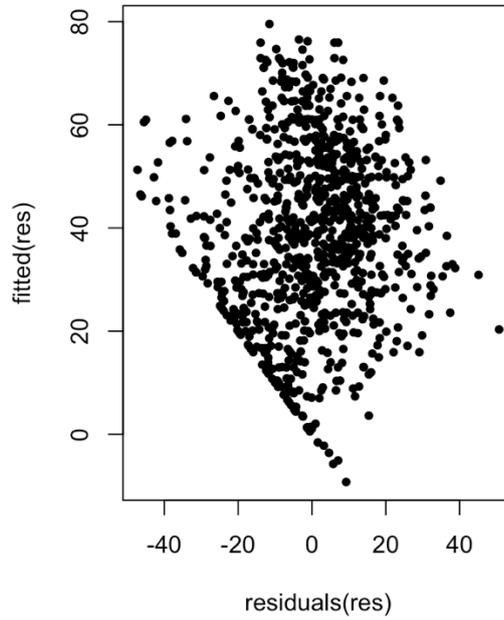
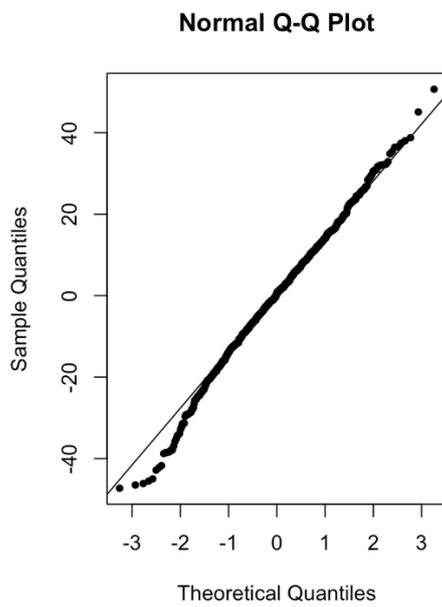
4	rowdy	168	MASTERBREEDER	120	78,3	313,6	13,5	30,6	65	26	48	75	22
6	hermes	168	MASTERBREEDER	133,2	110,4	198,9	6,9	20,4	81	57	62	96	68
7	stan	168	MASTERBREEDER	121,5	83,1	269,2	14	30,8	67	31	45	54	17
8	tom	168	MASTERBREEDER	42,3	21,8	147,9	0	46,3	54	17	57	12	0
9	spirit	168	MASTERBREEDER	80,9	51,7	187,6	9,3	36,3	63	27	44	43	7
10	nostromo	168	MASTERBREEDER	97,1	69,6	171,3	8,1	30,6	69	42	43	74	31
11	stormfire	168	MASTERBREEDER	103,8	66,3	214,6	8,7	37,4	64	32	47	58	13
12	VASCO	168	MASTERBREEDER	58,9	37,8	155,8	7,8	40,6	64	25	44	38	6
14	VIRUS	168	MASTERBREEDER	66,1	47,2	164,8	10,8	37,9	68	28	63	18	4
16	NOSTROMO	168	MASTERBREEDER	45,1	32,9	103,1	6,9	33,4	73	39	61	10	2
19	APOLLO	168	MASTERBREEDER	39,5	30,9	78,9	3	22,3	75	39	45	1	0
2	nostromo	168	R	125,9	110,8	195,2	7,5	31,5	86	57	45	88	71
4	rowdy	168	R	120,5	101,8	223,5	10,1	30	81	45	55	76	57
6	hermes	168	R	95,5	87,8	141,7	6,2	32	88	61	46	69	50
7	stan	168	R	122,2	106,9	210,4	8,8	31,7	85	51	55	77	59
9	spirit	168	R	111,2	85,1	240,6	11,4	26	75	37	46	55	33
10	nostromo	168	R	104,2	91,3	165,8	7,4	27,4	84	55	41	73	54
11	stormfire	168	R	107,9	93,2	223,9	10,7	31,8	83	42	51	26	20
13	VOICE	168	R	76,9	64,6	162,2	8,8	33	79	38	47	45	26
14	VIRUS	168	R	67,2	57,1	127,7	7,9	30,9	80	44	52	26	12
16	NOSTROMO	168	R	90,1	80,6	144,4	6,5	27,6	86	57	47	40	30
17	STORMFIRE	168	R	109,5	98,5	175,8	7,7	33,4	87	56	47	58	41
20	ROWDY	168	R	95	79,7	167,6	8,9	29,3	79	46	47	45	27
2	nostromo	192	BOTUDOG	85	71,2	161	7	28,9	83	47	39	46	32
4	rowdy	192	BOTUDOG	90,2	72	193,9	9,1	29,8	78	39	61	70	41
5	stormfire	192	BOTUDOG	73,8	50,9	163,8	9,4	34,8	70	36	43	56	19
6	hermes	192	BOTUDOG	67,8	56,1	120,6	6,3	33,4	79	48	42	39	18
7	stan	192	BOTUDOG	83,2	70,8	152,7	6,9	30,6	82	49	40	52	35
9	spirit	192	BOTUDOG	102,8	89,1	172,7	7,6	30,9	83	52	63	68	47
11	stormfire	192	BOTUDOG	110	102,5	149,6	5,7	27,7	91	70	46	78	65
20	ROWDY	192	BOTUDOG	75,8	61,2	151,5	7,9	29,5	80	43	44	40	21
2	nostromo	192	CANI EX LT	78,3	65,1	124,7	7,1	24,8	79	51	42	9	5
4	rowdy	192	CANI EX LT+R	63,3	50,8	111,4	8,1	28,1	76	45	46	24	9
7	stan	192	CANI EX LT+R	44,2	34,2	87,2	6,5	34,7	73	38	60	15	3
2	nostromo	192	CANI EX ST	66,4	57,4	106,7	5,4	29,3	82	52	52	54	28
7	stan	192	CANI EX ST	40	31,9	76,5	5,7	31,6	76	42	43	18	3
9	spirit	192	CANI EX ST	71,5	61,9	115,3	6,9	29,6	83	52	57	45	25
11	stormfire	192	CANI EX ST	99,9	91,9	146,7	6	33,5	88	61	58	67	50
2	nostromo	192	CHILL LT	118,4	99,1	179,8	8,5	21,9	82	57	74	91	68
4	rowdy	192	CHILL LT	119,1	94,6	249,6	12,7	31,5	75	36	71	72	42
6	hermes	192	CHILL LT	66,3	57	99,7	6,1	27,7	83	57	50	28	14
9	spirit	192	CHILL LT	123,5	100,9	219,6	11,5	26,5	78	46	70	68	45
10	nostromo	192	CHILL LT	92,7	75,2	161,2	8	30,1	77	47	52	41	24
2	nostromo	192	CHILL ST	113,8	96,1	172,7	8,5	22,1	82	56	53	88	66
4	rowdy	192	CHILL ST	120,9	93,9	256,3	12,3	33,6	73	35	69	71	39
6	hermes	192	CHILL ST	72,6	60	124,5	7,1	31,6	80	50	51	34	16
7	stan	192	CHILL ST	119,1	104,5	189,2	8,9	23,4	86	58	58	77	62
10	nostromo	192	CHILL ST	95,6	76,1	170,5	8,6	28,9	76	46	41	37	20
20	ROWDY	192	CHILL ST	113,1	86,8	222,3	11,2	31	74	39	50	39	19

2	nostromo	192	JO+R	116,7	102	193,9	8,1	29	86	53	53	86	70
3	apollo	192	JO+R	64,3	53,5	130,6	7,2	33,8	80	40	43	49	23
4	rowdy	192	JO+R	105,2	85,5	208,1	10,1	26,7	79	41	52	74	52
6	hermes	192	JO+R	80,1	68,2	139,5	7,2	33,9	81	48	42	63	33
7	stan	192	JO+R	124,7	110,5	197,3	7,6	31,2	86	57	44	77	62
9	spirit	192	JO+R	103,9	84,6	200,3	10,6	25,7	77	40	47	13	8
10	nostromo	192	JO+R	95,8	80,1	172,4	8	28,7	81	46	51	59	41
11	stormfire	192	JO+R	141,1	127,1	237	9,4	31,4	89	55	53	84	75
20	ROWDY	192	JO+R	103,7	86,2	189,5	9,3	27,2	80	45	49	63	42
2	nostromo	192	MASTERBREEDER	79,1	55,1	152,2	6,6	35,8	69	38	73	74	23
4	rowdy	192	MASTERBREEDER	103,2	62,9	267,5	13,6	34,6	60	24	56	56	10
6	hermes	192	MASTERBREEDER	103,2	73,4	184,5	8,5	30,2	69	42	60	67	29
7	stan	192	MASTERBREEDER	104,4	71	244,5	12,6	32,3	66	29	45	57	17
9	spirit	192	MASTERBREEDER	72,7	48,7	169,7	9,3	34,4	65	29	58	31	6
10	nostromo	192	MASTERBREEDER	97,1	69,8	172,8	7,8	30,8	71	42	60	72	29
11	stormfire	192	MASTERBREEDER	91,6	63,6	192,2	9,5	32,1	69	34	61	52	16
2	nostromo	192	R	120,5	105,3	194,4	7,7	29	86	55	46	84	69
4	rowdy	192	R	78,1	58	160,5	9,9	24,3	72	38	54	30	13
6	hermes	192	R	72,8	62,5	129,4	7,5	33,2	81	48	50	44	22
7	stan	192	R	122,6	110,5	190,3	7,6	30,3	87	58	44	80	65
9	spirit	192	R	112,3	85	243,2	12	26,5	74	36	46	44	24
10	nostromo	192	R	101,9	87	181,1	8,1	29,6	82	48	56	69	49
20	ROWDY	192	R	102,5	85,6	188,8	9,1	26,8	80	45	48	61	43

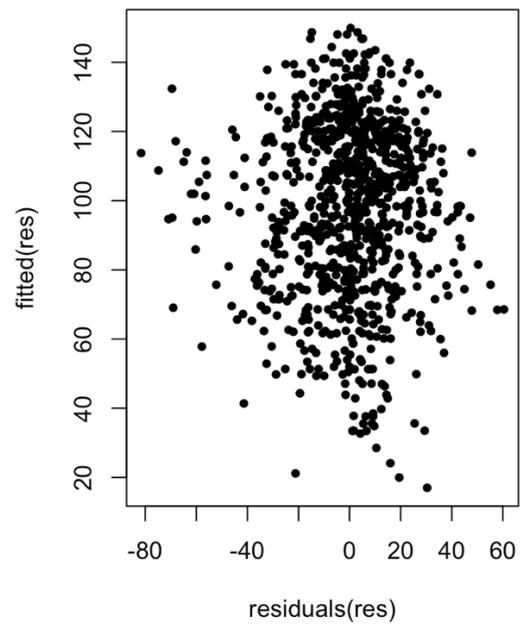
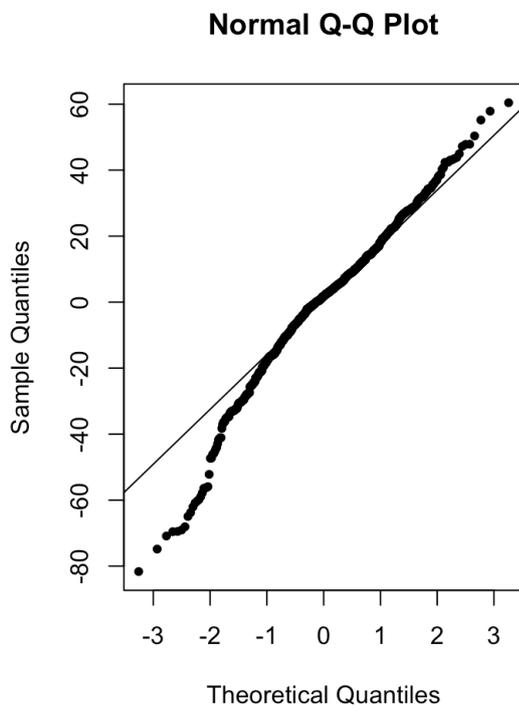
Annexe 2 : Vérification de la normalité des résidus de la mobilité totale



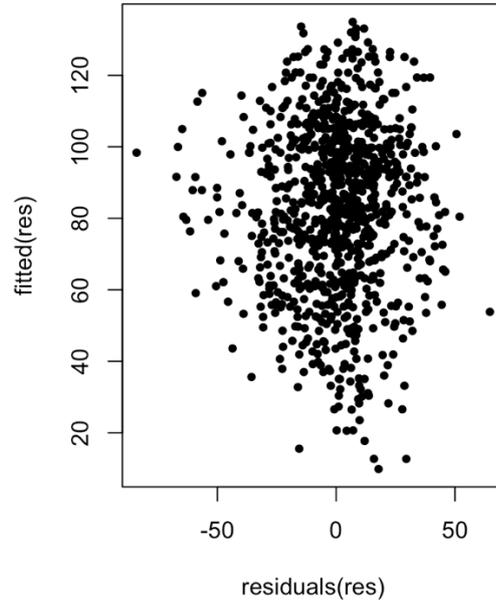
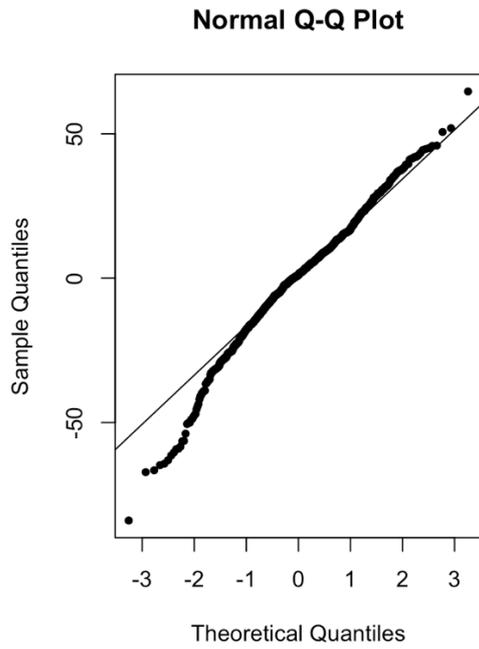
Annexe 3 : Vérification de la normalité des résidus de la mobilité progressive



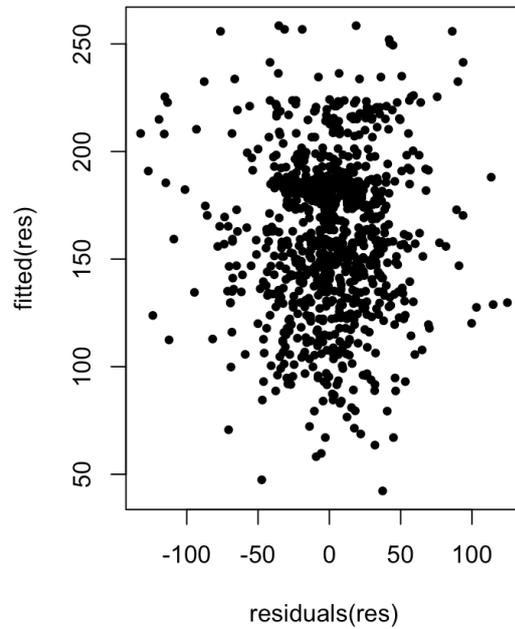
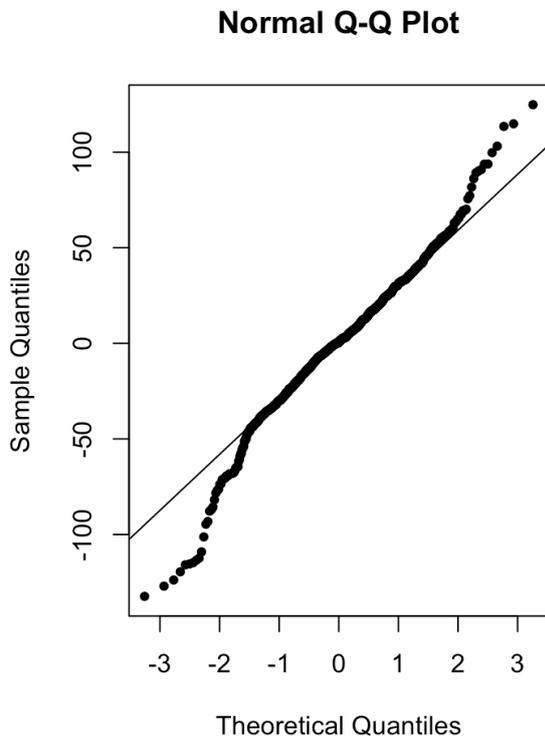
Annexe 4 : Vérification de la normalité des résidus de la VAP



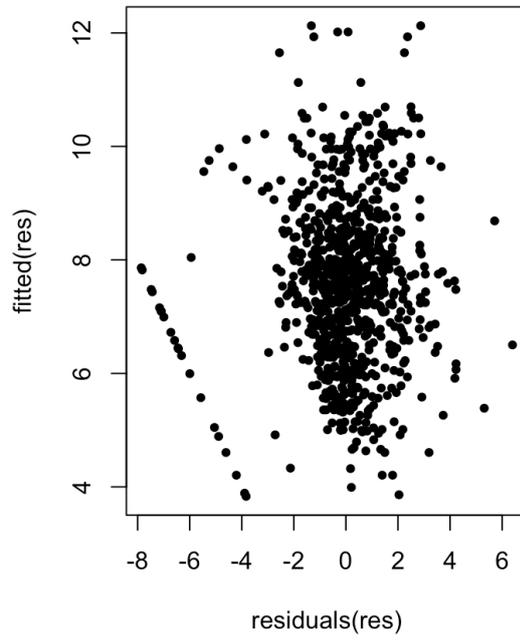
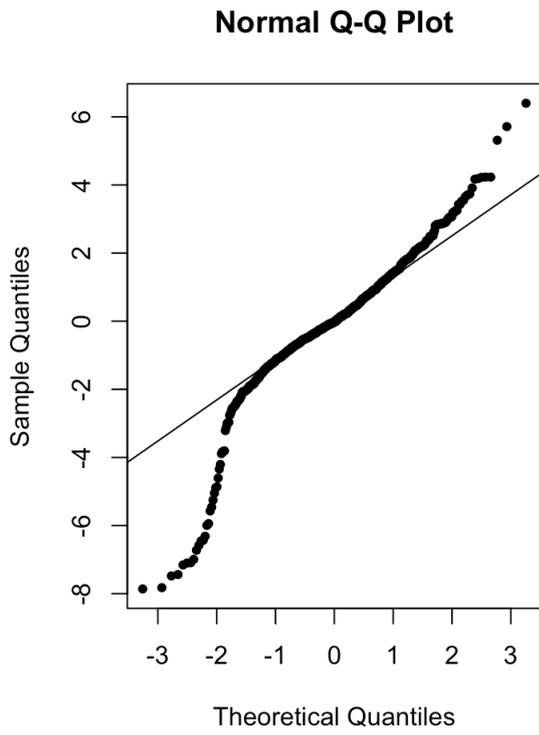
Annexe 5 : Vérification de la normalité des résidus de la VSL



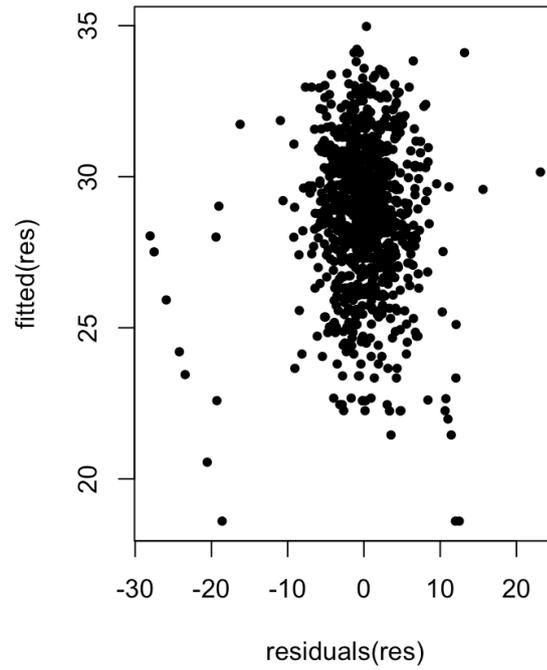
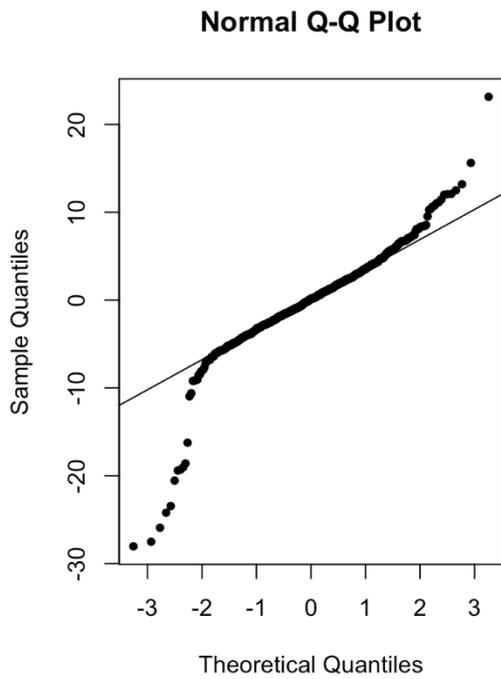
Annexe 6 : Vérification de la normalité des résidus de la VCL



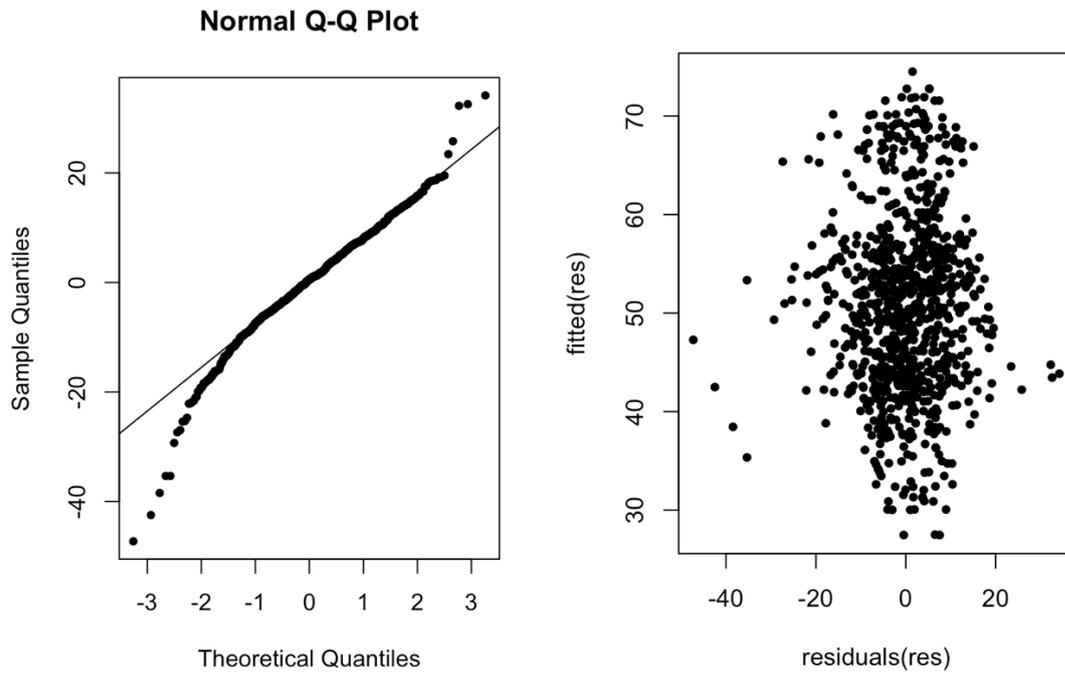
Annexe 7 : Vérification de la normalité des résidus de l'ALH



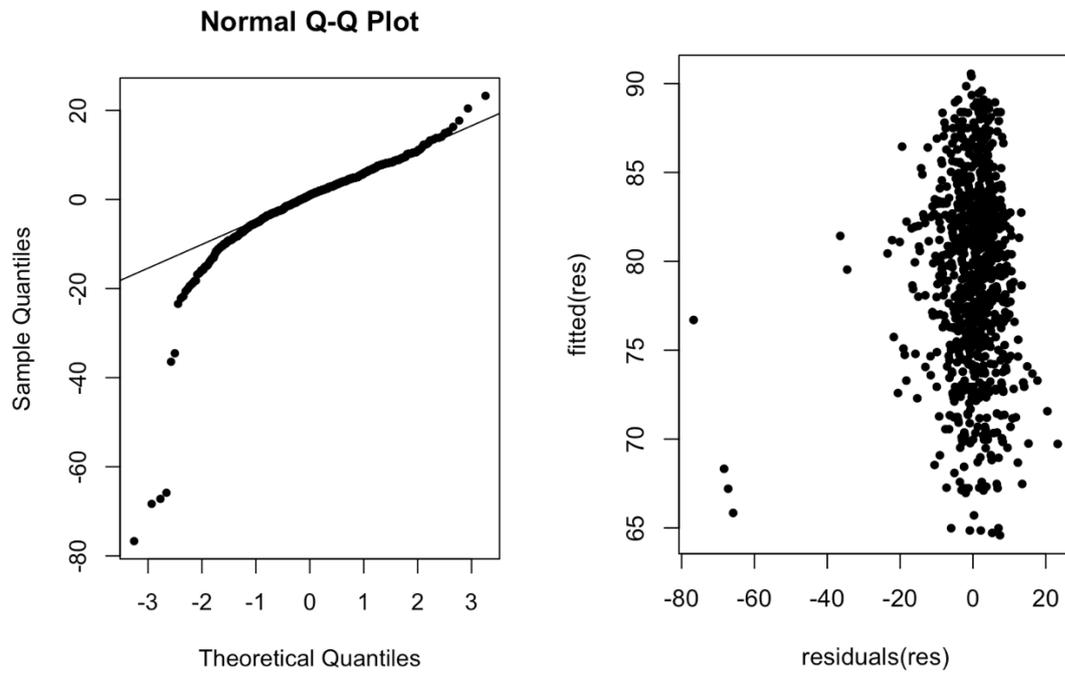
Annexe 8 : Vérification de la normalité des résidus de la BCF



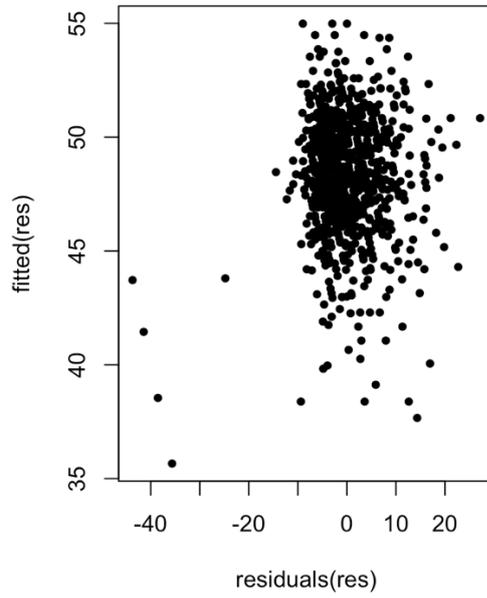
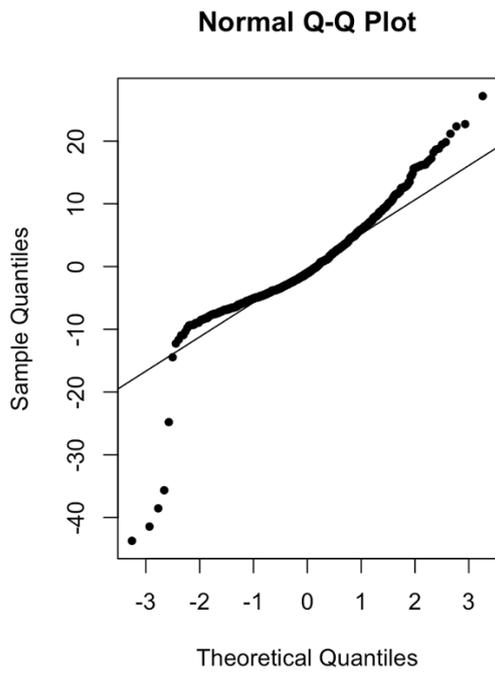
Annexe 9 : Vérification de la normalité des résidus de la LIN



Annexe 10 : Vérification de la normalité des résidus de la STR



Annexe 11 : Vérification de la normalité des résidus de l'ÉLONGATION



Comparative study of different refrigeration media to improve the conservation of canine semen at +4°C: Preliminary test with the use of Rosiglitazone

Hamed FARNIA¹, Emmanuel MONZINGER¹, M. LE-GUIRIEC¹, P. WARMOES², L. VANKRIEKEN² and Djemil BENCHARIF¹

¹ Theriogenology Unit, ONIRIS, National College of Veterinary Medicine Food Science and Engineering Nantes, France² *HuVeSearch Compagny*, Belgium

Preserving semen through refrigeration or freezing is crucial for the selective breeding of dog breeds. While canine spermatozoa are resilient, storing them at +4°C can be detrimental. To mitigate negative effects, it is necessary to use extension media containing cryoprotective agents. Therefore, this study aimed to compare various sperm extenders currently available in the market with or without the addition of rosiglitazone. Twenty ejaculates were collected from healthy dogs and diluted in three media with and without the additive. Samples were then refrigerated at +4°C, and total and progressive motility was assessed using a computerised system (CASA) at the time of dilution (t0h) and every 24 h for 8 days until mobility dropped below 30%. Initial findings suggested that JO+R retained the most ejaculates (8 in total) with mobility remaining above 30% after 192 h of storage. Its progressive motility indicated superiority over other media, particularly at t72h (47.5%), significantly higher than CANI EX LT (26.8%) and MASTERBREEDER (26.8%). Similarly, at t96h (45.5%) and t120h (45.1%), JO+R exhibited better progressive motility than CANI EX LT (28.8% and 18.2% respectively), while at t120h, CANI EX LT+R showed a significantly lower rate (23.7%). Between t144h (48.3%), t168h (42.6%), and t192h (49.8%), JO+R outperformed MASTERBREEDER (22.3%, 23.1%, and 18.6% respectively) ($P < 0.05$; Chi-squared test). These initial findings suggest that the JO+R medium is the most efficient in maintaining total and progressive motility for 192 hours of refrigeration at +4°C. The inclusion of rosiglitazone, particularly its ability to enhance glucose penetration intracellularly, may explain this superiority compared to other environments.

Vu: Le Directeur de Thèse

De l'École Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

Dr Djemil BENCHARIF
Professeur Agrégé



Vu: La Directrice Générale
De l'École Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

Laurence Deflesselle

Pr 02/04
Pr Nicole FOURNIER



Nantes, le

25/07/2024

Vu:

Le Président de la Thèse

Professeur

T. FREOUR



Vu:

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Antoine HAMEL



Vu et permis d'imprimer

NOM : HONZINGER

Prénom : Emmanuelle

Emmanuel MONZINGER

ÉTUDE COMPARATIVE DE NEUF MILIEUX POUR LA RÉFRIGÉRATION DE LA SEMENCE CANINE : TESTS DE MOBILITÉ

COMPARATIVE STUDY OF NINE EXTENDERS FOR CANINE SEMEN REFRIGERATION: MOBILITY TESTS

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 18 septembre 2024

RÉSUMÉ

Cette étude avait pour objectif de comparer divers dilueurs pour certains disponibles sur le marché et dont deux étaient supplémentés en rosiglitazone à une concentration de 50 µM. Vingt échantillons de semence canine ont été collectés et dilués dans neuf milieux différents : JO, JO+R, CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST®, MASTERBREEDER®, BOTUDOG®, CHILL LT® et CHILL ST®. Les échantillons ont ensuite été réfrigérés à + 4°C, et la mobilité totale et progressive ainsi que les paramètres cinétiques (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN et ÉLONGATION) ont été évalués par système informatisé (CASA) au moment de la dilution (T0H) et toutes les 24 heures pendant 8 jours, jusqu'à ce que la mobilité devienne inférieure à 30 %. L'analyse montre que les dilueurs supplémentés en rosiglitazone offrent de meilleures performances que leurs homologues non complémentés, malgré une absence de différence significative. De plus, la comparaison des milieux révèle que JO, JO+R, CHILL LT® et CHILL ST® obtiennent globalement de meilleurs résultats, tandis que le CANI EX LT®, CANI EX LT®+R, CANI EX ST® et BOTUDOG® apparaissent quant à eux moins efficaces. Enfin, le MASTERBREEDER® est encore moins bon, puisqu'une capacitation prématurée des spermatozoïdes s'y produit. En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que l'incorporation de rosiglitazone dans le JO et le CANI EX LT® améliore les paramètres de mobilité, mais sans pour autant compenser un défaut initial du dilueur. Elle dresse en outre un tableau comparatif de différents milieux commerciaux, en cours de développement, ou préparés directement en laboratoire et en fournit un état des lieux actualisé.

MOTS CLES :

- SPERME
- CHIEN
- REFRIGERATION
- CONSERVATION DU SPERME
- ROSIGLITAZONE
- DILUEURS
- REPRODUCTION

DATE DE SOUTENANCE : Le 18 septembre 2024