



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

La cryoconservation de la semence équine avec essais de congélation différée

Présenté par : HADJALLA HEDJALLA Ikram & OUKHAM Yasmine.

Devant le Jury :

| | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>Mme Kanane A</i> | <i>SNV, Blida1</i> | <i>Présidente</i> |
| <i>Mme Benazouz F</i> | <i>SNV, Blida1</i> | <i>Examinatrice</i> |
| <i>Mme Djazouli Alim F</i> | <i>SNV, Blida1</i> | <i>Promotrice</i> |
| <i>Mr Bellala Redha</i> | <i>M.C.B.U Blida1</i> | <i>Co-Promoteur</i> |

Session 2019 / 2020

Remerciement

Nous remercions DIEU le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force et la patience afin de mener ce travail à terme.

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et grand respect à notre chère promotrice **Mme DJAZOULI** Pour son aide, sa disponibilité, ses conseils avisés, et ses remarques qui nous ont permis de présenter notre travail.*

*Toute notre gratitude s'adresse aussi à notre co-promoteur **Mr BELALA** pour son aide et sa contribution à la réussite de ce modeste mémoire.*

Nos sincères remerciements s'adressent aussi aux membres de jury d'avoir accepté de juger notre travail et de contribuer à son enrichissement par leurs valeureuses remarques :

***Mme KANANE** pour avoir accepté de présider le jury et d'évaluer notre travail.*

***Mme BENAZOUZ** Pour avoir accepté d'examiner ce travail, d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et de juger notre travail.*

En dernier lieu, nous remercions chaleureusement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière...

Mon très cher père

La plus belle créature que Dieu a créée sur terre...

La source de tendresse, de patience et de générosité...

Ma mère !

Ma Chère tante Nacera et son fils Hani

Mes cousines Amina et Naila

Mes amis, Yasmine, Fatiha, Nour el houda, Maroua, Lilia.

Tous ceux et celles qui de près ou de loin

M'ont aidé, je le leur dédit

Ikram

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mon père pour toute l'aide qu'il m'a apporté durant mes années
d'études*

Ma mère et ma grande mère.

*Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'avais à dire
ne savait, exprimer à fond tout le sacrifice que vous avez du subir
pour nous élever.*

Mes chères sœurs : Nour El houda et Amira

Je vous souhaite à tous un brillant parcours dans la vie

*Mes chères tantes Chafia et Fatma pour tous ces moments de bon
humeur passés et a ceux qui restent à venir...*

*Mes amies et à tous mes collègues de 2ème année master en
Biotechnologies, option : Biotechnologie et pathologie moléculaire,
surtout à ma collègue Ikram pour toute l'aide et le support morale
qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce mémoire de fin d'étude.*

Yasmine

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'effet des différents temps d'équilibration sur la motilité et l'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes congelés chez les équins. Pour le faire une vingtaines d'éjaculats récoltés à partir de cinq (05) étalons de race Pur-sang Arabe ont été utilisés. Chaque éjaculat a été évalué initialement par les systèmes CASA : r Computer-AidedSpermAnalysis) et la CMF : Cytométrie en flux).

Ce qui permet une analyse automatique, répétitive et précise d'un échantillon de spermes selon les paramètres de: **mobilité, concentration, morphologie, fragmentation de l'ADN, vitalité, la réaction de l'acrosome** et les **leucocytes**. **Les échantillons de sperme sont mis** en équilibration à 4°C dans un diluant commercial pendant 2h, 24h, 48h, 72h dans une vitrine réfrigérée, puis congelé ensuite décongelé puis évalué à nouveau. Le temps d'équilibration dans la congélation ne diffère pas significativement par rapport à la variable du temps, 2h, 24h, 48h, 72h, en comparaison avec le temps conventionnel qui est de 2h.

La concentration de 2.5% en glycérol (INRA-Freeze) est une concentration optimale pour une congélation des spermatozoïdes équins. Une centrifugation de la semence équine (600xg, 10mn sur un coussin « Maxifreeze® ») a réduit le taux des pertes en cellules à 12% associé à une bonne viabilité-acrosomial.

La nouvelle approche de la congélation du sperme préalablement refroidi pour 2h, 24h, 48h, 72h peut être une méthode appropriée pour réduire de nombreux problèmes liés au risque de transport d'équipement coûteux, ou un étalon d'un endroit à un autre.

Mots clefs : Etalon, semence, cryoconservation, centrifugation équilibration, Cryométrie en flux, CASA.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير أوقات الموازنة المختلفة على الحركة والسلامة الوظيفية للحيوانات المنوية المجمدة في الخيول. للقيام بذلك ، تم استخدام حوالي عشرين عينة تم جمعها من خمسة (05) فحول (من الخيل العربي الأصيل). تم تقييم كل عينة في البداية بواسطة أنظمة CASA: تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر) و CMF: قياس التدفق الخلوي).

يسمح هذا بإجراء تحليل تلقائي ومتكرر ودقيق لعينة الحيوانات المنوية وفقاً لمعايير: التنقل ، والتركيز ، والتشكل ، وتقنيات الحمض النووي ، والحيوية ، والتفاعل الجسيمي والكريات البيض. تتم معايرة عينات الحيوانات المنوية عند 4 درجات مئوية في مادة مخففة تجارية لمدة ساعتين ، 24 ساعة ، 48 ساعة ، 72 ساعة في علبة عرض مبردة ، ثم يتم تجميدها ثم إذابتها ثم تقييمها مرة أخرى. لا يختلف وقت الموازنة في التجميد اختلافاً كبيراً عن متغير الوقت ، 2 ساعة ، 24 ساعة ، 48 ساعة ، 72 ساعة ، بالمقارنة مع الوقت التقليدي وهو 2 ساعة.

تركيز الجلوسرين 2.5% (INRA-Freeze) هو التركيز الأمثل لتجميد الحيوانات المنوية للخيول. أدى الطرد المركزي للسائل المنوي للخيول (600 xg ، 10mn على وسادة "Maxifreeze®") إلى خفض معدل فقدان الخلايا إلى 12% المرتبط بقدرة أكروسومال جيدة.

قد يكون النهج الجديد لتجميد الحيوانات المنوية المبردة مسبقاً لمدة ساعتين و 24 ساعة و 48 ساعة و 72 ساعة طريقة مناسبة لتقليل العديد من المشكلات المرتبطة بمخاطر نقل المعدات باهظة الثمن أو الفحل من مكان إلى آخر.

الكلمات المفتاحية: الفحل ، السائل المنوي ، الحفظ بالتبريد ، موازنة الطرد المركزي ، التحليل المنوي بمساعدة كمبيوتر ، (CASA) اختبار الحيوية ، القياس الخلوي عن طريق التدفق. (CMF).

The objective of this study is to evaluate the effect of different equilibration times on the motility and functional integrity of frozen sperm in equines. To do this, around twenty ejaculates collected from five (05) Arabian Thoroughbred stallions were used. Each ejaculate was initially evaluated by the CASA systems: r Computer-AidedSpermAnalysis) and the CMF: flow cytometry).

This allows an automatic, repetitive and precise analysis of a sperm sample according to the parameters of: mobility, concentration, morphology, DNA fragmentation, vitality, the acrosome reaction and the leukocytes. The sperm samples are equilibrated at 4 ° C. in a commercial diluent for 2 h, 24 h, 48 h, 72 h in a refrigerated display case, then frozen then thawed and then evaluated again. The equilibration time in freezing does not differ significantly from the time variable, 2h, 24h, 48h, 72h, in comparison with the conventional time which is 2h.

The 2.5% glycerol concentration (INRA-Freeze) is an optimal concentration for freezing equine sperm. Centrifugation of the equine semen (600xg, 10mn on a “Maxifreeze®” cushion) reduced the rate of cell loss to 12% associated with good acrosomal viability.

The new approach to freezing pre-chilled sperm for 2h, 24h, 48h, 72h may be an appropriate method to reduce many of the problems associated with the risk of transporting expensive equipment, or a stallion from one place to another.

Keywords: Standard, semen, cryopreservation, centrifugation equilibration, flow cryometry, CASA.

SOMMAIRE

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des illustrations

Introduction 1

Chapitre I : Données bibliographiques

I. Le spermatozoïde dans son milieu naturel.....3

1. Le spermatozoïde.....3

2. Spermatogénèse e spermiogénèse.....4

2.1 Spermatogénèse.....4

2.2 Spermiogénèse.....6

3. Maturation du spermatozoïde et capacitation.....8

3.1 Maturation.....8

3.2 Capacitation.....8

4. Caractéristiques de la semence d'étalon.....9

4.1 Aspect externe.....9

4.2 La composition chimique du sperme de l'étalon.....9

4.3 Plasma séminal.....9

II. Conservation cellulaire à la basse température, effets cellulaire et moléculaire.....9

1. Les effets de la cryoconservation sur la semenc.....9

1.1 Les effets de la cryoconservation sur les différentes fonctions
cellulaires.....10

1.2 Les changements de type capacitation.....12

1.3 Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les
spermatozoïdes.....12

III. Technologie de la conservation de la semence équine.....15

1. La cryoconservation de la semence équine.....15

1.1 Dilution du sperme.....16

1.2 Les principaux diluants employés dans l'espèce équine.....17

| | |
|--|-----------|
| 1.3 Les différentes étapes de la cryoconservation..... | 18 |
| 2. Evaluation de la semence équine..... | 22 |
| 2.1 Les examens de première intention..... | 22 |
| 2.2 Les examens de seconde intention..... | 24 |
| Chapitre II : Matériel et méthodes | |
| I. Matériels et méthodes..... | 31 |
| 1. Lieux d'échantillonnage et de l'expérimentation..... | 31 |
| 2. Matériel biologique et Animaux..... | 31 |
| 2.1 Récolte de la semence..... | 32 |
| 2.2 Filtration de l'éjaculat..... | 33 |
| 3. Évaluation initiale de la semence..... | 34 |
| 3.1 Examen macroscopique..... | 34 |
| 3.1.1 Evaluation du volume..... | 34 |
| 3.1.2 Evaluation de l'aspect et la couleur..... | 34 |
| 3.2 Examen microscopique..... | 34 |
| 3.2.1 Détermination de la concentration en spermatozoïde...34 | |
| 3.2.2 Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes..... | 34 |
| 4. Dilution de la semence..... | 36 |
| 5. Transport de la semence..... | 36 |
| 5.1 Conditionnement du sperme à une température à 22°C..... | 36 |
| 5.2 Conditionnement du sperme à une température de 22°C à 4°C..... | 36 |
| 6. Centrifugation de la semence..... | 37 |
| 7. Dilution secondaire..... | 37 |
| 8. Equilibration..... | 38 |
| 9. Conditionnement dans les paillettes..... | 39 |
| 10. Congélation des paillettes..... | 40 |
| 11. Stockage des paillettes..... | 40 |
| 12. La décongélation..... | 40 |
| 13. Techniques d'évaluation de la semence..... | 40 |
| 13.1 Analyse de la mobilité spermatique par système (CASA)..... | 40 |
| 13.2 Analyse spermatique par cytométrie en flux (CMF)..... | 41 |
| 14. Protocole expérimental..... | 42 |
| 15. Analyse statistiques..... | 44 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|--------------------------------------|----|
| Résultats..... | 45 |
| Discussion..... | 48 |
| Conclusion..... | 50 |
| Perspectives et recommandations..... | 51 |
| Référence bibliographique..... | 52 |
| Annexes..... | 59 |

ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations

| | |
|-------------|---|
| SPZ | Spermatozoïdes |
| ATP | Acide adenosine triphosphorique |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| FSH | Follicule stimulating hormon |
| LH | Luteinizing hormon |
| ART | Assisted reproduction technique |
| IA | Insémination artificielle |
| CASA | Computerized assisted sperm analysis |
| CMF | Cyto-métrie en flux |
| ROS | Reactif oxygen species |
| DMSO | Diméthyl-sulfoxyde |
| EG | Ethylène glycol |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| TMOT | Motilité totale |
| VIAB | Viabilité |
| PMOT | Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs |
| VAP | Average path velocity |
| VCL | Curvilinear velocity |
| ALH | Amplitude of Lateral Head Displacement |
| BCF | Beat cross frequency |
| INRA | Institut National de la Recherche Agronomique |
| HCG | Hormone gonadotrope chorionique humaine |

LISTE DES FIGURES

| N° | Titre de la figure | Page |
|-----------|--|-------------|
| 01 | Structure schématique du spermatozoïde équin. | 4 |
| 02 | La spermatogenèse. | 5 |
| 03 | Formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse. | 7 |
| 04 | Les différentes cibles des Espèces Réactives. | 11 |
| 05 | Les taux de suivre cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement. | 14 |
| 06 | Photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme. | 24 |
| 07 | Les paramètres cinétiques du spermatozoïde. | 25 |
| 08 | Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux. | 26 |
| 09 | Interaction de la lumière avec la cellule. | 27 |
| 10 | Positionnement de l'étalon pour la récolte du sperme dans le vagin artificiel. | 32 |
| 11 | Filtration de l'éjaculat. | 33 |
| 12 | Machine de remplissage et de sertissage de semence. | 38 |
| 13 | Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation. | 38 |
| 14 | Courbe de congélation. | 39 |
| 15 | Immersion des paillettes dans l'azote liquide. | 40 |
| 16 | Paramétrage casa pour espèce équine. | 41 |
| 17 | Le processus de congélation de la semence équine. | 43 |

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

| N° | Titre | Page |
|-----------|---|-------------|
| 01 | Composition de Kenney et de l'inra96. | 18 |
| 02 | Les 4 sous-populations distinguables par un test PNA-FITC/IP/SYTO | 29 |
| 03 | Identification des échantillons (chevaux). | 31 |
| 04 | Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon. | 35 |
| 05 | Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon. | 36 |
| 06 | Pourcentages (\pm SD) de motilité totale (MT) après décongélation, de motilité progressive (PM) et d'intégrité de la membrane plasmique (PMI) des spermatozoïdes après deux procédures de congélation différentes chez équin. | 45 |
| 07 | Pourcentages (\pm SD) de motilité totale (MT) après décongélation, de motilité progressive (PM) et d'intégrité de la membrane plasmique (PMI) des spermatozoïdes après plusieurs procédures de congélation différentes chez plusieurs espèces. | 46 |

INTRODUCTION

Introduction

La première procédure de cryoconservation de semence remonte à 1949 en France, a été mise au point par Polge et son équipe. Depuis, cette technique a connu un véritable essor notamment dans le domaine des biotechnologies de la reproduction assistée par l'intermédiaire du développement de l'insémination artificielle.

L'utilisation de spermatozoïdes d'étalons congelés pour l'insémination artificielle est en augmentation dans l'industrie équine ce qui a permis de diffuser la génétique des meilleurs étalons et d'importer celle des champions, (**Marc Stéphanie, 2015**). Cette technologie est d'une grande importance pour l'élevage équin, car elle permet le stockage et le transport à long terme du sperme (quels que soient l'emplacement et la disponibilité d'un étalon), permet de conserver le sperme d'animaux génétiquement performants et le développement d'un programme de sélection réussi. D'autre part cette technologie permet de minimiser et de contrôler les maladies vénériennes et infectieuses. Peut-être l'un des principaux avantages est la disponibilité du sperme congelé qui permet aux éleveurs d'inséminer plus facilement une jument à une période précise qui pourrait souvent pas coïncider avec celle de l'étalon. De plus, la cryoconservation permet aussi de créer une biobanque de gamètes, soutenant la conservation des biodiversités et la protection des espèces menacées.

Il est bien connue que la capacité fertilisante des spermatozoïdes d'étalons cryoconservés est généralement considérée comme inférieure à celle de certaines autres espèces domestiques, en particulier celle des produits laitiers bovins. Il existe une variabilité interindividuelle dans la cryosurvie de leur sperme. La raison de cette réduction de la fertilité est probablement due au fait que les étalons sont sélectionnés pour leur fiche de performance, pédigrée et caractéristiques de conformation, plutôt que pour leur fertilité (**Hussain et al, 2011**).

On suppose généralement que 40 à 50% des spermatozoïdes ne survivent pas le processus de congélation et de décongélation (**Watson, 2000**). Aussi, bien que le succès de la cryoconservation des étalons est inférieurs à ceux des autres animaux d'élevage, les corrélations entre la motilité du sperme sont faibles et la fertilité (35-40%), comme également observée chez d'autres espèces domestiques (**Blottner et al., 2001**).

La technologie de cryoconservation est encore à un niveau de développement sous-optimal, et cause des cryo-dommages chimiques et physiques étendus (létaux ou sublétaux) à la structure

intégrité, biochimique et biophysique des spermatozoïdes. Un certain nombre de facteurs liés à les cryo-lésions ont été caractérisées: transitions de phase dans le plasmalemme, stress oxydatif, changements de type de capacitation, le stress osmotique et mécanique sur les membranes et les changements de température pendant le processus de congélation et de décongélation. Ceci ont comme conséquence la mort des spermatozoïdes et, s'ils survivent, leur capacité fertilisante devient très réduite (**Sieme et al, 2008**).

Devant cette problématique de Préservation de la qualité et de la performance du sperme expédié sur de longues distances ainsi liés aux risques dus aux déplacements des étalons vers les centres spécialisés, il serait intéressant d'étudier la variation du temps d'équilibration à travers ce processus sur la qualité des spermatozoïdes congelés.

Ainsi, notre présente étude se veut un essai de congélation de la semence équine et vise comme objectifs spécifiques d'évaluer l'effet de la variation du temps d'équilibration sur la motilité et l'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes équin congelés.

CHAPITRE I

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le spermatozoïde dans son milieu naturel

1. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde assure trois fonctions successives : le transport du contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle, la pénétration du génome mâle dans le gamète femelle et la fusion des deux noyaux gamétiques (ou caryogamie) aboutissant au zygote (**Knobil et Neill, 1999**).

1.1 La tête

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines. Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles. L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques (**Knobil et Neill, 1999**) (**Fig. 1**).

1.2 La région intermédiaire

Cette partie comporte deux centrioles : le centriole proximal, bien individualisé et situé derrière le noyau et le centriole distal, incorporé à la base de l'axonème. La pièce intermédiaire comporte l'axonème dans sa partie centrale entourée d'un faisceau de fibres et d'un manchon de mitochondries. Ces dernières sont le reflet d'un métabolisme aérobie et assurent une production importante d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) utilisée dans le fonctionnement de l'axonème. Chez les mammifères l'approvisionnement énergétique, en l'absence de toute réserve intracellulaire, est assuré par le liquide séminal (sous forme de fructose) (**Knobil et Neill, 1999**) (**Fig. 1**).

1.3 Le flagelle

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres de microtubules denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique (**Knobil et Neill, 1999**) (**Fig. 1**).

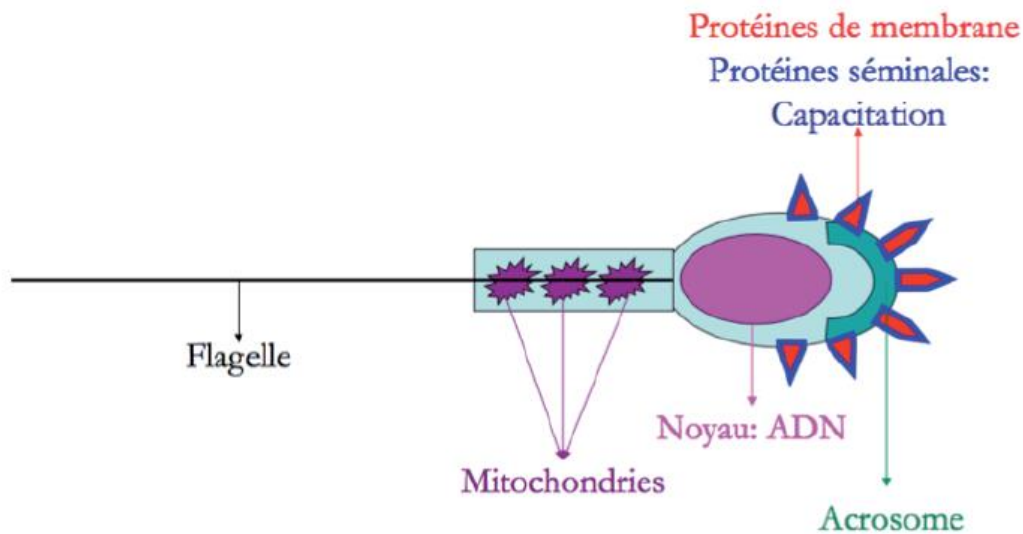


Figure 1 : structure schématique du spermatozoïde équin (Ponthier et al, 2014).

2. Spermatogénèse et spermiogénèse

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes : la spermatogénèse et la spermiogénèse, qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme, pour finir dans les voies génitales femelles. La durée de la formation du spermatozoïde est de 49 jours chez l'étalon. La connaissance de cette durée est importante pour la préparation de l'animal en vue d'une saison de monte. De même un incident influençant la production des spermatozoïdes peut avoir des répercussions sur l'aptitude reproductrice 49 jours plus tard (Heymon et Vignon, 2005).

2.1 Spermatogénèse

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action de la LH (Luteinising Hormone) sur les cellules de Leydig et de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de Sertoli (Thibault, 2001; Heymon et Vignon, 2005).

La lignée germinale mâle est constituée de deux types de spermatogonies : les spermatogonies de type A (cellules souches) et les spermatogonies de type B (cellules qui s'engagent dans la spermatogénèse) issues de ces dernières. Les spermatogonies de type B se divisent pour entrer en prophase méiotique et devenir des spermatocytes I. Ces dernières

passent ensuite de la région périphérique du tube séminifère à la région centrale par dissociation transitoire des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli. Une première division de méiose permet le passage de spermatocytes I en spermatocytes II. Ensuite, une seconde division de méiose conduit à la formation des spermatides (Fig. 2) (Thibault, 2001).

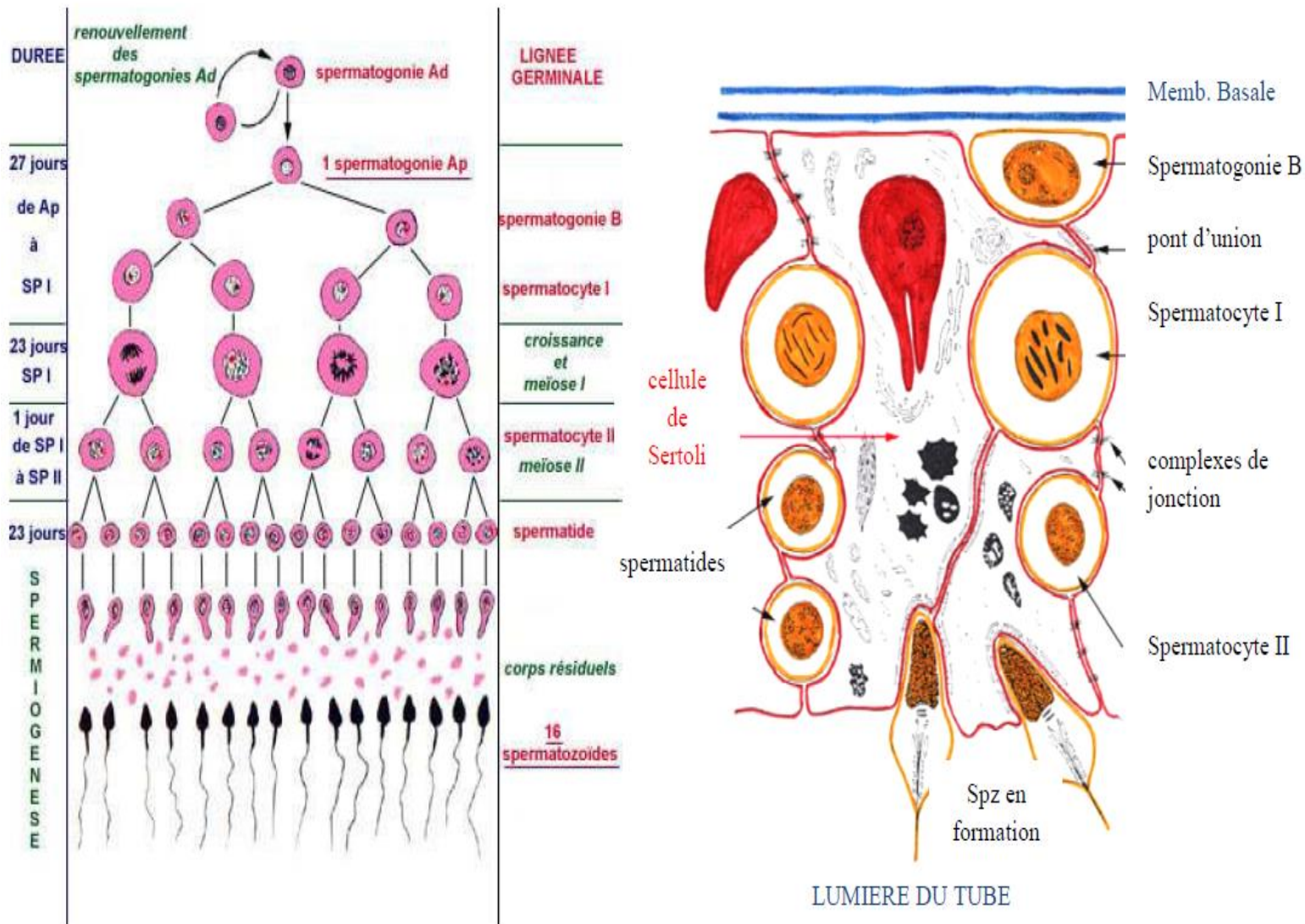


Figure 2 : la spermatogénèse (Vacheret, 1999).

La transition entre spermatogonie et spermatocyte I est marquée par une légère phase d'accroissement qui correspond à des synthèses d'ARN. La plupart de ces ARNm sont transcrits en prophase méiotique et traduits au stade spermatide ou spermatozoïde. Il s'agit d'ARNm codant des protéines intervenant en particulier dans la mobilité du spermatozoïde ou

dans la reconnaissance de l'ovule par le spermatozoïde (**Thibault, 2001; Heymon et Vignon, 2005**).

Durant les étapes correspondantes au spermatocyte II et à la spermatide, il y a encore des synthèses d'ARNm qui sont traduits encore un peu plus tardivement lors de la transformation en spermatozoïde : il s'agit d'ARNm de tubuline, de protamines... (**Thibault, 2001**).

Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire 16×10^6 spermatozoïdes par jour par gramme de testicule (**Heymon et Vignon, 2005**).

2.2 Spermiogénèse

La spermiogénèse permet le passage de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile, pauvre en cytoplasme et en réserves). Elle est caractérisée par (**Thibault, 2001; Heymon et Vignon, 2005**) (**Fig. 3**).

2.2.1 Une condensation nucléaire : Les histones riches en lysine sont éliminées et remplacées par des protamines, protéines basiques de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine. Le nucléole disparaît, les ARNm nucléaires sont éliminés et le noyau se déshydrate : l'ensemble du noyau devient une masse compacte d'hétérochromatine.

2.2.2 La formation de l'acrosome : Il se forme progressivement par confluence de vésicules golgiennes ; il y a d'abord mise en place d'une vésicule arrondie, la vésicule proacrosomiale, qui se positionne à l'opposé de l'appareil cinétique et donne la vésicule acrosomiale puis l'acrosome. Il continue à grossir par apport de vésicules golgiennes ; puis il s'étale sur la partie supérieure du noyau et finit par coiffer complètement le noyau.

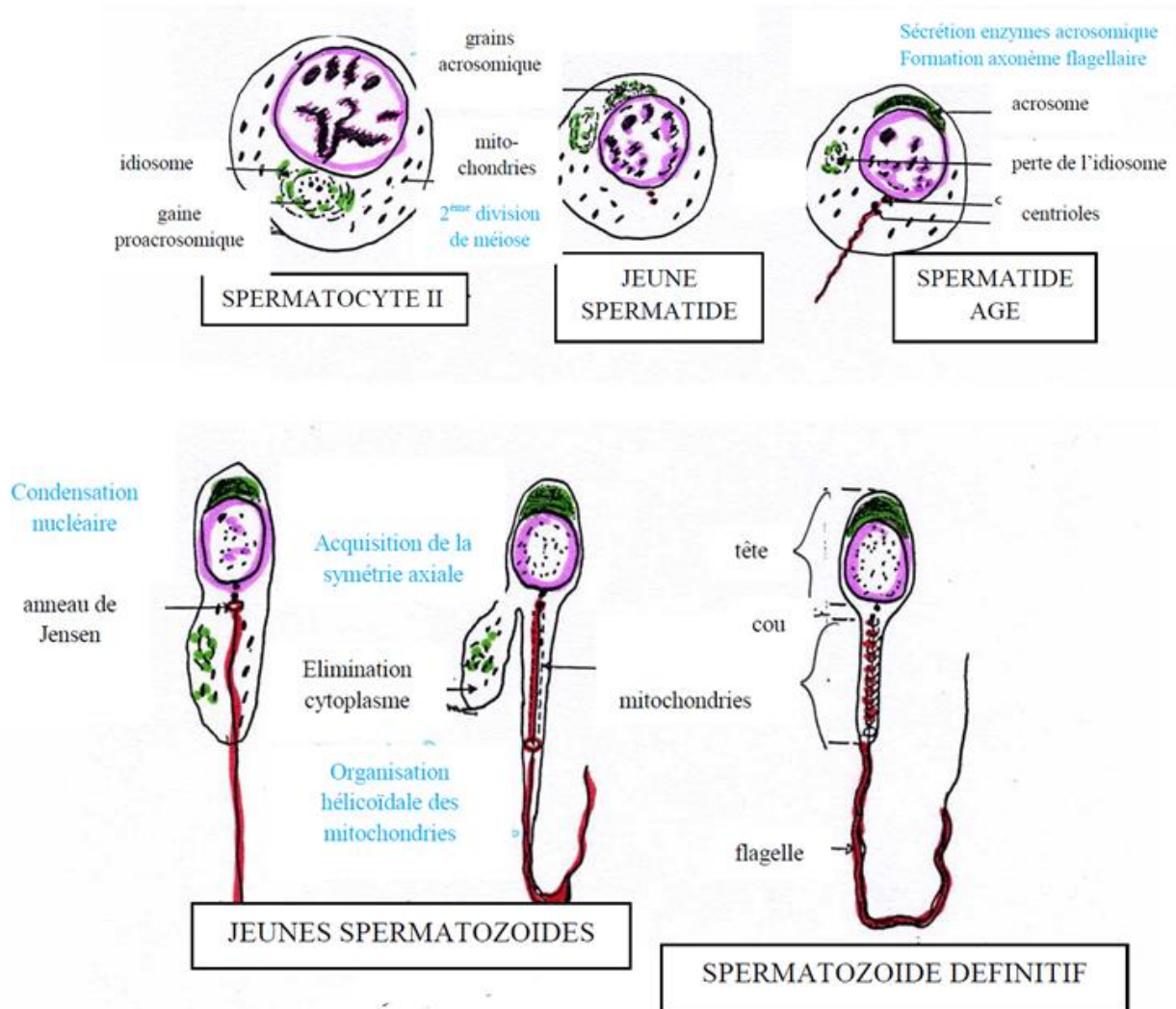


Figure 3 : formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse.

2.2.3 La différenciation de l'appareil cinétique : le complexe centriolaire, voisin de la vésicule proacrosomiale, migre à l'opposé du noyau. Le centriole proximal se positionne dans une invagination de la membrane nucléaire tandis que le centriole distal induit la polymérisation d'un axonème. Les mitochondries s'organisent en un manchon à la base de l'axonème.

2.2.4 L'élimination du cytoplasme excédentaire : L'essentiel du cytoplasme est d'abord éliminé et phagocyté par les cellules de Sertoli, et seule une goutte de cytoplasme persiste à la base du flagelle qui sera éliminée lors du passage dans l'épididyme.

Les spermatozoïdes, au sortir du testicule, n'ont pas encore la capacité de féconder un ovule. Ils vont séjourner dans l'épididyme et subir encore une série de transformations.

Lorsqu'ils quittent les testicules, ils sont dilués dans le liquide séminal sécrété par les voies génitales et les glandes annexes, puis stockés temporairement dans les vésicules séminales.

3. Maturation du spermatozoïde et capacitation

3.1 Maturation

Le spermatozoïde équin séjourne au minimum 4,1 jours dans l'épididyme, où des modifications physiologiques et morphologiques vont avoir lieu. Durant ce transit, Le liquide présent à l'entrée de l'épididyme va être presque entièrement réabsorbé et il sera ensuite remplacé par une sécrétion de la partie distale de l'épididyme (**Senger, 2005; Amann, 2011**). Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et une gouttelette cytoplasmique proximale est présente. Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent la mobilité.

L'apparition de cette dernière fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme (**Senger, 2005; Amann, 2011**). À ce stade, la gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (**Braun et al, 1994**) et les spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de féconder un ovocyte (**Sostarić et al, 2008**).

Dans le plasma séminal, la membrane cytoplasmique de la tête va être recouverte par des protéines et des glucides du plasma séminal (**Lopez et al, 2007; Gadella et al, 2008**). La dilution du milieu épидидymaire par le plasma séminal va aussi lever l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes (**Senger, 2005**).

Seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés. Les préliminaires sexuels provoquant une libération d'ocytocine, les contractions des muscles lisses vont amener les spermatozoïdes jusqu'à l'urètre pelvien où ils seront stockés avant l'éjaculation.

3.2 Capacitation

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques produites par les voies génitales femelles libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte, jusque-là masqués lors du passage dans l'épididyme. Des remaniements membranaires

interviennent, en particulier la diminution du ratio cholestérol/phospholipide qui rend la membrane plasmique très instable et rend possible l'exocytose de l'acrosome (**Thibault, 2001; Heymon, 2005**).

4. Caractéristiques de la semence d'étalon

4.1 Aspect externe

4.1.1 Le volume

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures : une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. (**Tibary, 2005; Blanchard, 2003; Heymon, 2005**).

4.1.2 La couleur et la consistance

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes. (**Tibary, 2005; Blanchard, 2003; Heymon, 2005**).

4.2 La composition chimique du sperme de l'étalon

La composition chimique du sperme est la suivante : Eau (**80%**) ; Matière organique (**6%**) ions (**calcium, phosphate...**) ; lipides ; Glucides (**fructose**) ; albumines et globulines ; bases aminées.

4.3 Plasma séminal

Le plasma séminal joue également le rôle de substance tampon pour les spermatozoïdes. Son pH est légèrement alcalin, entre **7,2 et 7,8**, et permet de neutraliser l'environnement acide du vagin (**Prins, 1998**).

Le liquide séminal est composé à **90%** d'eau et il contient également différents composants chimiques (matière organique (**6%**), ions (calcium, phosphate...), lipides, glucides (fructose), albumines et globulines, bases aminées...etc.), (**Prins, 1998**).

II. Conservation cellulaire à la basse température, effets cellulaire et moléculaire

1. Les effets de la cryoconservation sur la semence

Durant la cryoconservation de la semence, les procédures de refroidissement lors de la congélation et de réchauffement lors de la décongélation, sont responsables de sévères dommages auprès des gamètes mâles, ce qui diminue leur capacité de fécondation. Ces dommages induits par le froid représentent un facteur limitant de la conservation de la semence. Le processus de cryoconservation comprend plusieurs étapes, depuis la préparation

de la semence et sa dilution jusqu'à la décongélation : à chaque étape, les spermatozoïdes peuvent perdre leur capacité à fonctionner normalement.

En effet, durant le processus de congélation-décongélation, les spermatozoïdes sont exposés à un stress osmotique important et divers compartiments biochimiques et/ou anatomiques du spermatozoïde peuvent être lésés (l'acrosome, le noyau, les mitochondries, l'axonème, la membrane plasmique, etc...), altérant la longévité des spermatozoïdes et leur capacité à féconder l'ovocyte après insémination artificielle.

1.1. Les effets de la cryoconservation sur les différentes fonctions cellulaires

1.1.1. Les effets sur le métabolisme cellulaire

L'intensité du métabolisme est sous l'influence de la température. Une diminution de la température entraîne une nette réduction de l'activité métabolique. A des températures suffisamment basses, c'est-à-dire négatives, la plupart des processus métaboliques sont stoppés.

La congélation des spermatozoïdes induit donc un ralentissement voire un arrêt de leur métabolisme (**Loomis et Graham, 2008**).

1.1.2. Les effets sur les membranes cellulaires

La cryoconservation a des effets majeurs sur la membrane plasmique, cette dernière subi des modifications chimiques, topographiques ou mécaniques.

La membrane plasmique est une bicouche lipidique dont les parties hydrophiles des lipides et les protéines sont orientées vers l'extérieur alors que les parties hydrophobes sont orientées vers le centre de la membrane. Il existe différents types de lipides, tous étant particulièrement sensibles aux radicaux libres, libérés lors de la congélation par les cellules altérées. Ces radicaux libres sont à l'origine d'un phénomène de peroxydation, observé au niveau des lipides membranaires.

Il est connu chaque espèce de lipide possède une température de changement de phase, c'est-à-dire une température pour laquelle les lipides passent de l'état fluide à l'état de gel.

Lorsque la température devient inférieure à la température de changement de phase d'un type de lipides, tous les lipides de cette espèce se regroupent en microdomaines. Ceci est à l'origine d'une réorganisation de la membrane plasmique créant des trous entre les microdomaines de lipides et les portions fluides de membrane. Ce réarrangement des lipides membranaire induit par le froid est ce qu'on appelle le « **cold shock** » ou « **choc induit par le**

froid » et il entraîne une fragilisation de la membrane voire des dommages ou des ruptures membranaires (Marc Stéphanie. 2015).

Lorsque la température corporelle est de nouveau atteinte après décongélation, les lipides retrouvent leur forme liquide mais la membrane plasmique ne retrouve pas son organisation initiale et reste altérée. Les conséquences des altérations membranaires sont multiples car la membrane plasmique est atteinte tout comme les membranes des organites de la cellule spermatique. Ainsi, les spermatozoïdes congelés-décongelés peuvent présenter une perte de la structure interne de l'acrosome ou des mitochondries, qui représentent les structures cellulaires les plus sensibles à la cryoconservation.

Cela conduit à de sévères conséquences sur la viabilité de la cellule mais également à des dysfonctionnements dans l'activation de la mobilité ou dans la réaction acrosomique et la fécondation.

4.3.1.1 Les effets sur le noyau et l'ADN

Le noyau du spermatozoïde peut également être altéré durant la cryoconservation. Or, la préservation de l'intégrité de l'ADN est primordiale pour l'obtention d'une descendance viable et conforme aux parents.

Les spermatozoïdes endommagés sont susceptibles de produire des radicaux libres très rapidement, en particulier après congélation. Ces produits de peroxydation sont très délétères pour l'ADN et peuvent induire à la fois des cassures et des modifications de bases. Les conséquences sont dramatiques dans la mesure où le génome de la descendance, sa viabilité et la qualité de son développement sont altérés (Labbé et al, 2002; Luvoni, 2003).

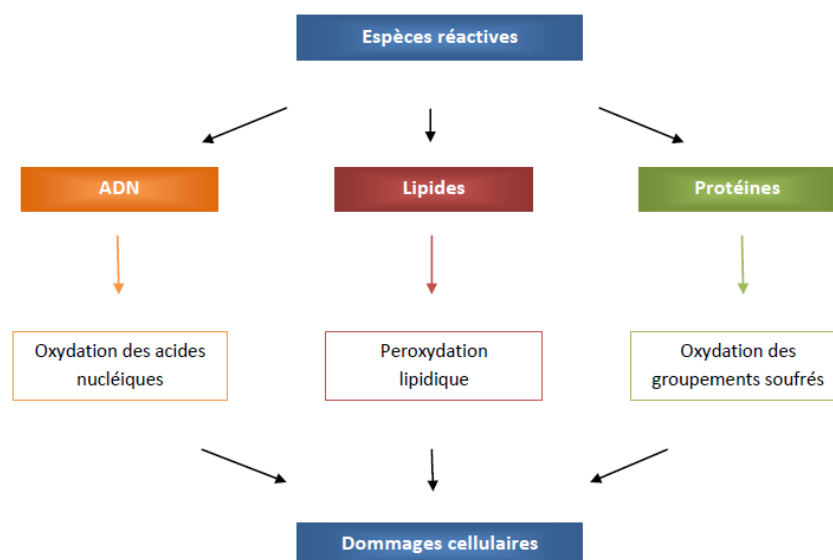


Figure 4 : Les différentes cibles des Espèces Réactives (Poisson, 2013).

1.1.3. Les changements de type capacitation

L'une des conséquences de la déstabilisation des membranes est la réaction acrosomique prématurée qui réduit fortement la durée de vie des spermatozoïdes et leur fécondité.

La membrane du spermatozoïde subit des changements de composition durant la capacitation qui la rendent perméable aux ions calcium. Suite à l'entrée du calcium dans la cellule, la réaction acrosomique a lieu ce qui rend le spermatozoïde capable de fusionner avec l'ovocyte.

Pendant la congélation et la décongélation, les spermatozoïdes subissent des changements de type capacitation, c'est ce qu'on appelle la « cryocapacitation ». Les spermatozoïdes présentent des mouvements hyperactivés selon un schéma caractéristique avec des mouvements moins linéaires et plus vigoureux que les spermatozoïdes non capités.

Les changements membranaires qui se produisent pendant le refroidissement détériorent la fonctionnalité des canaux de calcium, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Le même mécanisme est observé lors du phénomène de capacitation et pendant la réaction acrosomique (**Luvoni 2003; Rota et al, 2006 ; Cortes et al, 2006 ; Pena Martinez, 2004 ; Burgess et al, 2012**).

1.1.4. Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les spermatozoïdes

Chaque étape du processus de congélation, de la dilution jusqu'à la congélation proprement dite, peut avoir des effets néfastes sur la survie du spermatozoïde et être à l'origine de la diminution de la fécondité.

4.3.1.2 Effet de l'ajout de l'agent cryoprotecteur

L'ajout de l'agent cryoprotecteur, tel que le glycérol, a pour but d'améliorer la survie des cellules en augmentant la concentration totale en solutés dans le milieu extérieur ce qui diminue la quantité de glace formée quelle que soit la température. Dans un premier temps, l'ajout de l'agent cryoprotecteur expose la cellule à un environnement hypertonique ce qui entraîne initialement une déshydratation cellulaire. Suite à la pénétration de l'agent cryoprotecteur à l'intérieur de la cellule lors de l'étape d'équilibration, la cellule retrouve sa taille normale. Lors du retrait de l'agent cryoprotecteur, le volume cellulaire varie encore une fois et cela peut s'avérer néfaste pour la survie du spermatozoïde. D'après Loomis, 2008 le retrait semblerait plus néfaste que l'ajout du cryoprotecteur sachant que les dommages engendrés dépendent à la fois de la taille de la cellule et de la perméabilité de sa membrane aux agents cryoprotecteurs.

La différence entre la composition de la membrane en fonction de l'espèce peut être responsable d'une différence de perméabilité membranaire à l'eau et aux cryoprotecteurs. L'augmentation de la perméabilité au cryoprotecteur, par altération de la composition membranaire ou par utilisation de cryoprotecteurs alternatifs, améliore la survie des spermatozoïdes à la congélation. En effet, les cryoprotecteurs pénétrants tels que le glycérol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) augmentent la perméabilité à l'eau de la membrane, ce qui permet aux cellules de continuer à se déshydrater et donc d'éviter la formation de glace intracellulaire (Eilts 2005b; Day et Stacey 2007; Loomis et Graham 2008; Barbas et Mascarenhas 2009; Oldenhof et al. 2013).

4.3.1.3 Conséquences de l'étape de congélation proprement dite et de décongélation

Pendant la **congélation**, suite au stress osmotique engendré, la cellule subit des changements de volume qui peuvent être détériorants s'ils dépassent les limites osmotiques. Durant la phase de refroidissement, la glace se forme initialement dans le milieu extracellulaire ce qui entraîne la formation d'un gradient osmotique entre le milieu intracellulaire isotonique et la fraction non congelée du milieu extracellulaire où l'on retrouve la majorité du dilueur de congélation.

Cela provoque un mouvement de l'eau hors de la cellule et donc sa déshydratation, afin de maintenir l'équilibre entre les concentrations de solutés intra- et extracellulaires.

En fonction de la vitesse de refroidissement, l'eau intracellulaire traverse la membrane jusque dans le milieu extracellulaire et rejoint la phase solide ou alors elle se transforme en glace directement à l'intérieur de la cellule. La vitesse à laquelle les cellules se refroidissent détermine, à la fois, l'étendue et la durée de la déshydratation. Si la vitesse de refroidissement est trop rapide, la sortie d'eau hors de la cellule n'est pas suffisante et la glace se forme à l'intérieur de la cellule, ce qui peut entraîner des ruptures membranaires à l'origine de la mort de la cellule. En revanche, si la vitesse est trop lente, cela limite la formation de cristaux intracellulaires mais la cellule se déshydrate de façon excessive et peut alors être exposée à des concentrations en solutés à l'origine de changements irréversibles de la structure de la membrane plasmique, une dénaturation des protéines et une désorganisation des structures internes de l'axonème.

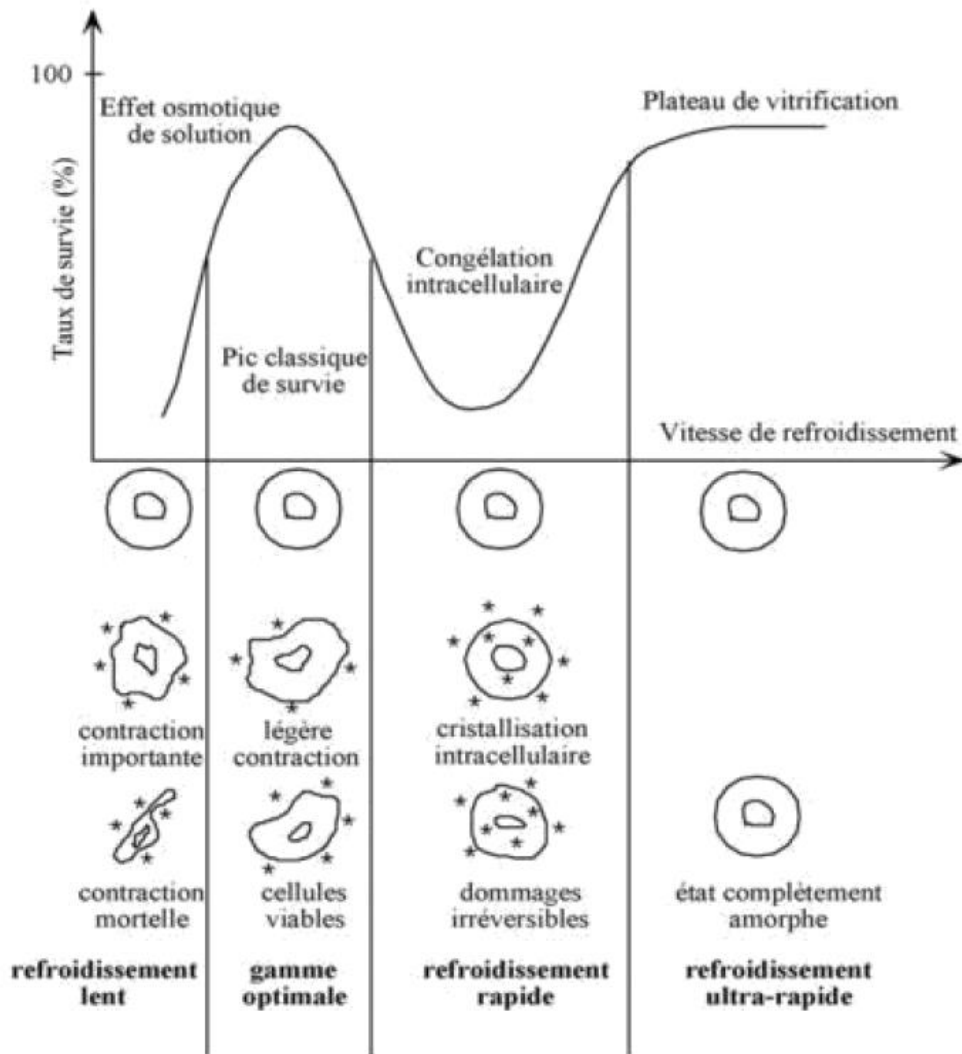


Figure 5 : les taux de suivre cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (courbière et al, 2009).

Ainsi, la vitesse de congélation doit être initialement lente afin de permettre à l'eau de quitter la cellule par osmose et ainsi prévenir la formation de glace intracellulaire, puis rapide pour éviter une déshydratation cellulaire trop importante. Le cryoprotecteur présent dans le dilueur offre une protection aux cellules par rapport à la formation de glace en augmentant la fraction d'eau non gelée (Thirumala et al, 2003; Eilts, 2005; Rota et al, 2006; Oldenhof et al, 2013).

Pendant la **décongélation**, le processus inverse se produit, et les spermatozoïdes sont exposés à des conditions hypotoniques. Le gonflement des spermatozoïdes suite à l'absorption de l'eau provoquée par le stress hypotonique est plus préjudiciable que la déshydratation engendrée

lors du stress hypertonique, surtout après la cryoconservation en raison de la quantité accrue en espèces réactives de l'oxygène fragilisant les membranes.

Ainsi, pour décongeler la semence, une vitesse rapide est préférable de façon à prévenir la recristallisation de l'eau intracellulaire présente dans le spermatozoïde.

Les spermatozoïdes décongelés à des vitesses rapides sont exposés moins longtemps aux solutés concentrés ainsi qu'aux cryoprotecteurs et la restauration de l'équilibre intra- et extracellulaire est plus rapide que lors d'une décongélation lente (**Barbas et Mascarenhas, 2009; Oldenhof et al, 2013**).

La capacité des spermatozoïdes à survivre à une exposition à de basses températures dépend en grande partie de la perméabilité hydraulique de la membrane et de la capacité à faire face aux changements de phases de la membrane induits par la température ainsi qu'aux réorganisations des microdomaines. Alors que les spermatozoïdes sont sensibles aux dommages du choc dû au froid. Par conséquent, l'intérêt premier des protocoles de congélation-décongélation de la semence est d'assurer un bon « réveil » des spermatozoïdes en prévenant la formation de glace et en réduisant les dommages cellulaires pouvant survenir avant, pendant et après le processus de congélation-décongélation (**Briand-Amirat et al, 2006; Loomis et Graham, 2008; Oldenhof et al, 2013**).

III. Technologie de la conservation de la semence équine

1. La cryoconservation de la semence équine

La cryoconservation correspond à l'utilisation de faibles températures pour préserver la structure intacte de cellules et de tissus vivants. Elle est utilisée dans la conservation des semences que ce soit dans l'espèce humaine ou dans les espèces animales. Une congélation sans protection peut s'avérer mortelle pour les cellules et cette seconde partie vise à analyser les procédés utilisés lors de la congélation afin de protéger au mieux les spermatozoïdes et montrer comment leur refroidissement permet leur conservation dans des conditions stables et la préservation de la vie.

1.1 Définition

La cryoconservation est la conservation à une température inférieure à -80°C d'une suspension de cellules après leurs préparations. Cette conservation peut-être dure plusieurs années et son utilisation après réchauffement à une température de 37°C .

1.2 Objectifs de la cryoconservation de la semence

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'année. Elle permet donc de conserver le matériel génétique des espèces menacées.

1.3 Avantages et inconvénients de la cryoconservation

La congélation de la semence permet la conservation *ex situ* de la diversité génétique des espèces de mammifères ainsi que le désaisonnement de la reproduction favorisant la gestion de la production et des géniteurs.

La congélation permet également de transporter la semence sur de longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle, ce qui est particulièrement stressant pour l'animal et donc néfaste au bon déroulement de l'accouplement et de la fécondation. De plus, la législation de nombreux pays est de plus en plus contraignante pour l'introduction d'animaux sur leur territoire, avec parfois des quarantaines de plusieurs jours ce qui rend impossible un accouplement au moment le plus propice du cycle de la femelle. La congélation et le transport de la semence permettent alors de s'affranchir de ces problèmes. Le transport de la semence congelée permet également une dispersion incomparable de caractères génétiques intéressants (Labbé et al. 2002).

1.4 Dilution du sperme

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 à deux phénomènes d'importance égale :

- La compétition entre spermatozoïdes pour les éléments nutritifs ou une accumulation de métabolites nocifs lorsque la concentration en gamètes est trop élevée.
- Les effets délétères du plasma séminal.

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Un nombre de spermatozoïdes d'au moins 200 millions par dose d'insémination artificielle doit être obtenue, avec un volume maximum de 1/3 de sperme pur pour 2/3 de dilueur (Isabelle Barrier-Battut, 2013).

1.4.1. Les principaux diluants employés dans l'espèce équine

Un dilueur est nécessaire pour assurer une protection aux spermatozoïdes, entre autres par un effet de volume. Il existe un grand nombre de dilueurs, à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes.

1.4.1.1. Composition

En règle générale, les dilueurs contiennent des agents cryoprotecteurs pénétrants ou non pénétrants dont le rôle est d'augmenter la survie des spermatozoïdes. On retrouve également d'autres composés dans les dilueurs comme par exemple des antibiotiques, des substances nutritives telles que des sucres, des sels ou encore des détergents (**Barbas et Mascarenhas, 2009; Ponthier et al, 2014**).

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique à la semence afin d'éviter les chocs osmotiques, avoir un pH compatible à la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée (c'est-à-dire **300 mOsm/L avec un pH de 7,4 à 7,6**), pour la plupart des dilueurs, l'osmolarité se situe entre **280 et 450 mOsm/L avec un pH de 6,6 à 7,0** (**Katila, 1997**). Il doit aussi avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, un pouvoir antioxydant et antibactérien. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser (**Barbas et Mascarenhas, 2009; Hanzen, 2014**).

Les fractions les plus protectrices isolées partir du lait, telle que, le **phosphocaséinate natif (PPCN)** et la **β -lactoglobuline** se sont révélés être les plus performants pour la conservation de la semence équine réfrigérée (**Batellier et al, 1998; Batellier et al, 2001**), d'où la création de l'**INRA96**. Dont la formulation de ce dilueur a été établie non seulement sur la base des résultats de mobilité, mais aussi sur ceux de fertilité de la semence conservée.

1.4.1.2. Les diluants de réfrigération

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont (**tab.1**) :

Le lait **UHT**, le Kenney aussi appelé **EZ-Mixin (CST Colorado)** ou **Non-Fat Dried Milk Solids Glucose (NFDMSG)** ou encore **Skim Milk Glucose extender (SKMG)**, le **KMT**, surtout utilisé pour remettre en suspension le sperme centrifugé car une interaction néfaste avec le plasma séminal a été mise en évidence (**Rigby et al, 2001**), l'**INRA96**.

Tableau 1 : composition de kenney et de l'INRA96 (pour 1l) (Marc Stéphanie, 2015).

| Dilueur | Composition |
|---------------------------------|---|
| Le Kenney | Glucose (49g), Lait en poudre (24g), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Streptomycine (1,5g), Pénicilline (1,5 millions UI) |
| L'INRA96 (IMV, L'Aigle, France) | CaCl (20,14g), KCl (0,4g), KH ₂ PO (40,06g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,2g). NaCl (1,25g), Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0,118g), NaHCO ₃ (0,35g), HEPES (4,76g), Glucose (13,21g), Lactose (45,39g), Pénicilline (50 000 UI), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Gentamycine (50 mg) Puis, Phosphocaséinate (27g/l) |

4.3.1.4 1.4.1.3. Les diluants de congélation

Des analyses *in-vitro* ont porté sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après décongélation, et sur l'intégrité de leur membrane plasmique. Les résultats du test d'intégrité membranaire étaient en faveur du milieu INRA 96 ®, tandis que ceux de mobilité des spermatozoïdes étaient en faveur du milieu INRA 82 ®. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Les paramètres de mobilité ne reflètent par la fertilité potentielle de la semence : aucune hypothèse n'est pour le moment avancée pour expliquer cela. Les essais de fertilité ont porté sur 84 cycles. Les taux de fertilité par cycle obtenus étaient de 71% avec le milieu INRA 96 ® et de seulement 40% avec le milieu INRA 82 ®.

Le milieu INRA 96 ®, développé en 1997, est donc un milieu de composition chimiquement défini qui permet de maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tant lors du processus de réfrigération que lors de celui de congélation de la semence équine.

2. Les différentes étapes de la cryoconservation

De sa récolte jusqu'à son stockage au froid, la semence passe par de nombreuses étapes constituant le processus de cryoconservation et dont il existe de nombreuses variantes en fonction des centres de reproduction. Ces différentes étapes seront décrites dans cette partie.

2.1. Récolte et évaluation de la semence

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence, rappelons que la technique la plus utilisée dans l'espèce équine est celle du vagin artificiel. Immédiatement après la récolte, l'éjaculat est filtré sur gaze, et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.1.1. Dilution préliminaire

La semence est diluée avec un premier dilueur D1 préalablement placé au bain-marie à + 35°C. D1 est également appelé le dilueur de centrifugation. Selon les protocoles, il peut être composé du milieu INRA 82 ® additionné de 2% de jaune d'oeuf, ou de lait écrémé UHT additionné d'antibiotiques, ou encore actuellement de l'INRA 96 ®.

Pour un éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de 1/4 de sperme pour 3/4 de dilueur, sans jamais dépasser les 2,5 milliards de spermatozoïdes par tube.

- **La première descente en température (de + 37°C à + 22°C)**

La préparation est placée au bain-marie à + 22°C durant 10 minutes.

2.2. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation et L'élimination du plasma séminal

En plus des spermatozoïdes normaux et viables, la semence peut contenir des spermatozoïdes morts ou anormaux, des contaminants (urine, bactéries, virus) et d'autres cellules (érythrocytes, cellules épithéliales, cellules germinales immatures) qui ont un effet toxique sur les spermatozoïdes vivants et réduisent par conséquent la fertilité d'un éjaculat. De plus, chez le cheval, le sperme est relativement peu concentré, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces comme le bovin (**Baracaldo, 2007**). C'est pourquoi des techniques de séparation du sperme sont utilisées.

La technique de séparation utilisée en routine est la centrifugation. Par ailleurs, elle permette d'augmenter la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, en enlevant le plasma séminal entièrement (**Vidament et al, 2000 ; 2001**), car il ne semble pas bénéfique pour la congélation du sperme équin (**Moore et al, 2005**), soit en gardant une petite fraction de celui-ci, de l'ordre de 5 % du volume final après centrifugation (**Salazar et al, 2008; Ponthier et al, 2013**), pour la congélation.

L'option retenue en France est la centrifugation de l'éjaculat à température ambiante, pour éliminer totalement le plasma séminal. La semence est centrifugée pendant 10 minutes à 600

x g, puis le surnageant (composé de dilueur D1 et de plasma séminal) est enlevé par aspiration.

Lors de la centrifugation, une perte importante en spermatozoïdes est déplorée : 20 à 50% des spermatozoïdes peuvent ainsi être éliminés dans le surnageant. De récents dispositifs que nous développerons plus loin permettent d'améliorer les résultats de cette étape.

2.1.2. Dilution secondaire (incorporation du cryoprotecteur)

Cette seconde dilution permet d'apporter le cryoprotecteur (le glycérol), et d'obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes par ml.

Le diluant de congélation D2 aura été préalablement réchauffé au bain-marie à + 22°C.

Il est ajouté en deux fois successives au culot de spermatozoïdes en suspension, séparées par une étape de mesure de la concentration du sperme à la cellule hématimétrique de façon à adapter précisément le volume de D2 ajouté.

3. L'équilibration

L'étape d'équilibration correspond à une réfrigération préalable de la semence à +4°C avant la congélation proprement dite. Elle fait suite à l'étape de centrifugation et est réalisée directement après l'ajout du glycérol. Certains auteurs rapportent que cette étape permettrait aux cryoprotecteurs, notamment le glycérol, de pénétrer dans la cellule. Cependant, lors d'une dilution en deux étapes, il est rapporté que le glycérol est ajouté après l'étape d'équilibration.

3.1. Durée de l'équilibration

Est le temps nécessaire de maintien de la semence à 4°C avant la congélation

3.2. Intérêt de l'étape d'équilibration

Il a été démontré qu'après une centrifugation à 25°C, le refroidissement à 4°C pendant **12** heures avant la congélation pouvait être bénéfique pour la mobilité après décongélation. Une phase plus longue d'équilibration de la température à 4°C semble donc permettre une meilleure survie des spermatozoïdes à la congélation (**Ponthier et al, 2014**).

Olaciregui 2014, a également étudié l'intérêt d'une étape d'équilibration, mais cette fois sur de la semence équine issue de l'épididyme. Il a comparé l'effet d'une exposition immédiate aux conditions de congélation après conditionnement et une exposition aux conditions de congélation précédée d'une étape de stabilisation à 4°C pendant 2 heures. Les résultats de cette étude montrent que la qualité de la semence est améliorée lorsqu'une étape de

stabilisation pré-congélation est réalisée, d'où encore une fois, l'intérêt d'une étape d'équilibration (Olaciregui et al, 2014).

4. Le conditionnement

La semence est conditionnée juste avant d'être congelée, dans le but de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable (Marc Stéphanie, 2015).

Le matériel nécessaire à la mise en paillette est placé à + 4°C, et l'enceinte de congélation est préparée, ainsi que le jonc d'identification.

Les paillettes de 0,5 mL préalablement identifiées sont remplies soit manuellement soit à l'aide d'une machine à remplir et à souder les paillettes, puis placées sur la rampe de congélation.

La paillette la plus fréquemment utilisée est la paillette Cassou, dont une extrémité est obstruée par deux tampons de coton entre lesquels se trouve de la poudre d'alcool polyvinylique (l'ensemble devient étanche au contact d'un liquide), et l'autre extrémité est fermée soit par soudure, soit en la trempant dans de la poudre d'alcool polyvinylique.

L'opérateur veillera à ne pas attraper les paillettes à mains nues en leur milieu, pour éviter d'éventuelles variations de températures.

4.1. Congélation des paillettes (de + 4°C à -196°C)

Après l'étape d'équilibration, les paillettes peuvent être refroidies dans un congélateur programmable qui permet d'atteindre -140°C, avec une pente variable, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute. Et elles sont ensuite immergées dans l'azote liquide à -196°C (Ponthier et al, 2014). Comme elles peuvent être congelées dans une boîte de polystyrène contenant de l'azote liquide : Les paillettes chargées sont placées dans une grille pré-refroidie (à 5°C) de telle sorte qu'elles se trouvent de 3 à 6 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 10 minutes d'équilibrage, ou jusqu'à ce que la température atteigne -- -120°C, elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide, placées dans des gobelets qui sont déjà fixés sur des cannes et finalement stockées dans un réservoir d'azote liquide à -196°C pendant des mois, voire des années (Dascanio, 2014).

Le choix de la vitesse de congélation est essentiel car il détermine la façon dont le spermatozoïde parviendra à rester en équilibre avec le milieu extracellulaire. La vitesse de congélation optimale est une vitesse initialement lente afin de permettre une déshydratation suffisante de la cellule pour prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaires, puis rapide pour éviter une déshydratation trop importante de la cellule (Marc Stéphanie, 2015).

5. La décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent dont les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie

Dans la plupart des cas les paillettes de **0,5 ml** sont décongelées à **37°C** pendant **30 secondes**, alors que certains chercheurs ont suggéré que la décongélation de ces paillettes à **75°C** pendant **7 secondes** pouvait générer une mobilité accrue des spermatozoïdes après décongélation tandis que pour d'autres chercheurs une température de **46°C** pendant **20 minutes**, peut-être recommandée (Steven et al, 2011).

6. Evaluation de la semence équine

Afin d'estimer la fertilité du mâle, il faut évaluer la qualité de la semence.

L'évaluation de la semence fraîche renseigne sur le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée-réanimée renseigne sur les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation.

Il existe deux niveaux d'évaluation de la qualité spermatique à savoir les examens de première intention et les examens de seconde intention. Les premiers sont des tests de routine ne nécessitant que peu de matériel et qui sont réalisables par le vétérinaire inséminateur dans son exercice en clientèle. Les seconds sont des tests plus approfondis et plus appliqués dans l'étude du sperme, et qui sont réservés aux centres spécialisés.

6.1. Les examens de première intention

Ils sont communément appelés le spermogramme et le spermocytogramme. Ils sont couramment effectués avant chaque insémination artificielle et avant toute congélation ou réfrigération de la semence.

4.3.1.5 6.1.1. Le spermogramme

Le spermogramme est une étude stricte du sperme qui revêt le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité. Dans la section suivante il ne sera fait mention que des éléments les plus importants à savoir la mobilité et la numération.

6.1.2. L'examen microscopique de la mobilité

C'est un examen réalisé sur une platine chauffante (37°C) pour éviter le ralentissement des spermatozoïdes causé par leur refroidissement. Cette analyse doit être effectuée rapidement

après le prélèvement. Il existe deux niveaux d'observation microscopique de la mobilité spermatique, à savoir la mobilité massale et la mobilité individuelle.

L'examen de la mobilité massale est l'observation des mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes sur une goutte de sperme mise sur une lame au grossissement, la notation se fait sur une grille de 0 à 5.

L'examen de la mobilité individuelle est l'observation d'une goutte de sperme placée entre lame et lamelle au fort grossissement 40 afin d'apprécier la mobilité progressive.

Le but de ce test est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, ainsi que la proportion de spermatozoïdes fléchants c'est-à-dire qui traversent le champ rapidement en ligne droite. Une semence de bonne qualité comporte 70% de spermatozoïdes fléchants.

L'analyse de la mobilité spermatique par microscopie optique demeure un examen subjectif, même si l'erreur est réduite en confiant toujours la lecture au même opérateur expérimenté.

6.1.3. Evaluation de la concentration

6.1.3.1. La numération

La numération est la détermination du nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. Le sperme est dilué dans un liquide hypertonique comme le chlorure de sodium à 3% pour immobiliser les spermatozoïdes, cette dilution est réalisée dans un tube capillaire gradué (mélangeur de Potain). La dilution est faite par apport à la concentration observée lors de l'examen microscopique, elle est soit 1/100ème ou 1/200ème.

Les spermatozoïdes sont dénombrés grâce à cellule hématimétrique dite de Thoma ou de Mallassez. Une goutte est déposée entre lame et lamelle et l'observation au grossissement 40 et les spermatozoïdes sont dénombrés dans les quatre carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. La concentration est donnée par la formule suivante :

$$\text{Equation1: } N=n \times V \times (1/d) \times 50000$$

$$\text{Equation2: } N= (\text{moyR1-5}) \times V \times 100 \times 250 \times 1000 \quad (N: \text{nombre spz /éjaculat} - n : \text{somme R1-5 } V : \text{volume de fraction spermatique (ml) } d : \text{dilution})$$

a) 6.1.3.2. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

. Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, (Allimant 2010).



Figure 6: photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).

4.3.1.6 6.1.3.3. Le spermocytogramme

Il s'agit de l'appréciation de la morphologie des spermatozoïdes. La lecture s'effectue sur un frottis coloré. Plusieurs anomalies sont rencontrées et classées en anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire (persistance gouttelette cytoplasmique) et du flagelle. La lecture de cent spermatozoïdes est effectuée au grossissement 40 pour obtenir le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux dans la semence.

Un sperme équin est fécondant lors d'un spermocytogramme n'excédant pas 20 à 30 % d'anomalies. L'application de ce seuil est importante lorsque la semence est destinée à la congélation et doit garder un pouvoir fécondant après décongélation.

6.2. Les examens de seconde intention

4.3.1.7 6.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis)

Le système CASA est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement. Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace.

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux :

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (**MOT** : Total Spermatozoal Motility)

- le pourcentage de mobilité progressive (**PMOT** : Progressive Spermatozoal Mobility)
- le pourcentage de spermatozoïdes fléchant (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie)
- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (**ALH**: Amplitude of Lateral Head Displacement)
- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (**VSL** : Straight-Line Velocity)
- la vitesse curviligne (**VCL** : Curvilinear Velocity), c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue.
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (**BCF** : Beat Cross Frequency).
- la moyenne des déplacements angulaires (**MAD** : Mean Angular Displacement).

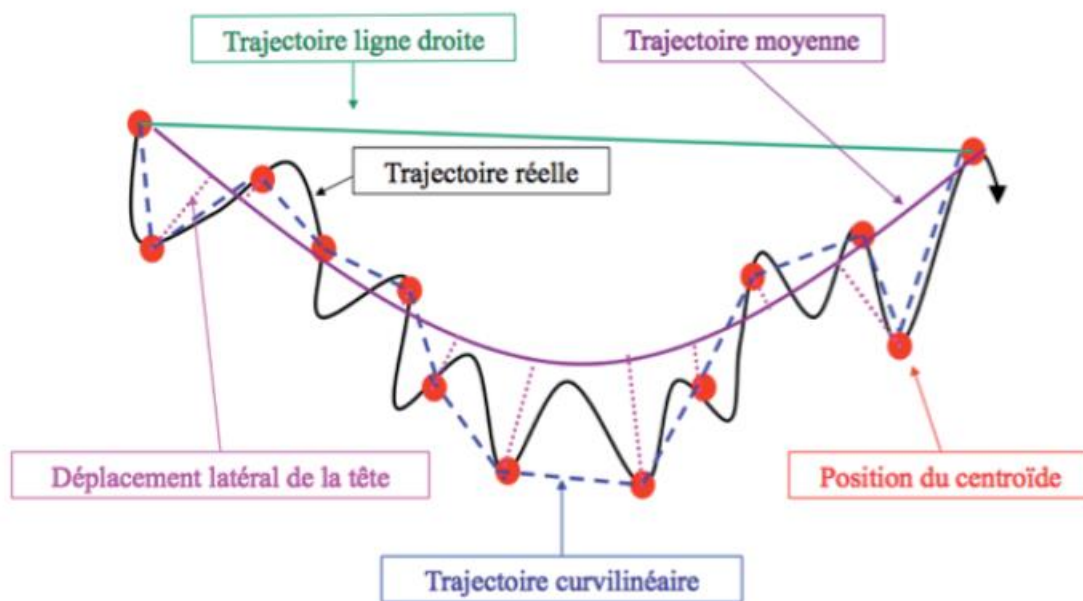


Figure 7 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde, (ponthier et al, 2014).

4.3.1.8 6.2.2. La cytométrie en flux (CMF)

L'application de la cytométrie en flux minimise, en partie, plusieurs difficultés d'analyse rencontrées. La cytométrie en flux est une approche automatisée capable de mesurer la quantité d'un ou de plusieurs marqueurs fluorescents associés avec la cellule de manière non biaisée. Cet appareil offre des propriétés incomparables de précision, de sensibilité, de rapidité et permet l'analyse multiparamétrique sur un nombre de cellules statistiquement approprié (Cordelli et al, 2005). De plus, la découverte d'une variété de fluorochromes et de

composants conjugués à une sonde fluorescente rend possible une grande gamme d'analyses pour l'évaluation de la semence à des niveaux biochimiques, ultra structuraux et fonctionnels (Gillan et al, 2005).

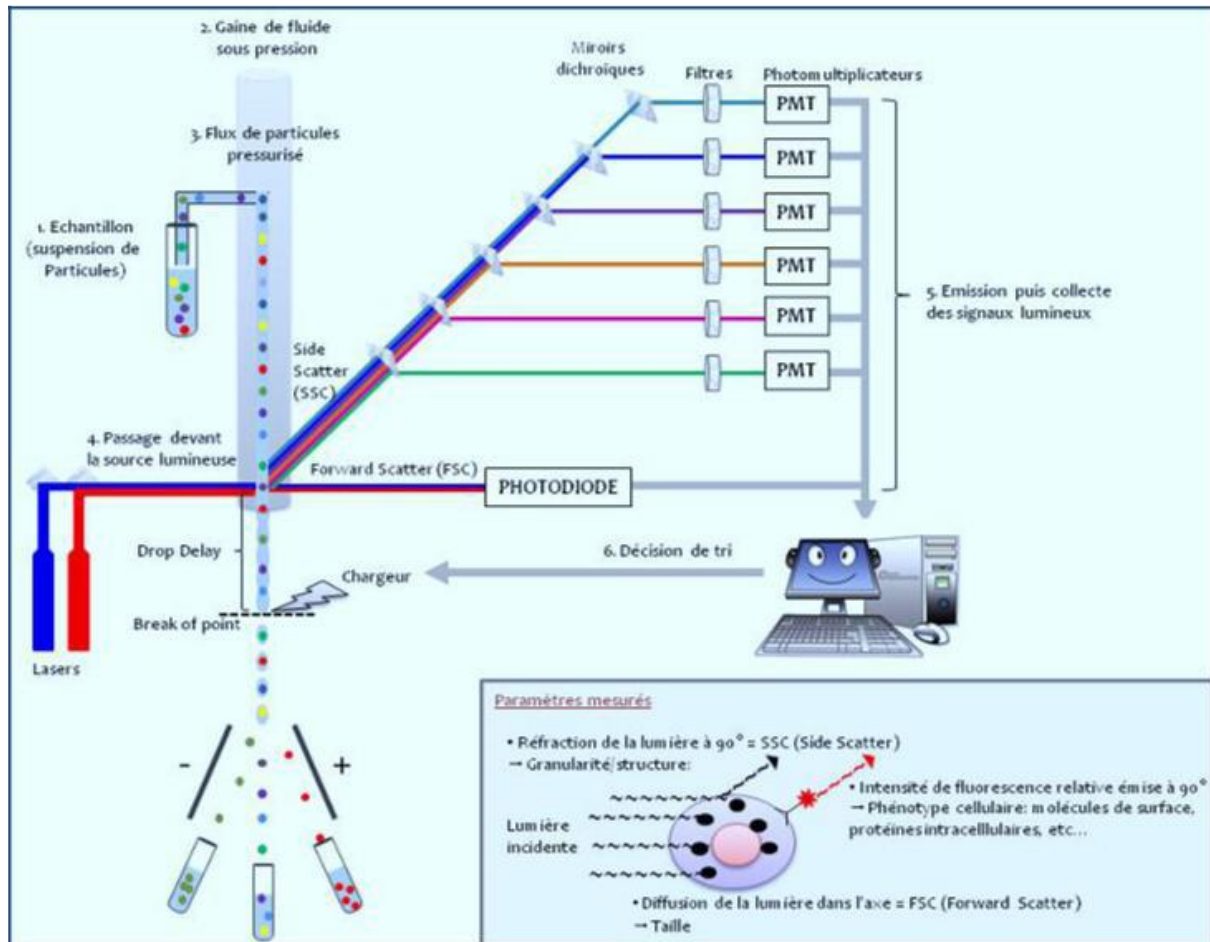


Figure 8 : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux (Tourrel-Cuzin, 2012).

4.3.1.9 Le système optique (Capture des signaux lumineux)

Le système optique intervient lors du passage des cellules au niveau de la source lumineuse. Ces dernières émettent en réponse à cette excitation différents signaux lumineux qui sont collectés et dirigés vers les photo-détecteurs à l'aide d'un banc optique.

Les signaux lumineux détectés sont de différentes natures (Gilman-Sachs, 1994; Ronotet al., 2006; Shapiro, 2005):

- **FSC (Forward Scatter)** : lumière diffractée aux petits angles, elle renseigne sur la taille des particules et sur la surface cellulaire.
- **SSC (Side Scatter)** : la lumière réfléchiée et réfractée aux grands angles, elle renseigne sur la granularité et la complexité cellulaire.

La fluorescence émise à 90°C dépend du phénotype cellulaire :

- Fluorescence émise par la cellule elle-même : auto fluorescence.
- Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome avec liaison spécifique à la cellule.

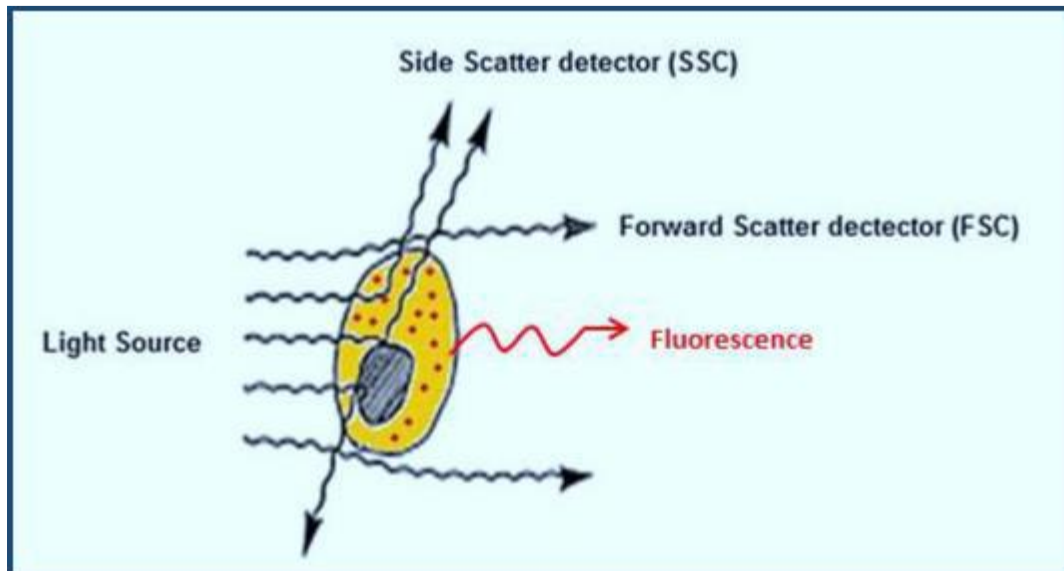


Figure 9 : Interaction de la lumière avec la cellule (Aberdeen, 2010).

4.3.1.10 Application de la cytométrie en flux en reproduction équine

Le Cytomètre en flux va permettre d'évaluer la concentration de la semence, l'intégrité des différents organites du spermatozoïde et donc sa fonctionnalité, dont notamment : la membrane plasmique, l'acrosome, la mitochondrie, le noyau ainsi que le stress oxydatif, sachant que la fertilité de la semence est conditionnée par l'intégrité de ses organites.

Dans cette revue de la littérature, nous nous intéresserons uniquement à quelques paramètres qui sont d'intérêt dans notre mémoire en l'occurrence, l'intégrité de la membranaire plasmique, de l'acrosomique.

- **Intégrité de la membrane plasmique (Test de viabilité)**

Ce paramètre est également mesurable par le cytomètre en flux à l'aide de plusieurs colorants tel que l'iodure de propidium et le fluorochrome SYBR 14.

Le cytomètre en flux distingue comme le microscope optique, 2 sous-populations de spermatozoïdes :

- o Les spermatozoïdes verts : membrane plasmique intègre, spermatozoïde vivant.

o Les spermatozoïdes rouges : membrane plasmique lésée, spermatozoïde mort.

De plus, nous savons depuis 1995 qu'une 3ème sous-population de spermatozoïdes dits « Moribonds », sont également visibles à la microscopie à fluorescence. (**Garner et Johnson, 1995**). Avec la cytométrie en flux, les spermatozoïdes colorés à la fois de rouge et de vert sont inclus dans les spermatozoïdes morts.

- **Capacitation et statut acrosomique (Le test PNA/FITC/IP)**

L'évaluation du statut acrosomique se réalise via les mêmes fluorochromes que ceux utilisés par la microscopie à fluorescence. Nous allons rappeler brièvement ces tests et expliquer les quelques différences observées avec la microscopie à fluorescence.

La lectine PNA liée à la fluorescéine FITC est un marqueur du statut acrosomial. Ensembles, elles se fixent à la membrane externe de l'acrosome. Dans le cas de la microscopie à fluorescence, les spermatozoïdes sont fixés et perméabilisés avec de l'éthanol. Le couple PNA-FITC rentre alors dans les gamètes et colore en vert la cellule lorsque l'acrosome est intact. Dans le cas de la cytométrie en flux, aucune fixation n'est nécessaire et la membrane plasmique du spermatozoïde reste imperméable au couple PNA/FITC. Ainsi, s'ils colorent le spermatozoïde en vert c'est que la réaction acrosomique a eu lieu, car des fragments de la membrane acrosomiale leur seront accessibles (**Peña et al, 1999**).

On les associe la plupart du temps avec un fluorochrome évaluant l'intégrité membranaire comme l'iodure de propidium, permettant ainsi de différencier les spermatozoïdes vivants (IP négatif), des spermatozoïdes morts (IP positif).

Cependant, l'association de ces fluorochromes ne marque pas toujours tous les spermatozoïdes, par exemple ceux ayant une membrane plasmique et un acrosome intact seront incolores. Le cytomètre en flux va alors les considérer comme des particules non spermatisées et les exclure des résultats statistiques.

Pour pallier à ce défaut, un fluorochrome spécifique des cellules a été ajouté dans de nombreuses études. On peut citer par exemple l'utilisation du fluorochrome SYTO, marqueur de l'acide nucléique, perméable à la membrane plasmique, il va fixer l'ADN nucléaire et mitochondrial, ainsi que l'ARN.

Il permet de marquer positivement les cellules possédant une membrane plasmique intacte (SYTO +, IP -) et de les différencier des débris cellulaires (SYTO - et IP -) ou des cellules à la membrane lésée (SYTO -, IP +).

Il existe plusieurs sous-types de fluorochrome SYTO, certains vont émettre une fluorescence verte au contact de l'ADN (SYTO 9 à 25), certains une fluorescence orange (SYTO 80 à 86),

d'autres une fluorescence rouge (SYTO 61 à 64), ou encore une fluorescence bleue (SYTO 40 à 45).

Tableau 2 : les 4 sous-populations distinguables par un test PNA-FITC/IP/SYTO

| Fluorescence | IP | PNA-FITC | SYTO 83 | Interprétation des colorations |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|--|-----------------------------------|
| Réaction | - | - | + | Spz vivant Acrosome intact |
| | + | - | - | Spz mort Acrosome intact |
| | + | + | - | Spz mort Acrosome défectueux |
| | - | + | + | Spz vivant Acrosome défectueux |
| Interprétation de la fluorescence | Incolore Membrane plasmique intègre | Incolore Acrosome intact | Incolore Débris cellulaire | |
| | Rouge Membrane plasmique lésée | Vert Acrosome lésé | Jaune Membrane plasmique intègre | |

Le test à l'ionophore A23 187: évaluation de la réaction acrosomique

En plus du pourcentage de cellules présentant un acrosome intact, leur capacité à effectuer la réaction acrosomique après induction est également considérée comme un paramètre fonctionnel important. L'inducteur de la réaction acrosomique utilisé est l'ionophore Ca²⁺ (A23-187) qui provoque l'influx entrant de calcium dans les cellules. Selon la majorité des études réalisées chez les équidés lors de l'application d'ionophore calcique, l'induction de la réaction acrosomique a lieu en 5 minutes. Cet influx calcique entrant est mesurable par le cytomètre en flux grâce au fluorochrome fluo3-AM. Il dépend des facteurs d'incubation comme la présence ou non du plasma séminal et des conditions en aérobie ou anaérobie. L'induction de la réaction acrosomique grâce à l'ionophore Ca²⁺ est aussi mesurable à la cytométrie en flux grâce aux fluorochromes PNA/FITC/SYTO/IP décrits dans la partie précédente (Magistrini et al, 1997 ; Szasz et al, 2000).

- **Stress oxydatif et radicaux oxygénés libres**

Le processus de cryopréservation peut être à l'origine de la production de radicaux oxygénés libres notamment, responsables de dommages sur la cellule (Fernandez et al, 2001) ; Gadella et al, 2003).

Chapitre I : Données bibliographiques

La présence de radicaux libres au sein du spermatozoïde a été corrélée à une diminution de la mobilité (**Baumber, Etat, 2000**), à une diminution de la capacité de fusion avec l'ovocyte (**Aitken, 1989**) et à de l'infertilité (**Agarwal, Makker et al, 2008**).

De nombreux protocoles existent, tous basés sur le même principe : l'oxydation d'un agent fluorescent par les radicaux libres accumulés dans la cellule.

Les sondes utilisables sont multiples, et on peut citer la sonde H2DCFDA (**Kim, et al 2010 ; Aisen et al 2009 ; Fernandez et al 2010**), la DHE (Dihydroethidium) ou MitoSoxTM Red (**Hardy et al, 2009 ; Iuliis, 2008**) spécifiques des radicaux oxygénés.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériels et méthodes

Notre présente étude a pour objectif d'évaluer l'effet de la variation du temps d'équilibration sur la motilité et l'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes équin congelés

1. Lieux d'échantillonnage et de l'expérimentation

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores de l'Université BLIDA1 (PBRC/U.BLIDA1).

2. Matériel biologique et Animaux

Le liquide spermatique de Cinq (05) chevaux pur-sang arabes, des centres d'élevage équin Haras Hocine el Mansour Mostaganem et de la ferme équestre Sahel Hadjout (**tab.3**).

Tableau 3 : Identification des chevaux (Original).

| Nom | Race | Age | Etat de santé général | Appareil uro-génital | Fertilité |
|-------------------|----------------|------|-----------------------|----------------------|-----------|
| MAROUAN DE MOMLOT | Pur-sang Arabe | 9ans | Bon | RAS | Connue |
| OMBIORIX | Pur-sang Arabe | 6ans | Bon | RAS | Connue |
| AURHEIN | Pur-sang Arabe | 8ans | Bon | RAS | Connue |
| DZIRI D'HEM | Pur-sang Arabe | 4ans | Bon | RAS | Connue |
| QUOTB | Pur-sang Arabe | 9ans | Bon | RAS | Connue |

2.1 Récolte de la semence

Avant la récolte du sperme, le matériel de récolte doit être préparé, le vagin artificiel, est lubrifié, et chauffé avec de l'eau. Une fiole dans son extrémité est fixée pour récolte de la semence, le manchon protecteur pour vagin doit être présent, et un mannequin(en forme du corps d'une jument) sur tapis en caoutchouc anti dérapant est préparé. L'étalon doit être préparé en l'entraînant pendant une durée de temps à un exercice physique dans le but de le réchauffé.

Dans une salle de monte, l'étalon est stimulé par une jument en chaleur, On se servant d'un mannequin. La verge, est insérée dans le vagin artificiel, puis sperme est recueilli dans une fiole. Cela dure quelques secondes (**fig.10**).



Figure 10: Positionnement de l'étalon pour la récolte du sperme dans le vagin artificiel (Original).

2.2 Filtration de l'éjaculat

Immédiatement après le prélèvement, la semence est transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou au choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude).

La semence est filtrée dans un récipient gradué sur un papier filtre ou une double gaze stérile pour en retirer les impuretés et le « gel » qui contiens le liquide séminal hautement toxique pour les SPZ en cryoconservation (Jasko., 1991).

L'ensemble est préalablement chauffé à l'étuve réglée 'à 37 °C pour éviter tout éventuel choc thermique. Le volume de l'éjaculat filtré est ensuite évalué puis aliquoté dans quatre(04) tube de 50 ml préalablement placées dans une étuve à 37°C.



Figure 11: Filtration de l'éjaculat (Original).

3. Évaluation initiale de la semence

3.1 Examen macroscopique

3.1.1 Evaluation du volume

Le volume en ml est évalué par lecture directe sur les graduations du tube de collecte. La mesure du volume est nécessaire pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat.

3.1.2 Evaluation de l'aspect et la couleur

La couleur et l'aspect des éjaculats sont évalués à l'œil nu afin de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus.

3.2 Examen microscopique

3.2.1 Détermination de la concentration en spermatozoïdes

La concentration en spermatozoïdes par **ml** de sperme était déterminée en utilisant un photomètre Minitube (**SDM1**) calibré sur la semence équine. Où un échantillon de sperme bien mélangé est chargé au niveau de l'extrémité de la microcuvette en utilisant une pipete jetable, la surface externe de la cuvette est bien nettoyée pour éliminer tout excès du sperme et la microcuvette est insérée par la suite au niveau de l'appareil, une fois le tiroir est fermé la lecture et le calcul de la concentration sont activés.

3.2.2 Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes

3.2.2.1 La mobilité massale

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement (x10) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 05).

3.2.2.2 La mobilité individuelle

Dans un second temps, le sperme est examiné au fort grossissement (x400) afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable.

Tableau 4 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).

| Note | Interprétation |
|------|--|
| 0 | Pas de mouvements |
| 1 | Spermatozoïdes en mouvements mais pas de mouvements d'ensemble |
| 2 | Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires |
| 3 | Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes |
| 4 | Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement |
| 5 | Mouvements d'ensemble intensifiés |

Dans la motilité eux aspects sont distingués

- **La mobilité simple** tous les spermatozoïdes sont considérés plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre champs microscopiques à fort grossissement (X 400). Celle-ci s'exprime en pourcentage (note de 0 à 100%) et reflète partiellement la qualité du sperme (sperme de bonne qualité : plus de 70% de spermatozoïdes mobiles).
- **La mobilité progressive** : elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchant (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite). Sur une Échelle de 1 à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement (Tab.5) (Fontbonne et al. 1992; Olivier Salson 2008).

Tableau 5 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (Fontbonne, 1992).

| Note | Interprétation |
|------|---|
| 0 | Pas de mouvement |
| 1 | Mouvements oscillants légers sans progression |
| 2 | Mouvements oscillants et progression faible et intermittente |
| 3 | Mouvements oscillants fléchant et progression lente régulière |
| 4 | Mouvements fléchant et progression régulière vers l'avant |
| 5 | Mouvements fléchant avec progression rapide vers l'avant |

4. Dilution de la semence

La semence est diluée dans l'inra96. Pour éviter des problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 200 ml après ouverture, l'inra96 est reconditionné à des fractions de 5, 10, 20 ou 40 ml puis congelé à -18°C pendant au moins 24 heures pour une bonne standardisation. Chaque jour de récolte, 10 ml d'inra96 par dose à préparer étaient décongelés à température ambiante puis mis à 37°C dans un bain-marie.

Le dilueur est rajouté à la semence pour une dilution de 1 :3 c'est à dire rajouter 3 volume pour 1 volume de sperme.

5. Transport de la semence

5.1 Conditionnement du sperme à une température à 22°C

Les tubes contenant le sperme dilué dans un bain marie réglé à 22 °C pendant 10 min.

5.2 Conditionnement du sperme à une température de 22°C à 4°C

Les tubes de la semence diluée sont mis dans des récipients en plastic remplis d'eau à 22°C. Ces récipients sont placés par la suite dans un réfrigérateur réglé à 4°C pendant 30min. Ainsi, le refroidissement de la semence se fait graduellement par transmission à travers l'eau du récipient évitant le choc thermique des spermatozoïdes.

Une fois à 4°C les fractions sont conditionnées dans des « Equitainer » isotherme de transport à 4°C et sont transportées au laboratoire. Le temps de transport est estimé de 4 heures en moyenne.

6. Centrifugation de la semence

Dans le but de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes et de les concentrer, mettre 2 ml de coussin de centrifugation (Maxi-freeze) au fond de chaque tube de 50 ml De centrifugation. Le coussin va jouer un rôle d'amortisseur mécanique pour éviter d'endommager les cellules spermatiques pendant la centrifugation à grande vitesse et de longue durée.

7. Dilution secondaire

Le culot riche en spermatozoïdes obtenu centrifugation, est dilué avec le milieu de congélation. Le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé. La concentration chez le cheval ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total (Vidament et al, 2005).Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et donne de très bons résultats de fertilité observée (Pillet et al, 2008 ; 2011). Le volume du deuxième

Calcule du volume du 2eme dilueur à rajouter pour atteindre $100 \cdot 10^6$ spz/ml par tube

Selon l'équation:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

C₁ : concentration initiale

V₁ : volume initiale

C₂ : concentration final

V₂ : volume final

Le volume calculé à ajouté INRA FREEZE®

$$= V_2 - V_1$$

8. Equilibration

Les tubes de semence diluée sont bouchés puis placés à + 4°C pendant 2h, 24h, 48h, 72h, dans une vitrine de réfrigérée à 4° C.

9. Conditionnement dans les paillettes

Après équilibrage, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes minitube qui peuvent renfermer un volume de **0,5 ml** et souder avec une machine à remplir (MRS I dual V2) après étiquetage par une imprimante (Domino a420i).



Figure 12 : Machine de remplissage et de sertissage de semence (Original).

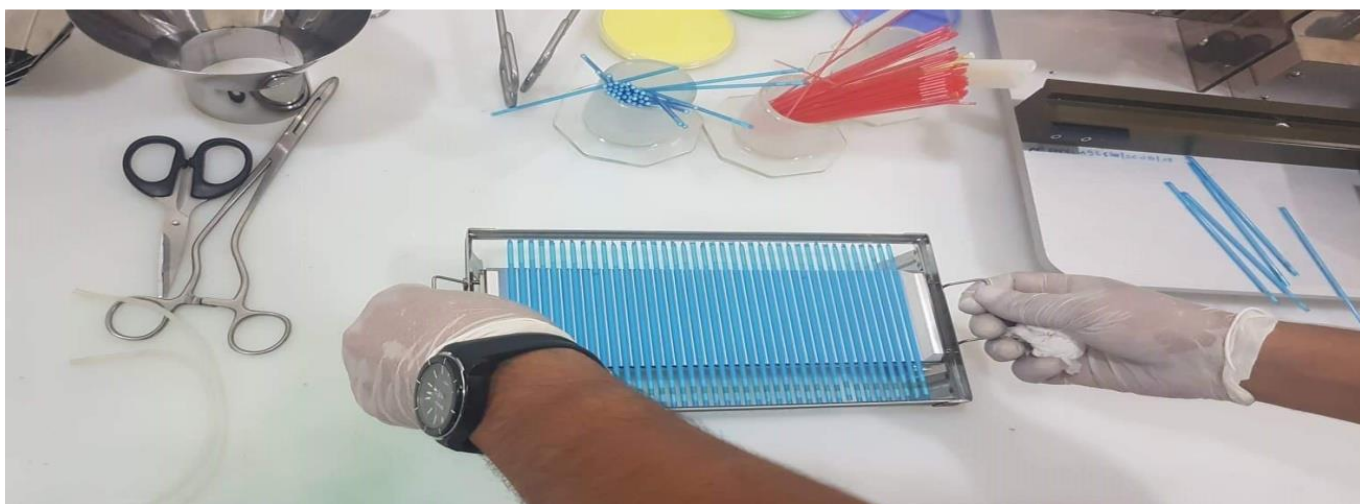


Figure 13: Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation (Original).

10. Congélation des paillettes

Les paillettes sont placées horizontalement sur le rack portoir et refroidies dans un congélateur électronique qui envoie des vapeurs d'azote pour atteindre -140°C , avec une pente variant, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute (Alvarenga et al, 2005 ; Pilet et al, 2008). La courbe de congélation est présentée en fig.14.

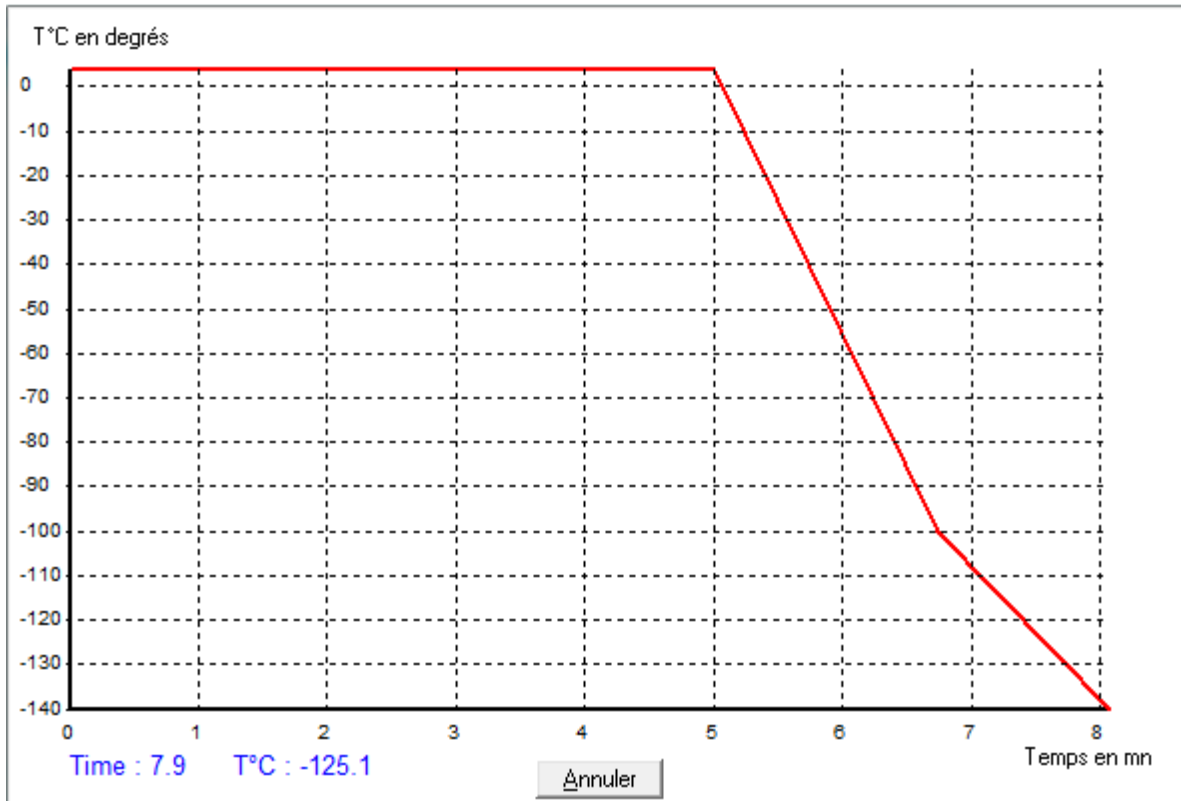


Figure 14: courbe de congélation (Original).

Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide à -196°C .

Les paillettes flottantes sont éliminées car ils sont le signe d'un mauvais remplissage.



Figure 15 : Immersion des paillettes dans l'azote liquide (Original).

11. Stockage des paillettes

Le stockage des paillettes se fait dans des cuves d'azote liquide.

Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C .

12. La décongélation

Après 72h de stockage, les paillets sont plongées dans un Bain marie à 37°C pendant 30 secondes pour décongélation du speme.

13. Techniques d'évaluation de la semence

La semence est évaluée à plusieurs au moyen d'une technique d'analyse :

13.1 Analyse de la mobilité spermatique par système (CASA)

Un examen de motilité par système casa Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM, EVOS II) et une chambre d'analyse d'une profondeur de $20\ \mu\text{m}$ (Leja®, LEJA Product B. V. Netherlands) selon la technique décrite par Varner, et al. 1991.

Avant l'analyse par ce système, la semence est diluée a la concentration de 25 million spz/ ml au moyen d'une solution tampon commerciale (Eazy buffer) puis mise en incubation (Cuve MEMMERT) pendant 10 min.

L'analyse de la semence a été faite selon le paramétrage technique mentionné en fig.16.

| Parameter | Value |
|---|-----------|
| Frames acquired | 30 |
| Frame rate (Hz) | 60 |
| Minimum contrast | 60 |
| Minimum cell size (pixels) | 6 |
| Minimum static contrast | 25 |
| Straightness cut-off (% , STR) | 75 |
| Average-path velocity cut-off PM ($\mu\text{m/s}$, VAP) | 50 |
| VAP cut-off static cells ($\mu\text{m/s}$) | 20 |
| Cell intensity | 100 |
| Static head size | 0.55–2.04 |
| Static head intensity | 0.45–1.70 |
| Static elongation | 11–99 |

Figure 16: Paramétrage CASA pour espèce équine

13.2 Analyse spermatique par cytométrie en flux (CMF)

Un cytomètre Guava-easycyte HT Plus (Millipore, USA) a été utilisé dans cette étude, afin d'évaluer un paramètre spermatique à savoir : le statut oxydatif.

Cet appareil a l'avantage de fonctionner avec des kits rapides prêts à l'emploi sous forme de microplaques contenant des fluorochromes. Après plusieurs étapes de dilution et préparation de la semence, cette dernière est ajoutée aux fluorochromes, incubée puis directement chargée et analysée par le cytomètre.

Le kit utilisé, permettent d'évaluer : Le pourcentage des spermatozoïdes vivants oxydés (**ROS**) en mesurant le taux des radicaux libres intracellulaires suivants : H^2O^2 , HOCL, ONOO-.

14. Protocole expérimental

Vingt (20) éjaculats récoltés à partir de 5 étalons ont été utilisés pour cette expérience. Chaque éjaculat a été filtré pour éliminer le gel puis soumis immédiatement à une évaluation initiale (numération et mobilité massale des spermatozoïdes) avant de subir une première dilution (1 :3) à l'INRA-96 puis refroidi à 4°C et transporté à cette température jusqu'au laboratoire « **PBRC/U.Blida1** ».

La semence a été centrifugée (600xg, 10mn, +4°C, sur coussin « maxifreeze®), puis remise en suspension dans ½ volume d'un diluant commercial INRA FREEZE® (IMV, L'aigle, France) contenant 2,5% de glycérol.

La concentration spermatique a été évaluée par spectrophotomètre après centrifugation et un volume du diluant correspondant a été calculé et ajouté (2ème dilution) pour avoir une concentration finale de **100x10⁶** spz/ml dans le tubes. Les tubes ont ensuite été équilibrés dans une vitrine réfrigérée à 4°C.

A l'issue de chacun de six temps d'équilibrage étudiés (12h, 24h, 48h, 72h).

La semence a été ensuite conditionnée en paillettes moyenne (0.5ml) avant d'être congelée (Courbe : Début 4°C ; -60°C/mn jusqu'à -100°C ; -30°C/mn jusqu'à -140°C) avec un congélateur automatique (Micro Digit Cool, IMV, Technologies, Aigles, France), puis immergée dans l'azote liquide et stockée pendant 3 jours avant d'être décongelée.

Les paillettes ont été décongelées (+37°C pendant 30sec), évaluées (CASA & CMF).

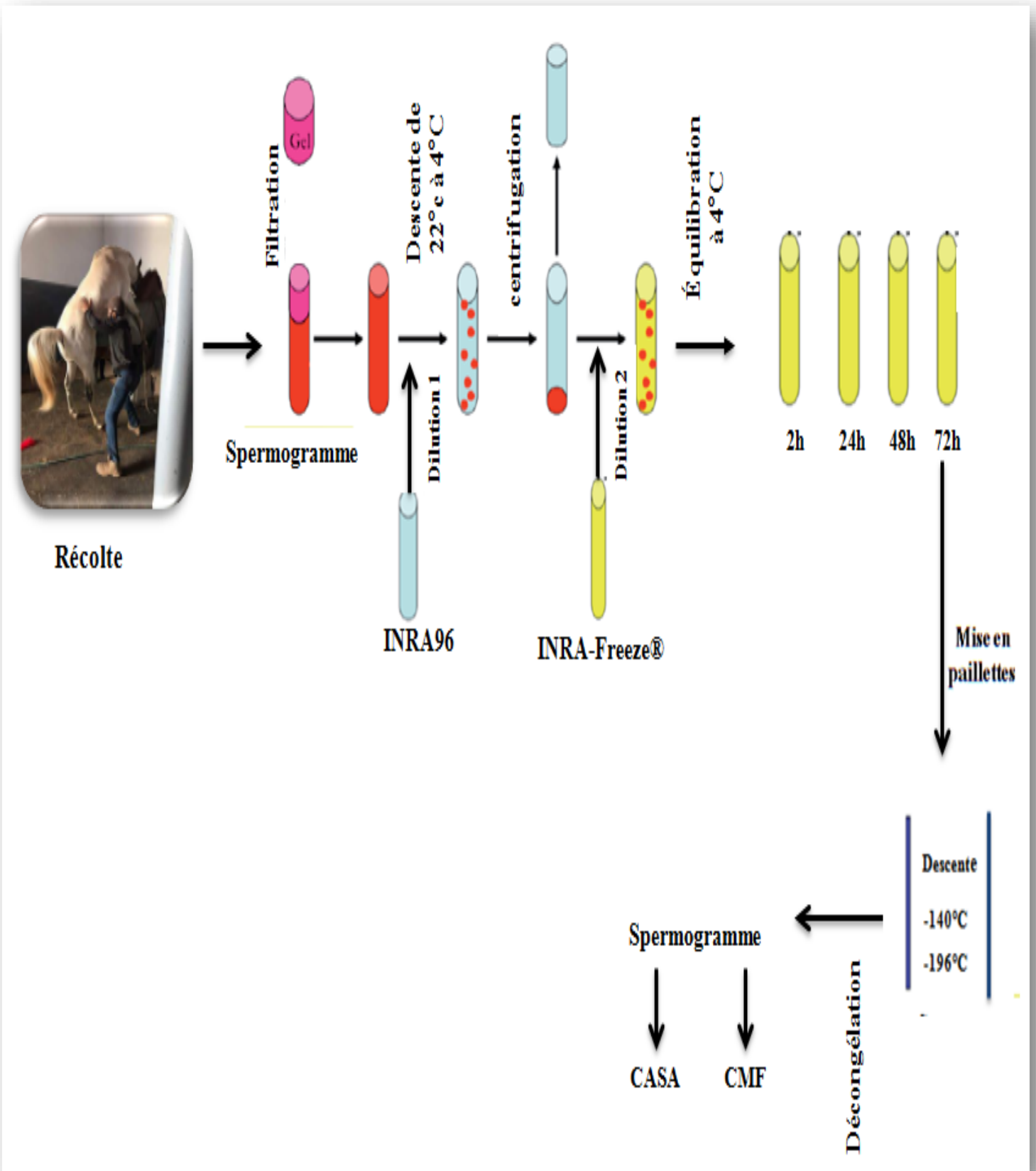


Figure 17 : Le processus de congélation de la semence équine (Original).

15. Analyse statistiques

Les données brutes ont été soit directement saisies sur Excel (pour les analyses manuelles « concentration » et « notes de mobilité massale ») ou récupérées sur une table Excel à partir des deux systèmes d'analyse automatique de la semence utilisés (CASA et Cytomètre en flux). Microsoft Excel a été utilisé pour la tabulation ainsi que le graphisme.

Le logiciel SPSS a été utilisé pour :

- Effectuer les statistiques descriptives (moyenne, écart type, erreur standard de la moyenne).
- Teste de la distribution normale des séries statistiques.
- La transformation logarithmique des données si la distribution n'est pas normale.
- La comparaison des moyennes entre les variables étudiées par analyse de variance(ANOVA) suivie des tests de Tukey et Duncun (Post hoc) afin d'effectuer la comparaison multiple et définir les différences significatives entre les diverses classes de données.

Le seuil de significativité a été défini à 5% ($p < 0.05$; $n=20$) et les résultats ont été présentés sous forme de $\text{Moy} \pm \text{SEM}$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISSCUSION

I. Résultat

1. Evaluation de la qualité de sperme après deux procédures de congélation différentes.

L'équilibration des spermatozoïdes d'étalon pendant 24 heures avant la congélation n'a eu aucun effet sur la motilité totale (MT= 65.8±5.9) et la motilité progressive (MP= 28.8±7.9). Toutefois, la congélation du sperme immédiatement après la collecte a donné des valeurs plus élevées (P <0,05) pour l'intégrité de la membrane plasmatisque (PMI= 56.2±8.0a) comparativement au sperme refroidi pendant 24 heures avant la congélation (**tab.5**).

Tableau 6 : Pourcentages (±SD) de motilité totale (MT) après décongélation, de motilité progressive (PM) et d'intégrité de la membrane plasmatisque (PMI) des spermatozoïdes après deux procédures de congélation différentes.

| Espèce | Méthodologie | MT | MP | PMI | Auteur | Année |
|---------------|---|-----------------|------------------|-----------------------------|--------------------|--------------|
| Equine | Congélation à -196°C après la collecte. | 68.9±5.9 | 31.6 ±6.5 | 56.2±8.0^a | Melo et al. | 2007 |
| | Congélation à -196°C après 24 heures de refroidissement. | 65.8±5.7 | 28.8±7.9 | 46.7±6.7^b | | |

^{a,b} Différentes lettres minuscules dans la même colonne différent (P < 0.05).

2. Evaluation de la qualité de sperme après plusieurs procédures de congélation différentes chez plusieurs espèces.

Tableau 7 : Pourcentages (\pm SD) de motilité totale (MT) après décongélation, de motilité progressive (PM) et d'intégrité de la membrane plasmatisque (PMI) des spermatozoïdes après plusieurs procédures de congélation différentes chez plusieurs espèces.

| Espèces | Dilu | Paramètres spermatique | Temps d'équilibration | | | | | | | | | Auteurs | Année |
|----------|-----------|------------------------|---|-----------------|---|-----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|-------|
| | | | 0h | 3h | 6h | 10h | 20h | 24h | 48h | 72h | 96h | | |
| Sanguier | / | Motilité (%) | / | 40 ^a | / | 41 ^a | 36 ^b | / | / | / | / | Eriksson et al | 2001 |
| | | PMI (%) | / | 50 ^a | / | 55 ^b | 54 ^b | / | / | / | / | | |
| | | Pénétration (%) | / | 68 ^a | / | 70 ^a | 70 ^a | / | / | / | / | | |
| Bélier | / | MT (%) | 29 | / | / | / | / | 31 | 36 | / | / | Purdy et al | 2005 |
| | | MP (%) | 16 | / | / | / | / | 15 | 17 | / | / | | |
| | | IMP (%) | 28 | / | / | / | / | 35 | 29 | / | / | | |
| Cagne | 6%(LDL) | PMI | 85 \pm 5.73 ^{a1} | / | 82.2 \pm 5.14 ^a ₁ | / | / | / | / | / | / | Belal et al | 2016 |
| | 6%(LIP O) | | 80.9 \pm 9.17 ^a ₁ | / | 80 \pm 5.36 ^{a1} | / | / | / | / | / | / | | |
| | 40%(EY P) | | 85.1 \pm 4.49 ^a ₁ | / | 81.9 \pm 4.84 ^{a1} | / | / | / | / | / | / | | |
| Taurau | / | Motilité (%) | / | / | / | / | / | 83.5 \pm 7.3 _{a,b} | 79.3 \pm 8.1 _{b,c} | 74.7 \pm 10.6 ^c | 67.3 \pm 15.4 ^d | Fliesch et al | 2017 |
| | | PMI (%) | / | / | / | / | / | 84.3 \pm 5.8 _{a,b} | 82.3 \pm 6.6 _{b,c} | 79.9 \pm 7.2 ^{c,d} | 77.3 \pm 8.7 ^d | | |

MT : Motilité Totale ; **MP** : Motilité progressive ; **PMI** : Intégrité de la Membrane Plasmique ; **Pénétration** : Pourcentage d'ovocytes pénétrés.

LDL : Lipoprotéines de basse densité ; **LIPO** : Liposomes ; **EYP** : Plasma de jaune d'œuf ; **HOST** : Hypo-Osmotic Swelling Test.

^{a,b}; ^{c,d} **Différentes lettres minuscules dans la même colonne diffèrent (P <0,05)**

Discussion

La nouvelle approche de la congélation du sperme préalablement refroidi pour 24 heures peut être une méthode appropriée pour réduire de nombreux problèmes liés au risque de transport d'équipement coûteux ou un étalon d'un endroit à un autre.

La conservation du sperme d'étalon peut être maintenue à 5 ou 15°C pendant 18 heures avant la cryoconservation, mais la motilité totale et progressive est significativement plus faible après décongélation par rapport à échantillons congelés immédiatement après refroidissement à 5 °C (Backman et al, 2004). Les taux de grossesse obtenus en utilisant du sperme d'étalon conservé pendant 18 h ou congelé immédiatement après le traitement n'étaient pas significativement différents (53% contre 70%, respectivement; $P > 0,05$) (Backman et al, 2004). La centrifugation des spermatozoïdes équins peut être préjudiciable à moins que des forces faibles (370 à $829 \times g$) ne soient utilisées (Pickett et al, 1975). La centrifugation des spermatozoïdes à 5°C s'est avérée préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes après 6 à 12h de stockage (Crockett et al, 2001) suivi de congélation et décongélation. Vidament et al. (2000) ont également signalé une motilité plus élevée et la fertilité si le sperme était centrifugé à ($600 \times g$ pendant 10 min) à 22°C et refroidi à 5 ° C.

Incubation des spermatozoïdes d'étalons à 5 ° C pendant 2, 6, 12 h avant la cryoconservation entraînait moins de pourcentages de motilité progressive après décongélation (25, 19, 13% respectivement) (Crockett, 2001). Il y a un avantage au refroidissement du sperme à 5 ° C car les dispositifs de refroidissement passifs du sperme équin sont facilement disponibles et sont largement utilisés dans l'industrie équine pour le transport de sperme (Squires et al, 1999). Les diluants à base de lait écrémé nécessitent généralement un refroidissement relativement lent des spermatozoïdes jusqu'à 5 ° C sur une période de 2 à 2,5 h avant la congélation. L'utilisation de glycérol à des faibles concentrations a assuré la viabilité du sperme après la décongélation lorsqu'il est combiné avec des amides ou même lorsqu'il est utilisé comme cryoprotecteur isolé (Melo, 2007).

Commercialement, le sperme est généralement congelé entre $200 \times 10^6 / \text{ml}$ et $400 \times 10^6 / \text{ml}$. Crockett et al. (2001) ont reporté que le sperme conservé à 5 ° C à une concentration plus faible de $250 \times 10^6 / \text{ml}$ a maintenu un pourcentage plus élevé de mobilité totale et progressive que les spermatozoïdes refroidis à $500 \times 10^6 / \text{ml}$ avant cryoconservation (42,23 contre 32,17 respectivement) les spermatozoïdes ont également bien survécu à la cryoconservation lorsqu'ils sont emballés dans des pailles de 0,5 ou 2,5 ml. Samper (1995) a

rapporté des pourcentages similaires de spermatozoïdes mobiles lorsque les spermatozoïdes ont été congelés dans des paillettes de 0,5, 2,5 et 5 ml (40, 38 et 42% respectivement).

Maintenir les spermatozoïdes à des températures inférieures à la température corporelle avant la cryoconservation, est couramment effectuée chez de nombreuses espèces avec des résultats acceptables.

les spermatozoïdes de sanglier sont généralement maintenue pendant de longues périodes (jusqu'à 24 h) à des températures réduites (15°C) avant la cryoconservation, cela a donné des pourcentages plus élevée de PMI pendant 10 et 20h par rapport à 3h, et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a diminué de manière significative pendant 20h par rapport à 3 et 10h, mais aucune différence au pouvoir pénétrant de l' ovocyte in vitro n'est observée (Eriksson et al, 2001).De plus, La conservation du sperme de bélier peut être maintenu à 5°C jusqu'à 48 h avant la cryoconservation, des pourcentages similaires de motilité (29, 31, 36% respectivement), motilité progressive (16, 15, 17% respectivement), d'intégrité de la membrane plasmique (28, 35, 29%) (**Purdy, 2005**).

Ces résultats démontrent qu'il est possible de collecter le sperme de bélier et de les conserver jusqu'à 48 h avant la cryoconservation sans effets délétères sur la qualité du sperme après décongélation.

La conservation du sperme canin avec trois extenseurs (6% de lipoprotéines de basse densité (LDL), 6% liposomes (LIPO) et plasma de jaune d'œuf à 40% (EYP), pendant 6h avant cryoconservation a donné le plus haut post-dégel proportions de spermatozoïdes mobiles et progressifs. La motilité totale était largement supérieure au seuil acceptable pour l'insémination artificielle (30%).

Un équilibrage de 3 heures a donné une motilité supérieure à 1 heure ($p < 0,05$), mais était toujours significativement plus faible qu'après six heures ($p < 0,05$).Prolonger le temps d'équilibrage à 3 h ou mieux 6 h augmente considérablement le pourcentage après décongélation de spermatozoïdes mobiles et progressifs (**Belala et al, 2016**).

La conservation du sperme de taureau jusqu'à 96h à 4°C avant la cryoconservation n'entraîne pas une diminution des proportions de spermatozoïdes mobiles après la décongélation (**Fleisch et al, 2017**).

CONCLUSION

Conclusion

A l'issue de cette étude, nous concluons ce qui suit :

- Le temps d'équilibration dans la congélation ne diffère pas significativement par rapport à la variable du temps, 2h, 24h, 48h, 72h, en comparaison avec le temps conventionnel qui est de 2h.

- Une centrifugation de la semence équine avant refroidissement à 600xg pendant 10mn sur un coussin (Maxifreeze®) a pu réduire le taux des pertes en spermatozoïdes au minimum (12%) associé à une bonne viabilité-acrosome.

- La concentration de 2.5% en glycérol a été optimale pour un refroidissement avant congélation des spermatozoïdes équins.

**PERSPECTIVES
ET
RECOMMANDATIONS**

A la lumière de notre travail étudier à l'avenir :

- Évaluée l'effet de la durée d'équilibration prolongée sur la fertilité in vivo (insémination artificiel, taux de gestation).

- La comparaison entre plusieurs températures 4°, 15°, 22° (si le résultat n'est pas significatif, nous pourrions alléger les étapes du protocole utilisé et travailler dans le futur sous température ambiante contrôlée).

- Étudier un facteur très important qui est le glycérol qui influence la qualité du sperme congelé.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Hussain J, Salam A, Gohar A. 2011.** A Study on the Cryopreservation of Stallion Semen with Alpha Lipoic Acid. *Intl R J of Pharmaceuticals* ;1:21–6.
- **Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481–592.
- **Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. 2001.** Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non breeding season. *Anim Reprod Sci* ;65:75–88.
- **Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. 2008.** Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008;107:276–92.
- **Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009.** Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stalliondependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* ;138:55–63.
- **Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M 2013.** Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*;138:2–38.
- **Knobil E, Neill JD 1999.** . Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction. Volume 4 (Pro-Z)*.586-596.
- **Marie Allimant. 2010.** Thèse: Actualités sur les méthodes d'évaluation de la Qualité de la semence de l'étalon. Université Claude-Bernard - Lyon I.
- **Heymon Y., Vignon X. 2005.** *Reproduction des animaux d'élevage. Educagri*
- **Thibault C. 2001.** *La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses.*
- **Senger P.L. 2005,** *Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions: Pullman, 373 p.*
- **Amann R.P., Graham J.K. 2011.** Spermatozoal function. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), *Equine reproduction. 2nd edition. Wiley-Blackwell: Oxford, 1053-1085.*
- **Braun J., Sakai M., Hochi S., Oguri N. 1994.** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41, 809-818.

- **Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E. 2008.** *The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm.* *Anim. Reprod. Sci.*, 107, 237-248.
- **Lopez M.L., Olea N., Retamal C.A. 2007.** *Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains.* *Anim. Reprod. Sci.*, 100, 204-210.
- **Gadella, B. M., R. Rathi, J. F. Brouwers, T. A. A. Stout et B. Colenbrander. 2001.** *Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.* *Anim Reprod Sci.* 68 : 249-265.
- **Tibary, A., Bakkourym. 2005.** *Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.*
- **Blanchard TL, et al. 2003.** *Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby.*
- **Dacheux J-L. et Dacheux F. 2001.** *L'épididyme et les glandes annexes. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle Edition entièrement refondue. INRA Editions. Ellipses.*
- **PRINS G. (1998) Semen.**
In : Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Knobil E., Neill J.D. Academic Press.
- **LOOMIS P.R. et GRAHAM J.K. (2008).** *Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols.*
Anim. Reprod. Sci. Vol. 105, n° 1-2, p. 119-128.
- **LABBÉ C., BLESBOIS E., LEBOEUF B., GUILLOUET P., STRADAIOLI G. et MAGISTRINI M. (2002)** *Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques: protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes.*
Congrès du Bureau des Ressources Génétiques, La Châtre (FRA). Vol. 10, p. 15–17.
- **LUVONI G. (2003) .** *Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability.* *J. Feline Med. Surg. Vol. 5, n° 5, p. 257-263.*
- **Poisson C., 2013,** *Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. ; innovation thérapeutique : du fondamental a l'appliqué.*
- **EILTS B.E. (2005b)**
Theoretical aspects of canine semen cryopreservation.
Theriogenology. Vol. 64, n° 3, p 692-697.
- **DAY John G. et STACEY Glyn N. (2007)**
Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.

- **Barbas JP, Mascarenhas RD.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking.* 2009;10:49–62.
- **OLDENHOF H., GOJOWSKY M., WANG S., HENKE S., YU C., ROHN K., WOLKERS W.F. et SIEME H. (2013).** Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biol. Reprod.* Vol. 88, n° 3, p. 68-68.
- **THIRUMALA S., FERRER M.S., AL-JARRAH A., EILTS B.E., PACCAMONTI D.L. et DEVIREDDY R.V. (2003)** Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology.* Vol. 47, n° 2, pp. 109-124.
- **ROTA A., MILANI C., CABIANCA G. et MARTINI M. (2006).** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology.* Vol. 65, n° 9, pp. 1848-1858.
- **BRIAND-AMIRAT L., ANTON M., GERARD O. et TAINURIER D. (2006)** Etude de la fertilité in vitro de la semence de taureau après congélation-décongélation avec les LDL du jaune d'oeuf de poule: Comparaison avec l'Optidyl®, dilueur commercial à base de jaune d'oeuf. *Revue Méd. Vét.* Vol. 157, n° 4, p 205–212.
- **Katila T.1997.** Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology.* 48(7) 1217-27
- **Isabelle Barrier-Battut. 2013.** Collecte et traitement de la semence d'étalon : quoi de neuf ? Le magazine en ligne de l'actualité technique et scientifique équine. Institut Français du Cheval et de l'Equitation.
- **PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. (2014)** Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.
- **HANZEN Christian (2014)** *Biotechnologies: L'insémination artificielle chez les ruminants.*
- **Batellier F. et al. 2001** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* 68 (3-4) 181-90.
- **Marc Stéphanie. 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).

- **Baracaldo M.I.** Steps for freezing bovine semen : from semen collection to the liquid nitrogen tank. [En ligne]. 2007. Adresse URL : http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia/2007/baracaldo_et_at_2007.pdf, consulté le 02/04/2014.
- **Vidament M., Ecot P., Noue P., Bourgeois C., Magistrini M., Palmer E.** 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 907-919.
- **Vidament M., Yvon J.M., Couty I., Arnaud G., Nguekamfeugang J., Noue P., Cottron S., Le Tellier A., Noel F., Palmer E., Magistrini M.** 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 201-218.
- **Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K.** 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Therio-genology*, 63, 2372-2381.
- **Salazar J.L., Hayden S.S., Waite J.A., Comerford K.L., Edmond A.J., Teague S.R., Love C.C., Varner D.D.** 2008. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 347-348
- **OLACIREGUI M., GIL L., MONTÓN A., LUÑO V., JEREZ R.A. et MARTÍ J.I.** (2014)
Cryopreservation of epididymal stallion sperm.
Cryobiology. Vol. 68, n° 1, p. 91-95.
- **John Dascanio and Patrick McCue.** 2014. *Equine Reproductive Procedures, First Edition.* Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).
- **Steven P. Brinsko, Terry L. Blanchard, Dickson D. Varner, James Schumacher, Charles C. Love, Katrin Hinrichs, David L. Hartman.** 2011. *Manual of equine reproduction – 3rd edition*, 325p (p161-162).
- **Johnston S.D., Root Kustritz M.V. ET Olson P.N.S.** (2001). *Canine and Feline Theriogenology.* Saunders Company. 592p.
- **PENA MARTINEZ A.I.** (2004)
Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.
Anim. Reprod. Sci. Vol. 82-83, p. 209-224.
- **Corde R.,** 1985. Saillie - Insémination artificielle - Infertilité du mâle. In : Maisons-

- Alfort, France, Assoc. pour l'Etude de la Repro. Animale. *La reproduction chez le cheval. Physiologie - pathologie* : 67-73.
- **Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M. et Spanò, M. (2005).** Applications de cytométrie en flux dans l'évaluation de la qualité du sperme: analyse du sperme, fonction du sperme et intégrité de l'ADN. *Contraception*, 72 (4), 273-279.
 - **Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005).** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
 - **LePecq, J. B., & Paoletti, C. (1967).** A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization. *Journal of molecular biology*, 27(1), 87-106.
 - **Eustache, F., Jouannet, P., & Auger, J. (2001).** Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *Journal of andrology*, 22(4), 558-567.
 - **Calamera, J. C., Fernandez, P. J., Buffone, M. G., Acosta, A. A., & Doncel, G. F. (2001).** Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia*, 33(2), 79-86.
 - **Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003).** Membrane changes during different stages of a freeze–thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59(8), 1693-1705.
 - **Baumber, J., Ball, B. A., GRAVANCE, C. G., Medina, V., & DAVIES-MOREL, M. C. (2000).** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, 21(6), 895-902.
 - **Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008).** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology*, 59(1), 2-11.
 - **Kim, S. H., Yu, D. H., & Kim, Y. J. (2010).** Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal reproduction science*, 119(1-2), 106-114.
 - **Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008).** Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of

- oxidative stress in spermatozoa. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), 3199-3207.
- **Zielonka, J., Hardy, M., & Kalyanaraman, B. (2009).** HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(3), 329-338.
 - **Martínez Pastor, F., Aisen, E., Fernández Santos, M. R., Estes, M., Maroto Morales, A., García Álvarez, O., & Garde López-Brea, J. (2009).** Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa.
 - **Crockett, E. C., J. K. Graham, J. E. Bruemmer, and E. L. Squires. 2001.** Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 55:793–803.
 - **Vidament, M., P. Ecot, P. Noue, C. Bourgeois, M. Magistrini, and E. Palmer. 2000.** Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improves post thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54:907–919.
 - **Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squires EL. 2004.** Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci* 2004;82:690–694.
 - **Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. 1999.** Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No. 9, Colorado State University*;
 - **Fleisch, A., Malama, E., Witschi, U., Leiding, C., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2017).** Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 89, 255-262.
 - **Eriksson, B. M., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Roca, J., Lucas, X., & Rodriguez-Martinez, H. (2001).** Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, 55(8), 1593-1605.
 - **Pudry, p. H. (2006).** The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science*, 93(1-2), 114-12.

Références bibliographiques

- *Melo, CM, Zahn, FS, Martin, I, Orlandi, C., Dell'Aqua Jr, JA, Alvarenga, MA, et Papa, FO (2007). Influence du stockage du sperme et du cryoprotecteur sur la viabilité après décongélation et la fertilité des spermatozoïdes des étalons. Journal of Equine Veterinary Science , 27 (4), 171-175.*

ANNEXES

Annexe N°1 :

L'objectif de la présente étude était de vérifier que l'étalon Les spermatozoïdes pourraient être refroidis pendant 24 heures, puis congelés. Dans l'expérience I, un éjaculat de chacun des 13 étalons a été utilisé. Le sperme a été recueilli et divisé en deux pièces; une pièce immédiatement congelée par cryoconservation standard techniques et les autres produits dilués, stockés dans un Equitainer pendant 24 heures, puis congelé. Dans l'expérience II, un éjaculat de chacun des 12 étalons était recueilli, dilué avec du Botu-Semen, et divisé en deux parties : l'une refroidie dans un Equitainer et l'autre dans Max-Semen Express sans centrifugation préalable. Après 24 heures de refroidissement, les échantillons ont été centrifugés pour enlever le plasma séminal et concentrer le sperme, et remis en suspension dans un extenseur Botu-Crio contenant l'un des trois traitements cryoprotecteurs (glycérol à 14 % diméthylformamide, 1 % glycérol p 4 % diméthylacétamide et 1% de glycérol p 4% de méthylformamide), maintenu à 5°C pendant 20 minutes, puis congelé dans de l'azote vapeur. Aucune différence n'a été observée entre les deux systèmes de refroidissement. L'association de 1% de glycérol et % de méthylformamide a fourni la meilleure progression post-dégel motility. Pour l'expérience III, deux étalons ont été utilisé pour un essai de fertilité. Quarante-trois inséminations ont été réalisé avec 22 juments. Aucune différence dans les paramètres de sperme et les taux de grossesse lors de la comparaison les deux protocoles de congélation (conventionnels et refroidi/congelé). Taux de grossesse pour les et le sperme refroidi/congelé étaient, respectivement, 72,7 % 82,3 % (étalon A) et 40,0 % et 50,0 % (étalon B).

Nous avons conclu que le refroidissement du sperme équin pour 24 heures avant le gel, tout en maintenant la viabilité des spermatozoïdes et la fertilité, est possible.

Mots clés : Équine; Sperme refroidi et congelé; Cryoprotecteur; Fertilité.

Annexe N° 2 :

But de cette revue est de décrire les techniques de congélation de la semence équine. Un rappel résumera la formation du spermatozoïde dans le testicule, son anatomie et sa physiologie en insistant sur les structures lésées pendant le processus de congélation et décongélation. Les techniques de congélation du sperme seront ensuite résumées dans différentes espèces et comparées avec celles utilisées pour la semence équine. Les critères actuels de qualité seront définis pour le sperme avant et après congélation en insistant sur la mobilité totale, progressive et les différentes définitions de ces concepts dans la littérature.

Les autres méthodes d'analyse comme la cytométrie de flux seront présentées ainsi que leurs intérêts cliniques. Les prochains développements et progrès dans le domaine de la congélation seront enfin envisagés : la prédiction de la qualité du sperme congelé à partir du sperme frais, l'amélioration des dilueurs et la lutte contre les formes activées de l'oxygène.

Annexe N° 3 :

La capacité d'expédier du sperme d'étalon refroidi à une installation spécialisée dans la cryoconservation de les spermatozoïdes permettraient aux étalons de rester à la maison pendant que leur sperme est cryoconservé dans les installations avoir l'équipement et l'expertise nécessaires pour congeler correctement le sperme. Pour atteindre cet objectif, les méthodes doit être développé pour congeler le sperme expédié refroidi. Trois expériences ont été menées pour déterminer le prolongateur spermatozoïde le plus approprié, l'emballage, le temps de centrifugation, le spermatozoïde concentration et durée après collecte des spermatozoïdes pouvant être refroidis avant cryoconservation. Dans la première expérience, les spermatozoïdes ont été centrifugés pour éliminer le plasma séminal, remis en suspension dans un allongeur de lait écrémé, un allongeur de sucre de jaune d'oeuf écrémé ou un oeuf de lait écrémé extenseur de sel jaune, refroidi à 5 ° C et congelé dans des pailles de 0,5 ou 2,5 ml 2,5 ou 24 h après refroidissement. Les échantillons congelés 2,5 h après refroidissement avaient des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes progressivement mobiles (PM) (27%) que les échantillons congelés 24 h après refroidissement (10%; $P < 0,05$). Échantillons congelés 2,5 h après refroidissement les allongeurs de lait écrémé contenant du jaune d'oeuf avaient des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes PM (moyenne 32%) que les spermatozoïdes congelés dans un diluant contenant du lait écrémé seul (moyenne 16%; $P < 0,05$). Les pourcentages de spermatozoïdes PM congelés dans des pailles de 0,5 ou 2,5 ml étaient similaires (21 et 28%, respectivement; $P > 0,05$). Dans la deuxième expérience, les spermatozoïdes ont été centrifugés pour éliminer le séminal plasma avant (25 ° C) ou après refroidissement (5 ° C), et les spermatozoïdes ont été congelés après avoir été refroidis à 5 ° C pendant 2, 6 ou 12 h. Les pourcentages de spermatozoïdes PM étaient plus élevés ($P < 0,05$) pour les spermatozoïdes centrifugé avant refroidissement (30%) que pour les spermatozoïdes centrifugé après refroidissement (19%). Spermatozoïdes centrifugé à 25 ° C puis refroidi pendant 12 h à 5 ° C avait une motilité progressive post-décongélation plus élevée ($P < 0,05$) (23%) par rapport aux spermatozoïdes refroidis pendant 12 h et centrifugés à 5 ° C (13%). Dans la troisième expérience, les spermatozoïdes ont été centrifugés pour une élimination du plasma séminal, remis en suspension au niveau des spermatozoïdes concentrations de 50, 250

ou 500×10^6 / ml, refroidies à 5°C pendant 12 h puis congelées. Échantillons avec les spermatozoïdes emballés à 50 ou 250×10^6 / ml avaient des pourcentages plus élevés ($P < 0,05$) de spermatozoïdes PM (25 et 23%) après congélation que les échantillons emballés à 500×10^6 spermatozoïdes / ml (17%). Nous recommander que le sperme soit centrifugé à 25°C pour éliminer le plasma séminal, suspendu à 250×10^6 spermatozoïdes / ml et maintenus à 5°C pendant 12 h avant la congélation.

Mots clés: étalon, sperme, refroidissement, centrifugation, cryoconservation

Annexe N° 4 :

La capacité d'expédier du sperme d'étalon refroidi pour congélation ultérieure dans une installation spécialisée dans la cryoconservation serait bénéfique pour l'industrie équine.

Le sperme d'étalon a été centrifugé, refroidi à 5°C pendant 12 h, et congelé sans effet néfaste sur la motilité dans une étude précédente; cependant, aucune donnée sur la fécondité n'a été disponible. L'expérience 1 a comparé la motilité après décongélation de sperme refroidi pendant 18 h à 15°C ou 5°C à 400 ou 200×10^6 spermatozoïdes / ml puis congelés. Température de stockage, concentration de spermatozoïdes ou interaction de la température et la concentration n'a eu aucun effet sur le total (TM) et la motilité progressive (PM) après refroidissement. Après décongélation TM et PM étaient plus élevés pour le contrôle que ($P < 0,05$) pour échantillons traités. Il n'y avait pas de différence après décongélation TM et PM en raison de la température ou de la concentration.

Expérience 2 autres procédures évaluées pour le refroidissement avant congélation. Les éjaculats ont été refroidis à 5°C pendant 18 h et centrifugé, centrifugé à température ambiante puis refroidi à 5°C pendant 18 h avant congélation, ou centrifugé et congelé immédiatement (contrôle). Il n'y avait pas différence entre les traitements après décongélation TM ou PM. Dans Exp. 3, les juments ont été inséminées avec du sperme qui avait été prolongé dans du jaune d'oeuf écrémé sans glycérol, centrifugé, remis en suspension à 200×10^6 spermatozoïdes / ml, refroidi à 5°C pendant 18 h, puis congelé ou non refroidi pendant 18 h avant congélation (contrôle). Les taux de grossesse ne diffèrent pas pour les juments recevant du sperme refroidi puis congelé (21 sur 30, 70%) ou du sperme congelé directement sans refroidissement préalable (16 sur 30, 53%).

En résumé, une procédure a été élaborée pour refroidir le sperme d'étalon pendant 18 h avant la congélation sans diminution conséquente de la fertilité.

Mots clés: refroidissement, fertilité, congélation, sperme d'étalon, stockage

Annexe N° 5 : ACCEPTÉ

Le présent travail visait à évaluer l'effet du temps d'équilibration sur la motilité post-dégel paramètres du sperme canin congelé en trois extenseurs: 6% de lipoprotéines de basse densité (LDL), 6% liposomes (LIPO) et plasma de jaune d'oeuf à 40% (EYP). Une deuxième expérience vise à évaluer l'intégrité fonctionnelle des spermatozoïdes canins congelés dans les trois extenseurs au meilleur temps d'équilibration trouvé dans l'expérience. Dans la première expérience, 20 éjacule récoltés sur 7 chiens, ont été congelés dans trois extenseurs (LDL, LIPO et EYP) après quatre temps d'équilibration (30 minutes, 1 heure, 3 heures et 6 heures). Le sperme a été évalué après décongélation à l'aide d'un analyseur d'images (HT-IVOS 14.0). Le temps d'équilibration de 6 heures a donné un meilleur résultats de la motilité et de la motilité progressive dans les trois extenseurs étudiés. (LDL: 58,9% contre 42,7%; LIPO: 54,4% contre 31,9%; EYP: 55,4% vs 40,5% pour Motility 6 vs 1 heure). dans le deuxième expérience, 10 éjaculats prélevés sur 6 chiens ont été congelés dans les mêmes conditions que l'expérience précédente, après 6 heures d'équilibration. Les paramètres d'intégrité du membrane spermatozoïde (test de gonflement hypo-osmotique et SYBR14 / iodure de propidium coloration), l'acrosome (coloration FITC-Pisium Sativum Agglutinin) et l'ADN (acridine orange coloration) ont été évalués à trois étapes différentes: post-dilution (T0), post-équilibration et après décongélation. Les résultats après décongélation étaient les suivants: intégrité de la membrane (HOST: 62; 6% vs 58% vs 64,4%; SYBR14 / IP: 63,6% contre 57,9% contre 64,8%); intégrité de l'acrosome (FITC-PSA: 79,4% vs 74% vs 76,2%) et l'intégrité de l'ADN (Acridine-orange: 98,9% vs 98,5% vs 98,7%) respectivement pour LDL vs LIPO vs EYP. Aucune différence significative n'existait entre les prolongateurs testés; ainsi 6% LIPO et 40% EYP pourraient être de bons candidats pour le remplacement de 6% LDL dans le protection des spermatozoïdes canins pendant le processus de gel dégel sans altérer la motilité et paramètres d'intégrité.

Mots clés : Sperme de chien, Cryoconservation, Temps d'équilibration, Liposomes, Plasma de jaune d'œuf, Tests de fertilité *in vitro*.

Annexe N° 6 :

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les effets de la vitesse de refroidissement à 4 ° C et de la température temps de centrifugation / addition de glycérol (extenseur de congélation: INRA82 + 2% jaune d'oeuf + 2,5% glycérol) sur le taux de récupération post-centrifugation, la motilité après décongélation et la fertilité par cycle. Quand centrifugation / addition de glycérol a été effectuée à 4°C (14 éjaculats), une vitesse de refroidissement modérée (37°C à 4°C en 1 h) a entraîné une motilité post-décongélation supérieure (45%) par rapport à un refroidissement lent (37 ° C à 4°C en 4 h) (39%; P<0.05). Lorsque la centrifugation / addition de glycérol a été effectuée à 22 ° C (37°C à 22°C en 10 min) (10 éjaculats), la motilité après décongélation était plus faible lorsque les spermatozoïdes ont été congelés directement à 22 ° C (23%) que lorsque les spermatozoïdes ont été refroidis à 4°C (22 ° C à 4°C en 1 h) avant congélation (47%; P <0.001). une centrifugation de poule / addition de glycérol a été effectuée à 22°C (avant refroidissement à vitesse modérée), contre 4 ° C (après refroidissement à vitesse modérée), un amélioration significative de 1) la récupération des spermatozoïdes après centrifugation (P <0.0001) 2.) après le dégel motilité des spermatozoïdes à la décongélation (40% vs 36% (n= 291 éjaculats / groupe), P <0.0001) a nd 3) une fertilité par cycle (56% vs 42% (n2190 cycles / groupe), P<0.01) a été observée. En conclusion, centrifugation / addition de glycérol à 22 ° C suivie d'un refroidissement à 4 ° C à une vitesse modérée se traduit par une amélioration de la motilité après décongélation, du taux de récupération des spermatozoïdes et de la fertilité par cycle.

Mots-clés: étalon, spermatozoïdes, cryoconservation, fertilité

Annexe N° 7 :

Les effets du maintien de la semence de bélier diluée à 5 ° C pendant 48 h maximum avant la cryoconservation ont été enquêtés. Le sperme de six béliers a été recueilli par électro-éjaculation à l'automne et à nouveau de six béliers différents au printemps. La concentration et la motilité des spermatozoïdes ont été déterminées à l'aide de spectrophotométrie et analyse automatisée du sperme, respectivement. Les échantillons ont été dilués 23 °C à 400 × 10⁶ cellules / ml dans un milieu Tris – jaune d'œuf – glycérol (5%, v / v) en une étape, refroidi à 5 °C pendant 2 h et maintenue à 5 ° C pendant toute la durée des expériences. Des aliquotes ont été chargées dans 0,5 ml Pailles françaises à 0, 24 ou 48 h après refroidissement, congelées dans de la vapeur d'azote liquide pendant 12 à 13 min, 4,5 cm au-dessus de l'azote liquide, et plongé dans l'azote liquide pour le stockage. Après décongélation, échantillons d'automne congelés après 0, 24 ou 48 h de stockage présentaient des pourcentages de motilité similaires

(29, 31, 36%, respect-), progressivement la motilité (16, 15, 17%, respectivement), l'intégrité de la membrane plasmique (28, 35, 29%, respectivement) et des cellules vivantes ayant réagi à l'acrosome (0,4, 0,6, 0,8%, respectivement; $P > 0,05$). De plus, le quantité de spermatozoïdes liés aux membranes périvitellines d'ovules de poule après avoir été maintenus à 5 ° C pendant 0, 24, ou 48 h n'était pas significativement différent lorsque les valeurs étaient exprimées en tant que moyenne du quantité des spermatozoïdes (155, 177, 106 spermatozoïdes, respectivement) ou en proportion de spermatozoïdes inséminés (0,39, 0,49, 0,34, respectivement; $P > 0,05$). De même, le sperme de bélier collecté au printemps et congelé à 0, 24 et 48 h après le refroidissement avaient une motilité totale similaire ($P > 0,05$) (21, 25, 20%, respectivement), progressive motilité (14, 15, 11%, respectivement), intégrité de la membrane plasmique (26, 33, 31%, respectivement) et cellules ayant réagi à l'acrosome (3,7, 3,5, 3,2%, respectivement; $P > 0,05$). Le temps de maintien de 0 h avait moins de spermatozoïdes liés à la membrane périvitelline d'œuf de poule par rapport au temps de rétention de 48 h (250 et 470 spermatozoïdes, respectivement) bien que le temps de maintien de 24 h ne soit pas différent de celui de 0 ou 48 h temps (281 spermatozoïdes; $P < 0,05$) mais l'analyse de la proportion du total des spermatozoïdes inséminés n'a différences significatives observées ($P > 0,05$). Ces résultats indiquent que le sperme de bélier peut être maintenu à 5 ° C jusqu'à 48 h avant la congélation sans effets néfastes sur la motilité, l'intégrité de la membrane ou la fertilisation potentiel comme indiqué par la capacité de liaison à la membrane.

Mots clés: Spermatozoïdes; Cryoconservation; Temps de maintien; bélier.

Annexe N° 8 :

Cette étude a été conçue pour étudier les effets d'une période d'équilibration jusqu'à 96 h et de trois prolongateurs (AndroMed® , OPTIXcell® et Triladyl® 16) sur la qualité de 17 sperme de taureau cryopréservé et d'évaluer si une prolongation du temps d'équilibrage à 72 h affecte la fertilité au champ. Un éjaculat de taureaux a été collecté et divisé en trois aliquotes égales et dilué, respectivement, avec les trois allongeurs. Chaque aliquote a été à nouveau divisée en cinq parties et équilibrée pendant 4, 24, 21 48, 72 et 96 h avant la congélation dans un congélateur automatique. La motilité des spermatozoïdes, l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome (PMAI) et l'indice de fragmentation de l'ADN (% DFI) ont été mesurés pendant l'équilibration. En plus des paramètres mesurés lors de l'équilibrage, le pourcentage de spermatozoïdes viables avec un potentiel de membrane mitochondriale élevé (HMMP) a été mesuré immédiatement après décongélation, et après 3 h d'incubation à 37 ° C.

La motilité des spermatozoïdes a été évaluée à l'aide de CASA et PMAI, HMMP et le% DFI ont été mesurés en utilisant la cytométrie en flux. Le temps d'équilibration a affecté tout paramètres avant la congélation ($P < 0,01$), et également un prolongateur affecté tous les paramètres sauf HMMP ($P < 0,05$). Après décongélation, tous les paramètres sauf HMMP immédiatement après la décongélation ont été influencés par la période d'équilibration ($P < 0,001$), alors que tous paramètres sauf% DFI immédiatement après décongélation ont été influencés par le prolongateur ($P < 0,001$). Les changements des caractéristiques du sperme pendant 3 h d'incubation ont également été en fonction du temps d'équilibration et du prolongateur utilisé dans tous les paramètres 34 ($P < 0,01$). Dans l'étude sur le terrain, le sperme de 9 taureaux a été collecté trois fois par semaine, traité avec Triladyl® 35 allongeurs de jaune d'oeuf et congelés en pailles de 0,25 ml avec 15×10^6 spermatozoïdes par paille. Au total, les taux de non-retour au jour 90 après l'insémination (NRR90) de 263 816 inséminations en deux périodes ont été évaluées. Alors que le sperme collectés les lundis et mercredis a été équilibré pendant 24 h dans les deux périodes, sperme collecté le vendredi a été équilibré pendant 4 h dans la période 1 et équilibré pendant 40 72 h pendant la période 2. Aucune différence de NRR90 n'a pu être trouvée ($P > 0,05$). En conclusion, L'extension du temps d'équilibration de 4 h à 24-72 h peut améliorer la motilité et viabilité du sperme cryopréservé après décongélation. L'ampleur de l'amélioration du sperme La qualité dépend du prolongateur utilisé. Prolongation de la période d'équilibration 44 de 4 h à 72 h n'a eu aucun effet sur la fertilité au champ.

Mots-clés: Sperme de taureau, Cryoconservation, Période d'équilibrage, Prolongateur, Qualité du sperme, Fécondité.

Annexe N° 9:

L'effet d'un temps de maintien prolongé (HT) pendant le refroidissement sur l'intégrité de la membrane plasmique (MI), la motilité et la capacité de pénétration des ovocytes in vitro des spermatozoïdes de verrat congelés-décongelés différents types de colis ont été étudiés. La semence de sanglier a été congelée dans un plan d'échantillonnage fractionné utilisant 3 HT différentes (3, 10 et 20 h) pendant le refroidissement et trois types de congélation différents paquet: Maxi-pailles, moyennes-pailles et FlatPacks. Évaluation du PMI (SYBR-14 et iodure de propidium, microscopie à fluorescence) et la motilité des spermatozoïdes (visuellement et avec CASA) était fait pendant le refroidissement (à 32°C 15°C 5°C) et après décongélation (PT). La pénétration des ovocytes in vitro la capacité des spermatozoïdes a été testée

uniquement PT, en utilisant un test de pénétration homologue in vitro (VIHP). Pendant le refroidissement, les HT utilisés n'ont eu aucun effet significatif ($p < 0.05$) sur le PMI ou pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Le PMI post-dégel était significativement plus élevé ($p < 0.05$) pendant 10 h et 20 h HT contre 3 h, et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a diminué de manière significative avec 20 h HT au lieu de 3 h et 10 h. Concernant les emballages de congélation, les FlatPacks et Les maxi-paquettes ont donné un PMI significativement plus élevé que les paquettes moyennes ($p < 0.05$). Après le dégel la motilité était significativement plus élevée pour les FlatPacks que pour les paquettes, en termes de pourcentage spermatozoïdes mobiles, vitesse des spermatozoïdes et déplacement latéral de la tête (LHD). Le VIHP n'a pas montré des différences significatives entre les HT, bien que FlatPacks ait donné un taux de pénétration plus élevé et plus de spermatozoïdes par ovocyte pénétré ($p < 0.05$) que les paquettes. Des changements dans les modèles de motilité, vers une motilité plus circulaire pendant le refroidissement et le PT, pourraient être remarqués où les spermatozoïdes individuels ont montré un modèle de motilité de type capacitation. Les changements étaient plus évidents avec les HT de 10 h et 20 h qu'avec les HT de 3 h. Q 2001 par Elsevier Science Inc.

Mots clés: sanglier, spermatozoïdes, refroidissement, cryoconservation, test de pénétration in vitro.

Annexe N° 10 : Présentation de la PBRC



Biotechnologies Platform in Carnivore Reproduction

B.P 270 Road of Soumâa –
Blida
Phone /Fax:025.27.24.21
Mob: 0661.721.940

pbrc.univ.blida1@gmail.com



Missions of the platform

- Assist and advise on the scientific level and technical the various security services users of the canine resource in breeding and reproduction.
- Conduct research programs and scientific partnership in medicine, surgery and reproduction of domestic and wild carnivore.
- Participate in graduate and postgraduate university training, and retraining in medicine, surgery and reproduction of domestic and wild carnivore.
- Produce, cryo-conserve, store and transport animal semens.
- Provide services in medicine, surgery and reproduction of carnivore.
- Contribute to the development of experimental medicine and surgery on animal model in partnership with the University Hospital Centers and Medical Research Centers.
- Contribute to the development and modernization of utility dog farming in Algeria.
- Contribute to the preservation of local canines breeds and protected wild carnivore in Algeria.

Organization of the:

- The Biotechnologies Platform in Carnivore Reproduction is organized in four (04) technical sections namely:
- Section 1: Medicine, Surgery and Reproduction of Carnivore.
 - Section 2: Analysis, cryopreservation, storage and transport of animal semen.
 - Section 3: Microbiological and Genomic Analysis
 - Section 4: Laboratory animal facility

Fields of training:

- Training of recycling and upgrading of veterinary practitioners in medicine, imaging, surgery, anesthesiology and carnivore reproduction
- Training for Teachers and Researchers in Biotechnology of Reproduction
- Training for canine breeders and cynotechnicians in the different areas of livestock management and reproduction

Partners:

- The National Veterinary School of Algiers.
- The University of Tiaret.
- The University of Constantine.
- Blida University Hospital.
- CRAPC.
- The CRBt.
- Botanical Garden of El Hamma.



ANNEX N° :11

Courbe de congélation équine (micro digit cool, IMV)

Numéro de la courbe : 011
Nom de la courbe : EQUINE 4 degrés

| Numéro | Type de Segment | T° à Atteindre | Vitesse | Palier |
|--------|----------------------------|----------------|---------|--------|
| 1 | RAMPE | 4,00 | 5,00 | |
| 2 | PAUSE INTRODUCTION PRODUIT | | | |
| 3 | PALIER | | | 5,00 |
| 4 | RAMPE | -100,00 | 60,00 | |
| 5 | RAMPE | -140,00 | 30,00 | |
| 6 | PAUSE RETRAIT PRODUIT | | | |
| 7 | RAMPE | 45,00 | 300,00 | |
| 8 | PAUSE | | | |
| 9 | RAMPE | 20,00 | 30,00 | |
| 10 | FIN | | | |

Saisir la Température Cuve à atteindre en degrés

Annuler
Enregistrer
Visualisation
Insérer
Supprimer
Imprimer

Annexe N° 12 :



Figure : Mettre la semence dans un bain-marie a 22°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014).

Annexe N°13 :



Figure : Phase d'équilibration de la semence a 4°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014).

Annexe N°14 :

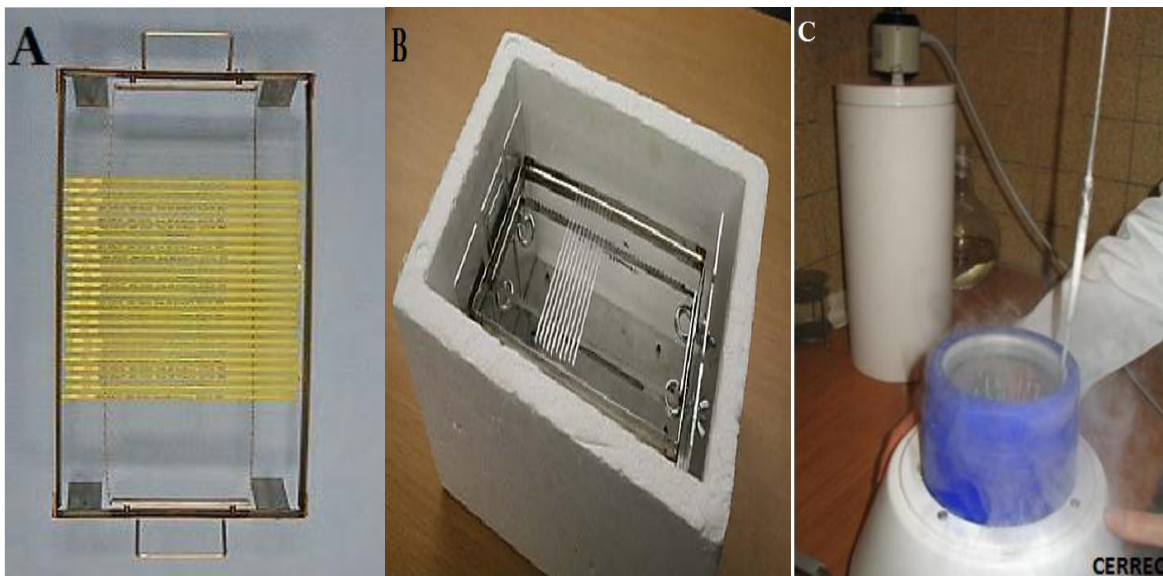


Figure : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (Dascanio, 2014 ; Steven et al, 2011).