

**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**

**THEME :**

**CONSERVATION À COURT TERME  
DE LA SEMENCE OVINE**

**QUEL CRYOPROTECTEUR UTILISER ?**

**Présenté par :**

**AMARI *Fella*  
BEDRANI *Nassima*  
YAKOUB *Fatma-Zohra***

**Devant Le jury composé de :**

<b>Dr LAMARA A.</b>	<b>Maitre de conférences A</b>	<b>ENSV Alger</b>	<b>Président</b>
<b>Dr IDRES T.</b>	<b>Maître assistant A</b>	<b>ENSV Alger</b>	<b>Promoteur</b>
<b>Dr BENHENIA K.</b>	<b>Attaché de recherche</b>	<b>CRBt Constantine</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Dr BOUDJELABA S.</b>	<b>Maître assistant A</b>	<b>ENSV Alger</b>	<b>Examinateur</b>

***Année universitaire : 2014/2015***

## *Remerciements*

Au **Dr LAMARA** de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach, Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de soutenance.

Hommage respectueux.

Au **Dr IDRES**, de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'el Harrach, merci de nous avoir prêté main en acceptant de diriger ce mémoire, malgré les multiples occupations qui sont les vôtres. Votre ouverture d'esprit et surtout l'intérêt que vous portez à la science font de vous une source intarissable à laquelle tout étudiant devrait s'abreuver. Trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

Au **Dr BOUDJELABA** de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'el Harrach, pour sa collaboration au cours de l'élaboration de ce travail et qui a bien accepté de participer au jury de notre travail.

Hommage respectueux.

A Monsieur **Dr BENHENIA K**, du CRBt Constantine qui, malgré la distance, a accepté de porter un intérêt à notre travail en acceptant de participer au jury d'évaluation de notre travail.

Sincères remerciement.

Au personnel de la bibliothèque : Yacine, Ammi Messaoud...Merci beaucoup pour votre aide

# Dédicaces

*Ce travail n'aurait point pu se réaliser sans l'aide de Dieu qui nous a donné volonté, courage et surtout patience, puis celle de toutes les personnes qui y ont contribué de près et de loin.*

*A l'être qui est ancré dans mon cœur jusqu'à mon dernier souffle, qui nous a malheureusement quitté à **mon grand-père**, ton amour, ton éducation, tes conseils...que t'a vraiment tenu à nous inculquer se reflètent aujourd'hui...*

*A la personne ayant le don de dessiner le sourire sur le visage des autres, **Abd el Waheb AZZOUNE** t'es parti trop tôt mon très cher ami...*

*A ma chère **grand-mère** que dieu te préserve...*

*Aux deux piliers de ma vie ;*

***Papa**, une reconnaissance éternelle t'est portée pour tes encouragements qui m'ont construits et m'ont rendu confiante...**Maman**, ta tendresse et compréhension sont l'élixir de laquelle je ne cesserai de me désaltérer ...*

*A mon unique frère **Mehdi**...*

*A mes **deux chéries** qui grandissent si vite, je serai toujours à vos côtés, à mes sœurs **Narimene & Ikram**...*

*A mes **oncles** et **tantes** une pensée très particulière...*

*A mes **cousines** et **cousins** avec qui j'ai partagé mon enfance, je partage mon présent et je partagerai mon futur...je vous aime énormément...*

*A mes **meilleures amies** mes âmes sœurs de la vie, **ADSF**...*

*A mes **amis** avec qui j'ai partagé ces cinq ans de folie, des moments inoubliables nous ont réunis pour le meilleur et surtout pour le pire, vous êtes une seconde famille pour moi, tous mes vœux de bonheur et de réussite...*

*Le meilleur pour la fin, aux deux merveilleuses collaboratrices **Nassima & Sabrina** merci pour votre entendement et à la sérénité qui régnée lors du déroulement des faits, j'espère pouvoir voir vos rêves se concrétiser...*

**FELLA**

# Dédicaces

A la mémoire de notre ami **AZZOUNE ABELWAHEB** qui nous a quitté trop tôt,

Depuis le temps que vous attendiez ce moment, le voilà arrivé, **papa, maman**, à l'apogée de mes études je ne peux 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 mon frère **Sabri** et à ma sœur **Ahlam**,

A mes **cousines** qui avec elles j'ai partagé mon enfance et je partage mon présent et je partagerai mon future,

A ma copine depuis lycée la merveilleuse **Yamina**,

A mes coéquipières : **Fliflou (Fella)** qui sans toi je vois flou et à **Babina (Sabrina)** la meilleure de tous,

A **Sofia**, a **Mounia**, a **Wissame** (travail par la tête), à **Hassina (hachi)**, à **Hadjar**, à **Fella**, le meilleur des groupes de clinique, pour m'avoir supportée tout ce temps,

A **Karima (krimou)** et à **Amel (Kamel)** pour les moments qu'on a passés ensemble qu'ils soient mauvais qu'on a laissés derrière nous et que les bons qui sont encreés dans mon cœur,

A mes amis de l'École nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach (le groupe **Goumari**) : **Sami, Achraf, Aziz, Sifou, Ahmed, Zaki, Khero, Houssam, Haroun, Oussama, Adam, Tamime, Hamza, Mohammed, Yacine, Walid, Amine, Amire, Fahem** ... pour tous les bons moments passés ensemble et aux nombreux à venir,

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin,

A toute personne dont j'ai une place dans leur cœur, que je connais, que j'estime et que j'aime.

Pour vous tous, Merci.

**Nassima**

# Dédicaces

*Je dédie ce travail*

*A maman et papa en signe de reconnaissance de l'immense bien que vous avez fait pour moi, pour m'avoir donné la vie et la joie de vivre. Votre bonne éducation, vos conseils et vos bénédictions n'ont jamais fait défaut, Recevez à travers ce travail, toute ma gratitude et mes profonds sentiments. Que Dieu le tout puissant soit à vos côtés et vous accorde une meilleure santé (amen).*

*A ma petite sœur AMIRA avec tout mon amour.*

*A mes frères AMINE, KARIM, et WAHAB pour m'avoir soutenue, protégés et encouragés durant toutes ces années.*

*A mon cousin AMINE pour avoir contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*A tous mes amis, pour vos nombreux encouragements. Je me jouis d'avoir fait votre connaissance. Votre soutien a été indéniable.*

*A mes meilleures amies NASSOU et FLIFLOU avec les quelles j'ai partagé ces cinq belles années et que j'espère garder éternellement.*

*A mon directeur de mémoire, pour m'avoir accordée votre confiance.*

*Au moment d'écrire ces lignes, il est encore difficile de croire pour moi que cette étape de ma vie se termine. C'est avec une immense fierté et surtout, avec le cœur serein, que je tourne enfin la page.*

*Encore une fois, merci à tous.*

*Sabrina.*

# Liste des abréviations

<b>% :</b>	<b>Pourcent</b>
<b>°C :</b>	<b>Degré Celsius</b>
<b>15% :</b>	<b>15% de glycérol</b>
<b>5%:</b>	<b>5% de glycerol</b>
<b>ABP:</b>	<b>Androgen binding protein</b>
<b>AND:</b>	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
<b>ARN:</b>	<b>Acide ribonucléique</b>
<b>cc:</b>	<b>Centimeter cube</b>
<b>Cl :</b>	<b>Chlore</b>
<b>FSH:</b>	<b>Follicule Stimulating Hormone</b>
<b>g:</b>	<b>Gramme</b>
<b>GnRH:</b>	<b>Gonadotrophin releasing hormone</b>
<b>h:</b>	<b>Heure.</b>
<b>HHG:</b>	<b>Hypothalamo-hypophyso</b>
<b>HOST:</b>	<b>Hypo-Osmotic Swelling Test.</b>
<b>IA :</b>	<b>Insémination Artificiel.</b>
<b>JO:</b>	<b>Jaune d'œuf.</b>
<b>Kg:</b>	<b>Kilos gramme.</b>
<b>LH:</b>	<b>Luteinising Hormone</b>
<b>LDL :</b>	<b>Lipoprotéines</b>
<b>ml :</b>	<b>Millilitre</b>
<b>mn :</b>	<b>Minute</b>
<b>mOsm :</b>	<b>Milli-Osmol</b>
<b>n:</b>	<b>Nombre de chromosomes</b>
<b>pH :</b>	<b>Potentiel Hydrogène</b>
<b>réf :</b>	<b>Réfrigération</b>
<b>SPZ :</b>	<b>Spermatozoïdes</b>
<b>TRIS :</b>	<b>Hydroxy méthyle Amino-méthane</b>
<b>V:</b>	<b>Volume</b>

# Liste des figures

<b>Figure 01</b>	<i>Etapas de la spermatogénèse (d'après Vachret N .,)</i> .....	<b>04</b>
<b>Figure 02</b>	<i>Structure d'un spermatozoïde (Knobil E, Neill JD, 1988)</i> .....	<b>07</b>
<b>Figure 03</b>	<i>Régulation hormonale de la fonction sexuelle du bélier (Van Der et Coll 1975 ; Bonnes et al ., 2005 ; Silverthom et al ,2007)</i> .....	<b>11</b>
<b>Figure 04</b>	<i>Schéma du testicule et de l'épididyme</i> .....	<b>13</b>
<b>Figure 05</b>	<i>schémas explicite des différentes parties de l'épididyme. (cliché personnel)</i> .....	<b>13</b>
<b>Figure 06</b>	<i>testicule dénudé de sa vaginale</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure 07</b>	<i>Isolement de l'épididyme</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure 08</b>	<i>injection du liquide dans le canal</i> .....	<b>31</b>
<b>Figure 09</b>	<i>gonflement des canaux</i> .....	<b>31</b>
<b>Figure 10</b>	<i>récupération de la semence dans un eppendorf</i> .....	<b>32</b>
<b>Figure 11</b>	<i>préparation des eppendorfs</i> .....	<b>34</b>
<b>Figure 12</b>	<i>incision de la membrane vitelline et récupération du jaune d'œuf</i> .....	<b>34</b>
<b>Figure 13</b>	<i>passage de tous les milieux eu vortex</i> .....	<b>35</b>
<b>Figure 14</b>	<i>réfrigération des eppendorfs à 4°C</i> .....	<b>35</b>
<b>Figure 15</b>	<i>Sperme pur du premier testicule</i> .....	<b>36</b>
<b>Figure 16</b>	<i>Lame Malassez</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 17</b>	<i>Quadrillage Malassez</i> .....	<b>38</b>
<b>Figure 18</b>	<i>Modifications morphologique des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique (Jeyendran 1984)</i> .....	<b>39</b>
<b>Figure 19</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 0H</i> .....	<b>40</b>
<b>Figure 20</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 6H</i> .....	<b>41</b>
<b>Figure 22</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 18H</i> .....	<b>41</b>
<b>Figure 23</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 24H</i> .....	<b>42</b>
<b>Figure 24</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 36H</i> .....	<b>42</b>
<b>Figure 25</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 48H</i> .....	<b>43</b>
<b>Figure 26</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 56H</i> .....	<b>43</b>
<b>Figure 27</b>	<i>Graphes représentent l'évaluation à 72H</i> .....	<b>44</b>
<b>Figure 28</b>	<i>Graphes représentent les résultats du Milieu A</i> .....	<b>44</b>
<b>Figure 29</b>	<i>Graphes représentent les résultats du Milieu de réfrigération</i> .....	<b>45</b>
<b>Figure 30</b>	<i>Graphes représentent les résultats du à 5% de glycérol</i> .....	<b>45</b>
<b>Figure 31</b>	<i>Graphes représentent les résultats du Milieu à 15% de glycérol</i> .....	<b>46</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	<i>les différents calculs pour l'obtention d'un milieu avec une concentration connue.....</i>	<b>33</b>
<b>Tableau 02</b>	<i>composition des solutions utilisées.....</i>	<b>33</b>
<b>Tableau 03</b>	<i>Résultats de l'examen macroscopique du sperme après la collecte.....</i>	<b>36</b>
<b>Tableau 04</b>	<i>Résultats microscopique du sperme après la collecte.....</i>	<b>39</b>

# Sommaire

Introduction générale.....	01-02
<b>Partie bibliographique</b>	<b>03-29</b>
<b>Chapitre 01 : La reproduction chez les béliers</b>	<b>03-16</b>
I. Introduction .....	03
II. Physiologie de la reproduction chez le bélier.....	03
II.1. Siège, durée et productivité de la spermatogénèse .....	03
II.1.1. Spermatogénèse.....	03
II.1.2. La spermiogénèse.....	04
II.2. Facteurs d'altération de la formation des spermatozoïdes.....	05
II.2.1. Déficits gonadotropes.....	05
II.2.2. Troubles primitifs de la spermatogénèse.....	05
II.3. Structure du spermatozoïde.....	06
II.3.1. Anomalies structurales du spermatozoïde.....	07
II.4. Contrôle endocrinien de la spermatogénèse .....	08
II.4.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire.....	08
II.4.2. Les gonadotropines.....	09
II.4.2.1. Mécanisme d'action des gonadotropines.....	09
II.4.3. La testostérone.....	10
II.4.4. Les hormones des cellules de Sertoli : ABP et l'Inhibine...	10
II.4.5. L'hormone de la photopériode : la mélatonine.....	11
II.5. Epididyme.....	12
II.5.1. Conformation de l'épididyme.....	12
II.5.2. Physiologie de l'épididyme.....	13
II.5.2.1. Maturation des spermatozoïdes.....	13
II.5.2.2. Transport des spermatozoïdes.....	14
II.5.2.2.1. Durée du transit épидидymaire chez le bélier....	14
II.5.2.2.2. Mécanisme de transport des spermatozoïdes....	14
II.5.2.2.3. Variation du temps de transit des spermatozoïdes	14
dans l'épididyme.....	
II.5.3. Résorption des spermatozoïdes.....	15
III. Particularité de la reproduction chez le bélier.....	15
III.1. Saisonnalité de l'activité sexuelle.....	16
III.2. Traitement photopériodique.....	16
<b>Chapitre II : La cryobiologie, c'est quoi ?</b>	<b>17-25</b>
I. Introduction.....	17
II. Mode d'action du froid sur la cellule.....	17
II.1. Les altérations dues à l'action du froid sur les membranes.....	18

# Sommaire

III.	Conservation pour combien de temps.....	19
III.1.	Cryoconservation à court terme : Réfrigération.....	19
III.2.	Cryoconservation à long terme.....	20
III.2.1.	Définition de la congélation.....	20
III.2.2.	Congélation lente.....	20
III.2.2.1.	Seeding : l'induction de la cristallisation.....	21
III.2.3.	Vitrification.....	21
III.2.4.	Particularités de la conservation de la semence ovine....	22
IV.	Cryoprotection.....	22
IV.1.	Composition du milieu de dilution.....	22
IV.1.1.	Différents types de cryoprotecteurs .....	23
IV.1.1.1.	Cryoprotecteurs pénétrants.....	23
IV.1.1.2.	Cryoprotecteurs non pénétrants.....	23
IV.1.1.2.1.	Jaune d'œuf .....	23
IV.1.1.2.2.	Lait .....	24
IV.1.2.	Substances nutritives.....	24
IV.1.3.	Antibiotiques.....	25
IV.1.4.	Substances tampons .....	25
IV.1.4.1.	Le jaune d'œuf et le lait .....	25
IV.1.4.2.	TRIS .....	25

## Chapitre 3 : protocoles de réfrigération

I.	Introduction .....	27
I.1.	Les protocoles communément employés.....	27
I.1.1.	Conservation dans le lait .....	27
I.1.2.	Conservation à base de jaune d'œuf et des glucides.....	28
I.2.	Dilueurs commerciaux .....	28
I.2.1.	Triladyl® (Minitüb, Allemagne).....	28
I.2.2.	CAPROGEN® (LivestockImprovement, Nouvelle-Zélande) .....	28
I.2.3.	Bioxcell®.....	29
I.3.	Inconvénients des milieux commerciaux .....	29

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

I.	Objectif de l'étude et choix du cryoprotecteur.....	30
II.	Matériels et méthodes .....	30
II.1.	Collecte de la semence.....	30
II.2.	Calcul des dilutions à faire.....	32
II.2.1.	effectuer les calculs .....	32
II.2.2.	Préparation de l'échantillon de référence.....	33
II.3.	Composition des milieux.....	33
II.4.	Protocoles.....	34
II.4.1.	Milieu A.....	34
II.4.2.	Milieu de réfrigération.....	34
II.4.3.	Milieu à 5% de glycérol.....	35

**27-  
29**

**30-  
48**

# Sommaire

II.4.4. Milieu à 15% de glycérol.....	35
III. Résultats.....	36
III.1. Résultats de la collecte.....	36
III.1.1.Évaluation macroscopique.....	36
III.1.2. Évaluation microscopique.....	37
III.1.2.1. Motilité massale.....	37
III.1.2.2. Motilité individuelle.....	37
III.1.2.3. Concentration de la semence collectée.....	38
III.1.2.4. Test de viabilité hypo-osmotique (HOST).....	39
III.2.Résultats des essais .....	40
III.2.1. Résultats globaux.....	40
III.2.2. Résultats détaillés par milieu et discussion.....	44
IV. Discussion.....	47
IV.1. de la thématique de recherche .....	47
IV.1.1. De la technique de collecte.....	47
IV.1.2. Du choix des paramètres d'évaluation de la qualité de la semence.....	48
IV.1.3. Du choix des milieux de réfrigération .....	48
IV.2. Discussion des résultats après réfrigération .....	48
V. Conclusion générale.....	50
VI. Recommandations.....	51

# **Introduction générale**



## Introduction générale

L'insémination artificielle est l'une des biotechnologies de reproduction la plus largement utilisée, elle est considérée comme l'un des outils de diffusion génétique les plus performants. Elle fait partie des plus grandes innovations du monde agricole du début du 20<sup>ème</sup> siècle. Elle permet aux éleveurs à faibles revenus de s'affranchir des frais d'entretiens des géniteurs augmentant ainsi leur marge de bénéfice en diminuant les coûts de production.

L'insémination des reproductrices à l'aide de semences sélectionnées permet la transmission à leurs descendances des caractères sélectionnés et prisés notamment de précocité et de fertilité tant recherchées par l'éleveur. C'est indéniablement un moyen d'amélioration génétique.

Tant bien que mal, cette biotechnologie peine à se mettre en place en Algérie et les résultats d'essais sur le terrain publiés sont parfois discordants et il reste encore de nombreux problèmes à résoudre avant d'envisager l'application de cette technique dans nos conditions d'élevage.

De surcroît, la majorité des auteurs s'accordent pour dire que les paramètres descriptifs de la qualité de la semence de bélier présentent des variations saisonnières marquées. (*Catherine Element-Boulianne, 2012*), cela signifie que naturellement l'activité de leur reproduction serait limitée à une période de l'année.

Autrement dit, il existe une période d'activité sexuelle maximale qui s'étend, en général, d'août à janvier (jours courts) et une période d'activité minimum de février à juillet (jours longs). Les variations se manifestent, chez la femelle, par l'existence d'une période d'œstrus saisonnier (*Catherine Boivin ; 2007*) et chez les mâles par une diminution de la qualité de la semence qui se manifeste par une baisse du volume (*mandikiet al ; 1998, de Catherine Element-boulianne, 2012*), une diminution de la concentration spermatique (*karagiannidiset al ; 2000, de Catherine Element-boulianne, 2012*) et une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (*Colas 1980, de Catherine Element-boulianne, 2012*).

Afin d'assurer une disponibilité constante sur le marché des viandes, les éleveurs cherchent à étaler leur production durant toute l'année et couvrir les besoins en période de fêtes religieuses, pour cela, la congélation et la réfrigération de la semence ovine sont considérées comme étant les méthodes les plus appropriées venant à bout de ces contraintes.

La conservation de la semence dépend de plusieurs paramètres à savoir l'espèce, la température de stockage ainsi que le cryoprotecteur utilisé, ce dernier permet de lutter contre le

## Introduction générale

phénomène délétères de cristallisation de l'eau, cependant elle s'accompagnerait généralement d'une baisse du taux de fertilité (*Colas G., et al, 1968*).

L'intérêt de la réfrigération est de conserver pendant une durée précise le potentiel génétique d'un animal. Elle offre ainsi, la possibilité de le transmettre à la descendance.

Elle permet également de transporter la semence sur de longues distances et une dispersion des caractères génétiques recherchés sans pour autant faire déplacer les géniteurs, ce qui est particulièrement stressant pour l'animal et donc néfaste au bon déroulement de l'accouplement et de la fécondation.

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

L'objectif de ce travail est de perfectionner les techniques de conservation de la semence ovine et d'obtenir les meilleurs résultats possibles, en termes de qualité de la semence après réfrigération pour la race ovine locale.

***Premier chapitre***

***La Reproduction  
Chez Le Bélier***

## I. Introduction

L'activité sexuelle du mâle présente un caractère continu, contrairement à ce que l'on observe chez la femelle. Elle s'installe à la puberté et se maintient tout au long de la vie de l'animal. Cependant chez les espèces présentant une variation saisonnière de l'activité sexuelle (ovins, caprins), on constate lors de la période défavorable un ralentissement de la production des gamètes.

## II. Physiologie de la reproduction chez le bélier

### II.1. Siège, durée et productivité de la spermatogénèse

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes : la spermatogénèse et la spermiogénèse, qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme. La durée de la formation du spermatozoïde est variable selon les espèces on compte **54** jours pour le chien **74** jour chez l'homme **56** jour chez le taureau **48** jours chez l'étalon et pour le bélier c'est **40** jours.

#### II.1.1. Spermatogénèse

La spermatogénèse est une succession d'événements qui se produisent à l'intérieur des tubes séminifères et cela dès la puberté, elle se poursuit durant toute la vie et permet la production des gamètes mâles (n chromosomes), sous l'action de la LH (Luteinising Hormone) sur les cellules de Leydig et de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de Sertoli.

La lignée germinale de gamètes mâle est constituée de deux spermatogonies :

- ✓ **Spermatogonies Ad** : c'est les cellules souches (noyau sombre (dark), arrondi avec une chromatine finement granuleuse, vacuoles nucléaires) Elles se divisent et donnent des *spermatogonies Ap* (pâles) et des Ad pour le renouvellement.
- ✓ **Spermatogonies Ap** : (noyau pâle, ovalaire, avec une chromatine fine et dispersée, sans vacuole nucléaire). Donnent deux spermatogonies B qui s'engagent dans la spermatogénèse.

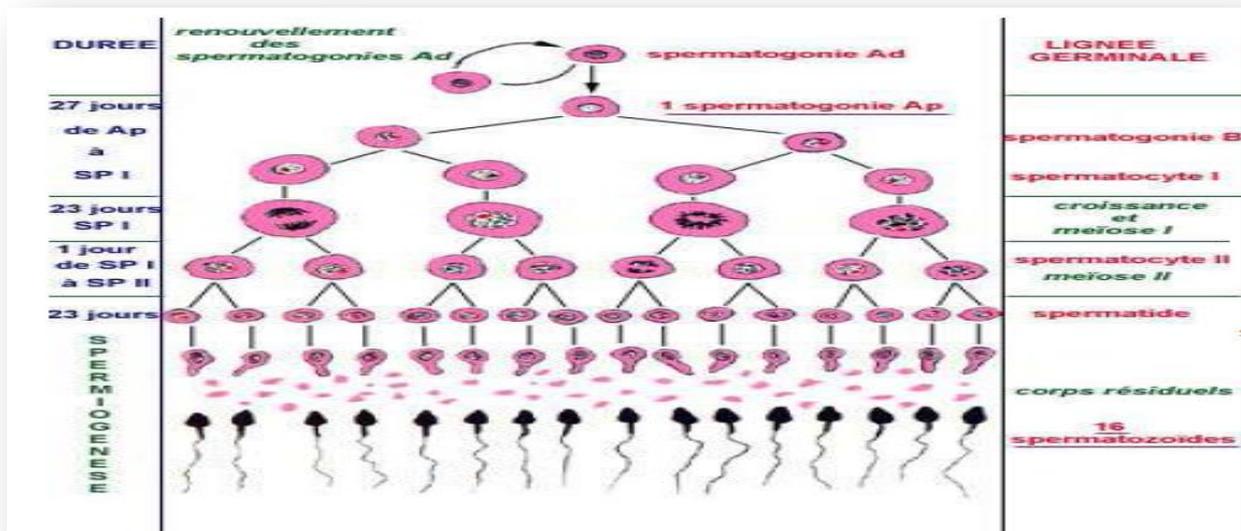
• **Spermatogonies B** : (noyau à chromatine en agrégat périphérique) Se divisent pour entrer en prophase méiotique et donner deux spermatocytes I (division hétéroplastique). Possède une chromatine irrégulière.

Les spermatocytes I passent de la région périphérique du tube séminifère vers la partie centrale ou on aura une première division de méiose qui se caractérise par deux divisions successives :

- **Division réductionnelle** : ou le spermatocyte I subit un accroissement de taille dû à la duplication d'ADN (phase S) ensuite une recombinaison du matériel génétique en prophase suivie d'une

métaphase, une anaphase et une télophase. Chaque spermatocyte I donne deux spermatocytes II (cellules diploïdes).

- **Division équationnelle** : dont la progression se fait plus rapidement que la précédente, elle induit la réduction du matériel génétique en donnant naissance à des spermatides (cellules haploïdes), de chaque spermatocyte II on obtient **deux spermatides**.



**Figure 01** : Étapes de la spermatogénèse (d'après Vachret N.,)

### II.1.2. La spermiogénèse

La spermiogénèse est la phase de la différenciation qui se traduit par la transformation de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile, pauvre en cytoplasme et en réserves). Elle est caractérisée par :

- ✓ **Condensation du noyau** : Cette condensation se caractérise par l'élimination des histones riches en lysine et remplacées par les protamines (protéines basique de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine). Le nucléole disparaît, les ARNm nucléaires sont éliminés et le noyau se déshydrate : d'où l'aspect dense (la chromatine se condense) aplati et allongé du noyau.
- ✓ **La formation de l'acrosome** : Pour cela la spermatide change de polarité suivie d'une confluence de vésicules golgiennes en une unique de grande taille appelée **acrosome** qui recouvre les deux tiers antérieurs de la surface du noyau **capuchon nucléaire**. L'acrosome est pourvu d'équipement enzymatique protéo-hydrolytique (hyaluronidase, neuraminidase, phosphatase acide, proacrosine) dont le rôle est primordial lors de la fécondation (dégradation de la zone pellucide).

- ✓ **La différenciation de l'appareil cinétique** : le complexe centriolaire, voisin de la Vésicule proacrosomiale, migre à l'opposé du noyau. Le centriole proximal se positionne dans une invagination de la membrane nucléaire tandis que le centriole distal induit la polymérisation d'un axonème.
- ✓ **Formation du manchon mitochondrial** : tout d'abord les mitochondries se retrouvent disperser dans le cytoplasme puis elles s'organisent en un manchon à la base de l'axonème au niveau de la pièce intermédiaire tout en formant une spirale. Le manchon constitue le moteur d'où le flagelle puisera son énergie.
- ✓ **Réduction du cytoplasme** : Le surplus du cytoplasme de la spermatide est éliminé en formant des corps résiduels qui sont phagocytés par les cellules de Sertoli, une mineure partie du cytoplasme demeure à la base du flagelle qui sera **éliminé** lors du passage dans l'épididyme.

Suite à tous ces événements, les spermatozoïdes qui sortent des tubes séminifères, n'ont pas encore la capacité de féconder un ovule. Ils vont séjourner dans l'épididyme et subir encore une série de transformations.

## II.2. Facteurs d'altération de la formation des spermatozoïdes

### II.2.1. Déficits gonadotropes

Ils correspondent à l'absence de stimulation hormonale du testicule par absence de sécrétion des gonadotrophines. Le plus souvent le déficit porte à la fois sur la sécrétion de LH et de FSH avec déficit de stimulation des deux fonctions testiculaires.

### II.2.2. Troubles primitifs de la spermatogénèse

Dus à divers types d'altérations morphologiques des tubes séminifères :

- L'hypo-spermatogénèse : le nombre des tubes séminifères et des cellules germinales est diminué ;
- Le blocage de la spermatogénèse au stade de spermatocyte I, de spermatocyte II ou de spermatide ;
- L'aplasie germinale : Absence totale de cellules de la lignée germinale (cellules souches des spermatozoïdes).
- Diverses anomalies se trouvent associées à des troubles de la spermatogénèse :
- Anomalies chromosomiques (délétion du bras long du chromosome Y) ;
- Varicocèle (dilatation des veines du cordon spermatique) ;

- cryptorchidie : il est probable qu'une altération constitutionnelle du testicule induise un trouble de la descente testiculaire pendant la vie intra-utérine et se manifeste aussi plus tard dans la vie par un trouble de la spermatogénèse ;
- Pathologie infectieuse génitale ou générale (orchite ourlienne) ;
- Altération ischémique ou traumatique du testicule ;
- Effets de substances toxiques et d'agents physiques (radiations, chimiothérapies, maladies fébriles) ;
- Hyperthermie ;
- Sous-nutrition.

### II.3. Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde assure trois fonctions successives :

- Mobilité : le transport du contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle grâce à son flagelle.
- Fécondité : la pénétration du génome mâle dans le gamète femelle et cela dépend de l'équipement enzymatique acrosomial.
- Vitalité : (l'espérance de vie des spermatozoïdes est limitée).

✓ **Tête :**

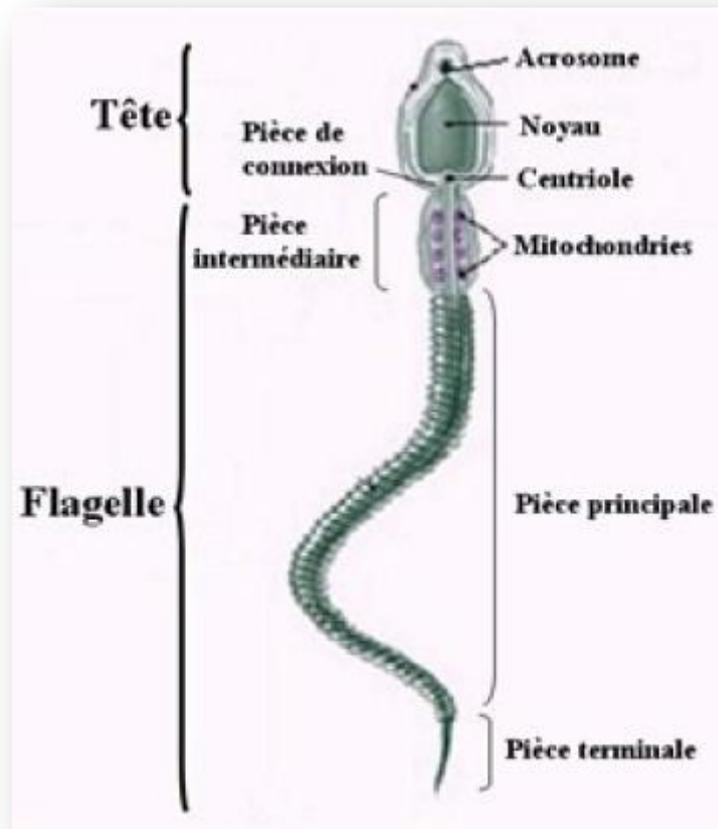
Est de forme ovoïde, le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau contenant les chromosomes et l'acrosome qui renferme à son tour des enzymes protéolytiques nécessaires lors de la fécondation.

✓ **La pièce intermédiaire :**

Très riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au mouvement des spermatozoïdes.

✓ **Le flagelle :**

Est l'organe locomoteur du spermatozoïde dont son rôle est d'assurer la mobilité de ce dernier afin de lui permettre d'atteindre l'ovocyte dans l'appareil génital femelle.



**Figure02** : Structure d'un spermatozoïde (*Knobil E, Neill JD, 1988*)

### II.3.1. Anomalies structurales du spermatozoïde

Les anomalies de spermatozoïdes trouvées sont les quatre suivantes:

#### Anomalies de la tête

- Microcéphalie ;
- Macrocéphalie ;
- Tête Anormalement Allongée ;
- Tête Irrégulière.

#### Anomalie de la pièce intermédiaire

- Restes Cytoplasmiques ;

#### Anomalies du flagelle

- Flagelle Angulé ;
- Flagelle Enroulé.

Formes doublées

- En Notant Les Parties Qui Sont Doublées.

Il existe aussi des spermatozoïdes sans ACROSOME, en absence de se dernier le spermatozoïde ne pourra pas pénétrer dans l'ovule.

Nous pouvons avoir :

- ✓ L'**asthénospermie** : correspond à une faible mobilité des spermatozoïdes
- ✓ L'**oligospermie** : lorsque le sperme contient une faible quantité de spermatozoïdes (moins de 20 millions de spermatozoïdes / ml)
- ✓ L'**azoospermie** c'est l'absence totale de spermatozoïdes
- ✓ La **nécrozoospermie** lorsque la vitalité des spermatozoïdes est inférieure à 75%
- ✓ La **tératozoospermie** le taux des spermatozoïdes normaux est inférieure à 40%

#### **II.4. Contrôle endocrinien de la spermatogénèse**

Chez tous les vertébrés, la spermatogénèse est régulée par les interactions endocriniennes entre l'hypophyse et les cellules gonadiques. Ce système endocrinien, désigné sous le nom d'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG), englobe une série de mécanismes de signalisation traduit par une sécrétion hormonale qui coordonnent la spermatogénèse et la stéroïdogenèse, qui elles-mêmes par un mécanisme de rétroaction négative, régulent le fonctionnement de cet axe. Cependant, cette activité hormonale est ralentie durant une partie de l'année chez les espèces connues ayant une reproduction saisonnière.

Le testicule possède deux fonctions l'une étant exocrine et l'autre endocrine, dont le rôle majeur est d'assurer la production des spermatozoïdes et de la testostérone et cela de manière continue de la puberté jusqu'à la fin de la vie.

##### ***II.4.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire***

Le « chef d'orchestre » de la fonction testiculaire est la production pulsatile de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) par des neurones de l'hypothalamus, eux-mêmes influencés par le cortex cérébral (*Bonne et al., 2005*). La GnRH présente une sécrétion pulsatile, puis après un court trajet dans le sang dans la tige hypophysaire, qui relie l'hypothalamus à l'hypophyse, elle stimule la sécrétion de FSH et de LH par les cellules de l'hypophyse.

## ***II.4.2. Les gonadotropines***

Chez les mammifères, le rôle des substances produites par l'hypophyse antérieure sur la croissance et le cycle de reproduction chez la femelle a été démontré dès les années 1920 (*Evans et al. 1922; Hewitt 1929*). Plus tard, Fevold et ses collègues (*Fevold et al. 1931*) réussirent à séparer deux fractions à partir d'hypophyses de brebis, l'une stimulant la croissance folliculaire et l'autre stimulant la lutéinisation.

Ces deux fractions furent donc désignées respectivement Follicle Stimulating Hormone (FSH) et Luteinizing Hormone (LH). Par la suite, des intriguassions ont menés à décrire la même propriété chez le mâle, au profit de l'hypophysectomie qui a conduit à la suppression de la spermatogenèse (*Hoar 1965*) puis à l'injection d'extraits hypophysaires qui permet de régénérer complètement la spermatogenèse (*Yamazaki et al. 1968*) (*Billard et al. 1970*).

Les hormones gonadotropes LH et FSH sont des glycoprotéines dont le contenu en sucre est d'environ 13 % pour la LH ovine et 25 % pour la FSH ovine. Par ailleurs, la sécrétion de la FSH est plus complexe que la LH, et de façon continue qu'épisodique, en présentant une dépendance infime à la GnRH, par contre, la sécrétion de LH est un phénomène discontinu ; des prélèvements de sang très fréquents révèlent que des décharges rapides d'hormones appelées « *pulses* » se produisent dans le sang, suivies par des moments de repos avec une sécrétion basale. Chaque pulse est le résultat d'une stimulation des cellules hypophysaires par la GnRH, sécrétée par les neurones hypothalamiques, qui détermine la fréquence de libération pulsatile de la LH et, par conséquent, l'intensité de la stimulation gonadique.

### ***II.4.2.1. Mécanisme d'action des gonadotropines***

Une fois les gonadotropines sécrétées dans la circulation sanguine, elles se lient à des récepteurs membranaires exprimés sur les cellules somatiques des gonades ; l'hormone folliculo-stimulante se fixe sur des récepteurs retrouvés au niveau des cellules de Sertoli ainsi un triple rôle est incité, dont le principal est l'activation de la spermatogenèse par l'intermédiaire du cytoplasme Sertolien qui permet la multiplication des cellules germinales ; un second rôle qui consiste à la stimulation de la formation d'ABP (Androgen Binding Protein) qui sert de transporteur à la testostérone ; et un dernier rôle qui consiste à la sécrétion d'inhibine, hormone exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH.

L'hormone lutéinisante commande essentiellement la stéroïdogénèse par sa fixation sur des récepteurs membranaires des cellules de Leydig, qui sécrètent alors des androgènes, principalement de la testostérone, cette dernière pénètre dans le compartiment tubulaire où elle se lie à une glycoprotéine de liaison, l'ABP (Androgen Binding Protein) pour conditionner le développement de l'épithélium séminal et le bon fonctionnement des voies génitales.

### ***II.4.3. La testostérone***

L'acquisition de la fonctionnalité de l'appareil sexuel mâle se fait, au cours de la vie embryonnaire, sous le contrôle de l'hormone sexuelle mâle : la testostérone. En raison de la fonction endocrine du testicule, ce dernier synthétise par le biais des cellules de Leydig la testostérone et la libère dans le sang et la lumière des tubes séminifères. L'observation du mode de sécrétion dans le plasma sanguin indique que la fréquence des pulses de testostérone est directement commandée par celle des pulses de LH. La testostérone module plusieurs phénomènes, on compte :

- Maintien de la spermatogénèse, en collaboration avec la FSH et LH ;
- Développement des caractères sexuels secondaire et de l'instinct sexuel ;
- Préserve la fonction épидидymaire, qui assure à son tour l'achèvement de maturation des spermatozoïdes ;
- Déclenchement des sécrétions des glandes annexes ;
- Rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ;
- Action générale positive sur le métabolisme, qui contribue à la croissance corporelle ;

Le taux sanguin de testostérone est détecté en permanence par le complexe hypothalamo-hypophysaire. La testostérone inhibe la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, et la sécrétion de FSH et LH par l'hypophyse (rétro-contrôle négatif), ainsi la testostéronémie est maintenue constante.

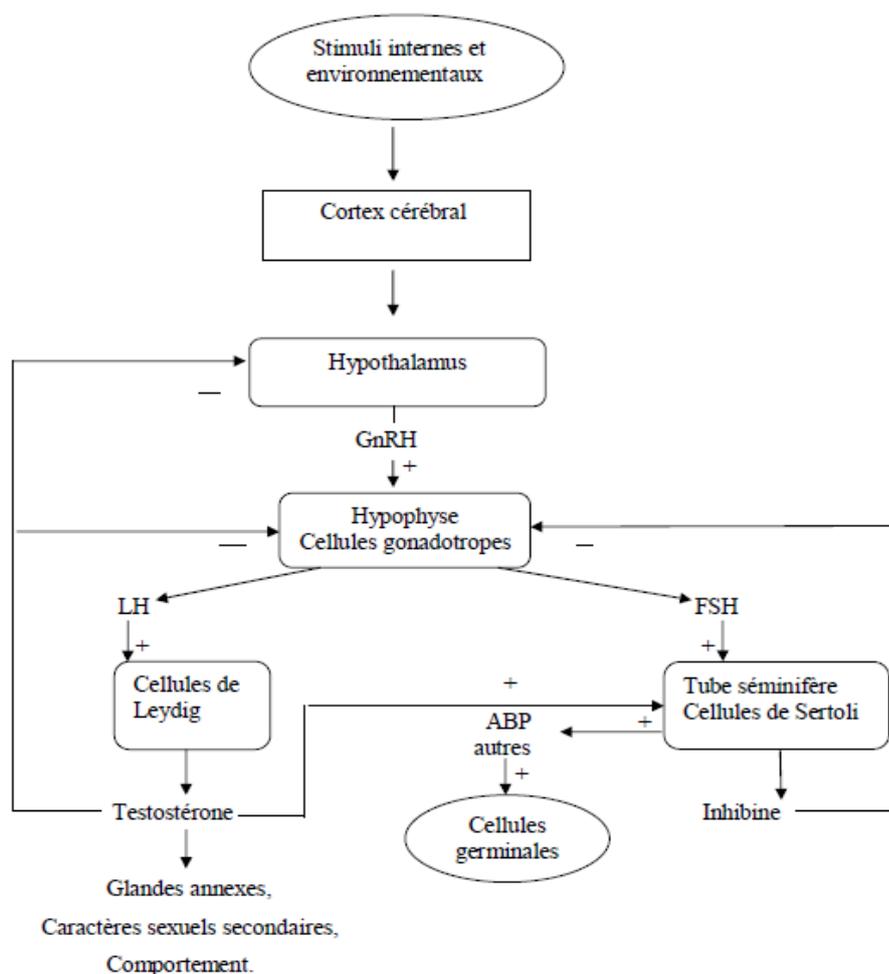
### ***II.4.4. Les hormones des cellules de Sertoli : ABP et l'Inhibin***

Sécrétées par les cellules de Sertoli, L'ABP (Androgen Binding Protein) sert de transporteur à la testostérone. L'inhibine est une hormone non stéroïdienne, elle assure un rétro contrôle sur la LH, et donc sur la testostérone.

### II.4.5. L'hormone de la photopériode : la mélatonine

L'effet de la photopériode sur la fonction sexuelle du bélier et du bouc est de découverte récente, illustré par la mélatonine qui fut découverte en 1958. La mélatonine est une indolamine de faible poids moléculaire, elle est la sécrétion dominante de la glande pinéale chez les ovins et les caprins. Chez les races photopériodiques, la mélatonine est considérée, messagère neuro-endocrinienne des effets de la lumière sur la reproduction, par sa sécrétion nocturne durant les périodes de nuits qui se rallongent aux jours décroissants.

La mélatonine est libérée dans la circulation générale et dans le liquide céphalorachidien, afin d'agir par la suite au niveau des récepteurs identifiés principalement dans la pars tuberalis de la tige hypophysaire pour contrôler la sécrétion saisonnière de prolactine, mais également, au niveau de l'aire de l'hypothalamus pré-mamillaire pour des effets gonadotropes.



**Figure 03 :** Régulation hormonale de la fonction sexuelle du bélier (Van Der Molen *et al.*, 1975 ; Bonnes *et al.*, 2005 ; Silverthorn *et al.*, 2007).

## II.5. Epididyme

L'Epididyme Correspond à la partie initiale des conduits permettant l'excrétion du sperme. Cet organe permet le stockage, la maturation et le transport des spermatozoïdes vers l'extérieur au cours de l'éjaculation.

Durant la spermatogénèse, les spermatozoïdes subissent des modifications morphologiques et physiologiques qui se poursuivent durant leurs présences dans l'épididyme, la plus part des auteurs attribuent à la sécrétion épидидymaire un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes (Pierrick HORDE, 2014)

### II.5.1. Conformation de l'épididyme

L'épididyme forme un organe allongé placé en face médiale du testicule, recouvrant les extrémités de celui-ci. Il est constitué de trois parties :

**Tête:** large aplatie, surmontée l'extrémité dorsale et déborde sur le bord crânial du testicule, elle se trouve fixée par une expansion fibreuse dénommée le ligament de la tête.

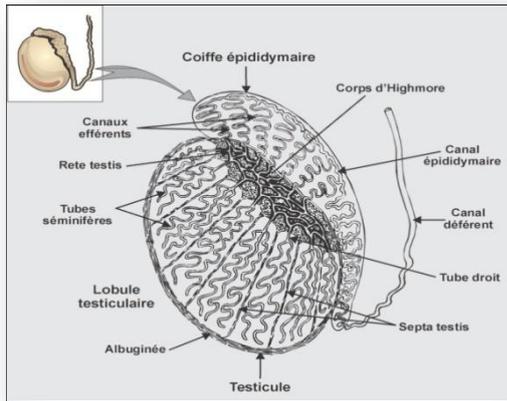
**Corps:** il est relativement étroit.

**Queue:** elle est bien attachée grâce au ligament propre du testicule, cette queue se prolonge par le conduit déférent.

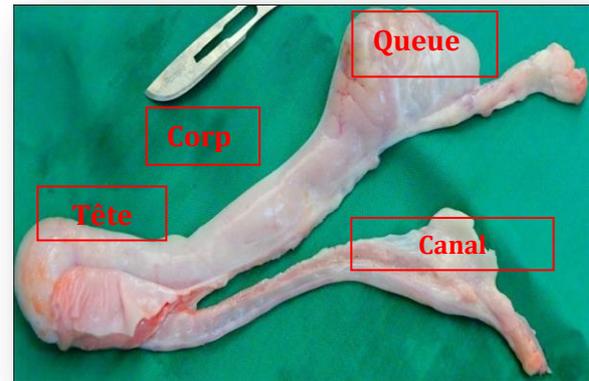
**Structure :** L'épididyme est formé par un système canaliculaire maintenu par une mince albuginée, ce système canaliculaire comprend des amas de fluctosités, de canalicules efférentes, puis ces canalicules confluent en un conduit épидидymaire qu'on appelle le rete testis, le rete testis occupe chez l'homme une position superficielle alors que chez le bélier le système lacunaire du rete testis plonge dans le testicule en suivant son grand axe.

La jonction entre le rete testis et les tubes séminifère s'effectue par l'intermédiaire des canaux droits, et la jonction avec le canal épидидymaire se fait par les canaux efférents.

Les études histo-chimiques ont montré une grande diversité des segments de l'épididyme, chaque partie de l'épididyme est responsable de sécrétions enzymatiques différentes de celle des autres, cette diversité laisse supposer qu'à chaque niveau de l'épididyme doit correspondre un rôle physiologique bien déterminé.



**Figure 04:** Schémas du testicule et de l'épididyme (Castongnon F., 2010).



**Figure 05 :** schémas explicite des différentes parties de l'épididyme. (cliché personnel).

## II.5.2. Physiologie de l'épididyme

### II.5.2.1. Maturation des spermatozoïdes

De nombreuses études effectuées, attribuent toutes aux sécrétions épидидymaires un rôle nutritif pour les spermatozoïdes durant leur passage dans l'épididyme.

Au cours de leurs passage dans l'épididyme les spermatozoïdes acquièrent une certaine résistance aux agents nocifs (STIGLER 1918), en effet les spermatozoïdes de la partie distale conservent mieux leur motilité aux hautes températures que ceux de la partie proximale ou testiculaire.

Par ailleurs cette fonction protectrice de l'épididyme est conditionnée par l'hormone testiculaire (BENOIT 1925). Cependant YONG (1930) a conclu que les facteurs de maturation sont intrinsèques aux spermatozoïdes eux-mêmes, et qu'ils dépendent simplement de la présence ou de l'absence d'un complexe hormone testiculaire.

Quelles que soit les causes de maturations des spermatozoïdes, celles-ci doivent se faire progressivement, il est donc essentiel de déterminer le temps exact pendant lequel les spermatozoïdes séjournent normalement dans l'épididyme.

### ***II.5.2.2. Transport des spermatozoïdes***

#### ***II.5.2.2.1. Durée du transit épидидymaire chez le bélier***

La durée du transit épидидymaire est déterminée par la différence entre l'arrivée des spermatozoïdes dans la tête et de l'épididyme et l'arrivée de ces mêmes spermatozoïdes dans le canal déférent, donc pratiquement l'éjaculat.

Ortavant(1956) a marqué les spermatozoïdes de Bélier et a suivi ensuite leur évolution. Il en a déduit la durée du cycle spermatogénétique qui est de 49 jours et la durée du transit épидидymaire qui varie de 14 à 21 jours. DAWSON(1958) a repris les mêmes expériences mais il a trouvé une vitesse de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme de 10 à 14 jours.

Ainsi, plusieurs études effectuées sur une même espèce ne donnent pas toujours des résultats identiques.

#### ***II.5.2.2.2. Mécanisme de transport des spermatozoïdes***

Quatre facteurs peuvent intervenir (TOOTHILL et YONG 1931) :

- L'action des cils vibratiles bordant la lumière des canaux efférents.
- Les contractions péristaltiques du canal épидидymaire.
- La production constante du fluide testiculaire et des spermatozoïdes par les tubes séminifères.
- L'élimination des spermatozoïdes déjà formés selon le rythme des éjaculations.

#### ***II.5.2.2.3. Variation du temps de transit des spermatozoïdes dans l'épididyme***

Plusieurs études ont montré que le premier éjaculat récolté contient une proportion de spermatozoïdes immobiles plus élevée que les éjaculats suivants obtenu au cours de la même collecte.

Willet Et Ohms (1958) ont montré qu'en collectant deux éjaculats en espace de quelques minutes le premier présente une mauvaise résistance à la congélation par rapport au second, les mêmes résultats ont été démontré en ce qui concerne le choc thermique (White et Wales 1959), c'est-à-dire que la résistance au choc thermique est plus importante pour les spermatozoïdes du deuxième éjaculat.

De Groot(1961) montre que les spermatozoïdes du premier éjaculat possèdent une grande sensibilité au froid et une diminution de la mobilité par rapport au premier.

Ces résultats indiquent donc que les spermatozoïdes stockés dans l'épididyme commencent à y subir un processus de vieillissement, dû à une influence nocifs trop prolongée des sécrétions du canal épидидymaire ou simplement à une sénescence.

Des résultats qui s'opposent aux précédents lors d'un décroissement de la vitalité des spermatozoïdes à cause d'une augmentation du nombre des éjaculats. Ou bien des spermatozoïdes immatures à cause du court intervalle entre deux collectes.

GUNN (1936) montre que chez le bélier le transit est plus court (6jours) chez les animaux fréquemment collectés par rapport aux béliers en repos sexuel (21jours). La fréquence des collectes n'influence pas sur le temps d'apparition des spermatozoïdes dans la tête de l'épididyme mais elle modifie de 2 à 3 jours la date de leur arrivé dans l'éjaculat. (BOIVINEAU 1962).

### ***II.5.3. Résorption des spermatozoïdes***

Une fois que les spermatozoïdes deviennent matures, ils doivent être éjaculés ; dans le cas contraire ils perdent progressivement leur pouvoir fécondant.

Lors du repos sexuel, il existe différentes possibilités d'élimination des spermatozoïdes du canal épидидymaire, soit l'élimination par l'urine, soit le passage à travers la paroi de l'épididyme, ou bien la liquéfaction et la résorption dans l'épididyme lui-même ou le canal déférent (SIMONE et YONG 1931).

## **III. Particularité de la reproduction chez le bélier**

L'activité reproductive de la plupart des animaux domestiques originaires des zones tempérées présente des variations saisonnières. Celles-ci sont plus ou moins marquées selon les espèces, les petits ruminants manifestant des périodes d'arrêt complet de leur reproduction (Ortavant et *al.*, 1985).

La plupart des centres d'insémination artificielle (IA) ovine font aujourd'hui largement appel au conditionnement lumineux des mâles. Ces traitements mis au point au début des années 1980, sont rendus nécessaire par le fait que les IA en semence fraîche ont lieu en avance de saison sexuelle voire en contre- saison. Outre leur utilisation pour les béliers adultes, ces applications s'avèrent particulièrement intéressantes pour les jeunes béliers, puisqu'elles permettent d'avancer la première saison sexuelle.

### **III.1. Saisonnalité de l'activité sexuelle**

La photopériode est le principal facteur extrinsèque modulant la physiologie endocrinienne et le comportement sexuel des reproducteurs saisonniers. La mélatonine serait en grande partie responsable de cette caractéristique de saisonnalité puisque la sécrétion qui est uniquement nocturne, augmente durant les jours courts à l'automne 24. L'efficacité du traitement de mélatonine est bien démontrée et utilisée pour stimuler des cycles œstraux durant la saison d'anoestrus.

L'utilisation de mélatonine sous forme d'implants pendant 3mois associée à un traitement lumineux préalable constitue une alternative aux conditionnements photopériodiques pour le contrôle de l'activité de la reproduction des ovins, dans le cas de bergerie ouverte (Malpaux B et al., 1996).

Chez le mâle, la photopériode affecte aussi l'équilibre endocrinien se caractérisant par des réductions des sécrétions des gonadotrophines et de la testostérone ce qui influence le développement testiculaire, la libido et la qualité séminale.

### **III.2. Traitement photopériodique**

Etant reproducteur saisonnier, le contrôle de cycle œstral par un programme de photopériode artificielle constitue une option pratique pour les élevages d'ovins de type intensif et de caprins laitiers (Cushwa WT et al., 1992 ; Keisler DH et al., 1997 24 44 ; Malpaux B et al., 1996).

Le concept du programme de luminosité consiste à reproduire une alternance de photopériode de jours longs (>14 heures/jour) pendant un à quatre mois suivie d'une photopériode de jours courts (8heures/jour).

*Deuxième chapitre :*

**CRYOBIOLOGIE**

## I. Introduction

Dès l'avenue de la cryoconservation à nos jours, les scientifiques continuent d'améliorer les techniques employées et d'en généraliser l'application sur toute être vivant, qu'il soit unicellulaire ou pluricellulaire.

Tous les auteurs s'accordent à dire, que chaque type de cellule et chaque type de tissu, possèdent leur propre réactivité et résistance vis-à-vis de la congélation ainsi qu'aux cryoprotecteurs utilisés. De ce fait, il est possible de définir les conditions techniques (vitesse de refroidissement et vitesse de réchauffement) et substances impératives (cryoprotecteurs...) placés lors de la cryoconservation pour un groupe cellulaire homogène ou un tissu monocellulaire, en revanche, cela est plus complexe pour les tissus composites.

## II. Mode d'action du froid sur la cellule

Depuis près d'un siècle de nombreuses interprétations ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des basses températures sur les tissus tant animaux que végétaux. Ces analyses amènent à considérer toute l'importance du phénomène de cristallisation, qu'il se produise à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules durant la cryoconservation

Sachant que la teneur en eau peut atteindre 95% dans les cellules ; l'eau contenue dans les tissus et les cellules a un impact important sur la survie lors de l'exposition à des températures négatives.

Lors de la congélation de l'eau, la formation de cristaux en forme d'aiguilles agglomérées s'accompagne d'une augmentation de volume de 9%, entraînant des modifications du métabolisme cellulaire et des dommages physiques irréversibles. La cristallisation de l'eau dans les milieux extra et intracellulaires est le principal événement qui conduit à la mort des cellules.

Ainsi, lors d'un abaissement de la température jusqu'à environ  $-5^{\circ}\text{C}$ , il y a d'abord surfusion des milieux intra et extracellulaires en raison de l'abaissement de la température de congélation par la présence de solutés.

Entre  $-5^{\circ}\text{C}$  et environ  $-15^{\circ}\text{C}$  lors d'un refroidissement lent, l'eau aura tendance à cristalliser dans un premier temps en dehors de la cellule ce qui provoquera une augmentation de la concentration en soluté du milieu extracellulaire (Dereuddre et Gazeau, 1992).

Par effet d'osmose, l'eau intracellulaire aura alors tendance à sortir de la cellule, ce phénomène est appelé l'exosmose (Mazur *et al.*, 1984). Il en résulte une forte déshydratation de la cellule et par conséquent une augmentation de la concentration du milieu intracellulaire et un

changement de pH (Meryman *et al.*, 1977). Les perturbations du métabolisme cellulaire associées à la déshydratation de la cellule et aux dommages mécaniques aboutissent alors à la destruction et à la mort des cellules.

En outre, lors d'une exposition brutale à des températures négatives, il est possible d'avoir simultanément une cristallisation dans le milieu extracellulaire et dans le milieu intracellulaire. Il y'aura alors, perforation des membranes et des parois sous l'action mécanique de la croissance des cristaux sans passer par une phase de déshydratation des cellules (Dereuddre et Gazeau, 1992).

Le plus souvent, les deux mécanismes ont lieu partiellement de manière conjointe mais dans tous les cas les cellules ne peuvent pas survivre à une formation importante de cristaux.

### **II.1. Les altérations dues à l'action du froid sur les membranes**

La membrane plasmique se compose d'une bicouche phospholipidique, de protéines et de stérols pour former une mosaïque fluide selon le concept de Singer et Nicholson (1972). C'est elle qui fait l'interface entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire par la diffusion active ou passive des molécules nécessaires au fonctionnement de la cellule (Robert et Roland, 1989). Toutes les membranes cellulaires et principalement la membrane plasmiques, sont sensibles au froid et à la dessiccation (Uemura et Steponkus, 1999).

Or, la survie de la cellule passe par le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. Plusieurs facteurs sont responsables de la désintégration de la membrane lors d'une exposition au froid. Tout d'abord la nature même des phospholipides et des protéines qui la composent, influence fortement la résistance au froid et à la déshydratation des cellules (Steponkus *et al.*, 1993). Ainsi à température ambiante, la bicouche lipidique se trouve dans un état fluide, hydratée.

A mesure que la température baisse (quelques degrés par heure) le phénomène d'exosmose se met en place. Le niveau d'hydratation de la membrane diminue, il y a alors perte de la fluidité de la bicouche par l'allongement et la rigidification des chaînes aliphatiques des phospholipides. A l'inverse, un abaissement rapide de la température peut provoquer une forte déshydratation des cellules.

### III. Conservation pour combien de temps ?

#### III.1. Cryoconservation à court terme : Réfrigération

Les spermatozoïdes de mammifères peuvent être conservés sans être congelés pendant une courte durée, soit de quelques heures à quelques jours (à 4 °C ou entre 15-20°C quelques heures).

La réfrigération de la semence consiste à abaisser la température de cette dernière à 4°C en présence de dilueur pendant 48h, passé ce délai les résultats sont plus aléatoires (très répandue chez les animaux de rente et les équidés).

De plus, la réfrigération de la semence présente des avantages et des inconvénients par rapport à la congélation :

- Les protocoles utilisés, tant pour la simple conservation que pour le transport, sont plus simples à réaliser, moins onéreux.

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

La plupart des auteurs recommandent de centrifuger la semence afin de minimiser les risques d'effets délétères du liquide prostatique (bien qu'il n'ait pas d'effets néfastes sur la mobilité, la vitalité et l'intégrité acrosomiale) sur les spermatozoïdes réfrigérés pendant une plus longue période.

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

En 2003, il a été montré que la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un dilueur qu'en l'absence de dilueur. De ce fait, on utilise comme dilueur soit le jaune d'œuf soit le lait écrémé qui contiennent des protéines afin d'assurer une protection et une stabilisation des membranes des spermatozoïdes donc l'obtention de bons résultats en terme de mobilité, de vitalité et d'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après leur réfrigération. (Lors d'IA de semence réfrigérée avec un dilueur donnent des taux de gestation significativement plus élevés que des IA de semence réfrigérée sans dilueur)

## III.2. Cryoconservation à long terme

### III.2.1. Définition de la congélation

La conservation cryogénique est une biotechnique de fixation et de stabilisation qui induit l'arrêt de toute activité biologique (chimique, métabolique, interactions extra et intracellulaire...) d'une cellule vivante donnée et cela pendant un temps indéfini en bloquant son activité métabolique, tout en conservant son intégrité fonctionnelle en ayant recours à la congélation à de très basses températures essentiellement à l'aide de l'azote liquide (-196°C).

Au fur et à mesure de l'abaissement de la température, les fonctions se figent graduellement, ainsi pour les températures allant de 0°C à -25°C, on note un ralentissement de l'activité enzymatique des cellules, à -40°C un gel des échanges physicochimiques, or il faut atteindre des températures inférieures à -130°C pour assurer une conservation cellulaire à long terme.

La cryoconservation a apporté beaucoup de dynamisme aux échanges et l'amélioration génétiques d'animaux d'élevage que ça soit au niveau national ou international.

Néanmoins, de nombreux inconvénients ont été soulignés, dont le principal étant les changements d'état de l'eau, en particulier le passage de l'état liquide à l'état solide sont les événements majeurs mis en jeu dans la cryobiologie, autrement dit, lors de la congélation on observe la formation de cristaux, ces derniers altèrent les cellules par lésions mécaniques directes.

### III.2.2. Congélation lente

La cryoconservation lente est une conservation classique dite équilibrée, elle permet de créer un équilibre progressif entre les milieux extra et intracellulaires au fur et à mesure de la pénétration du cryoprotecteur (utilisé en faibles proportions), ainsi que la formation de cristaux de glace dans le compartiment extérieur grâce à un refroidissement très progressif 0.3°C/mn.

Cette technique se décompose en différentes phases comprenant l'addition lente du milieu cryoprotecteur à concentration croissante, le refroidissement, l'induction de la cristallisation, puis un stockage en azote liquide.

**Technique :** Consiste à mettre les cellules (spermatozoïdes) dans un milieu isotonique qu'on refroidit. Au début les cellules et le compartiment externe sont en surfusion, puis ce dernier verra la formation accrue de cristaux d'eau pure ainsi on obtient une augmentation excessive de sels dissouts ce qui entraîne la sortie d'eau intracellulaire par osmose, le milieu intracellulaire étant

toujours en surfusion dû à la protection conférée par la membrane cytoplasmique en addition de la pression vapeur élevée à l'intérieur des cellules qui induit la déshydratation progressive des cellules.

La déshydratation des cellules a pour conséquences fastes la réduction ou suppression de la formation dommageable de glace intracellulaire lors de l'immersion des échantillons dans l'azote liquide, mais aussi néfastes liées à l'augmentation de la concentration des sels intracellulaires induisant des changements (altérations) dans la conformation de la membrane cellulaire et le rétrécissement des cellules.

La déshydratation peut être réversible par un appel d'eau lié au cryoprotecteur qui a pénétré les cellules. Lors de cette phase de rééquilibration, le volume des cellules diminué auparavant, tend à retrouver son état initial sans y parvenir complètement.

### III.2.2.1. Seeding: l'induction de la cristallisation

Le « **seeding** » se pratique le plus souvent manuellement en plaçant des pinces refroidies à l'azote liquide sur la paroi externe de la paillette qui contient la semence, loin de celle-ci. On induit ainsi la formation d'un premier cristal de glace loin de la semence et on enclenche la déshydratation des cellules afin d'éviter la formation de gros cristaux de glace intracellulaires.

Le « seeding » permet aussi d'évacuer plus progressivement la chaleur latente de la cristallisation exothermique.

#### Avantage :

- Technique facile à mettre en œuvre, peut être accomplie par une personne peu expérimentée.
- Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations relativement peu toxiques.
- Contourner la formation de cristaux intracellulaires.

### III.2.3. Vitrification

La cryoconservation rapide dite congélation non équilibrée, réalise un passage direct de l'état liquide de l'eau à un état amorphe ou verre sans réarrangement moléculaire ordonné, ce qui inhibe la formation de la glace cristalline à la faveur d'une exposition à des concentrations élevées de cryoprotecteurs qui déshydratent aussitôt les cellules et la rapidité du refroidissement de 2000 à 20 000 °C/mn.

La technique repose aussi sur le faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois des paillettes dans lesquelles sont montés les cellules. Cependant, les fortes doses de cryoprotecteurs ajoutées ont un effet toxique sur les cellules (lors de pénétration), néanmoins cet effet peut être

minimisé par addition de saccharides non pénétrants (sucrose, glucose, fructose, raffinose,...) et/ou de macromolécules (Polyvinylpyrrolidone, Ficoll,...).

Actuellement la cryoconservation rapide connaît deux systèmes, l'un ouvert (problème de contamination) et l'autre fermé (sécurité sanitaire), ces derniers mis en œuvre lors de vitrification des ovocytes.

Par ailleurs cette technique nécessite l'intervention d'une personne expérimentée ayant des connaissances acquises.

### **III.2.4. Particularités de la conservation de la semence ovine**

La semence de bélier peut être conservée à l'état liquide (4 ou 15-20 °C) ou être cryoconservée (-196°C) (Salamon S, 2000).

Le choix du type de conservation chez cette espèce dépend de la technique d'insémination artificielle qui sera utilisée. La semence conservée à l'état liquide est inséminée de manière exocervicale (à l'entrée du col de l'utérus). La cryoconservation de la semence de bélier réduit de beaucoup le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'utilisation de l'insémination exo-cervicale avec la semence cryoconservée donne lieu à de faibles taux de fécondation.

La semence cryoconservée doit être inséminée de manière intra-utérine (par laparoscopie, à l'intérieur des cornes utérines) afin d'obtenir des taux de fécondité élevés (Salamon S, Maxwell WMC. AnimReprodSci, 2000) Étant donné que la laparoscopie est plus coûteuse, car elle demande l'aide d'un vétérinaire et d'un équipement dispendieux, la semence non congelée est surtout utilisée pour l'insémination artificielle chez le bélier.

## **IV. Cryoprotection**

### **IV.1. Composition du milieu de dilution**

Les chercheurs s'intéressant à la conservation de la semence ont très vite remarqué la nécessité de diluer la semence dès sa récolte, sans quoi, sa durée de vie ne dépasse pas une heure ou deux (Katila, 1997) et son pouvoir fécondant est en grande diminution.

Ceci est dû essentiellement à la compétition entre spermatozoïdes pour les éléments nutritifs ou une accumulation de métabolites nocifs lorsque la concentration en gamètes est trop élevée. Afin de les protéger lorsque celle-ci seront d'une part au contact du froid et d'autre part lors du réchauffement.

### IV.1.1. Différents types de cryoprotecteurs

#### IV.1.1.1. Cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants sont de faible poids moléculaire et sont perméables à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bakhach *et al.*, 2007). Ils agissent à l'intérieur et à l'extérieur de celle-ci (Purdy, 2006). Lorsqu'ils sont à l'extérieur, ces cryoprotecteurs augmentent l'osmolarité du diluant et stimulent la déshydratation de la cellule, alors qu'ils diminuent le stress osmotique causé par la déshydratation à l'intérieur de cette dernière (Medeiros *et al.* 2002). Les cryoprotecteurs pénétrants sont généralement utilisés à des concentrations de 1 à 8 % (Purdy, 2006).

Il existe différentes molécules qui assurent cette fonction y compris Le glycérol, Éthylène glycol, éthanol, propanediol, méthanol, DMSO (Dimethylsulfoxyde).....etc.

Le glycérol est le cryoprotecteur pénétrant le plus utilisé, il contribue au changement de la structure des lipides membranaires du spermatozoïde, ce qui lui procure une stabilité et une perméabilité à l'eau (Holt, 2000). Lors de la comparaison de l'efficacité de plusieurs cryoprotecteurs pénétrants, la concentration de 6 % de glycérol dans le diluant s'est avérée produire une conservation de la motilité des spermatozoïdes de la semence congelée (Kunduet *al.*, 2001). Corteel et Baril (1974, 1975) utilisent une concentration finale de 7 % de glycérol dans un diluant à base de lait, alors que Ritar et Salamon (1982) utilisent des concentrations de glycérol allant de 2 à 4 % dans un diluant à base de jaune d'œuf.

#### IV.1.1.2. Cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants ne peuvent pas traverser la membrane plasmique du spermatozoïde contrairement au précédent. Leur présence augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde (Purdy, 2006b), ainsi ils protègent le spermatozoïde des pertes de cholestérol et de phospholipide de la membrane en diminuant la liaison des protéines du plasma séminal à la membrane plasmique (Bergeron *et al.*, 2007). La conservation de la cellule est ainsi favorisée.

Les cryoprotecteurs non pénétrants les plus utilisés :

##### IV.1.1.2.1. Jaune d'œuf

Le mécanisme par lequel le jaune d'œuf protège les spermatozoïdes n'est encore pas élucidé. Une première hypothèse propose que les LDL (lipoprotéines) s'associent à la membrane des spermatozoïdes et la stabilise, ce qui protégerait les spermatozoïdes. Toutefois, des résultats

contradictoires sont obtenus quant à la stabilité de ce complexe (Foulkes JA.1997 Graham JK et al, 1978). Une seconde hypothèse suggère que les phospholipides des LDL formeraient un film protecteur à la surface des spermatozoïdes ou encore remplaceraient les phospholipides perdus ou endommagés de leur membrane durant la cryoconservation (Graham JK et al, 1978 ; Foulkes JA et al, 1980).

La quantité de jaune d'œuf utilisée le plus fréquemment dans les dilueurs est de 20%. La conservation des spermatozoïdes de l'espèce Caprine avec leur liquide séminal (sperme) dans un dilueur à base de jaune d'œuf aurait été néfaste et cela est dû à l'hydrolyse de lécithine du jaune d'œuf par une phospholipase A du liquide séminal en lysolécithine et acides gras qui ont un effet spermicide. D'autres inconvénients c'est que la préparation du jaune d'œuf est un peu complexe car il faut tout d'abord le rouler sur un papier absorbant pour éliminer tout reliefs de blanc d'œuf et qu'une fois ajouté au dilueur il va falloir le filtrer, en outre la probabilité que le jaune d'œuf puisse contenir des agents pathogènes.

#### ***IV.1.1.2.2. Lait écrémé***

Le lait écrémé est utilisé depuis plus d'un demi-siècle comme diluant protecteur des spermatozoïdes de mammifères. Le lait écrémé est riche en protéines, ces dernières vont se fixer sur la membrane plasmique du spermatozoïde, ce qui va minimiser la perte de lipides (lors du choc thermique qui va créer des changements dans l'arrangement des lipides membranaires, ceci va induire l'altération des fonctions métaboliques des cellules) par la membrane plasmique et permet de maintenir la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes pendant la congélation (Bergeron *et al.*, 2007).

Le composant du lait qui protégerait les spermatozoïdes semble être les caséines, les protéines qui sont retrouvées en plus grande concentration dans le lait (80% m/m) (Amiot J, 2002, Farrell H.M., 2004). Des études montrent que les caséines isolées du lait protègent les spermatozoïdes de taureau, d'étalon et de bélier durant la conservation à 4-5 °C (Leboeuf B et al, 2003).

#### **IV.1.2. Substances nutritives**

Nécessaires au métabolisme du spermatozoïde et favorisent leurs vitalités et longévités, dont le lait est le substrat de choix à condition qu'il soit chauffé à 56°C pendant 15mn (destruction d'éléments spermicides) ou préparé à partir de poudre de lait écrémé, il apporte des phosphates, citrates et sucres.

Le lait contient des protéines et du lactose. Il possède un pouvoir tampon et il aurait un rôle protecteur sur les membranes des spermatozoïdes.

### **IV.1.3. Antibiotiques**

A pour rôle d'empêcher la multiplication bactérienne du fait de la présence du lait ou du jaune d'œuf qui va permettre la multiplication des germes, sachant que le sperme n'est pas stérile donc le risque d'une contamination n'est pas nul.

**La pénicilline et la streptomycine** sont employées à la dose, respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de dilueur.

### **IV.1.4. Substances tampons**

Au cours de la réfrigération ou de la congélation, il y'a un métabolisme au sein des spermatozoïdes ce qui va provoquer une acidification du milieu extracellulaire, engendrant un effet toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes .Le diluant doit contenir un tampon afin de garder un pH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes (qui varie de 6,7 à 7,0), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350 mOsm).

Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de TRIS ou de citrate de sodium (Vishwanath R, Shannon P. AnimReprodSci 2000)

#### ***IV.1.4.1. Le jaune d'œuf et le lait***

Il y a plus de soixante ans, les propriétés du jaune d'oeuf comme agent protecteur durant le refroidissement étaient découvertes et le lait était utilisé comme diluant pour la semence bovine (Phillips P, Lardy AL. J DairySci, 1940 ; Indian J AnimSci 1978). On ne sait pas clairement comment ces agents protègent les spermatozoïdes, mais il est reconnu qu'ils ont un effet bénéfique sur leur viabilité, leur motilité et leur pouvoir fécondant post-conservation.

#### ***IV.1.4.2. Le TRIS***

Le trishydroxyméthylaminométhane est le plus communément employé, en association avec de l'acide citrique. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible.

Avantages :

- Tris permettrait le meilleur taux de survie des spermatozoïdes après décongélation.
- comparativement à d'autres tampons, permet d'obtenir de meilleures motilités et viabilités (à vrai dire il influence la viabilité mais pas autant que les autres substances tampons) de la semence fraîche et décongelée.
- jouerait un rôle de stabilisateur du volume cellulaire
- Les tampons aident à la déshydratation cellulaire par l'augmentation de la stabilité membranaire.
- en plus d'être peu coûteux comparé à de nombreux autres. Il est aussi disponible sous forme non dissociée (base) et dissociée (sel de Cl<sup>-</sup>)

Inconvénients :

- il préviendrait la peroxydation des phospholipides membranaires
- Il inhibe plusieurs phénomènes biologiques en plus d'être très soluble dans les membranes, donc susceptible de s'infiltrer dans les cellules et les organites.

***Troisième chapitre***

***Protocoles de Réfrigération***

## I. Introduction

Ce n'est qu'après **1950** que de nombreuses publications ont commencé à paraître sur l'insémination artificielle avec de la semence de bélier fraîche ou réfrigérée, utilisant le plus souvent comme diluants ceux fabriqués à base de lait de vache ou la semence en paillettes. (Colas *et al.*) La réfrigération est un des moyens qui permet d'assurer la longévité de la semence ou plutôt de conserver sa fertilité, afin de permettre d'optimiser l'insémination artificielle.

La plupart des articles se sont portés sur la semence bovine alors que la semence ovine et caprine reste un terrain inexploité, néanmoins dans l'espèce ovine deux principaux dilueurs de semence fraîche ont été conçus l'un étant un dilueur lacté composé d'eau, de poudre de lait et d'antibiotiques et le dilueur à base de lactose et de jaune d'œuf (Baril *et al.* 1993).

### I.1. Les Protocoles communément employés

#### I.1.1. Conservation dans le lait

Le lait entier est considéré étant un milieu de conservation idéal pour la semence ovine car il apporte les constituants de bases aux spermatozoïdes phosphates, citrates et sucres. Il est simple à préparer et peu cher et sa dilution est rapide du fait de son pH 7 et son osmolarité de 280 mOsm/kg. Le lait est constitué en major partie de protéines qui vont jouer un rôle tampon pour préserver contre la modification du Ph d'une part et d'autre part c'est les lactofirines qui remplacent les transfirine qui se trouve au niveau de liquide séminal qui vont permettre la chélation de métaux lourds tel le fer donc prévenir contre la peroxydation lipidique des membranes.

Ensuite les glucides : dans l'état naturel le fructose est considéré étant une source d'énergie pour le spermatozoïdes au niveau du liquide séminal donc pour continuer à apporter une source d'énergie, un des constituant du lait va permettre cela et c'est le lactose, dont le rôle est de maintenir l'osmolarité.

Le lait entier doit être chauffé à 95°C pendant 10 min pour inactiver les enzymes toxiques, un complexe protéique toxique pour les spermatozoïdes. Au contraire, le lait UHT peut être utilisé sans traitement préalable, puisqu'il a déjà subi un traitement thermique.

Le plus utilisé est préparé à partir de poudre de lait écrémé de vache additionné de cholestérol ou de lécithine, de sels, de glucose, d'acides aminés (glycocolle, tryptophane, tyrosine) et d'antibiotiques (Laiciphos : IMV).

### ***1.1.2. Conservation à base de jaune d'œuf et des glucides***

Le jaune d'œuf est habituellement utilisé à l'insémination artificielle chez les ruminants. Il protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température.

Contrairement au lait écrémé, la conservation à base de jaune d'œuf et de glucides nécessite l'addition d'un tampon organique (TRIS) ou minéral (phosphate) mais ce dernier est moins efficace que le premier.

Le TRIS associé à du glucose et du jaune d'œuf peut être une alternative au lait (DRUART X., *et al*, 2009). 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.

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 n'ont pas observé de différence significative de mobilité entre le lait UHT et le Tris/Jaune d'œuf.

## **I.2. Dilueurs commerciaux**

Des dilueurs commerciaux sont disponibles pour la conservation des spermatozoïdes de différentes espèces. Ces diluants contiennent un agent protecteur d'origine animale ou végétale et ils peuvent être utilisés pour la conservation des spermatozoïdes en milieu liquide et/ou congelé. Nous allons détailler ci-dessous quelques-uns :

### ***1.2.1. Triladyl®*** (Minitüb, Allemagne)

Est un diluant à base de jaune d'œuf utilisé majoritairement pour la semence de taureau, mais il peut également être utilisé pour diluer les spermatozoïdes de bélier, de bouc et de chien (Barth AD, Bowman PA. revu dans Salamon S, Maxwell WMC, 2000 ; Santiago-Moreno J *et al.*, 2006)

### ***1.2.2. CAPROGEN®*** (LivestockImprovement, Nouvelle-Zélande)

Est un diluant pour la conservation de la semence bovine à température ambiante (18-24 °C) et est utilisé seulement avec de la semence qui garde un bon taux de fécondité pendant une période de quatre jours (Vishwanath R, Shannon P, 2000)

### ***I.2.3. Bioxcell®***

Est efficace pour conserver les spermatozoïdes de bélier que les diluants lait-jaune d'oeuf utilisés couramment lors de la cryoconservation et donne des taux de fertilité semblables (Gil J, Rodriguez-Irazaqui M et *al.* 2003)

### **I.3. Inconvénients des milieux commerciaux**

Un inconvénient des diluants commerciaux est que la composition est formulée pour conserver les spermatozoïdes d'une espèce en particulier. Présentement, la majorité des diluants disponibles sont conçus pour la conservation des spermatozoïdes de taureaux.

La composition des diluants commerciaux est tenue secrète, il est donc impossible de les modifier pour les utiliser pour d'autres espèces. De Paz et *al.* , en 2010 ont préparé un diluant à base de lécithine de soya pour conserver les spermatozoïdes de bélier. Ils ont observé que la température de préparation et de conservation des diluants affecte les lipides (formation d'émulsions), mais que ces effets étaient minimaux lors de la conservation à 5°C.

# *Réalisation Expérimentale*

## **I. Objectifs de l'étude et choix du cryoprotecteur**

L'insémination artificielle est considérée comme étant la biotechnologie la plus utilisée durant ces dernières années, elle est réalisée avec succès chez la race bovine, cependant, elle reste peu employée sur la race ovine vue la fragilité de la semence des petits ruminants vis-à-vis du froid, ce qui nous a dicté l'objectif du présent travail qui propose de perfectionner les techniques de conservation de la semence ovine et d'obtenir les meilleurs résultats possibles, en termes de qualité de la semence après réfrigération pour la race ovine locale.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II.1 Collecte de la semence**

Une fois les testicules récupérés de l'abattoir à 4 heures du matin et conservés à température ambiante, nous avons procédé à la collecte de la semence en employant la technique de rinçage rétrograde de l'épididyme dite « *flushing* ».

Tout d'abord, nous avons rincé soigneusement les testicules, puis nous les avons dénudé de leur vaginale et cela en réalisant une incision nette à l'opposé du complexe épидидymaire; par la suite, la dilacération de ce dernier est faite manuellement, ou à défaut en réalisant une petite boutonnière sous le corps de l'épididyme.



**Figure 06:** Testicule dénudé de sa vaginale.  
cliché personnel



**Figure 07 :** Isolement de l'épididyme.  
cliché personnel

Les vaisseaux présents dans la queue de l'épididyme doivent impérativement être vidés de leurs contenu à l'aide d'une aiguille, afin d'éviter toute contamination de la semence.

Le canal déférent est par la suite minutieusement isolé de sa gaine pour être distendu au maximum, se faisant, nous évitons l'accumulation du liquide de collecte qui sera injecté par la suite, ce dernier peut, en effet, se voir pris dans les replis du canal déférent à l'entrée de la queue de l'épididyme et rompre sous l'effet de la pression exercée.

Une fois le complexe épидидymaire isolé et le canal déférent individualisé, nous procédons au rinçage de ce dernier en introduisant une aiguille montée sur une seringue contenant 1 ml du milieu A, préalablement préparé, et 2 cc d'air, ce dernier servira à faire avancer la totalité du liquide injecté. Tout en appliquant une pression d'injection régulière et constante, nous devons vérifier l'intégrité du conduit, en contrôlant la progression du liquide injecté par la mise en évidence du gonflement des canaux séminifères superficiels (**Figure09**).

Enfin, une incision qui comprend aussi bien les canaux superficiels que les canaux profonds est pratiquée au niveau de la queue en région déclive, ainsi la semence est récupérée dans un Eppendorf, le volume obtenu est de **1,2 ml** de sperme pur.

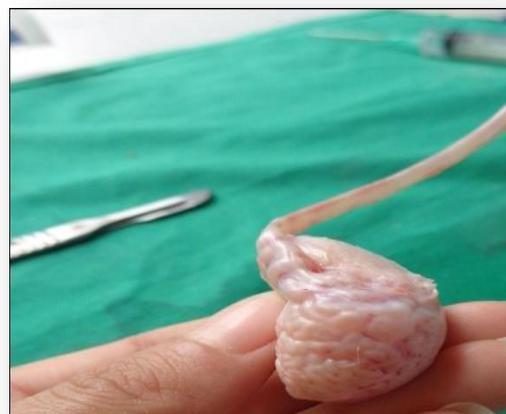
#### **Préparation de la solution A**

Au moyen d'une balance de précision à 2 chiffres, nous procédons à la pesée des composés suivant : Tris (hydroxy méthyle Amino-méthane), acide citrique monohydrate et Fructose, suivant le protocole de LONE (*LONE F.A et, al, 2012*), ainsi la composition comprendra : **3,028g** de Tris (hydroxy méthyleAmino-méthane), **1,70g** d'acide citrique monohydrate et de **1,25 g** de Fructose ; on diluera ces composés dans **100mL** d'eau distillée, on obtient ainsi la solution A.

**Solution A = Tris (3,028g) + Acide citrique (1,7g) +Fructose (1,25g) + 100ml d'eau distillée**



**Figure 08:** injection du liquide dans le canal déférent (cliché personnel).



**Figure09 :** gonflement des canaux. (cliché personnel)



**Figure 10:** récupération de la semence dans un eppendorf. (cliché personnel).

## **II.2. Calculs des taux de dilution**

Dans le but de préciser le taux de dilution que la semence peut supporter et de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherchés, on doit procéder à des dilutions préalablement calculées.

Après collecte et évaluation de la motilité massale (sur de la semence pure), les mesures du volume de l'éjaculat et sa concentration en spermatozoïdes sont utilisées afin de calculer le taux de dilutions toléré en cas d'insémination artificielle.

### ***II.2.1. effectuer les calculs***

Les scientifiques se sont accordés à standardiser la concentration spermatique, qui est définie par  $200 \cdot 10^7$  spermatozoïdes par millilitre, sachant que la concentration spermatique chez les ovins varie généralement de 2 à  $10 \cdot 10^9$  spermatozoïdes par millilitre, une dilution du sperme frais est nécessaire dans le but d'atteindre la concentration requise, pour cela on doit calculer le nombre de dilutions. Sachant que tout d'abord nous avons procédé au calcul de la concentration de la semence collectée à l'aide d'une Malassez, qui nous dicté une concentration de  $3.5 \times 10^9$  spz / ml.

#### **Calcul du nombre de dilutions :**

$$\text{Nombre de dilutions} = \frac{\text{concentration de notre semence fraiche}}{\text{concentration de la semence recherchée}} = \frac{3,5 \times 10^9}{2 \times 10^9} = 1,75\text{fois}$$

Le tableau ci-dessous résume les différents calculs :

**Tableau 01:** les différents calculs pour l'obtention d'un milieu avec une concentration connue.

Volume de la semence collectée	$V_0 = 1,2 \text{ ml.}$
Concentration spermatique initiale	$C_0 = 3.5 \times 10^9 \text{ spz /ml.}$
Concentration finale souhaitée	$C_f = 200 \times 10^6 \text{ spz /ml.}$
Volume total de la concentration souhaitée	$V_t = V_0 \times 1.75 = 2.1 \text{ ml.}$
Volume du dilueur à ajouter (solution A)	$V_A = V_t - V_0 = 2.1 - 1.2 = 0.9 \text{ ml.}$

Donc le volume du dilueur (solution A) à ajouter est de **0,9 ml**.

### II.2.2. Préparation de l'échantillon de référence

Une fois le volume de la solution A obtenu, on lui ajoute le volume de la semence collectée afin d'obtenir un milieu qu'on va appeler milieu B, qui contient une concentration connue, qui est  $200 \cdot 10^7$  spermatozoïdes par millilitre.

$$\text{Volume du milieu B} = V_0 + V_A = 1,2 + 0,9 = 2,1 \text{ ml milieu B}$$

### II.3. Composition des milieux

Notre étude va être portée sur quatre (4) milieux : milieu de *réfrigération*, milieu à **5% de glycérol**, milieu à **15% de glycérol** et un milieu *témoin* (*milieu A*) ; ces quatre milieux comportent une solution commune (Solution A) à différents volumes.

Le tableau ci-dessous résume la composition des différents milieux :

**Tableau 02 :** composition des solutions utilisées.

	<b>Solution A</b>	<b>Jaune d'œuf</b>	<b>Glycérol à 5%</b>	<b>Glycérol à 15%</b>
Solution Témoin.	<b>99ml</b>	--	--	--
Solution de Réfrigération.	<b>8ml</b>	<b>2ml</b> (20% de jaune d'œuf)	--	--
Solution à <b>5%</b> de glycérol.	<b>7.95ml</b>	<b>2ml</b> (20% de jaune d'œuf).	<b>0.05ml</b>	--
Solution à <b>15%</b> de glycérol.	<b>7.85ml</b>	<b>2ml</b> (20% de jaune d'œuf).	--	<b>0.15ml</b>

## **II.4. Protocoles**

Afin d'évaluer la semence à des temps différents (**H0, H6, H18, H24, H36, H48, H56**), nous avons préparé pour chacun des quatre (4) milieux précédemment décrits, six eppendorfs d'un millilitre bien étiquetés. (**Figure 11**)



**Figure 11** : préparation des eppendorfs.  
(cliché personnel)

### ***II.4.1. Milieu A***

Dans les six eppendorfs, on a mis **0,9 ml** de la solution A et **0,1 ml** du **milieu B**.

### ***II.4.2. Milieu de réfrigération***

Tout d'abord nous avons procédé à la récupération du jaune d'œuf, (**figure 12**) au moyen d'une aiguille, on a incisé la membrane vitelline on l'a écarté doucement pour éviter tout contact de cette dernière avec le vitellus vue que ses composants ont un effet spermicide, ensuite avec une seringue on a aspiré **2ml** de jaune d'œuf, qu'on dilue dans **8ml** de solution A.



**Figure 12**: Incision de la membrane vitelline et récupération du jaune d'œuf. (cliché personnel).

Ultérieurement, dans les six eppendorfs, on a mis **0,9 ml** de la solution de réfrigération (20% de jaune d'œuf) et **0,1 ml** du milieu B.

#### ***II.4.3. Milieu à 5% de glycérol***

Nous avons combiné **7,95 ml** de solution A avec **2ml** de jaune d'œuf et **0,05 mg** de glycérol ensuite dans les six eppendorfs, on a mis **0,9 ml** de cette solution et **0,1 ml** du milieu B.

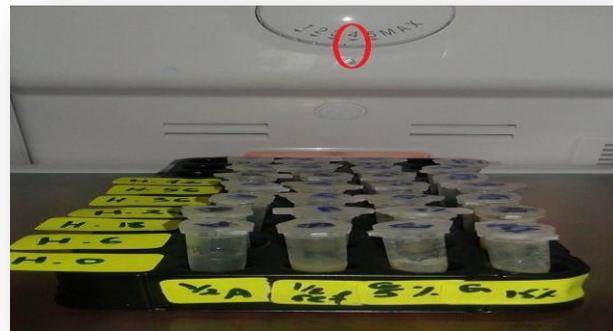
#### ***II.4.4. Milieu à 15% de glycérol***

Dans un bécher, nous avons mélangé **7,85 ml** de solution A avec **2ml** de jaune d'œuf et **0,15mg** de glycérol, puis dans les six eppendorfs, on a mis **0,9 ml** de cette préparation et **0,1 ml** du milieu B.

Ensuite nous avons passé tous les Eppendorfs au vortex, ensuite au réfrigérateur à **4°C**.



**Figure 13:** passage de tous les milieux au vortex. (cliché personnel)



**Figure 14:** réfrigération des eppendorfs à 4°C. (Cliché personnel)

La dépréciation de la qualité de la semence n'ayant pas été probante au bout des 48 premières heures, nous avons jugé nécessaire d'étendre notre champs de lecture à 72 heures, ce faisant nous optimisons encore mieux la chance de voir se démarquer une différence significative entre les différents milieux étudiés. Nous avons donc eu à optimiser le dernier Eppendorf en en partageant le volume en deux. Au total, nous obtenons un effectif total de 07 Eppendorf par milieu.

### **III. Résultats**

#### **III.1. Résultats de la collecte**

Nous avons gardé un testicule sur les deux récupérés, on a collecté 1,2 ml de sperme du premier par contre le second était vide, cela nous laisse prédire que le deuxième bélier a dus certainement éjaculer juste avant l'abattage.

##### ***III.1.1. Evaluation macroscopique***

Il s'agit de la première étape après la collecte et avant toute manipulation de la semence, elle comprend différents examens (volume, couleur, pH et viscosité) qui permettent d'apprécier la qualité de la semence, et de la trier.

Un sperme de bonne qualité a un volume moyen de 4 à 5mL, de couleur Ivoire-crème et inodore. Une couleur brunâtre ou rosée est pathologique tout comme une odeur anormale.



**Figure15:** sperme pur du premier testicule.  
(cliché personnel)

**Tableau 03:** résultats de l'examen macroscopique du sperme après la collecte.

<b>Volume</b>	<i>1.2ml</i>
<b>Couleur</b>	<i>Ivoire- crème</i>

### ***III.1.2. Evaluation microscopique***

Cet examen s'effectue sur du sperme pur (motilité massale) et du sperme dilué (mobilité individuelle et viabilité), pour cela il faut conserver la semence aussitôt dans une température de 37°C.

#### ***III.1.2.1. Motilité massale***

Elle se fait immédiatement après la récolte du fait de la sensibilité du sperme à la lumière et aux chocs thermiques.

Une goutte de sperme pur est déposée sur lame chauffée à 37°C, puis nous observons au microscope (x80) le mouvement en vague des spermatozoïdes qui forment des tourbillons plus ou moins rapides (EILTS., 2004).

Un sperme de bonne qualité présente un aspect tourbillonnant qui évolue en vague.

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

#### ***III.1.2.2. La Motilité individuelle***

Elle se fait après dilution du sperme, elle permet de déterminer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et leurs trajectoires.

Nous plaçons 10 µl du sperme dilué 10 fois entre une lame et une lamelle sur une plaque chauffante, nous passons ensuite à l'observation de 5 champs différents sous microscope au grossissement (x40).

- 0=** aucuns mouvements
- 1=** Légers mouvements
- 2=** Mouvements rapides
- 3=** Mouvements très rapides
- 4=** Mouvements fléchant
- 5=** Tourbillons

### III.1.2.3. La concentration de la semence collectée

L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure. Afin de déterminer si elle est compatible avec une fécondation ou non. Plusieurs techniques existent pour mesurer cette concentration.

Nous avons choisi la technique dont le principe est le comptage exact des spermatozoïdes avec un hématimètre (Malassez), c'est une lame quadrillée dont le volume est déterminé par la surface du quadrillage et par la profondeur de la chambre qui sont gravés dessus. Cette technique est précise et peu coûteuse.

On procède au dénombrement des cellules spermatiques sous microscope optique au grossissement X200 présentes dans un volume déterminé ( $1\text{mm}^3$ ).

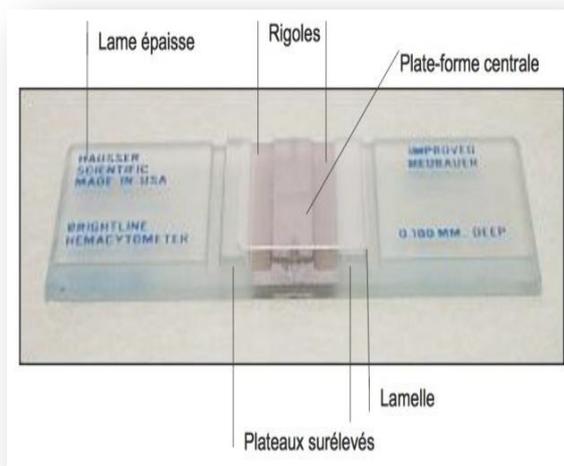
$$N \times D \times \text{nbr de rectangles} \times V = 172,25 \times 200 \times 100 \times 10^3 = 3,5 \times 10^9 \text{spz/ml}$$

**N** : le nombre de cellules comptées (une moyenne sur 5 numérations).

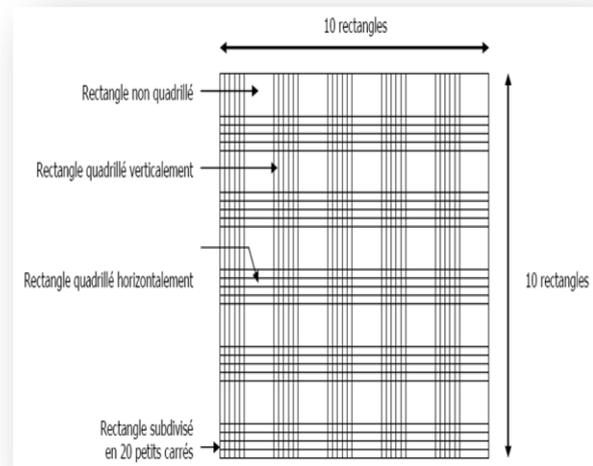
**D** : la dilution de 1/200.

Nombre de rectangles de la Malassez : 100

Volume d'un rectangle :  $1\text{mm}^3 = 10^{-3}$ .



**Figure 16** : lame Malassez.  
(Boumenjal, A)



**Figure 17** : Quadrillage Malassez  
(Boumenjal, A).

III.1.2.4. Test de gonflement hypo-osmotique (HOST)

*Hypo-Osmotic Swelling Test*, est un test qui permet d'évaluer l'intégralité membranaire des spermatozoïdes qui intervient dans la capacitation et la réaction acrosomique nécessaire à la fécondation lors de la fusion avec l'ovocyte (Jeyendran, 1984). Il fut adopté dès 1966 sur les spermatozoïdes de taureaux, de lapin et d'hommes par (Drevius et Eriksson). Mais c'est (Jeyendran et al.) Qui en 1984 utilisèrent ce test en vue d'évaluer la fonctionnalité de la membrane plasmatique.

Pour réaliser ce test, la semence est mélangée à une solution hypotonique dont la composition et l'osmolarité sont déterminées pour chaque espèce, pour notre expérience 2 V d'eau distillée ont été mélangées avec 1V de semence. Le mélange est incubé à 37°C pendant 45 minutes, puis les spermatozoïdes sont observés au microscope optique. Les spermatozoïdes dont la membrane est intègre se déforment c'est ce qui indique leur vitalité. Ces spermatozoïdes se reconnaissent à leur flagelle qui se recourbe ou s'enroule (Jeyendran, et al.1984). Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g » (Figure18)

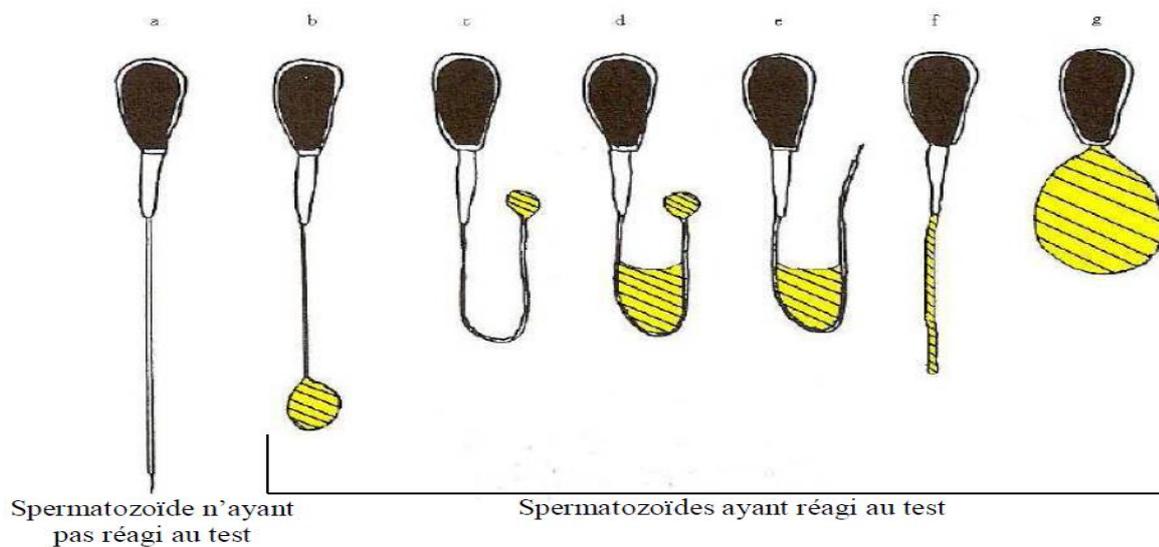


Figure18: Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo osmotique. (Jeyendran, 1984).

Le tableau ci-dessous reprend les valeurs notées au cours de l'évaluation microscopique :

Tableau 04 : résultats microscopique du sperme après la collecte.

Motilité massale	5
Motilité individuelle	5
Concentration	3.5× 10 <sup>9</sup> spermatozoïdes /ml

### III.2. Résultats des essais

Avant d’entamer la présentation de nos résultats, il nous a semblé important de souligner qu’une étude statistique des différences résultats observées entre ces derniers aurait donné une interprétation plus précise quant aux variations qui sont survenues.

#### III.2.1. Résultats globaux en fonction de l’heur de lecture

Pour l’appréciation, de la mobilité et la vitalité de la semence après réfrigération, nous avons effectué deux tests, la motilité individuelle et le test HOS et ce, pour chacun des quatre milieux.

La lecture des résultats s’est faite à **H0, H6, H18, H24, H36, H24, H48, H56, H72**, comme recommandé dans la littérature.

#### Résultats recueillis à H0

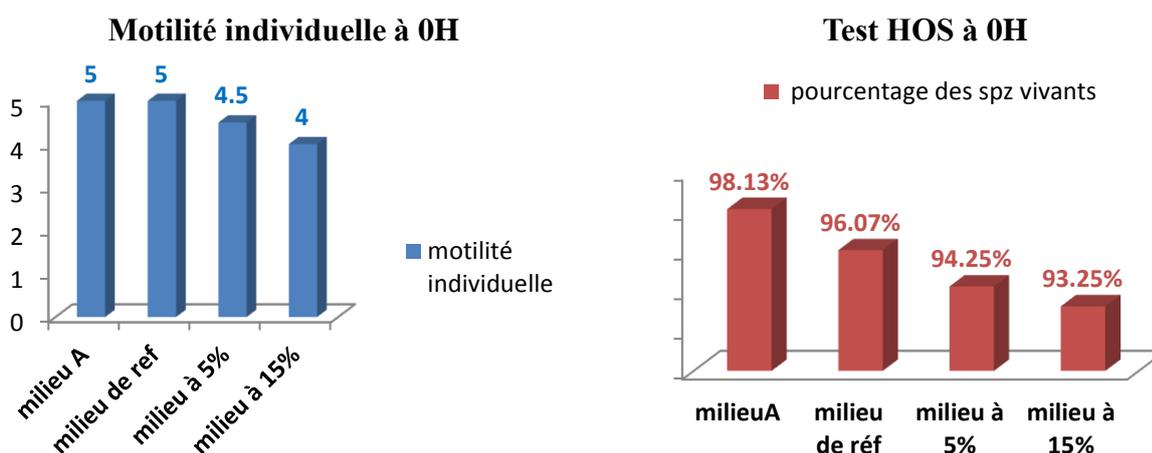
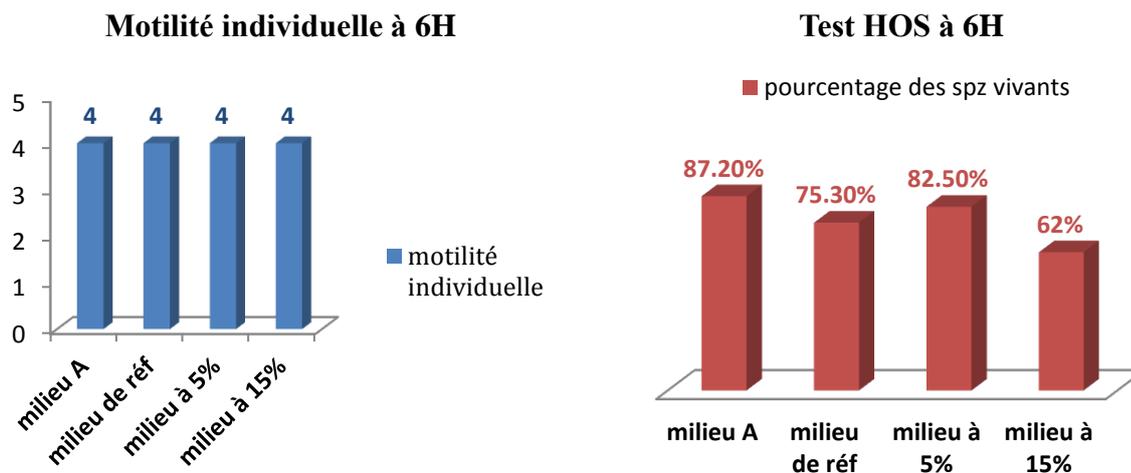


Figure 19: Graphes représentant l’évaluation à 0H

*Le milieu A* et le *milieu de réfrigération* maintiennent les valeurs de la mobilité et celles de la vitalité observées à l’état frais, tandis que les milieux à **5%** et **15%** présentent une légère baisse de valeurs.

Ces variations ne peuvent à elles seules mettre en exergue une quelconque action des cryoprotecteurs sitôt après la mise en place des protocoles d’étude.

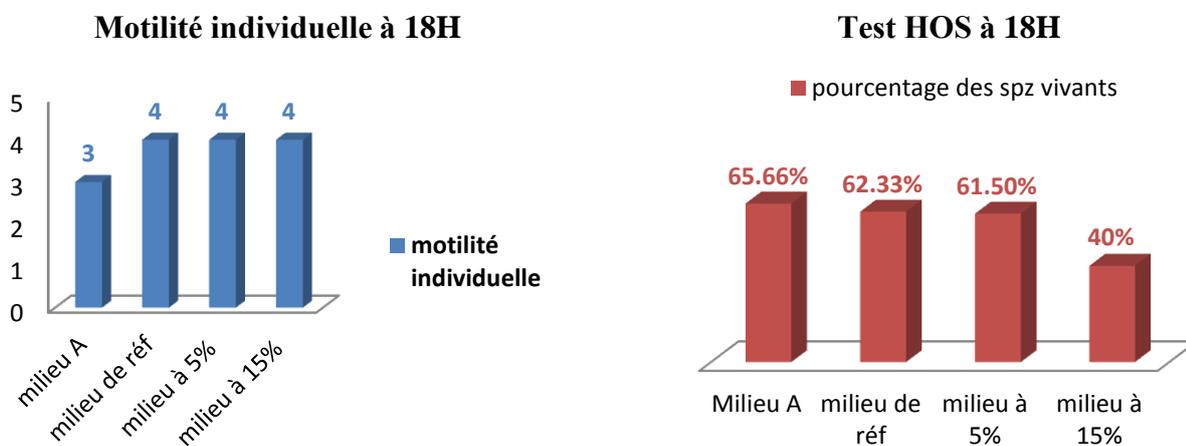
**Résultats recueillis à H6**



**Figure 20:** Graphes représentent l'évaluation à 6H

Nous constatons une mobilité invariable dans les quatre milieux, ce qui n'est pas le cas de la vitalité qui se voit diminuer dans le milieu de réfrigération et le milieu à 15% de glycérol comparativement à la légère diminution dans les milieux A et à 5% de glycérol.

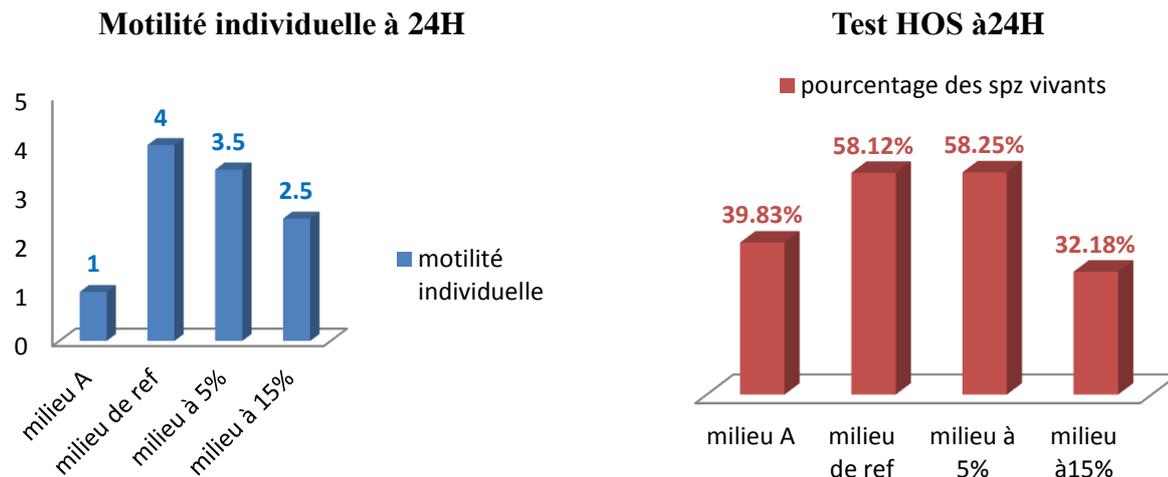
**Résultats recueillis à H18**



**Figure 22 :** Graphes représentent l'évaluation à 18h

On observe un début de diminution de la mobilité dans le milieu A, alors qu'elle reste constante dans les autres milieux, par ailleurs, la vitalité continue sa décroissance qui est plus remarquable dans le milieu à 15% de glycérol, ce qui laisse penser à une toxicité éventuelle comme rapporté dans la littérature.

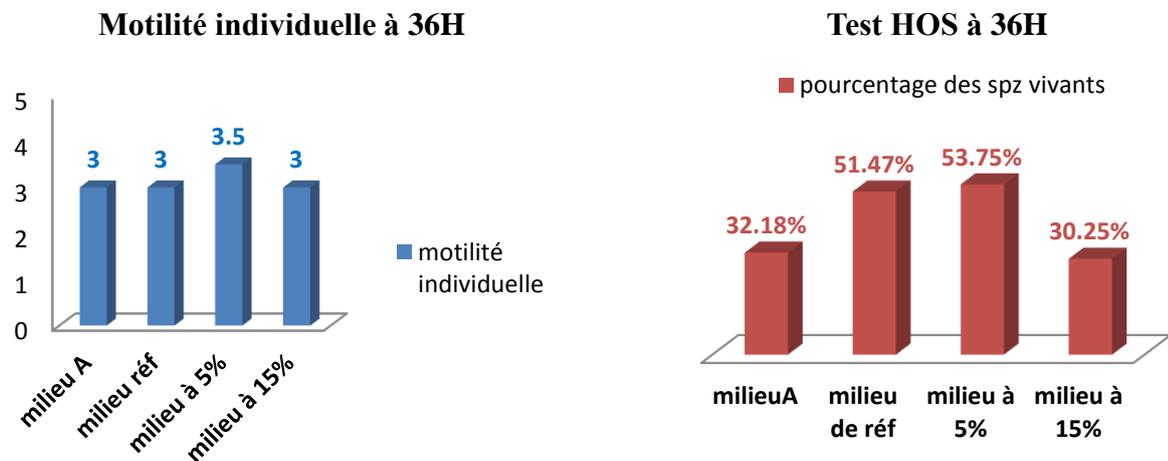
**Résultats recueillis à H24**



**Figure 23:** Graphes représentent l'évaluation à 24 H

On note une diminution conséquente de la mobilité et la viabilité dans le milieu A et le milieu à 15% de glycérol, bien qu'elles soient maintenues dans le milieu de réfrigération et le milieu à 5% de glycérol.

**Résultats recueillis à H36**

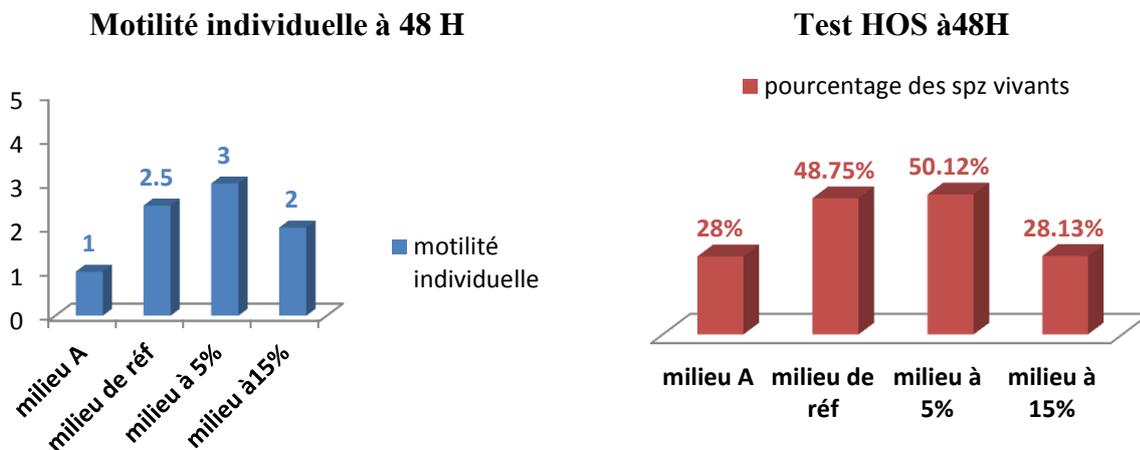


**Figure 24 :** Graphes représentent l'évaluation à 36 H

Une diminution uniforme des valeurs est observée dans les quatre milieux, le froid semblerait exercer une action à H36 en dépit de l'action des agents de protection.

**N.B :** la valeur de la mobilité qui a été attribuée au milieu A est due au stress oxydatif qui s'est manifesté dans l'heure d'évaluation précédente.

**Résultats recueillis à H48**

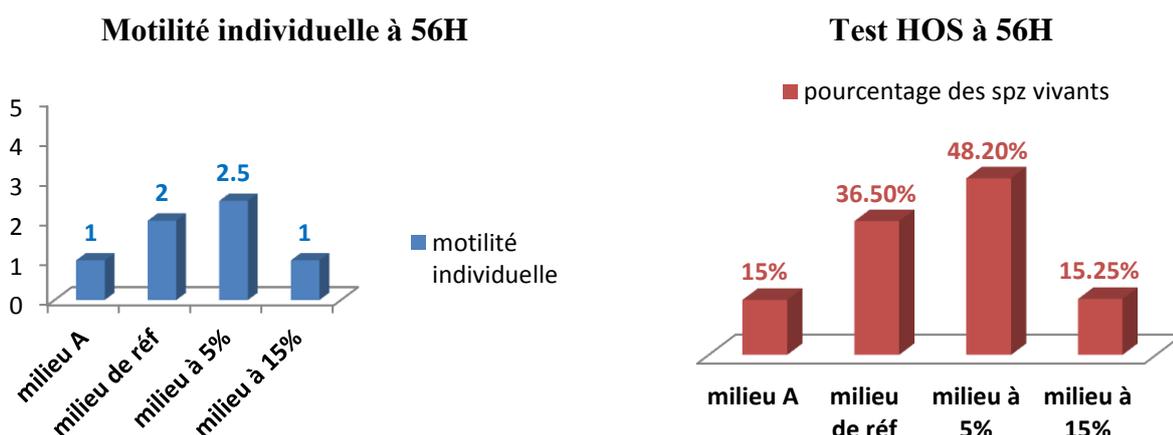


**Figure 25 :**Graphes représentent l'évaluation à 48H

On observe une diminution importante de la motilité et la vitalité dans le milieu A et le milieu à 15% de glycérol, alors qu'elle est moins importante dans les milieux de réf et à 5% de glycérol.

Ceci pourrait être expliqué, pour ce qui est du milieu A par l'absence d'agent protecteur alors que pour le milieu à 15% de glycérol, l'effet cytotoxique pourrait être envisagé.

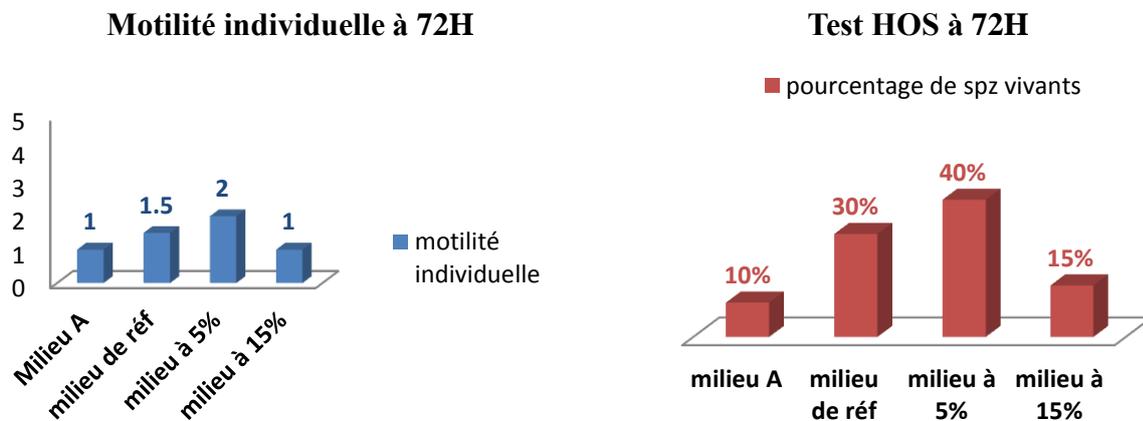
**Résultats recueillis à 56H**



**Figure 26:** Graphes représentent l'évaluation à 56 H

On note une décroissance importante de la motilité et de la vitalité dans tous les milieux, à l'exception du milieu à 5% de glycérol où la vitalité est plus au moins conservée, ce qui démarque ce milieu et envisagerait son efficacité au gré des heures.

**Résultats recueillis à 72H**

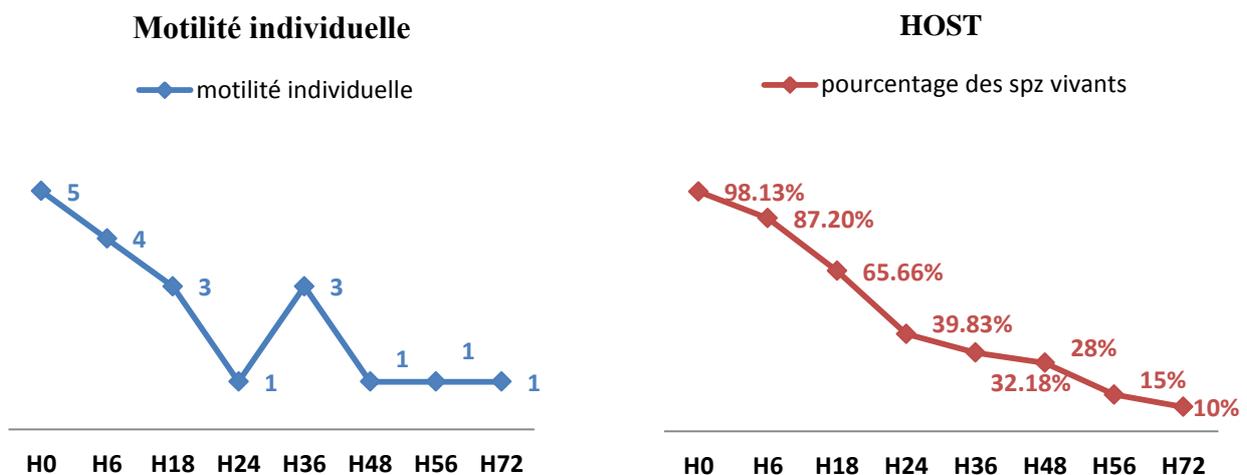


**Figure 27 :** Graphes représentent l'évaluation à 72 H

L'effet délétère du Milieu A par l'absence d'agent protecteur et celui du milieu concerté à 15 % de glycérol par son action cytotoxique se démarque clairement à **H72** où l'on observe une chute des valeurs à 1 pour ce qui est de la mobilité individuelle et 10% et 15% respectivement pour le HOST.

**III.2.2. Résultats détaillés par milieu et discussion**

Nous allons étudier l'évolution de chaque milieu dans le temps ; Notre étude a abouti aux résultats suivants :



**Figure 28 :** Graphes représentent les résultats du Milieu A

On constate une diminution de la motilité et de la vitalité de **H0** jusqu'à **H72** et qui est plus prononcée à partir de **H18**, en dépit de la valeur de la motilité individuelle à H24, celle observée lors du HOST n'indique une inefficacité de ce milieu qu'à partir de **H48** (valeurs se rapprochant des 20%).

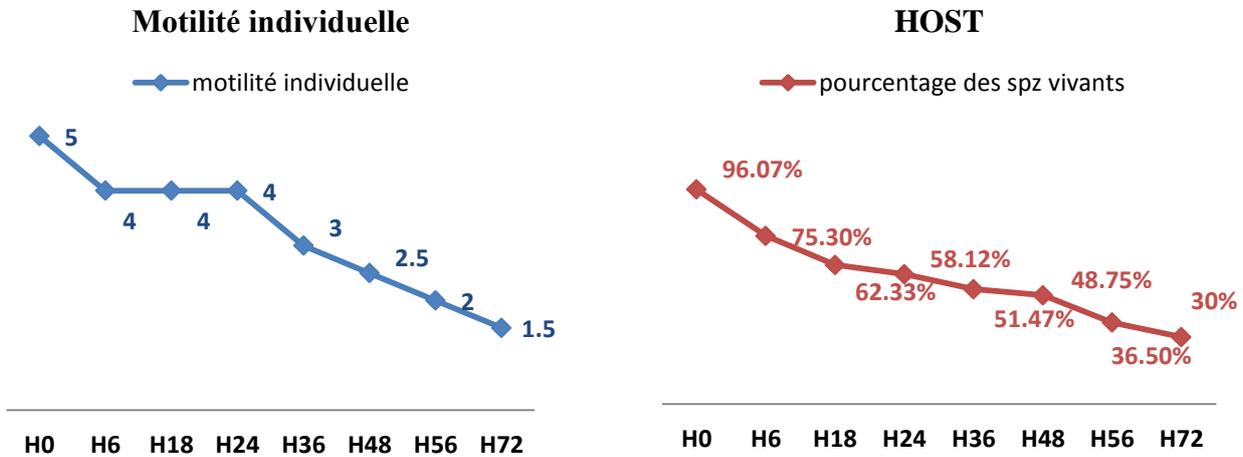


Figure 29: Graphes représentent les résultats du Milieu de réfrigération

Une diminution progressive de la motilité et de la viabilité s'observe pour le milieu de réfrigération mais qui conserve le pouvoir fécondant de la semence même au-delà de **H72**.

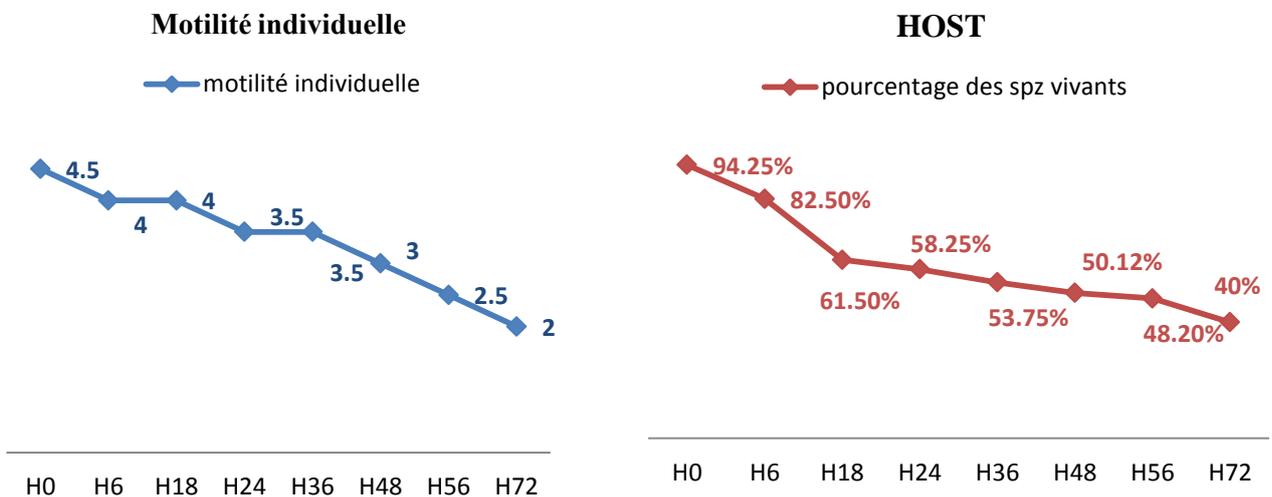
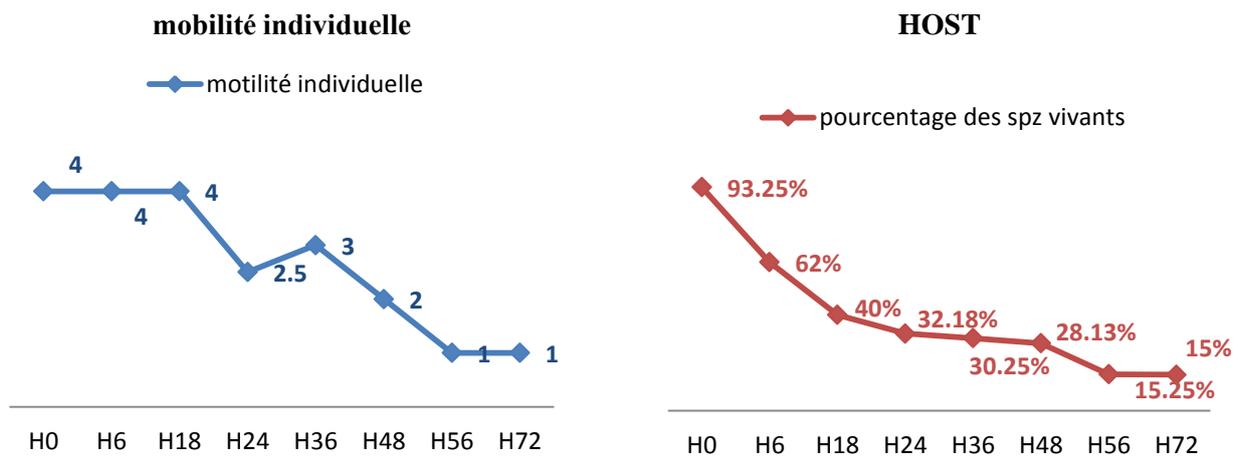


Figure 30 : Graphes représentent les résultats du Milieu à 5% de glycérol

Une diminution progressive mais moins marquée que pour le reste des milieux est observée pour le milieu concentré à 5% de glycérol. Ce milieu semblerait être, comparé aux autres milieux de l'essai, le meilleur conservateur de la semence en termes de motilité individuelle et de vitalité, ceci est observable au travers des chiffres recueillis (un score de 2 pour la motilité individuelle) et

un taux de **40 %** le HOST à **H72**.



**Figure 31** : Graphes représentent les résultats du *Milieu à 15% de glycérol*

La mobilité et la vitalité diminuent rapidement pour le milieu concentré à **15%** de glycérol, les valeurs relevées à **H48** suggèrent un début d'inefficacité de la semence soumise à ce protocole. L'effet cytopathique semblerait, là aussi, être mis en cause.

## **IV. Discussion**

La conservation à court terme des spermatozoïdes est une méthode qui garantit la préservation du matériel génétique ainsi que la diffusion de ses progrès.

Pour les besoins pédagogiques et dans certains cas médicaux, le rinçage épидидymaire est l'une des méthodes les plus accessibles pour l'obtention d'une semence dépourvue de liquide séminal, possédant le même pouvoir fécondant qu'un sperme éjaculé.

L'objectif de notre travail consistait à mettre en application cette technique de collecte ainsi que la réfrigération à 4°C de la semence obtenue et ce, dans différents milieux, dont deux comprennent différentes concentrations de glycérol à savoir 5% et à 15%.

L'insémination artificielle ovine repose principalement sur l'utilisation de la semence fraîche avec une durée de vie très limitée ce qui restreint par la suite sa diffusion.

Le recours à cette technique est due à la faible fertilité de la semence congelée (10-20%) (Druart *et al.* 2009).

### **IV.1. De la thématique de recherche**

#### ***IV.1.1. De la technique de collecte***

Il existe plusieurs méthodes qui nous permettent l'obtention d'un sperme épидидymaire, nous allons ci-dessous détailler deux d'entre elles :

La première est la technique de rinçage épидидymaire dite aussi, technique de lavage rétrograde « flushing », réalisée par l'injection d'un volume connu de milieu A dans le canal déférent ce qui nous permettra de tout récupérer par une incision déclive au niveau de la queue de l'épididyme. Le pouvoir fécondant de ce sperme n'est pas différent de celui obtenu lors de l'éjaculation en fertilité ou en prolificité (Y. Guérin *et al.* 2003).

Contrairement à la technique « *Float-up* » qui est réalisée à la faveur d'une dissection, incision et incubation pendant 30 min à 38°C de l'épididyme dans une boîte de pétri contenant du milieu PBS (solution saline tamponnée au phosphate contenant 0.3% de sérum de veau foetal). Pour libérer les spermatozoïdes, celle-ci nous a semblé plus longue à mettre en œuvre par rapport à la précédente, c'est ainsi que notre choix s'est portée sur la première.

### ***IV.1.2. Du choix des paramètres d'évaluation de la qualité de la semence***

Pour évaluer la qualité de la semence recueillie, nous nous sommes référés, d'une part, au test hypo-osmotique qui se fait impérativement lors du choix des spermatozoïdes en vue d'utilisation dans les biotechniques spermatiques, à la faveur de la mise en évidence de l'intégrité membranaire et d'autre part, à la mobilité individuelle qui est considérée étant une méthode subjective qui reflète la fertilité (Saacke and White, 1972 et de Del Olmo E, 2013)

Nous avons procédé à l'analyse de ces deux paramètres sur une semence réfrigérée à **h0, h6 h12, h18, h24, h36, h48, h56 et h72**.

### ***IV.1.3. Du choix des milieux de réfrigération***

Lors de nos manipulations, nous avons utilisé un milieu de réfrigération composé de Tris à **3.028%**, de fructose à **1.25%**, d'acide citrique monohydrate à **1.70%** et de jaune d'œuf à **20%** dans de l'eau distillée. Le travail de Lone (*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.

## **IV.2. Discussion des résultats après la réfrigération**

La diminution de la température à 4°C n'induit pas significativement une baisse de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes (MICLEA V., *et al*, 2010). Nos résultats à **H0** pour le *milieu A* et le milieu de réfrigération l'affirment, puisque ces deux paramètres sont identiques à ceux observés lors de l'évaluation post-collecte.

Pendant les **18 H** premières heures, la viabilité reste plus au moins stable dans tous les milieux à l'exception du milieu à **15%** de glycérol où l'on constate une diminution qui serait due à l'effet toxique d'une concentration élevée en glycérol, ces mêmes résultats ont été démontrés par MICLEA V., *et al*, 2010.

Après **24H** de réfrigération, nos résultats démontrent que le milieu à **5%** de glycérol maintient le pouvoir fécondant de la semence ceux-ci viennent soutenir les résultats de MORRIER A., *et al*. 2002 qui lui a utilisé le glycérol à **7%** et qui a démontré que cette concentration n'influence ni la mobilité ni la vitalité des spermatozoïdes sur les premières **24 H**.

A partir de **36H** la mobilité dans le milieu à **5%** de glycérol devient plus importante à celle du milieu de réfrigération. Nos résultats sont contradictoires à ceux observés chez SMATTI et MEKKI 2013 qui ont trouvé une mobilité élevée dans le milieu de réfrigération par rapport aux autres milieux durant toutes les évaluations.

A partir de **24heures**, la viabilité décroît dans tous les milieux surtout le milieu A et le milieu à **15%** de glycérol, tandis que le milieu de réfrigération et le milieu à **5%** de glycérol diminue de façon lente.

## **V. Conclusion**

L'objectif de notre travail vise à combiner un milieu de conservation à court terme adéquat pour préserver le pouvoir fécondant optimal de la semence le plus longtemps possible et par conséquent permettre le succès ultérieur de l'insémination artificielle chez les petits ruminants.

Notre expérimentation nous a permis de certifier que l'addition d'un cryoprotecteur pénétrant tel que le glycérol à des doses non toxiques dans le milieu de dilution amende la survie des spermatozoïdes lors de la réfrigération, contrairement à un milieu qui contient seulement un cryoprotecteur non pénétrant comme le jaune d'œuf.

Comparativement au milieu à **15%** de glycérol, le milieu à **5%** donne de bons résultats en termes de viabilité et mobilité des spermatozoïdes. Nous avons constatés que le glycérol à des concentrations minimales n'est pas toxique mais qu'au contraire, il a un effet protecteur sur la cellule.

Les résultats de notre travail suggèrent qu'il est possible de réfrigérer de la semence d'ovin en Algérie dans un milieu contenant du glycérol à **5%** et **20%** de jaune d'œuf.

Tenant compte de l'intérêt qu'offre la réfrigération en termes de préservation d'animaux d'élite et de sauvegarde du patrimoine génétique des races locales, d'autres études, plus approfondies, s'avèrent nécessaires.

## **VI. Recommandations**

Les travaux sur la cryobiologie en générale et la réfrigération en particulier sont peu nombreux dans le monde, à plus forte raison en Algérie. Les résultats obtenus à l'issue de notre démontrent clairement l'efficacité de certaines molécules dans la préservation des caractéristiques fonctionnelles de la semence ovine jusqu'à 72h après sa récolte. Cependant, et afin de prétendre à des résultats plus probants et statuer sur l'efficacité d'autres molécules à effets potentialisant, il est recommandé de :

- Etendre la période de lecture au-delà de **72h** afin de démarquer encore mieux les milieux testés ;
- Réitérer les tests employés afin de nous assurer de la répétabilité des résultats obtenus ;
- Tester de nouvelles molécules et comparer leurs effets entre elles et les éventuels effets potentialisant ;
- Envisager de mener des études semblables sur du sperme éjaculé afin d'en identifier les variantes du point de vue du comportement des molécules ;
- Entreprendre des travaux similaires sur la semence des caprins afin de pouvoir extrapoler les effets des molécules testés sur la semence des petits ruminants.

# *Références Bibliographiques*

# A

---

**Ada Rota.**, Chiara Milani., Giorgia Cabianca., Marco Martini., *Comparaison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation*. Theriogenology 65, 1848–1858. (2006).

**Allaoui Assia.**, *Etude des principaux facteurs de variation de la production de semence par les béliers géniteurs de race ouled djellal*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister année universitaire université de Batna (2012).

**Allimant Marie.**, *actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon.*, claud-bernard - lyon pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, pages 127 (2010).

**Amorim C.A.**, Rondina D., Rodriguesb A.P.R., Furtado Costa S.H., Dias Gonc P.B., De Figueiredo J.R., Giorgetic A., (2003) *Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol*, Theriogenology 60 ., 735–742.

**Arranz J.M.**, G.Lagriffoul., Y.Guerin., P.Chemineau., *maitrise de la reproduction spermatique des béliers par des traitements associant la lumière et l'utilisation de mélatonine 22-26* (1995).

**Audrey Chanvallon.**, Maria-Teresa Pellicer-Rubio., Laurent Shibler., *Maitrise de la reproduction dans les élevages de petits ruminants s'inscrivant dans un objectif d'élevage biologique*. casdar reprobio , pages 8. (2013).

# B

---

**Belkadi S.**, Alloui N., Belkacem L., Aissi A., Safsaf B., Djaaba M., Idir K., *Etude de la vitalité et de la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires conservés à 4°c chez la race Ouled Djellel*. Renc. Rech. Ruminants, pages 20. (2013).

**Belkasmi Farida.**, *Effet de la synchronisation et de l'insémination artificielle sur les performances de reproduction et la productivité de l'élevage ovin dans la région semi aride Algérienne*. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister, université Ferhat Abbas Sétif. (2012).

**Bencharif D.**, L. Amirat-Briand., J. Le Guillou., C. Vialtelle., M. Anton., E. Schmitt., S. Des-Herces., P. Barriere ., D. Tainturier., *Refrigeration of canine sperm at + 4°C: Comparative study of four different extenders for the refrigeration.* Revue Méd. Vét 252-262.(2013).

**Benson J.D.**, E.J. Woods., E.M. Walters., J.K. Critser., *The cryobiology of spermatozoa.* Theriogenology 78, (2012).

**Boivin C.**, *effet de l'intensité lumineuse sur le contrôle de la reproduction chez la brebis et sur la croissance des agneaux.* Thèse en guise d'obtention du grade de Maître de Sciences université LAVAL Québec, 161 pages. (2007).

**Boumendjel M.**, Massara Amel., *la culture cellulaire chapitre cinq*, cours de techniques immunologiques, département de biochimie faculté des Annaba.

**Boussena Sabrina .**, *Performances de reproduction chez les ovins Ouled Djellal : Avènement de la puberté et évolution des caractéristiques séminales chez le mâle jusqu'à l'âge de 1 an.*, these pour l'obtention du diplôme de doctorat es sciences, institut des sciences vétérinaires, Constantine(2013).

## C

---

**Chanvallon A.**, Pellicer Rubio M.T., Shibler L., *Maitrise de la reproduction dans les élevages de petits ruminants s'inscrivant dans un objectif d'élevage biologique.* casdar reprobio (2013).

**Chemineau P .**, B. Malpoux, Y .Guérin., F.Maurice, A.Danveau *et al.*, *Lumière et mélatonine pour la maitrise de la reproduction des ovins et des caprins* 247-257 (1992).

**Christiani Andrade Amorim.**, Davide Rondina., Ana Paula Ribeiro Rodriguesb., Sonia Helena Furtado Costa., Paulo Bayard Dias Gonc., Sonia Helena Furtado Costa., Jose Ricardo De Figueiredo., Alessandro Giorgetic., *Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol.* Theriogenology 60, 735–742.(2003).

**Christine Richard.**, *La mélatonine pour prolonger la saison sexuelle.* Bulletin Alliance Pastorale N°817.( 2011).

**Claude Gazeau.**, Jean Dereuddre., *Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire.* Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 133:3, 41-64.(1986).

**Colas G.**, Dauzier L., Courot M., Ortavant R., Signoret J.-P, *Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine*, Annales de zootechnie 17 (1968) 47-57

**Colas G.**, Personni D., Courot M., Ortavant R., *Influence du rythme de la récolte sur la production de spermatozoïdes chez le jeune bélier Romanov*. Ann.Zootech., 24 (1975) 189-198.

## D

---

**Druart X.**, Cognie J., Baril G., Clement F., Dacheux J.L., Gatti J.L., *Etude in vivo par endoscopie à fluorescence du transport et des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital femelle*, Renc. Rech. Ruminants 15 (2008).

**Dunner. S.**, I.vasquez., *Effets de milieux de conservation à base de substances amino-organiques sur la qualité de la semence de bouc mesurée in vitro après conservation à +15° C ou +5° C*. Arch. Zootech. 40 : 391-401 (1991).

## E

---

**Element-Boulianne C.**, *influence d'un programme photopériodique alternant les jours longs et les jours courts sur la capacité de reproduction chez le bélier*. Thèse en guise d'obtention du grade de Maître es Sciences université Laval Québec, 125 pages (2012).

## F

---

**Fascicule De Brevet Europeen.**, *Méthodes de conservation du sperme et ses applications*. Numéro de publication internationale. (2011)

**Felipe Martinez-Pastor.**, Maria Mata-Campuzano., Manuel Álvarez-Rodriguez., Julio Tamayo-Canul., Elena Lopez-Urueña., Paulino De Paz., Luis Anel., Mercedes Álvarez. *Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time*. INDEGSAL; University of León, 24071, León, Spain.

**François Castonguay, Ph. D.,** *La reproduction chez les ovins.* Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc de Lennoxville, Département des sciences animales, Université Laval, Québec.139p (2012).

## G

---

**Gabina D.,** Bougler J., Tisserand J.-L., *Les nouvelles techniques de reproduction et les programmes de sélection chez les ovins laitiers. Les petits ruminants et leurs productions laitières dans la région méditerranéenne.* Montpellier CIHEAM, 49-55 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 12 ). (1990).

**Gazeau C.,** Dereuddre J., *Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire.* *Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques* 41-64. (1986).

**Guignot F.,** *Cryoconservation des embryons des espèces domestiques.* INRA, Prod. Anim18 27-35. (2005).

## J

---

**Janice L.,** Bailey., François W., Castonguay, *Amélioration du diluant destiné à la semence ovine fraîche et cryoconservée par l'ajout de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine saturée en cholestérol (MBCLC).* (2004).

**Janice L.,** BAILEY., FRANÇOIS W., CASTONGUAY., *Amélioration du diluant destiné à la semence ovine fraîche et cryoconservée par l'ajout de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine saturée en cholestérol (MBCLC).* (2004).

**Johanne Cameron.,** *Guide de référence sur la photopériode. Paramètres de succès pour l'utilisation des nouveaux programmes lumineux AAC type CC4.* Guides techniques en production.(2008).

**John Ryan., Ph.D.** *Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales.* Corning Incorporated Life Sciences Lowell, MA 01851, USA.

# L

---

**Lahnsteiner F.**, B. Berger., A. Horvath., B. Urbanyi., T. Weismann., *Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes*. *theriogenology* 54, 1477-1496.(2000).

**Lahnsteiner F.**, B. Berger.,T. Weismann., *Effects of media, fertilization technique, extender straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen*. *Theriogenology* 60, 829–841. (2003).

**Lahnsteiner F.**, Berger B., Weismann T., *Effects of media, fertilization technique, extender straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen.*, *Theriogenology* 60 (2003). 829 –841.

**Ledda.S .**, G. Leoni., L. Bogliolo., S. Naitana., *Ovocyte cryopreservation and ovarian tissue banking*. *theriogenology* 55, 1350 -1371 (2001).

**Lone F.A.**, Islam R., Khan M.Z., Sofia K.A, *Effect of different egg yolkbased extenders on the quality of ovine cauda epididymal spermatozoa during storage at 4°C*. *Repro. Dom. Anim* 47. 257-262. (2012).

**Lucas H.**, A. D'Agostini., *Aspects biologiques de la fertilité masculine 2*. Evaluation de la semence humaine (2003).

# M

---

**Maher G.**, *comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insémination artificielle chez la chèvre*, 114 pages .,(2012).

**Malpaux B.**, Maurice-Mandon F ., Daveau A., Chemineau P., *Utilisation de la lumière et de la mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins*. *Renc. Rech. Ruminants*, 379- 386. (1995).

**Malpaux B.**, Maurice-Mandon F., Daveau A., Chemineau P., *Utilisation de la lumière et de la mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins etdes caprins*. *Renc. Rech. Ruminants* 379- 386. (1995)

**Marie-Claire Orgebin-Crist.,** Liliane Boivineau., Y. De Fontaubert., *Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme du taureau.* Ann.Biol.Anim. Bioch. Biophys, 2(1), 51-108.(1962).

**Měřička P.,** M.D., Ph.D., *Cryoconservation des cellules, des tissus et des organes. 100 ans au service du développement du froid et de ses applications.* Paris (2008).

**Michele Magistrini.** *Le point sur les techniques classiques de cryoconservation des spermatozoïdes et des embryons.* UMR INRA, CNRS, Université de Tours, Haras Nationaux, 37380 Nouzilly.

**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 Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Biotechnologies, 3-5 Manastur Street, 400372 Cluj-Napoca, Romania.

**Mireille Theriault.,** François Castonguay., Catherine Element-Boulianne ., *amélioration de la productivité des troupeaux ovins par le contrôle de la reproduction des béliers.* Projet #6349. (2012).

## O

---

**OIE** -Code Sanitaire Pour Les Animaux Terrestres, *Collecte et traitement de la semence de bovins, de petits ruminants et de verrats.* chapitre 4.6. article 4.6.1 (2010).

## P

---

**Pamela,** Virginie Fuertes., *Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée :* Etude expérimentale. thèse pour le doctorat vétérinaire (2008).

**Parmar V.,** Nsuthar B., Sharma V.K., Nakhashi H.C., Parikh S.S., *Preservation of Washed Spermatozoa of Mehsana Buck at Refrigeration Temperature.* Vet. World, Vol.5(5): 294-296 (2012).

**Pierre Bruyere.,** *Evaluation thermodynamique et biologique d'un substituant synthétique aux produits d'origine animale dans les solutions de* Thèse N°: 45-2012. *cryoconservation pour embryons de mammifères* (2012).

## R

---

**Rota A.,** Milani C., Cabianca G., Martini M., *Comparaison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation,* Theriogenology 65, 1848–1858.(2006)

## S

---

**Sharon T. Mortimer.,** *Computer-aided sperm analysis (CASA).* The Journal of Andrology,516-524 .(2000).

**Smatti Mohamed** Ben Laabed., Mekki Mustapha., *La conservation de la semence ovine.* Projet de fin d'étude, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger. Pages 59. (2012).

## T

---

**Tournadre H.,** M. Pellicer M., Bocquier F., *Maîtriser la reproduction en élevage ovin biologique : influence de facteurs d'élevage sur l'efficacité de l'effet bélier,* Innovations Agronomiques 85-90. (2009)

**Tournadre H.,** M. Pellicer., F. Bocquier., *Maîtriser la reproduction en élevage ovin biologique : influence de facteurs d'élevage sur l'efficacité de l'effet bélier.* Innovations Agronomiques, 85-90. (2009).

## V

---

**Vasile M,** *Cercetări privind coservarea pri refrigerare a spermei de berbec proveită de la rasele suffolk, laitier belge și țigăie cod.,* Thèse de doctorat, faculté de zootechnie et biotechnologie Belgique 52pages (2009).

**Viveiros N. SO., Komen J.,** *Sperm cryopreservation of african catfish clark garieninus cryoprotectants, freezing rates and sperm,* Theriogenology 54, 1395-1408. ,(2000)

## Résumé

La conservation à court terme de la semence ovine est un procédé qui permet de prolonger la longévité des spermatozoïdes, cependant cette durée de vie demeure limitée, ce qui réduit le développement de l'insémination artificielle chez l'ovine, seul un milieu de conservation adapté parviendra à venir à bout de cette contrainte. L'objectif de la présente expérience était de mettre à l'essai la réfrigération à +4°C de la semence épидидymaire de bélier, en s'appuyant sur trois milieux de conservation : à base de jaune d'œuf, à 5% de glycérol et à 15% de glycérol.

Notre méthode de collecte a été portée sur le rinçage rétrograde de l'épididyme, la semence collectée est évaluée puis diluée et mise à l'essai dans 04 milieux de conservation, un témoin, composé du milieu de base (Tris- Acide citrique-Fructose), le second, comprend le milieu de base et 20% de jaune d'œuf et les deux derniers comprennent le milieu de base, 20% de jaune d'œuf et une concentration de glycérol à 5% et à 15% respectivement. Par la suite nous avons mélangé 1 volume de la semence diluée avec 9 volumes de chaque milieu de conservation.

Enfin, nous avons évalué la motilité individuelle et l'intégrité membranaire (HOST) des quatre milieux à : 0h, 6h, 18h, 24h, 36h, 48h, 56h, 72h. Nos résultats révèlent que la durée maximale de conservation de la semence sans l'addition de cryoprotecteurs est de 18h (HOST : 65.66%), cependant le milieu qui contient uniquement un cryoprotecteur non pénétrant (jaune d'œuf) permet de sauvegarder une qualité acceptable de la semence pendant 36h (HOST : 58.12%). L'utilisation conjointe d'un cyoprotecteur pénétrant et non pénétrant révèle que la concentration de ce dernier à 5% permet la protection de la qualité de la semence épидидymaire jusqu'à 36h (HOST : 58.12%), tandis qu'à 15% de glycérol une importante toxicité se manifeste dès 18h de réfrigération (HOST : 40%).

Nous concluons, que l'ajout d'un cryoprotecteur pénétrant et non pénétrant optimise la durée de conservation de la semence et que la concentration de 5% de glycérol semble être la plus appropriée.

**Mots clefs :** semence ovine, spermatozoïdes, réfrigération, glycérol

## Abstract

Short term conservation of sheep semen is a process that will extend the life of sperm, however this life remains limited, which reduces the development of artificial insemination in sheep, only a suitable storage media manage to overcome this constraint. The objective of this experiment was to test refrigeration at 4 ° C in epididymal semen ram, relying on three storage media: based egg yolk, 5% glycerol and 15% glycerol.

Our method of collection was given to the retrograde flushing of the epididymis, the semen collected is evaluated and then diluted and tested in 04 conservation community, a witness, consisting of extender (Tris Acid Fructose citrique), the second comprises the basal media and 20% egg yolk and the last two are the basal media, 20% of egg yolk and a glycerol concentration of 5% and 15% respectively. Later we mixed 1 volume of diluted semen with 9 volumes of each storage extender. Finally, we evaluated the individual motility and membrane integrity (HOST) of the four environments: 0 h, 6 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 56 h and 72 h.

Our results reveal that the maximum period the seed of conservation without the addition of cryoprotectants is 18h (HOST: 65.66%), however the media containing only non-penetrating cryoprotectant (yolk) saves acceptable quality semen for 36 h (HOST: 58.12%). The joint use of a cyoprotecteur penetrating and non-penetrating, the concentration of the latter 5% allows the protection of the quality of epididymal semen until 36h (HOST: 58.12%), while only 15% glycerol significant toxicity occurs from 18h refrigeration (HOST: 40%).

We conclude that the addition of a penetrating and non-penetrating cryoprotectant optimizes seed shelf life and that the concentration of 5% glycerol appears to be the Proper fit.

**Keywords:** sheep semen, sperm, refrigeration, glycerol

## المخلص

ان الاحتفاظ للمدى القصير بالسائل المنوي إجراء يسمح بإطالة عمر الحيوانات المنوية، بينما هذا العمر المحدود يقلل من تطوير عملية التلقيح الاصطناعي عند الأغنام بحيث الوسيلة المناسبة للتخزين هي الوسيلة الوحيدة التي تعمل على انجاح عملية التغلب على هذا العائق.

ان الهدف من هذه التجربة هو اختبار التبريد عند 4 درجة مئوية في بريك السائل المنوي عند الكباش، بحيث تعتمد على ثلاث أوساط للتخزين : مصنوعة من 20% من صفار البيض و بنسبة 5% من الجليسيرول و 15% من الجليسيرول و قد اعتمدت طريقتنا في الجمع على شطف ما وراء البريك، السائل المنوي التي تم جمعها قمنا بتقييمها من ثم اماتها و وضعها تحت الاختبار في أربع أوساط للحفظ بالإضافة إلى وسط شاهد، متكون من وسط قاعدي ( ثلاثي حمض الستريك- الفركتوز- هيدروكسيدميثيل أمينو ميتان) الثاني يشمل وسط قاعدي بالإضافة 20% من صفار البيض أما بالنسبة للوسطين الاخيرين فيشمل كل من الوسط القاعدي 20% من صفار البيض وتركيز الجليسيرول بنسبة 5% و 15% على التوالي.

فيما بعد نقوم بخلط حجم 1 من السائل المنوي المخفف مع 9 احجام من كل وسط تخزين أخيرا قمنا بتقييم الحركة الفردية وسلامة الغشاء لكل من الأوساط الأربعة في: 0 ساعة، 6 ساعة، 18 ساعة، 24 ساعة، 36 ساعة، 48 ساعة، 56 ساعة، 72 ساعة. نتائجنا إن أقصى مدة للحفظ بدون إضافة وافي من البرد هي 18 ساعة، بينما الوسط الذي يحتوي فقط على وافي من البرد الغير قابل للاختراق (صغار البيض) يسمح بالاحتفاظ على نوعية مقبولة للسائل المنوي لمدة 36 ساعة. إن الاستخدام المشترك لكل من القابل للاختراق و وافي من البرد الغير قابل للاختراق يكشف أن تركيز هذا الأخير بنسبة 5% يسمح بحماية نوعية السائل المنوي بربخي في حين ان نسبة 15% من الجليسيرول تظهر حالة تسمم كبيرة عند 18 ساعة خلال التبريد. نستخلص ان الواقي من البرد القابل للاختراق والواقي من البرد الغير قابل للاختراق يساعد على تحسين مدة الحفظ أو تخزين السائل المنوي و أن تركيز 5% من الجليسيرول هو الأنسب.

**كلمات خصوصية:** السائل المنوي عند الكيش، الحيوانات المنوية، التبريد، الجليسيرول.