

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

Thème :

**La conservation de la
semence ovine**

Présenté par :

SMATTI Mohamed Ben Laabed

MEKKI Mustapha

Devant le jury composé de :

Dr TEMMIM-KESSACI S. Professeur
Dr LAMARA A. Maître de conférence classes B
Dr SOUAMES S. Maître-assistant classe A
Dr BOUDJELLABA S. Maître-assistant classe A

ENSV Alger
ENSV Alger
ENSV Alger
ENSV Alger

Présidente
Promoteur
Examineur
Examineur

Année universitaire : 2012/2013

REMERCIEMENT

A Madame le professeur TEMIM S,

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire.

A Monsieur le Docteur LAMARA A,

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,

Qu'on remercie vivement pour toutes les informations qu'elle nous a donnés, ses efforts, sa disponibilité, ses précieux conseils et surtout sa gentillesse.

A Monsieur le Docteur SOUAMES S,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, pour avoir bien voulu d'examiner notre travail.

A Monsieur le docteur BOUDJELLABA S,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

A Monsieur le docteur IDRES Takfarinas,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, que je remercie, vivement.

Qui nous a aidés beaucoup durant la réalisation et la rédaction de notre travail

Sincères remerciements.

A Monsieur le docteur BENHENIA Karim,

Vous avez été l'ami, le grand frère et le conseiller qui a su nous accompagner, et nous a aidés beaucoup durant la réalisation et rédaction de notre travail.

Sincères remerciements.

Dédicaces

Depuis le temps que vous attendiez ce moment, le voilà arrivé, papa, maman, à l'apogée de mes études je ne peux venir me permettre de vous offrir le modeste produit de votre fruit, ce travail ne peut et ne pourra vous véhiculer toute l'émotion, la véhémence et la reconnaissance qui m'animent à votre égard.

Votre patience, votre soutien, vos encouragements votre amour et votre tendresse ne peuvent être réduits à de simples mots ou à un simple concept de mémoire de fin d'étude, cependant, mon aboutissement est avant tout le vôtre et ma joie ne peut trouver de sens que si elle émane de votre bonheur ;

Papa, maman, puissiez-vous trouver en ce modeste essai une once de mes sentiments, de mon respect et de tout mon amour ;

A mes très chères sœurs **Nadia** et **Yasmina**, qui par leur amour ont su et pu être à mes côtés lorsque le besoin se faisait ressentir ;

A mes frères **Farouk** et **Okba** qui ont de tout temps été aux petits soins de leur frère, que ce travail incarne tout le respect que je vous voue ;

A mon beau-frère **Moussa** et son petit poupon **Asma**, votre venue dans notre famille l'a égayé de mille feux ;

Au colosse de Rome, mon grand frère et mon exemple **Karroum**, sans toi, ce travail n'aurait jamais vu le jour, comment te remercier pour tout ton investissement, tes conseils avisés, ton engouement, ton abnégation dans la transmission du savoir et ta patience à mon égard, je te serai éternellement reconnaissant pour m'avoir fait goûter à la saveur de la recherche. Tes valeurs humaines ont tout simplement fait de toi l'exemple à suivre ;

Sans oublier mon maître, grand frère et amis **Kinas**, qui m'a aidé jusqu'à l'obtention de ce travail et qui est toujours prêt à m'aider. Merci beaucoup mon grand frère.

A mes frères d'arme et d'âme **Abdenour, Houssein, Zoubir et Hicham**, vous avez été pour moi une source intarissable de courage et de volonté, dans les moments les plus difficiles, votre présence à elle seule a été pour moi une brise salvatrice.

A mon collaborateur dans cette entreprise qu'est le PFE, au-delà d'une relation amicale et professionnelle, une composante fraternelle s'est tissée entre nous faisant de toi le frère que j'ai laissé à la maison, **Mustapha** merci pour ton dévouement et ta patience dans les moments de doute et d'incertitude, j'espère que ce PFE n'est que le début d'une longue et fructueuse collaboration.

Mohamed.

Dédicace

A ma mère et mon père que Dieu les gardes éternellement heureux

A mes frères et sœurs : Fatima, Abdelouahabe, Yamna , Noureddine, Brahim, Nassima, Wafa, Mohamed, Zineb et Ismahane.

A ma fiancée: Sabrina

A mes beaux parents et mes beaux frères

Tous mes amis : Weid, Imène, Riyadh, Oussama, Rachide, Abdelhadi, Youcef, Abdelali, Touati, Djaafar, Mohamed SMATTI, Hassane, Walide, Mustapha, ...

A tous nos amis que nous avons peut-être oublié de citer, mais que nous garderons à jamais dans nos cœurs, et auxquels nous pensons incessamment.

Mustapha

LISTE DES ABREVIATIONS

- °C** : Degré Celsius
µl : Microlitre
% : Pourcent
ABP : Androgènes Binding Protein
ALH : Amplitude of lateral head displacement
BCF : Beat cross frequency
CASA : Computer assisted sperm analysis
CNIAAG : Centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique
EMB : Echantillon de milieu de base
EMBA : Echantillon de milieu de base à température ambiante
EMBC : Echantillon control de milieu de base à +4°C
EMBG : Echantillon de milieu de base avec
5% : 5% de glycérol
FGF : Fibroblast Growth Factor
FSH : Follicle stimulating hormone
g : Gramme
GnRH : Gonadotrophin releasing hormone
h : Heure
HOST : Hypo-osmotic test
IA : Insémination artificielle
ICSH : Interstitial Cell Stimulating Hormone
IGF1 : Insulin-like Growth Factor
JO : Jaune d'œuf
l : Litre
LH : Luteinising hormone
ml : Millilitre
mn : Minute
mOsM : Milli-Osmol
SPZ : Spermatozoïdes
Tris : Hydroxy méthyle Amino-méthane
UHT : Ultra-heat-treated
VAP : Average path velocity
VCL : Cell velocity
VSL : Straight line velocity

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	<i>Coupe verticale d'un testicule.....</i>	03
Figure 02 :	<i>Localisation anatomique et microscopique des tubes séminifères.....</i>	05
Figure 03 :	<i>Coupe transversale des tubules séminifères entourés par le tissu interstitiel.....</i>	05
Figure 04 :	<i>Régulation hormonale de la fonction sexuelle mâle.....</i>	09
Figure 05 :	<i>Les différents composants du vagin artificiel utilisé chez les ovins.....</i>	12
Figure 06 :	<i>Boute-en-train et collecte de la semence par un vagin artificiel.....</i>	13
Figure 07 :	<i>Electro-éjaculateur.....</i>	14
Figure 08 :	<i>Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier.....</i>	16
Figure 09 :	<i>Coloration eosine-nigrosine.....</i>	20
Figure 10 :	<i>Test hypo-osmotique.....</i>	21
Figure 11 :	<i>Schéma de différentes vitesses et paramètres de mouvement des spermatozoïdes mesuré par le système CASA.....</i>	21
Figure 12 :	<i>Diagramme de la cytométrie en flux.....</i>	22
Figure 13 :	<i>Schéma représentatif de la courbe de congélation lente et le refroidissement rapide des cellules.....</i>	26
Figure 14 :	<i>Spermatozoïdes de bélier congelés à -40°C.....</i>	27
Figure 15 :	<i>Dilacération du testicule.....</i>	35
Figure 16 :	<i>Coupe au niveau de la jonction queue-corps de l'épididyme.....</i>	35
Figure 17 :	<i>Glacière électrique réglable.....</i>	36
Figure 18 :	<i>Microscope optique.....</i>	36
Figure 19 :	<i>Balance de précision.....</i>	36
Figure 20 :	<i>Schéma représentatif d'une cellule de Malassez.....</i>	38
Figure 21 :	<i>Quadrillage d'une cellule Malassez.....</i>	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 :	<i>La composition des milieux de conservation.....</i>	39
Tableau 02 :	<i>Dilution et conservation des échantillons de la semence.....</i>	40
Tableau 03:	<i>Résultats de l'examen macroscopique et microscopique du sperme de chaque testicule avant la dilution.....</i>	42
Tableau 04:	<i>Résultats d'évaluation de la mobilité de la semence après réfrigération.....</i>	42
Tableau 05 :	<i>Résultats du test hypo-osmotique sur la semence après réfrigération.....</i>	43
Tableau 06 :	<i>Résultats d'évaluation de la mobilité de la semence après décongélation.....</i>	43
Tableau 07 :	<i>Résultats du test hypo-osmotique sur la semence après décongélation.....</i>	43

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	03
I- Bases anatomiques de l'appareil génital du bélier	03
I-1- La section glandulaire.....	03
I-1-1- Les testicules.....	03
I-1-2- Les glandes annexes.....	03
I-2- La section tubulaire.....	06
I-2-1- L'épididyme.....	06
I-2-2- Les canaux déférents.....	06
I-3- Sinus uro-génital.....	06
I-3-1- L'urètre.....	06
I-3-2- Pénis.....	07
II- Bases physiologique de l'appareil génital du bélier	07
II-1- Les fonctions testiculaires.....	07
II-1-1- Fonction endocrine.....	07
II-1-2- Fonction exocrine.....	07
II-2- Description et régulation hormonale de la spermatogénèse.....	07
II-3- Formation du sperme.....	09
II-4- Variation de la production spermatique.....	10
II-5- Régulation thermique du testicule.....	10
III- La collecte du sperme chez le bélier	11
III-1- Moyens de collecte.....	11
III-1-1- Après le coït.....	11
III-1-2- Le vagin artificiel.....	11
III-1-3- Le boute-en-train.....	13
III-1-4- L'électro-éjaculateur.....	13
III-2- Méthode de collecte.....	14
III-2-1- Collecte sur des mâles entraînés.....	14
III-2-2- Entraînement des mâles dont la semence n'a jamais été collectée.....	15
III-2-3- La collecte du sperme épидidymaire.....	15

III-2-3-1- Méthode opératoire.....	16
IV- Evaluation de la semence.....	16
IV-1- Examens macroscopiques.....	17
IV-1-1- Le volume de l'éjaculat.....	17
IV-1-2- Couleur et consistance.....	17
IV-1-3- Le poids spécifique.....	17
IV-2- Examens microscopiques.....	18
IV-2-1- La motilité massale.....	18
IV-2-2- Mobilité individuelle.....	18
IV-2-3- Concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat.....	19
IV-2-4- Examen de la viabilité des spermatozoïdes.....	19
IV-3- Méthodes plus avancés d'évaluation de la semence chez le bélier.....	21
IV-3-1- CASA.....	21
IV-3-2- La cytométrie en flux.....	22
V- Dilution et conservation de la semence.....	23
V-1- Historique.....	23
V-2- Conservation à court terme.....	23
V-2-1- Le lait (entier ou écrémé).....	23
V-2-2- Dans d'autres milieux.....	24
V-3- Conservation à long terme (congélation ou cryoconservation).....	24
V-3-1- Les bases de la cryoconservation.....	24
V-3-1-1- Définition de la cryoconservation.....	24
V-3-1-2- Refroidissement et équilibration.....	24
V-3-1-3- Congélation.....	25
V-3-2- Dilution.....	28
V-3-2-1- Importance.....	28
V-3-2-2- Les types de dilueurs.....	30
V-3-2-3- Les cryoprotecteurs.....	30
V-3-2-3-1- Cryoprotecteurs pénétrants la cellule.....	30
V-3-2-3-2- Cryoprotecteurs non pénétrants la cellule.....	32
V-3-2-4- Autres produits.....	33
V-3-2-4-1- les acides aminés.....	33
V-3-2-4-2- Les détergents.....	33

V-3-2-4-3- Les antioxydants.....	33
REALISATION EXPERIMENTALE.....	34
I- Introduction.....	34
II- Matériels et méthodes.....	34
II-1- Matériels.....	34
II-1-1- Matériels biologique.....	34
II-1-2- Matériels de manipulation.....	35
II-1-3- Matériels de conservation (équipement).....	35
II-2- Méthodes.....	36
II-2-1- Evaluation des spermés collectés.....	36
II-2-1-1- Evaluation macroscopique.....	36
II-2-1-2- Evaluation microscopique.....	37
II-2-1-2-1- La motilité massale.....	37
II-2-1-2-2- La mobilité individuelle.....	37
II-2-1-2-3- La concentration.....	37
II-2-2- Protocol de réfrigération.....	39
II-2-2-1- Milieux de réfrigération.....	39
II-2-2-2- Conservation.....	39
II-2-3- Protocol de congélation.....	40
II-2-3-1- Dilution.....	40
II-2-3-2- Equilibration.....	40
II-2-3-3- Conditionnement.....	40
II-2-3-4- Congélation.....	41
II-2-4- Evaluation de la semence après la conservation.....	41
III- Résultats et discussion.....	42
III-1- Résultats.....	42
III-1-1 Résultats après réfrigération de la semence.....	42
III-1-1-1- La mobilité.....	42
III-1-1-2- Le HOST.....	43
III-1-2- Résultats après décongélation de la semence.....	43
III-1-2-1- Mobilité.....	43
III-1-2-2- HOST.....	43
III-2- Discussion.....	43

III-2-1-Discussion de la méthodologie.....	44
III-2-1-1- Méthode de collecte.....	44
III-2-1-2- Choix des milieux de conservation.....	44
III-2-1-2-1- Milieu de réfrigération.....	44
III-2-1-2-1- Milieu de congélation.....	44
III-2-1-3- Choix des paramètres d'évaluation de la qualité de la semence.....	45
III-2-2- Discussion des résultats après la réfrigération.....	45
III-2-3- Discussion des résultats après la congélation.....	46
IV-Conclusions et recommandations.....	48
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	49-59
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE :

La reproduction correspond à l'ensemble des processus permettant d'assurer la pérennité de l'espèce. Dans le cadre de populations soumises à la sélection, la reproduction est la clef de voûte de la création et de la diffusion du progrès génétique et l'insémination artificielle (IA) en est la technique de choix.

L'IA a connu un développement rapide et universel depuis le début des années 50, c'est en fait la technique de reproduction assistée la plus répandue dans le monde (HUMBLOT, 1999). Les technologies développées dans le cadre de l'IA ovine doivent tenir compte des spécificités de l'espèce ovine par rapport aux autres espèces. Contrairement aux bovins et aux caprins, l'IA ovine repose principalement sur l'utilisation de la semence fraîche en raison de la faible fertilité de la semence congelée après IA cervicale. De plus l'insémination doit être réalisée dans les 10 h qui suivent la collecte pour obtenir une fertilité maximale. Une autre spécificité ovine est le dépôt de la semence au niveau vaginal ou exocervical car l'anatomie du col de l'utérus de la brebis rend quasi impossible l'insémination transcervicale

Le col de l'utérus constituant une barrière sélective de la semence, l'obtention d'une bonne fertilité avec de la semence conservée nécessite actuellement de réaliser une insémination intra-utérine sous contrôle endoscopique en déposant directement la semence dans l'utérus (Halbert *et al.*, 1990; Naqvi *et al.*, 2005; Kaabi *et al.*, 2006).

Cependant, le coût et la technicité requise pour l'IA intra-utérine ne permet pas de l'appliquer en routine à de grands troupeaux. En effet, la taille importante des troupeaux ovins conduit à la réalisation d'un nombre important d'inséminations dans des délais très courts.

Le processus de congélation-décongélation de la semence entraîne une altération de la qualité de la semence et des dommages sur les membranes des spermatozoïdes chez le bélier (Maxwell et Watson, 1996). Cependant la conservation à court terme de la semence entraîne petit à petit une baisse de la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes (Maxwell et Salamon, 1993).

Le glycérol est l'un des cryoprotecteurs le plus utilisés. Il présente néanmoins, s'il se retrouve en excès dans le milieu ou dans la cellule, une toxicité importante, tant osmotique

que biochimique. Par ailleurs il n'est pas indispensable à la congélation même si il l'améliore notablement (IAN GORDON., 1997 ; MOLINIA F.C *et al.*, 1994 ; SINGH M.P *et al.*, 1995).

Une forte diminution de la concentration en glycérol peut entraîner un stress osmotique (LEAHY T., *et al.*, 2010). Il est donc nécessaire de développer des méthodes de conservation (réfrigération et congélation) permettant d'obtenir des résultats de fertilité acceptables avec une méthodologie d'insémination facile et rapide à mettre en œuvre.

Le but de notre travail est de dresser un état des lieux sur les techniques de conservation de la semence dans l'espèce ovine, au vue de l'absence de travaux en Algérie et de la demande, sur le terrain, de plus en plus forte de l'IA chez les ovins.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Bases anatomiques de l'appareil génital du bélier :

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle où se réalise la fécondation (BARONE., 1978). En général, il comporte trois parties, à savoir : la section glandulaire, la section tubulaire et le sinus uro-génital.

I-1- La section glandulaire :

Représentée par les deux gonades (les testicules et leurs glandes annexes).

I-1-1- Les testicules :

La région scrotale forme, chez le bélier, une masse ovoïde, bilobée, longitudinalement et verticalement pendante sous la région inguinale et attachée à la paroi abdominale inférieure, le testicule, ou glande génitale, est un organe pair, très mobile dans les bourses, plus sphéroïde chez le bélier que chez le taureau, il est aussi plus volumineux et plus pesant en proportion ; son poids unitaire varie de 170 à 300 grammes (BARONE, 1978 ; MONTANE *et al.*, 1978 ; BONNES *et al.*, 2005).

Sa taille, qui varie selon plusieurs facteurs (race, individus, stades physiologiques...), est en moyenne de 10 cm de long, 6 cm de large, et 6 cm d'épaisseur ; le rapport poids du testicule/poids du corps chez le bélier est égal à 1/200 (DADOUNE et DEMOULIN., 2001 ; BONNES *et al.*, 2005), ce rapport est élevé comparativement à d'autres espèces telles que : l'homme (1/1500), le lapin (1/700), ou le taureau (1/640) (VAISSAIRE., 1977 ; DADOUNE et DEMOULIN., 2001).

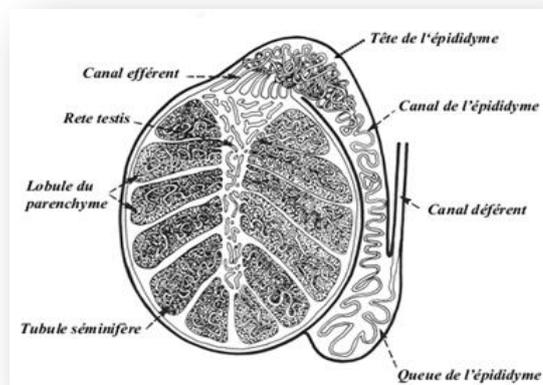


Figure 01: Coupe verticale d'un testicule (CASTONGNON F., 2010).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le testicule est protégé par des enveloppes superposées et de différentes origines, de l'extérieur vers l'intérieur, nous citerons:

- *Le scrotum* : qui est constitué par :
 - Une peau mince, souple, recouverte de jarre, et formant un sac commun aux deux testicules pourvu d'un sillon médian : le raphé ;
 - Le dartos, peu épais, constitué de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, et formant un sac autour de chaque testicule (VAISSAIRE., 1977 ; BARONE., 1978 ; BONNES *et al.*, 2005). Le rôle principal du scrotum est de maintenir les testicules à une température idéale à la formation et la maturation des spermatozoïdes, soit autour de 32°C, c'est-à-dire 4 à 7°C en dessous de la température corporelle (CASTONGNON F., 2010) ;

- *La tunique fibreuse* : tissu conjonctif sous cutané, très mobile ;

- *Le crémaster* : est un muscle qui joue un rôle prépondérant dans la thermorégulation de la spermatogénèse par le biais de ses contractions qui permettent d'éloigner ou de rapprocher les gonades du corps en fonction de la température ambiante. Le crémaster est localisé du côté externe de l'enveloppe fibro-séreuse, cette dernière forme un sac allongé engainant le testicule, l'épididyme et le cordon testiculaire (VAISSAIRE., 1977 ; BARONE., 1978 ; BONNES *et al.*, 2005) ;

- *La capsule fibreuse et l'albuginée* : s'enfoncent dans la profondeur du testicule pour constituer le corps de Highmore, perforé par des vaisseaux, et le rete testis. Entre l'albuginée et le corps de Highmore, des cloisons ou septa délimitent environ deux à trois cents lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubules séminifères (DADOUNE ET DEMOULIN., 2001).

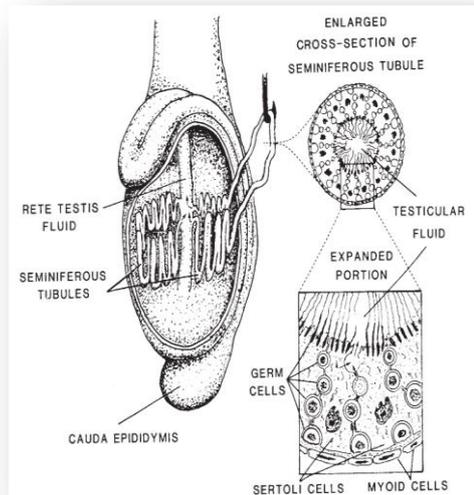


Figure 02 : Localisation anatomique et microscopique des tubes séminifères (FRANDSON D., 2009).

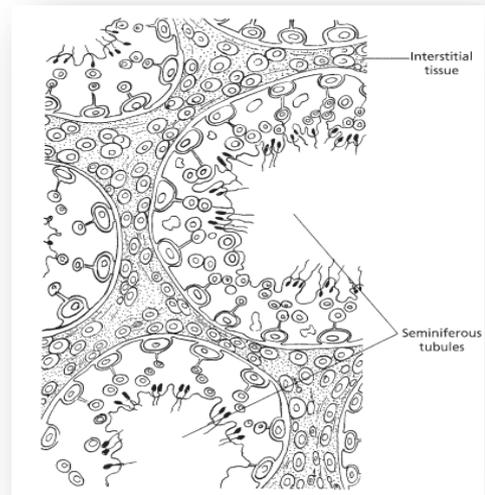


Figure 03: Coupe transversale des tubules séminifères entourés par le tissu interstitiel (FRANDSON D., 2009).

L'épithélium de revêtement des tubules séminifères contient deux types de cellules :

- Les grandes cellules pyramidales appelées cellules de Sertoli, qui les supportent et les nourrissent,
- Un tissu interstitiel assurant l'innervation et l'irrigation du tube et des îlots de petites cellules dites de cellules de Leydig (GILLES *et al.*, 2006).

I-1-2- Les glandes annexes :

Elles comprennent, la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales. A l'origine du liquide séminal se mélangent avec la fraction cellulaire (spermatozoïdes) pour former la semence ou le sperme (CASTONGNON F., 2010).

- *Les glandes vésiculaires* : anciennement appelées vésicules séminales, sont des glandes lobulées de taille considérable chez le taureau, le bélier et le sanglier. (FRANDSON D., 2009).
- *La prostate* : peu développée, elle est située sous le sphincter urétral sous forme d'un petit renflement glandulaire transversal de couleur jaune grisâtre (DACHEUX F., et DACHEUX J.L., 2001 ; BONNES *et al.*, 2005).

- *Les glandes de Cowper ou glandes bulbo-urétrales* : de la grosseur d'une noisette, elles s'ouvrent de chaque côté dans le cul de sac du bulbe par un seul orifice (Dacheux, F., et Dacheux, J-L., 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005).

Ces glandes produisent un liquide qui est libéré avant l'éjaculation et qui a pour principal fonction le nettoyage de l'urètre des restes d'urine (Castongnon F., 2010).

I-2- La section tubulaire : constituée par l'épididyme, et le canal déférent.

I-2-1- L'épididyme :

C'est un organe plaqué à l'arrière du testicule, d'une longueur de 60 m chez le bélier, reliant les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent. Il est divisé en trois parties : *la tête, le corps et la queue*. La paroi de ce tube est entourée d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (DACHEUX, F. et DACHEUX J.L., 2001 ; BONNES *et al.*, 2005).

Les spermatozoïdes sont acheminés vers l'épididyme, après leur production dans les testicules. C'est dans la queue de l'épididyme qu'ils sont stockés. La queue de l'épididyme contient, quant à elle, plus de 70% des réserves de spermatozoïdes (20 à 40 milliards). C'est à l'intérieur de ces tubules que les spermatozoïdes acquièrent leur motilité et leur pouvoir fécondant (CASTONGNON F., 2010).

I-2-2- Les canaux déférents :

Faisant suite au canal épидидymaire, ce canal s'engage dans le trajet inguinal où il contribue à former le cordon testiculaire, il pénètre dans la cavité abdominale et atteint la face dorsale de la vessie en formant un très léger renflement pelvien avant de se jeter dans l'urètre (BARONE, 1978 ; BONNES *et al.*, 2005). Il relie donc l'épididyme à l'urètre. Ce sont ces canaux que sont sectionnés en vue de la stérilisation des béliers lors d'une vasectomie. (CASTONGNON F., 2010).

I-3- Sinus uro-génital :

Comprenant l'urètre et l'appareil copulateur (pénis).

I-3-1- L'urètre :

L'urètre est le conduit qui sort de la vessie, traverse la prostate et le pénis pour déboucher à extrémité. Il permet l'évacuation de l'urine et l'éjaculation du sperme.

I-3-2- Pénis :

Le pénis est l'organe copulateur. D'une longueur d'environ 40 cm, il se termine par un renflement, le gland, et un appendice vermiforme qui est la terminaison de l'urètre permettant le dépôt de la semence à l'intérieur du vagin. Les muscles rétracteurs du pénis attachés au niveau du « S » pénien participent au déroulement et à la rétraction du pénis. L'extrémité du pénis est protégée par le fourreau (CASTONGNON F., 2010).

II- Bases physiologique de l'appareil génital du bélier :

II-1- Les fonctions testiculaires :

Elles sont double: endocrine et exocrine :

II-1-1- Fonction endocrine:

C'est la production de testostérone par les cellules de Leydig, cette hormone stimule la spermatogenèse, la maturation des organes génitaux, l'apparition des caractères sexuels secondaires, elle est aussi à l'origine de l'émergence de la libido, et participe au rétrocontrôle hormonal hypothalamo-hypophyso-gonadique; outre la testostérone, les cellules de Leydig sécrètent de l'estradiol, en quantité variables selon les espèces (ROBEL., 2003).

II-1-2- Fonction exocrine:

C'est la production, dans les tubules séminifères, de spermatozoïdes, ces derniers, mélangés aux sécrétions des glandes annexes, constituent le sperme, émis lors de l'éjaculation (PARAPANOV et VARGAS, 2009).

II-2- Description et régulation hormonale de la spermatogénèse :

La spermatogenèse se déroule au niveau de l'épithélium des tubes séminifères, le démarrage de celle-ci s'effectue à la puberté et se caractérise par l'augmentation du volume testiculaire suite à l'augmentation de la longueur et du diamètre des tubules et la formation de la lumière dans ces derniers.

Les spermatozoïdes sont formés à partir des spermatogonies. Le développement des spermatogonies en spermatozoïdes est organisé selon un ordre spatial et temporel bien précis ;

l'entrée en spermatogenèse de différents ilots de spermatogonies se fait en effet de façon régulière et cyclique : tous les 10 jours chez le bélier. Un cycle complet dure, par ailleurs, 49 jours. (GILLES *et al.*, 2006).

Ces différentes étapes sont sous contrôle de l'axe gonadotrope, classiquement hiérarchisé sur le modèle de la **figure 04**. La gonadolibérine, ou GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), de l'hypothalamus contrôle la sécrétion de deux gonadotrophines hypophysaires, la LH (Luteinizing Hormone), ou ICSH (Interstitial Cell Stimulating Hormone), et la FSH (Follicle Stimulating Hormone), qui agissent en retour de façon trophique sur les gonades.

La LH intervient essentiellement en contrôlant la production de testostérone des cellules de Leydig, alors que la FSH agit directement sur les cellules de Sertoli qui jouent un rôle important dans le contrôle du métabolisme et de la différenciation des cellules germinales. En effet sous l'influence de FSH, elles secrètent différents composés intervenant dans la nutrition des cellules de la lignée germinale, ainsi que de nombreux facteurs spermatogéniques et endocrines, parmi lesquels :

- Une *inhibine* ou une *activine*, inhibant ou activant, selon le cas, en rétroaction, la production des gonadotrophines hypophysaires ainsi que les productions des cellules de Leydig.
- Un *facteur de liaison des androgènes* : ABP (Androgènes Binding Protein), liant la testostérone et assurant son maintien en concentration optimale dans les fluides tubulaires et épидидymaires.
- Différents *facteurs de croissance* et de différenciation des spermatogonies tels que : les FGF Det E (Fibroblast Growth Factor), l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor), et l'Interleukine II, etc. (GILLES *et al.*, 2006 ; SILVERTHORN *et al.*, 2007).

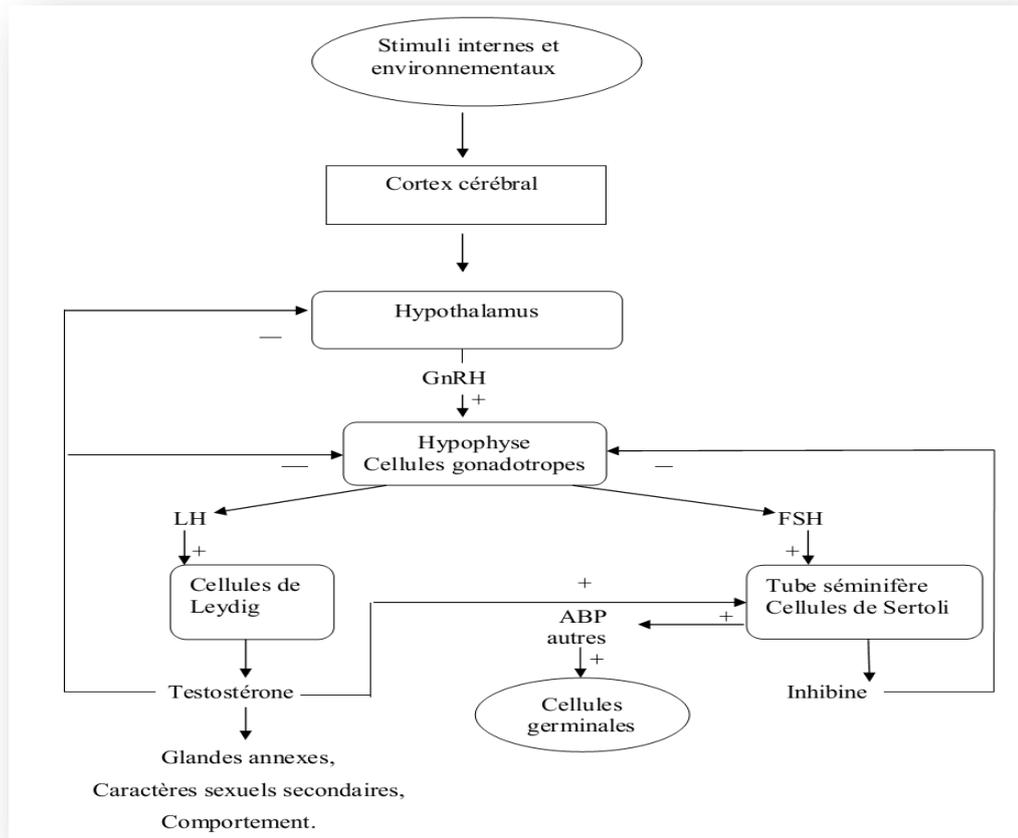


Figure 04 : Régulation hormonale de la fonction sexuelle mâle

(VAN DER MOLEN *et al* ,1975 ; BONNES *et al.*, 2005 ; SILVERTHORN *et al.*, 2007).

II-3- Formation du sperme :

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas encore matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds, leur différenciation se poursuit en dehors de la gonade durant le transit épидидymaire, qui dure de 10 à 14 jours, selon l'espèce (DACHEUX F., et DACHEUX J.L., 2001), ce transit peut être réduit de 10 à 20 % si la fréquence des éjaculations augmente, le canal déférent prend ensuite le relais pour acheminer ces spermatozoïdes jusqu'à l'urètre.

Tout au long du canal déférent, les glandes annexes assurent la formation du plasma séminal et donc du sperme définitif. Les vésicules séminales sécrètent du fructose, qui est la principale source d'énergie des spermatozoïdes, ainsi que des phosphates, des citrates, la prostate permet, quant à elle, une alcalinisation du sperme par sécrétion d'un liquide à pH = 8, contenant des phospholipides, des bases azotées et des ions divers.

Le stockage des spermatozoïdes, qui peut durer jusqu'à trois semaines, se fait essentiellement (70 %) dans la queue de l'épididyme. Seulement 2 % sont emmagasinés dans le canal déférent. Les spermatozoïdes non éjaculés sont résorbés ou éliminés dans les urines.

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée de 50 à 80 µm de longueur et comportant trois parties principales : la tête, la pièce intermédiaire, et le flagelle. Sa taille et sa forme varient selon les espèces (DOUET., 2000).

II-4- Variation de la production spermatique :

Plusieurs facteurs influencent la production spermatique et la libido des béliers notamment : la saison, l'âge, l'alimentation, l'état sanitaire et le stress.

L'activité sexuelle, chez le bélier, est influencée par les variations de la photopériode et donc par la saison de l'année. L'activité est maximale pendant les mois d'automne et hiver (période de jours courts) et plus faible au printemps et en été (période de jours longs).

En contre-saison, une diminution de la libido, de la circonférence scrotale et de la production des spermatozoïdes est observée, ce qui entraîne une baisse physiologique de fertilité. (CASTONGNON F., 2010).

II-5- Régulation thermique du testicule :

Chez le bélier, espèce exorchide, les testicules descendent dans le scrotum à partir de la 12^{ème} semaine de la vie fœtale (GAYRARD., 2007) ; la température au niveau scrotal est plus basse que celle du corps de 3 à 5°C , la spermatogénèse ne peut donc se dérouler complètement qu'à cette température, et si elle atteint la température du reste du corps, pendant seulement quelques heures, l'animal devient stérile environ 14 jours plus tard (DADOUNE et DEMOULIN., 2001; BOUKHLIQ., 2002).

Cette position extra-abdominale est modulable par le jeu du crémaster; à basse température, le testicule remonte jusqu'au trajet inguinal alors que le relâchement scrotal est complet pour les températures élevées. De plus, le sang artériel est refroidi par des échanges à contre- courant au niveau du plexus pampiniforme formé par les veines testiculaires.

En outre, la peau du scrotum chez le bélier est riche en glandes sudoripares, et contient également quelques thermorécepteurs qui mettent en route les mécanismes corporels de thermorégulation. (RUCKEBUSCH., 1981 ; BOUKHLIQ., 2002).

III- La collecte du sperme chez le bélier :

La récolte de la semence est une étape préalable clé à la réussite de l'IA, elle doit donc être faite suivant un protocole strict:

- La récolte doit toujours être réalisée dans les mêmes conditions. On développe ainsi chez les béliers un réflexe conditionné qu'il convient de maintenir (unité de lieu, du temps, du personnel) ;
- Entraînement constant des béliers durant toute l'année, que l'on ait ou non besoin de la semence. On réduira cependant le rythme de la récolte en dehors de la saison d'utilisation.
- Le rythme de récolte ne doit pas être trop intensif. Pendant la saison sexuelle, une à deux récoltes par jour sont théoriquement possibles. Cependant, lorsque les besoins en sperme sont importants, on peut être amenés à intensifier le rythme et raccourcir le temps de repos de 2 à 3 jours à un seul jour ; le volume et la qualité de la semence se verront diminués (LACROIX., 1976 ; SOLTNER., 1993), le nombre des spermatozoïdes émis cependant augmente, et la fertilité ne paraît pas défavorablement influencée pourvu que le nombre de spermatozoïdes par brebis reste supérieur à un minimum (MICHELAT., 1974).

III-1- Moyens de collecte :

La semence des ovins peut être obtenue par trois manières :

III-1-1- Après le coït :

Cette méthode est réalisée souvent sur des femelles nymphomanes, l'éjaculat correspond à celui d'un coït naturel, mais il a l'inconvénient de se mélanger avec les produits de sécrétions vaginales qui altèrent les capacités biologiques des spermatozoïdes (EDUARDO V. F *et al.*, 2003).

III-1-2- Le vagin artificiel :

La mise en œuvre de cette technique requiert le recours à un vagin artificiel, à un boute-en train (qui peut être un mannequin ou une femelle en chaleur) et à un opérateur chargé de la collecte (BARIL B., 1993). Le principe consiste à faire éjaculer le mâle dans un appareil qui mime toutes les conditions naturelles que les organes génitaux externes féminins présentent pendant le coït. Cette méthode, simple et rapide, permet d'obtenir ou de récupérer

un éjaculat total et non contaminé, il y'a cependant une légère difficulté due au fait que le bélier est très sensible aux conditions de température et de pression du vagin (MICHELAT., 1974).

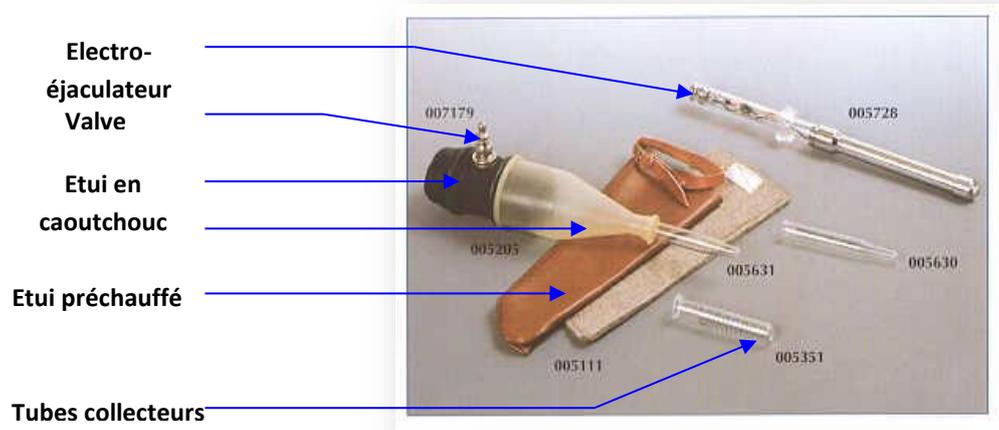


Figure 05 : Les différents composants du vagin artificiel utilisé chez les ovins
(<http://www.imvusa.com\ovine\collection.htm>)

Le vagin artificiel est conçu de façon à simuler les mêmes conditions de pression, de température et de lubrification présentes dans le vagin d'une femelle et qui sont favorables à une éjaculation (HAFEZ., 1974). Son modèle de base est formé d'un cylindre en gomme plus au moins dur avec une double paroi fournissant ainsi une chambre qui peut recevoir de l'air et de l'eau. Ces derniers sont introduits via une valve et contribuent à établir une pression et une température favorables.

Un deuxième cylindre en gomme élastique, plus long, est introduit dans le précédent, ses bords, une fois à l'extérieur, sont rabattus vers l'arrière et fixés à l'étui à l'aide de bagues, contribuant ainsi à la formation d'une deuxième chambre ayant le même rôle que la précédente. Par une extrémité, un manchon en caoutchouc est attaché au cylindre, l'autre extrémité est reliée à un tube collecteur en verre. Un étui préchauffé est souvent utilisé pour garder une température favorable le plus longtemps possible, quand le mâle tarde à éjaculer. (Eduardo V.F *et al*, 2003).

III-1-3- Le boute-en-train :

A pour rôle de stimuler l'instinct libidinal du bélier. Peuvent être utilisés soit un mannequin sur lequel le vagin artificiel est fixé, soit une femelle en chaleur, mais à ce moment un opérateur doit se charger du vagin artificiel (figure 06) (EDUARDO V.F *et al.*, 2003).

Pour la collecte, l'opérateur se place à droite de la femelle ou du mannequin, tient le vagin avec sa main droite, et de l'autre main oriente le pénis vers l'entrée du vagin à l'aide de la peau du prépuce. Le pénis ne doit en aucun cas être touché pour éviter les risques de contamination (MC KAY., 1991).



Figure 06: Boute-en-train et collecte de la semence par un vagin artificiel (IAN GORDON., 2004)

III-1-4- L'électro-éjaculateur :

L'électro-éjaculateur est un appareil constitué d'une sonde rectale (longueur 26 cm, diamètre 2.5cm) et d'un système électronique, permettant d'envoyer des impulsions électriques cycliques via la sonde. Ces impulsions stimulent la sphère génitale, excitent la zone lombo-sacro-médullaire et donc les zones déterminant l'érection et l'éjaculation (DOUET., 2000) (figure 07).



Figure 07 : Electro-éjaculateur ([www.medata-systems.co.uk/ Document/ramjob.htm](http://www.medata-systems.co.uk/Document/ramjob.htm))

Selon HAFEZ en 1974, une stimulation électrique des glandes vésiculaires et de l'ampoule du canal déférent, via le rectum, peut induire un écoulement de sperme.

L'application rythmique des stimulations électriques permet dans l'ordre, de provoquer les sécrétions des glandes annexes, puis l'éjaculation. Les sécrétions des glandes annexes étant très abondantes, elles doivent être éliminées pour éviter d'avoir une semence trop diluée (EDUARDO V.F *et al.*, 2003).

III-2- Méthode de collecte :

III-2-1- Collecte sur des mâles entraînés :

Les mâles sont conduits à la salle de collecte et attachés au mur à l'aide d'une chaîne et d'un collier. Il doit y avoir le même nombre de points d'attache que de mâles à utiliser. Une femelle boute-en-train est alors immobilisée dans l'appareil de contention et une autre femelle est gardée à proximité dans le cas où une nouvelle stimulation serait nécessaire pour une seconde collecte. Une fois attachée, il est nécessaire de nettoyer soigneusement la partie abdominale des béliers, devant et autour du fourreau. Le lavage de l'intérieur du fourreau avec une solution saline (0,9 % de NaCl), pour éliminer le maximum de fragments et d'impuretés qui ont pu s'y accumuler, est recommandé.

Chaque mâle est détaché et laissé au contact de la femelle boute-en-train. Un temps d'attente de cinq à six minutes avant l'éjaculation accroît la quantité et la qualité de semence, mais en pratique, elle est difficile à mettre en œuvre. Il peut être préférable de forcer le mâle à effectuer des fausses montes en lui permettant de monter sur la femelle et en le forçant à descendre avant l'éjaculation (BARIL G., 1993).

Il est à noter que d'une part, 3 à 8 éjaculats espacés de 15 minutes peuvent être recueillis en une journée. Le bélier observera un repos de 24 à 48 heures une fois par semaine (HAFEZ., 1974).

III-2-2- Entraînement des mâles dont la semence n'a jamais été collectée :

Cette opération nécessite un certain nombre d'heures de travail et beaucoup de patience. Il est préférable de la commencer pendant la saison où la motivation sexuelle est à son apogée (fin de l'été et automne chez les races saisonnées) ou, chez les jeunes animaux, dès qu'ils ont atteint la puberté. Il est très important que ce soit la personne chargée des futures collectes qui fasse ce travail.

Chez quelques animaux peu motivés, le comportement sexuel se limite à une tentative d'accouplement. L'opérateur doit alors être prêt à effectuer la collecte à chaque tentative de l'animal. Il peut aussi recourir à d'autres moyens pour améliorer la situation: détacher la femelle et la faire passer devant le mâle, changer de femelle, encourager le mâle de la voix ou tourner la tête de la femelle vers l'arrière. Dans ce cas, une telle sollicitation ne doit pas excéder cinq à 10 minutes. Il est préférable de répéter les contacts avec la femelle, puisque c'est en général dans les minutes qui suivent chaque contact que le comportement sexuel est déclenché (BARIL G *et al.*, 1993).

III-2-3- La collecte du sperme épидидymaire :

Est une nouvelle technique utilisable dans le cadre de l'insémination artificielle (IA) et la fécondation in vitro (FIV).

La collecte du sperme épидидymaire permet de recueillir les spermatozoïdes en nombre suffisant pour plusieurs dizaines d'IA ou de FIV. Selon GUERIN *et al.*, en 2003, qui ont travaillé sur la conservation et l'utilisation des spermatozoïdes épидидymaires chez les ovins et les cervidés, ils ont rapportés que :

- Le sperme épидидymaire se conserve plusieurs jours à +4 °C dans l'organe ou dans le milieu épидидymaire non dilué. Chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes s'acquiert dans l'épididyme.

- La fertilité du sperme épидидymaire d'ovins diminue en fonction du temps mais est encore utilisable après 72 heures de conservation, la fertilité étant alors encore égale à environ la moitié de la fertilité initiale.
- Cette technique permet d'envisager l'utilisation d'animaux non collectables (vivants ou morts depuis quelques jours) en insémination artificielle ou en fécondation in vitro.

III-2-3-1- Méthode opératoire:

Les spermatozoïdes épидидymaires d'ovins ont été recueillis sur des organes prélevés après castration ou abattage de l'animal. Le contenu du tubule de la région caudale a été perfusé à l'aide d'huile de paraffine à partir d'une aiguille insérée dans la lumière du canal déférent de la partie caudale de l'épididyme (figure 08). Les volumes de liquide obtenus variaient de 0,8 à 2,5 ml avec une concentration moyenne des gamètes de 8×10^9 spz/ml pour les béliers. GUERIN *et al.*, en 2003 montrent que la perfusion de la queue de l'épididyme peut être une méthode de prélèvement d'une semence fécondante en quantité suffisante pour plusieurs dizaines d'inséminations. Le pouvoir fécondant de ce sperme n'est pas différent de celui obtenu par éjaculation que ce soit en termes de fertilité ou de prolificité.



Figure 08 : Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier (GUERIN Y *et al.*, 2003).

IV- Evaluation de la semence :

Après sa collecte, la semence est rapidement contrôlée, les tests d'évaluation sont regroupés en trois types d'examen : *macroscopiques* (volume, couleur, consistance, et poids spécifique), *microscopiques* (motilité, concentration, forme anormale). Les examens de routine effectués au niveau des centres d'IA ovine sont ceux de la mesure de la motilité massale des spermatozoïdes, du volume éjaculé et de la concentration en spermatozoïdes.

IV-1- Examens macroscopiques :

IV-1-1- Le volume de l'éjaculat :

Chez le bélier, le volume éjaculé est peu abondant mais très concentré, en général les secondes éjaculations d'une même session de collecte sont plus abondantes que les premières (EDUARDO V *et al.*, 2003). Le volume moyen de l'éjaculation d'un bélier varie entre 0,7 ml et 2 ml. (LACROIX., 1976).

IV-1-2- Couleur et consistance :

L'échantillon normal a un aspect de lait concentré, en général plus le sperme est blanc et visqueux, plus sa concentration en spermatozoïdes est élevée. Chez le bélier, le sperme dit :

- Crémeux épais correspond à une concentration de 5×10^9 spermatozoïdes/ ml.
- Laiteux correspond à 2×10^9 spermatozoïdes/ ml.
- Trouble correspond à 0.7×10^9 spermatozoïdes/ ml (DOUET., 2000).

Certaines contaminations modifient la couleur du sperme : couleur jaunâtre lors de présence d'urine ou de pus, une couleur rouge ou rosée lors de présence de globules rouges ou d'antiparasitaires. Une tonalité jaunâtre peut apparaître lors de présence d'un dérivé de riboflavine (Vitamine B2) dans la semence. Une opacité trop accentuée, ou une apparence caséuse peuvent évoquer une dégénérescence testiculaire ou une infection de l'appareil reproducteur (HAFEZ., 1974; EDUARDO V.F *et al.*, 2003).

Chez le bélier, le sperme est peu visqueux, toutefois, la semence obtenue par électro-éjaculation est très visqueuse, en raison d'une exposition plus ou moins prolongée des glandes annexes aux décharges électriques (EDUARDO V.F *et al.*, 2003).

IV-1-3- Le poids spécifique :

Dans la pratique le poids spécifique moyen de la semence est directement proportionnel à la concentration spermatique. Aussi, les variations de ce paramètre sont en relation avec le nombre des spermatozoïdes mûrs (plus lourds) et immatures (plus légers) (EDUARDO V.F *et al.*, 2003).

IV-2- Examens microscopiques :

IV-2-1- La motilité massale :

Elle est analysée au microscope à faible grossissement (**x10**). L'opération doit être effectuée très rapidement du fait de la sensibilité du sperme à l'action toxique de la baisse du pH du plasma séminal, à la lumière ainsi qu'aux chocs thermiques.

Une goutte de semence pure est posée sur une lame chauffée à 37°C, on observe le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes qui forment des tourbillons plus ou moins rapides (EILTS., 2004).

Ces tourbillons sont notés subjectivement sur une échelle allant de 0 à 5 :

- Mouvements tourbillonnaires : **5**.
- Mouvements amples et rapides : **4**.
- Mouvements limités : **3**.
- Mouvements faibles : **2**.
- Mouvements très légers : **1**.
- Pas de mouvements : **0** (DOUET., 2000).

A l'issue de cette notation, seuls les éjaculats ayant reçu une note de motilité supérieure ou égale à 3,5 et 4 sont gardés, selon les centres d'insémination. Il faut noter que l'intensité des vagues est beaucoup plus importante dans les mêmes conditions chez le bélier que chez le taureau (LACROIX., 1976).

IV-2-2- Mobilité individuelle :

Une goutte de sperme est placée entre lame et lamelle sur la platine à 37°C du microscope, on observe, au fort grossissement (**x40**), individuellement les spermatozoïdes, l'intensité, la rapidité et la trajectoire de leurs mouvements. On peut ainsi apprécier d'une manière subjective, le pourcentage de spermatozoïdes vivants ou morts, fléchant ou tournant en rond.

Cet examen peut également se faire après dilution et refroidissement afin de juger dans le temps le comportement et la résistance des spermatozoïdes (LACROIX., 1976 ; DOUET., 2000), cependant, cette évaluation est subjective et les résultats sont largement tributaires de la dextérité de l'évaluateur (KATKOV IGOR I., 2012).

Les taux de spermatozoïdes morts ou anormaux acceptables dans le sperme se situe entre 20 et 26% (COLAS *et al.*, 1975 ; COLAS., 1980 ; FANTODJI *et al.*, 2009).

IV-2-3- Concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat :

Au niveau des centres d'IA ovine, aussitôt après la mesure de la motilité massale de l'échantillon, sa concentration est déterminée le plus souvent en utilisant la spectrophotométrie.

En Algérie les deux centres d'IA ovine d'Ouled Djellal et de Nâama utilisent cette méthode. Le principe repose sur la mesure d'absorbance (ou densité optique) du sperme, après dilution d'un volume constant de semence pure dans une solution de sérum physiologique formolée (GUILLOT., 2002 ; SAGOT., 2009). Cette technique est très efficace et rapide, mais l'absorbance peut être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires.

Le comptage direct des spermatozoïdes au moyen des cellules hématimètres est possible, cela suppose une dilution préalable. Ce comptage est très précis, mais nécessite beaucoup de temps (HAFEZ., 2000, cité par BESTER., 2006).

IV-2-4- Examen de la viabilité des spermatozoïdes :

La vitalité est le reflet de la proportion de spermatozoïdes vivants déterminée par l'évaluation des cellules et/ou de l'intégrité membranaire. Lorsque le pourcentage de spermatozoïdes immobiles dépasse 40%, il devient cliniquement important de vérifier la proportion de spermatozoïdes vivants. Cette évaluation peut différencier entre la mort des spermatozoïdes et l'absence totale de mobilité, ce qui indique des défauts structurels dans le flagelle.

La plupart des évaluations de la vitalité des spermatozoïdes sont basées sur la capacité de la membrane cellulaire à empêcher les colorants de pénétrer dans les spermatozoïdes, il s'agit de colorants appropriés et adaptés à la microscopie sur fond clair (l'éosine, l'éosine-nigrosine et le bleu trypan). La vitalité du spermatozoïde peut également être évaluée par la mesure de la capacité osmo-régulatrice sous les conditions hypo-osmotiques (150 mOsm / L), une indication de l'intégrité fonctionnelle de la membrane des spermatozoïdes (MOSKOVTSSEV S.I *et al.*, 2013).

➤ Coloration morts-vivants :

Lors de la coloration à l'éosine-nigrosine, les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs et sans couleur contre le fond violet de la nigrosine, alors que les spermatozoïdes morts ou endommagés qui ont une membrane plasmique perméable apparaissent de couleur rosâtre (figure 09). L'évaluation du pourcentage de spermatozoïdes vivants et morts, et le pourcentage de défauts de morphologie peut être réalisée sur les mêmes lames de coloration à l'éosine- nigrosine (Agnieszka Partyka *et al.*, 2012).

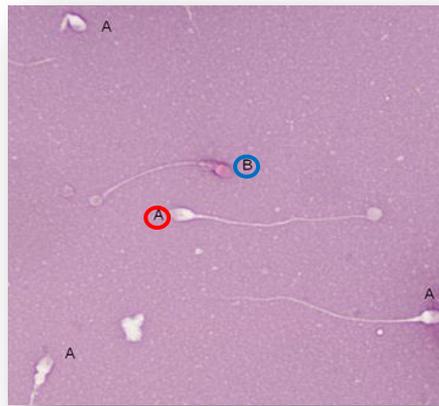


Figure 09 : Coloration eosine-nigrosine, (A) spermatozoïdes vivants non colorés, (B) spermatozoïdes morts colorés en le rose (MOSKOVTSSEV S.I *et al.*, 2013).

➤ **Test hypo-osmotique (HOS) :**

C'est une méthode d'investigation de l'intégrité de la membrane dans le sperme et, comme tel, est une alternative à la coloration morts-vivants. En fait, le test HOS est pensé pour avoir l'avantage d'indiquer non seulement si la membrane est intacte, mais également s'il est osmotique.

Lorsque les spermatozoïdes qui ont une membrane intacte et fonctionnel sont exposés à une solution hypo-osmotique et incubé pendant 30 minutes à 37 ° C, vont gonflés pour atteindre un équilibre osmotique (figure 10). Le test HOS est une technique simple, peu coûteux et facilement applicable, qui a été adapté à l'évaluation des spermatozoïdes de plusieurs espèces (AGNIESZKA PARTYKA *et al.*, 2012).

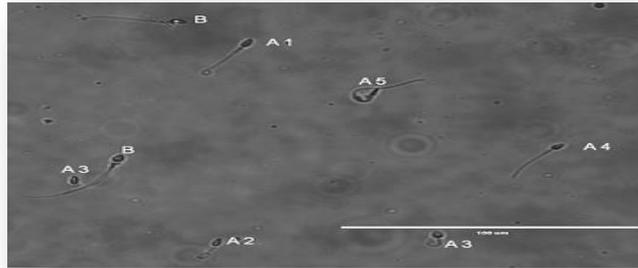


Figure 10 : Test hypo-osmotique, (A1-A5) ; spermatozoïdes vivants présentant différents tailles, (B) ; spermatozoïdes morts présentant une taille à ligne droite sans courbe (MOSKOVITSEV S.I *et al.*, 2013).

IV-3- Méthodes plus avancés d'évaluation de la semence chez le bélier :

IV-3-1- CASA: (Computer Assisted Sperm Analysis)

C'est un système informatique qui permet de calculer plusieurs paramètres de la mobilité individuels des spermatozoïdes (figure 11). L'avantage du système CASA est la mesure immédiate de la concentration du sperme, le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat et le calcul automatisé du nombre de paillettes qui peuvent être préparées à partir d'un éjaculat (AGNIESZKA PARTYKA *et al.*, 2012).

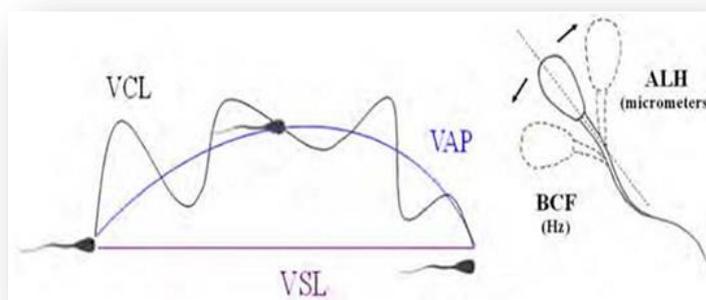


Figure 11: Schéma de différentes vitesses et paramètres de mouvement des spermatozoïdes mesuré par le système CASA ; **VAP** (Average path velocity), **VSL** (Straight line velocity), **VCL** (Cell velocity), **ALH** (Amplitude of lateral head displacement) et le **BCF** (Beat cross frequency) (AGNIESZKA PARTYKA *et al.*, 2012).

IV-3-2- La cytométrie en flux :

Au cours des dernières décennies, de nombreuses sondes fluorescentes ont été utilisées pour l'évaluation qualitative du sperme. La fluorescence de ces composés peut être estimée en utilisant la microscopie à fluorescence ou la cytométrie de flux (AGNIESZKA PARTYKA *et al.*, 2012).

Le principe de la cytométrie en flux repose sur le marquage des spermatozoïdes à l'aide d'un colorant fluorescent qui réagit spécifiquement avec l'ADN des cellules (Bromure d'éthidium ou Hoechst 33342).

La quantité de fluorochrome fixée est proportionnelle à la qualité d'ADN contenue dans chaque cellule, les spermatozoïdes sont ensuite soumis à l'éclairement d'un faisceau laser, puis la fluorescence émise par chaque cellule est analysée par un détecteur couplé à un système informatique. En fonction de l'intensité de fluorescence émise, les spermatozoïdes sont déviés par un champ électrique qui permet de les séparer en deux populations car les spermatozoïdes porteurs du chromosome X émettent un signal supérieur à celui émis par les cellules Y (figure 12) (ANNIK B.L., 2001).

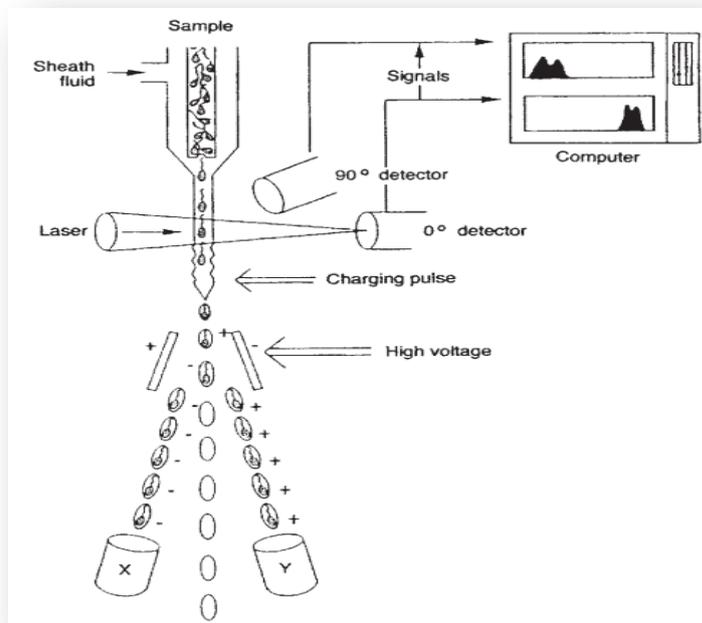


Figure 12 : Diagramme de la cytométrie en flux (IAN GORDON., 2004).

V- Dilution et conservation de la semence :

V-1- Historique :

L'étude de l'effet des températures négatives sur le sperme débute avec Spallanzani (1776), qui observe que, placée dans la neige, puis réchauffée dans l'air, la semence contient encore des spermatozoïdes mobiles. L'utilisation de dilueurs sucrés remonte à 1938 ; en 1946 Rostand montre le pouvoir protecteur du glycérol sur les spermatozoïdes de grenouille portés à -4°C et -6°C.

V-2- Conservation à court terme :

V-2-1- Le lait (entier ou écrémé) :

Nous utilisons du lait écrémé pasteurisé. Le lait frais non chauffé est un milieu défavorable car sa flore et son acidité augmentent rapidement et parce que certains de ses constituants (albumine, lacténine, lactopéroxydase) sont toxiques pour les spermatozoïdes. Nous pouvons, par contre, chauffer le lait frais pendant 10 minutes à 92°C pour détruire ces composants (SZUMOWSKY P., *et al*, 1956 ; DRUART X., *et al*, 2009).

Le lait écrémé est classiquement utilisé comme milieu de conservation de la semence chez le bélier, en effet, son pH étant égal à 7 et son osmolarité de 280 mOsm/kg permettent la dilution directe de la semence. Le lait est un milieu complexe riche en protéines et en glucides. La fraction protéique joue un rôle tampon contre des modifications de pH et assure une chélation des métaux lourds. La lactoferrine, une protéine proche de la transferrine et présente en grande quantité dans le lait, pourrait protéger les spermatozoïdes de l'oxydation par chélation de fer. Le fructose est la principale source énergétique des spermatozoïdes dans le plasma séminal.

Cependant, en absence de fructose, les spermatozoïdes sont capables de métaboliser d'autres glucides. Parmi lesquels, le lactose, permet le maintien de l'osmolarité et constitue une source énergétique pour les spermatozoïdes. La semence diluée est ensuite mise en paillettes fines de 0,25 mL et stockée dans des récipients isothermes dont la température de 15°C est maintenue grâce à une ampoule de verre remplie d'acide acétique congelé.

V-2-2-Dans d'autres milieux :

Ces milieux sont généralement constitué d'un tampon minéral ou organique associé à des glucides et du jaune d'œuf.

Les milieux à base de phosphate ou de citrate permettent de conserver la semence ovine à 4°C et 15°C avec une fertilité variable selon les auteurs mais similaire à celle du lait. Le Tris est un milieu de type organique, qui est préféré aux tampons phosphate du fait de son meilleur pouvoir tampon. Ce dernier associé à du glucose et du jaune d'œuf peut être une alternative au lait (DRUART X., *et al*, 2009).

La mobilité des spermatozoïdes de bélier après 24 h de conservation à 5°C dans des milieux lait écrémé/JO ou Tris/JO n'est pas significativement différente (PAULENZ *et al* 2002). Dans ces conditions, la fertilité obtenue après IA vaginale sur œstrus naturel dans une limite de 12 h de conservation à 5°C n'est pas différente entre le lait/JO et le tris/JO. De même, après 24h de conservation à 15°C, HOLLINSHEAD *et al*, 2004_a n'ont pas observé de différence significative de mobilité entre le lait UHT et le Tris/JO.

V-3- Conservation à long terme (congélation ou cryoconservation)

V-3-1- Les bases de la cryoconservation :

V-3-1-1- Définition de la cryoconservation :

La cryoconservation, de son préfixe **cryo**, qui désigne le froid et la glace, repose sur la suspension de toute activité biologique aux basses températures ce qui permet un stockage prolongé, en théorie illimité, et un retour à la viabilité des cellules après réchauffement. La température, généralement, utilisée pour la cryoconservation des gamètes et des embryons, est celle de l'azote liquide, -196 °C (Fuller *et al*, 2004).

V-3-1-2- Refroidissement et équilibration :

Le refroidissement des cellules correspond à une baisse régulière de 34°C à 37°C jusqu'à une température de 3°C à 5°C.

Lors de cette baisse en température, les cellules subissent des phénomènes regroupés sous le nom « cold shock ». Ce choc thermique est caractérisé par un déplacement circulaire des spermatozoïdes, une baisse de leur mobilité, l'augmentation de la perméabilité de leur membrane et donc la perte de substances intracellulaire. Sur les lames à l'éosine observées au

microscope, les spermatozoïdes touchés présentent une queue recourbée. La zone critique se situe entre 20°C et 15°C ; sont principalement affectés, les lipides de la membrane, car ils passent d'une phase liquide cristalline à une phase gel, et ils forment des agrégats.

Le refroidissement induit en effet une diminution de la fluidité des membranes suite à la solidification des lipides la composant ; la résistance au froid est favorisée par un rapport cholestérol sur phospholipides élevé, et par un taux important de phospholipides saturés.

Les protéines s'agrègent elles aussi et de nouveaux pores se créent alors la membrane, modifiant la perméabilité cellulaire, responsable de flux anarchiques.

L'importance des dégâts est directement liée à la vitesse de refroidissement. Ce temps de refroidissement est aussi un temps d'équilibration, vis-à-vis du glycérol si celui-ci est ajouté à 30°C, mais aussi de tout composé osmotiquement actif, et cet équilibration ne se fait pas à la même vitesse selon la température (DHAMI A.J *et al*, 1993).

Selon DHAMI A.J., *et al* en 1992, le refroidissement se doit d'être progressif et lent et ce, surtout entre 15°C et 0°C, afin de limiter la dégradation cellulaire. Il existe un optimum quant à la pente de refroidissement, optimum variable selon l'espèce et les dilueurs employés ; en générale la pente ne dépasse pas -0,5°C/min. Certaines molécules limitent en outre les dégâts sur les membranes ; elles peuvent être naturellement présentes dans les cellules (cholestérol) ou ajoutées par la manipulation (jaune d'œuf contenant des phospholipides).

V-3-1-3- Congélation :

Elle correspond au passage de 5°C à -196°C, température de l'azote liquide (congélation en paillettes) ou de 5°C à -79°C, température de la glace carbonique (congélation en pellets). Contrairement au bovin, où la semence peut être directement déposée dans l'utérus, chez la brebis, le col utérin constitue une barrière quasi infranchissable pour la tige de l'IA, ce qui limite l'utilisation de la semence congelée. Plusieurs phénomènes physiques s'imbriquent lors de la congélation :

Phénomène lié à la surfusion :

Cela signifie que, dans le cas présent, les liquides ne se solidifient pas quand on atteint la température de congélation de l'eau, soit 0°C. En effet, la congélation peut se réaliser s'il existe des impuretés dans le milieu permettant la formation d'un premier cristal de glace, puis

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

ce nucléus constitue lui-même un substrat de cristallisation et il se produit une réaction en chaînes. Ainsi l'eau pure peut rester liquide jusqu'à -40°C , température à laquelle les molécules d'eau elle-même servent de nucléus. La présence de solutés dans l'eau diminue le point de fusion conformément à la loi de Raoult appliquée aux électrolytes.

Pour une diminution de température lente (de l'ordre de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) la formation de glace dans le milieu extracellulaire débute vers $-3/-4^{\circ}\text{C}$; suite au phénomène de surfusion la cristallisation ne commence pas avant -10°C . Une fois la congélation amorcée, deux phénomènes se produisent.

D'une part les cristaux qui se forment sont plus organisés, donc moins énergétiques que les molécules libres. L'excès énergétique est alors libéré sous forme de chaleur, ce qui correspond à une remontée en température du milieu jusqu'à la température normale de congélation ; c'est ce qu'on appelle le pic de surfusion.

Une fois la congélation terminée, la température recommence à descendre. Finalement, la zone critique durant la congélation de situe aux alentours de -15 à -60°C (PILCH J, 1980). Il est important que le pic de surfusion ne soit pas trop important, car vu la rapidité de variation thermique, cela pourrait être préjudiciable à la survie des cellules.

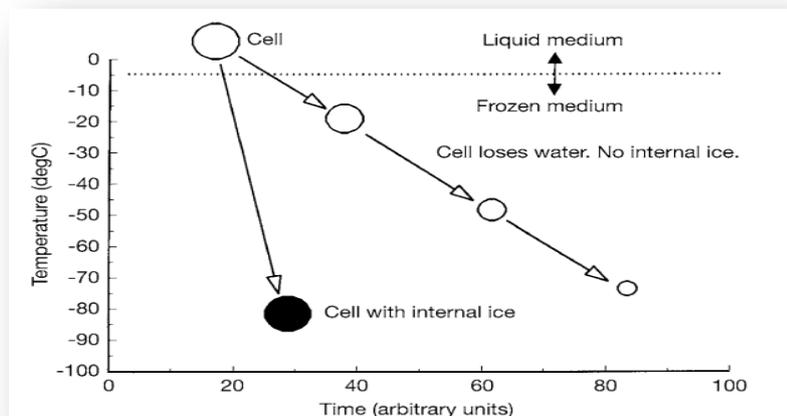


Figure 13 : Schéma représentatif de la courbe de congélation lente et le refroidissement rapide des cellules (JOHN G.D *et al*, 2007).

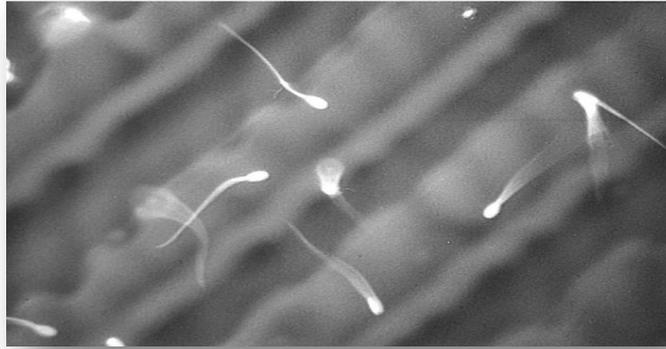


Figure 14 : Spermatozoïdes de bélier congelés à -40°C marqués par un fluorescent isothiocyanate et observés par un cryomicroscope à $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ avec la présence d'un $300\mu\text{g}/\text{ml}$ de rhodamine tamponné par le phosphate salé (HOLT W.V, 2000).

La région de forte fluorescence au fond, indique la présence d'une concentration importante de rhodamine et d'autres substances salées, par contre la région noir indique les zones où la concentration de substances salées est moins importante. (HOLT W.V, 2000).

Phénomène lié à la cristallisation des cellules en suspension :

La cristallisation s'amorce d'abord dans le milieu extracellulaire, les membranes plasmiques jouant un rôle de barrière protectrice. Or les sels présents dans ce milieu extracellulaire sont exclus de ce phénomène et donc de concentrent dans la partie liquidienne restante. Cela signifie que la pression osmotique du milieu extérieur augmente, créant un déséquilibre avec le milieu intracellulaire. L'eau contenue dans les cellules tend alors à sortir dans le milieu extérieur pour maintenir un état d'équilibre des gradients osmotique.

- Si la congélation est lente, l'eau peut passer la membrane donc, la cellule se déshydrate, ce qui limite le risque de formation de gros cristaux.
- Si la congélation est trop lente, la déshydratation de la cellule devient trop importante ; elle atteint son volume minimum et est le siège de flux ioniques intenses visant à compenser le déséquilibre osmotique ; on assiste à des modifications biochimiques pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.
- Si la congélation est trop rapide, l'eau n'a pas le temps de sortir de la cellule et gèle dans la cellule ; les gros cristaux qui se forment endommagent les membranes et les organites, là aussi on risque la mort cellulaire.

Cependant une congélation suffisamment rapide peut aussi permettre la formation de microcristaux, peu nocifs pour la cellule (MAZUR P, 1980).

La congélation peut être effectuée en deux temps dans les congélateurs programmables : une première étape de congélation lente qui permet la déshydratation et l'équilibration des pressions osmotiques, et une deuxième étape de congélation rapide qui évite l'effet de solution. De même pour le refroidissement, il existe des courbes optimales de congélation qui sont en fonction de type de cellule et du milieu de congélation. La température finale de congélation est de -196°C , dans l'azote liquide, et de -79°C dans la glace carbonique.

Quand on immerge des cellules dans l'azote liquide, si on a une grande différence de température entre les deux corps, il se produit une réaction de caléfaction qui les protège du froid ; à $-140/-150^{\circ}\text{C}$, l'azote mouille le corps.

En fait la congélation est achevée avant -196°C . On considère qu'elle est effective à -80°C , température utilisée pour la congélation des pellets par la glace carbonique, mais à cette température le métabolisme n'est pas complètement inhibé. Une fois les cellules congelées dans l'azote liquide, leur métabolisme est quasiment nul, leur conservation serait donc infinie. (JONDET R, 1980).

V-3-2- Dilution :

V-3-2-1- Importance :

Les dilueurs du sperme sont indispensables à sa congélation. Le sperme non dilué ne peut se conserver longtemps car :

- Il y a une compétition trophique entre les cellules ;
- Les déchets du métabolisme s'accumulent et sont toxiques (le métabolisme augmente avec la température) ;
- Le plasma séminal est toxique ;
- Le milieu s'acidifie suite à la respiration des cellules ;
- Les protéines de l'utérus qui assurent la survie du sperme sont absentes (HALLER E.S.E, 1993).

Les spermatozoïdes « s'auto-capacitent » et donc leur temps de survie diminue ; en effet les spermatozoïdes à membrane plus fragile libèrent leur acrosome spontanément ; ceci

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

explique que la simple incubation permette d'obtenir une fécondation d'ovocytes *in vitro*. Les milieux ont un rôle trophique pour la cellule, cryoprotecteur, tampon, sans oublier leur rôle de diluant qui permet avec un éjaculat d'obtenir plusieurs doses d'insémination (MARTIN J.C *et al.*, 1979). Ils doivent permettre à la cellule d'atteindre un stade de vie ralentie sans en altérer la fonctionnalité. Ils doivent en outre être économiques et facilement utilisables.

Rôle trophique :

On utilise couramment le fructose et le glucose, car ce sont des monosaccharides présents naturellement dans le plasma séminal et facilement utilisables par les spermatozoïdes. D'autres sucres sont utilisés pour leur efficacité cryoprotectrice (MOLINA F.C *et al.*, 1994).

Les sucres peuvent être ajoutés tels quels ou être présents dans autres constituants (ex : lactose du lait).

Rôle cryoprotecteur :

Beaucoup de constituants interviennent : les sucres, les lipides présents dans le jaune d'œuf et le lait. Actuellement tous les milieux sont additionnés d'une substance à action spécifiquement cryoprotectrice, en général qui le plus efficace parmi les molécules connues.

Rôle tampon :

La base des dilueurs est une solution saline de composition variable ; elle contient des ions qui régulent le pH et l'osmolarité du milieu.

Les tampons les plus couramment utilisés sont l'HEPES et le TRIS. Leurs rôle est de limiter les variations de pH liée à :

- La production d'acide lactique par le métabolisme des spermatozoïdes ;
- Les variations de pH de l'éjaculat, fonction de la sécrétion des glandes annexes.
- Ils ont un pH autour de 6,5 – 7,5 et sont isosmotiques au plasma séminal (300mOsm) ; une action bénéfique des dilueurs hyperosmotiques a cependant été constatée, liée à une meilleure déshydratation des cellules (UPRETI G.C *et al.*, 1995).

Les sucres ont une influence importante sur la pression osmotique ; les monosaccharides sont mieux supportés que les disaccharides car ils passent les membranes cellulaires.

La lécithine et les phosphoglycérides (œufs, soja) ont des propriétés amphotères.

Rôle bactéricide :

Les milieux de dilution contiennent des antibiotiques, car ils présentent des milieux favorables au développement des bactéries, et parce que le sperme peut être contaminé. On utilise la plupart du temps les associations pénicilline-streptomycine ou pénicilline-gentamicine (MOLINIA F.C *et al.*, 1994).

V-3-2-2- Les types de dilueurs :

On trouve trois grands types de milieux servant de dilueurs : les milieux sucre-tampon, les milieux au lait et/ou au jaune d'œuf.

Les milieux au jaune d'œuf seraient plus efficaces que ceux au lait selon certains auteurs à partir du moment où l'on descend en dessous de -15°C (FENNESSY P.F *et al.*, 1990 ; ASHER G.W *et al.*, 1993 ; CHAUDHRY T.M *et al.*, 1995 ; MAXWELL W.M.C *et al.*, 1995 ; DE LAS HERAS M.A *et al.*, 1996 ; GRAVANCE C.G *et al.*, 1997). On utilise que des œufs frais. Ils semblent que la lécithine du jaune forme une pellicule protectrice sur les membranes qui s'oppose au choc thermique (JEYEDRAN R.S *et al.*, 1980 ; WHITE I.G *et al.*, 1980) ; il semble aussi que le jaune, serve de « tampon osmotique », puisque les spermatozoïdes supportent mieux les variations de pression osmotique en sa présence. Son rôle est contesté par certains chercheurs, qui lui reprochent en particulier de faire coaguler le sperme de bouc, voire d'être toxique (CHAUHAN T.M *et al.*, 1990 ; MOMON M.A *et al.*, 1981 ; SHANON P., 1978).

V-3-2-3- Les cryoprotecteurs :

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques, naturels ou de synthèse dont le but est de protéger les cellules des effets délétères des très basses températures (Courbière *et al.*, 2009). On distingue deux catégories de cryoprotecteurs:

V-3-2-3-1- Cryoprotecteurs pénétrants la cellule :

Ce sont des substances organiques très solubles, dérivées le plus souvent d'alcools ou du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ils sont caractérisés par un poids moléculaire faible. Les cryoprotecteurs les plus utilisés en biologie de la reproduction sont : 1,2 propanediol (PM=76.1), DMSO (PM=78.13), glycérol (PM=92.1), éthylène glycol (PM=62.07) et d'autres

alcools (Palasz, 1996). Voelkel et Hu (1992) ont montré l'efficacité de l'éthylène glycol à une concentration de 1.5 M en tant que cryoprotecteur pour les embryons de la vache. La basse toxicité de l'éthylène glycol a été démontrée par Sommerfeld et Niemann (1999) qui ont examiné des concentrations de 1.8 à 8.9 M.

Le mécanisme d'action de glycérol n'est pas encore totalement élucidé. Il semblerait que son action soit intra et extracellulaire.

Dans le milieu intracellulaire :

- Il fixe les molécules d'eau grâce à des radicaux hydroxyles ou sulfoxydes, pour diminuant la cristallisation intracellulaire et limitant les phénomènes de choc osmotique par déshydratation précoce de la cellule ;
- A une forte concentration il permet, grâce à ses radicaux hydroxyles, un passage direct de l'état liquide à l'état amorphe vitreux, évitant ainsi l'apparition de cristaux de glace ;
- Il favorise la formation de cristaux de glace de petites tailles et de forme arrondie qui risquent moins de léser la membrane ;
- Il se concentre dans la tête du spermatozoïde, ce qui expliquerait l'amélioration de la fertilité du sperme.

Dans le milieu extracellulaire : il diminue la concentration des sels, ce qui :

- Abaisse son point de congélation, donc favorise sa surfusion, diminue l'écart entre la congélation des compartiments intra et extracellulaire et donc réduit le choc osmotique ;
- Limite la fraction d'eau non congelée et donc la concentration cellulaire ; il semble d'ailleurs que la quantité d'eau congelée soit plus nocive que la concentration des sels pour la survie de la cellule ;
- Il se fixe sur la membrane, empêche sa dénaturation et maintient l'intégrité des protéines ;
- Lors de la décongélation sa liquéfaction progressive entre -35°C et -1°C limite les risques de choc osmotique ;
- Il a aussi une action bactériostatique.

Son action semblerait n'avoir lieu qu'au cours de la congélation, il est donc inutile au cours du refroidissement et on peut ne l'ajouter qu'à 5°C. Ainsi que le jaune d'œuf agirait plus précocement : ses phospholipides se fixeraient sur les membranes de façon réversible,

empêchant leur désagrégation et secondairement les lésions cellulaires puisque les premières victimes du refroidissement seraient les membranes acrosomiales et mitochondriales.

Le glycérol présente néanmoins une toxicité importante, tant osmotique que biochimique, s'il se retrouve en excès dans le milieu ou dans la cellule. Par ailleurs il n'est pas indispensable à la congélation même s'il l'améliore notablement.

D'un point de vue osmotique, le glycérol étant responsable d'une hyperosmolarité du milieu lors de son incorporation, une forte concentration de glycérol peut entraîner un choc osmotique. De même si on décongèle les cellules en utilisant un milieu hyposmotique, le glycérol n'a pas le temps de sortir de la cellule que déjà l'eau rentre massivement, pouvant la faire éclater. A très forte dose il peut tellement favoriser la surfusion qu'il empêche la congélation ; il permet alors à l'effet de solution de s'exercer puisque la pression osmotique du milieu extérieur augmente et que la congélation n'est pas assez rapide.

D'un point de vue biochimique, le glycérol est capable de se lier aux phospholipides, ce qui diminue la fluidité de la membrane, favorise les agrégats et déplace les protéines enchâssées dans la membrane. A l'inverse de la toxicité osmotique, la toxicité biochimique est plus réduite quand le temps de contact avec les cellules diminue (IAN GORDON., 1997 ; MOLINIA F.C *et al.*, 1994 ; SINGH M.P *et al.*, 1995).

V-3-2-3-2- Cryoprotecteurs non pénétrants la cellule :

➤ A poids moléculaire faible, nous citons : galactose (PM=180.2), glucose (PM=181.1), sucrose (PM =342.3), tréhalose (PM=378.3) et tous autres sucres. (PALASZ *et al.*, 1996). Leur principe d'action est d'entraîner une fuite d'eau intracellulaire par effet osmotique : l'augmentation de la concentration en solutés intracellulaires qui en résulte vise à empêcher la cristallisation dans les cellules (COURBIERE *et al.*, 2009).

➤ A poids moléculaire élevé (> 50, 000 Daltons) comme la polyvinylpyrrolidone (7.34), l'alcool polyvinylique (34.109), l'amidon hydrox éthylique (7.34), le hyaluronate de sodium (46.78) et d'autres polymères (PALASZ *et al.*, 1996).

V-3-2-4- Autres produits :

V-3-2-4-1- les acides aminés :

Certains acides aminés amélioreraient les résultats de la congélation. Les plus efficaces sont la glutamine, la bétaïne, la proline. La glutamine a le meilleur effet à faible osmolarité. Son rôle a été étudié chez le Baudet du Poitou, le cheval, le bélier et le chien.

Nous n'avons pas encore trouvé d'acide aminé aussi efficace tout seul qu'un cryoprotecteur classique, mais leur association augmente l'efficacité des cryoprotecteurs, permettant d'en diminuer la dose et donc la toxicité.

Le mode d'action demeure encore mal connu; ils semblent protéger la membrane de la dénaturation et augmenter la pression osmotique du milieu extra-cellulaire, comme les sucres (B, EDEL-PICHON M., 1996 ; SHAMSUDDIN M *et al.*, 1978 ; SIMON A *et al.*, 1997 ; TRIMECHE A *et al.*, 1999).

V-3-2-4-2- Les détergents :

Le sodium tri-éthanol-amine lauryl sulfate (STLS) agirait en tant qu'émulsifiant ; il disperse les lipoprotéines du jaune d'œuf et favorise son interaction avec la membrane. Il diminue aussi la tension de surface entre la membrane et le dilueur, ce qui diminue les dégâts causés par les cristaux lors de la congélation et stabilise la membrane acrosomiale (ARRIOLA J *et al.*, 1987 ; IQBAL M.J *et al.*, 1996 ; JIMENEZ C.F, 1987 ; MONFORT S.L *et al.*, 1993 ; SCHIWE M.C *et al.*, 1991).

V-3-2-4-3- Les antioxydants :

Des chélateurs (EDTA, super-oxyde dismutase, catalase) sont parfois utilisés. Leur importance est plus grande chez le bélier dont le sperme ne contient pas d'antioxydants naturels. Le plasma séminal favorise la libération d'acides oxydase (AAO), ces enzymes peroxydent les phospholipides et déstabilisent la membrane. Le jaune d'œuf dans les dilueurs est donc lié à la dilution du sperme puisque la toxicité du plasma séminal est liée à sa concentration (BICONI M.T *et al.*, 1993 ; DHAMI A.J *et al.*, 1994).

**REALISATION
EXPERIMENTALE**

I- Introduction :

La fragilité de la semence des petits ruminants face à la cryoconservation est, actuellement, le problème majeur qui entrave quelque peu l'utilisation de l'IA ovine à grande échelle, une fois la semence collectée et conditionnée, son utilisation reste assez limitée dans le temps.

La conservation de la semence est très vite apparue comme une solution intéressante, venant à bout des contraintes rapportées ci-dessus. Elle permet la constitution d'un stock de semence d'élite utilisable à tout moment et diffusable partout dans le monde, cette technique a recours à l'utilisation du glycérol, l'un des cryoprotecteurs les plus largement utilisés mais qui est initialement incorporé dans les préparations en vue de la congélation de la semence, Morrieret *al.*, en 2002 rapportent une baisse de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes conservés à + 4°C avec des préparations contenant 7% de glycérol, mettant ainsi en évidence une éventuelle toxicité de ce dernier lorsqu'il est utilisé dans le cadre de la réfrigération au lieu de la congélation (utilisation initiale).

L'objectif du présent travail était, dans un premier temps, de procéder à la réalisation pratique des deux techniques de conservation, à savoir, la réfrigération à + 4°C et la congélation à - 196°C et dans un second temps, il était question d'évaluer la toxicité potentiel du glycérol utilisé dans les protocoles de réfrigération par le CNIAAG en utilisant deux doses de glycérol, 5% et 10%.

II- Matériels et méthodes :

La réalisation pratique de notre travail a été faite au niveau du cabinet du Dr. BENHENIA Karim, praticien exerçant dans la commune de Taouzient dans la wilaya de Khenchela.

Notre choix s'est porté sur Dr. BENHENIA en raison de sa dextérité dans la collecte du sperme épидидymaire et la manipulation de la semence, ajouter à cela le fait qu'il ait déjà réalisé des travaux sur les protocoles de congélation.

II-1- Matériels

II-1-1- Matériels biologique :

Notre travail s'est porté sur la semence ovine d'origine épидидymaire, 07 testicules d'abattoir provenant d'ovins adultes ont ainsi été achetés, nous nous sommes référés dans

REALISATION EXPERIMENTALE

notre choix des testicules à leur appréciation certes subjective mais qui nous a permis de les trier pour n'en garder que ceux qui ne présentaient aucune atteinte visible à l'œil nu ni de tissu cicatriciel, témoignant d'une atteinte antérieure.

II-1-2- Matériels de manipulation :

La tunique vaginale des testicules est incisée au moyen d'une lame de bistouri préalablement montée sur un manche, le testicule est ensuite dégagé. Nous procédons ensuite au détachement de l'épididyme du testicule par une dilacération aux doigts.



Figure 15 : Dilacération du testicule (Cliché personnel)



Figure 16 : Coupe au niveau de la jonction queue-corps de l'épididyme (Cliché personnel)

Les vaisseaux irriguant le testicule sont clampés à l'aide de pinces hémostatiques afin d'éviter que des gouttes de sang ne viennent atterrir dans le récipient de collecte de la semence.

Au moyen d'une seringue chargée de sérum physiologique (NaCl à 0,9%) nous injectons ce dernier au niveau du canal déférent pour ensuite le récupérer de la queue de l'épididyme, ce faisant, nous réalisons un lavage de l'épididyme de son contenu en sperme.

II-1-3- Matériels de conservation (équipement) :

Pour la conservation de la semence (réfrigération et/ou congélation), nous avons utilisé une glacière réglable dont l'intervalle de température va de -2°C à $+55^{\circ}\text{C}$, pour les besoins de

REALISATION EXPERIMENTALE

notre expérimentation, nous avons d'abord réglé la glacière sur une température de $+4^{\circ}\text{C}$ en vue d'assurer une réfrigération de la semence puis sur 37°C afin de pouvoir évaluer cette dernière à la faveur d'un réchauffement.

Pour ce qui est de la congélation, nous avons mis au point un dispositif de fortune constitué d'un bac de polyester recouvert par une plaque étanche, l'azote liquide à -196°C est versé à l'intérieur sans risquer d'en perdre des gouttes et de la vapeur.



Figure 17 : Glacière électrique réglable.



Figure 18 : Microscope optique.



Figure 19 : Balance de précision.

II-2- Méthodes :

II-2-1- Evaluation des spermés collectés :

II-2-1-1- Evaluation macroscopique : Sont appréciés :

Le volume : Un volume normal n'est qu'un facteur secondaire reflétant la qualité et dépende en grande partie du rythme de saillies ou de collectes effectuées ;

La couleur : La couleur normale du sperme est un blanc nacré, lorsqu'il est rouge, nous pouvons suspecter la présence de sang (hémospermie).

II-2-1-2- Evaluation microscopique :

Cet examen s'effectue sur du sperme pur, il faut donc conserver la semence, aussitôt récoltée à une température de 37°C. Une goutte est alors prélevée et mise entre lame et lamelle afin d'apprécier la motilité massale, individuelle et la concentration des spermatozoïdes qu'elle contient.

II-2-1-2-1- La motilité massale :

A l'issue d'une observation des mouvements d'ensemble des spermatozoïdes au faible grossissement nous attribuons une note qui va de 0 à 5

- Mouvements tourbillonnaires : **5**
- Mouvements amples et rapides : **4**
- Mouvements limités : **3**
- Mouvements faibles : **2**
- Mouvements très légers : **1**
- Pas de mouvement : **0**

II-2-1-2-2- La mobilité individuelle :

L'estimation visuelle de la mobilité individuelle des spermatozoïdes est réalisée en même temps que l'estimation du taux des spermatozoïdes mobiles. Nous plaçons une lamelle sur 10 µl du sperme dilués 10 fois, ce qui isole les spermatozoïdes et permet de distinguer les cellules qui sont mobiles des cellules qui sont déplacées par les mobiles. Nous apprécions alors le pourcentage des spermatozoïdes mobile, au grossissement (x40).

II-2-1-2-3- La concentration :

La cellule Malassez est une cellule hématimétrique ; elle est constituée d'une lame de verre épaisse portant un quadrillage dans une zone centrale, elle-même brodée et surélevées permettent de poser une lamelle (figure 20). Le quadrillage correspond à la zone de comptage. A son niveau, la lame épaisse est gravée de rectangles, et chaque rectangle est divisé en 20 carrés pour faciliter le comptage (Figure 21).

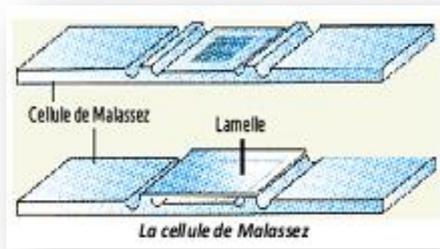


Figure 20 : Schéma représentatif d'une cellule de Malassez.

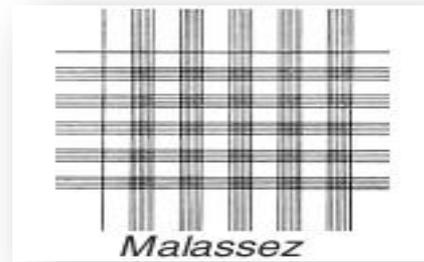


Figure 21 : Quadrillage d'une cellule Malassez.

La surface d'un carré est de $0,0025 \text{ mm}^2$, celle d'un rectangle est de $20 \times 0,0025 = 0,05 \text{ mm}^2$. La hauteur lame et lamelle est de $0,2 \text{ mm}$. Donc le volume d'un cube dont une face est un carré de $0,01 \text{ mm}^3$. Nous avons donc un volume de 1 mm^3 dans 100 cubes.

Nous avons commencé par réaliser une dilution de $10 \mu\text{l}$ de sperme dans $1990 \mu\text{l}$ de Formol à 3,5%. Ceci permet de tuer les spermatozoïdes pour qu'ils soient immobiles et d'éviter les amas cellulaires, ce qui nous évitera de compter le même SPZ plusieurs fois.

Au grossissement 40, nous avons compté les spermatozoïdes dans 2 lignes de carré d'un rectangle c'est-à-dire 10 carrés. Nous avons utilisé la formule suivante pour calculer la concentration du sperme :

$$\text{Concentration du sperme} = \frac{\text{Nombre SPZ} \times \text{taux de dilution}}{\text{Nombre de carrés} \times \text{volume de carré}} \text{ SPZ/mm}$$

$$\text{Sachant que volume du carré} = 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,2 \text{ mm} = 0,0005 \text{ mm}^3 = \underline{\underline{5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3}}$$

$$\text{Taux de dilution} = 200 (10 \mu\text{l} / 2000 \mu\text{l})$$

$$\text{Nombre de carré} = 10$$

$$1 \text{ mm}^3 = 10^{-3} \text{ ml}$$

$$\text{Donc : Concentration du sperme} = \frac{\text{Nombre SPZ} \times 200}{10 \times 5 \times 10^{-4} \times 10^{-3} \text{ ml}} = \text{Nombre SPZ} \times 0,04 \times 10^9 \text{ SPZ/ml}$$

II-2-2- Protocol de réfrigération :

II-2-2-1- Milieux de réfrigération :

Trois (3) milieux de réfrigération ont été préparés. Chaque milieu est composé de 2 fractions A et B. La fraction A est commune pour les 3 milieux, elle est constituée de tris-acide citrique- fructose.

A l'aide d'une balance de précision à 2 chiffres, la pesée des produit se fait pour 100 ml d'eau distillée, la composition comprendra alors : 3,028g de Tris (hydroxy méthyle Amino-méthane), 1,70g d'acide citrique monohydrate et de 1,25 g de Fructose (LONE F.A *et al*, 2012). La fraction B comporte 15% de jaune d'œuf et des taux variables de glycérol (0%,5% et 10%).

Le tableau ci-dessous reprend la composition de chaque milieu :

Tableau 1: La composition des milieux de conservation.

	Fraction A	Fraction B	Volume total	Taux de jaune d'œuf	Taux de glycérol
Milieu de base (MB)	8.5ml de fraction A	1.5 ml jaune d'œuf + 0 ml glycérol	10 ml	15 %	0%
Milieu à 5% Glycérol (MG5)	8ml de fraction A	1,5 ml jaune d'œuf + 0,5 ml glycérol	10 ml	15 %	5%
Milieu à 10% glycérol (MG10)	7.5 ml fraction B	1.5 ml jaune d'œuf + 1 ml glycérol	10ml	15 %	10%

II-2-2-2- Conservation :

La semence a été divisée en 4 échantillons (0.2 ml de sperme) (tableau xx), chaque échantillon est dilué jusqu'à 2 ml: le 1^{er} est dilué avec 2 ml MB (EMBA) et il est laissé dans à température ambiante qui varie de 22°C à 27°C et les 3 autres échantillons sont conservés dans un réfrigérateur réglé à + 4°C : le 1^{er} est dilué avec le MB (EMBR), le 2^{ème} échantillon avec MG5 (EMG5) et le dernier avec MG10 (EMG10).

Tableau 2: Dilution et conservation des échantillons de la semence.

	Volume du sperme	Dilution	Température	Abréviation
Echantillon 1	0.2 ml	1.8 ml de Milieu de base (MB)	Ambiante (22-27 °C)	EMBA
Echantillon 2	0.2 ml	1.8 ml de Milieu de base (MB)	4°C	EMBR
Echantillon 3	0.2 ml	1.8 ml de Milieu de Glycérol 5% (MG5)	4°C	EMG5
Echantillon 4	0.2 ml	1.8 ml de Milieu de glycérol 10% (MG10)	4°C	EMG10

II-2-3- Protocol de congélation :

II-2-3-1- Dilution :

Nous avons dilué le sperme destiné à la congélation dans un milieu composant de Tris-acides citrique-glucose - Jaune d'œuf –glycérol. Tris (300mM=36,342g) D-glucose (27,8mM=5g) Acide citrique anyhydrate (94,7mM=18,19g), jaune d'œuf (15%) et Glycérol (5%) (LEAHY T *et al*, 2010) .Pour un 50ml de milieu de conservation il faut donc ; 1,82g (tris) + 0,25g (D-glucose) + 0,91g (Acide citrique) + 30ml de l'eau distillé + 7,5ml (15%jaune d'œuf) + 2,5ml (5%glycérol), puis compléter par de l'eau distillée jusqu'à 50ml. Nous avons agité le milieu jusqu'à la dissolution de tous ces composants.

II-2-3-2- Equilibration

Nous avons mis la semence dans la glacière réglée à 4°C pendant 2 heures (phase d'équilibration). Ceci permet au glycérol de pénétrer dans la cellule.

II-2-3-3- Conditionnement

Après la phase d'équilibration, la semence est conditionnée, par aspiration, dans les paillettes (0,25ml) (mini-tube).

Le bouchage des paillettes a été réalisé par la poudre de bouchage. Elle est composée de polyvinyle alcool (IMV). En contact avec le milieu de conservation, elle se solidifie. Ceci assure une étanchéité des paillettes.

II-2-3-4- Congélation :

Après le conditionnement, les paillettes ont été mises à 5cm au-dessus de l'azote liquide pendant 12 minutes. L'opération s'achève par l'immersion directe des paillettes dans l'azote liquide.

II-2-4- Evaluation de la semence après la conservation (réfrigération et congélation)

La mobilité individuelle est le premier paramètre qui permet d'évaluer la fertilité de la semence *in vitro*. De ce fait, nous nous sommes basés sur la mobilité individuelle pour évaluer nos échantillons. Ajouter à ce paramètre, nous avons réalisé le test hypo-osmotique (HOST) car il permet la mise en évidence de l'intégrité de la membrane des spermatozoïdes, et des spermatozoïdes morts et vivants.

Nous avons préparé, dans un premier temps, le milieu hypo-osmotique avant de réchauffer la semence, ce dernier est composé de (9g de fructose + 4,9g de citrate de sodium + 1l de l'eau distillée) (REVELL S.G *et al*, 1994). Dans un second temps, nous avons mis 20µl de semence dans un tube avec 200µl/100 mOsM de milieu hypo-osmotique (4 tubes correspondant aux 4 groupes de semence). Puis nous agitons les tubes et nous les laissons à 37 °C pendant une heure (MUSTAFA N.B *et al*, 2009).

Pour l'évaluation de mobilité individuelle ou de l'intégrité de la membrane, nous avons pris 10µl de chaque tube à l'aide d'une micropipette, puis nous avons observé entre lame et lamelle sous le microscope. Nous octroyons un pourcentage de mobilité individuelle pour chaque échantillon. Quant au HOST, le comptage se fait sur 200 spermatozoïdes.

L'évaluation de ces 2 paramètres de la semence réfrigérée est effectuée à 0h, 12h, 24h et 48h. Nous parlons du test de thermo-résistance c'est-à-dire l'évolution de ces paramètres en fonction du temps. Pour l'évaluation de la semence congelée, il faut d'abord décongeler les paillettes (3 secondes à température ambiante et 40 secondes dans une eau tiède à 37°C. Nous avons pris 2 paillettes comme échantillonnage pour faire les examens d'évaluation. Deux lectures pour chaque paramètre ont été réalisées, puis la moyenne est calculée

III- Résultats et discussion :

III-1- Résultats :

Nous avons préférés garder deux testicules sur sept, car la qualité de leur sperme répondait mieux aux conditions suivantes : un volume ≥ 0.5 ml, une mobilité massale ≥ 3 ; une mobilité individuelle $\geq 70\%$; une concentration du sperme $\geq 2 \times 10^9$ spermatozoïde /ml.

Le tableau suivant reprend de manière succincte les résultats obtenus pour les deux testicules gardés lors de notre expérimentation en fonction qu'ils soient destinés à la réfrigération ou à la congélation.

Tableau 3 : Résultats de l'examen macro et microscopique du sperme après la collecte

	Volume (ml)	Motilité massale (note)	Mobilité individuelle (%)	Concentration (10^9spz/ml)
Testicule destiné à la réfrigération	0,8	3,5	75	2
Testicule destiné à la congélation	0,6	4,5	90	2,4

III-1-1 Résultats après réfrigération de la semence :

III-1-1-1- La mobilité :

Tableau 4 : Résultats d'évaluation de la mobilité de la semence après réfrigération

	Température ambiante (22-27°C)	Réfrigération à + 4°C		
	EMBA%	EMBR % (contrôle)	EMG5%	EMG10%
Après 12 heures	57,5	72,5	57,5	45
Après 24 heures	8,5	57,5	47,5	35
Après 48 heures	4	57,5	27,5	7

III-1-1-2- Le HOST :

Tableau 5 : Résultats du test hypo-osmotique sur la semence après réfrigération.

	Température ambiante (22-27°)	Réfrigération à 4°C		
	EMBA%	EMBR % (contrôle)	EMG5%	EMG10%
Après 12 heures	72,42	78,8	77,27	59
Après 24 heures	61	75,55	76,2	56,66
Après 48 heures	5	57,7	57,6	38,77

III-1-2- Résultats après décongélation de la semence :

III-1-2-1- Mobilité :

Tableau 6 : Résultats d'évaluation de la mobilité de la semence après décongélation.

	Paillette 1	Paillette 2	Moyenne
Mobilité (%)	57,5	60	58,75

III-1-2-2- HOST :

Tableau 7 : Résultats du test hypo-osmotique sur la semence après décongélation.

	Paillette 1	Paillette 2	Moyenne
HOST (%)	44,33	44	46,17

III-2- Discussion :

Les spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme sont mobiles, matures et aptes à féconder les ovocytes (TOSHIMORI, 2003). Ces caractéristiques du sperme épидидymaire ont permis aux scientifiques d'envisager la sauvegarde post-mortem des sujets de haute valeur génétique ou des espèces menacées de disparition sous forme de banques de semence. De ce fait, et en vue d'établir un protocole de conservation conventionnel du sperme épидидymaire chez le bélier, différentes études ont été réalisées (KAABI *et al*, 2003 ; EHLING *et al*, 2006). Ces études se sont basées principalement sur la composition de milieux de réfrigération et de congélation.

Le présent travail se propose de nous permettre une meilleure maîtrise des techniques de collecte du sperme épидидymaire, de son évaluation, de sa réfrigération et de sa congélation. Pour ce faire, nous nous sommes penchés sur l'impact de la température

ambiante et celle de la réfrigération sur la qualité de la semence ainsi que l'effet de différentes concentrations de glycérol sur la qualité, post-réchauffement de la semence réfrigérée à +4°C.

III-2-1-Discussion de la méthodologie

III-2-1-1- Méthode de collecte

Deux techniques nous permettent de collecter le sperme épидидymaire, la technique dite « retrograde flushing » qui, basiquement, consiste en l'injection d'un volume connu de sérum physiologique via le canal déférent qui mettra en suspension le sperme épидидymaire, le tout sera récupéré depuis les incisions faites au niveau de la queue de l'épididyme (Álvarez M *et al*, 2012). La technique dite « Float-up » se base, quant à elle, sur l'immersion pendant 20 minutes dans du sérum physiologique, d'une queue épидидymaire préalablement incisée (SUHAIL SALAM MIR *et al.*, 2012).

TURRI *et al* en 2011 comparent entre les deux techniques de collecte chez les bovins et mettent en évidence de meilleurs résultats en termes de mobilité et de viabilité de la technique dite Retrograde flushing comparée à la technique dite Float-up. C'est ce qui a alimenté notre choix, dans notre expérimentation.

III-2-1-2- Choix des milieux de conservation

III-2-1-2-1- Milieu de réfrigération

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé le un milieu de réfrigération composé de Tris (hydroxy methylamino methane) à 3.028% (w/v), de fructose à 1.25% (w / v), d'acide citrique monohydrate à 1.70% (w/v) et de jaune d'œuf à 20% (v / v) dans de l'eau distillée. Le travail de Lone FA *et al* en 2012 compare différents milieux de réfrigération du sperme épидидymaire et démontre que le milieu précité offre un meilleur rendement en termes de viabilité et d'intégrité de l'acrosome, c'est ce qui a orienté notre choix quant au milieu à utiliser.

III-2-1-2-1- Milieu de congélation

Le milieu de congélation utilisé lors de notre expérimentation comporte les composants suivant : 300mM de Tris, 94.7mM d'acide citrique, 27.8mM de glucose, 15% (v/v) de jaune d'oeuf et 5% (v/v) de glycérols. Ce milieu a été utilisé et cité dans différentes

étude ayant traité de la congélation du sperme d'éjaculat (Leahy T *et al*, 2010 ; Eva Mocé *et al*, 2010).

III-2-1-3- Choix des paramètres d'évaluation de la qualité de la semence

En vue d'évaluer la qualité de la semence, qu'elle soit réfrigérée ou congelée, nous sommes référés au test d'hypo-osmotique qui renseigne de l'intégrité de la membrane, qui, bien évidemment doit être dépourvue de toute brèche, rupture ou de quelconque autre lésion, et à la mobilité individuelle, cette dernière étant le reflet de la fertilité selon les travaux de Saacke and White, 1972 et de Del Olmo E, 2013.

Contrairement à la congélation, la réfrigération est évaluée en fonction du temps d'exposition de la semence au froid (test de thermo-résistance), c'est ainsi que nous avons procédé à l'appréciation des 2 paramètres, cités plus haut, sur de la semence fraîche et diluée (h0) et de la semence soumise à la réfrigération pendant 12h, 24h, 48h. Il est à noter que le test de thermo-résistance est habituellement prolongé à h72, il s'avère que lors de notre expérimentation et au bout de 48h, l'effet délétère du froid et du glycérol étaient nettement visibles, c'est pourquoi nous nous sommes contentés de l'évaluation de la semence soumise à 48h de réfrigération.

III-2-2- Discussion des résultats après la réfrigération :

Tout au long de la durée de réfrigération (12h, 24h et 48h), la mobilité au même titre que la viabilité des spermatozoïdes étaient significativement plus élevées dans le lot contrôle EMBR (4°C) comparé à l'échantillon EMBA (T° ambiante) à 22°C, nos résultats viennent confirmer les observations de Paulenz *et al*, 2002

Le taux de spermatozoïdes gonflés est significativement plus élevé dans l'échantillon EMBR que dans les autres échantillons, ce qui reflète une intégrité de la membrane des spermatozoïdes et donc leur vie.

Au cours de la période de réfrigération, la mobilité a une dynamique spécifique, influencée par le taux de dilution et par la concentration en glycérol (MICLEA V., *et al*, 2010). La mobilité des spermatozoïdes est plus élevée dans le lot EMG (5% de glycérol) comparée à l'échantillon EMG (10% de glycérol), puis elle descend plus vite dans les deux échantillons.

Au bout de 48 heures de réfrigération à 4°C, la mobilité est presque absente dans le lot EMG (10%). Le taux de spermatozoïdes vivants observé dans le lot EMG 5% est plus élevé comparé à celui constaté dans le lot EMG 10%. Ce qui laisse penser qu'il y a un effet négatif de la concentration élevée de glycérol sur la qualité de la semence, surtout de celle de l'échantillon EMG (10%) que dans l'échantillon EMG (5%), ces observations viennent corroborer celles rapportées par MORRIER A., *et al*, 2002 et MICLEA V., *et al*, 2010.

Il est à noter cependant que la diminution de la température de 37°C jusqu'à 4°C ne provoque pas une diminution significative de la mobilité des spermatozoïdes dans l'échantillon EMBC, alors que dans l'échantillon EMBA la température a un effet néfaste sur la mobilité des spermatozoïdes.

III-2-3- Discussion des résultats après la congélation :

Il est bien connu que le processus de congélation-décongélation cause des dommages de manière significative sur les spermatozoïdes, mais les mécanismes exacts à l'origine de ces blessures ne sont loin de faire l'unanimité.

Le taux de dilution du sperme est un facteur déterminant de la réussite de la cryoconservation, mais rares sont les sujets qui ont traité des taux de dilution optimaux de la semence chez le bélier avant la congélation, nous ne sommes pas en mesure (Phillips *et al*, 2004).

Le taux de dilution est généralement adapté pour produire un conditionner un nombre standardisé de spermatozoïdes par dose d'insémination ou simplement basé sur le nombre des femelles à inséminer par un éjaculat (Salamon *et Maxwell*, 2000). Les faibles taux de dilution sont utilisés probablement pour éviter « l'effet de dilution », qui est décrit par MANN en 1964, qui cause une perte de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes après dilution. On pense que ce phénomène est dû à une diminution des cryoprotecteurs (Harrison *et al*, 1982).

Dans notre expérience sur la congélation-décongélation, la dilution avec le milieu Tris-acide citrique-glucose-glycérol (5%), montre une mobilité individuelle des spermatozoïdes après congélation-décongélation avoisinant en moyenne les (58,75%), avec un taux des spermatozoïdes vivants de (46,67%). Ce qui montre qu'il y a un effet rapide et très délétère du froid sur la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes. Cela peut être dû à une sensibilité accrue des spermatozoïdes décongelés au stress par rapport aux spermatozoïdes

frais, ainsi que d'une plus grande différence de pression osmotique lors du processus de congélation-décongélation.

Les dommages au cours de la congélation de la semence altèrent les fonctions des spermatozoïdes chez le bélier, cette dernière réduit sa capacité à s'adapter aux changements de l'environnement (Salamon et Maxwell, 1995_a). Le stress osmotique a été réduit par la dilution des spermatozoïdes pour permettre l'ajustement osmotique entre les composants intracellulaires et extracellulaires. Le stress osmotique peut être dû à une forte diminution de la concentration en glycérol (LEAHY T., *et al*, 2010).

Selon MARCIANE D.S.M., *et al*, 2009, l'ajout des suppléments antioxydants Trolox et catalase dans le milieu Tris-jeune d'œuf améliore la viabilité des spermatozoïdes et dans une moindre mesure la mobilité après décongélation de la semence chez le bélier. Cependant ils ont montrés qu'il faut toujours vérifier la concentration de ces deux antioxydants.

**CONCLUSIONS ET
RECOMMANDATIONS**

Conclusions et recommandations :

Nous concluons, d'après ce travail, que la conservation de la semence fraîche (T° ambiante) issue de l'épididyme du bélier ne doit pas dépasser les 24 h. Ceci limite l'application de l'insémination artificielle sur le terrain.

La réfrigération de la semence permet de sauvegarder de bonne qualité de semence au moins 48 h après la collecte. La conservation de la semence épидидymaire chez le bélier permet d'appliquer l'insémination artificielle dans un intervalle du temps de 48 h.

Nous concluons aussi que la présence de glycérol dans le milieu de réfrigération diminue la mobilité de la semence et ce surtout à des concentrations élevées (10%). Pour cela, il est déconseillé d'utiliser des milieux de congélation contenant le glycérol comme un milieu de réfrigération. De plus, d'autres études s'avèrent nécessaires pour prouver l'effet délétère du glycérol à des concentrations minimales sur la semence.

En fin, la congélation du sperme épидидymaire permet de sauvegarder de semence des béliers d'élite abattus ou morts. Elle permet aussi de préserver des races en voie de disparition. Nos résultats en termes de mobilité et de HOST de la semence décongelée sont recommandés pour l'IA par voie chirurgicale plutôt que cervicale, pour cette dernière, (dépôts de semence exo-col), elle nécessite d'autres études pour avoir une meilleure qualité de semence décongelée tel que le rajout des antioxydants au milieu de congélation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

A

AGNIESZKA P., WOJCIECH N., MALGORZATAOCHOTA., (2012). *Methods of Assessment of Cryopreserved Semen, Current Frontiers in Cryobiology*, <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen>.

ANNIK BOUOCHE-LACOMBE., (2001). *Biotechnologie de la reproduction chez les mammifères et l'homme*. Vocabulaire Anglais-français. INRA édition, 32P.

ARRIOLA J., FOOTE R.H., (1987). *Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extender*. J. Dairy Sci, 70, 1664-1670.

ASHER G.W., FISHER M.W., FENNESSY P.F., MACKINTOSH C.G., JABBOUR H.N., MORROW C.J., (1993). *Oestrus synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed deer (Cervus elaphus) and fallow deer (Dama dama)*. Anim. Repro. Sci, 33, 241-265.

AWAD M.M., (2011). *Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity*. Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Suez Canal University, Ismailia 41522, Egypt. 164–168.

B

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

BARONE, R., (1978). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Editions Vigot frères – Tome 3. LYON, 851p.

BECONI M.T., FRANZIA C.R., MORA N.G., AFFRANCHINO M.A., (1993). *Effect of natural antioxydants on frozen bovine semen preservation*. Thriogeniology, 40, 841-851.

BEDEL-PICHON M., (1996). *Amélioration de la technique de congélation du sperme de chien: intérêt de la glutamine.* Mémoire de DEA de Bio-Agro, Rennes, 1996.

BESTER, N., (2006). *Effect of different dietary energy levels on productive and Reproductive traits in Dorper rams.* Magister Scientiae Agriculturae. University of the Free State. Bloemfontein, 175 P.

BONNES, G., DESCLAUDE, J., DROGOUL, C., GADOUD, R., JUSSIAU, R., MONTMEAS, L., ET AL., (2005). *Reproduction des animaux d'élevage.* Educagri édition, deuxième édition, 407 P.

BOUKHLIQ, R., (1993). *Rôles de la photopériode et de la nutrition dans le contrôle de la fonction de reproduction chez le mouton.* Thèse pour le diplôme Ph D de l'université of western Australia (Résumé de la thèse).

C

CHAUHAN M.S., ANAND S.R., (1990). *Effect of egg yolk lipids on the freezing goat semen.* Theriogenology, 34, 5, 1003.

CHOUDHRY T.M., BERGER T., DALLY M., (1995). *In vitro fertilization evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility.* Theriogenology, 43, 1195-1200.

COLAS G., (1975). *Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen.* Repro. Fert, 42, 277-285.

COLAS, G., (1980). *Variation saisonnière de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I - Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale.*

COLAS, G., PERSONNI, D., COUROT, M., ORTAVANT, R., (1975). *Influence du rythme de la récolte sur la production de spermatozoïdes chez le jeune bélier Romanov.* Ann. Zootech., 24, 189-198.

COURBIÈRE B., BAUDOT A., MAZOYER C., SALLE B., LORNAGE J. (2009). *La vitrification : technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne. Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites.* Gynécologie Obstétrique & Fertilité 37,803–813.

D

DADOUNE, J-P., DEMOULIN, A., (2001). *Structure et fonction du testicule.*

In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme, 756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.

DE LAS HERAS M.A., VALCAECCEL A., FURNUS C., PEREZ L., MOSES M., BALDASSARRE H., (1996). *Changes in sperm bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by microscopy.* Anim. Repro. Sci, 45, 81-86.

DHAMI A.J., SAHNI K.L., MOHAN G., (1992). *Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep freezing of Bos Taurus Bos bubalis semen.* Theriology, 38, 565-574.

DHAMI A.J., SAHNI K.L., (1993). *Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa.* Theriogenology, 40, 1269-1280.

DHAMI A.J., SAHNI K.L., (1994). *Role of different extender and additives in improving certain biological indices of frozen bull and buffalo semen.* Indian Vet. J, 71, 670-677.

DOUET, D-G. N., (2000). *Congélation de sperme de mammifères, application aux antilopes.* Thèse Docteur vétérinaire. Ecole nationale de Nantes 111P.

DRUART. X, Y. GUÉRIN, J.-L. GATTI, J.-L. DACHEUX., (2009). *Conservation de la semence ovine.* Inra Prod. Anim,22 (2), 91-96.

E

EDUARDO V.F., JOSE JIMENEZ R.M., MENDOZA E., LOPEZ, J.C., (2003). *Technicien en élevage.*

Editions Cultural, S.A Tome2, MADRID – Espagne, 226 p.

EHLING C., RATH D., STRUCKMANN C., FRENZEL A., SCHINDLER L., NIEMANN H., (2006) *Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds.* Theriogenology 66, 2160–2164.

EILTS B.E., (2004). Male Theriogenology: Semen Evaluation. [Web]: http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/male_index.htm. (05-05-2011).

F

FENNESSY P.F., MACKINTOSH C.G., SHACKELL G.H., (1990). *Artificial insemination of farmed red deer.* Anim. Prod. 51, 613-621.

FERNANDEZ J., (2003) *In : Technicien en élevage.tome1.* Cultural S.A. (Espagne), 232p.

FRANCOIS CASTONGNON., PH.D., (2010). *La reproduction chez les ovins.* Chercheur en production ovine, agriculture et Agroalimentaire Canada.

FULLER B., PAYNTER S. (2004). *Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine.* Reproductive BioMedicine Online Vol 9. No 6. 680-691.

G

GILLES, R., ANCTIL, M., BAGUET, F., CHARMANTIER, M., CHARMANTIER,

GORDEN I., (1997). *Controlled reproduction in sheep and goats.* International, 2, 450p.

GORDEN I., (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals.* Professor Emeritus Department of Animal Science and Production University College Dublin Ireland.

GRAVANCE C.G., WITH C., ROBERTSON K.R., CHAMPION Z.J., CASEY P.J., (1997). *The effects of cryopreservation on morphometric dimension of caprine sperm heads.* Anim. Repo. Sci, 49, 37-43.

GUILLOT J., (2002). *La calcification testiculaire chez les boucs de centres d'insémination artificielle : étude clinique et répercussion sur la reproduction de semence.* Thèse Docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire Toulouse 113P.

H

HAFEZ E.S.E., (1974). *Reproduction in farm animals*. 3ème édition. *Lea et Fabiger*, 480p.

HALLER O., CHEMINEAU P., CORTEEL J.M., (1980). *In vitro survival and fertilizing ability of goat epididymal semen*. Ninth International Congress on Animal reproduction and Artificial Insemination, Spain, Madrid, 16-20 june, 3 (Symposia).

HALBERT, G.W., DOBSON, H., WALTON, J.S., AND BUCKRELL, B.C. (1990). *The structure of the cervical canal of the ewe*. *Theriogenology*, 33(5):977-992.

HARRISON R.A.P., DOTT H.M., FOSTER G.C., (1982). *Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect"*. *J. Exp. Zool.* 222, 81–88.

HOLT W.V., (2000). *Basics aspects of frozen storage of semen*. *Animal Reproduction science* 62, 3-22.

I

IQBAL M.J, TOMAR N.S., (1989). *Studies on the efficacy of certain additives and method of glycerolisation for deep freezing of zebu and buffalo bull semen*. *Indian vet. J.*, 66, 3, 237-242.

J

JEYEDRAN R.S, HUNTER A.G., (1980). *Properties of bovine seminal plasma; egg yolk protein interaction complex formed during cryopreservation*. *Ninth International Congress on Animal reproduction and Artificial insemination*, Spain, Madrid, 16-20 june, 5 (Symposia), 375.

JIMENEZ C.F., (1987). *Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and post-thaw motility of equine epididymal spermatozoa*. *Theriogenology*, 28, 6, 773-782.

JOHN G.D., GLYN N.S., (2007). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512. 42 P.

JONDET R., RABADEAUX Y., JONDET M., (1980). *Observation on freezability of bull ejaculates using a two step freezing procedures*. Ninth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Spain, Madrid, 16-20 June, 5(Symposia), 389.

K

KAABI M., PAZ P., ALVAREZ M., ANEL E., BOIXO J.C., ROUSSI H., HERRAEZ P., ANEL L., (2003). *Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem*. *Theriogenology* 60, 1249–1259.

KAABI M., ALVAREZ M., ANEL E., CHAMORRO C.A., BOIXO J.C., DE PAZ P., AND ANEL L. (2006). *Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study*. *Theriogenology*, 66(8):1876-1883. Karaca F., Tasal, I., and Alan, M. (2009). Prelim

L

LABBÉ C., BLESBOIS E., LEBOEUF B., MARTORIATI A., GUILLOUET PH., STRADAIOLI G., MAGISTRINI M., (2003). *Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques : protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes*. Les Actes du BRG, 4 (2003) 143-157 © BRG, 2003, Article original.

LACROIX, M., (1976). Circuit physique de la semence ovine, 81-93 pp. *In Insémination artificielle ovine Editions SEARLE-PARIS, 105 P.*

LEAHY T., MARTI J.I., MENDOZA N., PEREZ-PE R., MUINO-BLANCO T., CEBRIAN-PEREZ J.A., EVANS G., MAXWELL W.M.C., (2010). *High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa*. *Animal Reproduction Science* 119, 137-146.

LONE F.A., ISLAM R., KHAN M.Z., SOFI K.A., (2012). *Effect of different egg yolk-based extenders on the quality of ovine cauda epididymal spermatozoa during storage at 4°C.* *Repro. Dom. Anim* 47, 257-262.

M

MANN T., (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Methuen and Co. Ltd., London.

MARTIN J.C., KLUG E., GUNZEL A.R., (1979). *Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw.* *J. Repro. Fert, suppl* 27, 47-51.

MAXWELL W.M.C., LANDERS A.J., EVANS G., (1995). *Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straw, and minitubes.* *Theriogenology*, 43, 1201-1210.

MAZUR P., (1980). *Fundamental of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos.* Ninth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Spain, Madrid, 16-20 june, 1(Plenary sessions), 99-114.

MC KAY G.W. (1991). *Anatomie du tractus génital, récolte de la semence. Manuel technique de l'insémination artificielle bovine.* Association Canadienne des éleveurs de bétail, Ontario (CANADA) pp 33-41.

MICHELAT J., CHAUVIER G., (1974). *Encyclopédie Vétérinaire.* Editions Vigot Frères-Tome2. PARIS, 767 p.

MICLEA V., DASCĂL-CIORNEI A., ZĂHAN M., DASCĂL-CIORNEI V., MICLEA I., (2010). *The influence of the dilution rate and glycerol concentration on ram semen preservation.* University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Biotechnologies, 3-5 Manastur Street, 400372 Cluj-Napoca, Romania.

MOLINA F.C., EVANS G., MAXWELL W.M.C., (1994). *Effect of polyols on the post thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa.* *Theriology*, 42, 15-23.

MOLINA F.C., EVANS G., QUINTANA-CASARES P.I., MAXWELL W.M.C., (1994). *Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa.* *Anim. Repro. Sci*, 36, 2, 113-122.

MOMON M.A., OTT R.S., (1981). *Methods of semen preservation and Artificial insemination in sheep and goats.* World Rev. Anim. Prod, 17, 1, 19-25.

MONFORT S.L., ASHER G.W., WILDT D.E., WOOD T.C., SHIEWE M.C., WILLIAMSON L.R., BUSH M., RALL W.F., (1993). *Successful intrauterine insemination of Eld's deer (Cervus eldi thamin) with frozen-thawed spermatozoa.* J. Repro. Fertil, 99, 459-465.

MONTANE., BOURDELLE., BRESSOU., (1978). *Anatomie régionale des animaux domestiques, fascicule II Ruminants.* 2^{ème} Edition J. B. BAILLIERE- PARIS.

MORRIER A., CASTONGUAY F., BAILEY J.L., (2002). *Glycerol addition and conservation of fresh and cryoconserved ram spermatozoa.* Canada journal of animal science. Recieved 18 May 2001, accepted 16 March 2002.

MUSTAFA N.B., PURHAN B.T., SERPIL S., PINAR A.U., (2009). *Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thaw ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxydant activities.* Small Ruminant research 81, 13-17.

MUSTAFA NUMAN BUCAK., PÜRHAN BARBAROS TUNCER., SERPIL SARIÖZKAN., PINAR ALKIM ULUTAS., (2009). *Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities.* Small Ruminant Research (81) 13–17.

N

Naqvi S.M., Pandey G.K., Gautam K.K., Joshi,A., Geethalakshmi V., and Mittal, J.P.

(2005). *Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds.* Anim. Reprod. Sci., 85(3-4):337-344.

NIEMANN H., SACHER B., ELSAESSER F., (1985). *Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryo.* Theriogenology , 23, 631-639.

P

PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J., (1996). *Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances.* Biotechnology Advances, Vol. 14, No. 2, 127-149.

PAULENZ H., SODERQUIST L., PEREZ PE.R., BERG K.A., (2002). *Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.* Theriogenology 57, 823–836.

PEQUEUX G.A., (2006). *Physiologie animale.* Edition De Boeck et Larciens. a., 677P.

PHILLIPS N.J., EVANS G., MCGOWAN M.R., (2004). *Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres.* Aust. Vet. J. 82, 309–310.

PILCH J., (1980). *Observation of the influence of sub-zero temperatures (-12 to -80°C) on bull semen motility after thawing.* Ninth international Congress on Animal reproduction and artificial insemination, Spain, Madrid, 16-20 June, 5(Symposia), 379.

R

REVELL S.G., MRODE R.A., (1994). *An osmotic resistance test for bovine semen.* Animal Reproduction Science 36, 77-86.

ROWEN D.F., LEE WILKE W., ANNA D., (2009). *Anatomy and physiology of farm animals 7th edition.*

RUCKEBUSCH Y., (1981). *Physiologie pharmacologie thérapeutique.* Maloines. a., éditeur, 611P.

S

SAGOT L., (2009). *Conduite de la reproduction. Insémination animale : du bélier à la paillette.* Institut de l'élevage- CIIRPO. INRA Paris.[Web]:www.inst-elevage.asso.fr. (06/05/2011). *Reprod. Nutr. Dévelop*, 20, 1789-1799.

SALAMON S., MAXWELL W.M.C., (1995a). *Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.* Anim. Reprod. Sci. 37, 185–249.

SALAMON S., MAXWELL W.M.C., (2000). *Storage of ram semen.* Anim. Reprod. Sci. 62, 77–111.

SCHIEWE M.C., BUSH M., DE VOS V., BROWN J.L., WILDT D.E., (1991). *Semen characteristics, sperm freezing and endocrine profiles in free-living wildebeest (Connochaetes taurinus) and greater kudu (tragelaphus strepsiceros).* J. Zoo Wild. Med, 1, 58-72.

SERGEY I. MOSKOVITSEV., CLIFFORD L., LIBRACH., (2013). *Methods of Sperm Vitality Assessment.* Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 927, DOI 10.1007/978-1-62703-038-0_2, © Springer Science+Business Media, LLC.

SHANNON P., (1978). *Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle.* J. Repro. Fert, 54, 2, 519-527.

SHMSUDDIN M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., (1994). *A simple, non-traumatic swim-up method for selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine.* Anim. Reprod. Sci, 36, 61-75.

SILVERTHORN D.U., OBER W.C., GARRISON C.W., SILVERTHORN A.C., JOHNSON B.R., (2007). *Physiologie humaine. Une approche intégrée.* Pearson education France, 976 P.

SIMON A., (1997). *Intérêt de la glutamine en congélation de semence bovine.* Mémoire de DEA de Biologie et Production animale, Rennes 1.

SINGH M.P., SINHA A.K., SINSH B.K., (1995). *Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa.* Theriogenology, 43, 1047-1053.

SOLTNER D., (1993). *La reproduction des animaux d'élevage.* Editions : Collection Sciences et techniques agricoles, tome 1, 232 p.

SZUMOWSKY P., MARKOVIC B., CANO A., (1956). *Le lait écrémé en poudre pour la dilution et la congélation du sperme de Bélier.* Réc. Méd. Vét, 124-134.

T

TOSHIMORI K., (2003). *Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue.* Microsc Res Tech 61,1–6.

TRIMECHE A., YVON J.M., VIDAMENT M., PALMER E., MAGISTRINI M., (1999). *Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa.* Theriogenology, 52, 1, 181-191.

U

UPRETI G.C., OLIVER J.E., DUGANZICH D.M., MUNDAY R., SMITH J.F., (1995). *Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1).* Anim. Repro. Sci, 37, 143-157.

V

VAISSAIRE J.P., (1977). *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires.* Editions Maloine S.A, éditeur PARIS, 457 p.

VALDIVIA M.E., (2013). *Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing.* Biology Faculty, Animal Reproductive Physiology Laboratory, Antonio Raimondi Biological Sciences Research Institute, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Av. Venezuela cda. 34, Lima, Peru. Livestock Science (152) 94–99.

VASQUEZN J.H., NUNEZ V.H., FLORENTINI E.A., GONZALES J.M., CAMARGO VOELKEL S.A., HU Y.X., (1992). *Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos.* Theriogenology Vol. 37 No. 1 23-37.

VOELKEL S. A., HU Y. X., (1992). *Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed Embryos to recipient females.* Theriogenology 37:687-697.

W

WHITE I.G., CHOW P., QUINN P.J., (1980). *Role of phospholipids in protecting spermatozoa from cold shock.* Ninth international Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Spain, Madrid, 16-20 june, 5 (Symposia), 371.

Annexes :



Annexe 01 : Citrate de sodium (cliché personnel).



Annexe 02 : Acide citrique (cliché personnel).



Annexe 03 : Lactose (cliché personnel).



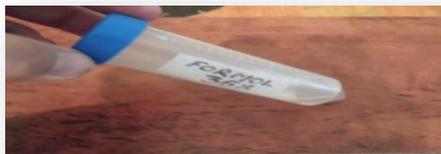
Annexe 04 : Fructose (cliché personnel).



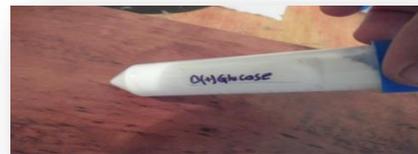
Annexe 05 : Tris (cliché personnel).



Annexe 06 : Glycérol (cliché personnel).



Annexe 07 : Formol 35% (cliché personnel).



Annexe 08 : D (+) Glucose (cliché personnel).



Annexe 09 : Paillette (0,25ml) (cliché personnel).



Annexe 10 : Poudre de bouchage (polyvinyle alcool) (cliché personnel).



Annexe 11 : Pipette graduée
(cliché personnel).



Annexe 12 : Micropipette
(cliché personnel).



Annexe 13 : Pipette pasteur
(cliché personnel).



Annexe 14 : Cellule Malassez (cliché personnel).



Annexe 15 : Lames et lamelles (cliché personnel).

Résumé :

Notre objectif de cette étude est d'appliquer les techniques de congélation (-196°C) et de réfrigération (+4°C) d'une part et d'autre d'apprécier l'effet de glycérol sur la semence réfrigérée issu de l'épididyme du bélier.

De ce fait, nous avons collecté du sperme épидидymaire chez le bélier en utilisant la méthode retrograde flushing. Concernant la réfrigération, 4 échantillons ont été dilués en milieu de base (Tris- Acide citrique- Fructose-jaune d'œuf), 1^{ier} laissé à la température ambiante, les 3 autres sont mis à (+4°C). Nous avons rajouté aux 3^{ème} et 4^{ème} échantillons 5% et 10% de glycérol respectivement. Nous avons évalué la mobilité et l'intégrité de la membrane des 4 échantillons et ce chaque 0h, 12h, 24h et 48h. Quant à la congélation, la semence est diluée dans le milieu de congélation (Tris-Acide-Citrique-Glucose- jaune d'œuf) contenant 5% de glycérol. Nos résultats montre que la température ambiante ne sauvegarde la qualité de la semence épидидymaire que 12h (Mobilité : 57.5% ; Le HOST : 72.42%). De plus, la réfrigération permet de garder la qualité utilisable de semence au moins 24h (Mobilité 57.50% ; Le HOST : 72.55%). La présence de glycérol dans le milieu de réfrigération a un effet néfaste sur la qualité de semence, surtout à la concentration 10%, (A 48h : Echantillon 2 (0%) glycérol ; La mobilité = 57.50% ; Le HOST : 57,50%), Echantillon (5%) : La mobilité =27.50%, Le HOST= 57.60%, Echantillon (10%) : La mobilité =7,00% Le HOST : 38.77%). Les résultats de la décongélation sont acceptable surtout si la semence est réservée pour l'IA par la laparotomie (Mobilité =58.75%, Le HOST= 44.17%). Nous concluons que la présence de glycérol dans les milieux de réfrigération influe négativement sur la qualité de semence.

En fin, d'autres études de l'effet de glycérol sur l'intégrité de l'acrosome et celle de l'ADN de la semence réfrigéré s'avèrent nécessaire.

Mots clefs : bélier, épидидyme, semence, réfrigération, congélation, glycérol.

Abstract:

The aim of this study is to apply the techniques of freezing at (-196°C) and refrigerating at (+4 ° C) and to assess the effect of glycerol on the chilled semen from the epididymis ram.

Therefore, we collected epididymal sperm from rams using the retrograde flushing method. Concerning the refrigeration, 4 samples were diluted in basal medium (Tris-citric acid-fructose-egg yolk), 1st left at area temperature, the other 3 were set to +4 ° C. We added to the 3rd and 4th samples 5% and 10% glycerol, respectively. We evaluated the mobility and membrane integrity of the four samples each 0h, 12h, 24h and 48h. As for freezing, semen is diluted in freezing medium (Tris-Citric Acid, Glucose and egg yolk) containing 5% glycerol. Our results show that the ambient temperature saves the usable quality of the epididymal semen only 12h (Mobility=57.5% The HOST= 72.42%). In addition, refrigeration keeps the usable quality seed at least 24 hours (Mobility =57.50% The HOST= 75.55%).The presence of glycerol in the cooling medium has a detrimental effect on the quality of seed, especially at a concentration of 10% (A 48: Sample 2 (0%) glycerol: Mobility :57.50% The HOST =57,50 %), sample (5%): mobility = 27.50%, The HOST=57.60%, sample (10%): mobility =7.00% The HOST= 38.77%). The results of thawing are acceptable especially if the semen is reserved for AI by laparotomy (Mobility = 58.75% The HOST = 44.17%). We conclude that the presence of glycerol in the media refrigeration adversely affects the quality of semen.

Finally, other studies of the effect of glycerol on the integrity of the acrosome and the DNA of the refrigerated semen are required.

Key words: rams, epididymis, semen, refrigeration, freezing, glycerol.

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تطبيق تقنيات التبريد (+4°C) والتجميد (-196°C) وأيضا رؤية مدى تأثير الغليسيرول على مني الكباش المستخرجة من الإبيديديم وذلك بعد التبريد.

لهذا قمنا باستخراج المنى بطريقة الريتروغراد فلوشين (الاستخراج العكسي). للقيام بعملية التبريد قمنا بتحضير أربع عينات من المنى بعد تمييزها في وسط (تريس-حمض السيترليك-فريكتوز- مخ البيض). من ثم قمنا بترك العينة الأولى في درجة حرارة (22°C-27°C) الثلاث عينات المتبقية في درجة حرارة تعادل (4°C). إلى جانب أننا أضفنا إلى العينتين الثالثة والرابعة نسبتيين من الغليسيرول (5% , 10%) على التوالي و قمنا بتقييم كلا من حركة النطفة و سلامة الغشاء في جميع العينات و هذا في الأوقات التالية عند (0ساعة, 12ساعة, 24 ساعة و 48 ساعة). أما بالنسبة لتطبيق عملية التجميد, حضرنا وسط التمييز المكون من (تريس-حمض السيترليك-غلوكوز-مخ البيض) وأضفنا له الغليسيرول بنسبة 5%. نتائجا تبين أن العينة الأولى لم تحافظ على جودة النطاف فقد أظهرت بعد 12 ساعة من التبريد (حركة النطفة = 57,50%) و (HOST : 72,55). في حين أن العينة الثانية حافظت على جودة النطاف لمدة 12 ساعة ; (حركة النطفة=57.5%) و (HOST= 72.42%). إن وجود الغليسيرول في كل من العينتين الثالثة والرابعة لديه تأثير سلبي على جودة النطاف. بعد 24 ساعة من التبريد أظهرت العينة الثانية (حركة النطفة= 57.50%) و (HOST= 72.42%) بعد 48 ساعة من التبريد أظهرت العينة الثانية (حركة النطفة= 57.50%) و (HOST= 57,50 %) العينة الثالثة (حركة النطفة=27.50%) و (HOST= 38.77%) أما العينة الرابعة أظهرت (حركة النطفة=7.00%) و (HOST= 38.77%). إن وجود الغليسيرول في وسط التبريد يؤثر سلبا على جودة النطاف المحفوظة .

في النهاية هنالك دراسات حول مدى تأثير الغليسيرول بعد عملية التبريد على رأس النطفة كذا ال ADN.

كلمات مفتاحية: كباش, الإبيديديم, نطاف تجميد, تبريد, غليسيرول