

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD Dahleb Blida -1-

Faculté sciences de la nature et de la vie
Département de biologie des populations et des organismes



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
du Diplôme de Master II en biologie
Option Reproduction Animale

Thème :

Conservation à court terme de la semence ovine

Présenté par :

Mlle. TOUMI Fetima

Soutenu le : Dimanche 26 juin 2016

Devant le jury composé de :

Présidente	KANANE A	M.A.A	USDB 1
Examineur	ADEL D	M.A.A	USDB 1
Promoteur	IDRES T	M.A.A	ENSV

Année Universitaire : 2015 – 2016

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné la force, la et la patience de pouvoir achever ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon encadreur, Docteur **IDRES Takfarinas**, de l'École Nationale Vétérinaire d'Alger pour avoir accepté de diriger et de corriger ce travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse dans la réalisation de ce mémoire.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à :

Madame **KANNAE A**, Maître assistante à la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bida 1, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de ce mémoire.

Docteur **ADEL D**, Maître assistant à l'institut des sciences vétérinaires de Blida, de m'avoir honorée d'accepter d'examiner ce travail.

Monsieur **BESSAD Mohammed Amine**, chef d'option de « reproduction animale » qui nous a donné l'accès aux études dans ce master, je le remercie infiniment, pour sa gentillesse et son esprit de recherche, mes respectueuses considérations.

A l'école Nationale Vétérinaire d'Alger qui m'a ouvert ses portes pour la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude aux vétérinaires et à l'ensemble du personnel de l'abattoir de Boufarik pour leur collaboration et leur gentillesse.

A tous mes enseignants qui ont prodigué mon cursus étudiantin.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de **mon père**, que Dieu lui accorde sa sainte miséricorde et l'accueille en son vaste paradis.

A toi **ma mère** mon ange gardien, merci de m'avoir toujours soutenue. Voici un deuxième fruit de tes sacrifices que tu as investi en moi, je te l'offre en signe de reconnaissance.

A mes frères, mes sœurs, mes neveux & nièces et mes beaux frères.

A la mémoire de mes grands parents que j'ai beaucoup aimés.

A toute ma famille.

A mon cher fiancé et sa famille.

A mes amis, amies et mes collègues de travail pour tous les bons moments qu'on a partagés ensemble et les bons souvenirs que j'en garderai.

A mes confrères et censeurs vétérinaires en particulier ceux de la promotion **2012/2013**.

A toute la promotion de reproduction animale **2015/2016**.

A tous ceux qui partagent ma vie, mes joies et mes peines.

Soraya

LISTE DES ABREVIATIONS

%: Pourcent

°C: Degré Celsius

‰: Pour-mille

ABP: Androgènes Binding Protein

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine-triphosphate

CASA: Computer assisted sperm analysis

cc : centimètre cube

cm : Centimètre

CNIAAG : Centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique

FIV: Fécondation in vitro

FSH: Follicle stimulating hormone

g: Gramme

GNRH: Gonadotropin Releasing Hormone

H: Heure

Host: Hypo-osmotic test

IA : Insémination artificielle

JO: jaune d'œuf

LDL: low-density lipoprotein

LH: Luteinising hormone

m : Mètre

ml : Millilitre

mn: Minute

PH : potentiel d'hydrogène

SPZ : Spermatozoïde

SQA: Sperm quality analyzer

TRIS : Tri-hydroxy-méthyl-aminométhane

V: Volume

µl : Microlitre

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Appareil génital mâle des petits ruminants	02
Figure 2 : Spermatogenèse chez les ruminants	09
Figure 3 : La régulation hormonale de la fonction sexuelle du mâle.....	12
Figure 4 : L'électro-éjaculateur utilisé pour la collecte de semence	14
Figure 5 : Introduction de la sonde de l'électro-éjaculateur dans le rectum.....	14
Figure 6 : Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier	16
Figure 7 : Estimation du volume et de l'apparence de l'éjaculat	17
Figure 8 : Hématimètre utilisé pour le comptage des spermatozoïdes	20
Figure 9 : Comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre	20
Figure 10 : Coloration éosine-nigrosine	21
Figure 11 : trajectoires des spermatozoïdes analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur	22
Figure 12 : modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique	24
Figure 13 : Conséquences de la formation de glace sur la cellule pendant la congélation.....	28
Figure 14 : Schéma indiquant les divers processus impliqués dans la congélation de cellules en fonction des vitesses de refroidissement.....	34
Figure 15 : Produits constituant la solution A.	41
Figure 16 : Pesée des produits dans une balance à deux chiffres de précision	41
Figure 17 : Réalisation de la boutonnière sur un testicule dénudé de sa gaine vaginale	42
Figure 18 : Individualisation du complexe épидидymaire et le canal déférent.	42
Figure 19 : Injection de la solution A dans le canal déférent	43
Figure 20 : Gonflement des tubes séminifères de la queue épидидymaire	43
Figure 21 : Récupération de la semence dans un eppendorf	43
Figure 22 : Estimation du volume et de l'apparence du sperme collecté	44

Figure 23 : Images figées de la motilité massale	44
Figure 24: Cellule de Malassez utilisée pour le comptage des spermatozoïdes	45
Figure 25: Incision de la membrane vitelline et récupération du jaune d'œuf	46
Figure 26 : Composition de base des protocoles de réfrigération	47
Figure 27 : Préparation des milieux de réfrigération	48
Figure 28 : Passage des eppendorfs au vortex	48
Figure 29 : Préparation du frottis de la coloration vitale	49
Figure 30 : observation microscopique des spermatozoïdes colorés à l'éosine	49
Figure 31 : observation microscopique au grossissement X40 des spermatozoïdes gonflés à la solution hypo-osmotique	50
Figure 32 : Graphes représentant l'évaluation à H ₀	53
Figure 33 : Graphes représentant l'évaluation à H ₁₂	53
Figure 34 : Graphes représentant l'évaluation à H ₃₆	54
Figure 35 : Graphes représentant l'évaluation à H ₆₀	54
Figure 36: Graphes représentant l'évaluation à H ₈₄	55
Figure 37: Graphes représentant l'évaluation à H ₁₀₈	55
Figure 38: Graphes représentant l'évaluation à H ₁₃₂	56
Figure 39 : Graphes représentant l'évaluation à H ₁₅₆	56
Figure 40 : Evolution des résultats dans le milieu témoin..	57
Figure 41 : Evolution des résultats dans le protocole à 20 % du jaune d'œuf..	58
Figure 42: Evolution des résultats dans le le protocole à 5% de glycérol.	58
Figure 43 : Evolution des résultats dans le le protocole à 10% de glycérol.	59
Figure 44 : Evolution des résultats dans le protocole à 5% d'éthylène glycol.	59
Figure 45: Evolution des résultats dans le protocole à 10% d'éthylène glycol.	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description de la motilité massale des spermatozoïdes.....	18
Tableau 2 : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes	19
Tableau 3: Composition des solutions utilisées	47
Tableau 4: Résultats d'évaluation du sperme après collecte	51
Tableau 5: Résultats d'évaluation du sperme réfrigéré.	51

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>Chapitre I : La reproduction chez les béliers</i>	
I. Introduction	02
II. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle	02
II.1. La section glandulaire	03
II.1.1. Les testicules	03
II.1.2. Les glandes annexes	04
II.2. la section tubulaire	04
II.2.1. L'épididyme.....	05
II.2.1.1.Structure	05
II.2.1.2. Fonctions physiologiques de l'épididyme.....	05
II.2. 2. Canal déférent.....	06
II.3. le sinus uro-génital	06
II.3. 1. L'urètre	06
II.3. 2. Le pénis	06
III. Physiologie de la reproduction chez le bélier	07
III.1. La fonction testiculaire.....	07
III.1.1. La spermatogenèse	07
III.1.1.1. Le déroulement de la spermatogenèse	07
➤ La spermatocytogenèse	08
➤ La méiose.....	09
➤ La spermiogenèse	09
III.2. Formation du sperme	10
IV. Contrôle endocrinien des fonctions testiculaires	11
IV. 1. L'axe hypothalamo-hypophysaire	11
IV. 2. Les stéroïdes sexuels.....	12
IV. 3. L'hinibine.....	13
IV. 4.L'ABP	13
IV.5. La mélatonine	13
<i>Chapitre II : Collecte & évaluation de la qualité de la semence</i>	
I. Méthodes de récolte de la semence.....	14
I.1. Après le coït (post-coïtum)	14
I.2. Le vagin artificiel	14
I. 3. Collecte du sperme épидидymaire	15
I.3.1.Techniques de récolte du sperme épидидymaire.....	15
I.3.1.1. Méthode de float- up.....	15

I.3.1.2. Méthode de rétrograde flushing.....	15
II. Évaluation de la qualité du sperme	16
II.1. Examens macroscopiques.....	16
II.1.1. Volume de l'éjaculat	16
II.1.2. Couleur et consistance du sperme	17
II.2. Examens microscopiques	17
II.2.1. Motilité	17
II.2.1.1. Motilité massale	18
II.2.1.2. Motilité individuelle	19
II.2.2. Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat	20
II.2.3. Examens morphologiques des spermatozoïdes	21
II.2.3.1. Colorations totales.....	21
II.2.3.2. Colorations vitales.....	21
II.2.4. Comptage du pourcentage de spermatozoïdes vivants, morts, et anormaux.....	22
II. 3. Méthodes plus avancées d'évaluation de la semence chez le bélier	22
II. 3.1. CASA: (Computer Assisted Sperm Analysis).....	22
II.3.2. Le système SQA (Sperm Quality Analyzer)	23
II.3.3. Le microscope à transmission électronique (MET)	23
II.3.4. La fluorescence	23
II.3.5. Test de gonflement hypo-osmotique (HOST)	23

Chapitre III : Cryobiologie

I. Introduction	25
II. Particularité de la conservation de la semence ovine	25
III. Les techniques de conservation de la semence.....	25
III. 1. Conservation à long terme (congélation ou cryoprotection).....	25
III.1.1.Définition et historique	25
III.1.2. Principes de congélation des cellules.....	26
III.1.2.1.Chocs thermiques	26
III.1.2.2. Cristallisation	24
III.1.2.3.Stress osmotique	27
III.1.3. Procédure de la congélation	28
III.1.3.1. La dilution et cryoprotection.....	28
III.1.3.1.1.Cryoprotecteurs non pénétrants	29
III.1.3.1.2. Cryoprotecteurs pénétrants	31
III.1.3.1.3. Sucres	33
III.1.2.3.4 Tampon	33
III.1.3.1.5.Antibiotiques	33
III.1.3.2. Le refroidissement.....	33
III.1.3.3. La congélation.....	34
III. 2. Conservation à court terme : Réfrigération.....	35
III. 2.1. Définition	35
III. 2.2. Diluants et méthodes de conservation de semence de bélier en milieu liquide	35
IV. Diluants commerciaux	37

V. Dommages cellulaires dus au froid	37
V.1.Effets sur le métabolisme cellulaire	38
V.2. Effets sur les membranes cellulaires	38
 PARTIE EXPERIMENTALE	
OBJECTIFS	39
MATÉRIEL & MÉTHODES	40
I. Matériels utilisés	40
I. 1. Matériel biologique : Testicules	40
I.2. Matériel du laboratoire	40
I.3. Produits de préparation	40
II. Méthodes	42
II.1. Préparation de la solution A	42
II.2. Collecte du sperme épидидymaire	42
II.3. Examen du sperme collecté.....	43
II.3.1. Évaluation macroscopique	43
II.3.2. Évaluation microscopique	44
II.4. Dilution de la semence & préparation des protocoles de réfrigération	46
II.4.1. Calcul du taux de dilution	46
II.4.2. Composition des diluants	46
II.5. Analyse de la qualité de la semence réfrigérée	48
II.5.1. Évaluation de la motilité individuelle	48
II.5.2. Coloration à l'éosine	48
II.5.3. Test de gonflement hypo-osmotique (HOST)	49
 RÉSULTATS	 51
I. Résultats d'évaluation du sperme pur collecté	51
II. Analyse des paramètres de la semence réfrigérée	51
II.1. Résultats globaux en fonction de l'heure de lecture.....	53
II.1.1. Résultats recueillis à H0	53
II.1.2. Résultats recueillis à H12	53
II.1.3. Résultats recueillis à H36	54
II.1.4. Résultats recueillis à H60	54
II.1.5. Résultats recueillis à H84	55
II.1.6. Résultats recueillis à H108	55
II.1.7. Résultats recueillis à H132	56
II.1.8. Résultats recueillis à H156	56
II.2. Progression des résultats par milieu de réfrigération	57
II.2.1.Milieu témoin	57
II.2.2. Milieu à 20% du jaune d'œuf	58
II.2.3. Milieu à 5% de glycérol	58
II.2.4. Milieu à 10% de glycérol	59
II.2.5. Milieu à 5% d'éthylène glycol	59

II.2.6. Milieu à 10% d'éthylène glycol	60
DISCUSSION.....	61
I. Discussion de la thématique de recherche.....	61
I.1. Technique de collecte	61
I.2. Liquide du rinçage & Milieu de réfrigération.....	61
I.3. paramètres d'évaluation de la qualité de la semence.....	62
II. Discussion des résultats du sperme collecté.....	62
II.1. Évaluation macroscopique	62
II.1.1. Volume	62
II.1.2. Couleur & consistance.....	62
II.2. Évaluation microscopique	62
II.2.1. Motilité	62
II.2.2. Concentration	63
III. Discussion des résultats post réfrigération de la semence	63
CONCLUSION	66
RECOMMANDATIONS.....	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION GENERALE

La reproduction sexuée chez les mammifères consiste en la fécondation d'une cellule haploïde femelle (ovocyte) par une cellule haploïde mâle (spermatozoïde) afin de donner un zygote diploïde.

Ces cellules, nommées gamètes, sont hautement spécialisées et n'ont qu'une seule fonction: assurer la continuité de l'espèce. Cette thèse portera uniquement sur la conservation des gamètes mâles, les spermatozoïdes chez l'espèce ovine.

Elle est présentée en deux grands volets, le premier porte sur les données bibliographiques relatives à la reproduction chez le bélier, collecte & évaluation de la qualité de la semence ainsi que les principes de base de cryobiologie.

Le second volet est représenté par l'étude expérimentale. Nous nous sommes penchés dans cette étude sur une méthode de conservation à court terme de la semence ovine vu que l'insémination artificielle réalisée avec de la semence réfrigérée chez cette espèce soit la technique de reproduction sur laquelle sont aujourd'hui basés les programmes de sélection, pour cela nous avons essayé de tester six milieux différents (milieu témoin, jaune d'œuf à 20%, Glycérol à 5 et 10%, Éthylène glycol 5 et 10%) rapportés dans la bibliographie afin d'en apprécier l'efficacité et surtout de faire ressortir celui qui est le plus approprié à la réfrigération de la semence ovine.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

La reproduction chez les béliers

I. Introduction

La reproduction est la clef de voûte de toutes les filières animales. 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 au long de la vie de l'animal, cependant chez les ovins, cette activité présente une variation saisonnière qui dépend de l'effet de la photopériode.

II. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle où se réalise la fécondation (Barone, 1978).

La figure 1 montre la topographie des différentes parties de l'appareil génital mâle.

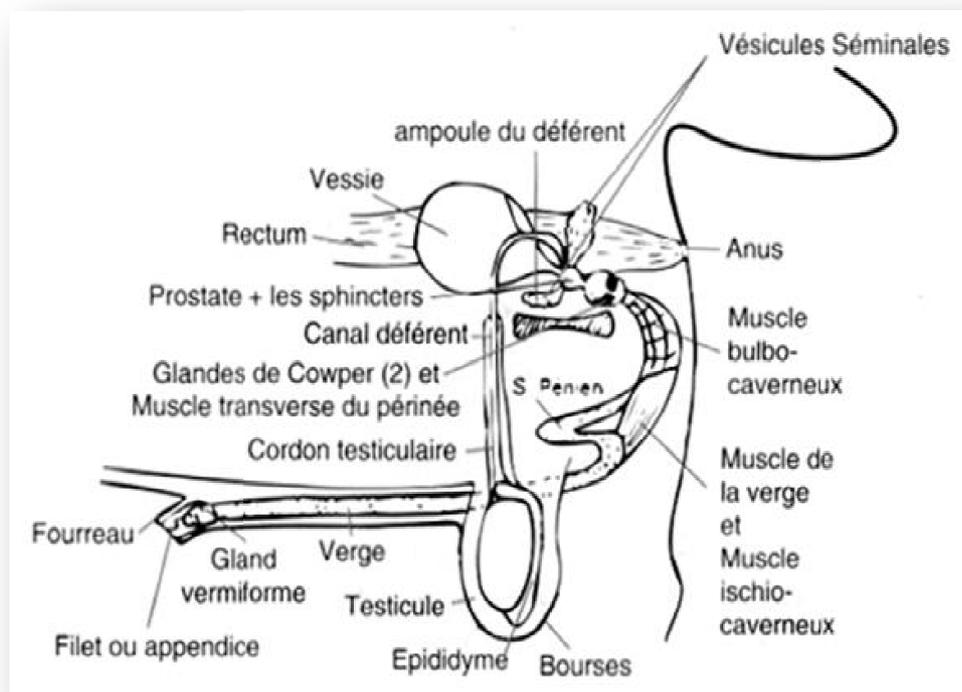


Figure 1: Appareil génital mâle des petits ruminants d'après (Baril *et al.*, 1993).

En général, il comporte trois grandes parties, dont chacune possède son équivalent dans l'appareil génital femelle qui sont : la section glandulaire, la section tubulaire et le sinus urogénital.

II.1. La section glandulaire :

Comprenant deux gonades : « les testicules », et les glandes annexes.

II.1.1. Les testicules

La région scrotale forme chez le bélier une masse ovoïde, bilobée, longuement et verticalement pendante sous la région inguinale et attachée à la paroi abdominale inférieure.

Le testicule ou glande génitale est un organe pair, très mobile dans les bourses, plus sphéroïde chez le bélier que chez le taureau, il est aussi plus volumineux et plus pesant en proportion ; son poids unitaire varie de 170 à 300 grammes (Barone, 1978 ; Montane *et al.*, 1978 ; Bonnes *et al.*, 2005).

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

Le testicule est protégé par des enveloppes superposées et d'origines très différentes.

En surface se trouve le scrotum, qui est constitué par :

- Une peau mince, souple, recouverte de jarre, et formant un sac commun aux deux testicules pourvu d'un sillon médian : le raphé.
- Le dartos peu épais, constitué de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, et formant un sac autour de chaque testicule.

En intermédiaire se trouve la tunique fibreuse : tissu conjonctif sous cutané, très mobile.

En profondeur se trouve le crémaster ; ce muscle joue un rôle important dans la thermorégulation. Selon (Waits, 1969) cité par (Vaissaires, 1977) la température des testicules est inférieure à la température corporelle d'environ 2 à 4°C.

Le crémaster est localisé du coté externe de l'enveloppe fibro-séreuse, cette dernière forme un sac allongé engainant le testicule, l'épididyme et le cordon testiculaire (Vaissaire, 1977) ; Barone, 1978 ; Bonnes *et al.*, 2005).

Plus profondément chaque testicule est revêtu d'une capsule fibreuse, l'albuginée, qui s'enfonce dans la profondeur du testicule pour constituer le corps de Highmore, perforé par des vaisseaux, et le rete testis. Entre l'albuginée et le corps de Highmore sont tendues des cloisons ou septa, souvent incomplètes qui délimitent environ deux à trois cents lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubes séminifères (Dadoune et Demoulin, 2001).

II .1.2. Les glandes annexes

Elles sont à sécrétion externe produisant des liquides destinés à diluer les spermatozoïdes et favoriser leur mouvement, à les nourrir (Soltner, 2001). Leurs sécrétions représentent environ les trois quarts du plasma séminal d'un éjaculat (Barone, 1978). Ces glandes sont:

- *Les vésicules séminales* : Ce sont des organes glandulaires à surface lobulée, dont le tube excréteur interne sinueux, s'ouvre en arrière sur le plafond de l'urètre en commun avec le canal déférent. Leurs sécrétions constituent une grande partie du liquide séminal (60% du volume total du sperme) (Bonnes *et al.*, 2005). Il s'agit d'un liquide riche en fructose qui constitue une source d'énergie pour les spermatozoïdes selon White et Wales (1961) et Bonnes *et al.*, (2005), en acide citrique et en prostaglandines (Setchell, 1991 ; Baril *et al.*, 2005).

- *La prostate* : Peu développée, elle est située sous le sphincter urétral, elle a une forme d'un petit renflement glandulaire transversal de couleur jaune grisâtre (Vaissaires, 1977). Le liquide prostatique étant riche en acides aminés, enzymes, fructose et des ions divers surtout le Zinc (rôle bactéricide), contribue d'une grande part dans la formation du sperme (Barone, 1978).

- *Les glandes de Cowper ou glandes bulbo-urétrales* : Glande paire, appelée glande de Cowper, elle est peu volumineuse chez les petits ruminants, globuleuse, de taille d'une noisette et d'une largeur de 1cm (Barone, 1990 ; Setchell, 1991), étendu du revers médial de la tubérosité ischiatique à la face dorsale de la terminaison de l'urètre pelvien (Barone, 1990). Elle secrète un liquide clair visqueux à pH alcalin (pH=7,8) servant au nettoyage et à la lubrification de l'urètre juste avant l'éjaculation (Barone, 1978 ; Noakes *et al.*, 2001).

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

II.2.1. L'épididyme

C'est un organe plaqué sur l'arrière du testicule, d'une longueur de 60 m, reliant les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent (Dacheux, F., et Dacheux, J-L., 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005). Il est très flexueux et se pelotonne une première fois au départ du testicule constituant ainsi la tête de l'épididyme, puis après un parcours plus au moins rectiligne, correspondant au corps de l'épididyme, il se pelotonne de nouveau formant ainsi sa queue avant d'aller déboucher dans le canal déférent (Bonnes *et al.*, 2005).

La paroi de ce tube est entourée d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (Dacheux, F., et Dacheux, J-L., 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005).

II.2.1.1. Structure

L'épididyme est formé par un système canaliculaire maintenu par une mince albuginée, ce système canaliculaire comprend des amas de fluctosités des canalicules efférentes, puis ces canalicules confluent en un conduit épидидymaire qu'on appelle le rete testis, ce dernier occupe chez l'homme une position superficielle alors que chez le bélier, il se prolonge dans le testicule suivant son grand axe (Barone, 1978).

La jonction entre le rete testis et les tubes séminifères s'effectue par l'intermédiaire des canaux droits, 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 celui-ci 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 (Soltner, 2001).

II.2.1.2. Fonctions physiologiques de l'épididyme

Il constitue un lieu de stockage, de maturation et de remaniement des spermatozoïdes. Ces rôles sont déterminés par les androgènes (Craplet et Thibier, 1977 ; Voglmayr *et al.*, 1977 ; Noakes *et al.*, 2001)

C'est au niveau de l'épididyme (le corps épидидymaire) que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Chevrier et Dacheux, 1988 ; Barone, 1990 ; Setchell, 1991 ; Baril *et al.*, 1993 ; Noakes *et al.*, 2001). On reconnaît à l'épididyme une autre fonction qui consiste à l'augmentation de la concentration du sperme par réabsorption de la majeure partie du fluide du

rete-testis (Setchell, 1991). La paroi de ce tube est entourée d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (Dacheux, F., et Dacheux, J-L., 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005).

Dans l'épididyme, le sperme se conserve fertile jusqu'à 40 jours après ce délai, les spermatozoïdes sont fragmentés et sont résorbés par les spermiophages ou éliminés dans les urines (Hammond, 1961).

II.2.2. Canal déférent

Faisant suite au canal épидидymaire, Il s'étend de la queue de celui-ci à l'urètre dans lequel il s'ouvre à côté de l'une de ses dépendances: «la glande vésiculaire». Dans son trajet, il s'engage dans le cordon spermatique en position médiale, puis arrivé en partie abdominale pelvienne, il décrit une courbe à concavité ventro-caudale, sur le côté du détroit cranial du bassin, à ce niveau, il se place en face dorsale de la vessie, se rapproche progressivement avec l'autre conduit déférent formant ainsi une ampoule: «ampoule déférentielle» avant de se jeter dans l'urètre.

C'est un tube de quelques centimètres mais, il à une puissante musculature qui va présenter des contractions au moment de l'éjaculation. Ces contractions du canal déférent sont induites par les prostaglandines (Craplet et Thibier, 1977 ; Barone, 1990).

II.3. le sinus uro-génital : comprenant l'urètre et l'appareil copulateur.

II.3. 1. L'urètre

L'urètre a une forme d'un long conduit impair servant à l'excrétion de l'urine et du sperme, il est divisé en deux parties anatomiquement distinctes (Barone, 1990):

- l'urètre pelvien logé dans le bassin,
- l'urètre extra-pelvien entièrement recouvert par l'albuginé et soutenu par deux cordons fibro spongieux.

II.3. 2. Le pénis

Le pénis ou verge est l'organe copulateur du mâle (Vaissaire, 1977). Il est de type fibro-élastique, mesurant 40 centimètres en moyenne, sa structure tissulaire lui permet de s'éjecter au moment de l'accouplement et de déposer la semence dans les voies génitales femelles (Barone, 1990). Il est formé par l'urètre pelvien auquel sont annexés des muscles et des formations érectiles

(Bonnes *et al.*, 2005). Il décrit chez le bélier une double inflexion en forme de S (S pénien) qui s'efface au cours de l'érection (Meyer, 2008).

III. Physiologie de la reproduction chez le bélier

III.1. La fonction testiculaire

Elle est double: endocrine et exocrine :

- Fonction endocrine (la stéroïdogénèse) : production de testostérone par les cellules de Leydig (tissu interstitiel), cette hormone stimule la spermatogénèse, la maturation des organes génitaux, l'apparition des caractères sexuels secondaires, suscite l'émergence de la libido, et participe au rétrocontrôle hormonal hypothalamo-hypophyso-gonadique; outre la testostérone, les cellules de Leydig sécrètent de l'estradiol, en quantité variables selon les espèces (Robel, 2001).

- Fonction exocrine (la spermatogénèse.): production de spermatozoïdes dans les tubules séminifères. Associés aux sécrétions des glandes annexes, ils constituent le sperme, émis lors de l'éjaculation (Parapanov et Vargas, 2009).

III.1.1. La spermatogénèse

La spermatogénèse est un processus chronologiquement long et continu débutant à la puberté, qui à partir de cellules initiales basales (cellules de la ligné germinale mâle) des tubes séminifères, aboutit après mitose, méiose et différenciation à la libération de spermatozoïdes mûrs dans la lumière des tubes séminifères (Amann et Schanbacher, 1983 ; Johnson, 1991). Ainsi, l'épithélium séminifère est composé de trois types de cellules germinales : spermatogonies, les spermatocytes (primaires et secondaires) et les spermatides (Desjardins, 1978 ; Noakes *et al.*, 2001) à chacune des quelles correspond une phase du cycle spermatogénétique : la spermatocytogénèse, la méiose et la spermogénèse (Johnson, 1991).

Le développement des spermatogonies en spermatozoïdes est organisé selon un ordre spatial et temporel rigoureux ; l'entrée en spermatogénèse de différents ilots de spermatogonies se fait en effet de façon régulière et cyclique : tous les 10 jours chez le bélier. Le cycle complet dure par ailleurs 49 (Parapanov et Vargas ,2009).

III.1.1.1. Le déroulement de la spermatogénèse

Selon Barone (1990) et Johnson (1991), le cycle spermatogénétique est divisé en trois principales phases : la spermatocytogénèse, la méiose et la spermogénèse.

➤ La spermatocytogenèse

Les gonocytes formées dans les cordons testiculaires au cours de la vie foetale se transforment après la naissance (3 à 6 semaines) en spermatogonies (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1995). Les spermatogonies souches stockées le long de la membrane basale des tubes séminifères, entre les cellules de soutien (précurseurs des cellules de Sertoli) (Courrot, 1962 ; Hochereau-de Reviers *et al.*, 1995 ; Noakes *et al.*, 2001) donnent par mitose d'une part des cellules filles qui deviennent des spermatogonies souches et d'autre part, d'autres cellules filles qui se divisent activement en spermatocytes (Desjardins, 1978 ; Johnson, 1991).

Trois types de spermatogonies originellement décrits par Johnson (1991) et Noakes *et al.* (2001) sont : les spermatogonies A (ou poussiéreuses), les spermatogonies intermédiaires et les spermatogonies B (ou croûteuses).

Cinq différents sous types de spermatogonies sont observés (A1, A2, A3, B1 et B2) (Amann et Schanbacher, 1983 ; Johnson, 1991). En revanche, chez les ovins, les spermatogonies A0, A1, A2, A3, In (intermédiaire), B1 et B2 apparaissent durant ce stade (Desjardins, 1978 ; Hochereau-de Reviers *et al.*, 1976 cité par Noakes *et al.*, 2001) représentant ainsi, six divisions mitotiques entre les spermatogonies souches (A0) et les spermatocytes primaires (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1995 ; Noakes *et al.*, 2001) (Figure 2).

A l'issue de cette mitose, les spermatogonies B donnent naissance aux spermatocytes primaires préleptotènes, ces derniers restent attachés par des ponts intercellulaires (Desjardins, 1978 ; Barone, 1990 ; Johnson, 1991). Ces ponts entre cellules du même stade de développement, facilitent le développement ou la dégénérescence synchrone des cellules germinales, la différenciation de la spermatide haploïde avec un seul chromosome sexuel et/ou la phagocytose des résidus laissés après la spermiation. La dégénérescence de spermatogonies permet de contrôler la production abondante de spermatocytes durant ou en dehors de la saison sexuelle (Johnson, 1991).

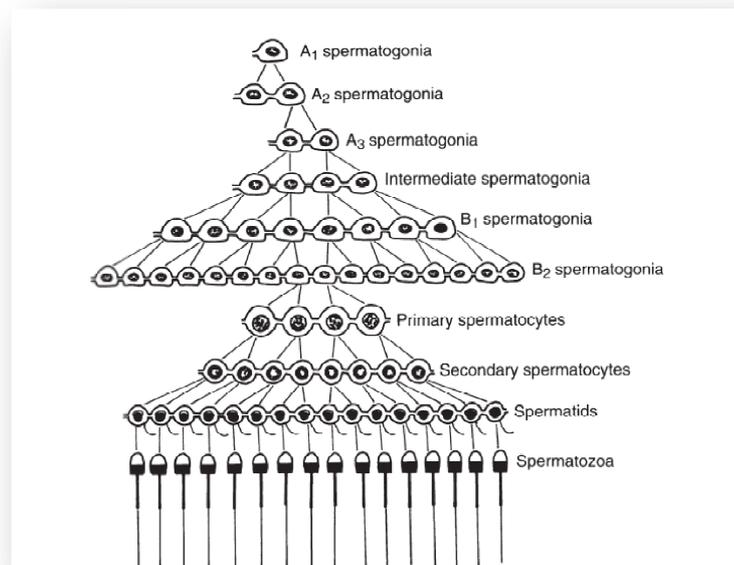


Figure 2 : Spermatogénèse chez les ruminants d'après Noakes *et al.* (2001).

➤ La méiose

Au cours de cette phase, les spermatocytes I passent de la région périphérique du tube séminifère vers la partie centrale où ils subissent deux divisions méiotiques successives :

- **Division réductionnelle** : où le spermatocyte I subit un accroissement de la taille dû à la duplication d'ADN (phase S) puis il entre en prophase méiotique (L, leptotène; Z, zygotène; P, pachytène; D, diacinèse), cette phase sera suivie par trois autres stades de division cellulaire : la métaphase, l'anaphase et la télophase donnant ainsi des spermatocytes II diploïdes. Ces cellules restent en interphase que peu de temps pour entamer par la suite la deuxième division méiotique (Dollander et Fenart, 1979 ; Johnson, 1991).

- **Division équationnelle** : Elle consiste en une prophase suivie d'une métaphase, anaphase et de télophase, d'où il en résulte la séparation des chromatides soeurs dans deux cellules filles nettement plus petites : les spermatides (cellules haploïdes) (Dollander et Fenart, 1979), (Bonnes *et al.*, 2005). Selon Baril *et al.* (1993), l'efficacité de la transformation des spermatocytes primaires peut être modifiée par des signaux tels que la lumière chez les races saisonnières.

➤ La spermiogénèse

La spermiogénèse est la différenciation morphologique de spermatides issues de la deuxième division méiotique en spermatozoïdes. La spermatide, cellule sphérique possédant un noyau sphérique (Johnson, 1991 ; Noakes *et al.*, 2001) se transforme en une cellule possédant une

tête aplatie avec un noyau condensé et une queue nécessaire à la motilité (Johnson, 1991 ; Baril *et al.*, 1993). Selon Craplet (1952), Barone (1990) et Johnson (1991), la spermatide se développe suivant quatre phases : Golgienne, de coiffe, de l'acrosome et de maturation.

Les granules acromosomiques apparaissent à partir de l'appareil de Golgi et finissent par confluer pour former l'acrosome sur le noyau (Dollander et Fenart, 1979 ; Barone, 1990 ; Johnson, 1991 ; Noakes *et al.*, 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005), constituant ce qu'on appelle couramment la coiffe ou le capuchon céphalique (Dollander et Fenart, 1979 ; Barone, 1990). Les centrioles migrent à proximité (centriole proximal) et à l'arrière du noyau (centriole distal) (Johnson, 1991 ; Bonnes *et al.*, 2005), qui délimite la portion du col où naissent divers filaments constituant le flagelle (Dollander et Fenart, 1979 ; Bonnes *et al.*, 2005). Les mitochondries se rassemblent en arrière du noyau et s'ordonnent bout à bout en une sorte de chapelet enroulé en hélice autour du flagelle (Noakes *et al.*, 2001), sur toute la longueur de ce qui deviendra la pièce intermédiaire du spermatozoïde (Craplet, 1952 ; Dollander et Fenart, 1979 ; Johnson, 1991). Une grande partie du cytoplasme trouvé dans la spermatide va être éliminée. Cet excès est éliminé sous forme de gouttelettes cytoplasmiques (Johnson, 1991 ; Bonnes *et al.*, 2005) qui n'est pas souvent perdue avant l'éjaculation chez les ovins (Amann, 1987 cité par Setchell, 1991). Les spermatozoïdes se forment ainsi dans les replis cytoplasmiques des cellules de Sertoli, en bordure de la lumière des tubes séminifères (Bonnes *et al.*, 2005).

L'acquisition de la capacité de fertilisation et de la motilité progressive, la maturation de spermatozoïde se fait en première étape par le biais de changements des caractéristiques de la membrane et du métabolisme de spermatozoïde (Bedford, 1975 ; Orgebinchrist *et al.*, 1981 cités par Amann et Schanbacher, 1983). Ce dernier semble même avoir lieu dès que les spermatozoïdes sont dans le rete-testis (Evans et Setchell, 1978). En effet, les changements de la morphologie des spermatozoïdes (la membrane) sont dus selon Scott *et al.* (1963) aux remaniements de la membrane liés surtout aux changements de la nature de l'association des protéines, des carbohydrates et des lipides. Les spermatozoïdes testiculaires ont une proportion plus importante de lipide (réserves énergétiques) par rapport aux spermatozoïdes épидидymaires (Setchell, 1991).

III.2. Formation du sperme

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas encore matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. Leur différenciation se poursuit en dehors de la gonade durant le transit épидидymaire qui dure de 10 à 14 jours selon l'espèce (Dacheux, F ; et Dacheux, J-L., 2001). Ce

transit peut être réduit de 10 à 20 % si la fréquence des éjaculations augmente. Ensuite le canal déférent prend le relais pour acheminer ces spermatozoïdes jusqu'à l'urètre.

Les glandes annexes, tout au long du canal déférent, assurent la formation du plasma séminal et donc du sperme définitif.

Le stockage des spermatozoïdes, qui peut durer jusqu'à trois semaines, se fait essentiellement (70 %) dans la queue de l'épididyme. Seulement 2 % sont emmagasinés dans le canal déférent. Les spermatozoïdes non éjaculés sont résorbés ou éliminés dans les urines. Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée de 50 à 80 µm de longueur et comportant trois parties principales : la tête, la pièce intermédiaire, et le flagelle. Sa taille et sa forme varient selon les espèces (Douet, 2000).

IV. Contrôle endocrinien des fonctions testiculaires

Le contrôle des fonctions testiculaires repose sur la relation hormonale entre le système nerveux central et les gonades (hypothalamus-hypophyse-testicule), il est assuré à la fois par les hormones gonadotropes et stéroïdiennes (Amann et Schanbacher, 1983), ayant pour origine selon Bonnes *et al.* (2005) : le complexe hypothalamo-hypophysaire et les testicules.

Cette activité hormonale se trouve ralentie durant une partie de l'année chez les espèces connues ayant une reproduction saisonnière.

IV. 1. L'axe hypothalamo-hypophysaire

Les neurones hypothalamiques produisent de la GnRH (LHRH) ; une neuro-hormone de nature peptidique (Gonadotropin Releasing Hormone), qui sera libérée dans le système vasculaire porte, où la GnRH interagit avec ces récepteurs trouvés sur la surface des cellules gonadotropes (Adams, 2005). Cette gonadolibérine stimule la synthèse et la libération des hormones gonadotropes hypophysaires (la FSH et la LH) ayant deux sites d'actions au niveau testiculaire, ils s'agissent respectivement des cellules de Sertoli et de Leydig (Adams, 2005 ; Bonnes *et al.*, 2005).

La FSH ou follitropine ou hormone folliculo-stimulante; stimule le développement des tubes séminifères et l'activité spermatogénétique (Vaissaire, 1977 ; Bonnes *et al.*, 2005). Selon Amann et Schanbacher (1983), l'action de la FSH sur la spermatogenèse est indirecte mais, elle agit directement sur les cellules germinales. Elle stimule directement les cellules de Sertoli pour leur fonction de soutenir le développement des cellules germinales (Johnson, 1991).

En effet sous l'influence de FSH, les cellules de Sertoli secrètent différents composés intervenants dans la nutrition des cellules de la lignée germinale, ainsi que de nombreux facteurs spermatogénétiques et endocrines (l'hinibine, l'ABP) et différents facteurs de croissance et de différenciation des spermatogonies tels que : les FGF α et β (Fibroblast Growth Factor), l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor), et l'Interleukine II, etc (Silverthorn *et al.*, 2007).

La LH ou ICSH (interstitiel cell stimulating hormone) stimule la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig (Bonnes *et al.*, 2005). En effet, la testostérone présente des récepteurs au niveau des cellules de Leydig (Desjardins, 1978; de Krester, 1984) et agit en synergie avec la LH et avec d'autres hormones telles que les substances paracrines secrétées par les tubes séminifères sur la spermatogénèse (Amann, 1989 cité par Johnson, 1991).

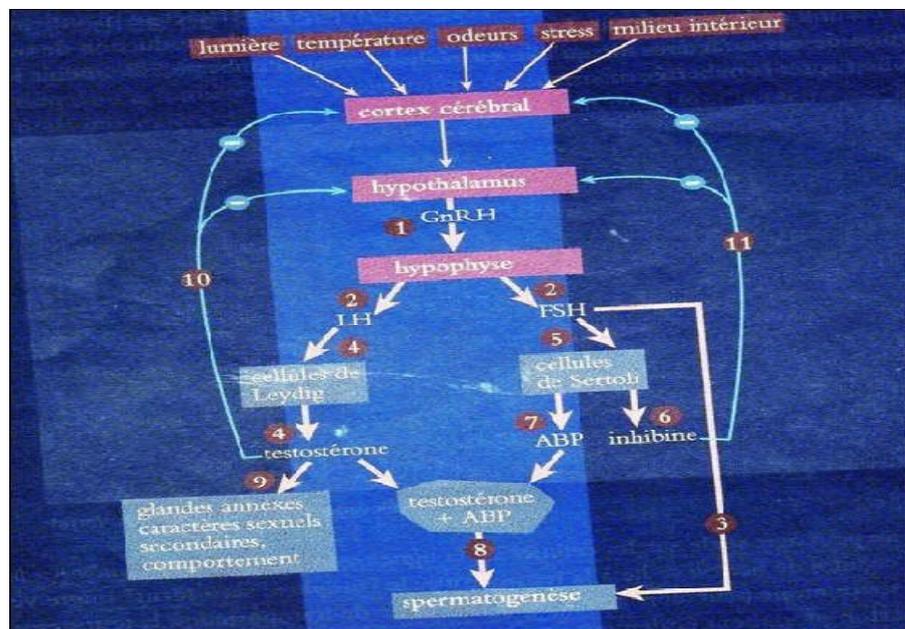


Figure 3: La régulation hormonale de la fonction sexuelle du mâle d'après Bonnes *et al.* (2005).
(Les chiffres indiquent la chronologie des événements).

IV. 2. Les stéroïdes sexuels

La fonction endocrine du testicule est principalement assurée par les cellules de Leydig qui sécrètent de la testostérone (Bonnes *et al.*, 2005). Cette hormone possède des récepteurs spécifiques au niveau des cellules de Sertoli. La testostérone exerce un rôle primordial dans la différenciation sexuelle chez les ovins et dans la croissance des testicules fœtaux. De même, la différenciation spermatogoniale, l'accomplissement et le maintien de la spermatogénèse dépendent clairement des stéroïdes testiculaires surtout de la testostérone (Desjardins, 1978). La LH est le principal régulateur de la stéroïdogénèse (Schanbacher, 1982). La testostérone joue également un rôle important dans la

croissance et sécrétion des glandes annexes (Desjardins, 1978; Baril *et al.*, 1993; Galbraith et Berry, 1994).

En plus de son rôle dans le contrôle des caractères sexuels primaires (qui concernent le fonctionnement de l'appareil reproducteur : spermatogenèse et sécrétion des glandes annexe), la testostérone permet le contrôle des caractères sexuels secondaires (morphologie, développement de l'avant-main, etc...) et tertiaires (combativité, comportement sexuel du mâle), qui apparaissent à la puberté et se maintiennent ensuite chez l'adulte sous l'action de la testostérone (Bonnes *et al.*, 2005). Enfin, la testostérone exerce également un rétrocontrôle négatif sur les hormones gonadotropes (Schanbacher, 1982).

IV. 3. L'inhibine

L'inhibine est une hormone non stéroïdienne inhibant en rétroaction la production des gonadotrophines hypophysaires ainsi que les productions des cellules de Leydig, l'inhibine joue un rôle important dans la régulation de la fonction testiculaire et de l'activité spermatogénétique à travers la suppression sélective de la concentration de la FSH dans le sang périphérique, sans altérer la sécrétion de la LH (McKeown *et al.*, 1997).

IV.4. L'ABP (Androgènes Binding Protein)

Un facteur de liaison des androgènes, liant la testostérone et assurant son transport et son maintien en concentration élevée dans les fluides tubulaires et épидидymaires (Silverthorn *et al.*, 2007).

IV.5. La mélatonine

La mélatonine est une hormone épiphysaire, synthétisée par la glande pinéale, elle est considérée comme messagère neuro-endocrinienne de l'effet de la photopériode, permettant à tous les animaux de percevoir la durée de la nuit et donc du jour. Elle n'est sécrétée de manière pulsatile que pendant la phase obscure du nyctémère. La mélatonine est libérée dans la circulation générale et dans le liquide céphalorachidien, elle agit par la suite niveau de récepteurs identifiés principalement dans la pars tuberalis de la tige hypophysaire mais également au niveau de l'hypothalamus vraisemblablement pré-mamillaire : elle contrôle la libération de la LHRH pour des effets gonadotropes (Hanzen, 2005). La mélatonine augmente la pulsativité de LH et ainsi la production d'androgènes et donc des caractères sexuels tertiaires (Malpaux *et al.*, 1996 ; Locatelli et Mermillod, 2005). Cette hormone présente des concentrations dans le sang périphérique multipliées au moins par 50 à l'occasion du passage lumière/obscurité (Ravault, et Thimonier, 1988).

Chapitre II **Collecte & évaluation de la qualité de la semence**

I. Méthodes de récolte de la semence

Globalement, la semence peut être obtenue de deux manières :

I.1. Après le coït (post-coïtum)

Dans le vagin de la femelle de façon directe ; cette méthode est réalisée souvent en utilisant des femelles en œstrus, l'éjaculat correspond à celui d'un coït naturel, mais il a l'inconvénient de se mélanger avec les exsudats vaginaux qui altèrent les capacités biologiques des spermatozoïdes (Eduardo Villena Fernandez *et al.*, 2003).

I.2. Le vagin artificiel

Le principe de cette méthode consiste à faire éjaculer le mâle dans un appareil qui mime toutes les conditions naturelles que les organes génitaux externes féminins présentent pendant le coït. Cette méthode, simple et rapide, permet d'obtenir ou de récupérer un éjaculat total et non contaminé, il y'a cependant une légère difficulté due au fait que le bélier est très sensible aux conditions de température et de pression du vagin (Michelat, 1974).

L'érection et l'éjaculation sont généralement stimulées par la présence d'un boute-en-train, plus rarement, il est possible d'avoir recours à l'électro éjaculation (Figures 4 et 5).



Figure 4 : L'électro-éjaculateur utilisé pour la collecte de semence. (Boussena, 2013)

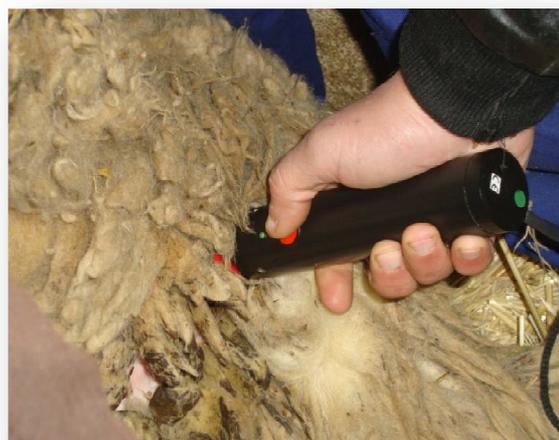


Figure 5 : Introduction de la sonde de l'électro-éjaculateur dans le rectum (Boussena, 2013).

I. 3. Collecte du sperme épидидymaire

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

Cette technique permet d'envisager l'utilisation d'animaux non collectables (vivants ou morts depuis quelques jours) et de recueillir les spermatozoïdes en nombre suffisant pour plusieurs dizaines d'IA ou de FIV. Selon Guerin *et al*, en 2003, qui ont travaillé sur la conservation et l'utilisation des spermés épидидymaires chez les ovins et les cervidés, ils ont rapportés que:

- Le pouvoir fécondant de ce sperme n'est pas différent de celui obtenu par éjaculation que ce soit en termes de fertilité ou de prolificité.
- Le sperme épидидymaire se conserve plusieurs jours à +4 °C dans l'organe ou dans le milieu épидидymaire non dilué.
- La fertilité du sperme épидидymaire d'ovins diminue en fonction du temps mais il est encore utilisable après 72 heures de conservation, la fertilité étant alors encore égale à environ la moitié de la fertilité initiale.
- Selon Cary *et al*. (2004), les spermatozoïdes épидидymaires de taureau, d'étalon et de bélier sont plus résistants au choc dû au froid que les spermatozoïdes éjaculés

I.3.1. Techniques de récolte du sperme épидидymaire

I.3.1.1. Méthode de float- up

La méthode de float up a été décrite par Cary *et al*. (2004), son principe est comme suit : la queue et la partie proximale de l'épididyme sont incisées dans une boîte de pétrie ,puis lavées avec environ 2, 5 ml d'une extension chauffée à 37°C, ensuite transférées dans une seconde biote de pétrie puis lavées à nouveau avec 2,5 ml de la même extension, la suspension du sperme obtenue à partir de ces deux étapes de lavage sera par la suite filtrée à travers un tamis de 200 micromètres de diamètre puis recueillie dans un tube en verre.

I.3.1.2. Méthode de rétrograde flushing

La méthode de rétrograde flushing a été décrite par Martinez Pastor *et al*. (2006), son principe est le suivant : La queue, la tête de l'épididyme et le canal déférent sont isolés du reste du testicule en effectuant une coupe avec un scalpel. Après cela, la lumière du canal déférent sera annexée d'une canule avec une aiguille, les spermatozoïdes seront ensuite rincés dans une direction rétrograde des canaux déférents à travers la queue de l'épididyme avec une seringue contenant environ 2 ml du TRIS A réchauffé à 37° C (Figure 6).

Les volumes de liquide obtenus variaient de 0,8 à 2,5 ml avec une concentration moyenne des gamètes de 8×10^9 spz/ml pour les béliers.



Figure 6 : Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier (Guerin *et al.*, 2003).

II. Évaluation de la qualité du sperme

Selon Parez et Duplin (1978), l'évaluation du sperme est la première opération à effectuer au laboratoire, elle a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques biologiques plus au moins corrélées à son pouvoir fécondant afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

Les examens de routine effectués au niveau des centres d'IA ovine sont ceux de la mesure de la motilité massale des spermatozoïdes, du volume éjaculat et de la concentration en spermatozoïdes.

II.1. Examens macroscopiques

II.1.1. Volume de l'éjaculat

La mesure du volume d'éjaculat s'effectue par une lecture directe à l'aide des graduations d'un tube de collecte (Figure 6). La majorité des béliers éjaculent une moyenne de 1.0 ml avec une variation de 0.5 à 2 ml (Maxwell et Evans, 1987 ; Hafez, 1987). Chez les espèces à déposition vaginale, cas du bélier, le volume est peu abondant mais très concentré (Eduardo Villena *et al.*, 2003).



Figure 7 : Estimation du volume et de l'apparence de l'éjaculat (Boussena , 2013).

II.1.2. Couleur et consistance du sperme

L'appréciation de la couleur se fait dès son obtention à l'œil nu dans le tube de collecte, chez le bélier, la couleur normale du sperme est blanche laiteuse ou bien crèmeuse pâle, le sperme pathologique peut avoir, selon les cas, une couleur brunâtre, rosée, bleuâtre, jaunâtre, rougeâtre ou grisâtre. (Maxwell et Evans, 1987 ; Hafez, 1987).

En général plus le sperme est blanc et visqueux, plus sa concentration en spermatozoïdes est élevée, on note :

- *Sperme crémeux épais* correspond à une concentration de 5×10^9 spermatozoïdes/ ml ;
- *Sperme laiteux* correspond à 2×10^9 spermatozoïdes/ ml ;
- *Sperme trouble* correspond à 0.7×10^9 spermatozoïdes/ ml (Douet, 2000).

II.2. Examens microscopiques

Ils comportent l'évaluation de la motilité, de la concentration en spermatozoïdes, du pourcentage en spermatozoïdes vivants et de la morphologie des spermatozoïdes.

II.2.1. Motilité

C'est un élément d'appréciation de la vitalité des spermatozoïdes, et de leur niveau de vivacité. Elle peut porter sur la semence globale après récolte (motilité massale) ou sur la semence diluée en s'intéressant aux spermatozoïdes individualisés (motilité individuelle) (Vaissaire, 1977).

II.2.1.1. Motilité massale

C'est un examen rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès celle-ci est récoltée. Son principe est le suivant : une goutte de semence pure est déposée sur une lame de microscope chauffée à 37°C puis observée au faible grossissement (x 10), on observe le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes qui forment des tourbillons plus ou moins rapides (Eilts, 2004). Ceux-ci sont notés subjectivement sur une échelle de 0 à 5 (Tableau 1).

Selon (Baril *et al.*, 1993), l'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur, à cette température, diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes.

Tableau 1 : Description de la motilité massale des spermatozoïdes (Salamon, 1976).

Note	Description
0	Pas de motilité, tous les spermatozoïdes sont morts.
1	Très faible motilité : très peu de spermatozoïdes montrent des signes de vie sans mouvements progressifs.
2	Motilité très faible : 20 à 40% de spermatozoïdes sont actifs ou vivants, pas de formation de vagues.
3	Motilité massale faible : il n a pas ou il ya peu de vagues lentes, les spermatozoïdes individualisés peuvent être observés.45 à 65% de spermatozoïdes sont actifs
4	Bonne motilité : mouvements rigoureux, de vagues et tourbillons ne sont pas aussi évidents qu'en score 5.
5	Très bonne mobilité : vague et tourbillon, mouvements très rapide, les spermatozoïdes ne peuvent être vus individuellement.

A l'issue de cette notation, seuls les éjaculats ayant reçu une note de motilité supérieure ou égale à 3,5 et 4 sont gardés, selon les centres d'insémination.

Il faut noter que l'intensité des vagues est beaucoup plus importante dans les mêmes conditions chez le bélier que chez le taureau (Lacroix, 1976).

II.2.1.2. Motilité individuelle

L'estimation visuelle de la motilité individuelle est réalisée dans les mêmes conditions de température que la mobilité massale, sur une goutte de sperme pur ou dilué au 1/10 (10%) (selon la concentration de l'éjaculat) dans une solution de chlorure de sodium à 9 ‰ entre la lame et la lamelle, observée au moyen grossissement X 40 et noté comme pour la mobilité massale sur une échelle de 0 (aucun mouvement des spermatozoïdes) à 5 (spermatozoïdes "fléchants" avec un mouvement rectiligne) (Tableau 2) (Baril *et al.*, 1993; Marco-Jiménez *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes (Baril *et al.*, 1993).

Note	Description
0	Pas de déplacement des spermatozoïdes.
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblements du spermatozoïde, oscillations de la queue.
2	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement.
3	Les spermatozoïdes effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement.
4	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe.
5	Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes.

Il est aussi possible de réaliser une estimation objective de la motilité par ordinateur (C.A.S.A). Cette analyse informatisée de la cinétique des Spermatozoïdes permet une mesure plus fine des mouvements puisqu'il est possible, avec cette méthode, d'identifier chaque spermatozoïde et de suivre son déplacement (Kumar, et Naqvi.,2010).

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

II.2.2. Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat

Au niveau des centres d'IA ovins, aussitôt après la mesure de la motilité massale de l'échantillon, sa concentration est déterminée. Elle est exprimée par le nombre de spermatozoïdes par millilitre, la concentration du sperme de bélier varie de 1 à 6 milliards de spermatozoïdes par millilitre. En dessous de 2 milliards, l'échantillon est rejeté, les quantités de diluant à ajouter deviennent alors trop faibles pour garantir une bonne conservation des spermatozoïdes (Sagot, 2009).

Diverses méthodes sont utilisées à cet effet à savoir : Hématimètre, Néphélométrie ou, spermidensimétrie, consistance de la semence et Spectrophotométrie. Cette dernière est la méthode la plus fréquemment utilisée, les deux centres d'IA Algériens utilisent cette méthode. (Allaoui, 2012).

Le principe de cette méthode d'analyse repose sur la mesure d'absorbance (ou densité optique) du sperme, après dilution d'un volume constant de semence pure dans une solution de sérum physiologique formolée (Guillot, 2002 ; Sagot, 2009).

Le comptage direct des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique est possible (cellule de Thoma ou de Malassez). Cet examen suppose une dilution préalable. Le comptage est très précis, mais nécessite beaucoup de temps (Hafez et Hafez, 2000, cités par Bester, 2006).

Les figures 8 et 9 représentent la méthode du comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre.

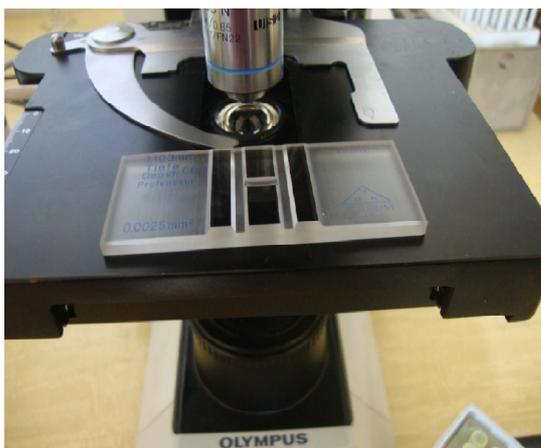


Figure 8 : Hématimètre utilisé pour le comptage des spermatozoïdes (Cellule de Thoma) (Boussena, 2013).

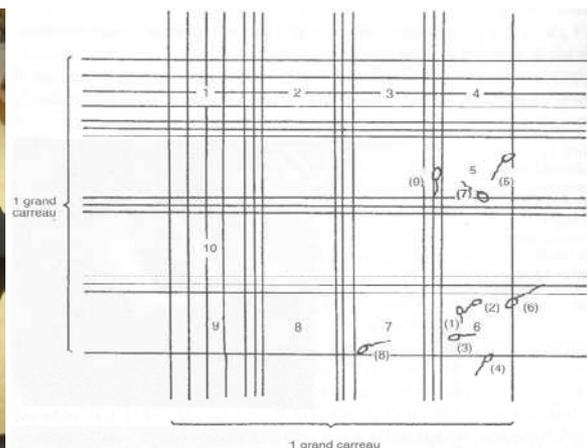


Figure 9: Comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre (Baril *et al.*, 1993).

II.2.3. Examens morphologiques des spermatozoïdes

L'étude morphologique des éléments figurés du sperme nécessite le recours aux préparations colorées. Diverses méthodes de colorations sont utilisées, les unes ont simplement pour objet de mieux apparaître la morphologie générale des spermatozoïdes, les autres dites colorations vitales permettent de différencier les spermatozoïdes vivants des morts. (Derivaux et Ector, 1989).

II.2.3.1. Colorations totales

Parmi les *colorations totales*, certaines sont dites simples (encre de Chine, bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane, fuschine...): elles fournissent une coloration uniforme des spermatozoïdes tandis que les secondes dites doubles (Giemsa, Williams) font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire.

II.2.3.2. Colorations vitales

Il s'agit de méthodes de colorations différentielles permettant de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport aux vivants. La coloration vitale a pour principe d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (éosine, rose Bengale, vert de Crésyl) et un colorant de fond qui facilite la lecture (bleu de méthylène, nigrosine) (Hanzen, 2005).

La coloration la plus utilisée en routine est l'éosine-nigrosine. Elle est la référence en matière d'examen morphologique de la semence. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs et sans couleur contre le fond violet de la nigrosine, alors que les spermatozoïdes morts ou endommagés qui ont une membrane plasmique altérée apparaissent de couleur rosâtre (Agnieszka Partyka *et al.*, 2012). (Figure 10).

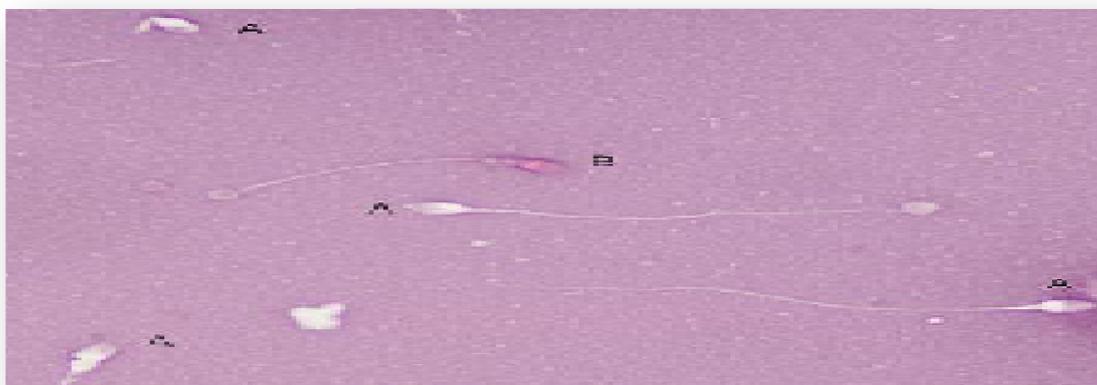


Figure 10 : Coloration eosine-nigrosine, (A) spermatozoïdes vivants non colorés, (B) spermatozoïdes morts colorés en rose (Moskovtsev *et al.*, 2013).

II.2.4. Comptage du pourcentage de spermatozoïdes vivants, morts, et anormaux

Cette détermination requiert la numération de tous les spermatozoïdes rencontrés dans les champs microscopiques, puis la numération des formes anormales. Pour obtenir une estimation assez significative on compte 150 à 200 cellules et les pourcentages des formes anormales et mortes sont calculés ainsi comme suit :

$$X = (n \times 100) / N$$

- n : nombre de spermatozoïdes anormaux repérés.
- N : nombre de spermatozoïdes totaux comptés (Colas, 1980).

II. 3. Méthodes plus avancées d'évaluation de la semence chez le bélier

Les autres méthodes utilisées dans les centres spécialisés sont plus objectives mais elles nécessitent du matériel adapté et onéreux, on distingue :

II. 3.1. CASA: (Computer Assisted Sperm Analysis)

C'est un Système informatique d'analyse de la semence qui s'est développé de façon significative au cours des dernières années, Cet outil permet d'obtenir de nombreux paramètres objectifs et précis en évaluant un très grand nombre de spermatozoïdes en très peu de temps. En effet, il permet d'apprécier la concentration du sperme, la mobilité massale et individuelle, les mouvements des spermatozoïdes (Figure 11) et la fréquence des battements des flagelles, ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà subit leur capacitation sont reconnus à leur mouvement hyperactivé (Rijsselaere *et al.*, 2005).

Ce système permet aussi le calcul automatisé du nombre de paillettes qui peuvent être préparées à partir d'un éjaculat (Agnieszka Partyka *et al.*, 2012).

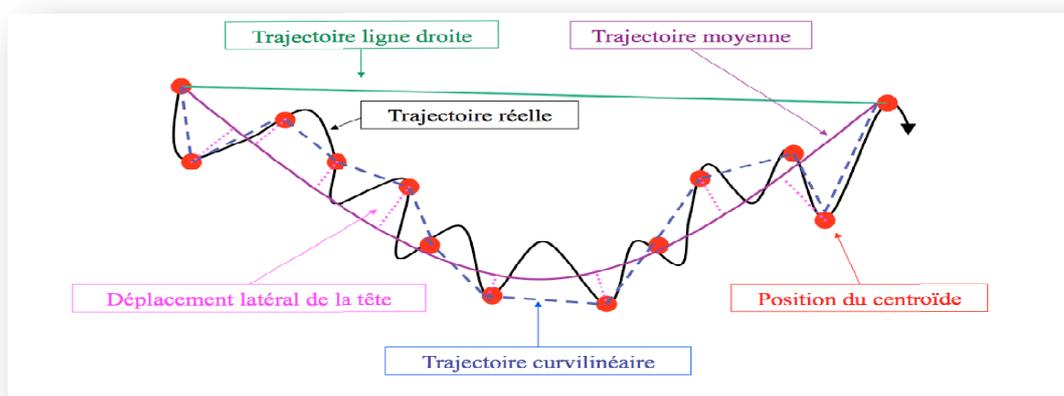


Figure 11 : Trajectoires des spermatozoïdes analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (CASA) (Ponthier *et al.*, 2012).

II.3.2. Le système SQA (Sperm Quality Analyzer)

Cet appareil semi-automatique utilisant la densité optique permet de déterminer la concentration, la mobilité et le pourcentage de spermatozoïdes ne présentant pas d'anomalies morphologiques. Ce système est facile à utiliser, et son prix est plus abordable que le système CASA.

Cependant, il est peu fiable pour les semences de mauvaise qualité et pour les semences très concentrées (Rijsselaere *et al.*, 2005).

II.3.3. Le microscope à transmission électronique (MET)

Il permet d'observer toutes les anomalies morphologiques telles que les dommages membranaires et les lésions de l'acrosome. Vu son coût, il est réservé à des centres spécialisés. (Pena , 2004).

II.3.4. La fluorescence

La fluorescence est une méthode permettant d'évaluer la morphologie et le fonctionnement des cellules, elle peut se faire à l'aide d'un microscope à fluorescence ou bien en utilisant la cytométrie de flux, cette méthode permet d'évaluer plusieurs caractéristiques simultanément car différents colorants peuvent être utilisés sur le même échantillon (Pena *et al.*, 1998)

Les paramètres pouvant être évalués grâce à cette méthode sont nombreux : la proportion de spermatozoïdes vivants et morts, l'intégrité membranaire, le fonctionnement des mitochondries, l'intégrité de l'acrosome, la capacitation, la concentration intracellulaire en calcium, la structure de la chromatine ou les composants de l'ADN. (Pena, 2004).

Parmi les colorants utilisés dans ce type d'analyse, on distingue des lectines couplées à la fluorescéine, la chlortétracycline qui est un antibiotique fluorescent, des anticorps couplés à la fluorescéine, la Carboxy-SNARF-1, le diacétate de carboxyfluorescéine (CFDA) et l'iodure de propidium (PI) (Rijsselaere *et al.*, 2005).

II.3.5. Test de gonflement hypo-osmotique (HOST)

Le test hypo-osmotique ou HOST est un test qui a pour but d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. En effet, les cellules présentant une membrane plasmique intacte ont la capacité de se déformer et d'évacuer l'eau. Lorsque la cellule est exposée à des conditions hypo-osmotiques, l'eau va pénétrer dans le milieu intracellulaire jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint de part et d'autre de la membrane.

La cellule va donc gonfler. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau des spermatozoïdes qui vont montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement de celui-ci (Pena, 2004).

La semence est diluée dans une solution hypotonique puis le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant une période de 30 à 60 minutes. Une goutte de semence est ensuite placée entre lame et lamelle et 100 à 200 spermatozoïdes sont observés au microscope à contraste de phase au grossissement x40.

Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g » (Figure 12). Les catégories les plus aisés à reconnaître sont les catégories b, e et g. En revanche, si la membrane plasmatisque est endommagée, les spermatozoïdes vont conserver leur morphologie.

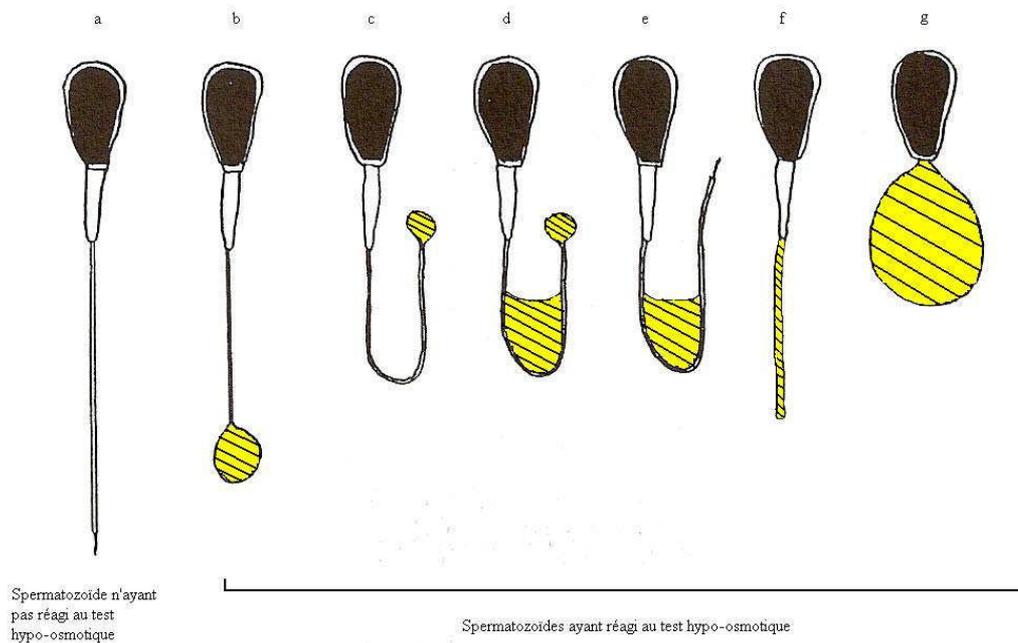


Figure 12 : modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.

(England., 1993)

Chapitre II

Cryobiologie

I. Introduction

Le but de la conservation des tissus au froid est le blocage ou tout au moins le ralentissement des fonctions cellulaires et de la conservation des structures physico-chimiques qui conditionnent ces fonctions. Les faits naturels montrent qu'un organisme, soumis à l'action du froid voit son activité fonctionnelle diminuer puis s'arrêter.

La cryoconservation des tissus vivants, particulièrement prometteuse et intéressante, a depuis toujours passionné les scientifiques et représente aujourd'hui une discipline à part entière désignée sous le terme de « cryobiologie ». Bien en deçà du rêve d'immortalité, la cryopréservation présente de nombreuses applications : dans le domaine de la médecine, de biotechnologie, de l'agriculture ou encore de l'environnement.

II. Particularité de la conservation de la semence ovine

La semence du bélier peut être conservée à l'état liquide (5 ou 15-20 °C) ou être cryoconservée. 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 exo-cervicale (à l'entrée du col de l'utérus). La cryoconservation de la semence du bélier réduit beaucoup le pouvoir fécondant des spermatozoïdes car l'utilisation de l'insémination exo-cervicale avec la semence cryoconservée donne lieu à de faibles taux de fécondation. En revanche, 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. 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 (Salamon et Maxwell, 2000).

III. Les techniques de conservation de la semence

III. 1. Conservation à long terme (congélation ou cryoprotection)

III.1.1. Définition et historique

En 1789, Spallanzani remarqua au cours de ses expériences que le sperme de grenouille stocké dans la neige conservait ses propriétés fécondantes. Mais ce n'est qu'en 1949 que Polge et son équipe mirent au point la première procédure de congélation des spermatozoïdes et utilisèrent le glycérol comme agent cryoprotecteur. (Amann, 1998 ; England, 1993).

Toutes les cryoconservations en médecine de la reproduction ont un objectif : arrêter l'horloge biologique des cellules afin d'augmenter leur durée de conservation, La cryoconservation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures, souvent dans l'azote liquide à -196°C . À cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (Bakhach *et al.*, 2007).

Morris (1981) rapporte que dans ces conditions de températures que les réactions chimiques seraient 8 millions de fois plus lentes qu'à 0°C .

III.1.2. Principes de congélation des cellules

Les techniques de congélation détériorent la qualité de la semence (Batista *et al.*, 2009), l'exposition des cellules au froid leur fait courir trois types de danger : le choc thermique, la cristallisation et les stress osmotiques (Watson, 2000).

III.1.2.1. Chocs thermiques

On appelle *chocs thermiques* les changements rapides de température allant essentiellement de 35 à 15°C et de 0 à -80°C (Bakhach *et al.*, 2007). Le choc dû au froid affecte principalement les membranes plasmiques, acrosomiques et mitochondriales des spermatozoïdes (Hammerstedt *et al.*, 1990 ; Watson, 1995 ; Sieme *et al.*, 2008).

Ces variations de température créent des changements de l'arrangement des constituants lipidiques membranaires (cholestérol et phospholipides) (Parks *et al.*, 1981 ; Darin-Bennet *et al.*, 1973), et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du spermatozoïde (Medeiros *et al.*, 2002; Bakhach *et al.*, 2007). Il s'ensuit une perte de perméabilité sélective de la membrane au calcium (Medeiros *et al.*, 2002).

Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est très élevée, la motilité et la fertilité seraient réduites (Collin *et al.*, 2000). Il en va de même pour la viabilité du spermatozoïde (Simpson et White, 1986). Certaines des composantes du spermatozoïde sont retrouvées dans le diluant après le refroidissement, telle la hyaluronidase, ce qui indique que la membrane acrosomique a été endommagée (Watson, 1981). Ainsi le cryodommage de la membrane mitochondriale entraîne une diminution de la production d'ATP (Watson, 1995).

Il devient donc indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leurs permettre de résister à ces modifications délétères.

III.1.2.2. Cristallisation

L'eau est essentielle à la structure et au bon fonctionnement des cellules vivantes mais elle est également le principal agent responsable des cryodommages au moment de la congélation. Pendant sa congélation, l'eau va subir une transition de phase passant d'un état liquide à un état cristallin (Mazur, 1968). La formation de glace extracellulaire serait activatrice du processus de cristallisation intracellulaire (Mazur, 1965; Toner, 1993).

La présence de cristaux dans le milieu extracellulaire crée un gradient de concentration qui favorise la sortie d'eau de la cellule au profit de l'entrée des solutés. À des basses températures, la membrane cellulaire modifie son coefficient de perméabilité et se comporte comme une membrane semi-perméable (Andersen, 1969; Mazur, 1984).

De plus, la vitesse de refroidissement de la semence détermine si la formation des cristaux de glace sera intra ou extracellulaire lors de la congélation. La cristallisation extracellulaire modifie l'environnement chimique des cellules et génère des contraintes mécaniques qui vont déformer les cellules. D'autre part, la cristallisation intracellulaire combinée à la déshydratation de la cellule peut occasionner des lésions aux membranes des organelles intracellulaires (Bakhach *et al.*, 2007).

III.1.2.3. Stress osmotique

Au cours de la congélation des spermatozoïdes, la formation de cristaux extracellulaires augmente l'osmolarité de l'eau intracellulaire ainsi que la concentration en solutés dans le milieu extracellulaire. Il se crée donc un appel d'eau depuis le milieu intracellulaire vers l'extérieur de la cellule jusqu'à ce que les concentrations en solutés soient identiques de part et d'autre de la membrane plasmique et provoque sa sortie et la déshydratation de la cellule.

Les cryoprotecteurs sont très importants pour empêcher la formation de cristaux extracellulaires (Medeiros *et al.*, 2002). Durant le processus de congélation, l'ajout de cryoprotecteurs au diluant de la semence crée un stress osmotique plus ou moins important selon sa perméabilité. La concentration finale de cryoprotecteurs dans un médium détermine son effet sur la cellule.

Les cellules exposées à des concentrations élevées de cryoprotecteurs subiront une déshydratation et une perte de volume intense. On appelle limite de tolérance osmotique le degré auquel la cellule peut maintenir sa viabilité malgré les variations de volumes cellulaires causées par les stress osmotiques (Bever-Gilmore, 1998).

La figure 13 montre le mécanisme et les conséquences de formation de cristaux de glace extracellulaires à des basses températures.

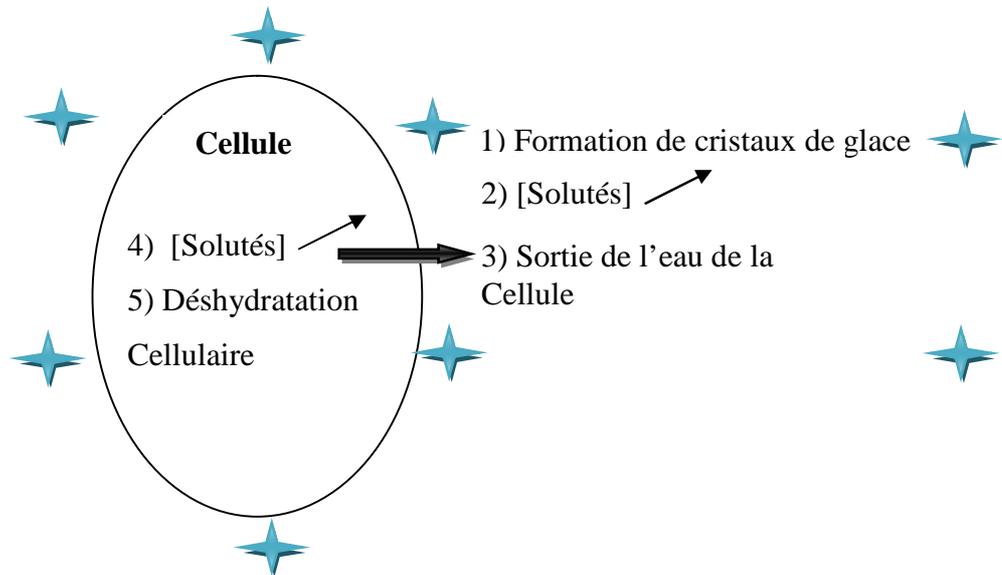


Figure 13 : Conséquences de la formation de glace sur la cellule pendant la congélation (Anne, 2007).

III.1.3. Procédure de la congélation

La procédure, couramment utilisée dans l'industrie œuvrant en insémination artificielle, comprend une série d'étapes : la dilution, refroidissement à 4 ou 5°C, la cryoprotection, l'emballage, la congélation et l'entreposage dans l'azote liquide à -196°C, sont toutes les étapes qui peuvent influencer la structure et la fonction des spermatozoïdes (Tasseron *et al.*, 1977; Bailey *et al.*, 2003).

III.1.3.1. La dilution et cryoprotection

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.

Les diluants de semences sont des solutions aqueuses servant à augmenter le volume d'un éjaculat pour l'amener à la concentration de conservation souhaitée et à protéger les spermatozoïdes contre les chocs thermiques et les phénomènes de cristallisation (Purdy, 2006).

Afin d'être efficace, le diluant doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes, conserver un Ph extracellulaire optimal pour la survie des

spermatozoïdes ainsi qu'une osmolarité physiologique, empêcher la prolifération bactérienne et faciliter l'ajout d'agent cryoprotecteur (Gadea, 2003).

Les ratios de dilution utilisés à cet effet varient d'une espèce à l'autre, variant habituellement de 1 : 2 à 1 : 20 (semence : diluant), Chez le bélier ce ratio variant de 1 : 2 à 1 : 5. Nonobstant l'utilisation de ratios de dilution des spermatozoïdes épидидymaires ou éjaculés plus grands affectent négativement la motilité et la viabilité des spermatozoïdes de taureau, de lapin et de bélier (Cheng *et al.*, 1949). Ce phénomène est appelé « effet de dilution » (Maxwell et Johnson, 1999).

Généralement, les diluants de congélation de la semence sont composés de cryoprotecteurs non pénétrants et pénétrants, d'un tampon, d'un ou plusieurs sucres, de sels et d'antibiotiques (Evans et Maxwell, 1987).

III.1.3.1.1. Cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants ce sont des substances à poids moléculaire élevé qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Leur action est extracellulaire, ils permettent d'enrober les cristaux de glace formés par la congélation et protègent ainsi les spermatozoïdes des déformations et lésions cellulaires.

La présence cryoprotecteurs non pénétrants augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde (Purdy, 2006), ce qui retarde la formation de glace intracellulaire, ainsi ils protègent le spermatozoïde des pertes de cholestérol et de phospholipides membranaires en diminuant la liaison des protéines du plasma séminal à la membrane plasmique, La conservation de la cellule est par conséquent favorisée. Les cryoprotecteurs non pénétrant les plus utilisés sont :

- **Jaune d'œuf**

Dans le jaune d'œuf, la lipoprotéine de basse densité (*low-density lipoprotein* « LDL ») est le composant du jaune d'œuf montrant le meilleur effet protecteur de semence (Pace et Graham, 1974; Watson, 1981). Le mécanisme de cette protection est expliqué selon plusieurs hypothèses, la première propose que les LDL s'associent à la membrane des spermatozoïdes et la stabilisent, ce qui protégerait les spermatozoïdes. La seconde hypothèse rapporte que les phospholipides du LDL forment un film protecteur à la surface de la membrane spermatique (Quinn *et al.*, 1980) ou remplacent les phospholipides membranaires perdus ou endommagés pendant la cryoconservation (Graham et Foote, 1987 ; Foulkes *et al.*, 1980).

Selon Drobnis *et al.* (1993), ces LDL interagissent avec les protéines du plasma séminal. Il a été démontré que le jaune d'œuf protège la semence de la transition des lipides membranaires provoquée par les chocs thermiques. Sa présence dans le diluant augmente le ratio cholestérol / phospholipides de la membrane plasmique ce qui diminue la fluidité membranaire et les lésions cellulaires (Parks *et al.*, 1981).

Le jaune d'œuf est généralement très concentré dans le diluant, il est utilisé à (20% v/v). (Foulkes, 1977; Watson, 1981).

- **Lait**

Le lait est un milieu biologique de composition complexe, composé de protéines, sels, glucides, lipides, vitamines, etc. Le pH est d'environ 7,0 et la pression osmotique autour de 300 milimoles sont proches de ceux de la semence (Hafez, 1993).

Le lait entier ou écrémé est classiquement utilisé comme milieu de conservation de la semence de bélier. L'efficacité du lait en tant que milieu de dilution et de conservation de la semence est liée à son rôle de tampon, son action protectrice contre le choc thermique et son action antioxydante contre quelques métaux lourds (Jones, 1969).

Cette action est liée à la lactoferrine qui chélate le fer, une protéine proche de la transferrine. Il est à noter que cette protéine constitue également l'une des protéines majoritairement sécrétées dans le fluide épидидymaire chez le bélier et plusieurs espèces domestiques. Elle pourrait assurer un rôle de protection des spermatozoïdes au cours de la maturation et le stockage épидидymaire (Dacheux *et al.*, 1998). En plus, le lait apporte le lactose comme substrat énergétique aux spermatozoïdes.

L'effet protecteur du lait est attribué à la caséine (fraction protéique) qui se fixe à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bergeron et Manjunath, 2006) ce qui minimise la perte de lipides de la membrane plasmique et permet de maintenir la motilité et la viabilité de la semence pendant la congélation (Bergeron *et al.*, 2007).

Le lait entier ou le lait écrémé sont couramment utilisés comme base de diluant pour la cryonservation de semence lorsqu'ils sont supplémentés en glycérol (Choong et Wales, 1963), Il doit toute fois être chauffé à la température de 95° C pendant 10 minutes afin d'inactiver la lacténine présente dans la fraction protéique car cette dernière possède des radicaux libres qui ont un effet toxique sur les spermatozoïdes (Flipse *et al.*, 1954).

III.1.3.1.2. 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 la cellule (Purdy, 2006). Lorsqu'ils sont à l'extérieur, ces substances augmentent l'osmolarité du diluant et stimulent la déshydratation de la cellule. La perte d'eau intracellulaire du spermatozoïde le dispose à la congélation (Medeiros *et al.*, 2002).

Lorsque ces cryoprotecteurs sont à l'intérieur de la cellule, ils diminuent le stress osmotique de la cellule causé par la déshydratation (Medeiros *et al.*, 2002). Cette sortie d'eau du spermatozoïde diminue son point de congélation et réduit les phénomènes de cristallisation intracellulaire (Purdy, 2006).

Les cryoprotecteurs les plus utilisés sont :

- **Glycérol**

Le glycérol est le cryoprotecteur pénétrant le plus efficace et le plus utilisé dans la conservation de semence du bélier (Salamon et Maxwell, 2000), sa propriété cryoprotectrice est découverte par polge *et al.* (1949).

Il possède une action à la fois intra- et extra-cellulaire, Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes où il abaisse la température de nucléation de l'eau, ce qui diminue les risques de formation de glace intracellulaire qui est létale pour les cellules.

Dans le milieu extra-cellulaire, le glycérol, dont la température de congélation est plus basse que celle de l'eau, se fixe aux molécules d'eau et diminue ainsi le seuil de sa congélation et permet de limiter le gradient osmotique et de ralentir la vitesse de déshydratation des spermatozoïdes. (Hay *et al.*, 1997). Ce cryoprotecteur minimise donc la formation des cristaux de glace et modifie leur structure en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes. De plus, le glycérol diminue la température à laquelle les membranes subissent un changement de phase (phase liquide-cristalline à phase gel) pendant le refroidissement et minimise le risque de cassure des membranes des spermatozoïdes causée par le choc dû au froid. (Mazur et Cole, 1989).

Il est utilisé à des concentrations variant entre 1 et 8 %. Selon Kundu *et al.* (2001), 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 meilleure conservation de la motilité des spermatozoïdes de la semence congelée. Cependant, le glycérol possède une toxicité à des

concentrations importantes. Il peut provoquer des dommages membranaires sur les spermatozoïdes (rupture membranaire, perte de la stabilité et de la perméabilité membranaires), une altération de l'acrosome, une désorganisation et un changement de viscosité du cytoplasme (Martins-Bessa *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2003).

L'utilisation du glycérol, connu pour ses propriétés cryoprotectrices, a été suggérée par certains auteurs pour protéger et stabiliser les membranes des spermatozoïdes au cours de la conservation à court terme de la semence. En effet Morrier *et al.* (2002) ont montré que la présence de glycérol à un taux de 7% dans le diluant durant réfrigération de la semence de bélier à 5°C ne réduit pas la qualité des spermatozoïdes.

- **Éthylène glycol**

L'éthylène glycol est un cryoprotecteur utilisé pour la congélation d'embryons de certaines espèces mammifères à des concentrations allant de 5% à 10% et dans la congélation du tissu ovarien mais aussi dans la cryoconservation de la semence (10% pour la semence de truite). Il présente la même structure chimique que le glycérol mais son poids moléculaire est inférieur. Il possède donc une perméabilité supérieure au glycérol qui pourrait être à l'origine d'une toxicité inférieure.

La mobilité après décongélation est meilleure lorsque le glycérol a été remplacé par l'éthylène glycol à la concentration de 5%. Mais après incubation, la mobilité est identique pour tous les diluants. Il en est de même pour l'intégrité membranaire (Martins-Bessa *et al.*, 2006 ; Rota *et al.*, 2006).

- **Le tréhalose**

Le tréhalose est un disaccharide composé de deux molécules de glucose, cette substance a la particularité d'être remarquablement thermostable, il possède un seuil de congélation très élevé (température de congélation -197°C dans 100mg/mL dans de l'eau) (Jain et Roy, 2009).

Lors d'une baisse importante de température, le tréhalose a la faculté de remplacer la molécule de d'eau à l'intérieur des cellules réduisant ainsi la formation de cristaux intracellulaires (Carpenter *et al.*, 1993). Ce glucide est décrit comme le plus efficace des sucres pour la protection des spermatozoïdes lors de la cryoconservation (Najafi *et al.*, 2013).

De nombreuses études montrent un effet bénéfique du tréhalose pour la cryoconservation de semence de plusieurs espèces comme le bélier (Aisen *et al.*, 2002; Jafaroghli *et al.*, 2011), le bouc

(Aboagla et Terada, 2003; Aboagla et Terada, 2004), le taureau (Chen et al., 1993; Woelders *et al.*, 1997), le porc (Hu *et al.*, 2009) et la souris (Sztein *et al.*, 2001).

D'autres cryoprotecteurs pénétrants sont également utilisés, comme le méthanol chez le poisson (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2010), du diméthylacétamide chez le coq (Blanco *et al.*, 2010; Wishart, 2007) et du DMSO (diméthylsulfoxyde) chez l'amphibien (Mansour *et al.*, 2010).

III.1.3.1.3. Sucres

Les sucres procurent l'apport énergétique aux spermatozoïdes, différents glucides ont été ajoutés aux diluants, tels que le glucose, le fructose, le raffinose, le galactose, en plus du rôle trophique des sucres, ceux ci participent également à l'équilibre osmotique du diluant (Watson, 1990).

Chez le bélier, le raffinose et le saccharose fournissent une meilleure protection de l'intégrité de l'acrosome, par rapport au glucose, au fructose ou au lactose (Salamon et Maxwell, 2000).

III.1.2.3.4 Tampon

Le métabolisme des spermatozoïdes entraîne une augmentation de la production d'ions hydrogène qui est à l'origine d'une acidification du milieu qui est toxique pour les spermatozoïdes. En l'absence de substance tampon, cette diminution du pH peut entraîner une diminution de la fertilité et de la longévité des spermatozoïdes (England, 1993).

Les tampons utilisés sont généralement à base de tri-hydroxy-méthyl-aminométhane ou TRIS en association avec de l'acide citrique monohydraté. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible, des tampons à base de phosphate ou de citrate de sodium sont également utilisés (Vishwanath et Shannon, 2000).

III.1.3.1.5. Antibiotiques

Le sperme n'étant pas stérile et le diluant pouvant être un bon milieu de culture, c'est pourquoi des antibiotiques sont ajoutés pour lutter contre la prolifération bactérienne. En général, la dihydro-streptomycine et la benzyl-pénicilline sont les plus utilisées car elles sont bien tolérées par les spermatozoïdes (Leblanc, 2004).

III.1.3.2. Le refroidissement

Afin de minimiser les chocs thermiques potentiels, une fois diluée, la semence doit être placée au frais, à des températures variant selon les auteurs entre 4 et 15°C, le passage à ces

températures doit être progressif (Leboeuf *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2009) ainsi les différentes études réalisées sur le sujet montrent qu'une vitesse de refroidissement relativement lente donne de meilleurs résultats qu'une vitesse plus rapide (Hay *et al.*, 1997 ; Pena *et al.*, 2001 ; Nothling et Shuttleworth, 2005 ; Rota *et al.*, 2005).

La figure 14 résume les divers processus impliqués dans la congélation cellulaire, en tenant compte de la vitesse de refroidissement du matériel.

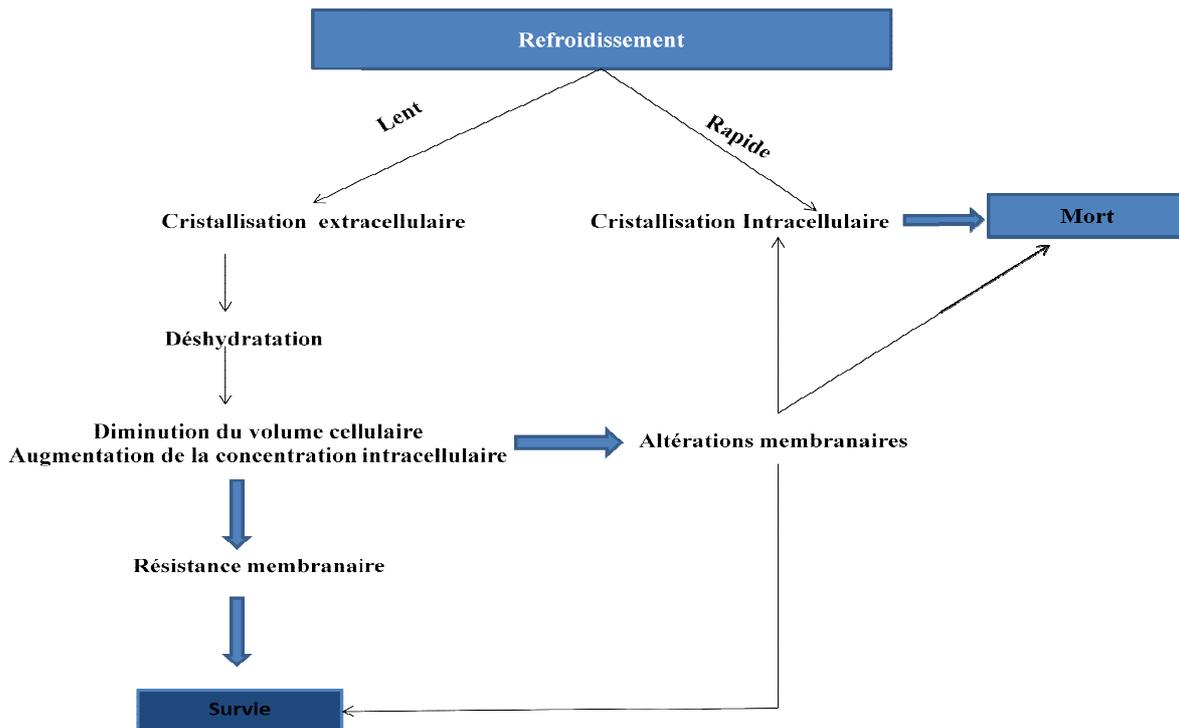


Figure 14 : Schéma indiquant les divers processus impliqués dans la congélation de cellules en fonction des vitesses de refroidissement (Claude Gazeau et Jean Dereuddre, 1986).

III.1.3.3. La congélation

Les spermatozoïdes sont conditionnés en paillettes fines de 0,25 ml, la congélation *au sens strict* correspond à la mise des paillettes dans les vapeurs d'azote puis à la plongée de celles-ci dans l'azote liquide à -196°C .

La méthode de congélation avec les paillettes dans l'azote liquide peut s'effectuer de façon manuelle sur les vapeurs d'azote liquide ou avec une machine qui contrôle le taux de refroidissement. La première méthode consiste à disposer horizontalement les paillettes à 16 cm au-dessus de l'azote liquide pendant deux minutes, elles sont ensuite descendues à 4 cm au-dessus de l'azote liquide pendant trois minutes avant d'être complètement immergées (Baril *et al.*, 1993).

Certains protocoles alternatifs utilisés par les chercheurs suggèrent de placer les paillettes de 3 à 5 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 4 à 5 min (Leboeuf *et al.*, 2000) ou 20 min (Dorado *et al.*, 2007) avant de les immerger.

La seconde méthode consiste à utiliser une machine de congélation qui permet de programmer différents taux de diminution de température pendant le processus de congélation.

III. 2. Conservation à court terme : Réfrigération

III. 2.1. Définition

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). La réfrigération de la semence consiste à abaisser progressivement la température de celle-ci à 4°C en présence de diluants. Cette descente en température a pour but de réduire les dépenses métaboliques et de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes (Gadea, 2003).

III. 2.2. Diluants et méthodes de conservation de semence de bélier en milieu liquide

Étant donné que la survie des spermatozoïdes à 4°C est réduite, il est nécessaire d'utiliser un milieu spécifique, ou diluant, afin d'accroître leur longévité et de préserver au mieux leur capacité de fécondation. En effet, Rota *et al.* (1995) ont montré que la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un diluant qu'en l'absence de diluant.

De plus, Linde Forsberg (1995) a prouvé que des inséminations artificielles de semence réfrigérée avec un diluant donnent des taux de gestation significativement plus élevés que des inséminations artificielles de semence réfrigérée sans diluant.

L'efficacité des diluants et des méthodes de conservation résident dans leur potentialité à maintenir l'ensemble des fonctions des spermatozoïdes en milieu liquide soit entre 4 et 5° C soit à 15° C. Ils sont le plus souvent basés sur l'utilisation de milieu biologique tel que le lait (Dauzier, 1956 ; Colas *et al.*, 1968), le jaune d'œuf (Dauzier, 1956 ; Salamon et Robinson, 1962), l'eau de coco (Salles, 1989).

- **Conservation dans le lait**

Le lait de vache écrémé est, parmi d'autres, le plus utilisé pour la conservation du sperme réfrigéré à 4° ou 15° C (Flipse *et al.*, 1954). Les spermatozoïdes du bélier peuvent être conservés dans le lait

à ces mêmes températures jusqu'à une durée de 10 h sans perte du pouvoir fécondant. Cependant, la fertilité de la semence est meilleure après conservation à 15°C par rapport à 4°C (Colas, 1984).

- **Conservation à base du jaune d'œuf et des glucides**

D'autres milieux que le lait peuvent être utilisés pour conserver la semence ovine. Ces milieux sont généralement constitués d'un tampon minéral ou organique associé à des glucides et du jaune d'œuf. Ce dernier présente un effet préservateur bien connu sur la mobilité, le métabolisme et la fertilité des spermatozoïdes conservés à 5°C et cela grâce à la lécithine qu'il renferme (Mayer et Lasley, 1945 ; O'Shea et Wales, 1967 ; Robertson et Watson, 1987).

Le diluant Glucose-citrate-jaune d'œuf est l'un des premiers à avoir été testé avec succès sur de la semence de bélier depuis 1960. Plus récemment, les diluants de conservation de semence en frais sont à base de Tris : Tris-glucose-jaune d'œuf et le Tris-citrate-fructose-jaune d'œuf (Salamon et Maxwell, 2000). Selon Druart *et al.* (2009), le Tris associé à du glucose et du jaune d'œuf peut être une alternative au lait, en effet Colas *et al* n'ont pas observé de différence de fertilité après insémination artificielle avec de la semence conservée 4 h à 4°C avec du lait écrémé ou du Tris/JO.

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 inséminations artificielle 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 (Paulenz *et al.*, 2002). De même, après 24 h de conservation à 15°C.

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 globalement similaire à celle du lait (Maxwell et Salamon, 1993).

Une fois diluée, la semence est refroidie à 4°C ou à 15°C puis conditionnée en paillettes de 0.25ml (1.2 à 1.6 milliards de spermatozoïdes par ml).

De manière générale, il est recommandé d'utiliser la semence réfrigérée pour les inséminations artificielles durant les 8h qui suivent la collecte. Chez le bélier, les semences inséminées plus de 24h après la collecte montrent une baisse de fertilité de 10-35% par jour de stockage (Maxwell et Watson, 1996; Salamon et Maxwell, 2000).

La limite de cette technique consiste donc en la durée restreinte du pouvoir fécondant de la semence ce qui impose de fortes contraintes techniques aux centres d'insémination artificielle.

IV. Diluants commerciaux

Des diluants commerciaux peuvent être utilisés pour la conservation des spermatozoïdes en milieu liquide et/ou congelé. Cette section présentera les diluants commerciaux les plus souvent cités dans la littérature.

- **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 ; Bowman, 1988).

- **CAPROGEN® (Livestock Improvement, Nouvelle-Zélande)**

Est un diluant destiné à 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 et Shannon , 2000).

- **BioXCell ®**

Il est à base de lécithine de soya, cette dernière est composée en grande partie de phosphatidylcholine, phosphatidylinositol et phosphatidyléthanolamine, qui sont des phospholipides également retrouvés au niveau de la membrane spermatique (Lenzi *et al.*, 1996; Martinez et Morros, 1996). Chez le bélier, un diluant à base de lécithine de soya est meilleur que le diluant à base de jaune d'œuf commercial pour la préservation de la chromatine et de la motilité spermatique (Khalifa et Lymberopoulos, 2013).

Dans ce contexte, (Forouzanfar *et al.*, 2010) ont décrit chez cette même espèce que 1% de lécithine de soya combinée à du glycérol était aussi efficace que 20% de jaune d'œuf comme base de diluant de cryoconservation.

V. Dommages cellulaires dus au froid

Les conséquences de la cryoconservation sur les cellules sont dues au refroidissement lors de leur congélation et à leur réchauffement lors de la décongélation qui précède leur utilisation. (Amann, 1998).

V.1. Effets sur le métabolisme cellulaire

L'intensité du métabolisme est en fonction de la température. Une diminution de la température de 10°C entraîne une diminution de l'activité métabolique de 50%. A 2°C, il ne reste que 5% de l'activité métabolique présente à 37°C et à - 80°C, la plupart des processus métaboliques sont stoppés. La congélation des cellules induit donc un ralentissement du métabolisme. (Amann, 1998).

V.2. Effets sur les membranes cellulaires

De nombreuses évidences suggèrent que la membrane plasmique du spermatozoïde soit le site privilégié où surviennent les dommages résultant du refroidissement et de la congélation (Hammerstedt et coll, 1990; deLeeuw *et al.*, 1992).

Bien que la nature des phospholipides et le cholestérol composant la membrane plasmique du spermatozoïde lui confèrent un caractère unique (Watson, 1995), les perturbations membranaires reliées à une diminution de température ressembleraient à celles observées dans d'autres types cellulaires. En effet, la membrane plasmique du spermatozoïde possède essentiellement les mêmes caractéristiques que celles illustrées par le modèle de base, soit une mosaïque fluide constituée d'une bicouche de phospholipides avec des protéines intégrées, ainsi que des glycoprotéines et des glycolipides périphériques (Singer et Nicolson, 1972).

L'ajout du concept d'asymétrie, en complexifiant ce modèle, a permis de mieux caractériser les fonctions cellulaires telles la compartimentation et la perméabilité sélective (de Leeuw *et al.*, 1992; Parks et Graham, 1992). Au cours de la cryopréservation des spermatozoïdes, une baisse soudaine de la température augmenterait la diffusion latérale des lipides membranaires et faciliterait le regroupement de phospholipides non favorables à une configuration en bicouche, occasionnant ainsi une fluidification et une déstabilisation des membranes (de Leeuw *et al.*, 1992; Parks et Graham, 1992; Watson, 1995). Il en résulte une perte de l'intégrité membranaire et de la perméabilité sélective ce qui affecteraient les fonctions cellulaires telles l'activité enzymatique, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes (de Leeuw *et al.*, 1991; Parks et Graham, 1992; Robertson et Watson, 1987).

Dans ce concept, Moggia et Perros (1999), Rodriguez *et al.* (1994) ont mis en évidence les altérations de la membrane plasmique et de l'acrosome telles que la perte d'une portion de la membrane au niveau de l'acrosome, une vacuolisation ou la disparition de la membrane externe de l'acrosome et une perte des composants de l'acrosome. La cryoconservation a donc un impact direct sur la structure des membranes cellulaires et elle peut engendrer des dommages irréversibles.

RÉALISATION EXPÉRIMENTALE

Objectifs

Les biotechnologies liées à la reproduction ont connus un réel essor depuis quelques, décennies, poussés par le besoin de produire mieux et plus, les chercheurs ont mis au point des techniques à même de permettre d'augmenter rapidement la qualité génétique des sujets dans le but de maximiser la productivité des animaux d'élevage.

L'insémination artificielle représente aujourd'hui la biotechnologie de reproduction la plus largement répandue dans le monde, cette technique d'application, déjà courante dans nos élevages bovins, n'est cependant qu'à ses débuts en élevage ovin avec une utilisation relativement limitée vu la fragilité de la semence des petits ruminants vis-à-vis du froid.

L'objectif de la présente étude est de tester et d'évaluer l'effet de trois cryoprotecteurs rapportés dans la littérature à des concentrations différentes et ce en vue d'optimiser un protocole de conservation à court terme à une température de + 4°C d'une semence ovine, reproductible et abordable en pratique courante.

Matériel & Méthodes

I. Matériels utilisés

I. 1. Matériel biologique : Testicules

Pour la collecte de la semence, nous avons utilisé des testicules de bélier.

I.2. Matériel du laboratoire: Nous étions munis de :

- **Bistouri** : destiné aux différentes incisions et dissections ;
- **Gants d'examen** : Vu que le statut sanitaire de certains ovins était inconnu ;
- **Aiguille épicroânienne et seringue** : qui nous ont servis à ponctionner le canal déférent et à y injecter le liquide de collecte ;
- **Pince à clamer** : Elle nous a servis à empêcher le retour du liquide de collecte ;
- **Eppendorfs**: Destinés à contenir la semence collectée et les différents protocoles ;
- **Bain marie** : Nous a permis de maintenir la semence à 37°C pendant les premières évaluations de la qualité et aussi à réchauffer la semence avant chaque lecture ;
- **Incubateur** : Utilisé pour l'incubation pendant le test HOST ;
- **Vortex** : Pour homogénéiser la matière première ainsi que les différents milieux ;
- **Microscope à plaque chauffante** : Élément incontournable pour les différentes observations ;
- **Lames et lamelles** : Support des échantillons pour les observations ;
- **Cellule de Malassez** : Utilisée pour définir la concentration ;
- **Micropipettes** : Déposer les quantités adéquates des milieux utilisés ;
- **Balance à deux chiffres de précision** : Nous a servis à peser les quantités des différents constituants des cryoprotecteurs ;
- **Séparateur du jaune d'œuf** : Utilisé pour individualiser le jaune d'œuf du blanc afin d'en extraire le contenu ;
- **Réfrigérateur** : Maintien des échantillons à +4°C.

I.3. Produits de préparation

Nous avons par ailleurs utilisé du sérum physiologique, du formol, de l'Éosine, du Tris, de l'Acide citrique, du fructose, du jaune d'œuf, du glycérol et de l'éthylène glycol.

II. Méthodes

Pour la réalisation de notre expérimentation, nous avons récupéré des testicules de l'abattoir de Boufarik à 7 heures 30 minutes, ces derniers ont été acheminés, à température ambiante, au laboratoire de physiologie de la reproduction de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger où s'est tenue notre expérimentation.

Au total, nous avons collecté du sperme épидидymaire de 7 testicules, il est cependant à noter que ce n'est qu'après plusieurs collectes que nous avons pu récupérer une semence jugée bonne pour l'étude. Ce testicule provenait d'un ovin reproducteur âgé de trois ans. Les autres semences collectées avaient une qualité médiocre (anomalies morphologiques, faible concentration, anomalie de mobilité).

II.1. Préparation de la solution A

Au moyen d'une balance de précision à 2 chiffres, nous avons préparé une solution conventionnelle dont la composition est comme suit : **3,03 g** de Tris, **1,7 g** d'acide citrique, **1,25 g** de fructose et **100 ml** d'eau distillée, pour notre expérimentation, nous avons préparé un volume de **40 ml** contenant ainsi : **1,2 g** de Tris, **0,7 g** d'acide citrique et **0,5 g** de fructose, Ces composés sont dilués dans **40 ml** d'eau distillée, cette préparation est représentée dans les figures ci-dessous (Figure 15 & 16).

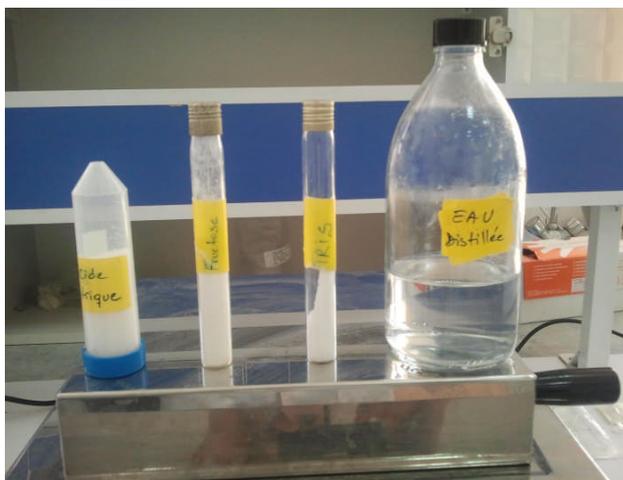


Figure 15 : Produits constituant la solution A (Cliché personnel).



Figure 16 : Pesée des produits dans une balance à deux chiffres de précision (Cliché personnel).

II.2. Collecte du sperme épидидymaire

La collecte de la semence a été réalisée avec la technique du rinçage rétrograde de l'épididyme dite « Flushing ». Dans un premier temps, nous avons dénudé les testicules de leurs

tuniques vaginales et cela en effectuant une petite incision au moyen d'un bistouri du côté opposé du complexe épидидymaire, puis nous les avons dilacérés. Par la suite nous avons réalisé une petite boutonnière sous le corps de l'épididyme à partir de laquelle nous avons commencé l'individualisation du complexe épидидymaire et le canal déférent (Figure 17 & 18), puis nous avons enlevé minutieusement toutes les séreuses entourant ce dernier ce qui évitera l'éclatement de celui-ci sous l'effet de la pression exercée par le liquide injecté lors du rinçage.

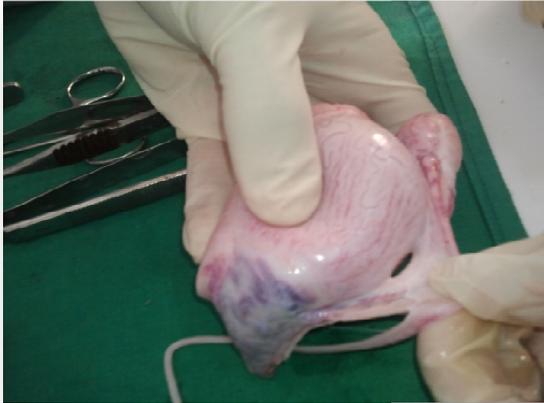


Figure 17 : Réalisation de la boutonnière sur un testicule dénudé de sa gaine vaginale (Cliché personnel).



Figure 18 : l'individualisation du complexe épидидymaire et le canal déférent (Cliché personnel).

Les vaisseaux sanguins de la queue épидидymaire sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille afin d'éviter toute contamination de la semence par le sang.

La deuxième étape consiste en le rinçage épидидymaire proprement dit « flushing », cette technique a été réalisée à l'aide d'une aiguille épидидymaire appliquée sur le canal déférent et une seringue contenant 1 ml de la solution A préalablement préparée et 2 cc d'air, ce dernier servira à faire progresser la totalité du liquide injecté. Au fur et à mesure que nous injectons le liquide, nous avons remarqué le gonflement des tubes séminifères et le durcissement de la queue épидидymaire (Figure 19 & 20).

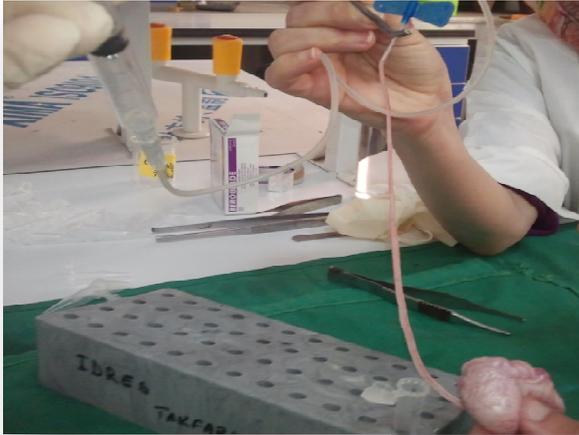


Figure 19 : Injection de la solution A dans le canal déférent (Cliché personnel).



Figure 20 : Gonflement des tubes séminifères de la queue épидидymaire (Cliché personnel).

En fin, une incision de la partie distale de l'épididyme a été pratiquée et la semence a été ainsi récupérée dans un eppendorf (Figure 21).



Figure 21 : Récupération de la semence dans un eppendorf (Cliché personnel).

II.3. Examen du sperme collecté

Le sperme récolté est immédiatement placé dans un bain-marie à 37° C et examiné sur place, cette évaluation a comporté l'examen macroscopique et microscopique.

II.3.1. Évaluation macroscopique

Elle a porté sur le volume, la couleur et la consistance de la semence collectée, en effet nous avons récolté 1,5 ml de sperme pur de couleur blanche laiteuse et une consistance un peu épaisse (Figure 22).



Figure 22 : Estimation du volume et de l'apparence du sperme collecté (Cliché personnel).

II.3.2. Évaluation microscopique

L'examen microscopique comprend l'étude de la motilité massale, de la mobilité individuelle et de la concentration.

- **Motilité massale**

Dès sa collecte, la motilité massale du sperme est évaluée, Elle est déterminée, sur une goutte du sperme pur prélevée au moyen d'une micropipette, déposée sur une lame préalablement chauffée à 37° C et placée sur la platine chauffante du microscope (37°C) sous un grossissement X 10. La note de motilité massale est ainsi attribuée selon l'importance et l'intensité des vagues ondulantes des spermatozoïdes (Figure 23).

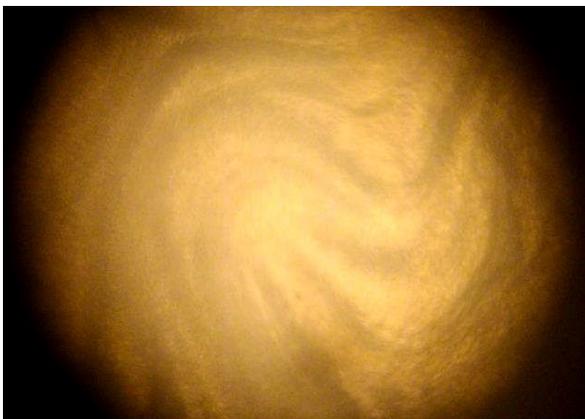


Figure 23 : Images figées au grossissement X 10 de la motilité massale (Cliché personnel).

- **Motilité individuelle**

L'estimation de la motilité individuelle a été réalisée dans les mêmes conditions de température que la motilité massale, sur une goutte du sperme diluée au 1/10 dans la solution A, étalée et recouverte d'une lamelle, nous avons observé au grossissement X 40 les mouvements individuels des spermatozoïdes selon lesquels nous avons estimé la note de mobilité individuelle.

- **Concentration**

Elle est déterminée par comptage des spermatozoïdes à l'hématimètre (cellule de Malassez), après dilution au 1/200^{ème} de la semence pure dans du formol à 3,5%, une goutte du mélange est alors déposée sur la cellule de Malassez puis couverte d'une lamelle.

L'hématimètre utilisé comporte 100 grands carreaux eux même divisés en 20 petits carreaux d'une surface de 0,0025 mm² et 0,2 mm de profondeur chacun (Figure 24).



Figure 24 : Cellule de Malassez utilisée pour le comptage des spermatozoïdes (Cliché personnel).

Nous avons procédé au dénombrement des spermatozoïdes au microscope optique au grossissement X 100 sur 5 carreaux donnant ainsi une moyenne de 20 spermatozoïdes par carreau. Le calcul de la concentration en cellules spermatiques est obtenu selon la formule suivante :

$$= \frac{\bar{i}}{é} \times 2 \times 10 \text{ millions} \times \text{Nombre de dilutions}$$

II.4. Dilution de la semence & préparation des protocoles de réfrigération

Après la collecte, la semence est diluée afin de multiplier le pouvoir de reproduction des mâles et d'allonger la durée de vie des spermatozoïdes. Aux fins d'inséminations artificielles, la concentration finale de la semence du bélier a été standardisée par les scientifiques à une valeur de 200×10^6 spermatozoïdes par millilitre de semence.

II.4.1. Calcul du taux de dilution

Dans le but d'atteindre la concentration des spermatozoïdes requise par les scientifiques, nous avons calculé le taux de dilution que la semence pourra supporter selon la formule suivante :

$$= \frac{\text{Concentration initiale}}{\text{Concentration finale}}$$

$$= \frac{400 \times 10^6}{200 \times 10^6} = \mathbf{2 \text{ fois}}$$

Donc notre échantillon de sperme sera dilué 2 fois (volume / volume).

II.4.2. Composition des diluants

Au cours de notre expérience, nous avons utilisé six types de protocoles, tout d'abord, nous avons extrait le jaune d'œuf au moyen d'une seringue après avoir incisé et écarté la membrane vitelline du vitellus vu que ses composants ont un effet spermicide (Figure 25).

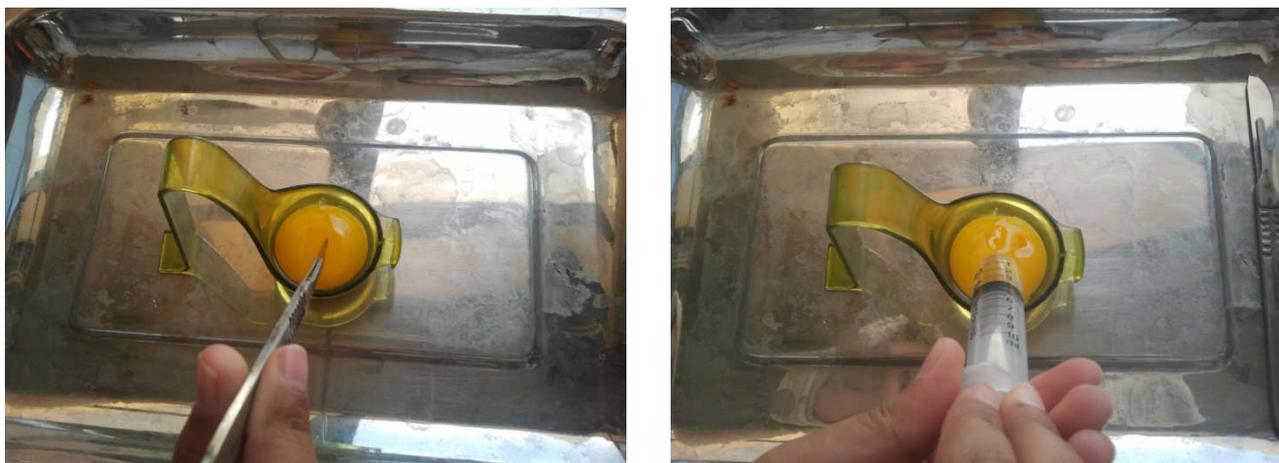
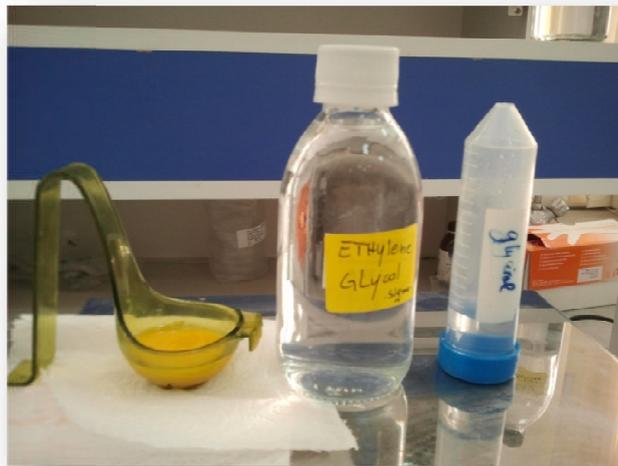


Figure 25 : Incision de la membrane vitelline et récupération du jaune d'œuf (cliché personnel).

Après cela, nous avons préparé les six milieux de réfrigération dont la composition est illustrée et rapportée dans le tableau ci-après et la figure 26.

Tableau 3: Composition des solutions utilisées.

Compositions Protocoles	Solution A	Jaune d'œuf	Glycérol	Éthylène glycol
Témoin.	1 ml	--	--	--
Jaune d'œuf à 20%	0,8 ml	0,2 ml	--	--
Glycérol à 5%	0,75 ml	0,2 ml	0,05	--
Glycérol à 10%	0,7 ml	0,2 ml	0,1 ml	--
Éthylène glycol à 5%	0,75 ml	0,2 ml	--	0,05
Éthylène glycol à 10%	0,7 ml	0,2 ml	--	0,1 ml

**Figure 26 :** Composition de base des protocoles de réfrigération. (Cliché personnel).

A l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé 200 μ l de chacune de ces solutions dans six eppendorfs étiquetés auxquels nous avons ajouté le même volume de sperme pur (Figure 27). Ces eppendorfs sont vortexés et mis par la suite dans un réfrigérateur réglé à + 4° C (Figure 28).



Figure 27 : Préparation des milieux de réfrigération (cliché personnel).



Figure 28 : Passage au vortex des eppendorfs (cliché personnel).

II.5. Analyse de la qualité de la semence réfrigérée

La semence des six eppendorfs a été évaluée avec trois types d'examen (**motilité individuelle, test de coloration à l'éosine et le test Host**) à des temps différents (**H0, H12, H24, H36, H60, H84, H108, H132, et H156**). Il est à noter qu'avant toute évaluation, les eppendorfs sont passés au vortex afin de bien homogénéiser les solutions.

II.5.1. Évaluation de la motilité individuelle

La motilité individuelle a été évaluée sur une goutte de sperme combinée à une goutte de la solution A, l'ajout de cette dernière a pour objectif d'approvisionner les spermatozoïdes en source d'énergie (fructose).

II.5.2. Coloration à l'éosine

C'est une coloration vitale et différentielle permettant de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes vivants par rapport aux morts, elle est réalisée sur une goutte de sperme et une goutte d'éosine concentrée à 0,5%, étalée sur une lame et couverte d'une lamelle, puis observée sous microscope optique au grossissement X 40. La membrane d'un spermatozoïde vivant est intacte donc imperméable au colorant, par contre celle d'un spermatozoïde mort laisse pénétrer le colorant

à l'intérieur de la cellule lui conférant ainsi une coloration rose ou rouge. (Figure 29 & 30).



Figure 29 : Préparation du frottis de la coloration vitale (cliché personnel).



Figure 30 : observation microscopique au grossissement X40 des spermatozoïdes colorés à l'éosine (cliché personnel).

Nous avons procédé au dénombrement de 50 spermatozoïdes et ce dans quatre champs microscopiques différents, puis nous avons calculé le pourcentage de spermatozoïdes vivants selon l'équation suivante :

$$X = (n \times 100) / 200$$

- n : nombre de spermatozoïdes vivants repérés.
- X : Pourcentage de spermatozoïdes vivants.

II.5.3. Test de gonflement hypo-osmotique (HOST)

Ce test a pour but d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. En effet, les cellules présentant une membrane plasmique intacte ont la capacité de se déformer et d'évacuer l'eau.

Pour réaliser ce test, nous avons d'abord préparé la solution hypo-osmotique composée de 10 ml du sérum physiologique (NaCl à 9‰) et 10 ml d'eau distillée, en suite nous avons prélevé un volume de 50 µl de celle-ci combiné à un même volume de la semence de chaque milieu. Le mélange est incubé dans un incubateur à 37°C pendant 45 minutes, puis les spermatozoïdes sont observés au microscope optique au grossissement X 40. (Figure 31).

Les spermatozoïdes dont la membrane est intègre se déforment ce qui indique leur vitalité, ils sont reconnus par un gonflement de la tête et/ ou enroulement du flagelle, les spermatozoïdes morts ne réagissent pas au test.



Figure 31 : observation microscopique au grossissement X40 des spermatozoïdes gonflés à la solution hypo-osmotique (cliché personnel).

Nous avons procédé au dénombrement de 200 spermatozoïdes (morts et vivants), le pourcentage de spermatozoïdes vivants est ainsi calculé selon l'équation suivante :

$$X = (n \times 100) / 200$$

- n : nombre de spermatozoïdes vivants repérés.
- X : Pourcentage de spermatozoïdes vivants.

Résultats

I. Résultats d'évaluation du sperme pur collecté

Les résultats d'évaluation de la semence ayant fait l'objet de notre travail sont rapportés dans le tableau 4.

Tableau 4: Résultats d'évaluation du sperme après collecte

Évaluation macroscopique			Évaluation microscopique		
Volume	Couleur	consistance	Motilité massale	Motilité individuelle	concentration
1,5 ml	Blanche	Laitieuse	5 (tourbillon rapide)	5 (spermatozoïdes fléchants)	400×10^6 spermatozoïdes /ml

II. Analyse des paramètres de la semence réfrigérée

Les résultats des observations réalisées sur la semence réfrigérée sont récapitulés dans le tableau ci-dessous, les valeurs notées représentent respectivement : la motilité individuelle, pourcentage de spermatozoïdes vivants obtenu avec la coloration vitale et le test HOST dans les différents temps d'observation.

Tableau 5: Résultats d'évaluation du sperme réfrigéré.

Protocoles Évaluation		Témoin	Jaune d'œuf à 20%	Glycérol à 5%	Glycérol à 10%	Éthylène glycol à 5%	Éthylène glycol à 10%
		H0	Motilité individuelle	5	5	5	5
Coloration à l'éosine	84,66%		78%	78%	85,5%	87%	82%
Test Host	97%		95%	95%	93%	97%	95%
H 12	Motilité individuelle	3	4	5	3,5	4	4,5
	Coloration à l'éosine	63,5%	67%	68,25%	73,5%	77,5%	75,25%
	Test Host	89%	91%	93%	91%	90%	91%

H 36	Motilité individuelle	2	3	3	3	3	3,5
	Coloration à l'éosine	56%	52%	68%	69%	72%	70%
	Test Host	75%	75%	80%	82%	83%	84%
H 60	Motilité individuelle	2	2,5	3	2,5	2,5	3
	Coloration à l'éosine	49%	50%	63%	61%	65%	68%
	Test Host	52%	59%	67%	65%	69%	75%
H 84	Motilité individuelle	1	1	2	2,5	3	3,5
	Coloration à l'éosine	47,5%	57%	55,5%	59%	55,5%	67,5%
	Test Host	39%	47%	58%	52%	57%	69%
H108	Motilité individuelle	1	1	2	1	1	3,5
	Coloration à l'éosine	38%	41,5%	45,5%	47%	41%	60,15%
	Test Host	28%	35%	49%	47%	52%	67%
H132	Motilité individuelle	0,5	1	1,25	1,5	1,5	3,5
	Coloration à l'éosine	26%	23,5%	27%	41%	34%	48%
	Test Host	16%	22%	26%	31%	41%	62%
H156	Motilité individuelle	0	0	0,25	0,5	1	3
	Coloration à l'éosine	10%	8,5%	15,5%	23%	29%	35,5%
	Test Host	7%	10%	14%	12%	30%	50%

Ces résultats sont représentés, en détails, dans les figures ci-après :

II.1. Résultats globaux en fonction de l'heure de lecture

II.1.1. Résultats recueillis à H₀

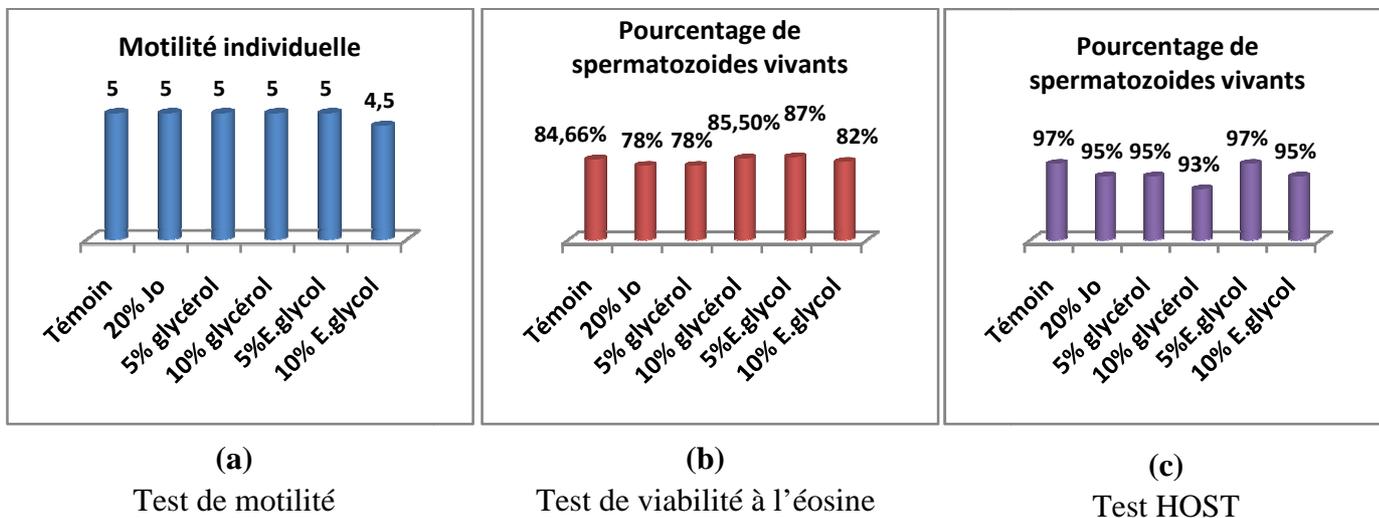


Figure 32 : Graphes représentant l'évaluation à H₀.

Nous constatons à partir des résultats de l'évaluation effectuée à H₀ que les valeurs de motilité individuelle est identique pour les cinq premiers milieux (5) tandis que le milieu à 10% d'éthylène glycol se singularise par une légère baisse du score de motilité à 4,5. Ainsi le pourcentage de viabilité des spermatozoïdes est presque identique dans les six milieux.

II.1.2. Résultats recueillis à H₁₂

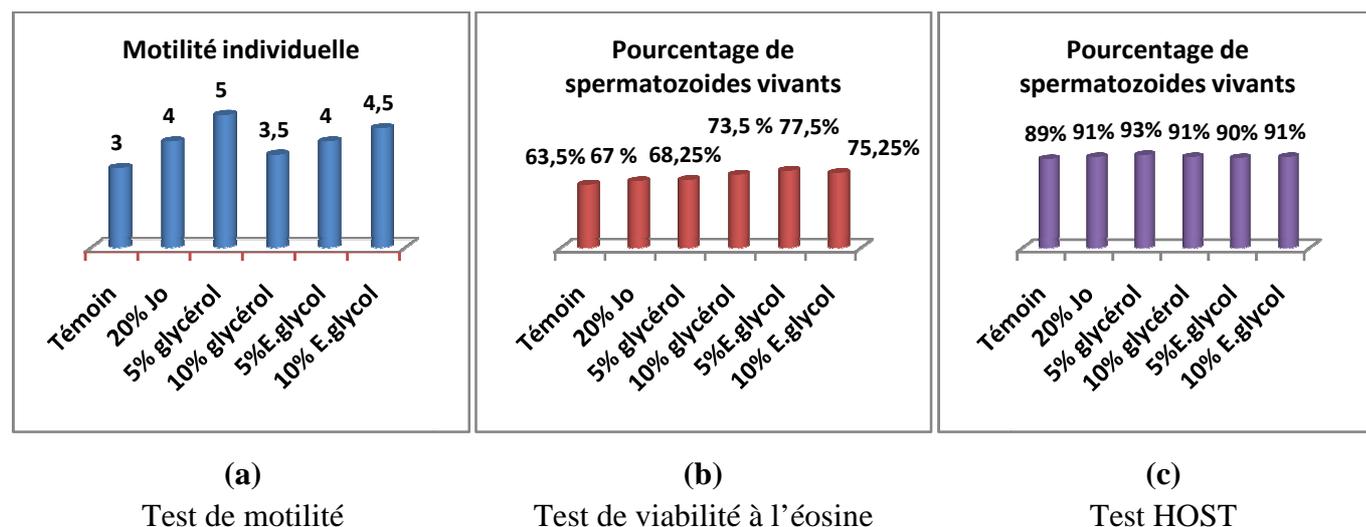


Figure 33 : Graphes représentant l'évaluation à H₁₂.

L'analyse de la qualité de la semence réfrigérée à H₁₂ a révélé des valeurs variables de la motilité individuelle, qui se voit diminuée dans le milieu témoin, 20% JO, 10% de glycérol et 5%

d'éthylène glycol. Par contre les deux protocoles à 5% de glycérol et à 10% d'éthylène glycol ont maintenu leur valeur de motilité enregistrée à H₀. Concernant le pourcentage de spermatozoïdes vivants, nous avons remarqué qu'il a diminué dans tous les milieux.

II.1.3. Résultats recueillis à H₃₆

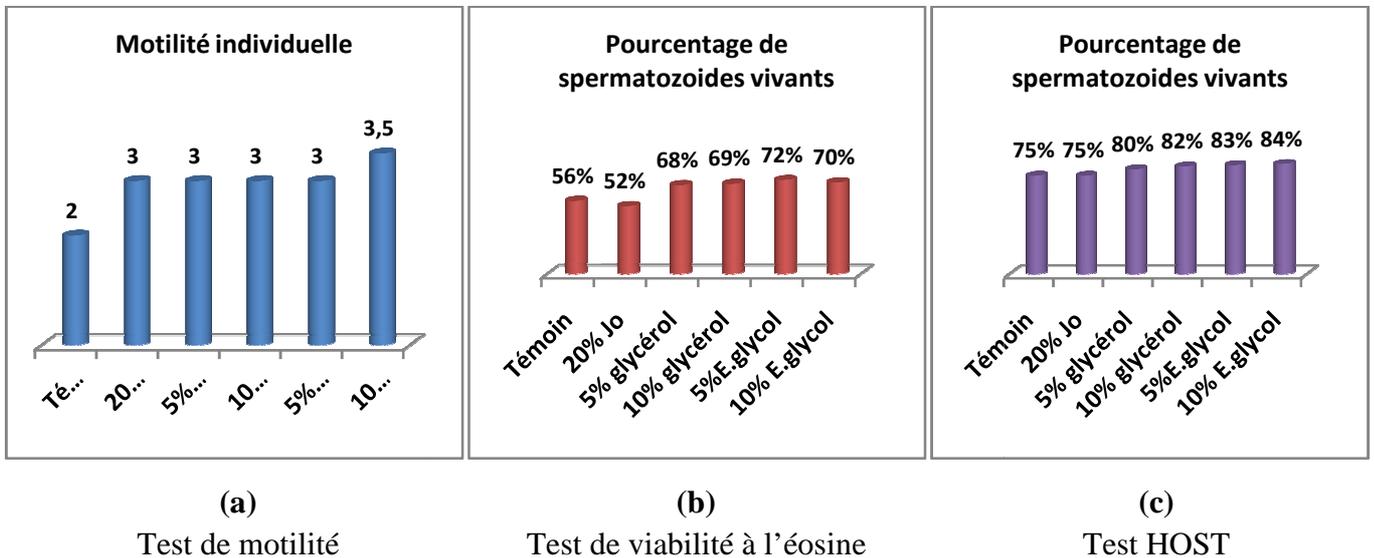


Figure 34: Graphes représentant l'évaluation à H₃₆.

Il ressort des résultats représentés dans la figure 34 que la motilité individuelle continue sa décroissance dans les six protocoles, il est à noter que les milieux : 20% JO, 5% de glycérol, 10% de glycérol et 5% d'éthylène glycol ont marqué la même valeur de motilité (3) tandis que le milieu témoin: 2 et l'éthylène glycol à 10%: 3,5. Par ailleurs, la vitalité poursuit sa décroissance et ce dans tous les milieux.

II.1.4. Résultats recueillis à H₆₀

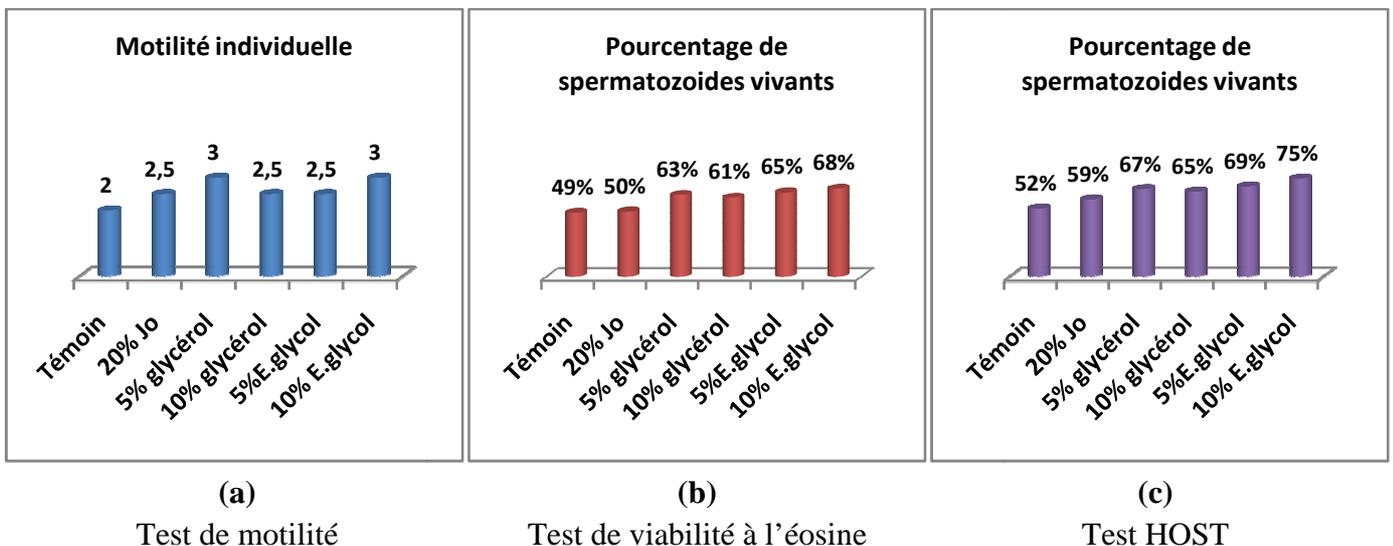


Figure 35: Graphes représentant l'évaluation à H₆₀.

Cette figure indique que les valeurs de motilité individuelle ainsi que celles de la vitalité continuent leur diminution, cette dernière est plus prononcée dans le milieu témoin étant dépourvu d'éléments protecteurs.

II.1.5. Résultats recueillis à H84

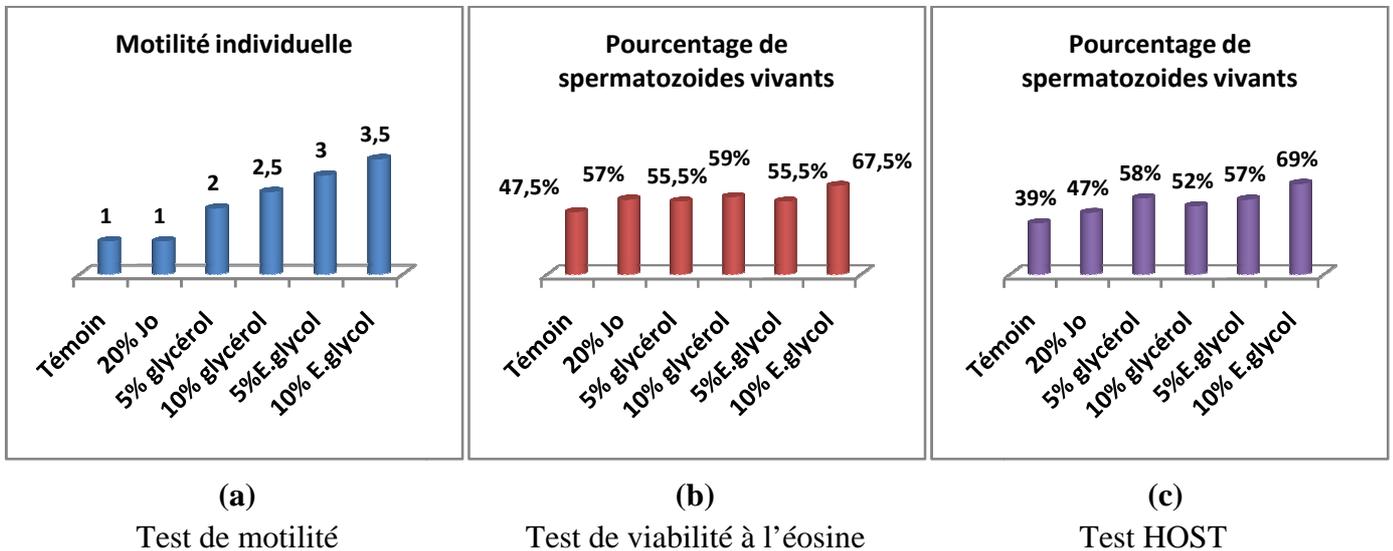


Figure 36 : Graphes représentant l'évaluation à H₈₄.

Nous notons, à partir des résultats de cette figure, le prolongement de la diminution des valeurs de vitalité, ainsi que celles de motilité dans le milieu témoin, le JO à 20%, le glycérol à 5% et à 10%, les protocoles à 5% et à 10% d'éthylène glycol quant à eux ont marqué une augmentation du score de la motilité.

II.1.6. Résultats recueillis à H108

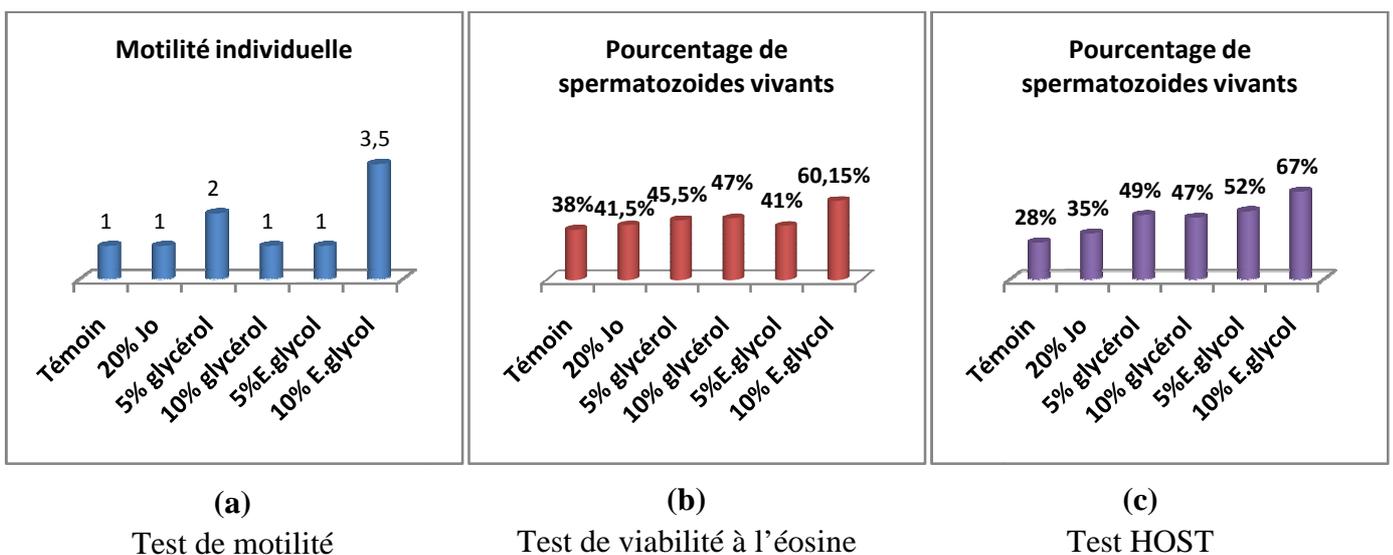


Figure 37: Graphes représentant l'évaluation à H₁₀₈.

Les résultats de l'analyse de la qualité de la semence à H₁₀₈ indiquent une décroissance importante des résultats de la motilité individuelle dans tous les milieux à l'exception du milieu à **10%** d'éthylène glycol qui a conservé sa valeur de motilité notée à H₈₄. Même constat pour les résultats de la vitalité des spermatozoïdes qui ont été plus au moins conservés dans ce milieu.

II.1.7. Résultats recueillis à H132

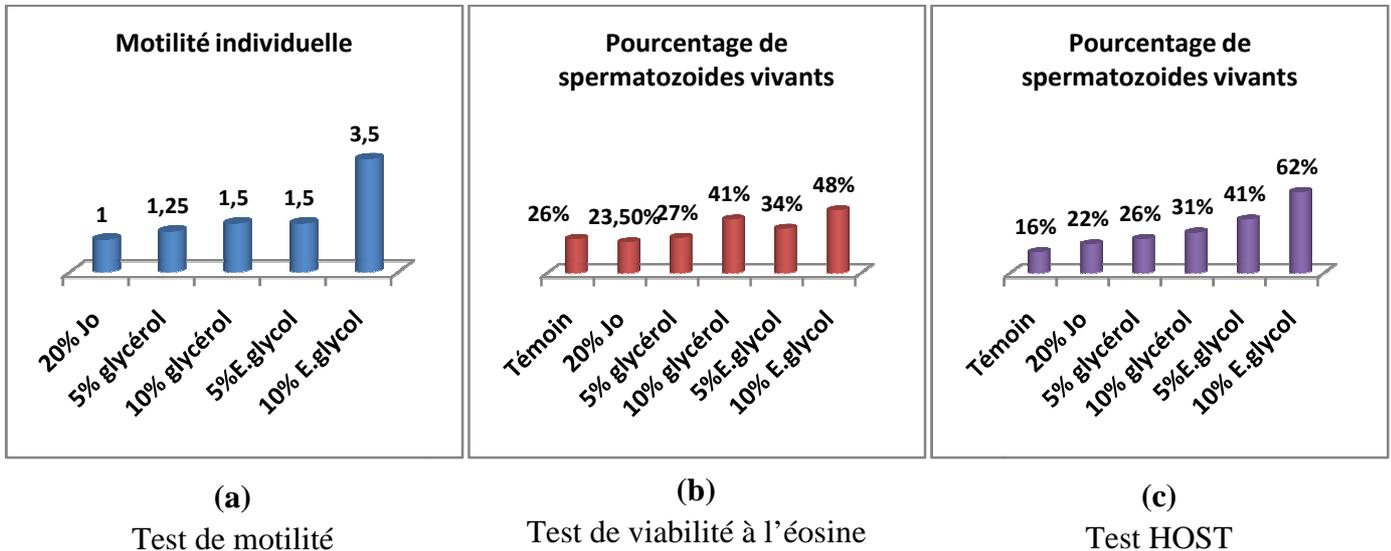


Figure 38: Graphes représentant l'évaluation à H₁₃₂.

Nous avons remarqué que le milieu à **10%** d'éthylène glycol conserve sa note de motilité à **3,5** avec une légère diminution du pourcentage de spermatozoïdes vivants. Les autres milieux de réfrigération marquent toujours une diminution importante du taux de vitalité.

II.1.8. Résultats recueillis à H156

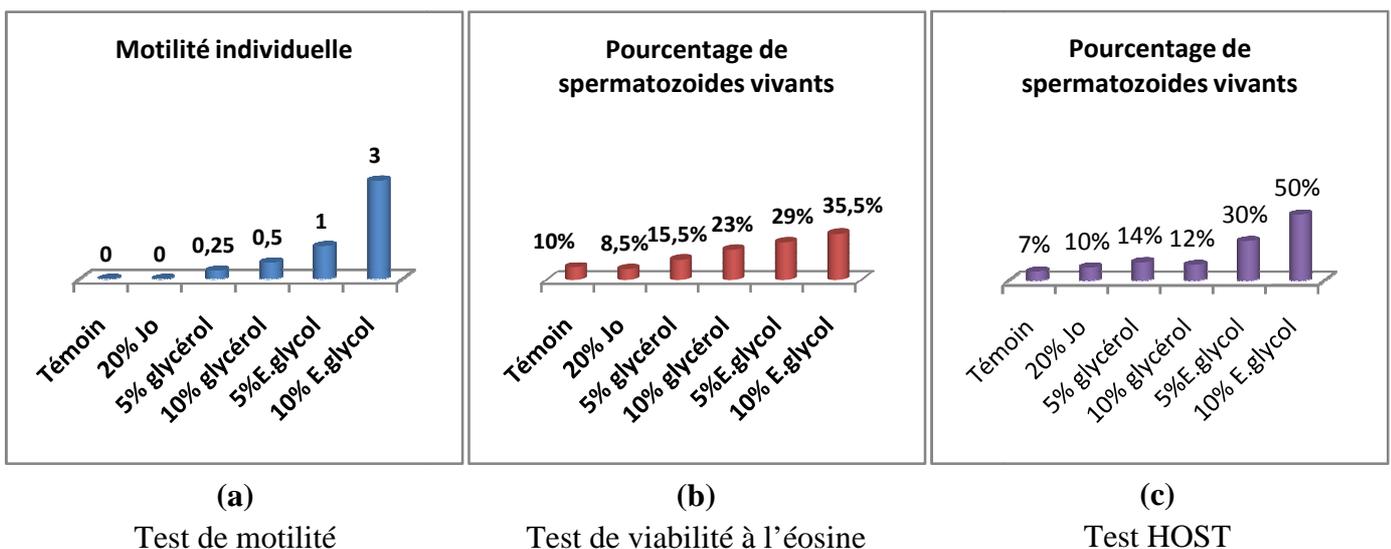


Figure 39: Graphes représentant l'évaluation à H₁₅₆.

L'évaluation effectuée à H₁₅₆ a indiqué que le milieu témoin et celui à 20% du JO ont perdu leurs motilités, le milieu à 10% d'éthylène glycol a marqué une baisse de 0,5 de la valeur de motilité pour marquer une note de 3 à la fin de l'évaluation. Le taux de vitalité dans ce milieu était satisfaisant avec un pourcentage de 50% de spermatozoïdes vivants.

II.2. Progression des résultats par milieu de réfrigération

Dans ce volet, nous allons étudier la cinétique de chaque milieu en fonction des différents temps de lecture, notre étude a abouti aux résultats représentés dans les gaffes suivants :

II.2.1. Milieu témoin

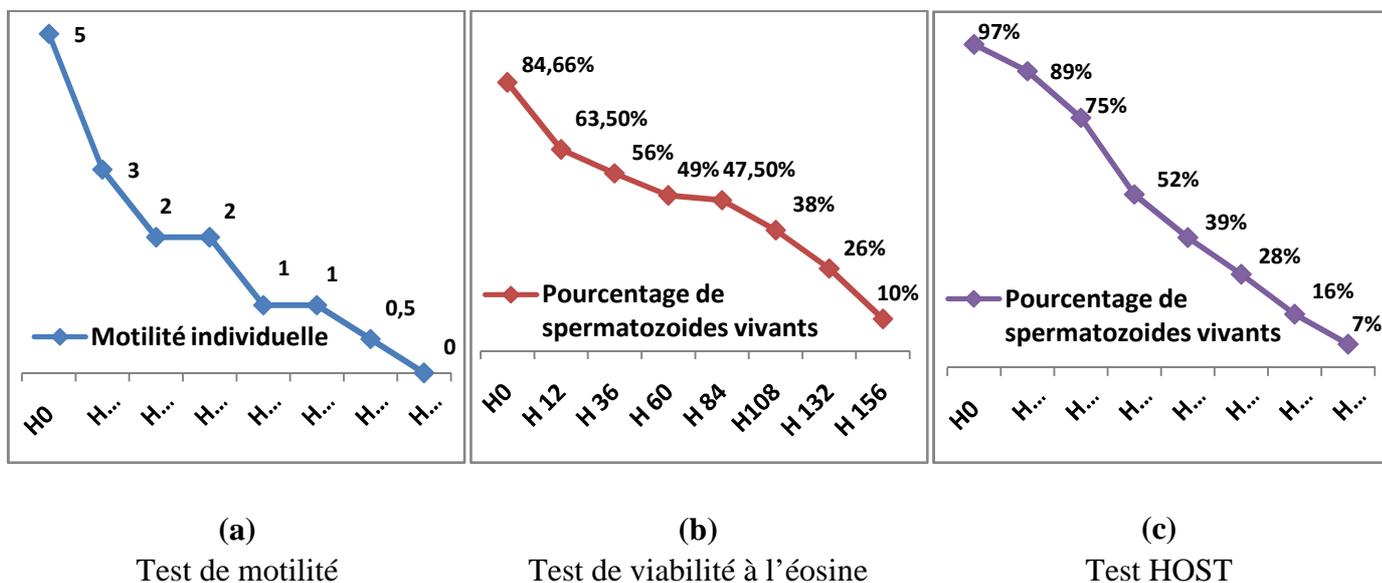


Figure 40 : Evolution des résultats dans le milieu témoin.

Nous constatons une diminution de la mobilité et de vitalité de H₀ à H₁₅₆ pour atteindre une valeur de motilité 0 à la fin d'évaluation et 10% & 7% de spermatozoïdes révélés respectivement par la coloration vitale et le test HOST.

II.2.2. Milieu à 20% du jaune d’œuf

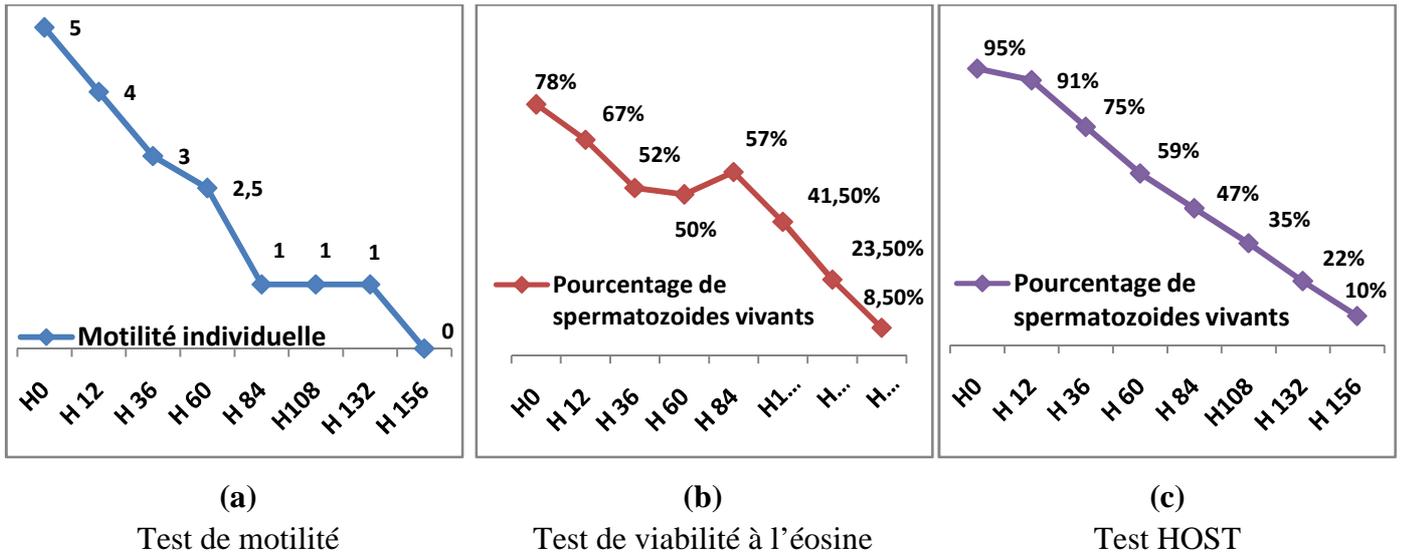


Figure 41 : Evolution des résultats dans le protocole à 20 % du jaune d’œuf.

Une diminution progressive de la motilité individuelle s’observe dans le milieu à **20%** du JO pour atteindre la note **1** qui s’est maintenue entre H₈₄ et H₁₃₂ pour redescendre à **0** à **156** heures. Le taux de vitalité des spermatozoïdes dans ce protocole décroît dans le temps pour atteindre **8,5%** (éosine) et **10%** (HOST) à H₁₅₆. Nous avons remarqué que la coloration vitale a révélé une augmentation du nombre de spermatozoïdes vivants entre H₆₀ et H₈₄ qui est certainement due à une erreur d’observation microscopique.

II.2.3. Milieu à 5% de glycérol

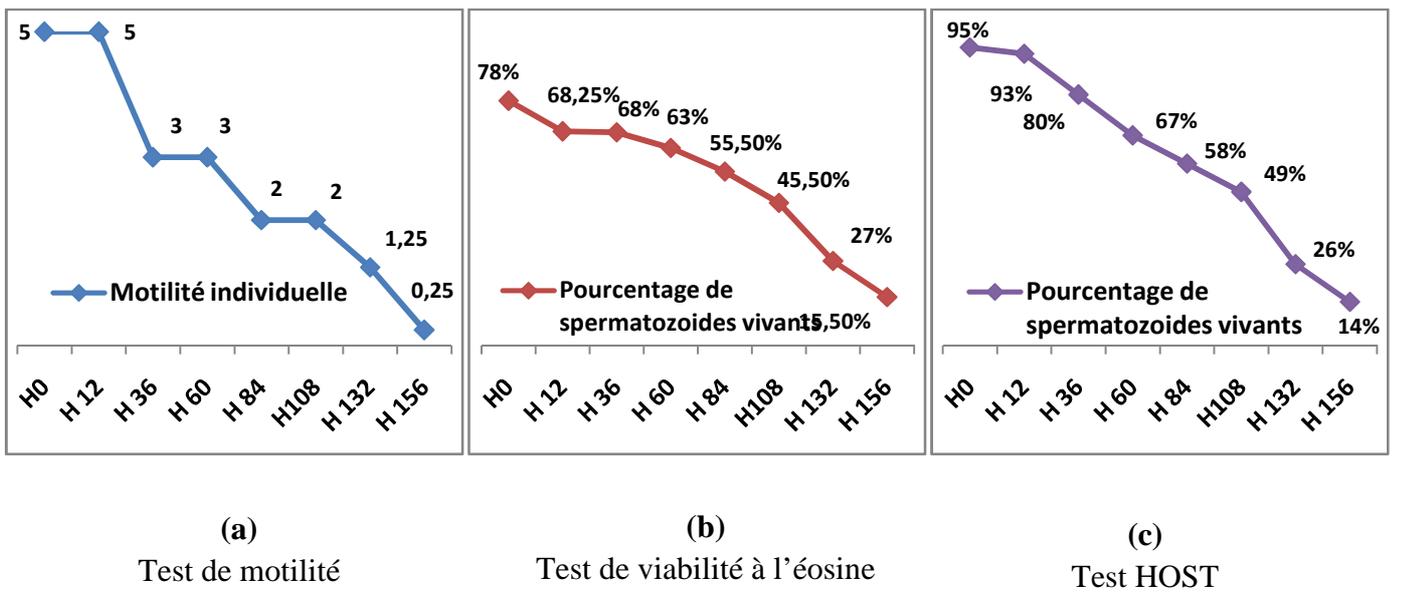


Figure 42 : Evolution des résultats dans le le protocole à 5% de glycérol.

Le milieu à 5% de glycérol a gardé la valeur de motilité de 5 durant les deux premières évaluations, puis elle descend progressivement jusqu'à 0,25 notée à la dernière estimation. Les deux tests de viabilité des spermatozoïdes indiquent la diminution du taux de vitalité au fil du temps. Ils ont marqué 15,5% et 14% de spermatozoïdes vivants à H₁₅₆.

II.2.4. Milieu à 10% de glycérol

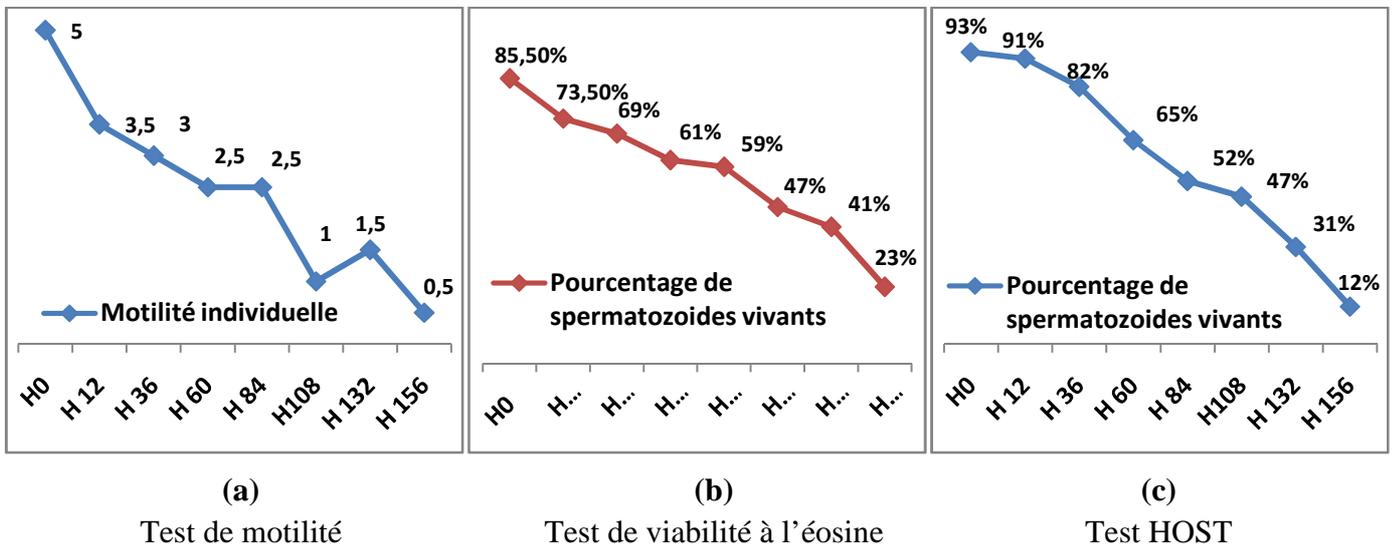


Figure 43 : Evolution des résultats dans le le protocole à 10% de glycérol.

Les valeurs de motilité individuelle ainsi que celles de vitalité évoluent selon une courbe de régression dans le milieu à 10% de glycérol, marquant une note de 0,5 (motilité) et 23% et 12% relevé respectivement avec la coloration vitale et le test HOST.

II.2.5. Milieu à 5% d'éthylène glycol

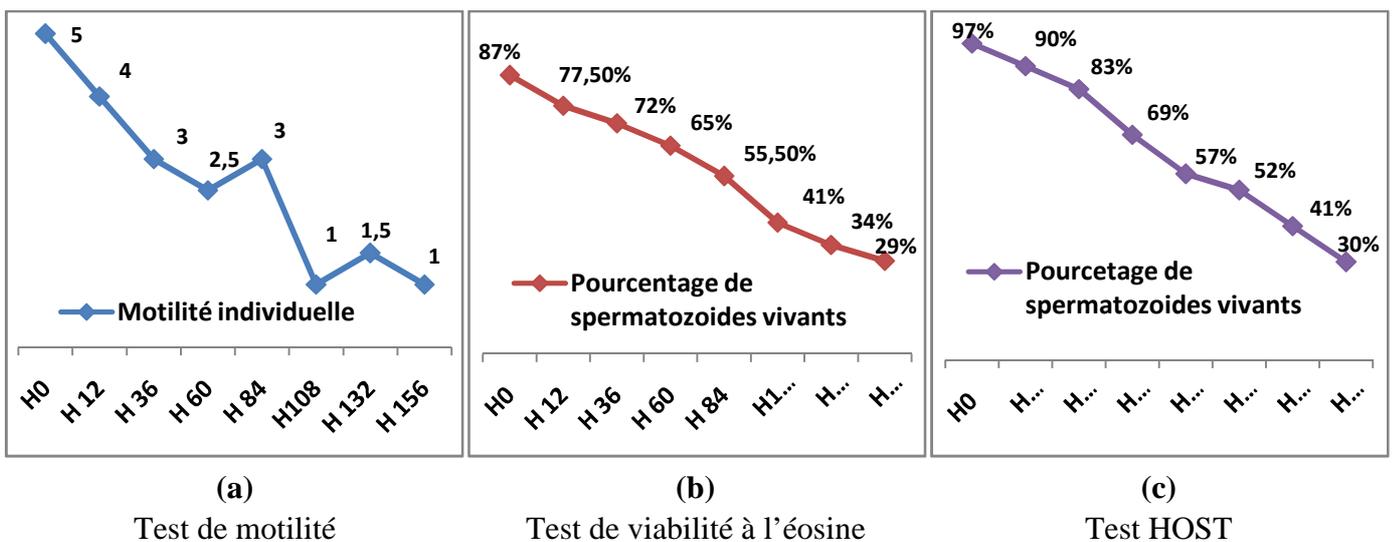


Figure 44 : Evolution des résultats dans le protocole à 5% d'éthylène glycol.

Un décroissement progressif de la motilité a été aussi enregistré dans le protocole à **5%** d'éthylène glycol pour atteindre la valeur de **1** à H₁₅₆. Même observation pour les pourcentages des spermatozoïdes vivants qui ont marqué **29%** (coloration à l'éosine) et **30%** (test HOST).

II.2.6. Milieu à 10% d'éthylène glycol

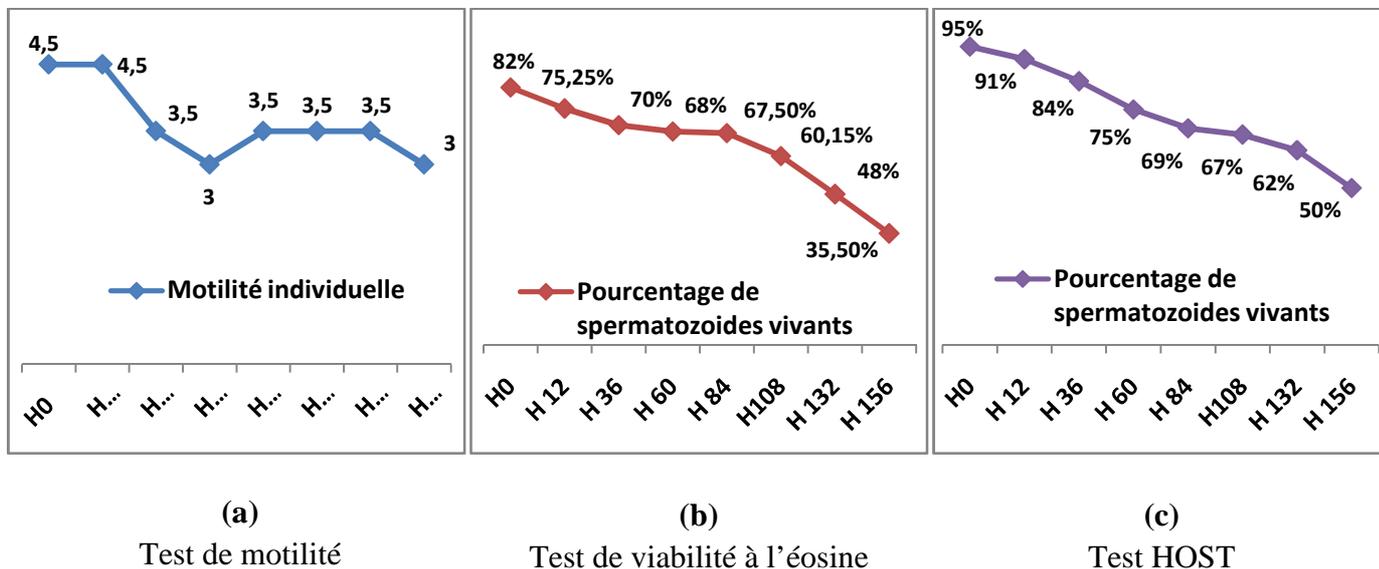


Figure 45: Evolution des résultats dans le protocole à 10% d'éthylène glycol.

Une diminution progressive mais moins marquée des valeurs de motilité et de viabilité a été constatée dans le protocole à **10%** d'éthylène glycol, ce milieu semblerait être comparativement aux autres protocoles meilleur pour la conservation de la semence ovine, en effet la note de motilité attribuée était de **3** avec **35%** & **50%** de spermatozoïdes vivants, notés respectivement avec la coloration vitale et le test HOST à la fin de l'expérimentation.

Discussion

I. Discussion de la thématique de recherche

I.1. Technique de collecte

Les spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme sont mobiles, matures et aptes à féconder les ovocytes (Toshimori, 2003). Ces caractéristiques du sperme épидидymaire ont permis aux scientifiques d'envisager la sauvegarde post-mortem des sujets de haute valeur génétique ou des espèces menacées de disparition pour des expérimentations diverses ou une congélation en vue d'inséminer artificiellement ou de fécondation *in vitro*. (Zambelli et Cunto 2006; Korochkina *et al.*, 2014).

La semence peut être prélevée dans les douze heures post-mortem sur des animaux conservés au froid (environ +4 à +6 °C). Il y a également une démarche croissante des propriétaires et des éleveurs qui souhaitent conserver le sperme de leur animal post-castration ou post-mortem pour réaliser de nouvelles descendance (Bruemmer, 2006).

Deux techniques nous permettent de collecter le sperme épидидymaire, la première est dite « *retrograde flushing* » et la deuxième est appelée « *Float-up* », notre choix de collecte s'est porté sur le flushing rétrograde au vu ses avantages par rapport à la technique de flottaison, il est facile à réaliser, rapide et il permet de collecter un nombre beaucoup plus important de spermatozoïdes qu'avec le float-up (15 à 20 milliards de spermatozoïdes contre 4 à 5 avec la méthode de flottaison chez l'étalon (Bruemmer, 2006)). En outre, Turri *et al* en 2011 ont mis en évidence de meilleurs résultats en termes de mobilité et de viabilité de la technique du rétrograde flushing comparativement à ceux obtenus avec la technique du Float-up.

I.2. Liquide du rinçage & Milieu de réfrigération

Le flush épидидymaire peut être réalisé avec du sérum physiologique (Martinez-Pastor *et al.*, 2006), citrate de sodium/ jaune d'œuf (Soler et Garde, 2003) ou l'huile de paraffine (Dacheux *et al.*, 2006 ; Belkadi *et al.*, 2013, Guerin *et al.*, 2003).

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé un milieu de réfrigération standard dans les cinq protocoles, il est ainsi composé de Tris à 3.03%, de fructose à 1.25%, d'acide citrique monohydrate à 1.70% dilués dans de l'eau distillée et du jaune d'œuf à 20%.

Le travail de Lone *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.

I.3. paramètres d'évaluation de la qualité de la semence

Pour l'analyse de la qualité de la semence, nous nous sommes référés à la coloration à l'éosine qui est selon Hanzen (2005) une coloration vitale de référence en matière d'examen morphologique du sperme et le test hypo-osmotique qui se fait impérativement lors du choix des spermatozoïdes en vue de l'utilisation dans les biotechnologies spermatiques, le HOST est considéré le meilleur test d'indication de l'intégrité membranaire des spermatozoïdes reflétant leur vitalité (Esteves *et al.*, 1996 ; Neild *et al.*, 1999).

D'autre part nous avons évalué la motilité individuelle, cette dernière étant le reflet de la fertilité (vivacité et vitalité) (Vaissaire, 1977).

II. Discussion des résultats du sperme collecté

II.1. Évaluation macroscopique

II.1.1. Volume

Le sperme collecté avait un volume de **1,5** ml correspondant ainsi aux volumes de sperme épидидymaire recueillis par Guerin *et al.*(2003) Fernández Abella *et al* en 2013 dans leurs trois expériences, par contre ces résultats sont supérieurs à ceux de Amari *et al.* (2015), Smatti et Mekki (2013) qui ont obtenu respectivement un volume de 1,2 ml, 0,8 ml et 0,6 ml et ce dans les mêmes conditions de collecte que les nôtres, ces différences observées sont probablement dues à l'âge des agneaux desquels les testicules ont été récupérés ou à des différences raciales.

II.1.2. Couleur & consistance

La couleur de la semence obtenue était blanche de consistance laiteuse ce qui confirme les observations rapportées par Maxwell et Evans (1987) ; Hafez (1987) et Fourie *et al.* (2004).

Selon Douet (2000), un sperme laiteux correspond à une concentration de 2×10^9 spermatozoïdes/ ml qui corrobore avec la concentration et la consistance du sperme de notre étude.

II.2. Évaluation microscopique

II.2.1. Motilité

La note de motilité massale et individuelle attribuée à la semence était de 5 du fait que les spermatozoïdes soient fléchants avec des trajets rectilignes et qu'ils forment des tourbillons rapides (Salamon, 1976 ; Baril *et al.*, 1993; Marco-Jiménez *et al.*, 2005).

Ces résultats sont proches de ceux de Belkadi *et al.* (2013) qui ont estimé la motilité du sperme épидидymaire à H_0 $4,55 \pm 0,12$ et ceux obtenus par Smatti et Mekki (2013) qui ont obtenu deux notes de motilité individuelle : 4,5 et 3,5 dans les deux testicules collectés.

II.2.2. Concentration

La concentration en spermatozoïdes obtenue était 400×10^6 spermatozoïdes par millilitre, cette valeur est nettement inférieure à celles rapportées par Fernández Abella *et al.* (2013) qui ont obtenu $8.7 \pm 1.8 \times 10^9$ spermatozoïdes pour les béliers de race corriedale et $13.2 \pm 2.1 \times 10^9$ pour les béliers de race île de France et celle de Amari *et al.* (2015) qui ont trouvé une concentration de $3,5 \times 10^9$ spermatozoïdes par millilitre.

III. Discussion des résultats post réfrigération de la semence

Les résultats recueillis à H_0 sont presque identiques dans les cinq milieux qui maintiennent les valeurs de motilité et celles de viabilité enregistrées à l'état frais. Ces observations affirment les résultats recueillis par Amari *et al.* (2015) et Miclea *et al.* (2010) qui ont indiqué que la diminution de la température à 4°C n'induit pas significativement une baisse de motilité et de viabilité des spermatozoïdes à H_0 . Par contre au niveau du protocole à 10% d'éthylène glycol, une légère diminution de la motilité individuelle a été observée (4,5) vu que ce milieu était le dernier qui a été évalué ce qui indique un début d'action du froid sur les spermatozoïdes d'une part et d'autre part que les cryoprotecteurs n'agissent pas sitôt sur les cellules après leur mise en contact.

Au cours des évaluations H_{12} , H_{36} , H_{60} , H_{84} , H_{108} , H_{132} et H_{156} , nous avons observé des variations de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes ce qui met en évidence l'action des cryoprotecteurs.

En effet, dans le milieu témoin la motilité individuelle décroît progressivement pour atteindre une valeur de 0 à H_{156} , même constatation pour le pourcentage de spermatozoïdes vivants révélé par le test HOST et la coloration à l'éosine qui ont montré respectivement une valeur de 10% et de 7% de spermatozoïdes vivants à H_{156} . Ceci est expliqué par l'effet délétère du froid exercé sur les spermatozoïdes en l'absence d'éléments protecteurs.

Dans le milieu à 20% du jaune d'œuf, les deux paramètres d'évaluation de la semence diminuent aussi mais moins vite par rapport au milieu précité pour atteindre un score de motilité de 3 et un pourcentage de spermatozoïdes vivants de 59% enregistrés à H_{36} avec le test HOST, valeurs qui peuvent être encore acceptables en vue de l'utilisation de cette semence pour l'insémination artificielle. Il est à noter que le test de viabilité (coloration à l'éosine) avait marqué une

augmentation du nombre de spermatozoïdes vivants entre **H₆₀** et **H₈₄** ce qui est probablement dû à une erreur de lecture consécutive de la subjectivité de l'observation microscopique.

Lors de la comparaison entre les résultats du milieu à 5% de glycérol et ceux du milieu à 10% de glycérol, nous avons ressorti des conclusions différentes entre la coloration vitale et le test HOST, en effet ce dernier a révélé que le 5% de glycérol est meilleur que le 10% ayant donné des pourcentages respectivement de 14% et de 12% de spermatozoïdes vivants à **H₁₅₆** avec un seuil de bonne qualité enregistré à **H₈₄** marquant ainsi les valeurs de 58% et 52%.

Ce résultat corrobore celui obtenu par Smatti et Mekki (2013) qui ont comparé ces mêmes concentrations et ont conclu que la concentration de 10% est toxique pour les spermatozoïdes du bélier. Ces résultats soutiennent aussi ceux de Amari *et al.*, (2015) qui ont démontré qu'un milieu à 5% de glycérol est meilleur que celui de 15% de glycérol ce qui nous laisse prédire que le glycérol à de faible concentration protège les spermatozoïdes du bélier contre le froid. Cette même constatation a été observée par Morrier *et al.* (2002) qui ont rapporté qu'une concentration de 7% de glycérol préserve la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes du bélier à 5°C.

Ces observations confirment les données bibliographiques qui attestent que le glycérol à des hautes concentrations est toxique pour les cellules, cette toxicité est due à la perturbation de la viscosité du cytoplasme, de la stabilité et de la perméabilité de la membrane plasmique et ce par disruption des phospholipides et des protéines structurales de la membrane plasmique. Ces phénomènes pourraient entraîner des effets néfastes potentiels sur le pouvoir fécondant du sperme. (Amann et Pickett, 1987; Storey, 1998 ; Hammerstedt et Graham, 1992)

Le test de la coloration vitale quant à lui a indiqué un résultat contradictoire : le milieu à 10% de glycérol a marqué un pourcentage de spermatozoïdes vivants supérieur à celui du milieu à 5% de glycérol. Les différences constatées peuvent être dues à la subjectivité de l'observation microscopique mais le test HOST reste plus significatif vu que son appréciation se fait après 45 minutes d'incubation des spermatozoïdes dans la solution hypo-osmotique à 37°C.

Notre travail a démontré que l'utilisation de l'éthylène glycol comme cryoprotecteur pour la réfrigération de la semence ovine a amélioré significativement la vitalité et la motilité des spermatozoïdes par rapport aux autres milieux surtout lorsqu'il est utilisé à une concentration de 10%. Cette dernière a conservé 35% (coloration vitale) et 50% (test HOST) de spermatozoïdes vivants et une motilité de 3 à **H₁₅₆**, valeurs qui constituent un seuil d'utilisation pour l'insémination artificielle.

Comparativement avec le milieu à 5% d'éthylène glycol, nous avons obtenu des chiffres très proches avec la coloration vitale et le test HOST qui sont respectivement 29% et 30% de spermatozoïdes vivants et une motilité de 1 à **H**₁₅₆.

Il ressort de la comparaison des résultats obtenus avec le glycérol et l'éthylène glycol que ce dernier est mieux adapté à la conservation de la semence ovine quelque soit sa concentration (5 ou 10%). Ces résultats sont en accord avec ceux des auteurs qui ont travaillé sur la cryoconservation de la semence ovine. En effet Moraes *et al.* (1988) ont estimé que l'éthylène glycol à 5% était plus efficace pour congélation du sperme du bélier que 7,5% de glycérol en se basant sur les deux critères : motilité et intégrité de l'acrosome. Du point de vue de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'éthylène glycol a donné une plus grande protection aux spermatozoïdes que le glycérol (Brisola, 1999).

Nos résultats corroborent ceux des autres auteurs qui ont utilisé l'éthylène glycol à la place du glycérol chez d'autres animaux, en effet ces résultats corroborent ceux de Swelum *et al.* (2011) qui ont démontré que l'utilisation de l'éthylène glycol comme un cryoprotecteur pour le sperme de buffle a amélioré significativement sa qualité après la décongélation (viabilité élevée, l'intégrité acrosomique, l'intégrité de la membrane plasmique, et faibles anomalies) que l'utilisation du glycérol, Cependant ces résultats sont en désaccord avec ceux de Rohilla *et al.* (2005) qui ont estimé qu'une concentration de 6,8% de glycérol est meilleure en termes de motilité, de viabilité et intégrité de l'acrosome que 5% d'éthylène glycol lors de la congélation du sperme de buffle.

L'effet protecteur de l'éthylène glycol est attribué à son petit poids moléculaire, une caractéristique qui lui confère une grande perméabilité aux cellules, ce qui lui permet de pénétrer et de quitter la cellule plus rapidement que le glycérol et par conséquent sa toxicité est faible (Soares *et al.*, 2002 ; Massip, 2001). Ces caractéristiques lui ont values d'être un cryoprotecteur optimal pour la protection des cellules (Harrison *et al.*, 1996).

Il est par ailleurs, à rappeler que l'éthylène glycol était largement utilisé pour la congélation des spermatozoïdes de diverses espèces de mammifères comme l'homme (Gilmore *et al.*, 1995), le sanglier (Phelps *et al.*, 1999) et de la souris (Gilmore *et al.*, 1998), congélation des embryons (Massip, 2001 ; Le Gal *et al.*, 1993) ainsi que la congélation du tissu ovarien (Rodrigues *et al.*, 2004 ; Newton *et al.*, 1996).

CONCLUSION

CONCLUSION

Le froid est un processus entraînant de nombreux effets néfastes sur les spermatozoïdes notamment la perte de l'intégrité de la membrane plasmique qui n'est pas sans effets délétères sur la fertilité des spermatozoïdes. De nombreux protocoles de cryoconservation sont proposés dans la littérature pour la congélation des semences, cependant très peu d'études sont réalisées dans le contexte de la réfrigération de la semence ovine avec cryoprotecteurs.

L'objectif de notre travail était d'optimiser un milieu de conservation adéquat à la conservation à court termes de la semence épидидymaire ovine en présence de cryoprotecteurs et ce afin de préserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes le plus longtemps possible et, par conséquent, permettre la diffusion de l'insémination artificielle chez les petits ruminants.

Il ressort des résultats de notre expérimentation que l'addition de l'éthylène glycol à une concentration de **10 %** dans le milieu de dilution conserve la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes à +4°C pendant **156** heures (motilité :3,% de spermatozoïdes vivants :52%) presque à la moitié de celles observées à **H₀** contrairement au milieu qui ne contient pas de cryoprotecteur ou qui contient un cryoprotecteur non pénétrant « le jaune d'œuf » et aussi par rapport au milieu qui contient le glycérol comme cryoprotecteur pénétrant.

Nous avons également conclu que la présence de glycérol dans le milieu de réfrigération diminue la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes et ce surtout à des concentrations élevées (10%) qui sont toxiques pour les spermatozoïdes.

Tenant compte de l'intérêt que la réfrigération de la semence offre en terme de préservation des animaux d'élite et de sauvegarde du patrimoine génétique de nos races locale, d'autres études restent encore à réaliser afin d'améliorer l'efficacité des protocoles de réfrigération de la semence ovine.

RECOMMENDATIONS

RECOMMANDATIONS

L'insémination artificielle, moyen de diffusion du progrès génétique dans les élevages, a prouvé son rôle prépondérant dans le développement de la filière ovine, malgré ses spécificités pour cette espèce, elle a pris une place importante dans bon nombre des pays du monde. Quoiqu'en Algérie cette technique, est utilisée depuis l'année 2006 d'une manière timide et n'a touché que 0,14% du total national des brebis (CNIAG, 2009), le nombre total de brebis inséminées par an selon la même ressource est en décroissance continue ce qui prouve que cette biotechnologie ne trouve pas encore sa place dans les systèmes de production actuels.

Les résultats obtenus à l'issue de notre travail démontrent clairement l'efficacité de certaines molécules dans la préservation des caractéristiques fonctionnelles de la semence ovine jusqu'à **156 heures** après sa récolte. Cependant, et afin de prétendre à des résultats plus probants, nous recommandons ce qui suit :

- Étendre le temps de lecture au-delà de **156 heures** afin de démarquer encore mieux l'effet de l'éthylène glycol en fonction du temps ;
- Utiliser des méthodes objectives et plus avancées pour l'évaluation de la semence comme le CASA afin de pallier à la subjectivité des résultats de l'observation microscopique;
- Tester la fécondité de la semence réfrigérée obtenue avec la fécondation *in-vitro* des ovocytes, ou l'insémination artificielle des brebis ;
- Tester d'autres concentrations de ces cryoprotecteurs afin de mettre en évidence une concentration optimale à la réfrigération de la semence ;
- Tester de nouvelles molécules et comparer leurs effets potentialisant ou toxiques ;
- Envisager de mener des études semblables sur du sperme éjaculé afin d'en identifier des variations du point de vue du comportement des molécules ;
- Collecter du sperme épидидymaire à partir de béliers reconnus de haute valeur génétique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOAGLA, E. M., TERADA, T. (2003).** Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 69 1245-50.
- ABOAGLA, E.M., TERADA, T. (2004).** Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62 809-18.
- ADAMS, T. E. (2005).** Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Anim. Repro. Sci.*, 88: 127-139.
- AGNIESZKA, P., WOJCIECH, N., MALGORZATAOCHOTA. (2012).** Methods of Assessment of Cryopreserved Semen, *Current Frontiers in cryobiology*, <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen>.
- AISEN, E.G., MEDINA, V.H., VENTURINO,A. (2002).** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57 1801-8.
- ALLAOUI, A. (2012).** 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. Institut des sciences vétérinaires et agronomiques de Batna, 79 P.
- AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. (1983).** Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci*, 57: 380-403.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. (1987).** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, 7:145-76.
- AMANN, R.P. (1998).** Cryopreservation of sperm. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). *Encyclopedia of reproduction.*, Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.
- AMARI, F., BEDRANI, N., YAKOUB, F.Z. (2015).** Conservation à court terme de la semence ovine. Quel cryoprotecteur utilisé. projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire, École Nationale vétérinaire d'Alger, 51 P.
- ANDERSEN, K. (1969).** Insemination with frozen semen in goats. *Eur. Ass. Anim. Prod. Meeting 2*: 23-26.
- ANNE, S.B. (2007).** Congélation de la semence canine, Détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents. Mémoire pour obtention du grade de Docteur Vétérinaire, université Claude-Bernard – Lyon, 129 P.
- BAILEY, J.L., MORRIER, A., CORMIER, N. (2003).** Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci*, 83: 393-401.
- BAKHACH, J., CASOLI, V., GUIMBERTEAU, J.C. (2007).** La cryopréservation de tissus composites : principe. *Revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547.
- BARIL, G., CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., LEBOEUF, B., ORGEUR, P., VALLET J.C. (1993).** Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.FAO, Rome, Italy, 125P

- BARONE, R. (1978).** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3, Splanchnologie, fascicule II, appareil uro génital, fœtus et ses annexes, Edition. Vigot, Paris, 951 p.
- BARONE, R. (1990).** Anatomie comparée des animaux domestiques. Tome 4, Splanchnologie II, Appareil uro-génital. Foetus et Annexes, Péritoine et topographie abdominale. Edition. Vigot, Paris, 951 p.
- BATISTA, M., NIÑO, T., ALAMO, D., CASTRO, N., SANTANA, M., GONZÁLEZ, F., CABRERA, F., GRACIA, A. (2009).** Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*, 71: 1307-1315.
- BELKADI, S., ALLOUI, N., BELKACEM, L., AISSI, A., SAFSAF, B., DJAABA, M., IDIR, K. (2013).** Étude de la vitalité et de la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires conservés à 4°C chez les ovins de la race Ouled Djellel. Département des science vétérinaires de Batna. *Rech. Ruminants*, 273.
- BERGERON, A., MANJUNATH, P. (2006).** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Repr. Dev*, 73: 1338-1344.
- BERGERON, A., BRINDLE, Y., BLONDIN, P., MANJUNATH, P. (2007).** Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77, 120-126.
- BESTER, N. (2006).** Effect of different dietary energy levels on productive and Reproductive traits in Dorper rams. *Magister Scientiae Agriculturae*. University of the Free State. Bloemfontein, 175 P.
- BEVER GILMORE, J.A. (1998).** Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa, Purdue University, Indiana.
- BLANCO, J.M., LONG, J.A., GEE, G., WILDT, D.E., DONOGHUE, A.M. (2010).** Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci*, 123 242-8.
- BONNES, G., DESCLAUDE, J., DROGOUL, C., GADOUD, R., JUSSISAU, R., LE LOC'H, A., MONTMEAS, L., ROBIN, G. (2005).** Reproduction des animaux d'élevages. 2^{ème} Edition. Dijon : Educagri (Ed.), 407 p.
- BOUSENNA, S. (2013).** Performances de reproduction chez les ovins Ouled Djellal : Avènement de la puberté et évolution des caractéristiques séminales chez le mâle jusqu'à l'âge de 1 an . These en vue d'obtention du diplôme de doctorat en science. Institut des sciences vétérinaires de Constantine, 210 P.
- BRISOLA, L.B.S., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, J.F.C., MONTAGNER, M.M. (1999).** Intégrité de la membranae plasmique, nucléaire et mitochondriale des spermatozoïdes ovins cryopresevés. *Na vaca. Ciência Rural*, Santa Maria, 29:27-531.
- BRUEMMER JASON, E. (2006).** Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* Vol. 22, n° 3, p 677-682.

- CARPENTER, J., PRESTRELSKI, S.J., ARAKAWA, T. (1993).** Separation of freezing and drying induced denaturation of lyophilized proteins using stress specific stabilization, Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys*, 303 456-64.
- CARY, J.A., MADILL, S., FARNSWORTH, K., HAYNA, J.T., DUOOS, L., FAHNING, M.L. (2004).** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm. collection technique in stallion. *Can Vet J*, 45: 35-41.
- CHEMINEAU, P. (1993).** Environment and animal reproduction. *World Anim. Rev.*, n° 77, 2-14.
- CHEN, Y., FOOTE, R.H., BROCKETT, C.C. (1993).** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30 423-31.
- CHENG, P., CASIDA, L.E, BARRETT, G.R. (1949).** Effects of dilution on motility of bull spermatozoa and the relation between motility in high dilution and fertility. *J Anim Sci*, 8: 81-88.
- CHEVRIER, C., DACHEUX, J. L. (1988).** Maturation des spermatozoïdes de bélier : Étude préliminaire du mouvement flagellaire caractéristique des formes de transition du corps de l'épididyme. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 28: 1301-1305.
- CHOONG, C.H., WALES, R.G. (1963).** The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Aust J Biol Sci*, 16 896-904.
- COLAS, G., DAUZIER, I., COUROT, M., ORTAVANT, R., SIGNORET, J.P. (1968).** Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine. *Ann. Zootechn. (Paris)*, 16 :47-57.
- COLAS, G. (1980).** Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile de France. I. Étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dev*, n° 20. 1789-1799.
- COLAS, G. (1984).** Semen technology in the ram. In: *The male in farm animal reproduction*. Courot M. (Ed). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 219-236.
- COLLIN, S., SIRARD, M.A., DUFOUR, M., BAILEY, J.L. (2000).** Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl* 21: 938-943.
- COUROT, M. (1962).** Action des hormones gonadotropes sur le testicule de l'agneau impubère. Réponse particulière de la lignée Sertolienne. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 2 : 157-162.
- COUROT, M. (1971).** Établissement de la spermatogenèse chez l'agneau (*ovis aries*). Étude expérimentale de son contrôle gonadotrope, importance des cellules de la lignée Sertolienne. Thèse Doc. es-Sc. Nat. Paris VI, 200 p.
- COUROT, M. (1976).** Physiologie sexuelle du bélier : Conséquences pratiques pour l'insémination artificielle. Éditions SEARLE-PARIS ,105 P.
- CRAPLET, C. (1952).** Reproduction normale et pathologique des bovins. 1ère Ed., Vigot frères (Ed.), 260 p.

- CRAPLET, C., THIBIER, M. (1977).** Le mouton, Tome 4, 4^{ème} Ed., Vigot Frère (Ed.), Paris, 575 p.
- DACHEUX, F., DACHEUX, J.L. (2001).** L'épididyme et les glands annexes. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme, 290-315 pp. Coédition INRA-Ellipses.
- DACHEUX, J.L., BELGHAZI, M., LANSON, Y., DACHEUX, F. (2006).** Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250, 36–42.
- DACHEUX, J.L., DRUART, X., FOUCHECOURT, S., SYNTIN, P., GATTI, J.L., OKAMURA, N., DACHEUX, F. (1998).** Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J. Reprod. Fertil., Suppl* 53, 99-107.
- Dadoune, J-P., Demoulin, A., (2001).** Structure et fonction du testicule. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme, 756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.
- DARIN BENNET, A., POULOS, A., WHITE. (1973).** The effect of cold shock and freeze thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Aust J Biol Sci*, 26: 1409-1420.
- DAUZIER, L. (1956).** Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. *Proc. 3rd Int Congr Anim Reprod Artif Insemin.* Cambridge, 3:12-14.
- DE KRESTER, D.M. (1984)** The testis. In: AUSTIN. R.C., SHORT, R.V. (Ed.) *Reproduction in mammals: 3. Hormonal control of reproduction.* 2nd Ed. Cambridge University Press Ed, 244 p.
- DELEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKIEIJ, A. J. (1992).** The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: Johnson, L. A., Rath, D, eds. *Bonn Semen Preservation II.* Berlin: Paul Parey Sci. Publ, 95-104.
- DERIVAUX, J., ECTORS, F. (1989).** *Reproduction chez les animaux domestiques.* Éditeur Academia, 3^{ème} édition, 1141 P.
- DESJARDINS, C. (1978).** Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *J. Anim. Sci.*, 47: 56-79.
- DOLLANDER, A., FENART, R. (1979).** *Embryologie générale comparée et humaine.* 4^{ème} Ed. Flammarion Médecine Sciences (Ed.), 394 p.
- DORADO, J., RODRÍGUEZ, I., HIDALGO, M. (2007).** Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68: 168-177.
- DOUET, D.G. N. (2000).** Congélation de sperme de mammifères, application aux antilopes. Thèse Docteur vétérinaire. École Nationale de Nantes, 111 P.
- DROBNIS, E.Z., CROWE, L.M., BERGER, T., ANCHORDOGUY, T.J., OVERSTREET, J.W., CROWE, J.H. (1993).** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membrane: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool*, 265: 7.

- DUDOUE, C. (2003).** La production du mouton. Éditions France Agricole, PARIS, 2^{ème} édition, 287 P.
- DRUART, X., GUÉRIN, Y., GATTI, J.L., DACHEUX, J.L. (2009).** Conservation de la semence ovine ; Inra Prod. Anim n°2, 22 (2), 91-96.
- EDUARDO VILLENA, F., JOSE JIMENEZ, R.M., MENDOZA, E., LOPEZ, J.C. (2003).** Technicien en élevage. Editions Cultural, S.A Tome 2, MADRID – Espagne, 226 p.
- EILTS, B, E. (2004).** Male Theriogenology: Semen Evaluation. [Web]: http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/male_index.htm.
- ENGLAND, G.C.W. (1993).** Cryopreservation of dog semen, a review. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 243-255.
- ESTEVE, S.C., SHARMA, R.K, THOMAS, J.R ., AGARWAL. A .(1996).** Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. Fertility and Sterility, 66 798–804
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (1987).** Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, 200 p.
- EVANS, R. W., SETCHELL, B. P. (1978).** The effect of rete testis fluid on the metabolism of testicular spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 52: 15-20.
- FERNÁNDEZ, D., ABELLA1, M., DA COSTA, Y., GUÉRIN, Y., DACHEUX, J. L. (2014).** Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. *The Animal Consortium*, 9:2, 313–319.
- FLIPSE, R.J., PATTON, S., ALQUIMINT, J.O. (1954).** Diluents for bovine semen. Effect of lactenin and of lactoperoxidase upon spermatozoa viability. *J Dairy Sci*, 41: 1205 -11.
- FOROUZANFAR, M., SHARAFI, M., HOSSEINI, S.M., OSTADHOSSEINI, S., HAJIAN, M., HOSSEINI, L., ABEDI, P., NILI, N., RAHMANI, H.R ., NASR ESFAHANI, M.H. (2010).** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73 480-7.
- FOULKES, J.A. (1977).** The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 49 277-84.
- FOULKES, J.A., SWEASEY, D., GOODEY, R.G. (1980).** Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J Reprod Fertil*, 60 165-9.
- FOURIE, P.J., SCHWALBACH, L.M., NESER, F.W.C., VAN DER WESTHUIZEN, C. (2004).** Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. *Small Rum. Res*, 54: 53-59.
- GADEA, J. (2003).** Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agr*
- GALBRAITH, H., BERRY, A. D. (1994).** Effect of naturally occurring and synthetic androgens on growth, body composition and muscle glucocorticoid receptors in wether lambs. *Anim. Prod.*, 58: 357-364.
- GAZEAU, C., DEREUDDRE, J. (1986).** Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques* s 1 17-27.

- GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H. (1987).** Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24 42-52.
- GILMORE, J.A., MCGANN, L.E, LIU, J., GAO., D.Y., PETER, A.T., KLEINHANS, F.W. (1995).** Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 53:985–95.
- GILMORE, J.A., LIU, J., GAO, D.Y., PETER, A.T., CRITSER, J.K. (1998).** Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod*, 58:28 –36.
- GUÉRIN, Y., LOCATELLI, Y., COMIZOLLI, P., MAUGET, R., MERMILLOD, P., LEGENDRE, X., GATTI J.L., DACHEUX J.L. (2003).** Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d’ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation *in vitro*. *Les Actes du BRG*, 4: 173-183.
- GUILLOT, J. (2002).** La calcification testiculaire chez les boucs de centres d’insémination artificielle : étude clinique et répercussion sur la reproduction de semence. Thèse Docteur vétérinaire. École nationale vétérinaire Toulouse, 113P.
- HAFEZ, E.S.E. (1987).** Reproduction in farm animals. Vol 1, LEO- FEBIGER, 5^{ème} Edition.
- HAFEZ, E. S. E. (1993).** Reprodução Animal. Fisiologia veterinária – Elsayed Saad Edition, 513 p.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K., NOLAN, J. P.(1990).** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 11:73.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. (1992).** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29:26 –38.
- HAMMOND, J. (1961).** Reproduction, croissance et hérédité des animaux de la ferme. 1^{ère} Ed., Vigot frères (Ed.), 268 p.
- HANZEN, C. (2005).** Propédeutique de l’appareil reproducteur du mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc. 2^{ème} année doctorat. Faculté de médecine vétérinaire, service d’Obstétrique et de Pathologie de la reproduction des équidés, ruminants et porcs.
- HARRISON, R.A.P., ASHWORTH, P.J.C., MILLER, N.G.A. (1996).** Assessment of Domestic Anim, 44 571-5. sperm function under fertilizing conditions. *Reprod Dom Anim*, 31:25–30.
- HAY, M., KING, W., GARTLEY, C., LEIBO, S., GOODROWE, K. (1997).** Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil., Suppl* 51, 99-108.
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T., PERREAU, C., PISSELET, C., LOCATELLI, A., BOSCH, M. (1995).** Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *J. Reprod. Fert.*, 103: 41-46.
- HU, J.H., LI, Q.W., JIANG, Z.L., YANG, H., ZHANG, S.S., ZHAO, H.W. (2009).** The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod.*

- JAFAROGHLI, M., KAHALILI, B., FARSHAD, A., ZAMIRI, M. (2011).** The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96 58-63.
- JAIN, N.K., ROY, I. (2009).** Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*, 18 24-36.
- JOHNSON, L. (1991).** Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. (Ed.) *Reproduction in domestic animals*. 4th Ed., Academic Press, Inc. San Diego. New York. Boston. London. Sydney. Tokyo, 670 p.
- JONES, R.C., MARTIN, I.C.A, LAPWOOD, K.R. (1969).** Studies on the artificial insemination of sheep: the effects on fertility of diluting ram semen, stage of oestrus of the ewe at insemination, and injection of synthetic oxytocin. *Aust J Agric Res*, 20 141-50.
- KATILA, T., COMBES, G.B, VARNER, D.D, BLANCHARD, T.L. (1997).** Comparaison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 48 (7) 1085-92.
- KHALIFA, T., LYMBEROPOULOS, A. (2013).** Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell Tissue Bank*, 14 687-98.
- KOROCHKINA, E., JOHANNISSON, A., GOODLA, L., MORRELL, J.M., AXNER, E. (2014).** Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 82, n° 9, 1206-1211.
- KUMAR, D., JOSHI, N., NAQVI, S. M. K. (2010).** Objective assessment of sperm motion characteristics of Malpura ram lambs raised under intensive management system in semiarid tropical environment. *Trop Anim Health Prod*. 42:653–658.
- KUNDU, C.N., DAS, K., MAJUMDER, G.C. (2001).** Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology*, 42: 21-27
- LACROIX, M. (1976).** Circuit physique de la semence ovine, 81-93 pp. In *Insémination artificielle ovine*. Éditions SEARLE-PARIS, 105 P.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., HORVATH, A., URBANYI, B., WEISMANN, T. (2000).** Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54 1477-98.
- LEBLANC B. (2004).** Améliorations des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'étude en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 55 p.
- LEBOEUF, B., RESTALL, B., SALAMON, S. (2000).** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci*, 62: 113-141.
- LE GAL, F., BARIL, G., VALLET, J.C., LEBOEUF, B. (1993).** In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology*, 40:771–7.
- LENZI, A., PICARDO, M., GANDINI, L., DONDERO, F. (1996).** Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update*, 2 246-56.
- LINDE FORSBERG, C. (1995).** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, 48-58.

- LOCATELLI, Y., MERMILLOD, P. (2005).** Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. *INRA Prod. Anim.*, 18 (1), 3-25.
- LONE, F.A., ISLAM, R., KHAN, M.Z., SOFI, K.A. (2012).** Effect of different egg yolk based extenders on the quality of ovine cauda epididymal spermatozoa during storage at 4°C. *Repro. Dom. Anim*, 47, 257-262.
- MALPAUX, B., VIGUI, C., THIÉRY, J.C., CHEMINEAU, P. (1996).** Contrôle photopériodique de la reproduction. *INRA Prod. Anim.*, 9 (1), 9-23.
- MANSOUR, N., LAHNSTEINER, F., PATZNER, R.A. (2010).** Motility and cryopreservation of spermatozoa of European common frog. *Rana temporaria*. *Theriogenology*, 74 724-32.
- MARCO JIMÉNEZ, F., PUCHADES, S., GADEA, J., VICENTE, J.S., VIUDES DE CASTRO, M.P. (2005).** Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64: 1756-1765.
- MARTINEZ, P., MORROS, A. (1996).** Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci*, 103-17.
- MARTINEZ PASTOR, F., GARCIA-MACIAS, V., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C. , HERRAEZ, P., PAZ, PD., RODRIGUEZ, L.A. (2006).** Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65, 471–485.
- MARTINS BESSA, A., ROCHA, A., MAYENCO AGUIRRE, A. (2006).** Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, 66, 2047-2055.
- MASSIP, A. (2001).** Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim*, 36:49–55.
- MAXWELL, W.M.C. (1987).** Samon's artificial insemination of sheep and goat. *Butterworths Sydney. Anim. Reprod. Sci.* 10: 309-316.
- MAXWELL, W.M.C., JOHNSON, L.A. (1999).** Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52: 1353-1362.
- MAXWEL, W.M.C., SALAMON, S. (1993).** Liquid storage of ram semen. A Review. *Reprod. Fertil. Dev*, 5:613-38.
- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. (1996).** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 42, 55-65.
- MAYER, D.T., LASLEY, J.F. (1945).** The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities and fertilising capacity of mammalian spermatozoa, *J Anim Sci*, 4:261
- MAZUR, P. (1965).** The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 125: 76.
- MAZUR, P. (1968).** Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl Haematol*, 29 764-77.
- MAZUR, P. (1984).** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell. Ph.* 247: C125-C142.

- MAZUR, P., COLE, K.W. (1989).** Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, 26: 1-29.
- MCKEOWN, R. M., CALLAGHAN, D. O., ROCHE, J. F., BOLAND, M. P. (1997).** Effect of immunization of rams against bovine inhibin $\alpha 1$ -26 on semen characteristics, scrotal size, FSH, LH and testosterone concentration. *J. Repro. Fertil.*, 109: 237-345.
- MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. (2002).** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? . *Theriogenology*, 57: 327-344.
- MEYER CHRISTIAN. (2008).** Guide de l'élevage du mouton méditerranéen et tropical. Cirad-emvt. Ceva Santé Animale.154P.
- MICHELAT, J., CHAUVIER, G. (1974).** Encyclopédie Vétérinaire. Editions Vigot Frères. Tome 2. PARIS, 767 p.
- MICLEA, V., DASCĂL CIORNEI, A., ZĂHAN, M., DASCĂL CIORNEI, V., MICLEA, I. (2010).** The influence of the dilution rate and glycerol concentration on ram semen preservation. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Biotechnologies, 3-5 Manastur Street, 400372 Cluj-Napoca, Romania.
- MOGGIA, S., PERROS, D. (1999).** Contribution à la mise en évidence des altérations de l'acrosome et de la membrane des spermatozoïdes du chien lors de la congélation et de la décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 131 p.
- MORAES, C.N., NEVES, J.P., GONCALVES, P.B.D, OLIVEIRA, J.F.C., SCHWEITZER, C.M. (1998).** Criopreservac,ao do semen ovino em pellets com etileno glicol (Ethylene glycol for freezing ram semen in pellets). *Ciencia Rural*, 28:287-92.
- MORRIER, A., CASTONGUAY, F., BAILEY, J.L. (2002).** Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. centre de recherche en biologie de la reproduction, department des sciences animales, université Laval , Quebec, Canada, 221,227.
- NAJAFI, A., ZHANDI, M., TOWHIDI, A., SHARAFI, M., AKBARI SHARIF, A., KHODAEI MOTLAGH, M., MARTINEZ PASTOR, F.(2013).** Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 66 275-82.
- NEARY, M. (2002).** Reproductive Management of the Ewe Flock and the Ram. Extension Sheep Specialist; Ruminant Nutrition, Sheep; B.S., University of Nebraska, M.S. and Ph.D., Mississippi State University: Extension Sheep Specialist Purdue University.
- NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGUERO, A. (1999).** Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51 721-7.
- NEWTON, H., AUBARD, Y., RUTHERFORD, A., SHARMA, V., GOSDEN, R. (1996).** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, 11:1487-91.
- NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J., ENGLAND, G. C. W. (2001).** Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics. *Theriogenology*. 8 th Ed., Saunders Elsevier (Ed.), 868 p.
- NOTHLING, J., SHUTTLEWORTH, R. (2005).** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63, 1469-1480.
- O'SHEA, T., WALLEES, R.G. (1967).** The metabolism of ram, bull, dog and rabbit spermatozoa after cooling to 5°C. *Aust J Biol Sci*, 20:447-60.

- PACE, M.M., GRAHAM, E.F. (1974).** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, 39 1144-9.
- PARAPANOV, R., VARGAS, J. (2009).** Spermatogenèse et perturbateurs endocriniens: étude sur la qualité du sperme en Suisse. *Fondation andrologie, biologie, endocrinologie, reproduction (Faber) en Suisse.*
- PAREZ, M., DUPLUN, J.M. (1978).** Insémination artificielle bovine, *Reproduction et amélioration génétique.* Edition ITEB et UNCELA , 17-99 PP.
- PARKS, J. E., GRAHAM, J. K. (1992).** Effects of cryopresemination procedures on sperm membranes. *Theriogenoiogy*, 38:209-22.
- PARKS, J.E., MECHAM, T.N., SAACKE, R.G. (1981).** Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposome prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod*, 24: 399-404.
- PAULENZ, H., ADNOY, T., FOSSEN, O.H., SODERQUIST, L., BERG; K.A. (2002).** Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. *Vet. Rec*, 150, 299-302.
- PENA MARTINEZ, AI., JOHANNISSON, A., LINDE FORSBERG, C. (2001).** Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57 (suppl), 371-376.
- PENA MARTINEZ, A.I., QUINTELA, L.A., HERRADON, P.G. (1998) .** Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, 50, 1211-1220.
- PENA MARTINEZ, A.I. (2004) .** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83.
- PHELPS, M.J., LIU, J., BENSON, J.D., WILLOUGHBY, C.E., GILMORE, J.A., CRITSER, J.K. (1999).** Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod*, 61:1031– 41.
- PONTHIER, J., VAN DEN BERGHE, F., PARRILLA-HERNANDEZ,S., HANZEN, C., DELEUZE,S. (2012).** Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives. *Ann. Méd. Vét.*, 2014, 158, 57-72.
- PURDY, P.H. (2006).** A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.
- QUINN, P.J., CHOW, P.Y., WHITE, I.G. (1980).** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, 60 403-7.
- RAVAULT, J.P., THIMONIER, J. (1988).** Melatonin patterns in ewes maintained under skeleton or resonance photoperiodic regimens. *Reproduction Nutrition Développement*, n° 28 (2B), 335-540.
- RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., TANGHE, S., CORYN, M., MAES D., DE KRUIF, A. (2005).** New techniques for the assessment of canine semen quality : a review. *Theriogenology*, 64, 706-709.

- ROBEL, P. (2001).** La stéroïdogénèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'homme, 144-154pp. Coédition INRA-Ellipses.
- ROBERTSON, L., WATSON, P.F. (1987).** The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. *Animal Reprod Sci*, 15:177-187.
- RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A., COSTA, S.H.F., MATOS, M.H.T., SANTOS, R.R., LUCCHI, C.M. (2004).** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, 61:1009–24.
- RODRIGUEZ GIL, J.E., MONTSERRAT A., RIGAU T. (1994).** Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42.
- ROHILLA, R.K., TULI, R.K, GOYAL, R.L. (2005).** Comparative study of the effects of cryoprotective agents in freezing Murrah buffalo bull semen. *Indian J Vet Res*, 14:37– 43.
- ROTA, A., MARTINI, M., MILANI, C., ROMAGNOLI, S. (2005).** Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction, Nutrition and Development*, 45, 29-37.
- ROTA, A., MILANI, C., CABIANCA, G., MARTINI, M. (2006).** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65, 1848-1858.
- ROTA, A., STROM, B., LINDE FORSBERG, C. (1995).** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44, 885-900.
- SAGOT, L. (2009).** Conduite de la reproduction. Insémination animale : du bélier à la paillette. Institut de l'élevage- CIIRPO. INRA Reprod. Nutr. Dévelop, 20, 1789-1799.
- SALAOMON, S. (1976).** Artificial insemination in sheep. Animal husbandary, department university of Sydney, 139 p.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. (2000).** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 77-111.
- SALAMON, S., ROBINSON, T.J. (1962).** Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II. The effects of semen diluents and storage on lambing performance. *Aut. J. Agric. Res*, 13:271-81.
- SALLES, M.G.F. (1989).** Agua de coco (cocus nucifera) “in natura” sob forma de gel e estabilizada, como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 52p. Tese de Mestrado.
- SCHANBACHER, B. D. (1982).** Hormonal interrelationships between hypothalamus, pituitary and testis of rams and bulls. *J. Anim. Sci.*, 55: 56-67.
- SCOTT, T. W., WALES, R. G., WALLACE, J. C., WHITE, I. G. (1963).** Composition of ram epididymal and testicular fluid and the biosynthesis of glycerylphosphorylcholine by the rabbit epididymis. *J. Reprod. Fert.*, 6: 49-59.
- SETCHELL, B.P. (1977).** Male reproductive organs and seven. Edition *Reproduction in domestic animals*, ed H.H cupps PT Academics press, New York, 229-256.

- SETCHELL, B.P. (1991).** Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. 4th Ed., Academic Press, Inc. San Diego. New York. Boston. London. Sydney. Tokyo, 670 p.
- SIEME, H., HARRISON, R.A., PETRUNKINA, A.M. (2008).** Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci*, 107: 276-292.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. (2003).** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- SILVERTHORN, D.U, OBER, W.C., GARRISON, C.W., SILVERTHORN, A.C., JOHNSON, B.R. (2007).** Physiologie humaine. Une approche intégrée, Pearson education, France, 976 p.
- SIMPSON, A.M., WHITE, I.G. (1986).** Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 131-143.
- SMATTI, M., MEKKI, M. (2013).** Conservation de la semence ovine. projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire, École Nationale vétérinaire d'Alger, 59 P.
- SOARES, M.P., ROSSI, C.A.R., MEZZALIRA, A., CECIM, M. (2002).** Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural*, 32:649 –55.
- SOLER, A.J ., GARDE, J.J. (2003).** Relationship between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. *Journal of Andrology* 24, 393–400.
- SOLTNER, D. (2001).** La reproduction des animaux d'élevage et zootechnie générale, 3^{ème} édition. Tome 1,13 P.
- STOREY, B.T, NOILES, E.E., THOMPSON, K.A. (1998).** Comparison of glycerol, other polyols, thehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37:46 –58.
- SWELUM, A.A., MANSOUR, H.A., ELSAYED, A.A., AMER, H.A. (2011).** Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. *Theriogenology*, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Egypt.
- SZTEIN, J.M., NOBLE, K., FARLEY, J.S., MOBRAATEN, L.E. (2001).** Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42 28-39.
- TASSERON, F., AMIR, D., SCHINDLER, H. (1977).** Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 51: 461-462.
- THIMONIER, J., COGNIE, Y., LASSOUED, N., KHALDI, G. (2000).** L'effet mâle chez les ovins : une technique actuelle de maîtrise de la reproduction. *Production animale*, 13, 223,231.
- TONER, M. (1993).** Nucleation of ice crystals inside biological cells. In: P. Steponkus (ed.). *Advances in low temperature biology*. p. 51. JAI Press, London.
- TOSHIMORI, K. (2003).** Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech*, 61,1–6.

- TURRI, F., MADEDDU, M., GLIOZZI, T.M., GANDINI, G., PIZZI, F. (2011).** Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim.*
- VAISSAIRE, J.P. (1977).** Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. Editions Maloine S.A, éditeur PARIS, 457 p.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. (2000).** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*, 62: 23-53.
- VISHWANATH, R. (2003).** Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, Volume 59, Issue 2, 571-584.
- VOGLMAYR, J. K., MUSTO, N. A., SAKSENA, S. K., BROWN-WOODMAN, P. D. C., MARLEY, P. B., WHITE, I. G. (1977).** Characteristics of semen collected from the cauda epididymidis of conscious rams. *J. Reprod. Fert.*, 49: 245-251.
- VOGLMAYR, J. K., SETCHELL, B. P., WHITE, I. G. (1971).** The effect of heat on the metabolism and ultra structure of ram testicular spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 24:71-80. 356.
- WATSON, P.F. (1979).** The preservation of semen in mammals. In: Finn C, editor. *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford: Oxford University Press, 283–350.
- WATSON, P.F. (1981).** The effect of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A (eds.), *Effects of low temperature on biological membrane*. London: Harcourt Brace Jovanovich, 189-218.
- WATSON, P.F. (1990).** Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming GE (ed.) *Marshall's physiology of reproduction*, vol. 2. Edinburgh: Churchill- Livingstone, 747-869.
- WATSON, P.F. (1995).** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 7: 871-891.
- WATSON, P.F. (2000).** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- WISHART, G.J. (2007).** Cryopreservation of avian spermatozoa. *Methods Mol Biol*, 368 219-25.
- WOELDERS, H., MATTHIJS, A., ENGEL, B. (1997).** Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35 93-105.
- YANG, H., NORRIS, M., WINN, R., TIERSCH, T.R. (2010).** Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. *Cryobiology*, 61 211-9.
- ZAMBELLI, D., CUNTO, M. (2006).** Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 2, pp. 159-165.

Résumé

La conservation à court terme de la semence ovine est une biotechnique qui permet de prolonger la longévité des spermatozoïdes, cependant cette durée de vie demeure limitée, toutefois, la semence cryoconservée chez cette espèce ne donne des taux de fertilité acceptables que lorsqu'elle est utilisée en IA par laparoscopie, ce qui limite l'expansion de l'insémination artificielle chez les ovins. Ces constatations nous ont dictés l'objectif de rechercher un milieu approprié à la réfrigération de la semence ovine à 4°C et ce en présence de cryoprotecteurs en vue de pallier à la limite de la durée de vie restreinte des spermatozoïdes obtenue par ce procédé. Pour ce faire, nous avons mis à l'essai la réfrigération de la semence épидидymaire de bélier moyennant six milieux de conservation : à base de **20%** du jaune d'œuf, **5%** de glycérol, **10%** de glycérol, **5%** d'éthylène glycol, et **10%** d'éthylène glycol et un milieu témoin.

Notre méthode de collecte a été portée sur le rinçage rétrograde de l'épididyme, la semence obtenue a été évaluée, diluée et répartie dans les six milieux, puis réfrigérée à 4°C, par la suite nous avons évalué la motilité individuelle et la vitalité des spermatozoïdes (Test HOST & coloration à l'éosine) des six milieux à **H₀**, **H₁₂**, **H₂₄**, **H₃₆**, **H₆₀**, **H₈₄**, **H₁₀₈**, **H₁₃₂**, et **H₁₅₆**. Nos résultats révèlent que le protocole à **10% d'éthylène glycol** semble être le meilleur protocole pour la réfrigération, ainsi, la durée de conservation optimale de la semence dans ce milieu était de **156 h** avec un pourcentage de **50%** de spermatozoïdes vivants obtenus avec le test HOST. L'utilisation conjointe d'un cryoprotecteur pénétrant (le glycérol) et non pénétrant a donné des résultats acceptables (58%) pour la concentration de 5% et 52% pour la concentration 10% à **H₈₄**.

Mots clés : semence ovine, spermatozoïdes, conservation, cryoprotecteurs, réfrigération, glycérol, éthylène glycol.

Summary

Short term conservation of sheep semen is a biotechnology that can extend the sperm's life, even if this life duration remains limited, however cryopreserved semen in this species gives acceptable fertility rates when used in laparoscopic artificial insemination, that what limits the expansion of artificial insemination in sheep. These findings have dictated us the objective to find an appropriate medium to refrigeration sheep's semen at 4 ° C with croprotectors and to overcome the constraint of the restricted life of sperm obtained by this method. We tested the refrigeration of epididymal ram semen using six conservation mediums: based on **20%** of egg yolk, **5%** glycerol, **10%** glycerol, **5 %** ethylene glycol, **10%** ethylene glycol and a control medium.

We also used the retrograde flushing of the epididymis method in order to recover ram semen which was than was evaluated, diluted and distributed in the six mediums, then refrigerated at + 4 ° C, thereafter we assessed the individual motility and vitality sperm (HOST Test & eosin coloration) of the six circles in **H₀**, **H₁₂**, **H₂₄**, **H₃₆**, **H₆₀**, **H₈₄**, **H₁₀₈**, **H₁₃₂**, and **H₁₅₆**).

Our results demonstrated that usage of ethylene glycol as a cryoprotectant to **10%** for ram semen appears to be the best protocol for cooling, the HOST test have reveled **50%** of living spermatozoa at **156 h**. We have noticed that the joint use of a penetrating cryoprotectant (glycerol) and non-penetrating gave acceptable results (58%) to a concentration of 5% of glycerol and 52% for the concentration to H84.

Keywords: sheep semen, sperm, refrigeration, conservation, cryoprotectant glycerol, ethylene glycol.

ملخص

إن الاحتفاظ بالسائل المنوي لمدة قصيرة يعتبر طريقة من طرق التكنولوجيا الحيوية التي تسمح بإطالة عمر الحيوانات المنوية التي تبقى لعمر محدود، بينما التلقيح الاصطناعي باستعمال السائل المنوي المجمد عند الأغنام لا يعطي معدلات خصوية مقبولة إلا إذا استعمل عن طريق التلقيح عبر المنظار البطني، مما يقلل من تطوير عملية التلقيح الاصطناعي عند الأغنام. هذه النتائج فرضت علينا إيجاد وسيلة مناسبة لتبريد السائل المنوي للكباش للقيام بهذا الاختبار قمنا بتبريد بريح السائل المنوي وذلك في ستة أوساط : صفار البيض بنسبة 20%، الجليسرول 5% و 10% الإيثيلين جليكول 5% و 10%، بالإضافة إلى الوسط الشاهد. لقد تحصلنا السائل المنوي بتقنية شطف ما وراء البريخ ثم قمنا بتقييم نوعيته و بعدها بتمديده في الأوساط السابقة الذكر بعد ذلك قيمنا الحركية الفردية و سلامة الغشاء الخلوي للحيوانات المنوية في كل أوساط التبريد المستعملة وذلك عند 0سا، 12سا، 24سا، 36سا، 60سا، 84سا، 108سا، 132سا، 156سا.

لقد وصلنا لخلاصة مهمة و هي أن البروتوكول المركز ب 10 % من الاتيلين جليكول هو الأنسب لتبريد الحيوانات المنوية حيث حافظ على 50% من هذه الأخيرة حية، كما استخلصنا أن استعمال المتزامن لكل و اقي التبريد القابل لاحتراق غشاء الخلية و الغير قابل لاحتراقها أعطى نتائج مقبولة بالنسبة للجليسيرول المركز 5% و 10% بنسبتي 52% و 58% على الترتيب عند 84 سا.

كلمات خصوصية

مني الغنم، الحيوانات المنوية، التبريد، الحفظ، و اقي التبريد، الاثيلين جليكول، الجليسيرول