Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un milieu de dilution et d'un protocole de cryopréservation de la semence de bélier

HENRIOUL, Fabrice

Award date:
1993

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 16. May. 2024

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

MISE AU POINT D'UN MILIEU DE DILUTION ET D'UN PROTOCOLE DE CRYOPRÉSERVATION DE LA SEMENCE DE BÉLIER

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

HENRIOUL Fabrice

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Mise au point d'un milieu de dilution et d'un protocole de cryopréservation de la semence de bélier

HENRIOUL Fabrice

Résumé

Au cours de nos investigations pour l'élaboration d'un milieu performant, toute une série de paramètres ont été optimalisés afin de répondre au mieux aux besoins des spermatozoïdes. Cette ainsi que notre milieu, par l'utilisation d'un tampon hepes-phosphate, permet de pallier à l'acidification du milieu en maintenant le sperme dilué à un pH optimum de 7,2. Les sucres inositol et fructose, en plus de leur rôle énergétique, permettent de maintenir la pression osmotique à un optimum de 320 mOsm/kg. Une réduction du métabolisme est possible par une conservation de la semence à 4°C. Il a également été observé que l'ajout des ions Na^+, Mg^{++} et Ca^{++}, favorisait la survie et la vitalité des spermatozoïdes. L'addition de gentamycine au dilueur, permet d'éviter toutes contaminations pathogènes. Le milieu dans sa version finale, permet une conservation en frais dépassant les deux jours, en gardant plus de 75% des gamètes en vie avec une motilité massale à un score supérieur à 4.

La mise au point du protocole de cryopréservation du sperme de bélier, nous a conduit à la récupération d'un pourcentage de spermatozoïdes vivants de plus de 45%. Ceci a été possible par l'utilisation d'une solution cryoprotectrice de glycérol à 4% final, additionné à 4°C en deux fois afin de limiter les stress osmotiques. La vitesse optimale de congélation est fixée à -20°C/min jusqu'à -100°C, pour une décongélation de la semence dans un bain à 60°C pendant 8 secondes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1993
Promoteur : R. Paquay
Co-promoteur : J.-L. Bister

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION
PREMIÈRE PARTIE

Chap. I Travail bibliographique

1. LE SPERME....2
1.1. Le spermatozoïde....2
1.1.1. Structure....2
1.1.1.1. La tête....2
1.1.1.2. Le col....4
1.1.1.3. Le flagelle....4
1.1.2. Motilité du spermatozoïde....5
1.1.2.1. Motilité et différenciation postgonadique....5
1.1.2.1.1. Evolution du mouvement flagellaire du spermatozoïde du bélier....6
1.1.2.1.2. Mise en place du mouvement....6
1.1.2.2. Motilité des spermatozoïdes éjaculés....7
1.1.2.2.1. Base du mouvement....7
1.1.2.2.2. Spermatozoïdes éjaculés....7
1.1.2.3. Facteurs influençant le mouvement flagellaire....7
1.1.2.3.1. Rôle du pH et des ions Na+ et K+....7
1.1.2.3.2. Viscosité du milieu et motilité....8
1.1.2.3.3. Rôle du calcium....8
1.2. Le plasma séminal....8
1.2.1. Composantes du plasma séminal....9
1.2.1.1. Sucres....9
1.2.1.2. Constituants organiques micellaires....9
1.2.1.3. Lipides, acides gras et prostaglandines....10
1.2.1.4. Protéines, acides aminés et enzymes....10
1.2.1.5. Ions....11
1.3. Facteurs affectant la survie et la fécondance des spermatozoïdes....11
1.3.1. Facteurs environnementaux....12
1.3.1.1. La température....12
1.3.1.2. La lumière solaire....12
1.3.1.3. Contact avec le métal....12
1.3.1.4. Contact avec l'eau....12
1.3.1.5. Impuretés et bactéries....12
1.3.1.6. Désinfectant....13
1.3.1.7. Exposition prolongée à l'air....13
1.3.1.8. Pouvoir tampon du dilueur....13

1.3.1.9. Pression osmotique du dilueur....13
1.3.2. Anomalies morphologiques....13
2. CONSERVATION DE LA SEMENCE *IN VITRO*....14
2.1. Altération de la semence lors du stockage *in vitro*....15
2.1.1. Effets des spermatozoïdes....15
2.1.2. Effets du plasma séminal....15
2.1.3. Effets des facteurs extérieurs....16
2.2. Motivations biologiques à la dilution....16
2.3. Motivations techniques à la dilution....17
2.4. Composants d'un milieu de dilution....17
2.4.1. Tampon....18
2.4.2. Sucres....18
2.4.3. Protéines....18
2.4.4. Lipides....18
2.4.5. Antibiotiques....19
2.4.6. Protecteurs spermatiques: les vitamines....19
2.4.6.1. Les vitamines liposolubles....19
2.4.6.2. Les vitamines hydrosolubles....20
3. CRYOPRESERVATION DE LA SEMENCE....20
3.1. Généralités sur la cryobiologie....20
3.1.1. La cristallisation....20
3.1.2. Cinétique de la congélation....21
3.1.3. Utilisation d'une solution cryoprotectrice....22
3.2. Cryopréservation du sperme de bélier....23
3.2.1. Vitesse optimale de congélation....23
3.2.2. Stockage de la semence congelée....24
3.2.3. Décongélation de la semence....24
3.2.4. Action membranaire de la congélation....25
3.2.5. Facteurs influençants la survie des cellules à la congélation....26
3.2.5.1. Influence de la photopériode....26
3.2.5.2. Facteurs propres à l'individu....26
3.2.5.3. Influence des conditions de stockage de la semence....27

DEUXIÈME PARTIE: RECHERCHE PERSONELLE

Chap. II Objectifs....28
Chap. III Matériel et méthodes....30

1. ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION 30
1.1. Béliers 30
2. PRELEVEMENTS 30
2.1. Matériel 30
2.2. Méthode 31
3. ANALYSE DE LA SEMENCE 31
3.1. Analyse macroscopique 31
3.2. Analyse microscopique 32
3.2.1. Motilité 32
3.2.1.2. Motilité massale (M.M.) 32
3.2.1.3. Motilité individuelle 33
3.2.2. Frottis morts/vivants 33
3.3. Mesure de la concentration 34
4. TRAITEMENT DE LA SEMENCE EN FRAIS 34
4.1. Dilution du prélèvement 34
4.2. Composants ayant servis pour l'élaboration du dilueur (DBH) 35
4.2.1. Tampons 35
4.2.2. Sucres 35
4.2.3. Ions 35
4.2.4. Protecteurs membranaires et albumine 35
4.2.5. Antibiotiques 36
4.3. Refroidissement à 4°C 36
4.4. Préparation du dilueur en frais (DBH) 36
5. TRAITEMENT DE LA SEMENCE EN VUE DE LA CONGÉLATION 37
5.1. Dilution de la semence 37
5.2. Congélation 37
5.3. Décongélation 38
5.4. Cryoprotecteurs (CPA) étudiés 38
6. METHODE D'ANALYSES STATISTIQUES 40

Chap. IV Resultats, discussions, conclusion 41
1. MISE AU POINT D'UN MILIEU DE DILUTION POUR LA SEMENCE D'OVIN 41
1.1. Choix d'un tampon 41
1.1.1. Schéma expérimental 41
1.1.2. Résultats 42
1.1.3. Discussion 43
1.1.4. Conclusions 43
1.2. Choix d'une combinaison de sucres 43

1.2.1. Schéma expérimental 44
1.2.2. Résultats 44
1.2.3. Discussion 45
1.2.4. Conclusion 45
1.3. Détermination d'une pression osmotique optimale 46
1.3.1. Schéma expérimental 46
1.3.2. Résultats 46
1.3.3. Discussion 47
1.3.4. Conclusions 47
1.4. Choix d'une combinaison ionique 47
1.4.1. Schéma expérimental 47
1.4.2. Résultats 48
1.4.3. Discussion 48
1.4.4. Conclusion 50
1.5. Observation des effets de différentes concentrations en albumine 50
1.5.1. Schéma expérimental 50
1.5.2. Résultats 50
1.5.3. Discussion 50
1.5.4. Conclusion 51
1.6. Choix de protecteurs spermatiques 51
1.6.1. Schéma expérimental 51
1.6.2. Résultats 51
1.6.3. Discussion 52
1.6.4. Conclusion 52
1.7. Choix d'un antibiotique 52
1.7.1. Schéma expérimental 52
1.7.2. Résultats 53
1.7.3. Discussions 53
1.7.4. Conclusions 54
1.8. Comparaison de notre milieu avec d'autres milieux de dilution 54
1.8.1. Schéma expérimental 55
1.8.2. Résultats 55
1.8.3. Discussions 55
1.8.4. Conclusions 56
2. CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR LE MILIEU DE DILUTION 57
3. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONGÉLATION DE LA SEMENCE D'OVIN 59
3.1. Observation de la survie en frais des spermatozoïdes dans différentes solutions cryoprotectives 59

3.1.1. Schéma expérimental 60
3.1.2. Résultats 60
3.1.3. Discussions 61
3.1.4. Conclusions 62
3.2. Choix d'un cryoprotecteur et d'une vitesse de congélation 62
3.2.1. Schéma expérimental 62
3.2.2. Résultats 63
3.2.3. Discussions 64
3.2.4. Conclusions 65
3.3. Choix d'une vitesse de décongélation 65
3.3.1. Schéma expérimental 65
3.3.2. Résultats 65
3.3.3. Discussion 66
3.3.4. Conclusions 66
3.4. Choix d'un mode de conditionnement 66
3.4.1. Schéma expérimental 66
3.4.2. Résultats 67
3.4.3. Discussions 67
3.4.4. Conclusions 68
3.5. Observation des variations raciales 68
3.5.1. Schéma expérimental 68
3.5.2. Résultats 68
3.5.3. Discussions 69
3.5.4. Conclusions 69
4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR LA MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONGÉLATION 69

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Au terme de cette année passée au laboratoire de Physiologie Animale où se termine mon mémoire, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur R. Paquay, mon promoteur, qui par ses nombreuses remarques judicieuses, me fut d'un grand secours lors de la rédaction de ce travail.

Je tiens également à montrer toute ma sympathie au Dr Jean-Loup Bister, mon co-promoteur, pour son aide précieuse qui a permis de mener à bien toutes les expériences.

Des remerciements tout particuliers sont à faire à Mlle Bénédicte Noël (chef), qui par sa patience et son dévouement, a fait de cette année un très bon moment.

Que les membres du laboratoire ainsi que le personnel de Faulx-les-Tombes, soient remerciés pour leur accueil, leur patience et leur assistance.

Pour terminer, j'exprime toute ma reconnaissance à mes parents, qui m'ont permis d'arriver au terme de ces études, ainsi qu'à ma soeur, mon amie et toutes les personnes de mon entourage qui me furent d'un grand soutien.

INTRODUCTION

Dans un contexte économique tel que nous le vivons, la notion de rentabilité dans tous les secteurs de la société et particulièrement dans le domaine agricole est une nécessité absolue. Ce concept de productivité et de rentabilité passe par une amélioration animale et une meilleure maîtrise des processus de reproduction des animaux domestiques. Cette maîtrise permettrait entre autres des campagnes d'insémination à grande échelle avec un minimum de perte, et l'établissement d'une sélection des individus les plus productifs.

C'est principalement sur ces deux points que vont intervenir les acquis ultérieurs de ce mémoire. De fait, le conditionnement de la semence de bélier, étape nécessaire à l'insémination artificielle (IA.), joue un rôle prépondérant car il permet, entre autres, grâce à la dilution de la semence:

- d'augmenter le volume d'un éjaculat après dilution, ce qui présente comme avantage de pouvoir inséminer plusieurs brebis avec un même éjaculat;
- de véhiculer le matériel génétique avec une plus grande facilité;
- de ne diffuser que les gamètes des meilleurs géniteurs;
- de pallier les problèmes posés par les animaux récalcitrants.

C'est donc en réponse à ces avantages qu'il nous a paru nécessaire d'effectuer la mise au point pour le sperme de bélier, d'un milieu de dilution performant et entièrement contrôlé en laboratoire. De fait, les milieux actuellement utilisés ne permettent pas une conservation suffisante de la semence au delà d'une dizaine d'heures. D'autre part, il nous est également apparu nécessaire d'établir un protocole de congélation de la semence qui échelonnerait dans le temps les avantages acquis par le dilueur. La congélation autoriserait également la création d'un stock de semence des béliers d'élite, permettant de mieux répondre à une demande importante d'IA.

Le travail comprend deux parties. La première est une étude bibliographique du sujet afin de mieux cerner le contexte dans lequel vont s'inscrire les recherches expérimentales qui constituent la deuxième partie.

PREMIÈRE PARTIE
CHAPITRE I.
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

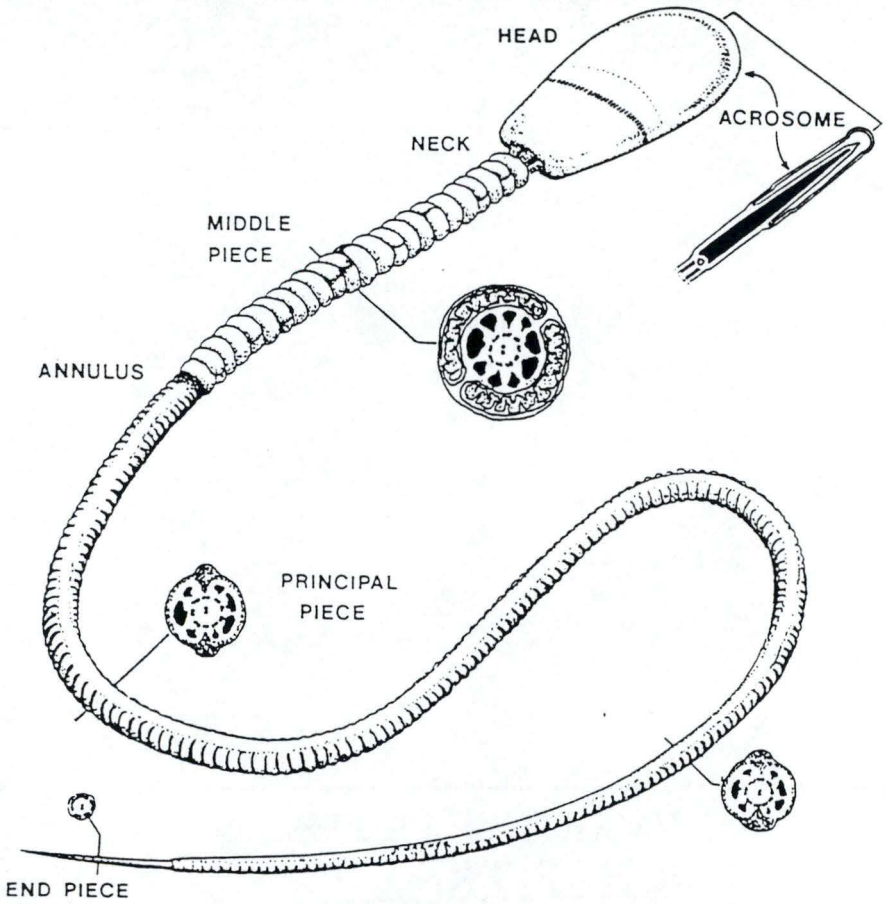


Fig. 1. Représentation structurale du spermatozoïde (Hafez, 1980).

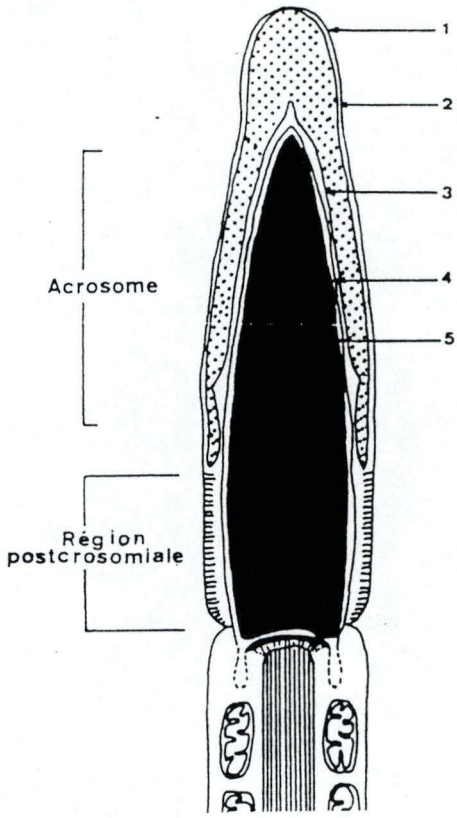


Fig. 2. Représentation sagittale du spermatozoïde. (1) Membrane plasmique, (2) membranes acrosomiales externe et (3) interne, (4) enveloppe nucléaire, et (5) noyau (Derivaux et Ectors, 1986).

1. LE SPERME

Le sperme est le liquide émis lors de l'éjaculation. Il est constitué d'une part des sécrétions produites par les différentes glandes génitales mâles, et d'autre part par la fraction cellulaire, les spermatozoïdes.

Egalement appelé éjaculat, il présente chez le bélier une variabilité relativement importante, tant au point de vue du volume (de 0.2 à 3 ml) que de la concentration et de la qualité des spermatozoïdes. Ces variations sont principalement dues à des facteurs individuels, de race et saisonniers. Le tout est déterminé par l'efficience de la spermatogenèse, la qualité de la maturation épididymaire et la fréquence d'éjaculation liée à l'activité sexuelle du bélier.

1.1. LE SPERMATOZOÏDE

De l'ordre de 3 à 5.10^9 par ml d'éjaculat, les spermatozoïdes sont une des cellules les plus petites de l'organisme, ils sont conçus pour la propagation des gènes qu'ils portent, et sont profilés pour avoir une motilité maximale, leur conférant de ce fait un maximum de chance dans la "course pour la fécondation".

1.1.1. Structure

Le spermatozoïde est constitué de trois sections bien distinctes: la *tête*, le *col*, et la *queue*, elle même subdivisée en trois pièces (Fig.1).

1.1.1.1. La tête

Constituant la partie principale de la cellule, la tête du spermatozoïde de bélier a une longueur de 9 µm sur 5 µm de large. Avec son profil fusiforme et son apparence de massue, elle est composée de différentes parties essentielles pour la fécondation (Fig.2).

Le noyau est constitué d'une chromatine plus dense, plus compacte et plus petite que celle des cellules somatiques. Cette réduction de près de moitié est notamment due à une division réductionnelle lors de la spermatogenèse. Une particularité de cette chromatine organisée en fibres hélicoïdales, est la nature des histones, différentes de celles du type somatique, riches en arginine et en protamines (Metz et Monroy, 1985).

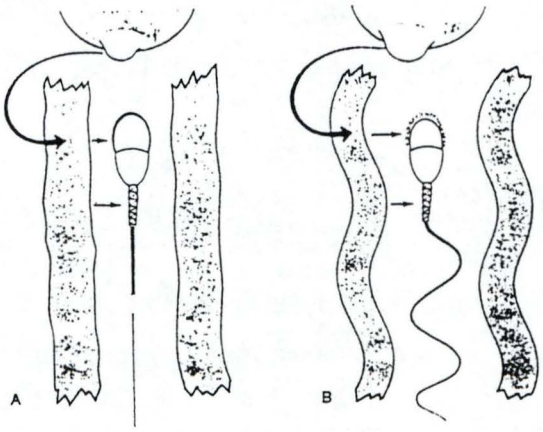


Fig. 3. Modèle illustrant la manière par laquelle l'activité endocrine des follicules de de Graaf agit localement pour programmer la configuration de la membrane et la motilité du spermatozoïde dans le lumen et l'isthme de l'oviducte. Les hormones agissent sur l'épithélium de l'oviducte dont les sécrétions influencent ensuite le fluide luminal.
A: Spermatozoïde sous l'influence d'un follicule pré-ovulatoire. B: Réaction acrosomiale et hyperactivité du spermatozoïde en réponse à un follicule de de Graaf sur le point d'ovuler (Hunter, 1987).

Intimement appliqué contre le noyau, l'acrosome ou vésicule acrosomale constitue les deux tiers antérieurs de la tête. Il serait un élément indispensable lors de la fécondation en permettant la pénétration et la fusion à l'ovocyte. On y distingue deux parties.

L'acrosome proprement dit est le segment bordé d'une simple membrane provenant de la fusion de vésicules golgiennes des spermatides (Hafez,1980). Cette partie renferme différents enzymes hydrolytiques qui sont libérés lors de la réaction acrosomiale. Parmi ceux-ci on peut citer la proacrosine, l'acrosine, l'hyaluronidase, des estérases,... (Derivaux et Ectors,1986).

Le perforatorium est constitué principalement d'actine et de myosine. Une brusque modification dans l'organisation de ces deux composés provoque une poussée au travers de l'acrosome, ce qui a pour conséquence directe la libération du contenu acrosomial. Le stockage de l'actine se ferait sous forme globulaire ou comme filament hélicoïdal associé à d'autres protéines telles que la spectrine, la profiline et la α–actine (Metz et Monroy, 1985). On situe le perforatorium en région équatoriale et au pôle antérieur de l'acrosome.

La réaction acrosomiale

Le relargage du contenu acrosomial permet le passage du gamète mâle au travers des barrières que présente l'ovocyte (corona radiata et zone pellucide). En fait, la réaction acrosomiale serait une conséquence de modifications des membranes subies bien antérieurement lors du processus de capacitation (Töpfer-Petersen *et al.*,1988). Au cours de ce processus, le spermatozoïde se voit modifié lors du passage dans le tractus génital femelle. Il y a élimination ou modification de substances intégrées dans le plasma séminal lesquelles pourraient avoir des effets décapacitants.

On observe également une fluidification de la membrane résultant du retrait du cholestérol membranaire qui serait dès lors pris en charge par de l'albumine ou d'autres molécules sécrétées par le tractus génitital femelle.

Mais les modifications membranaires ne sont pas les seuls impératifs pour la fécondation; une hyperactivation marque la capacitation par une augmentation du rythme flagellaire, dépendant de la présence de Ca^{++} (Bearer et Friends,1990).

Parallèlement, on observe un accroissement de l'activité de l'adénylate cyclase (Ca^{++} dépendante) et une dépression dans l'activité phosphodiestérase, suggérant une élévation du niveau de l'AMPc lors de la capacitation. De même, les glycoaminoglycans présents dans les sécrétions génitales femelles vont favoriser la conversion de la proacrosine en acrosine, stimulant ainsi l'activité protéolytique.

La réaction acrosomiale débute par la fusion de la membrane plasmique et de la membrane acrosomiale externe, ce qui induit la formation d'un passage conduisant à la

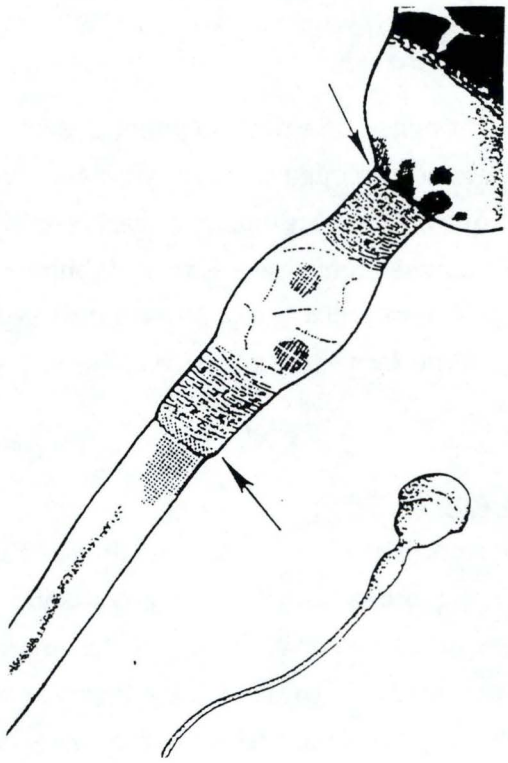


Fig. 4. Schéma montrant la jonction entre la tête et la queue du spermatozoïde. La flèche supérieure indique l'anneau strié et l'inférieure, l'annulus (Bearer et Friend, 1990).

libération du contenu enzymatique. Cette fusion va se résorber progressivement permettant de démasquer certains enzymes, tel que l'acrosine, dont une fraction reste accrochée à la membrane acrosomiale interne. Dans les conditions naturelles, l'induction de cette réaction se fait par contact avec les cellules du cumulus oophorus ou de la zone pellucide.

Toutefois, certains auteurs tel Bedfort (1982), ont suggéré longtemps que la capacitation était une réponse à des événements inhérents à l'ovocyte nouvellement ovulé. Ceci a été mis en doute par Hunter (1987) qui voit la capacitation comme un phénomène périovulatoire-dépendant. Il se base sur le fait que toutes les études sur la capacitation se sont faites dans des périodes post-ovulatoires (donc en présence de l'ovocyte), ce qui a débouché sur des données conduisant à des interprétations biaisées. Pour lui, ce serait l'activité endocrine du follicule de de Graaf qui régulerait la programmation physiologique du tractus génital femelle et la maturation du spermatozoïde (Fig.3). On aurait donc, d'une part des protéines spécifiques du plasma séminal qui inhiberaient l'évolution ou l'achèvement de la capacitation, d'autre part une induction (facilitation) de la capacitation ultérieure qui serait gérée par les sécrétions de ces follicules terminaux.

1.1.1.2. Le col

Le col du spermatozoïde est une pièce connective de la tête et de la queue. Il permet l'articulation de celle-ci grâce à une dépression située dans la région postérieure du noyau et qui est un point des plus vulnérables du spermatozoïde (Derivaux et Ectors,1986). Outre son rôle de connection, il possède l'appareil centriolaire avec un centriole proximal (parallèle à la base du noyau) et un centriole distal (qui lui est perpendiculaire). Cet appareil marque également le début du filament axial parcourant tout le flagelle (Fig.4). Circonférentiellement, on trouve des mitochondries accolées à une membrane dotée de particularités telles que des "colliers" de particules encerclant tout le col (Bearer et Friends, 1990). Il n'est pas rare d'observer des vésicules de cytoplasme non éliminées lors de la maturation.

1.1.1.3 Le flagelle

Responsable du mouvement du spermatozoïde, le flagelle est divisé en trois parties, chacune d'elles présentant un diamètre décroissant vers la région postérieure.

La pièce intermédiaire s'étend du centriole distal à l'anneau centriolaire (*annulus*); elle constitue la partie la plus épaisse de la queue et serait considérée comme le moteur du mouvement (Lamming,1990).

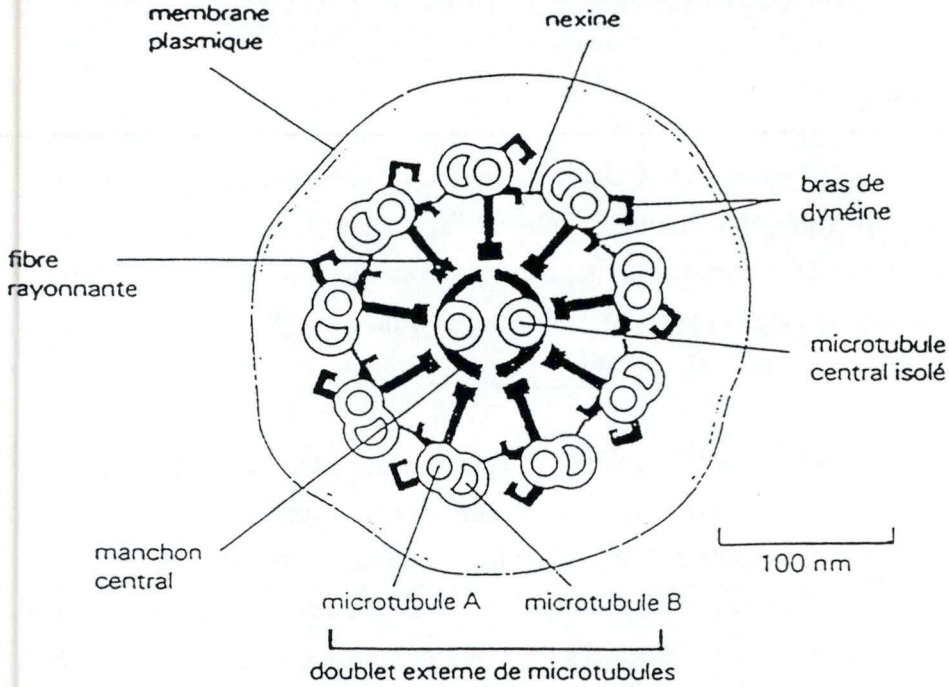


Fig. 5. Représentation schématique de l'organisation de l'axonème dans le flagelle (Metz et Monroy, 1985).

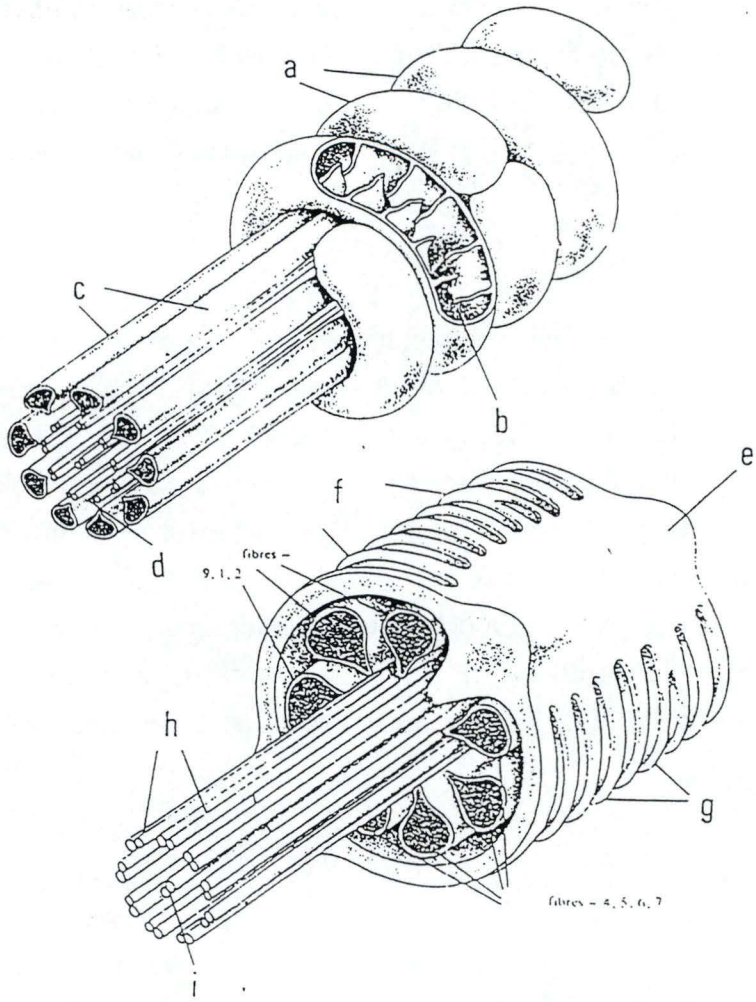


Fig. 6. Pièce intermédiaire du flagelle (1) et portion de la pièce principale (2). A: Gaine mitochondriale, B: mitochondrie, C: fibres denses, D: microtubules, E: colonne fibreuse longitudinale, F-G: fibres circulaires, H: doublets de l'axonème, I: microtubule centrale.

L'*axonème* ou filament axial est constitué de neuf paires de microtubules arrangées radiairement autour de deux microtubules centraux (Fig.5). Associées à ces cylindres de 0.18 mm de diamètre (Metz et Monroy,1985), et les entourant, on retrouve neuf fibres denses ayant des propriétés élastiques et contractiles (Hafez,1980). Chaque cylindre fibrillaire est entouré d'une enveloppe mitochondriale, elle même entourée d'une couche de protoplasme et d'une membrane cytoplasmique. Cette enveloppe est riche en lipides et on peut y trouver le système cytochrome-oxydase des spermatozoïdes (Derivaux et Ectors,1986).

La pièce principale est située postérieurement à l'annulus et représente le segment le plus long du spermatozoïde. Tout comme la pièce intermédiaire, elle est constituée de l'axonème et de ses fibres surnuméraires, mais le manchon mitochondrial a laissé place à une gaine fibreuse ayant pour rôle de conférer une stabilité aux éléments contractiles de la queue. Cette gaine est caractérisée par deux épaississements longitudinaux s'étendant tout le long de la pièce et qui marqueraient la face ventrale et dorsale. (Fig.6)

La pièce terminale n'est finalement plus constituée que des filaments axiaux et de la membrane plasmique.

1.1.2. Motilité du spermatozoïde

La motilité du spermatozoïde est un facteur essentiel pour la fécondance de celui-ci (Lamming, 1990). Son évaluation par estimation, soit de la motilité massale soit de la motilité individuelle, permet à l'expérimentateur de juger de la qualité de la semence.

1.1.2.1. Motilité et différenciation postgonadique

Lors de sa sortie de la gonade, le spermatozoïde n'est pas motile; l'acquisition de cette capacité se fait progressivement lors du transit au travers de l'épididyme (Dacheux et Paquignon, 1980, Bork *et al.* 1988). Au cours de cette progression, dès les premières zones épididymaires, des changements dans la cellule vont être à l'origine de l'initiation de la motilité et de l'apparition du pouvoir fécondant (Dacheux *et al.*, 1987). On remarque une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc, ainsi que des modifications dans l'activité de certains enzymes.

Dans cette première partie de l'épididyme, la majorité des structures membranaires externes du spermatozoïde testiculaire est éliminée ou masquée, laissant place à de nouveaux constituants dans la deuxième partie du transit. On peut également mentionner des changements importants dans la composition lipidique du spermatozoïde.

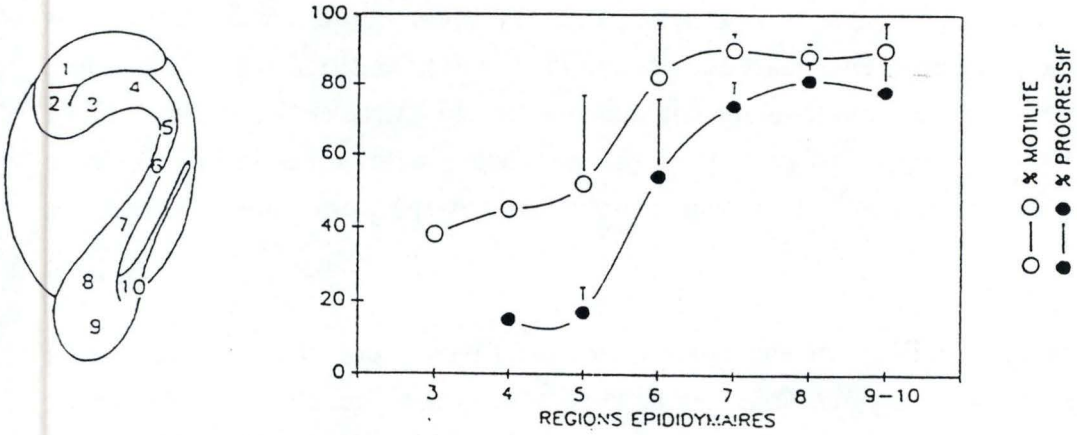


Fig. 7. Evolution du pourcentage de spermatozoïdes motiles et progressifs au cours du transit épididymaire (Chevrier et Dacheux, 1990a).

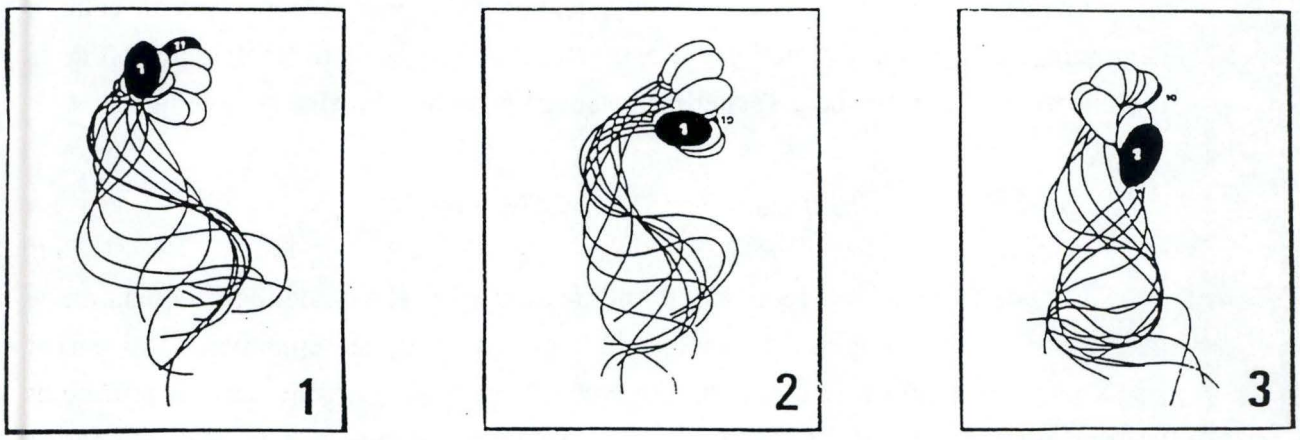


Fig. 8. Représentation réelle du mouvement des spermatozoïdes; l'intervalle entre deux prises est de 10 msec. Schémas 1 et 2: mouvement flagellaire non coordonné, 3: mouvement progressif (Chevrier et Dacheux, 1990a).

La motilité, critère plus facilement observable, évolue au cours de l'avancée au travers du transit épididymaire. Inexistante à la sortie du testicule, elle s'accroît entre les parties antérieure et terminale de l'épididyme (Fig. 7).

1.1.2.1.1. Evolution du mouvement flagellaire du spermatozoïde du bélier

Dans la partie antérieure de l'épididyme, le mouvement flagellaire est seulement marqué par des oscillations sans propagation d'ondes et ne générant aucun mouvement progressif de la part du spermatozoïde.

Dans le corps médian, on retrouve toujours ces mouvements flagellaires immatures, auxquels viennent s'ajouter des mouvements de type transitoire, avec une amplitude de battement flagellaire élevée qui provoque une oscillation latérale de la tête ne conduisant à aucune progression effective (Fig.8-1). Est présent également un troisième type de mouvements s'opposant au deuxième par le fait que les déplacements de la tête sont moindres et que les ondes flagellaires se déplacent plus rapidement, générant ainsi une certaine progression (Fig.8-2). La proportion de spermatozoïdes à mouvements de type mature est faible dans cette région (20%). Ces mouvements sont caractérisés par une amplitude de courbure flagellaire très faible et un battement symétrique et coordonné (Fig.8-3). La proportion de spermatozoïdes à mouvement mature croît au cours du transit pour finalement être maximale dans la partie caudale (Chevrier et Dacheux, 1988, 1990(a)).

1.1.2.1.2. Mise en place du mouvement

L'initiation progressive du mouvement des spermatozoïdes lors de la maturation épididymaire suggère l'implication de deux mécanismes d'interaction dynéine-tubuline.

Le premier initie sur le flagelle une courbure statique qui serait induite par une contrainte localisée et résulterait d'un changement dans l'organisation du cytosquelette.

Le second induit la propagation d'ondes sur le flagelle. Il se produit progressivement au cours de la maturation et parallèlement à la régression de la courbure statique.

Ces mécanismes, encore mal connus, ne seraient que l'expression de la mise en place progressive de la réversibilité des interactions entre dynéine et tubuline. Le calcium et l'AMPc seraient susceptibles de les influencer (Lindemann *et al.*, 1987).

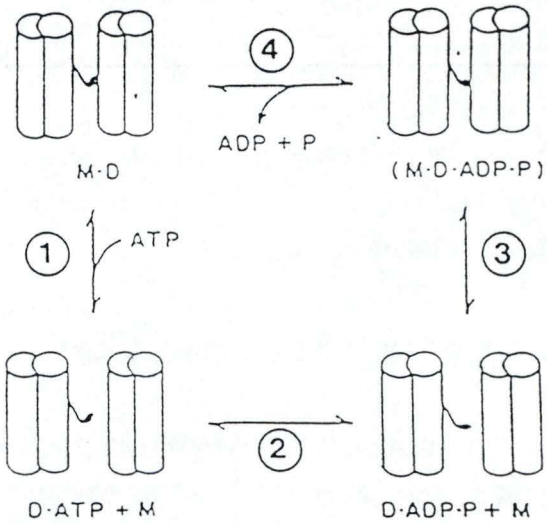


Fig. 9. Mécanisme pour le glissement microtubulaire. M: microtubule, D: dynéine.
1: Fixation d'ATP sur la dynéine entraînant le détachement du bras de son site sur la sous-unité B.
2: Hydrolyse de l'ATP entraînant l'extension du bras.
3: Liaison du bras à la sous-unité B du microtubule adjacent.
4: Changement d'angle du bras adoptant ainsi une position rigide quand l'ATP est hydrolysé. Le tout provoque un glissement microtubulaire.

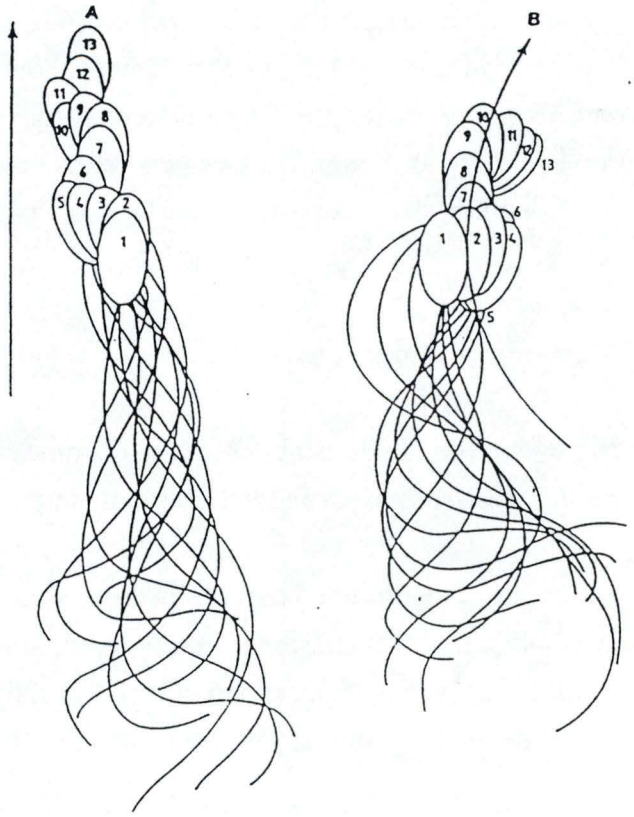


Fig. 10. Représentation de la progression du spermatozoïde éjaculé. A: mouvement rectiligne, B: mouvement circulaire (Chevrier et Dacheux, 1987).

1.1.2.2. Motilité des spermatozoïdes éjaculés

1.1.2.2.1. Base du mouvement

Les mouvements du spermatozoïde éjaculé sont basés sur l'existence de réseaux complexes de filaments protéiques formant le cytosquelette cellulaire et le moteur moléculaire de la cellule. Les microfilaments d'actine et les microtubules interagissant avec plusieurs autres protéines peuvent générer différents mouvements. Ces interactions sont énergie-dépendantes et nécessitent des protéines capables :

1. d'hydrolyser l'ATP (dynéine);
2. de reconnaître l'actine des microfilaments, la tubuline des microtubules et les constituants spécifiques de la membrane des organites;
3. de changer de conformation par induction suite à la fixation d'ATP (Fig.9).

1.1.2.2.2. Spermatozoïdes éjaculés

Deux types de progressions différentes sont observés pour les spermatozoïdes de bélier; l'une rectiligne, l'autre circulaire (Chevrier et Dacheux, 1987). (Fig.10).

En trajectoire rectiligne, il y a formation de l'onde à la base du flagelle. L'angle formé par le flagelle augmente avec sa progression sur l'axonème. L'angulation est maximale quand l'onde atteint le dernier quart du flagelle. Une onde se forme lorsque la précédente a atteint la moitié de sa valeur maximale. On assiste à une progression uniforme du spermatozoïde avec oscillation régulière de la tête (Fig.10-A).

En trajectoire circulaire, on observe un développement assez asymétrique des ondes le long du flagelle, ces ondes atteignant leur valeur maximale dans la première partie du flagelle. C'est la perte du synchronisme de propagation des ondes qui entraîne ce phénomène. Un retard de propagation de l'onde sur un des côtés de l'axonème dans la pièce intermédiaire est observé, contrairement au mouvement rectiligne où la progression des ondes flagellaires est synchronisée de part et d'autre de l'axonème (Fig.10-B). Les causes de ces variations restent encore méconnues.

1.1.2.3. Facteurs influençant le mouvement flagellaire

1.1.2.3.1. Rôle du pH et des ions Na^+ et K^+

On peut observer au cours du transit épididymaire une diminution du taux de Na^+

dans le milieu et une augmentation de celui du K^+. L'action de ces ions externes sur la motilité et le métabolisme des spermatozoïdes est clairement établi (Dacheux et Paquignon,1980).

Le pH du milieu évolue également; il passe de 7.40 dans le fluide testiculaire à 6.48 dans la région antérieure de l'épididyme et à 6.85 dans le région postérieure. On peut mettre en relation cette baisse de pH et la localisation de la zone où apparaît la motilité "potentielle" des spermatozoïdes. Toutefois, le spermatozoïde de bélier montre une motilité maximale pour des valeurs de pH allant de 7 à 8 (Gatti *et al.*, 1992).

Le pH interne dans le gamète du bélier est fortement dépendant du pH externe et un équilibre entre les deux s'établit relativement vite. Cette régulation ne serait pas, chez le mouton, liée à la présence d'échangeurs membranaires Na^+/H^+ ou K^+/H^+. Ce serait plutôt l'échangeur membranaire chlore/bicarbonate qui serait impliqué dans cette régulation.

Mais, chez le bélier, le pH ne représente pas un facteur déterminant pour la régulation de la motilité car on peut encore observer des pourcentages significatifs de spermatozoïdes motiles dans un milieu à pH extrême (6 ou 9).

1.1.2.3.2. Viscosité du milieu et motilité

Lors d'un accroissement de la viscosité, une diminution significative de la fréquence des battements flagellaires est enregistrée, qui reflète la résistance rencontrée lors de la poussée ondulatoire.

1.1.2.3.3. Rôle du calcium

On a constaté qu'une exposition à une concentration en calcium extracellulaire supérieure à 5mM engendre une altération de la motilité du spermatozoïde de bélier.

Il existerait un niveau critique de calcium libre interne pour le maintien du fonctionnement de l'axonème.

Différentes voies peuvent être empruntées par cet ion pour agir sur la régulation du fonctionnement de l'axonème. La cascade calmoduline/AMPc/phosphorylase semble la plus probable (Pariset *et al.*, 1985, cités par Chevrier).

1.2. LE PLASMA SÉMINAL

Le plasma séminal est un amalgame de sécrétions produites par l'épididyme et les glandes annexes de l'appareil génital. La contribution de chacune d'elles est variable suivant l'espèce et même de façon individuelle, ce qui expliquerait les variations

Tabl. 1 Caractéristiques et compositions approximatives du plasma séminal (Hafez, 1980).

Constituent or Property	Bull	Ram	Boar	Stallion	Dog	
					SBF	PF
Volume of ejaculate (ml)	5–8	0.8–1.2	150–200	60–100	1–5	5–20
pH	*6.9(6.4–7.8)	*6.9 (5.9–7.3)	*7.5 (7.3–7.8)	*7.4 (7.2–7.8)	6.3	6.8
Sodium	225±13	178±11	587	257	332±11	335±10
Potassium	155± 6	89± 4	197	103	31± 4	34± 3
Calcium	40± 2	6± 2	6	26	5± .5	4± .6
Magnesium	8± .3	6± .8	*11 (5–14)	9	4± 1	2± .5
Chloride	174–320	86	*330 (260–430)	448	444	525
Fructose	460–600 (SV)	*250 (SV)	9 (SV)	*2 (0–6)	1	1
Sorbitol	*(10–140) (SV)	*72 (26–120) (SV)	*12 (6–18)	*40 (20–60)	Trace	
Citric acid	620–806 (SV)	*140 (110–260) (SV)	173 (SV)	*26 (8–53) (SV)	4	<30
Inositol	*35 (25–46)	*12 (7–14)	*530 (380–630) (SV)	*30 (20–47)		
Glycerylphosphorylcholine (GPC)	*350 (100–500) (E)	*1650 (1100–2100) (E)	*(110–240) (E)	*(40–100) (E)	176	20
Ergothioneine	*0	*0	17 (SV)	*(40–110) (A)		
Protein (g/100 ml)	*6.8	*5.0	*3.7	*1.0	3.7	2.8

* Analyses on whole semen. Mean values (mg/100 ml of seminal plasma unless otherwise indicated) are given, S.E. or range.

SBF, Sperm-bearing fraction; *PF*, prostatic fluid; *SV*, mainly from seminal vesicles; *E*, mainly from epididymis; *A*, from ampullae.

volumétriques rencontrées (Shani *et al.* , 1988). La synthèse des composants de ce fluide par les glandes serait modulée par la sécrétion de testostérone par le testicule. Il en résulte que comme l'activité androgène du testicule est antérieure à son activité spermatogénique, les spermatozoïdes peuvent bénéficier de substrats métabolisables dès leur formation (Derivaux et Ectors,1986).

De fait, outre sa fonction de transport des spermatozoïdes, le plasma séminal est un milieu isotonique et neutre qui contient de nombreuses substances énergétiques directement assimilables par la cellule, ou qui le deviennent après mélange à des sécrétions de la femelle; c'est le cas de la glycérylphosphorylcholine (GPC).

L'intérêt biochimique du plasma est basé sur le fait qu'on y retrouve certains composés biochimiques particuliers dont les quantités (en proportion) sont supérieures à celles rencontrées dans le reste de l'organisme (Hafez,1980), (Tabl.1).

1.2.1. Composantes du plasma séminal

1.2.1.1. Sucres

Le fructose est le composé glucidique le plus important du sperme, avec des concentrations individuelles variant de 100 à 500 mg/100ml, et interspécifiques allant jusqu'à 1g/100ml. C'est la source majeure d'énergie pour le spermatozoïde et son utilisation via la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof conduit à l'accumulation d'acide lactique si celui-ci n'est pas mis en contact avec de l'oxygène qui l'oxyde en eau et anhydride carbonique (cycle de Krebs). Il proviendrait du glucose sanguin et subirait la "métamorphose" au niveau des glandes, ce qui pourrait expliquer la présence de glucose et de sorbitol dans la plasma.

Le glucose est en concentration plus faible que le fructose (40 à 100mg/100ml), et peut également être métabolisé par la voie glycolytique (Setchell et Hinks, 1966).

L'inositol est en concentration relativement faible chez le bélier et représente pour d'autres espèces (verrat) un facteur essentiel notamment pour le maintien de la pression osmotique. Il n'est toutefois pas métabolisé par le spermatozoïde.

Le sorbitol, également en concentration faible est, par contre, métabolisable suite à une oxydation en fructose.

1.2.1.2. Constituants organiques micellaires

La glycérylphosphorylcholine (GPC) se trouve en relativement grande proportion

dans le plasma séminal des animaux domestiques, tandis que chez l'homme on trouve principalement la phosphorylcholine (PC). Ce sont des substrats énergétiques qui ne sont pas directement assimilables par le spermatozoïde; ils le deviennent après action d'un enzyme se trouvant dans les sécrétions de la femelle et qui provoque la formation de phosphoglycérols métabolisables par le spermatozoïde (Hafez, 1980; Derivaux et Ectors, 1986).

L'acide citrique, de concentration très variable (50 à 800 mg/100ml), est un composé important du plasma séminal. Synthétisé également au niveau des vésicules séminales, il n'a pas une importance capitale en tant que source énergétique pour le spermatozoïde, mais il jouerait un rôle non négligeable dans la coagulation de sperme chez l'homme (Lamb et Foster,1988).

1.2.1.3. Lipides, acides gras et prostaglandines

Le sperme de bélier contient différents lipides:

- des phospholipides qui constituent la fraction majeure des lipides dans le plasma (PC, éthanolamine, cardiolipine et sphingomyéline);
- du cholestérol;
- des di- et des triglycérides.

Leur utilisation n'est pas connue mais ils joueraient un rôle énergétique.

Les prostaglandines (PG) sont dérivées d'acides gras insaturés. On ne leur connaît pas d'effet sur le métabolisme ni sur la motilité des spermatozoïdes de bélier. Chez le mouton, on trouve des concentrations de l'ordre de 40 mg/ml pour PGE_2 et de très faibles quantités de $PGF_{2\alpha}$ sont notées. L'action connue des PG sur les muscles lisses suggère qu'elles interviendraient comme aide pour le transport des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle. Des expériences ont montré une augmentation de la fertilité par addition de prostaglandines.

1.2.1.4. Protéines, acides aminés et enzymes

Les protéines des spermatozoïdes ont pour rôle d'exercer une action protectrice en neutralisant les effets néfastes des métaux lourds se trouvant dans le plasma, et de prévenir l'agglutination des cellules.

La teneur en protéines du plasma séminal est variable chez les individus. Elle va de 3 à 7% auxquels il convient d'ajouter les polypeptides produits par la dégradation protéique. Le taux d'acides aminés dépend de l'activité androgène du testicule.

Parmi les enzymes, on peut citer le *Lactic déhydrogénase* (LDH) qui se trouve en plus grande concentration dans le spermatozoïde que dans le plasma séminal. Des enzymes sont libérés par le gamète lors de la détérioration de la cellule, notamment sous l'effet d'un choc thermique (cold-shock), ce qui expliquerait la dépression observée dans le métabolisme suite à ce choc.

D'autres enzymes existent également, en proportions variables dans le plasma séminal: glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), phosphatase alcaline (en quantité dominante dans les sécrétions),... .

1.2.1.5.Ions

Le sodium est l'ion qui présente la concentration la plus abondante dans l'éjaculat (178mg/100ml) et sa concentration serait plus forte dans le plasma que dans le spermatozoïde.

Le potassium a, au contraire, une concentration plus importante dans le spermatozoïde que dans le plasma; il est tout comme le sodium en quantité appréciable dans le plasma (0,089g/100ml).

Le magnésium, malgré son action stimulante sur la motilité des spermatozoïdes (Hafez, 1980), est en concentration relativement faible (6mg/100ml).

Le calcium est l'ion (6mg/100ml) dont le rôle est le mieux connu dans la cellule:

- il intervient dans la régulation du fonctionnement cellulaire car il agit comme messager coordonnant de nombreuses réactions intracellulaires;
- il agit aussi lors de la capacitation (Birds, 1988); l'accumulation de calcium dans l'espace entre les membranes plasmiques et acrosomiales externes serait à l'origine de la fusion de ces deux membranes (par neutralisation des charges négatives de surface);
- on lui connait également une action sur la motilité (Hafez 1980, Derivaux et Ectors 1986, Gatti *et al.*, 1990).

1.3. FACTEURS AFFECTANT LA SURVIE ET LA FÉCONDANCE DES SPERMATOZOÏDES

Lors du prélèvement des béliers plusieurs paramètres, parfois difficilement contrôlables, interviennent dans la réduction du potentiel des spermatozoïdes vivants dans l'éjaculat. Une connaissance des facteurs affectant la survie des spermatozoïdes devrait

donc permettre d'augmenter la proportion de spermatozoïdes vivants dans le milieu de conservation.

1.3.1. Facteurs environnementaux

1.3.1.1. La température

Le sperme est éjaculé à une température proche de celle de l'organisme (37,5°C). L'exposition de la semence à une température supérieure accroît le métabolisme du spermatozoïde et sa consommation d'énergie, limitant ainsi ses chances de survie. La mortalité est totale à une température supérieure à 45°C.

D'un autre côté une diminution trop brutale de la température (cold-shock) a des conséquences fatales, alors qu'une réduction progressive de la température augmentera les chances de survie par diminution de l'activité métabolique. Cette diminution du métabolisme est toutefois réversible.

1.3.1.2. La lumière solaire

Une courte exposition à la lumière solaire réduit la viabilité des spermatozoïdes et une exposition de 30 à 40 minutes les tue. On peut pallier cet effet par l'utilisation pour la récolte de fourreaux qui préservent également les spermatozoïdes contre les déperditions calorifiques. Une exposition à une lumière fluorescente ou à des radiations ultraviolettes n'est pas non plus souhaitable.

1.3.1.3. Contact avec le métal

Un contact avec un métal est toxique pour le spermatozoïde; c'est pourquoi l'utilisation d'un matériel en verre ou constitué de matériaux synthétiques inertes est conseillée pour chacune des étapes (prélèvement, dilution, conservation et insémination).

1.3.1.4. Contact avec l'eau

En réduisant la pression osmotique du plasma séminal, un contact du sperme avec de l'eau présente un caractère spermicide auquel on peut pallier par l'utilisation d'un équipement sec (une précaution particulière sera prise dans l'étuve pour que le contact eau-semence ne se fasse pas).

1.3.1.5. Impuretés et bactéries

Les prélèvements de sperme ne se faisant pas toujours dans un environnement extrêmement propre, il n'est pas rare d'observer des contaminants dans les récoltes. Une attention toute particulière est dès lors requise par l'expérimentateur pour préserver l'éjaculat contre ces sources de contamination. On peut empêcher tout développement bactérien par l'utilisation d'antibiotiques.

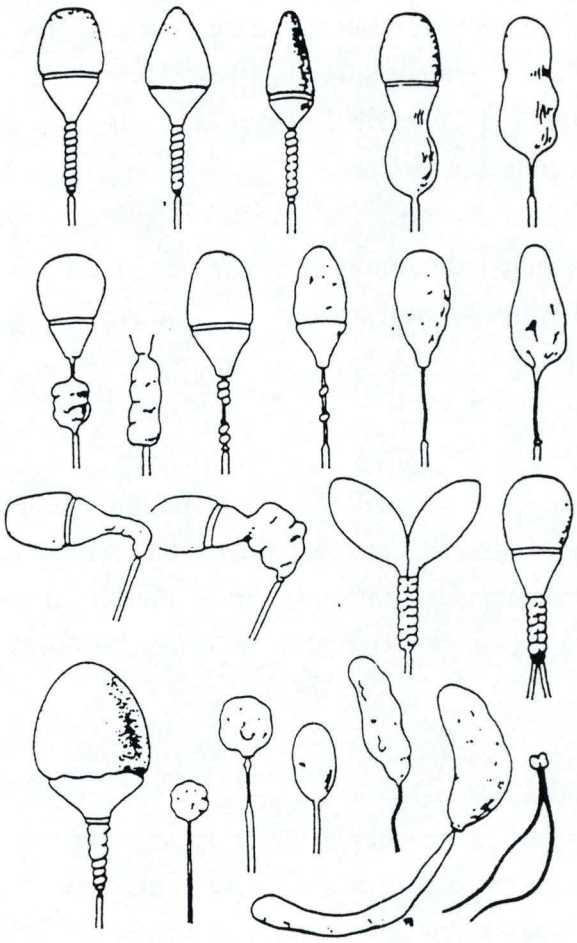


Fig. 11. Anomalies morphologiques de le tête du spermatozoïde (Hafez, 1980).

1.3.1.6. Désinfectant

Utilisé après chaque récolte pour nettoyer l'ensemble du matériel de prélèvement, le désinfectant est également une source de perte de spermatozoïdes si le rinçage n'est pas à la hauteur du lavage.

1.3.1.7. Exposition prolongée à l'air

L'oxygène augmentant l'activité des spermatozoïdes, une exposition prolongée des spermatozoïdes à l'air provoque un accroissement de l'accumulation d'acide lactique dans le prélèvement, ce qui se marquera par une réduction du pH. Le temps entre le prélèvement et le stockage doit dès lors être réduit au minimum afin d'éviter ce désagrément.

1.3.1.8. Pouvoir tampon du dilueur

Les variations de pH faisant diminuer la proportion de spermatozoïdes vivants, un tampon empêchant l'alcalinisation ou l'acidification du milieu est requis pour le maintien du sperme à un pH optimum.

1.3.1.9. Pression osmotique du dilueur

Les différents constituants des milieux de dilution exercent une pression sur la membrane du spermatozoïde; il est donc préférable d'utiliser un dilueur isotonique afin de maintenir la viabilité de la cellule.

1.3.2. Anomalies morphologiques

Des anomalies morphologiques peuvent être relevées dans les différentes parties constitutives du spermatozoïde, que ce soit la tête, le col ou le flagelle. Elles sont la résultante de causes diverses inhérentes à l'animal ou à l'environnement telles que: l'âge de l'animal, les problèmes hormonaux, la saison, l'état physiologique de l'individu, l'hérédité,... (Derivaux et Ectors, 1986).

Les anomalies de la tête peuvent se marquer par des anomalies de formes, de positions, de dimensions, ... (Fig.11). Les différentes parties constitutives de la tête peuvent être touchées:

- dans le noyaux, où on observe une chromatine faiblement condensée voir même absente localement;
- au niveau de l'acrosome qui peut-être décollé, présenter des épaississements,...
- dans le cytoplasme qui peut présenter une excroissance persistante.

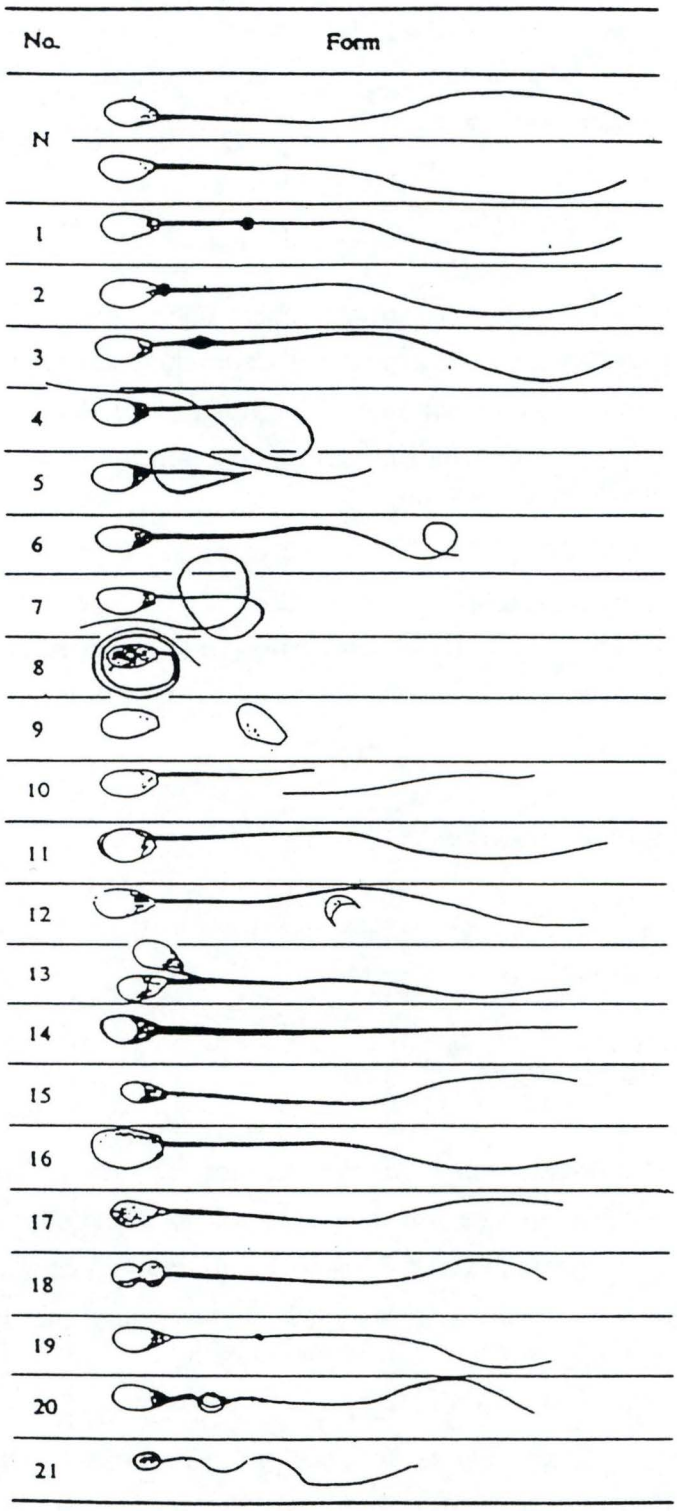


Fig. 12. Anomalies morphologiques de la pièce principale du spermatozoïde.

Les anomalies du col marquent l'implantation de la queue qui peut être absente. On a également persistance de la gouttelette protoplasmique. Celle-ci, selon certains, servirait à la nutrition des spermatozoïdes au cours de la traversée épididymaire avant le contact avec les éléments nutritifs du plasma.

Les anomalies de la pièce intermédiaire sont toutes sortes de malformations rendant critique voir inexistante la progression du spermatozoïde: élargie, craquée, mal insérée, ...

Les anomalies de la pièce principale sont diverses: longueur, calibre, enroulement, présence de pièces supplémentaires (Fig.12).Une petite goutelette cytoplasmique s'élimine normalement au cours de la maturation du spermatozoïde. Sa persistance sur la queue est le signe d'une immaturité qui n'est pas grave si la goutellette atteint la seconde moitié de la queue.

L'observation d'un nombre important de formes anormales dans le prélèvement ne doit pas entraîner de conclusions hâtives quant aux qualités reproductrices d'un individu, étant donné que ces malformations ont très bien pu apparaître lors du temps écoulé entre le prélèvement et l'observation et ne pas être la résultante d'anomalies primaires survenues lors de la spermatogenèse.

Toute semence présente une certaine proportion de base de formes anormales, sans pour autant que cela n'affecte la fécondité du sperme. Toutefois, il est souhaitable que ce niveau ne dépasse pas les 10% (Derivaux et Ectors, 1986).

2. CONSERVATION DE LA SEMENCE IN VITRO

Après éjaculation, les spermatozoïdes deviennent actifs dans le plasma séminal. Cette situation présente comme avantage, dans un contexte naturel, d'augmenter la probabilité de fécondation de l'ovocyte par les spermatozoïdes. Toutefois, tel quel, le sperme ne permet qu'une survie des gamètes limitée à quelques heures. Les causes principales de cette réduction du nombre de vivants sont d'une part, une consommation par les cellules des ressources énergétiques, et d'autre part, les modifications physiques du milieu inhérentes à cette consommation (Lamming, 1990).

Cette limitation temporelle pour la survie des gamètes peut être atténuée *in vitro* par l'utilisation d'un milieu de dilution performant et par réduction du métabolisme soit par

des inhibiteurs chimiques, soit plus simplement par une réduction progressive de la température.

2.1. ALTÉRATION DE LA SEMENCE LORS DU STOCKAGE IN VITRO

La réduction du nombre de spermatozoïdes vivants lors de la conservation *in vitro* peut se faire par une action à trois niveaux: sur les spermatozoïdes, le plasma séminal et les facteurs externes.

2.1.1. Effets des spermatozoïdes

Outre le fait qu'il se produit une diminution continuelle du substrat énergétique suite à sa consommation par les gamètes vivants, il existe également une action néfaste de la part des spermatozoïdes morts. Ceux-ci et tout autre spermatozoïde ayant une altération au niveau de la membrane libèrent dans le milieu tout un bagage enzymatique qui va avoir une action limitante sur la survie des cellules. Ces enzymes sont non seulement susceptibles de détruire le substrat énergétique, mais aussi d'entraîner la production de substances toxiques. Il a été observé que les spermatozoïdes de taureau oxydent des acides aminés aromatiques, ce qui conduit à la production de peroxydases qui inhibent la respiration et la motilité des gamètes.

2.1.2. Effets du plasma séminal

L'effet toxique du plasma séminal fut constaté principalement par son action sur la motilité massale du sperme frais. Si certains auteurs observent juste après la récolte que les spermatozoïdes présents dans un plasma séminal non dilué ont une motilité légèrement supérieure à celle des spermatozoïdes placés dans un milieu fortement dilué, l'avantage de celui-ci se manifeste rapidement lorsque la motilité des spermatozoïdes dans le plasma non dilué décline, alors que plus constante, la motilité des spermatozoïdes dilués reste inchangée et apparaît beaucoup plus durable (Dott *et al.*, 1979).

Chez le bélier, il y a sécrétion au niveau de la glande de Cowper d'une lécithinase dont la concentration est telle qu'elle permet l'hydrolyse des lécithines se trouvant dans le jaune d'oeuf avec libération d'acides gras et de lysolécithines (Roy, 1957). Il n'est pas impossible de penser que cette lécithinase soit capable d'hydrolyser les phospholipides membranaires, induisant dès lors des altérations au niveau de la membrane qui conduiront à la mort cellulaire.

La motilité plus élevée des spermatozoïdes dans le plasma séminal non dilué résulterait d'une concentration faible en lysolécithines. Il a été montré chez le bouc que la

synthèse croissante de lysolécithines par l'hydrolyse des phospholipides membranaires conduirait rapidement au seuil de toxicité pour les spermatozoïdes. La dilution permet une réduction de l'action déstabilisante de la lécithinase sur les membranes (Corteel, 1980). Le même auteur préconise même le lavage des spermatozoïdes afin d'éliminer le plasma séminal et d'augmenter ainsi la survie des gamètes.

2.1.3. Effets des facteurs extérieurs

Le nombre de facteurs externes pouvant jouer un rôle négatif sur la préservation du sperme *in vitro* est important (cfr. para.1.3.1.).

Généralement la mort cellulaire survient suite à une altération de la membrane. De fait, l'intégrité de celle-ci est impérative pour le fonctionnement du spermatozoïde et pour le maintien d'une bonne fécondité.

In vitro, où le risque d'introduction de contaminants est limité, le facteur le plus susceptible d'induire des altérations membranaires est le refroidissement. Une réduction jusque 4°C est nécessaire pour une diminution du métabolisme qui permettrait une conservation plus longue, mais ce refroidissement produit une modification dans l'organisation de la membrane des spermatozoïdes de bélier (Holt et North, 1984). Cette modification dans la fluidité et dans l'organisation de la structure membranaire peut être réduite par un rapport cholestérol/phospholipides suffisamment élevé. Le cholestérol a effectivement la capacité de maintenir l'agencement lamellaire initial de la membrane le plus longtemps possible face à la descente de température.

Il est donc important, lors de l'élaboration d'un dilueur de tenir compte de chacun des paramètres qui pourraient conduire à une réduction du stock de spermatozoïdes vivants.

2.2. MOTIVATIONS BIOLOGIQUES À LA DILUTION

Le but premier de la dilution est de fournir dans un premier temps les composés énergétiques nécessaires au métabolisme du spermatozoïde. Ce substrat serait en quantité trop faible dans le plasma séminal pour procurer une vitalité suffisante aux gamètes lors d'une fécondation après une longue période de conservation (période dépassant la dizaine d'heures). De fait, les spermatozoïdes peuvent cataboliser une quantité considérable de substrat. La plus grande partie de l'énergie produite lors de ce processus est utilisée pour la motilité et le maintien de l'intégrité cellulaire contre les pertes causées par la diffusion ou par d'autres processus physiques.

Une autre raison à la dilution, toujours liée au catabolisme énergétique, est le maintien d'un pH physiologique constant. On remarque que l'acidification du milieu est proportionnelle à la viabilité du sperme. Si on veut prolonger la survie des spermatozoïdes, il est impératif que le milieu de dilution présente un bon pouvoir tampon afin de pallier l'acidification résultant de la production d'acide lactique lors de la glycolyse.

Un troisième objectif de la dilution est de procurer un environnement isotonique aux spermatozoïdes, limitant ainsi les altérations physiques pouvant résulter d'un non-équilibre. Il est à remarquer qu'un milieu légèrement hypertonique est moins toxique qu'un milieu hypotonique, car la déshydratation résultant de l'hypertonicité serait favorable à la cellule lors du refroidissement (Watson, 1979).

Le milieu de dilution, de par sa composition, permet également une protection contre les chocs thermiques lors du refroidissement et du stockage.

2.3. MOTIVATIONS TECHNIQUES À LA DILUTION

La raison technique majeure à la dilution de la semence réside dans les perspectives intéressantes qu'elle offre dans le domaine de l'insémination artificielle (Colas, 1984).

Dans un processus naturel de fécondation et d'insémination, plusieurs milliards de spermatozoïdes sont déposés par le mâle dans le vagin de la femelle. Seulement 100 à 140 millions de spermatozoïdes vont pénétrer le cervix, ce qui fait que, dans le cadre d'une insémination artificielle où la semence est directement déposée au niveau du cervix, la totalité d'un éjaculat n'est pas nécessaire. Ceci permet donc d'augmenter par dilution le volume de sperme prélevé; chez le mouton, une concentration de 400 millions de spermatozoïdes par paillette de 0,25 ml permet d'obtenir des résultats d'insémination artificielle aussi bon que si cette insémination cervicale avait été faite avec des quantités supérieures. Si les spermatozoïdes sont injectés directement dans les cornes utérines, par endoscopie, 20 millions de spermatozoïdes suffisent. Il est dès lors possible d'inséminer plusieurs femelles avec un seul éjaculat.

Toujours dans le cadre de l'insémination artificielle, une dilution adéquate de la semence augmente le temps de survie des spermatozoïdes, réduisant ainsi les barrières géographiques et temporelles à l'insémination.

2.4. COMPOSANTS D'UN MILIEU DE DILUTION

Différentes catégories majeures de composés ont été proposées (Lamming, 1990) comme étant nécessaires, voire indispensables pour l'obtention d'un milieu de dilution performant.

2.4.1. Tampon

Les tampons utilisés pour contrôler le pH des dilutions sont très variés. Que ce soit un tampon citrate (Martin et Emmens, 1961), phosphate (Phillips et Lardy, 1940 cités par Lamming, 1990), Tris (Davis *et al.*, 1963), ou autres, chacun tend à répondre aux exigences que réclame le laboratoire qui l'utilise. L'introduction de nouveaux tampons d'origine organique (TES, MES, Tricine, HEPES) montre des perspectives avantageuses pour la survie des spermatozoïdes, probablement grâce aussi à la capacité de ces substances à lier les métaux lourds aussi bien qu'elles ne contrôlent le pH.

Les différents tampons sont préalablement titrés contre l'alcalinisation et l'acidification du milieu jusqu'à un pH approprié (7,2).

2.4.2. Sucres

L'inclusion de sucres dans le milieu de dilution permet de pallier certains problèmes qui sont fortement limitants pour la survie des gamètes:

- les sucres métabolisables par le spermatozoïde tel que le glucose, le fructose, l'inositol, le mannose et le ribose, fournissent le substrat énergétique additionnel nécessaire à la cellule.
- les sucres contribuent également au maintien d'un équilibre osmotique entre le milieu et les spermatozoïdes, via la pression osmotique qu'ils génèrent sur la membrane des cellules.
- les sucres, de par leur poids moléculaire important, contribuent à une relative cryopréservation des gamètes.

2.4.3. Protéines

L'albumine sérique présente semble-t-il de nombreux avantages lors de la conservation *in vitro* de la semence. Elle peut servir de protecteur pour la membrane des spermatozoïdes, contre les chocs thermiques pouvant survenir lors du stockage à 4°C et elle a également un effet d'absorption de molécules de faible poids moléculaire, et des métaux lourds.

2.4.4. Lipides

Une mention particulière est à faire pour certains lipides dont les propriétés bénéfiques sont reconnues contre les effets du choc thermique. Lors de cette protection,

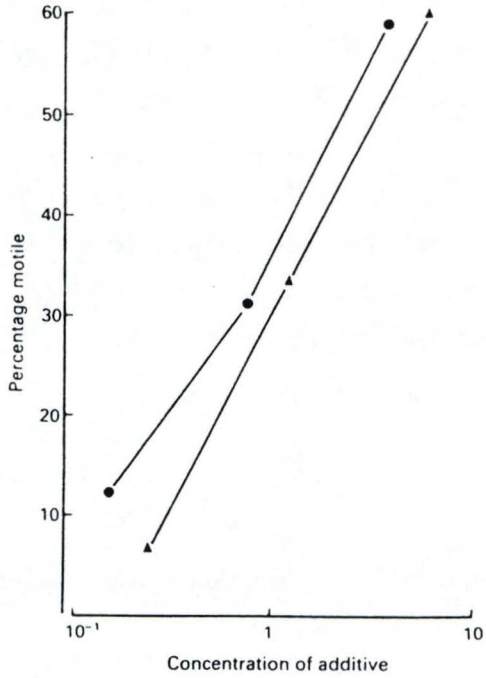


Fig. 13 Effets du jaune d'oeuf (cercles) et de la fraction lipoproteique de faible densité du jaune d'oeuf (triangles) sur la motilité de spermatozoïdes de bélier concervés à 5°C pendant 72 heures (Watson, 1976).

ce sont principalement les phospholipides de la fraction lipoprotéique de faible densité qui agissent (Watson, 1976, Fig. 13). C'est la raison pour laquelle de nombreux dilueurs contiennent du jaune d'oeuf, que ce soit pour la conservation à 4°C ou pour la congélation.

2.4.5. Antibiotiques

Bien que n'étant pas directement pathogènes, certains micro-organismes, de par leur présence, réduisent considérablement les chances de survie des spermatozoïdes. Leurs actions sont fort diverses: production de toxines, diminution de la fertilité de la semence, putréfaction des composés de dilution d'origine biologique et utilisation des ressources énergétiques destinées aux gamètes. C'est pour pallier ces détériorations que l'ajout d'antibiotiques est profitable.

Le fluide séminal est bactériologiquement stérile, mais une contamination au niveau du prépuce, de l'urètre et du pénis est quasiment inévitable lors des récoltes et ce malgré l'utilisation d'un matériel stérile.

2.4.6. Protecteurs spermatiques: les vitamines

La majorité des dommages subis par la cellule semblerait provenir de peroxydations lipidiques résultant d'oxydations cellulaires. De ces péroxydations s'en suit une profonde désorganisation au niveau membranaire, provoquant de ce fait une perte irréversible de l'intégrité de la membrane du gamète ce qui conduit à la mort cellulaire.

La protection conférée par les vitamines se traduirait par une action antioxydante qui contrôlerait et réduirait la peroxydation (Burton *et al.*, 1985).

Cette réaction est une succession d'étapes nécessitant un apport constant de radicaux libres afin d'amorcer les peroxydations additionnelles. Les 3 étapes du processus peuvent être résumées comme suit:

1. étape d'initiation: $R\text{-}H + OH\cdot^{-} \rightarrow R\cdot$
2. étape de propagation: $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$
   $ROO\cdot + R'\text{-}H \rightarrow ROOH + R'$
3. étape de terminaison: $R\cdot + R\cdot$; $ROO\cdot + ROO\cdot$;...

2.4.6.1. Les vitamines liposolubles

Les vitamines liposolubles sont par leur structure de molécules hydrophobes apolaires confinées à l'intérieur des membranes phospholipidiques.

En première ligne de la protection des phospholipides membranaires, on retrouve l'α-tocophérol (vitamine E). Celui-ci agit en transférant un hydrogène phénolique à un

radical peroxyde; il en résulte un radical phénoxy stabilisé par raisonnance et qui est peu réactif. L'action de l'α-tocophérol se fait surtout sentir en milieu riche en oxygène, son action est donc efficace lors de la conservation de la semence qui est généralement mis en contact avec l'oxygène de l'air.

2.4.6.2. Les vitamines hydrosolubles

Les vitamines hydrosolubles sont toutes des molécules polaires. La plus efficace est l'acide ascorbique (vitamine C) qui malgré ses propriétés hydrosolubles protège les membranes contre les peroxydations par interception des radicaux libres de la phase aqueuse.

3. CRYOPRÉSERVATION DE LA SEMENCE

A température physiologique (37°C), les spermatozoïdes ont une activité métabolique très élevée, ce qui augmente la probabilité de fécondation de l'ovocyte. Toutefois, cette activité débordante est limitante pour la survie à long terme des cellules en raison de la consommation rapide du substrat énergétique. Dès lors une réduction de la température jusque 4°C limite les consommations énergétiques des spermatozoïdes par un ralentissement de leur activité métabolique. Cette conservation est malgré tout fortement limitée dans le temps. Il est donc pensable que la conservation à plus long terme des gamètes pourrait s'effectuer à des températures encore plus basses. Le problème réside dans le fait qu'à ces températures, de nombreuses altérations cellulaires apparaissent suite à la cristallisation du milieu interne ou externe, ou suite à l'augmentation de la concentration en solutés.

3.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA CRYOBIOLOGIE

3.1.1. La cristallisation

Selon la loi de Raoult, le point de congélation auquel doit débuter la cristallisation dans une solution dépend principalement de la concentration en solutés dissous dans celle-ci. La formation de glace ne débute que lorsque la solution arrive sous cette température. Pourtant, il arrive que la température de l'échantillon descende en dessous du point de fusion sans qu'il n'y ait formation de cristaux de glace. Cet état de *surfusion* est très instable, et la température à laquelle il est rompu est extrêmement variable. Cette température dépend principalement de la formation d'un germe cristallin suite à différents événements physiques tel que des vibrations, un choc (thermique ou physique), des impuretés, ... Lorsque la cristallisation s'amorce, après l'état de surfusion, la libération

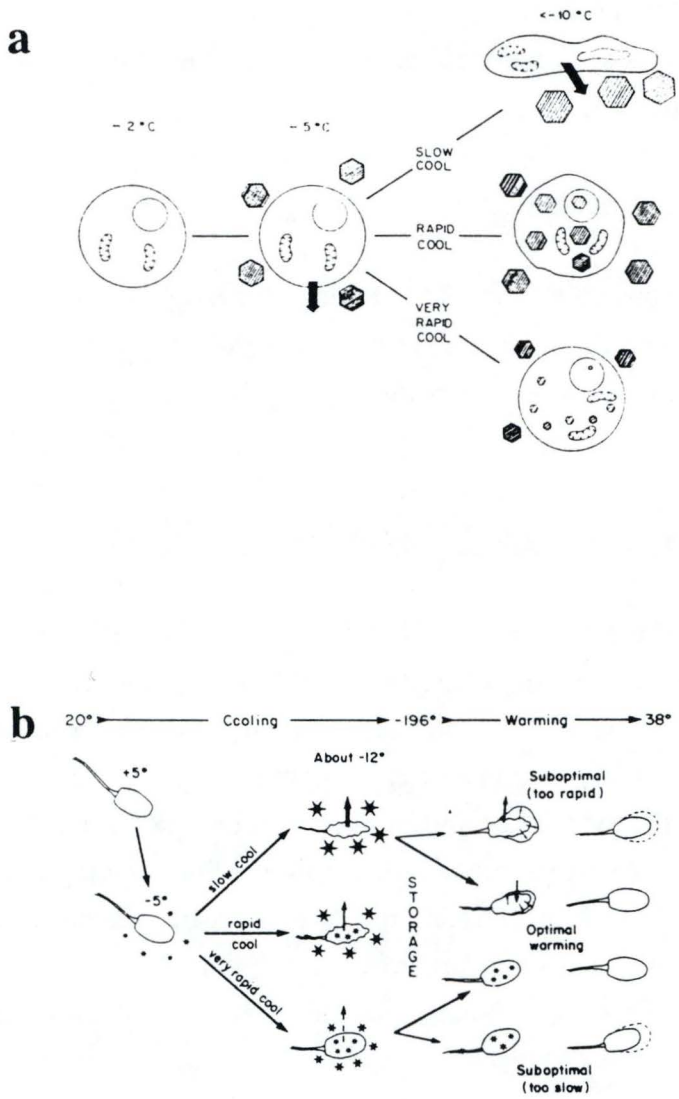


Fig. 14 Représentation schématique des événements physiques se produisant dans la cellule lors de la congélation (A: Mazur, 1977, B: Hammerstedt, 1990).

d'énergie produite par le changement d'état peut élever la température de l'échantillon et entraîner des dégats au niveau cellulaire.

3.1.2. Cinétique de la congélation

Tout au long de la congélation, l'intégrité fonctionnelle et physique de la cellule est préservée si les potentiels chimiques extra- et intra-cellulaires sont équivalents. Or en l'absence de cryoprotecteurs ("cryoprotective agent" ou CPA), les points de congélation intra-et extra-cellulaires sont différents.

Vers -5°C, la cellule et son milieu environnant restent non-congelés suite à la surfusion et à la dépression du point de congélation par utilisation d'une solution cryoprotectrice (Mazur, 1984).
Au niveau de la phase liquide extra-cellulaire, les cristaux de glace formés n'acceptent aucune autre molécule que l'eau, ce qui provoque une surconcentration en sel. Le cytoplasme de la cellule en surfusion répond à la surconcentration du milieu extérieur par libération d'eau afin d'équilibrer la différence de pression osmotique entre les deux phases liquides (Fig. 14 et Mazur, 1969). En effet, la membrane cytoplasmique empêche, de par son imperméabilité, que les cristaux de glace extracellulaire induisent la cristallisation intracellulaire.

Sous -5°C, spontanément ou par "seeding", la glace se forme dans le milieu externe, mais le contenu cellulaire reste incongelé et en surfusion, toujours grâce à l'action de la membrane préservant la cellule de la pénétration des cristaux de glace.

Sous -10°C, les événements physiques apparaissant dans la cellule dépendent de la vitesse de congélation.

Si la *vitesse* est *lente*, les cristaux extra-cellulaires prennent de plus en plus d'eau, concentrant ainsi la phase liquide externe. La cellule est capable de perdre son eau rapidement par exo-osmose provoquant une concentration de la solution intra-cellulaire suffisante pour maintenir la potentiel chimique de l'eau extra-cellulaire en équilibre avec l'eau intra-cellulaire. Il en résulte une déshydratation de la cellule qui reste non-congelée, ainsi que l'apparition d'altérations résultant de la croissance trop importante

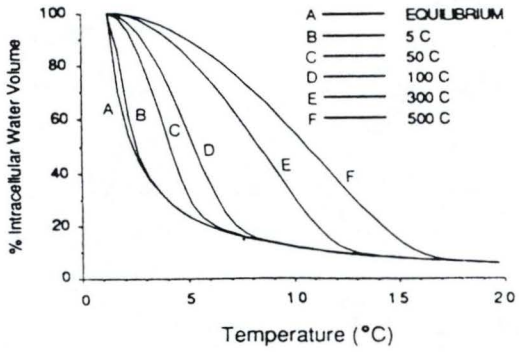


Fig. 15 Courbes calculées de la perte d'eau pour des spermatozoïdes de bélier congelés à différentes vitesses dans une solution à 4% de glycérol. La courbe "*equilibrium*" représente une vitesse de congélation très faible, où le gamète peut rétablir l'équilibre osmotique avec le milieu exterieur (Duncan, 1992).

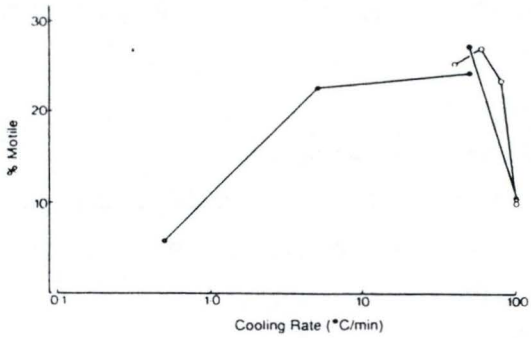


Fig. 16 Effets de différentes vitesses de congélation linéaire sur la motilité des spermatozoïdes décongelés. Symboles pleins: 0.5, 5 et 50°c/min., symboles vides: 40, 60, 80 et 100°c/min., et demis symboles: 50 et 100°c/min (Duncan, 1992).

des cristaux de glace externes qui confinent la cellule dans de petits "canaux".

Si la *vitesse* est *rapide*, il y a incapacité de la cellule à perdre rapidement de l'eau pour maintenir l'équilibre. Un certain équilibre peut être atteint lorsque le milieu intra-cellulaire atteint la température de cristallisation, et qu'il y a formation de cristaux à l'intérieur de la cellule.

Si la *vitesse* est *très rapide*, il y a vitrification par formation de cristaux de très petite taille.

Il est à noter que la formation de cristaux intra-cellulaires est toujours dommageable pour la cellule. De fait, ces cristaux provoquent des altérations membranaires, mais également des destructions au niveau des différents compartiments assurant un rôle vital dans la cellule. L'action négative de ces cristaux n'est pas directe, mais il semble que c'est plus la recristallisation par assemblage de cristaux entre eux lors de la décongélation qui soit responsable de toutes les altérations (Mazur, 1977).

3.1.3. Utilisation d'une solution cryoprotectrice

En l'absence de cryoprotecteurs (CPA's), les cellules de mammifères ne survivent généralement pas à une température inférieure à -20°C. L'objectif principal de l'utilisation d'une solution cryoprotectrice est non seulement de diminuer le point de congélation, mais également de retarder la surconcentration en soluté vers des températures plus basses où les dégâts cellulaires sont moins marqués. Deux types d'actions sont reconnus pour les différents CPA's en fonction de leur capacité à pénétrer ou non à l'intérieur de la cellule.

Les *CPA pénétrants*, par diffusion au travers de la membrane cellulaire, préviennent la cellule contre la formation de cristaux de grande taille. Ils réduisent également les concentrations salines excessives et toxiques, par la diminution de la quantité de cristaux de glace. La vitesse de diffusion de ces CPA dépend de la température et du coefficient de perméabilité.

Parmi les CPA pénétrants les plus utilisés, on trouve le glycérol, le diméthyl sulfoxide (DMSO), l'éthylène glycol, etc. . Une mention toute particulière est à faire pour le glycérol qui agit comme un pénétrant lorsqu'il est additionné à 20°C et qui est non pénétrant additionné à 4°C (Hayat, 1989).

Les *CPA non pénétrants* sont généralement des polymères hydrophiles de haut poids moléculaire ne pouvant pénétrer facilement dans la cellule. Ils créent une différence

Tabl. 2 Paramètres, variables ,constantes et formule utilisés pour calculer la perte d'eau du spermatozoïde de bélier durant la congélation (Duncan,1992).

Symbol	Meaning	Unit	Value
V_0	Volume of water in cell	μm^3	17.28
T	Temperature	°C	variable
n_s	No. moles of solute in cell	mol	11.232×10^{-15}
V_w	Partial molal volume of water	μm^3/mol	18.015×10^{12}
I and S	Constants determined by the concentration of cryoprotective agent before freezing, and the cryoprotectant	—	1 and 0
R	Gas constant	μm^3 atm/ (mole degree)	82.057×10^{12}
A	Membrane surface area	μm^2	139
T_g	Reference temperature	°C	20
b	Temperature coefficient of the hydraulic conductivity	/°C	0.045
k_g	Hydraulic conductivity at reference temperature (T_g)	$\mu m^3/\mu m^2$/min/atm	0.222
B	Cooling rate	°C/min	variable

Note. Fahy's equation :

$$dV = \frac{-k_g e^{b(T-T_g)} AR(T + 273.15)dT}{BV_w} \times l_n \left[\frac{1 - \frac{I}{(V/n_s V_w + 1)} - \frac{S}{(V/n_s V_w + 1)^2}}{1 + 0.00966T + 4.1025 \times 10^{-5} T^2} \right].$$

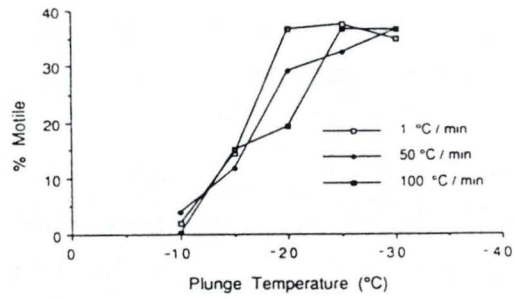


Fig. 17 Motilité des spermatozoïdes de bélier après congélation à différentes vitesses (Duncan, 1992).

de pression osmotique entre le milieu extra et intra-cellulaire. Il en résulte une perte d'eau par la cellule, et ce déjà avant que la concentration en soluté n'augmente à cause de la cristallisation externe. Il en découle que la concentration ionique toxique est atteinte plus tardivement dans le milieu extra-cellulaire, mais la toxicité ionique interne n'est pas réduite (Mac Kenzie, 1977).

Les CPA non pénétrants les plus communément utilisés sont le polyvinylpyrrolidone (PVP), l'hydroxyethyl starch (HES) et le dextran.

3.2. CRYOPRESERVATION DU SPERME DE BÉLIER

3.2.1. Vitesse optimale de congélation

Chaque type cellulaire possède une vitesse de congélation optimale propre, basée sur le comportement osmotique de la cellule au cours du processus de refroidissement.

Au-dessus de cette vitesse optimale, la quantité de cristaux intra-cellulaires augmente et parallèlement, il se produit un accroissement des dégats cellulaires provoqués par la croissance des cristaux à la congélation et à la décongélation.

Au-dessous de cette vitesse optimale, la viabilité des gamètes est limitée par "*l'effet solution*". Celui-ci est la résultante des modifications des propriétés des solutions dont la concentration augmente à l'extérieur par cristallisation et à l'intérieur par déshydratation pour maintenir l'équilibre osmotique (Meryman *et al.*, 1977).

La vitesse de congélation optimale pourrait donc être vue comme la vitesse présentant un compromis entre les altérations causées par la formation de cristaux, et les désagréments provenant de "l'effet solution".

Duncan et Watson (1992) ont calculé, suivant l'équation de Fahy (1981, cité par Duncan et Watson, 1992), que la vitesse optimale pour la congélation des spermatozoïdes de bélier, était de -50°C/min. (Fig.15 et Fig.16). Ils ont également estimé que la température de nucléation devait se trouver aux alentours de -8°C, point intermédiaire entre la rencontre des courbes de -50 et -100°C/min. avec celle représentant l'équilibre. Seule une estimation de ce point est possible, car la technique généralement utilisée pour mesurer la température de nucléation des cellules de mammifères est biaisée par le fait que la teneur en eau dans le spermatozoïde est trop faible et que le noyau a une haute refractibilité. De ce fait, il se produit un changement dans la réfraction causée normalement par la formation de glace et qui était observée microscopiquement.

Les expériences menées ultérieurement, toujours par Duncan et Watson (1992) ont montré que les observations expérimentales ne correspondent pas à la courbe calculée (Fig. 17). Les paramètres majeurs utilisés pour calculer les courbes de perte d'eau, sont d'une part le coefficient de température et d'autre part la conductivité hydraulique. Les

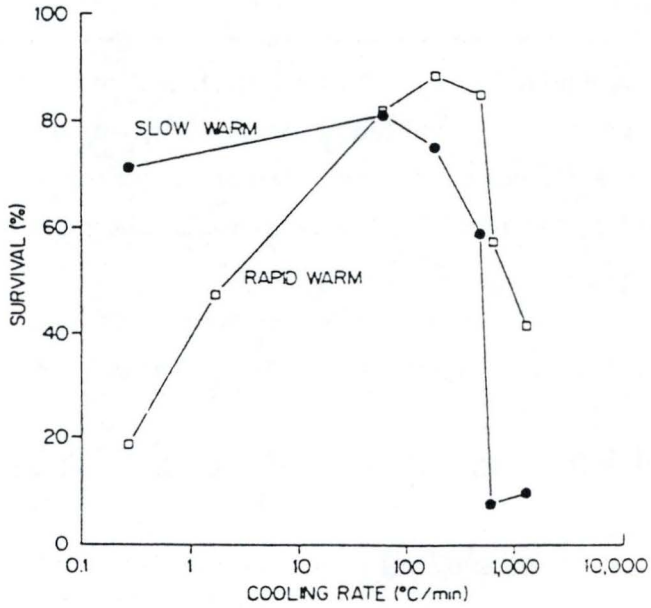


Fig. 18 Pourcentage de globules rouges vivants récupérés aprés congélation à différentes vitesses et avec une décongélation rapide ou lente (Mazur, 1984).

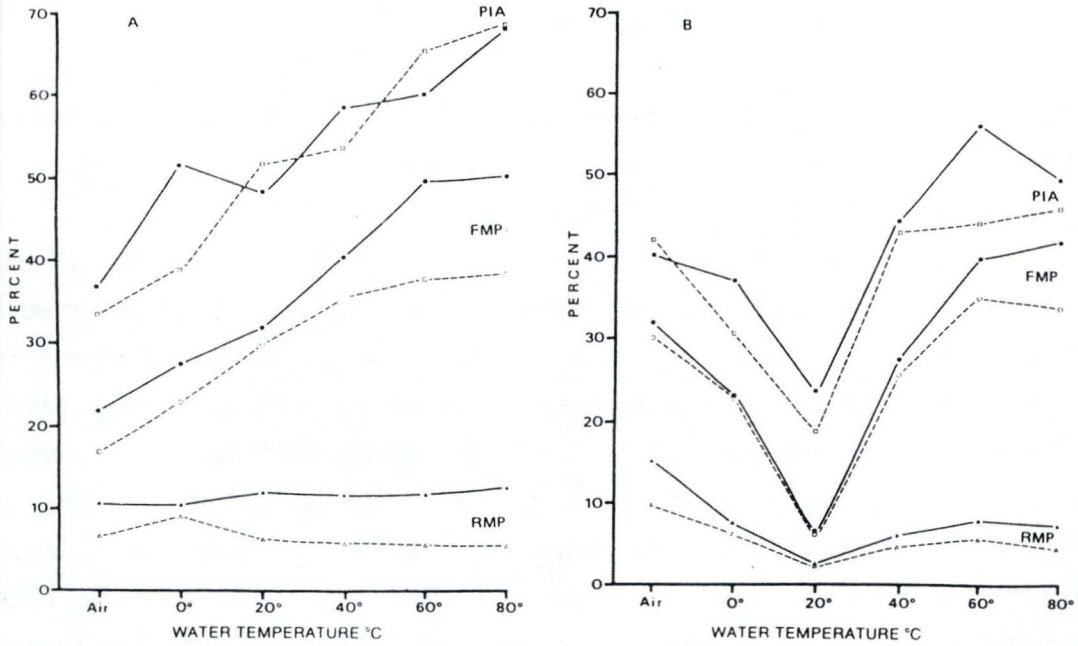


Fig. 19 Influence de la vitesse de décongélation sur le pourcentage d'acrosomes intacts (PIA), sur le pourcentage de spermatozoïdes motiles (FMP) et motiles après recongélation (RMP). A: spermatozoïdes congelés à -20°c/min., B: gamètes congelés à -2°c/min (Fiser, 1986).

auteurs expliquent la différence entre la théorie et les observations par le fait qu'il existe une grande variabilité individuelle pour la réponse des spermatozoïdes de béliers face à un stress osmotique. Les mesures qu'ils ont établies pour déterminer cette conductivité (Tabl. 2) ayant été faites sur un pool de plusieurs béliers, des variations individuelles vont influencer les conductivités hydrauliques enregistrées malgré ce "pooling".

3.2.2. Stockage de la semence congelée

Le stockage de la semence, après le processus de congélation, est effectué dans l'azote liquide, à -196°C. A cette température, aucune réaction n'apparait, d'une part parce que l'eau liquide n'existe plus en dessous de -130°C (on ne trouve plus que la forme cristalline ou vitrifiée), et d'autre part parce qu'il n'y a plus assez d'énergie thermique à -196°C pour que se déclenchent des réactions chimiques. Les seules réactions pouvant survenir à ces températures, sont des événements photophysiques entraînant la formation de radicaux libres et des cassures au niveau des macromolécules par action de radiations ionisantes. A très long terme, ces radiations peuvent provoquer des dommages dans l'ADN après retour à température physiologique. Toutefois, 200 à 400 rad sont nécessaires pour ces altérations, comme la terre n'en libère que 0,1 rad/an, cela nous laisse une marge "raisonnable" de 2000 ans pour la conservation.

3.2.3. Décongélation de la semence

La décongélation est une étape déterminante pour la récupération d'un maximum de spermatozoïdes vivants.

Mazur (1984) établit le principe général qu'une cellule congelée à une vitesse infra-optimale, et où la déshydratation cellulaire est plus forte, doit pour une récupération maximale, être décongelée lentement afin que la réhydratation et le retour à la taille initiale puissent se faire. Par contre, une cellule congelée à une vitesse supra-optimale, doit être décongelée rapidement afin qu'une recristallisation des petits cristaux en cristaux de taille plus importante ne puisse se faire, épargnant ainsi à la cellule des dommages que ceux-ci pourraient provoquer (Fig.18).

Fiser *et al.* (1986b) ont comparé différentes vitesses de décongélation pour des spermatozoïdes de bélier congelés à une vitesse optimale (-20°C/min.) et infra-optimale (-2°C/min.). Ils constatent l'existence de types de courbes différentes pour les deux vitesses (Fig.19). Ceci suggère deux types de mécanismes de détérioration cellulaire; l'un dû à la formation de glace par recristallisation, et l'autre provenant de "l'effet solution" dû à la réhydratation, ce qui est en accord avec Mazur (1984). Olar *et al.* (1977, cités par Fiser *et al.*, 1986). Les auteurs expliquent la dépression dans le pourcentage de spermatozoïdes vivants lors de la décongélation dans un bain à 20°C pour la semence

Tabl. 3 Composition phospholipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde de bélier avant et après congélation (Hinkovska-Galcheva, 1989).

Phospholipids	Plasma membranes (μg PL/mg protein)		Spermatozoa (μg PL/1.8 × 10^9 cells)	
	Control	− 196°C	Control	− 196°C
SM	20.37 ± 2.8	20.36 ± 2.4	58.00 ± 5.1	62.45 ± 1.9***
PC	94.76 ± 8.1	88.22 ± 1.2	159.00 ± 5.8	153.73 ± 1.4*
PS	5.47 ± 0.9	4.32 ± 2.6*	8.80 ± 2.9	9.13 ± 0.7
PI	2.69 ± 0.1	2.25 ± 0.6*	6.60 ± 1.3	8.31 ± 1.8*
PE	19.70 ± 2.7	15.89 ± 0.9*	49.09 ± 2.9	41.18 ± 2.7**
PG	9.68 ± 2.2	6.46 ± 0.5***	15.50 ± 2.1	14.05 ± 1.9*
DPG	13.90 ± 1.7	16.42 ± 0.5***	26.80 ± 4.8	20.85 ± 3.5***
TPL	167.80 ± 3.5	153.92 ± 1.2	323.79 ± 4.7	314.10 ± 1.2
SM/PC	0.236	0.230	0.364	0.406
CH/PL	0.280	0.250	0.769	0.630

Note. Values are means ± SD (n = 10). TPL, total phospholipids; SM, sphingomyelin; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; CH, cholesterol; PL[phospholipids.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

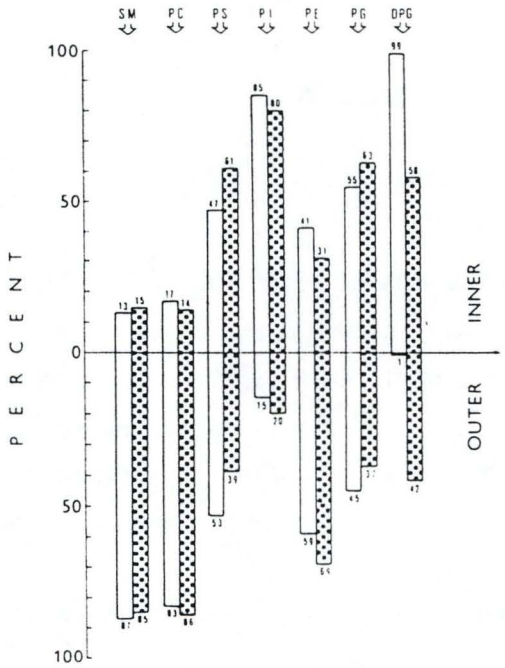


Fig. 20 Distribution phospholipidique sur les monocouches interne et externe de la membrane plasmique du spermatozoïde de bélier, avant et après congélation (Hinkovska-Galcheva, 1989).

congelée à -2°C/min., par le fait que 20° est une température critique car la surface de l'ampoule de conservation produit un gradient de température très large auquel est exposé le spermatozoïde pendant un temps prolongé. Ce phénomène ne semble pas marquer la semence congelée à -20°C/min.

3.2.4. Action membranaire de la congélation

La nature biochimique de la membrane du spermatozoïde de bélier est liée à sa structure relativement complexe et instable. De cette fragilité peut résulter une altération membranaire suite à l'addition de CPA dans le milieu de dilution en vue d'une congélation.

Chez le spermatozoïde, les composés lipidiques membranaires sont assez instables, mais leurs interactions avec les protéines jouent un rôle capital pour assurer l'intégrité de l'ensemble et pour préserver une activité fonctionnelle. Certains enzymes nécessitent une conformation spéciale maintenue par la membrane lipidique, pour jouir d'une activité optimale. C'est notamment le cas des enzymes impliqués dans la réaction acrosomiale, dont l'activation se fait par modification de l'organisation des macromolécules membranaires.

Affectant la diffusion des composés membranaires, la température est un des facteurs les plus déterminants pour les variations d'organisation dans l'asymétrie lipidique.

Hinkovska-Galcheva *et al.* (1989) ont mis en lumière que la congélation des spermatozoïdes de bélier en l'absence de CPA conduit à des variations dans la composition des lipides. Ils ont observé que la quantité totale de phospholipides isolés au niveau de la membrane plasmique reste inchangée après congélation sans CPA, mais que certaines fractions individuelles de phospholipides subissent des variations, notamment une diminution en phosphatidylcholine (PG), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE), mais aussi une augmentation en diphosphatidylglycérol (DPG) (tabl. 3). De même la quantité totale de phospholipides au niveau du spermatozoïde reste inchangée, seul un réarrangement de certaines fractions est observé (Fig.20). C'est ainsi qu'on observe une altération profonde dans la distribution de ces phospholipides entre la monocouche externe et interne.

Une modification dans l'activité métabolique est probablement une des résultantes de ce réarrangement. De fait, on constate qu'une des plus importantes variations apparaît dans la distribution du DPG dont la présence est nécessaire lors de la réaction acrosomiale. Un transfert de DPG de la couche interne vers la couche externe va provoquer une inhibition de la réaction acrosomiale qui débute généralement par la fusion de la couche interne de la membrane plasmique et de la couche externe de la membrane de

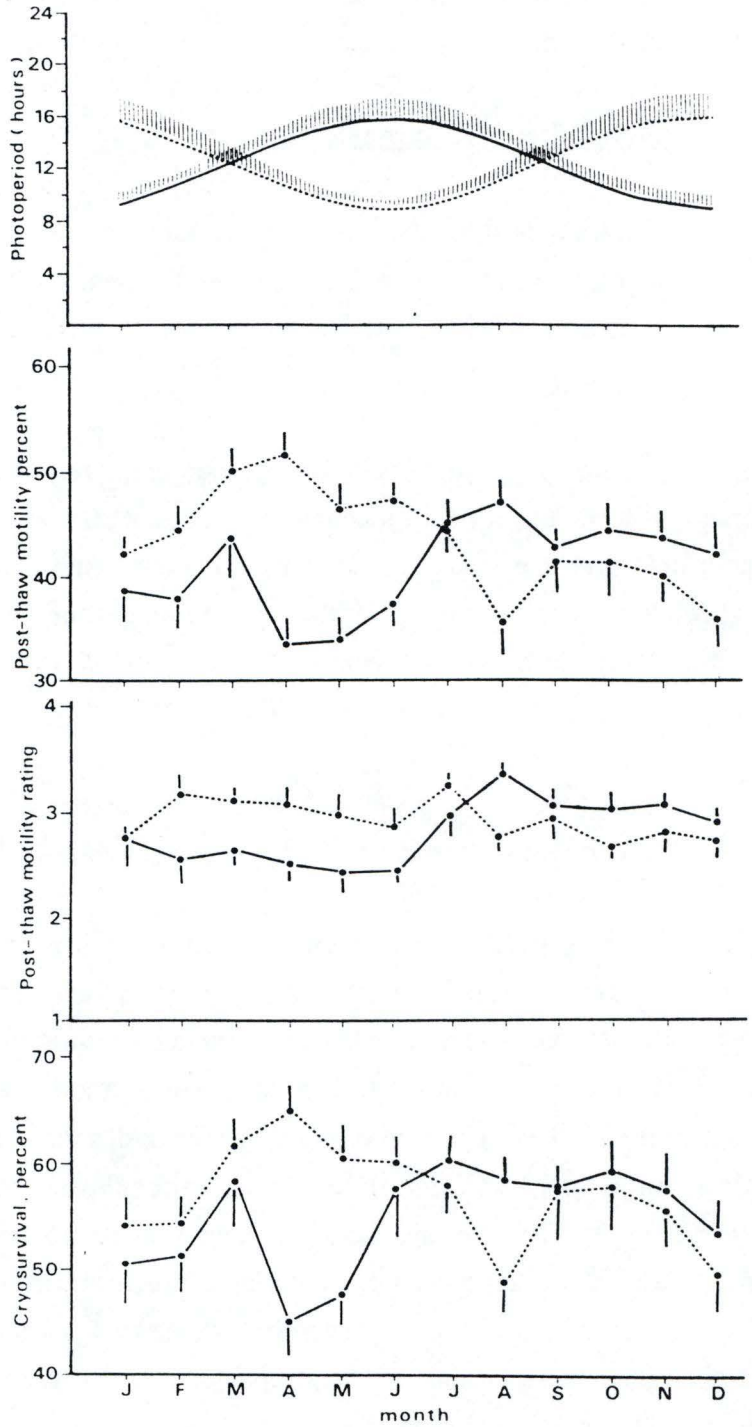


Fig. 21 Effet du changement de photopériode sur le pourcentage de motilite, sur la motilité massale et sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation. Trait plein: régime de lumière normale (45° lat. N); trait discontinu: régime inverse (Fiser, 1983).

l'acrosome. Certaines hypothèses (Clegg et Foot, 1973) expliquant le mécanisme biologique de la fusion membranaire lors de la réaction acrosomiale incluent la participation d'une phospholipase A_2 qui est un des constituants de la membrane. Cet enzyme est connu comme induisant une accumulation de lysophospholipides et d'acides gras, le tout conduisant à des changements au niveau de la bicouche. Or une modification dans la distribution des phospholipides entre les couches interne et externe, provoque une variation locale dans la fluidité membranaire de laquelle dépend l'activité de la phospholipase A_2.

Il apparaît clairement qu'une des voies à exploiter pour préserver la capacité fertilisante du spermatozoïde est de conserver la distribution normale des phospholipides entre les deux couches membranaires.

3.2.5. Facteurs influençant la survie des cellules à la congélation

Les facteurs influençant la survie des cellules au cours d'un processus complet de congélation peuvent se situer à de nombreux niveaux. De fait, comme le mécanisme de la congélation est très complexe, tout écart peut provoquer la mort cellulaire, que ce soit avant, pendant ou après le congélation.

3.2.5.1. Influence de la photopériode

La photopériode, agissant sur les phénomènes généraux de la reproduction, modifie aussi la capacité des spermatozoïdes à survivre à la congélation. Fiser et Fairfull (1983 et 1986) ont mis en évidence que la motilité des spermatozoïdes est beaucoup plus influencée par la photopériode que la proportion totale de spermatozoïdes vivants après un processus complet de congélation-décongélation. Ils ont tiré comme conclusion que la période décroissante de lumière, qui correspond à la saison de reproduction, a un effet bénéfique sur la conservation à long terme des spermatozoïdes de béliers (Fig.21). Les sécrétions hormonales optimales en cette saison ont une répercussion bien connue sur la spermatogenèse, et les spermatozoïdes produits seraient plus résistants.

3.2.5.2. Facteurs propres à l'individu

Tout comme il est observé une variabilité entre individus et même d'un éjaculat à l'autre (cfr. para.1) pour les caractéristiques de la semence, il semble qu'il y ait une variabilité de réponse à la congélation pour la semence d'un individu à l'autre. Ces variations seraient principalement dues à la composition du plasma séminal, facteur qui influencerait la survie des spermatozoïdes après la congélation, mais pourraient aussi

provenir de résistances variables des gamètes, sans que l'on ait actuellement élucidé ce qui leur confère cette qualité.

3.2.5.3. Influence des conditions de stockage de la semence

Les conditions de stockage de la semence ont une importance sur la survie cellulaire (Pickett *et al.*, 1978). Différents systèmes de conditionnement sont utilisés: pastilles, petits sacs, cryotubes, paillettes (de 0,25 à 1 ml),... . Il apparaît que les résultats les plus satisfaisants sont obtenus avec les paillettes, technique mise au point par les Français et actuellement la plus répandue et la plus pratique. Néanmoins, de nombreux auteurs restent adeptes des "pellets". Il est à noter que le conditionnement en grand volume pose des problèmes à la décongélation.

DEUXIÈME PARTIE
RECHERCHE PERSONELLE

CHAPITRE II.
OBJECTIFS

Les objectifs fixés pour ce mémoire sont doubles. Il s'agit d'une part de mettre au point un milieu de dilution performant pour la conservation en frais, et d'autre part d'élaborer un protocole de cryopréservation de la semence ovine.

La problématique ayant déterminé le premier objectif réside dans le fait que la plupart des milieux utilisés actuellement sont peu performants pour une conservation supérieure à quelques heures, ce qui laisse peu de temps pour des programmes étendus d'insémination.

Le milieu de dilution le plus utilisé en Belgique, pour les inséminations artificielles, est celui que préconise l'I.N.R.A. (Institut National de Recherche Agronomique, en France). Il est constitué de lait écrémé en poudre additionné d'eau et d'antibiotiques, le tout chauffé à 80°C afin d'annihiler l'action spermicide de la lactine. Malheureusement, ce milieu ne permet pas une conservation suffisante des spermatozoïdes au delà d'une dizaine d'heures.

Façe à cette limite temporelle, il apparait impératif de mettre au point un milieu de dilution permettant une liberté d'action plus étendue à l'inséminateur. Pour ce faire, l'objectif à atteindre est de préserver une bonne viabilité de la semence en gardant une motilité massale à un niveau 4, et ce jusque 48 heures au moins après le prélèvement. Ce maintien de la motilité massale à un bon niveau laisse ainsi un délai plus important à l'inséminateur entre le moment du prélèvement et celui de l'insémination. Ce milieu servirait également de solution de base pour l'élaboration d'un protocole de congélation des spermatozoïdes.

Afin qu'un maximum de paramètres puissent être contrôlés lors de la mise au point du dilueur, son élaboration s'est réalisée de façon progressive; à chacune des étapes est conservé le composant donnant le plus de satisfactions. Les différentes étapes successives peuvent être résumées comme suit:

- recherche d'un tampon maintenant le pH à son optimum de 7.2, sans présenter de caractère toxique pour le spermatozoïde;
- recherche d'un bon substrat énergétique par combinaison de différents sucres;
- observation de la mortalité des spermatozoïdes en fonction des variations de la pression osmotique;
- addition de protecteurs spermatiques et d'albumine;
- essais de différents antibiotiques afin de limiter les contaminants dans le milieu, mais sans action néfaste sur les cellules.

Une fois le milieu de dilution mis au point, il nous a servi lors de nos investigations pour l'élaboration d'un protocole de conservation à long terme de la semence.

De fait, le sperme d'ovin est une des dernières semences d'animaux domestiques dont la congélation reste problématique. Il parait donc utile dans le cadre d'un programme de sélection et d'insémination, de pouvoir conserver la semence de béliers d'élite. Ceci permet, d'une part une collecte de sperme échelonnée sur toute l'année, ce qui présente comme avantage de pouvoir répondre, en saison de reproduction, aux demandes massives d'inséminations avec un même bélier. D'autre part, la constitution d'un stock de semence de différents béliers permettrait d'effectuer des inséminations même après la disparition de ceux-ci, c'est à dire lorsque l'étude de la descendance aura permis de définir leurs qualités dans un programme de sélection.

La mise au point progressive de la technique de cryopréservation de la semence a principalement été axée sur les paramètres suivants:

- essais de différents cryoprotecteurs;
- observation de la toxicité de ces cryoprotecteurs en frais;
- variation de la concentration de chacun des cryoprotecteurs en se basant sur les concentrations données dans la littérature;
- variation de la vitesse de congélation dans les limites fixées par le matériel du laboratoire.

CHAPITRE III.
MATÉRIEL ET MÉTHODES

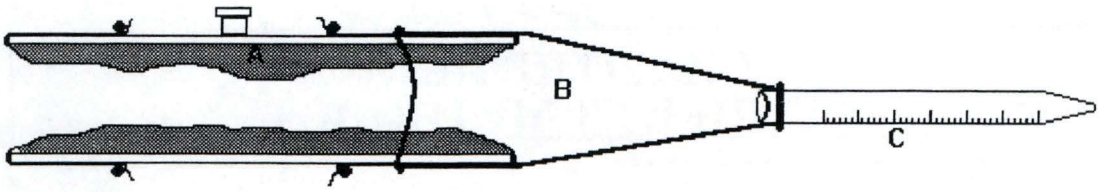


Fig. 22 Représentation shématique du système de prélèvement (vagin artificiel). A: Gaine de caoutchouc, B: Cône, C: tube de récolte du sperme.

1 ANIMAUX D'EXPÉRIMENTATION

1.1. BÉLIERS

La collecte du sperme est faite sur des béliers d'élite du C.I.S.O. (*Centre d'insémination et de sélection ovine*, de Faulx-les-Tombes) destinés à l'insémination artificielle. La quantité de semence nécessaire pour constituer un échantillon étant supérieure au volume moyen d'un éjaculat de bélier, le sperme de plusieurs individus est "poolé" aléatoirement afin d'atteindre le volume requis.

Les principaux béliers prélevés présentent les caractéristiques suivantes:

Pico: race Texel, né le 09.04.1991
Onirique: race Texel, né le 22.03.1990
Rollcar: race Texel français, né le 23.03.1992
Nestor: race Suffolk, né le 13.12.1988
Occident: race Bleu-du-Maine, né le 23.01.1990
Raffut: race Texel, né le 03.03.1992
Nobilis: race Ile-de-France, né le 3.11.1989
Préféré: race Hamshire, né le 29.12.1990
Johanis: race Frison (laitier Hollandais), né 26.02.1989

2. PRÉLÈVEMENTS

2.1. MATÉRIEL

La collecte du sperme est faite à l'aide d'un vagin artificiel. Celui-ci présente comme avantage comparé à d'autres techniques de ne pas être stressant pour l'animal. La semence est donc de bonne qualité et on peut prélever plus fréquemment.

Ce système tend à imiter les conditions du vagin de la brebis en fournissant des stimulations thermiques et mécaniques (pression) au pénis en érection ce qui déclenchera l'éjaculation. Ces conditions sont remplies par la première partie du système constituée d'un cylindre à paroi de caoutchouc contenant de l'eau. Celle-ci a pour fonction d'assurer la pression interne et de maintenir la température adéquate (+/- 41°C), la chaleur accumulée par le vagin artificiel dans l'étuve.

Faisant suite à ce cylindre, un cône également en caoutchouc permet à l'éjaculat d'être dirigé dans un tube à prélèvement jaugé.

Une précaution supplémentaire est prise pour le maintien de la température grâce à un fourreau dans lequel est glissé l'appareillage assemblé (Fig.22).

2.2. MÉTHODE

Tous les prélèvements ont été exécutés dans des lieux connus par les béliers, limitant ainsi la gêne que les animaux pourraient développer dans un environnement nouveau.

Pour stimuler la libido des béliers, une brebis est mise en chaleur par une injection intramusculaire de 1,5 ml de cyprionate d'oestradiol (ECP) 48 heures avant le prélèvement.

Tandis qu'un expérimentateur tient la brebis pour empêcher tout mouvement pouvant perturber la bonne marche de l'opération, le bélier est libéré de son box. Un deuxième expérimentateur se tient à côté du bélier avec un vagin prêt. Lors de la monte, l'opérateur dévie le pénis en érection dans le vagin artificiel. L'éjaculation est marquée par un coup de rein de l'animal. Chaque individu est différent et par de multiples essais, on peut connaître les préférences de chacun que ce soit pour la pression et la température du vagin ou le nombre de montes; cette connaissance permet d'avoir une semence de bonne qualité et en quantité suffisante.

Les béliers peuvent être prélevés tous les jours sans que cela affecte la concentration et le volume de la semence.

Sitôt le prélèvement effectué, on place le tube avec son contenu dans un bain-marie à 37°C. Une première analyse est effectuée avant de "pooler" les éjaculats pour atteindre le volume requis.

3. ANALYSE DE LA SEMENCE

Deux niveaux d'analyse de la semence ont été réalisés et chacun de ces niveaux est susceptible d'écarter une semence ne répondant pas aux normes de qualité qu'on attend d'un éjaculat frais.

3.1. ANALYSE MACROSCOPIQUE

L'analyse macroscopique est directement réalisable dans le tube de prélèvement; elle est basée sur une observation de l'aspect du sperme.

La couleur est le premier paramètre analysable. Elle est généralement blanc-laiteux chez le bélier avec des variations individuelles principalement dépendantes de la concentration. Il est possible aussi d'observer des couleurs révélant la présence de contaminants tel qu'une teinte rosée (présence de sang), grisâtre ou brune (signe d'une infection dans le tractus génital); dans ces cas, les prélèvements sont évidemment à écarter.

L'odeur est un paramètre secondaire qui permet éventuellemment de déceler la présence d'urine dans l'éjaculat .

Le volume est directement mesurable à l'aide des graduations se trouvant sur le tube. Il est à noter qu'une fréquence de prélèvement trop intense provoque une réduction progressive du volume moyen de l'éjaculat (cfr. chap I, para. 1).

3.2. ANALYSE MICROSCOPIQUE

L'analyse microscopique est faite au moyen d'un microscope à platine chauffante, maintenue à 37°C afin de préserver les spermatozoïdes contre tout choc thermique.

3.2.1. Motilité

La motilité est un très bon élément d'appréciation de la qualité du sperme, car elle est représentative de la proportion de gamètes vivants.

3.2.1.2. Motilité massale (M.M.)

Pour l'étude de la motilité massale, une goutte de sperme est placée sur une lame préalablement réchauffée, et est observée sous microscope à faible grossissement (10x15). L'évaluation de la M.M. est faite subjectivement par l'observateur par caractérisation des vagues formées par les mouvements conjoints de tous les spermatozoïdes. Une cotation est donnée à chaque sperme, basée sur une échelle conventionnelle allant de 0 à 5 et présentant les critères suivants:

5: très bon;	vagues denses à mouvements très rapides; plus de 90% des spermatozoïdes sont actifs;
4: bon;	mouvements vigoureux, mais les vagues sont moins rapides que pour la cotation 5; 70 à 85% des spermatozoïdes sont actifs;
3: moyen;	mouvements lents des vagues; 45 à 65% des spermatozoïdes sont actifs;
2: pauvre;	il n'y a pas formation de vagues, mais des mouvements de spermatozoïdes sont discernables; 20 à 40% des cellules sont actives;
1: très pauvre;	nombre restreint de gamètes en mouvement: environ 10% et pas de mouvement de masse;
0: mort;	aucun signe de mouvement.

3.2.1.3. Motilité individuelle

La motilité individuelle permet d'estimer le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans un sperme dilué.

L'analyse de la motilité individuelle est effectuée avec le même matériel optique que pour la motilité massale, mais à un grossissement plus important (10x32). Une goutte de sperme est placée entre lame et lamelle ce qui permet à l'observateur d'estimer le nombre de spermatozoïdes motiles traversant le champ de vision par rapport au nombre de spermatozoïdes inertes. Pour être précise, cette estimation doit être, dans la mesure du possible, instantanée.

3.2.2. Frottis morts/vivants

Un frottis permet de déterminer la proportion de gamètes morts par rapport à celle de gamètes vivants et ce, par une coloration différentielle des spermatozoïdes; c'est la technique de *coloration vitale.*

La coloration vitale se base sur le fait que les cellules, en mourant, subissent des modifications de leur perméabilité membranaire suite à des altérations quelconques. Ces perturbations membranaires facilitent la pénétration du colorant qui va colorer la tête du spermatozoïde. Par contre, une cellule vivante sera préservée de la pénétration d'une grande partie du colorant et apparaîtra donc nettement plus claire.

Le colorant utilisé est *l'éosine-nigrosine.* Il existe de nombreuses colorations possibles. L'éosine sert principalement à la coloration de la tête du spermatozoïde en rouge tandis que la nigrosine sert de colorant de fond pour mettre la structure premièrement colorée en évidence.

La préparation du colorant est faite à base des composés suivant:

Eosine	1 gr
Nigrosine	2 gr
Citrate de sodium	3,57 gr
H_2O	100 ml

Le pH de la solution est ensuite ajusté jusque 6,8 avec de l'acide citrique, la pression osmotique est également ajustée jusque 320 mOsm/kg avec de l'eau distillée.

Une lame à 37°C est utilisée comme support sur laquelle on place une goutte de colorant (celui-ci est également maintenu à température dans un bain-marie) qui sera homogénéisée pendant une dizaine de secondes avec une gouttelette de sperme et ce avant de laisser poursuivre la coloration durant 60 secondes. La coloration ainsi terminée, la goutte est étalée sur la lame (technique du frottis) pour être observée sous microscope

(10x32); plusieurs régions du frottis sont balayées afin que le comptage des vivants et des morts permette de calculer un rapport le plus représentatif possible du sperme.

3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION

En raison de la grande variabilité des concentrations observées pour le sperme de bélier, il paraît judicieux de ramener cette concentration à une valeur fixe pour la conservation de la semence *in vitro* en vue de la congélation, soit $1,6.10^9$ spermatozoïdes par ml. L'ajustement à la concentration adéquate se fait par addition d'une quantité calculée de dilueur.

La concentration du sperme est mesurée par colorimérie qui est une technique rapide et facile d'utilisation. Elle est basée sur le principe d'une lecture de densité optique déterminée par un lecteur d'absorbance. La lecture est faite après dilution de 50 ml de sperme dans 100 ml de sérum physiologique formolé (9 gr de NaCl et 2 ml de formol à 40% dans 1 l d'eau). La mobilité des spermatozoïdes générant des perturbations dans la mesure de la densité optique, l'utilisation de formol dans le sérum de dilution est impérative pour immobiliser les cellules.

La dilution sperme-sérum est ensuite versée dans le lecteur préalablement étalonné avec un blanc (sérum sans sperme). L'absorbance (D.O.) est lue à 500 nm et on peut déterminer la concentration en spermatozoïde grâce au rapport:

$$\text{Concentration de spermatozoïdes} = (4,114 \times \text{D.O.} + 0,112) \times 10^9/\text{ml}$$

4. TRAITEMENT DE LA SEMENCE EN FRAIS

4.1. DILUTION DU PRÉLÈVEMENT

Lors de nos essais, la dilution sert, par modification successive de ses constituants, à tester les différents paramètres nécessaires pour l'obtention d'un milieu de dilution final idéal

Connaissant la concentration de spermatozoïdes dans l'échantillon, il est aisé de déterminer le volume de dilueur qu'il faut additionner à la semence pour obtenir la concentration de $1,6.10^9$ spermatozoïdes par ml.

Toujours dans un souci de préserver les spermatozoïdes d'un choc thermique éventuel, on aura préalablement mis à température (37°C) le dilueur et les tubes qui serviront à contenir le sperme dilué.

Lorsque le volume de sperme désiré pour un échantillon est récolté, il est divisé en un nombre d'aliquotes égales. Celles-ci vont permettre, à chacune des étapes de

l'élaboration du dilueur, de tester les différents éléments fixés (tampons, sucres, ions,...) par analyse microscopique (nombre de morts et motilité massale), pour finalement ne garder que l'élément qui nous donne le plus de satisfaction.

4.2. COMPOSANTS AYANT SERVI À L'ÉLABORATION DU DILUEUR

4.2.1. Tampons

Les quatres tampons testés à une concentration de 100mM sont:

-Tampon HEPES: Sigma, n°. H-3375, PM: 238
-Tampon Phosphate: solution de NaH_2PO_4 (Merck, n°503A912146, PM: 137.99) et de Na_2HPO_4 (UCB, n°1770, PM:141,96)
-Tampon citrate: solution de de citrate de sodium (UCB, n°1726, PM: 294,10)
-Tampon Tris (Carlo Erba, n°489981, PM: 121,14)

Une combinaison des tampon HEPES et phosphate a également été testée.

4.2.2. Sucres

Les trois sucres testés seuls ou en combinaisons sont:

-Glucose: sous forme de "D+ Dextrose" anhydre (UCB, N° 1290, PM: 180,16)
-Fructose: sous forme de "Levulose" (UCB, n°9427, PM: 180,16)
-Inositol: sous forme de "méso-inositol" (UCB, n°7809, PM: 180,16)

4.2.3. Ions

Les quatres ions ayant servi à la recherche de la meilleure combinaison ionique sont:
-K^+: sous forme de K_2HPO_4 (UCB, n°88I86087, PM: 74,56)
-Na^+: sous forme de NaH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 (cfr. tampon phosphate)
-Ca^{++}: sous forme de $CaCO_3$ (Merk, n°2066)
-Mg^{++}: sous forme de $Mg_3(PO_4)_2$ (Sigma, n°M-1265, PM: 174,3)

4.2.4. Protecteurs membranaires et albumine

Deux protecteurs sont testés, ainsi qu'une combinaison des deux. L'albumine est

testée à différentes concentrations. Les références de ces composés sont:

-Vitamine C: Acide ascorbique (L) anhydre (Sigma, N°. A-0278)

-Vitamine E: α-Tocophérol (D) 970/g, extrait d'huile végétale (Sigma, N°.T-3634)

-Albumine: Albumine sérique bovine, fraction V (Hoechst n°12659)

4.2.5. Antibiotiques

Les trois antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison sont:

-Sulfanilamide: (Sigma, n°S-9251)

-Gentamycine: (Gibco Bri, n°043-05750D)

-Streptomycine sulfate: (Sigma, n°S-6501)

4.3. REFROIDISSEMENT À 4°C

La conservation de la semence en frais étant faite sur un laps de temps pouvant atteindre quelques jours, il est nécessaire de diminuer l'activité métabolique des spermatozoïdes en vue de réduire leur consommation énergétique. Evans et Maxwell (1987) suggèrent qu'une diminution trop rapide de la température est fatale pour les spermatozoïdes, et ce suite au choc thermique, mais que par contre une diminution progressive de la température jusque 4°C accroît la longévité des spermatozoïdes.

Pratiquement, les tubes contenant la semence diluée sont plongés au 3/4 dans un berlin de 250 ml rempli d'eau à 37°C. L'ensemble du système est ensuite placé dans un chambre frigorifique à 4°C, et la température des tubes diminue progressivement à une vitesse approximative de 0,2°C/min. pour venir se stabiliser à 4°C.

4.4. PRÉPARATION DU DILUEUR EN FRAIS (DBH)

Comme le dilueur pour la semence de bélier (DBH), obtenu pour la conservation en frais, nous a servi de milieu de base lors de nos essais pour la congélation, voici pour plus de détail sa composition et sa préparation:

Composition pour 100 ml:

- 1,19 gr d'HEPES
- 0,65 gr de Na_2HPO_4
- 0,065 gr de NaH_2PO_4
- 0,014 gr de $Mg_3(PO_4)_2$
- 0,007 gr de $CaCO_3$
- 1,10 gr de fructose

- 1,15 gr d'inositol
- 5 ng de gentamycine

Le dilueur est préparé comme suit:

- ajouter les différents composants à 90 ml d'H_2O distillée, tout en mélangeant fortement au moyen d'un agitateur magnétique.
- mettre à volume par addition d'H_2O distillée.
- contrôler la pression osmotique au moyen d'un osmomètre, et si il y a lieu ajuster celle-ci à 320 mOsm/kg avec de l'inositol ou de l'eau distillée.
- vérifier le pH, qui parfois doit être porté à 7,2 avec du NaOH 1N.

5. TRAITEMENT DE LA SEMENCE EN VUE DE LA CONGÉLATION

5.1. DILUTION DE LA SEMENCE

La congélation n'étant pas toujours faite au même endroit que le prélèvement et le traitement de la semence, une dilution de base est nécessaire à la survie des spermatozoïdes lors du transport. Cette dilution est différente de celle effectuée pour la conservation en frais (para. 4.1) par le fait qu'elle doit être incomplète, permettant de ce fait l'ajout ultérieur de cryoprotecteurs (CPA).

Pour une question de facilité, les solutions de cryoprotection sont 4 fois plus concentrées que la concentration finale désirée, ce qui permet une dilution de base suffisante au transport des spermatozoïdes.

La quantité de dilueur et de solution cryoprotective peut être calculée par le rapport suivant:

$$\text{Vol. solution cryo.} = \frac{[\text{ vol. sperme + vol. de dilution total }]}{4}$$

Vol. de dilueur à ajouter= Vol. de dilution total - Vol. solution cryo.

5.2. CONGÉLATION

Après un traitement adéquat de la semence (para. 4.2.), le sperme additionné du dilueur et de la solution cryoprotective est mis en paillettes de 0,25 ml. Ceci se fait par aspiration buccale. Les paillettes sont ensuite bouchées au moyen de poudre spéciale se solidifiant au contact d'un liquide. L'utilisation de paillettes de couleurs différentes permet en outre de distinguer les tests effectués à partir d'un même échantillon.

Les paillettes sont ensuite placées dans l'appareil de congélation qui au laboratoire permet une programmation de diminution de température allant de -1 à -19°C/min. Il est également possible de programmer la température où se terminera la congélation.

La programmation exécutée, les différents groupes de paillettes congelées sont placés dans des cruches à azote liquide dans des visotubes numérotés de couleurs différentes, ce qui permet de différencier les échantillons entre eux.

5.3. DÉCONGÉLATION

Pour la décongélation, les paillettes sont extraites de la cruche et sont immergées dans un bain à 37°C pendant 30 secondes. Des variations de temps d'immersion et de température de bain ont également été testées microscopiquements (motilité individuelle).

5.4. CRYOPROTECTEURS (CPA) ÉTUDIÉS

Les cryoprotecteurs à tester sont mis en solution dans le milieu de dilution qui nous a donné les résultats les plus satisfaisants lors des recherches en frais (cfr. para 4.4.).

Les concentrations finales sont celles obtenues après dilution avec la semence. Toutes les quantités données ci-dessous sont calculées pour des concentrations quatre fois supérieures à la concentration finale (para.4.2.)

Pour le glycérol: (Merck, n°4094, PM: 92,10, solution à 87%), les différentes concentrations utilisées sont:

2% de conc. finale:	0,92 ml de CPA	9,08 ml de DBH
4% de conc. finale:	1,84 ml de CPA	8,16 ml de DBH
6% de conc. finale:	2,76 ml de CPA	7,24 ml de DBH
8% de conc. finale:	3,68 ml de CPA	6,32 ml de DBH
10% de conc. finale:	4,60 ml de CPA	5,40 ml de DBH

Pour l'éthylène glycol: (Merk, n°9621, PM: 62,07, solution à 1,11 kg/l), les différentes concentrations utilisées sont:

0,25M de conc. finale:	0,55 ml de CPA	9,45 ml de DBH
0,50M de conc. finale:	1,11 ml de CPA	8,89 ml de DBH
0,75M de conc. finale:	1,65 ml de CPA	8,35 ml de DBH
1,00M de conc. finale:	2,24 ml de CPA	7,76 ml de DBH
1,50M de conc. finale:	3,35 ml de CPA	6,65 ml de DBH
2,00M de conc. finale:	4,47 ml de CPA	5,53 ml de DBH

Pour le diméthylsulfoxide (DMSO): (UCB, n°6107,PM: 78,13, solution à 1,10 kg/l) les différentes concentrations utilisées sont:

0,50M de conc. finale:	1,42 ml de CPA	8,58 ml de DBH
1,00M de conc. finale:	2,84 ml de CPA	7,16 ml de DBH
1,50M de conc. finale:	4,26 ml de CPA	5,74 ml de DBH
2,00M de conc. finale:	5,68 ml de CPA	4,32 ml de DBH
2,50M de conc. finale:	7,10 ml de CPA	2,90 ml de DBH
3,00M de conc. finale:	8,52 ml de CPA	1,48 ml de DBH

Pour l'hydroxyethyl starch (HES): (Sigma, n°H-6382) les quantités nécessaires à peser étant très faibles, nous sommes partis d'une solution de base 100mg de CPA dans 100ml d'H_2O. Les concentrations utilisées à partir de celle-ci (100%) sont:

5% de conc. finale:	2 ml de CPA	8 ml de DBH
10% de conc. finale:	4 ml de CPA	6 ml de DBH
15% de conc. finale:	6 ml de CPA	4 ml de DBH
20% de conc. finale:	8 ml de CPA	2 ml de DBH
25% de conc. finale:	10 ml de CPA	0 ml de DBH

Pour le polyéthylèneglycol (PEG): (Sigma, polyéthylèneglycol 6000, n°H-6382) et pour les mêmes raisons, nous sommes partis d'une solution de base 100mg de CPA dans 100ml, les différentes concentrations utilisées à partir de celle-ci (100%) sont:

5% de conc. finale:	2 ml de CPA	8 ml de DBH
10% de conc. finale:	4 ml de CPA	6 ml de DBH
15% de conc. finale:	6 ml de CPA	4 ml de DBH
20% de conc. finale:	8 ml de CPA	2 ml de DBH
25% de conc. finale:	10 ml de CPA	0 ml de DBH

Pour le propylèneglycol: (UCB, 1,2-Propylèneglycol: n°8214, PM: 76,10, solution à 1,04 kg/l) les différentes concentrations utilisées sont:

0,50M de conc. finale:	1,46 ml de CPA	8,54 ml de DBH
1,00M de conc. finale:	2,93 ml de CPA	7,07 ml de DBH
1,50M de conc. finale:	4,39 ml de CPA	5,61 ml de DBH

2,00M de conc. finale: 5,85 ml de CPA	4,15 ml de DBH
2,50M de conc. finale: 7,32 ml de CPA	2,68 ml de DBH
3,00M de conc. finale: 8,78 ml de CPA	1,22 ml de DBH

6. METHODES D'ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus au cours de nos différentes expériences ont été traités selon le modèle de l'ANOVA.

Nos résultats étant sous forme de pourcentage, une transformation de variable a été nécessaire pour rendre cette distribution homogène. La transformation utilisée est ARCSIN $(X_{ij})^{1/2}$.

Les schémas expérimentaux étant en fait, des blocs aléatoires, il n'y a pas de résiduelle.

Les différences significatifs observé par ANOVA sont ensuite testés par contraste de Scheffé.

CHAPITRE IV.
RÉSULTATS, DISCUSSIONS, CONCLUSIONS

1. MISE AU POINT D'UN MILIEU DE DILUTION POUR LA SEMENCE D'OVIN

Dans un premier temps, la nécessité d'un milieu de dilution performant, où la survie des spermatozoïdes serait supérieure à celle observée actuellement avec le dilueur usuel (lait INRA), nous a conduit à la mise au point de notre dilueur en frais. Dans un deuxième temps, celui-ci nous a également servi de milieu de base pour la recherche d'un protocole de congélation de la semence de bélier.

Afin d'obtenir une qualité de semence la plus constante possible pour le travail, les essais nécessaires à l'élaboration du milieu sont réalisés sur un "pool" de spermes. Celui-ci est constitué d'éjaculats de plusieurs béliers, regroupés en un seul échantillon après analyse de qualité (volume, concentration et motilité massale) sur chacun d'eux.

Au cours de nos investigations, nous nous sommes penchés sur différents impératifs utiles à une survie maximale des spermatozoïdes; recherche d'un tampon et d'un substrat énergétique idéal, détermination d'une pression osmotique optimale, et d'une combinaison ionique adéquate et observation des effets de l'albumine, de vitamines et d'antibiotiques sur les spermatozoïdes.

1.1. CHOIX D'UN TAMPON

Sur base des travaux déjà effectués au laboratoire de Physiologie Animale (Bousette, 1990 et Lessire, 1991), cinq tampons (HEPES, phosphate, citrate, tris et HEPES-phosphate) sont testés pour leur capacité à maintenir le pH de la semence à un optimum de 7.2 et pour leurs actions sur la motilité massale et sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants après visualisation. Ces tampons sont testés à une concentration de 100mM, compromis entre le pouvoir tampon et la possibilité d'additionner d'autres substances énergétiques et protectrices, sans dépasser la pression osmotique (P.O.) idéale.

1.1.1. Schéma expérimental

Afin de fournir aux spermatozoïdes un substrat métabolisable et de les maintenir dans une pression osmotique suffisante, et dans l'ignorance du meilleur substrat énergétique pour les spermatozoïdes, trois sucres connus pour être favorables à leur survie sont répartis dans chacun des cinq tampons. Cela représente quinze milieux à tester. La quantité de sucre à additionner aux milieux est déterminée de façon à obtenir une pression osmotique proche de la valeur physiologique du plasma séminal (320 mOsm/kg). La semence, un pool d'éjaculats de plusieurs béliers, est fractionnée pour être

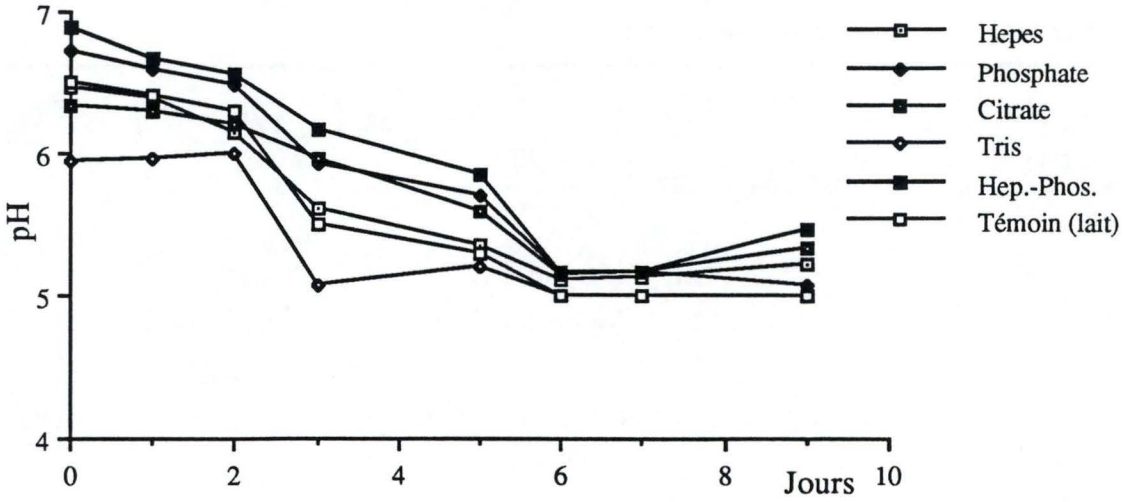


Fig. 1 pH mesurés pour les différents milieux tampons (n=16)

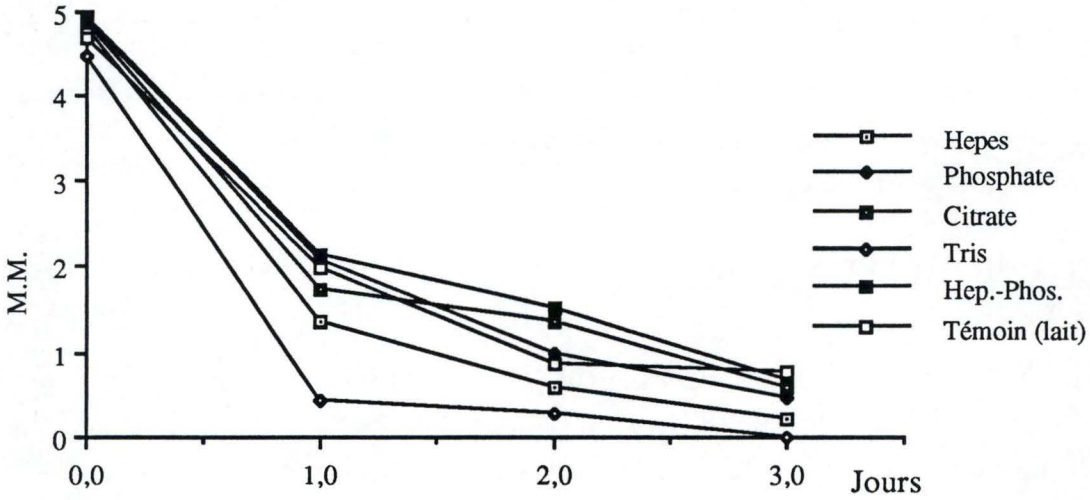


Fig.2 Motilités massales estimées pour les différents milieux tampons (n= 16)

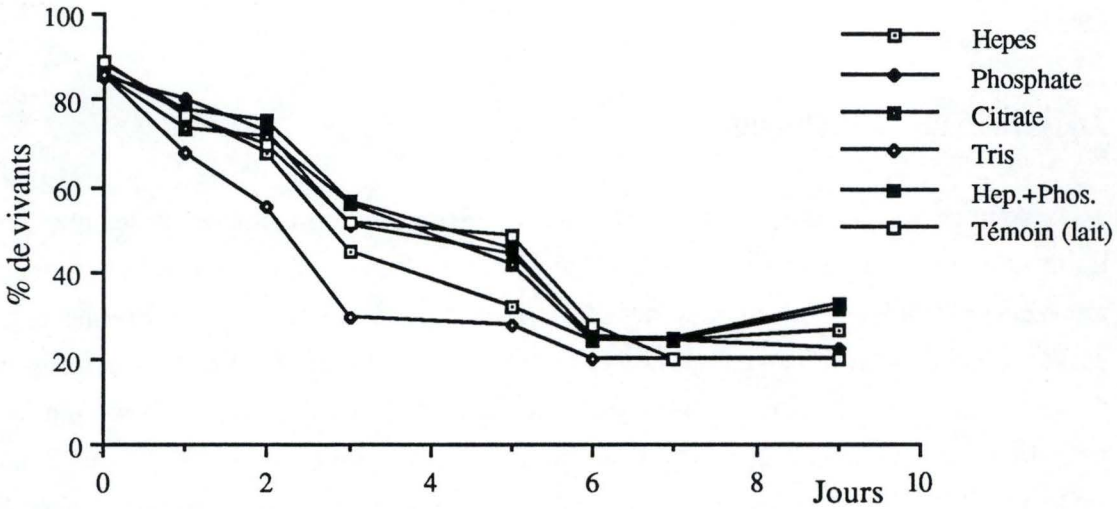


Fig. 3 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les différents milieux tampons (n=16).

diluée dans chacun des quinze milieux. La dilution effectuée, le sperme est placé en chambre froide, où sa température va descendre progressivement pour se stabiliser à 4°C après un peu plus de deux heures.

La motilité massale (M.M.), le pourcentage de spermatozoïdes ayant survécus au stockage dans chacun des milieux et le pH sont déterminés toutes les 24 heures. L'expérience est répétée 4 fois avec des pools de semences différents. Les résultats sont calculés pour chaque solution tampon sur la moyenne des données obtenues avec les différents sucres au cours de chaque répétition.

1.1.2. Résultats

Quel que soit la substance tampon considérée, le pH (fig. 1) diminue progressivement au cours du temps. Au jour 2, il se situe entre 6 et 6,6 pour tous les tampons. Au jour 5, seul le tampon HEPES-phosphate maintient un pH supérieur à 5,8 qui représente la limite extrême de survie des spermatozoïdes.

En ce qui concerne la motilité massale (fig. 2.), une réduction de plus de la moitié de la vitalité s'observe déjà après 24 heures pour tous les tampons. Le graphe montre que 48 heures après la dilution, le tampon HEPES-Phosphate maintient légèrement mieux la motilité des spermatozoïdes que les autres tampons, mais au jour 3, les différences disparaissent. Le tampon TRIS est le moins efficace.

La figure 3 montre que le pourcentage de spermatozoïdes vivants diminue régulièrement. L'évolution est fort semblable dans tous les tampons sauf pour le TRIS qui s'avère moins bon. Après 2 jours de stockage, il y a encore près de 75% de spermatozoïdes vivants dans le meilleur des tampons. Après 6 jours, les frottis révèlent environ 20 % de spermatozoïdes vivants, bien que la motilité massale ait disparu depuis longtemps.

Notre but étant d'atteindre un maintien de survie et de motilité pendant au moins 48 heures, nous nous sommes penchés sur l'analyse particulière des résultats à ce moment (fig. 4). Cette figure fait apparaitre la supériorité du mélange HEPES-phosphate par rapport aux autres tampons, cette supériorité n'est pas significative pour le pH, mais bien pour la motilité massale (P<0,025) et la survie des spermatozoïdes (P<0,05).

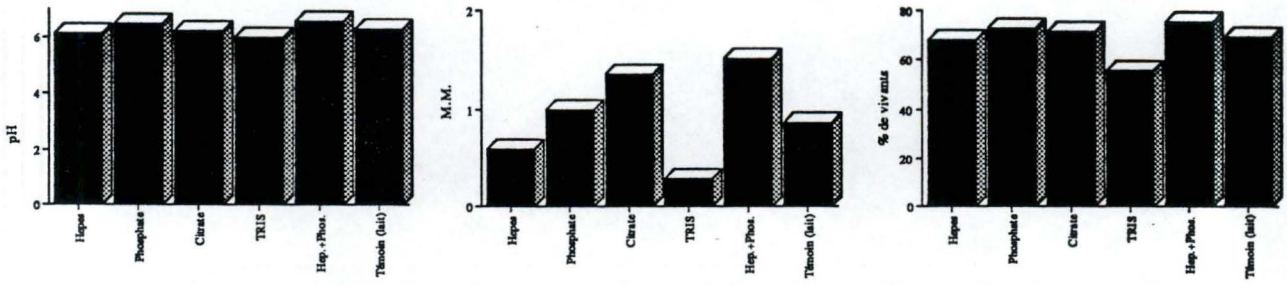


Fig. 4. M.M., pH et pourcentages de spermatozoïdes vivants après 48 heures dans les différents tampons.

1.1.3. Discussion

La diminution progressive du pH observée au fil des jours serait la résultante de l'activité cellulaire qui produirait de l'acide lactique par utilisation des sucres du milieu au cours de la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof. Toutefois, il est concevable que les spermatozoïdes survivent encore jusqu'à un pH de 6,4 qui est le pH mesuré dans la région antérieure de l'épididyme (Levine et Kelly, 1978 cités par Chevrier, 1990). De fait, on constate que la diminution un peu plus importante du pH entre le deuxième jour (de 6 à 6,5 tous tampons confondus) et le troisième jour (de 5 à 6), se solde par une chute du pourcentage de gamètes vivants; de 75 à 55% le deuxième jour, on tombe au troisième jour à des valeurs allant de 56 à 22%. Gatti *et al.* (1992) ont montré que la motilité était maximale pour des valeurs de pH allant de 7 à 8, alors qu'un spermatozoïde éjaculé se trouve dans un sperme dont le pH moyen est de 6,84.

La supériorité du tampon HEPES-Phosphate peut-être due à différents facteurs: soit il présente une toxicité moins importante que les autres tampons, soit il stabilise mieux le pH. Cette supériorité due à une meilleure stabilisation du pH par l'HEPES-Phosphate n'est pas évidente au vu de nos résultats.

D'un autre côté, il est possible que les avantages apportés par le tampon phosphate, qui est également un des tampons permettant la survie d'un grand nombre de cellules et une bonne stabilisation de pH, seraient confortés par le tampon HEPES qui est un tampon organique couramment utilisé pour la culture de différents types cellulaires.

1.1.4. Conclusions

Le tampon HEPES-Phosphate est le tampon qui, au "jour 2", permet la meilleure survie des spermatozoïdes et le maintien de la meilleur. Il présente également les meilleurs résultats de pH, de survie cellulaire et de motilité massale, si on considère chaque jour étudié .

Une proportion initiale de spermatozoïdes morts ou anormaux de l'ordre de 10 à 15% est observée après dilution.

Un pH inférieur à 6 est toxique pour les spermatozoïdes dont l'optimum doit se trouver aux alentours de 7,2.

1.2. CHOIX D'UNE COMBINAISON DE SUCRES

La seconde expérience a pour but de déterminer la combinaison de sucres qui

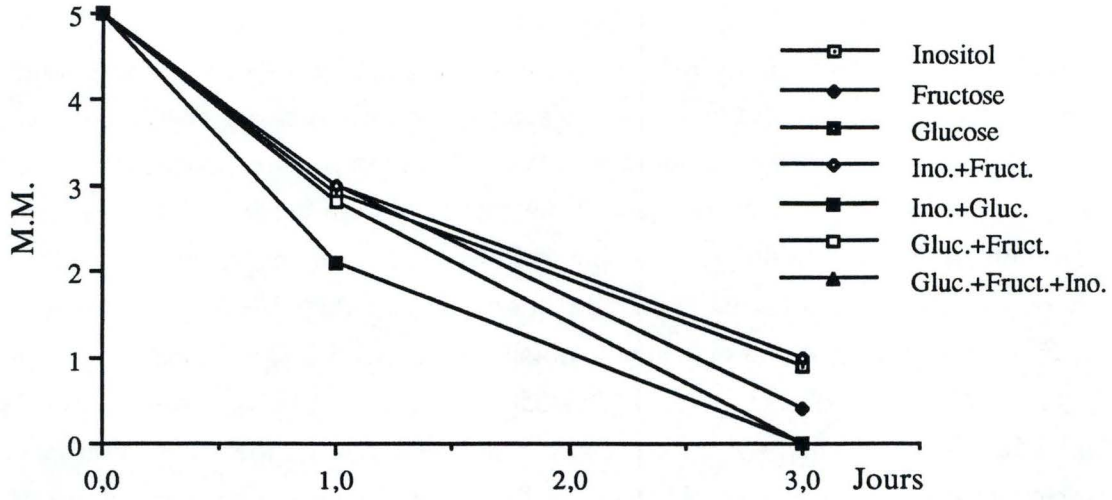


Fig. 5 Motilités massales estimées pour les différentes combinaisons de sucres (n=4)

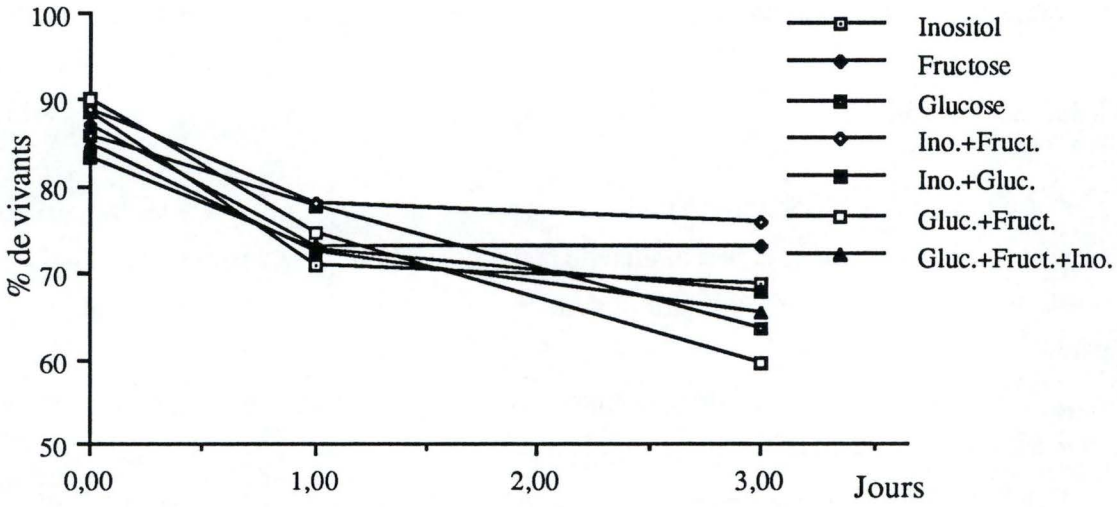


Fig. 6 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les différentes combinaisons de sucres(n=4)

répondrait le mieux aux attentes en substrats énergétiques et en pression osmotique pour un milieu de dilution et de conservation performant. Sur base des travaux effectués au laboratoire et en accord avec la littérature, trois sucres semblent particulièrement performants pour la survie des spermatozoïdes, le glucose, le fructose et l'inositol, alors que d'autres s'avèrent toxiques et n'ont pas été repris dans nos tests. Il s'agit du mannose et du sorbitol. Dès lors, les trois premiers sont testés seuls ou combinés.

1.2.1. Schéma expérimental

Les six combinaisons de sucres obtenues à partir du glucose, du fructose, et de l'inositol, sont additionnées au tampon HEPES-Phosphate, et forment les 6 échantillons à tester. La quantité de sucre à ajouter dans chaque échantillon est calculée pour que la pression osmotique du milieu soit de 320 mOsm/kg. La vérification des échantillons (M.M. et pourcentage de vivants) est faite toutes les 24 heures pendant 3 jours. L'essai est reproduit 4 fois, avec des pools différents d'éjaculats prélevés à différentes dates.

1.2.2. Résultats

Les résultats de motilité massale obtenus avec les combinaisons de sucres (fig. 5), montrent un avantage pour l'inositol seul et sa combinaison avec le fructose. Toutefois cette supériorité n'est pas significative.

Si on observe les résultats obtenus pour la survie des spermatozoïdes (fig. 6), on constate que l'inositol-fructose est la combinaison donnant les meilleurs résultats suivie de très près par le fructose.

Ces données confirment l'analyse qui peut-être faite sur les résultats de la première expérience, lorsqu'on calcule les moyennes obtenues par chacun des 3 sucres ajoutés aux différents tampons (fig. 7). La supériorité de l'inositol pour la motilité est significative ($P<0,05$).

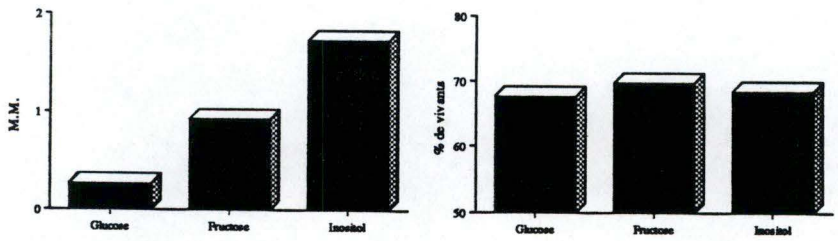


Fig. 7. M.M. et pourcentages de vivants pour les sucres au jour deux dans l'expérience préliminaire de détermination du tampon (tous tampons confondus).

1.2.3. Discussion

L'adjonction d'une combinaison d'inositol-fructose au tampon HEPES-phosphate, est celle qui semble nous donner les meilleurs résultats.

Ces résultats sont plus satisfaisants que ceux de chacun des deux sucres pris séparément. Cet avantage pourrait s'expliquer par une complémentarité des deux sucres. Comme on peut l'observer sur les figures 5 et 7, l'inositol montre des scores intéressants pour la motilité massale, alors que l'action du fructose semble être plus axée sur la survie des spermatozoïdes.

Dans le plasma séminal de bélier, le fructose est le composé glucidique le plus important en quantité (Setchell, 1966, Mann, 1975 et Hafez, 1980). Il est également la source majeure d'énergie pour le spermatozoïde via la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof. Il est plus que concevable que le rôle énergétique joué par le fructose *in vivo*, est concervé lors du stockage et de la conservation *in vitro*.

L'inositol se trouve en très faible quantité dans le plasma séminal du bélier. Une de ses seules actions connue serait un rôle de maintien de la pression osmotique chez une espèce où il est en grande quantité (porcin). Par ailleurs, l'inositol n'est pas considéré comme un sucre métabolisable par le spermatozoïde (Derivaux et Ectors, 1986). Toutefois, lorsqu'il est additionné *in vitro*, il est faiblement oxydé par les spermatozoïdes, alors que *in vivo* il est absorbé dans l'épididyme et incorporé aux phospholipides (Hafez, 1980). Au vu des résultats obtenus par l'inositol, dont l'action semble surtout se marquer sur la motilité massale (pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants), ce sucre pourrait être considéré comme un "stimulant" de la motilité. Ceci expliquerait également que l'inositol présent en faible quantité dans une semence non diluée, pourrait faire rapidement défaut entraînant ainsi une réduction de la vitalité de la semence. L'addition d'inositol dans le milieu de dilution pourrait donc éventuellement pallier ce manque dans le plasma séminal, manque qui n'est pas limitant dans un processus normal de reproduction.

1.2.4. Conclusion

La combinaison équipondérale des sucres inositol et fructose est celle qui donne les meilleurs résultats. Le mélange, additionné de manière à maintenir la pression osmotique à une valeur optimale ($\pm$ 23g/100ml au total), fournit un substrat énergétique suffisant à la survie des spermatozoïdes.

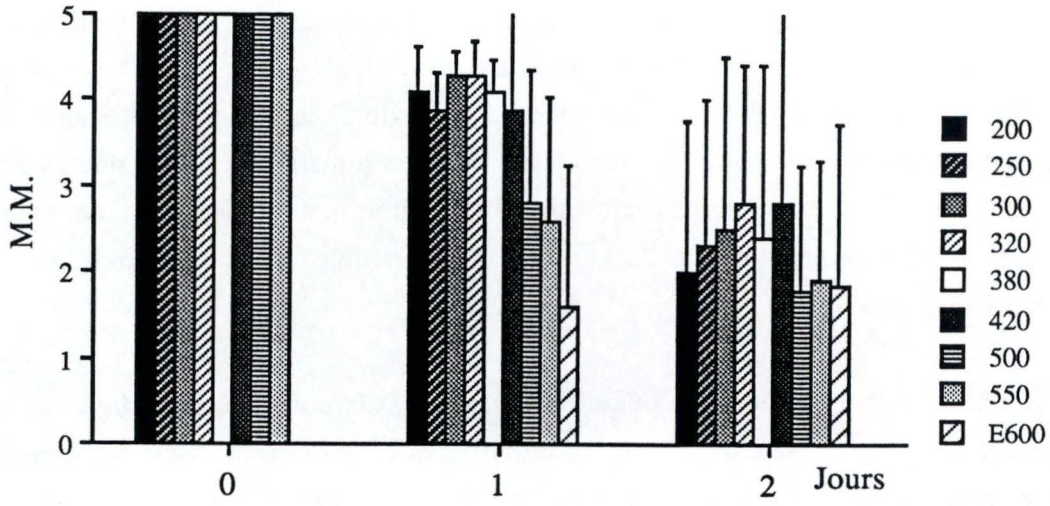


Fig. 8 Motilités massales estimées pour les variations de pression osmotique (n= 4)

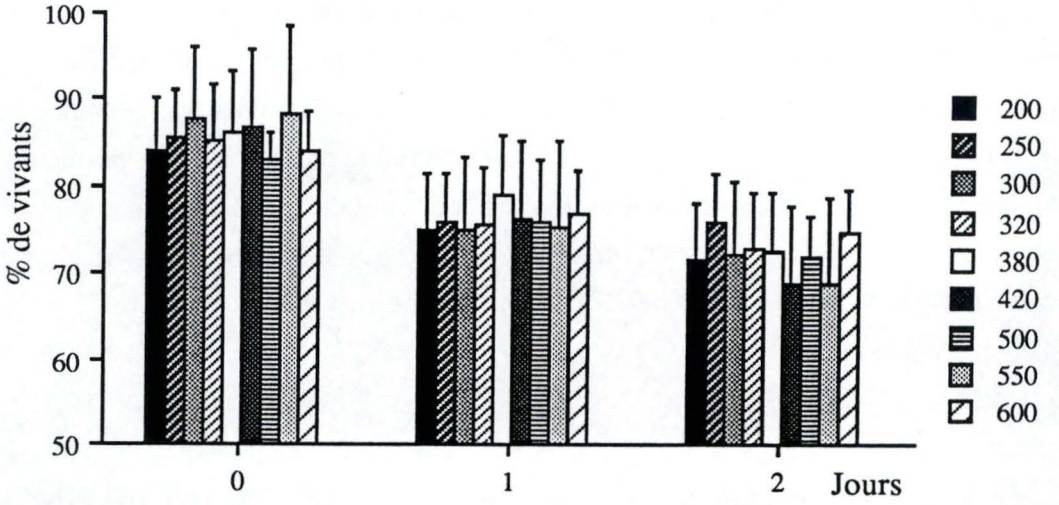


Fig. 9 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les variations de pression osmotique (n=4)

1.3. DÉTERMINATION D'UNE PRESSION OSMOTIQUE OPTIMALE

La pression osmotique étant un facteur important pour la survie et l'intégrité morphologique des spermatozoïdes, la troisième expérience vise à déterminer une pression osmotique optimale pour les gamètes de bélier.

1.3.1. Schéma expérimental

Pour ces essais, des variations de 200 à 600 mOsm/kg par pas de 50 forment un ensemble de neuf échantillons à tester. La pression osmotique de chacun des échantillons est obtenue par des additions en quantité croissante du mélange inositol et fructose dans un milieu tamponné à l'HEPES-phosphate. Les résultats de survie et de motilité sont enregistrés après 24 et 48 heures. L'essai est répété 4 fois.

1.3.2. Résultats

Le traitement statistique n'a pas pu montrer de différences significatives pour la motilité massale entre les milieux de différentes pressions osmotiques (fig. 8). On observe néanmoins une dépression dans les résultats obtenus au deuxième jour avec des pressions osmotiques de 200 et de 500 à 600 mOsm/kg. Les valeurs de 250 à 420 semblent être les plus prometteuses, même si les résultats ne sont pas significativement différents.

De même que pour la motilité massale, les pourcentages de vivants (fig. 9) ne présentent pas de variations significatives entre les pressions osmotiques, suggérant une absence d'effets de celles-ci pour la fourchette de pression étudiée.

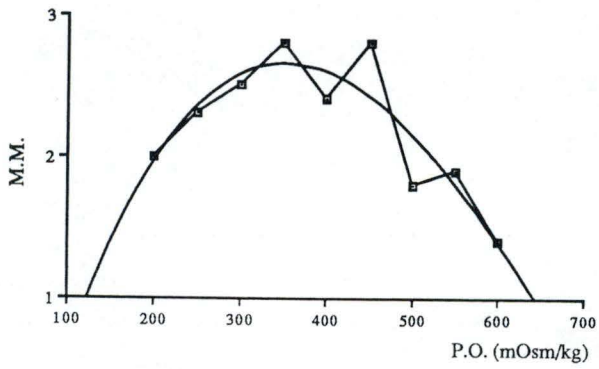


Fig. 10. M.M. au deuxième jour pour les différentes pressions osmotiques et approximation réalisée sous forme de polynôme du troisième degré.

1.3.3. Discussion

On constate que des pressions osmotiques inférieures à 250 et supérieures à 420 mOsm/kg semblent limitants pour la survie des spermatozoïdes, alors qu'une variation de pression osmotique de 250 à 420 mOsm/kg ne semble pas altérer outre mesure la motilité ou le pourcentage de vivants. Ces observations vont dans le sens des conclusions de Roy *et al.* (1978) qui ont montré qu'un milieu hypotonique (inférieur à 200 mOsm/kg) entraîne une modification du volume des spermatozoïdes par un accroissement de 50% du compartiment aqueux du spermatozoïde (résultats comparés au volume à 300 mOsm/kg). D'autre part, un milieu hypertonique (supérieur à 600 mOsm/kg) comprimerait le volume de 25 à 30%.

Si l'on se réfère aux résultats obtenus au deuxième jour pour la motilité massale des spermatozoïdes (fig. 10), on peut observer que la courbe d'approximation réalisée sous forme de polynome du troisième degré passe par un maximum à 320mOsm/kg ce qui est très semblable aux P.O. mesurées au niveau du plasma séminal (310-330mOsm/kg) pour le sperme de bélier. Nous avons donc opté pour un milieu isotonique, et fixé la pression osmotique du dilueur à 320 mOsm/kg.

1.3.4. Conclusion

Des variations de pression osmotique de 250 à 450 mOsm/kg ne semblent pas affecter la survie des spermatozoïdes; toutefois, nous optons pour un milieu isotonique dont la pression osmotique sera ajustée à 320 mOsm/kg avec les sucres inositol et fructose, dans un milieu tamponné à l'HEPES-phosphate.

1.4. CHOIX D'UNE COMBINAISON IONIQUE

L'objectif de la quatrième expérience est de déterminer la combinaison ionique la plus adéquate pour la survie et la motilité des spermatozoïdes. Pour ce faire, quatre ions présents dans le plasma séminal de bélier (Na^+, K^+, Ca^{++} et Mg^{++}) sont testés.

1.4.1. Schéma expérimental

Notre milieu de base (HEPES-phosphate et Inositol-fructose) contenant déjà du sodium, huit combinaisons ioniques vont former notre échantillonnage. Les concentrations utilisées pour les différents ions sont établies en fonction de leur concentration physiologique dans le plasma séminal de bélier. Pour chaque ajout des combinaisons ioniques, la P.O. est ajustée à 320mOsm/kg avec les sucres. Les

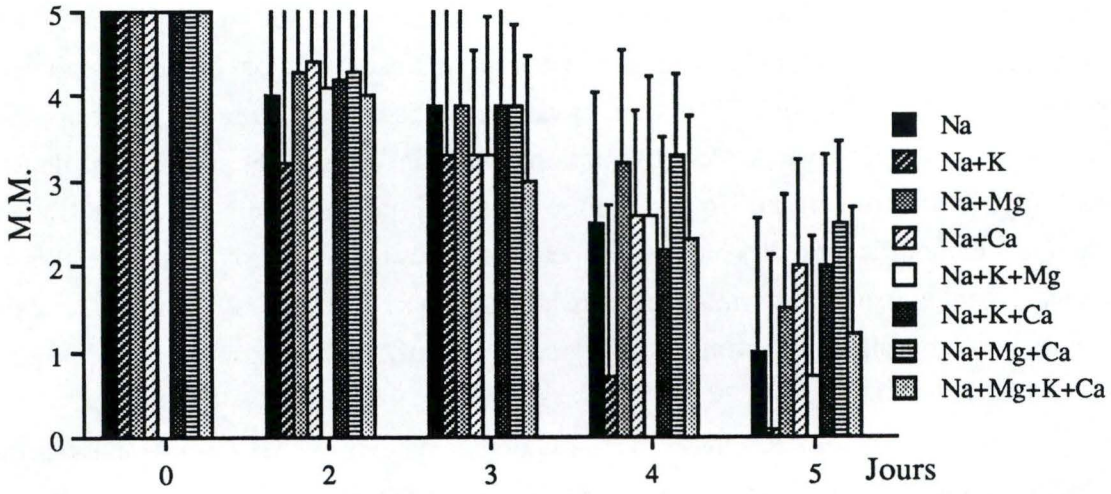


Fig. 11 Motilités massales estimées pour les différentes combinaisons ioniques (n=4)

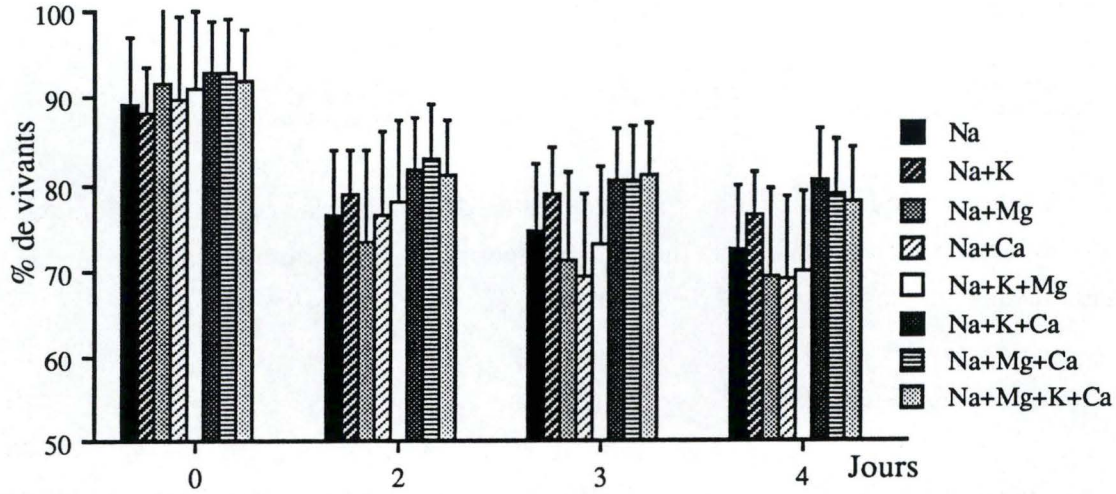


Fig. 12 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les différentes combinaisons ioniques (n=4)

paramètres habituels (M.M. et pourcentages de vivants) sont mesurés 48, 72, 96 et 120 heures après la dilution. L'essai est répété 4 fois.

1.4.2. Résultats

Quarante huit heures après la dilution, la majorité des combinaisons ioniques permettent encore une motilité massale (fig. 11) supérieure à un niveau 4, excepté pour l'échantillon "Na+K" dont l'effet négatif est significatif par rapport à tous les autres à partir de 96 heures ($P<0,05$).

Après 72 heures, trois autres combinaisons (Na+Ca, Na+K+Mg et Na+Mg+K+Ca) montrent aussi une diminution de la motilité massale de près d'une unité alors que le bloc de tête (Na, Na+Mg, Na+K+Ca et Na+Ca+Mg) préserve encore une motilité massale appréciable.

La supériorité de "Na+Mg" et de "Na+Ca+Mg" se marque pour la motilité massale au bout de 96 heures, et se confirme significativement ($P<0,05$) pour "Na+Ca+Mg" au bout de 120 heures.

Malgré l'évidence de l'avantage de "Na+Ca+Mg" observé au cours des vérifications pour la motilité massale, il n'en est pas de même pour le pourcentage de vivants (fig. 12). De fait, il n'y a pas de différences significatives entre les échantillons ioniques en ce qui concerne le nombre de spermatozoïdes vivants.

On peut quand même observer dès le deuxième jour, que les ions permettant la survie la plus satisfaisante sont "Na+K+Ca", "Na+Mg+Ca" et "Na+Mg+K+Ca", ce qui se confirme les jours suivants.

1.4.3. Discussion

Les résultats de motilité et dans une moindre mesure ceux du pourcentage de spermatozoïdes vivants, indiquent que la combinaison ionique nous donnant le plus de satisfactions est celle composée de Na^+, Ca^{++} et Mg^{++}.

Le sodium étant l'ion le plus abondant dans le plasma séminal du bélier (Hafez, 1980), il n'est pas étonnant de constater que l'addition d'autres ions n'entraine des modifications qu'après 72 heures. Avec une quantité de près de 30 fois supérieure aux ions magnésium et calcium dans le plasma séminal, le sodium est certainement indispensable dans le milieu extérieur pour les différences de potentiel transmembranaire. Toutefois, au cours du transit épididymaire où se fait la maturation et l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes, on constate une réduction de la concentration en Na^+ couplée à une augmentation de la concentration en K^+. Cette diminution du rapport Na^+/K^+ au cours du transit serait donc utile pour la mise en place de la motilité. Un

rapport inadéquat entre ces deux ions, devrait se solder par une action négative sur la motilité des spermatozoïdes. Quinn *et al.* (1970) ont montré qu'une modification de ce rapport n'affecte pas la motilité des spermatozoïdes de bélier, par opposition à ce qui se passe pour d'autres espèces; une réduction du rapport entraîne une diminution de la motilité chez le lapin et le taureau, alors qu'elle l'augmente chez le chimpanzé. Nos résultats montrent des effets différents du K^+ sur les paramètres de survie et de motilité: l'addition de K^+ entraine toujours une diminution de la motilité par rapport à la même combinaison sans K^+. Par contre, des 4 meilleurs dilueurs pour la survie, 3 contiennent l'ion K^+, même si les différences observées entre les combinaisons ne sont pas significatives. On est arrivé à penser que l'addition de K^+ au milieu extracellulaire diminue l'activité des spermatozoïdes mais permet, peut-être pour cette raison, une survie plus longue. Le K^+ étant nécessaire entre autre pour la synthèse de protéines dans les ribosomes et pour son action sur la pyruvate kinase lors de la glycolyse (Lehninger, 1985), une augmentation *in vitro* de la concentration en K^+ dans le milieu extérieur pourrait se solder par une hyperactivité au niveau des pompes ioniques Na^+-K^+, conduisant ainsi à une consommation des ressources en ATP qui auraient dû servir pour la motilité. Cette hypothèse expliquerait la réduction de la motilité massale pour les milieux contenant du K^+.

Le magnésium additionné au sodium est la combinaison qui, pour la motilité, donne, après le mélange Na+Mg+Ca les meilleurs résultats jusqu'à 96 heures après la dilution. Cet avantage semble indiquer une action positive du magnésium sur la motilité. Chaque combinaison contenant du Mg^{++} présente une motilité supérieure et une survie inférieure par rapport à la même combinaison sans Mg^{++}. C'est l'effet opposé à celui que nous avons noté pour le K^+. Le Mg^{++} étant connu comme cofacteur lors de diverses réactions enzymatiques, il n'est pas étonnant que son apport permette une augmentation de l'activité cellulaire. De plus la dynéine, protéine de grande taille, ne présente une activité ATPasique nécessaire aux mouvements flagellaires qu'en présence de Mg++ (Lehninger, 1985). Mais cette activité semble aller de paire avec un épuisement plus rapide et la mort plus précoce des spermatozoïdes.

La calcium joue un rôle important dans la régulation du fonctionnement cellulaire en tant que messager coordonnant de nombreuses réactions. On peut donc penser que c'est un ion qui devait trouver place dans la combinaison ionique nécessaire à l'élaboration du dilueur. Ceci se confirme dans les résultats lorsque la calcium est associé au Na^+ et au Mg^{++}. Toutefois, bien qu'étant impliqué dans le déclenchement du mouvement flagellaire (Lindeman *et al.*, 1987) et dans l'hyperactivation (où le mode d'action est ignoré), le calcium serait, à un certain niveau, toxique pour la cellule. De fait, il a été observé une réduction de la motilité des spermatozoïdes lorsque l'ion est en trop grande concentration.

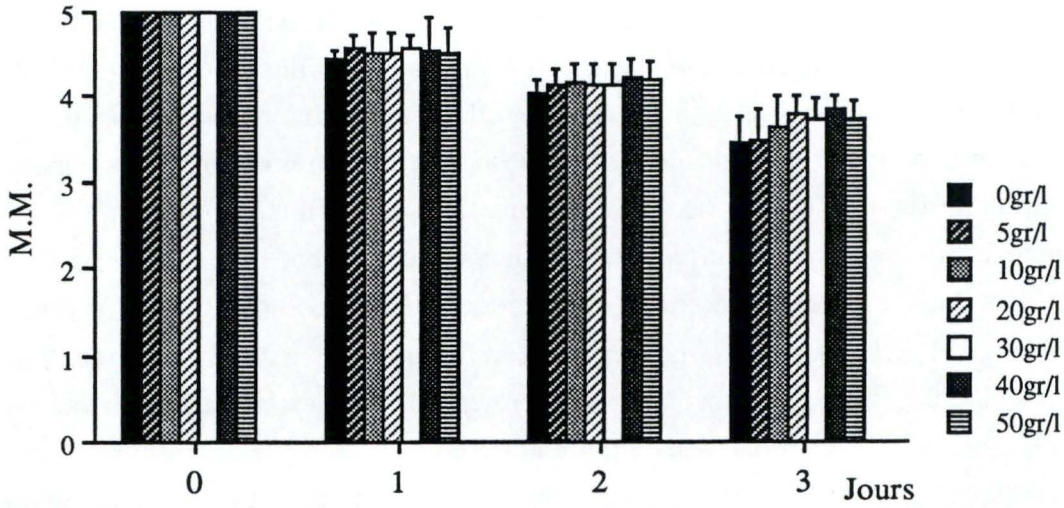


Fig. 13 Motilités massales estimées pour les différentes concentrations en albumine (n= 4)

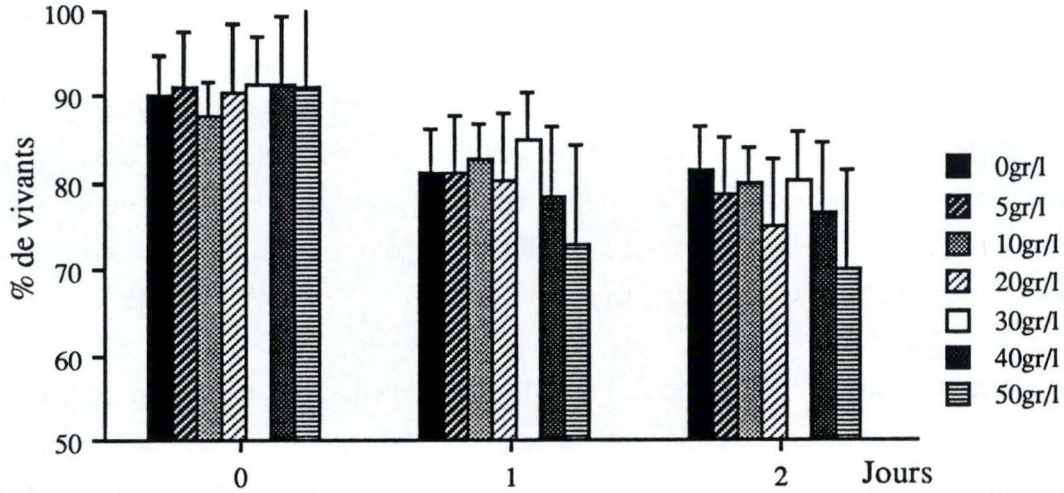


Fig. 14 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les différentes concentrations en albumine (n=4)

De plus, le calcium est un inducteur de la réaction acrosomiale, ce qui pourrait s'avérer négatif pour le maintien de la fécondité après conservation dans le milieu de dilution.

1.4.4. Conclusion

Le mélange ionique le plus satisfaisant est Na+Mg+Ca, chaque ion étant additionné de manière à obtenir un rapport de concentrations proche des concentrations physiologiques observées dans le plasma séminal de bélier.

1.5. OBSERVATION DES EFFETS DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ALBUMINE

Afin d'observer l'action de différentes concentrations en albumine sur la survie et la motilité massale des spermatozoïdes, un échantillonnage de 0 à 50 g/l d'albumine sérique bovine est testé.

1.5.1 Schéma expérimental

Dans un milieu tamponné à l'HEPES-phosphate, où sont adjoints les ions Na^+, Mg^{++} et Ca^{++}, on additionne différentes concentrations en albumine sérique, afin d'obtenir sept échantillons de 0 à 50 gr/l qui sont testés (M.M. et pourcentages de vivants) après 24, 48 et 72 heures. La pression osmotique est ajustée à 320mOsm/kg avec un mélange équipondéral d'inositol et de fructose. L'essai est répété 4 fois.

1.5.2. Résultats

Que ce soit pour la motilité massale (fig. 13) ou pour le pourcentage de spermatozoïdes vivants (fig.14), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les milieux contenant les différentes concentrations en albumine.

Il est à noter que la motilité massale au deuxième jour se trouve encore à un niveau de 4 et ce, pour toute les concentrations.

On peut malgré tout observer au jour 3 un faible désavantage (non significatif) dans les scores de motilité massale pour la concentration 0 gr/l par rapport aux autres concentrations. Mais d'autre part, au jour 2, c'est cette concentration de 0 gr/l qui a l'avantage (toujours non significatif) pour le nombre de spermatozoïdes vivants.

1.5.3. Discussion

L'albumine a en théorie un effet bénéfique sur le spermatozoïde, en le protégeant

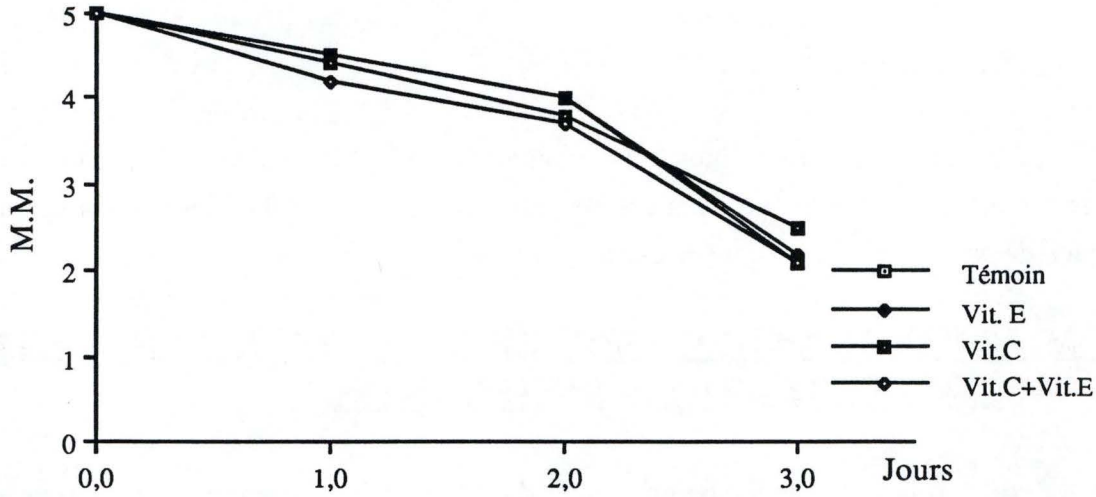


Fig. 15 Motilités massales estimées pour les différents milieux vitaminés (n=4)

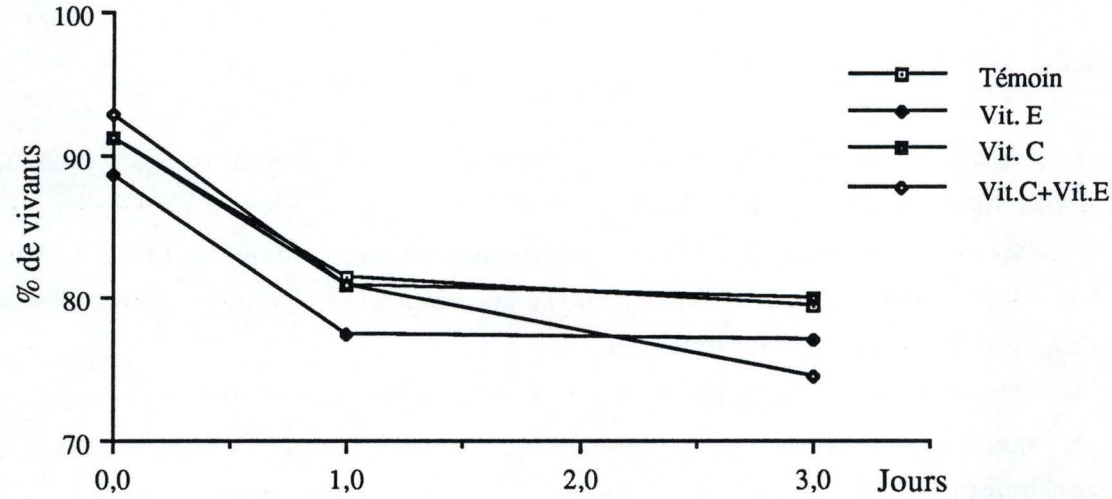


Fig. 16 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les différents milieux vitaminés (n=4)

contre les chocs thermiques pouvant survenir lors de la réduction de température pour un stockage à 4°C (Lamming, 1990).

L'absence d'effets observés pour les différentes concentrations en albumine, pourrait s'expliquer par le fait que la réduction de température de 37 à 4°C subie par le spermatozoïde placé en chambre froide, est suffisamment lente (elle dure deux heures à raison de 0,2°C/min.) que pour éviter les chocs thermiques pouvant survenir lors d'une descente trop rapide de température.

Nous plaçant dans l'optique de l'éleveur, une addition supplémentaire d'albumine serait inutile d'un point de vue pécunier au vu des résultats obtenus.

1.5.4. Conclusion

Bien que l'albumine préserve les membranes des spermatozoïdes contre les chocs thermiques, elle est sans effets lors de réductions lentes de température pour la conservation.

1.6. CHOIX DE PROTECTEURS SPERMATIQUES

L'objectif de la cinquième expérience est de comparer les effets que pourraient montrer les protecteurs spermatiques sur les performances du milieu de dilution. Pour ce faire, et en accord avec les observations faites précédemment au laboratoire de Physiologie Animale, deux composés ont été choisis: la vitamine E et la vitamine C.

1.6.1. Schéma expérimental

Dans un milieu tamponné à l'HEPES-phosphate, dont la pression osmotique est ajustée à 320mOsm/kg avec un mélange équipondéral d'inositol et de fructose et où sont adjoints les ions Na^+, Mg^{++} et Ca^{++}, on additionne les deux vitamines ainsi qu'une combinaison de celles-ci, afin d'obtenir trois échantillons qui snt testés (M.M. et pourcentages de vivants) après 24, 48 et 72 heures. L'essai est répété 4 fois.

1.6.2. Résultats

En ce qui concerne la motilité massale (fig. 15), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le témoin et les trois échantillons. On peut quand même observer que jusqu'au jour 2, le témoin et la vit. E sont les deux milieux présentant les

meilleurs résultats, alors qu'on observe un léger avantage pour la Vit. C au troisième jour.

Pour les pourcentages de vivants (fig. 16), on constate que la vit. E est significativement (P<0,05) moins bonne que le témoin et la vit. C. Un mélange de la vit. C et de la vit.E permet une survie inférieure (P<0,05) à la vit.C et au témoin après 72 heures.

1.6.3. Discussion

Contrairement à l'espoir que nous mettions dans le rôle de protection que fournissent les vitamines, les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer la supériorité d'une des deux vitamines ou de la combinaison de celles-ci.

Alors que la vitamine E est reconnue comme étant la vitamine liposoluble la plus efficace contre les attaques radicalaires, et que la vitamine C permet d'intercepter les radicaux libres générés dans la phase aqueuse, aucune action bénéfique de ces vitamines n'a pu être observée. Bien au contraire, la vitamine E s'affiche comme négative pour la survie des spermatozoïdes jusqu'à 72 heures. La vitamine C ne présente pas d'effet significativement favorable.

Pour les mêmes raisons qui nous ont fait écarter l'albumine, nous n'ajouterons pas de vitamines dans notre milieu de dilution.

1.6.4. Conclusion

Les vitamines n'améliorent pas les résultats obtenus, aucune d'entre elles, ni leur combinaison ne sera additionnée au dilueur.

1.7. CHOIX D'UN ANTIBIOTIQUE

L'élaboration progressive du milieu nous a conduit à un dilueur qui présente de nombreuses conditions avantageuses pour la survie des spermatozoïdes. Or les spermatozoïdes ne sont certainement pas les seules cellules à profiter des attraits du milieu de dilution. Il est évident que malgré toutes les précautions qui peuvent être prises, divers éléments pathogènes peuvent contaminer le milieu, que ce soit avant ou après la dilution. L'objectif de cette expérience est d'observer les effets de différents antibiotiques sur le milieu de dilution.

1.7.1. Schéma expérimental

Dans le milieu de dilution élaboré d'après les résultats des expériences précédentes,

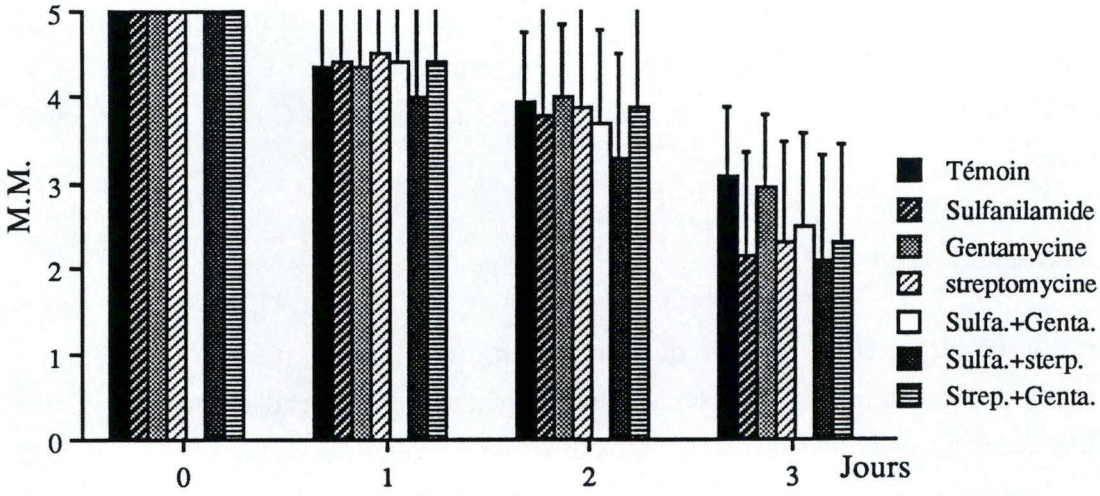


Fig. 17 Motilités massales estimées pour les milieux contenant divers antibiotiques (n=4)

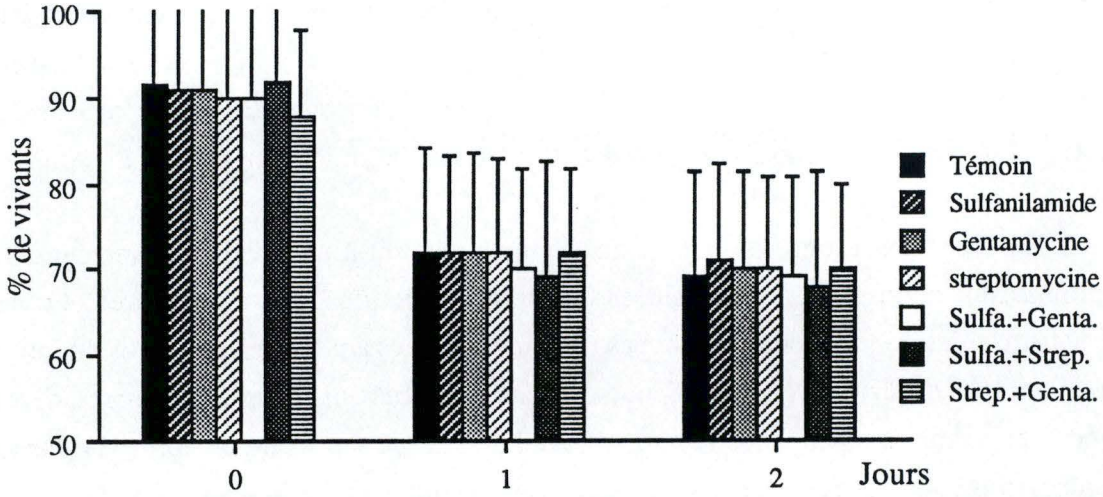


Fig. 18 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour les milieux contenant divers antibiotiques (n=4)

du sulfanilamide, de la gentamycine, de la streptomycine et la combinaison de ces trois antibiotiques sont incorporés selon les doses courantes utilisées en milieu de culture. Un ensemble de 6 échantillons et un témoin sont donc testés (M.M. et pourcentage de vivants) 24, 48 et 72 heures après dilution. L'essai est répété 4 fois. Une observation régulière de l'état de notre milieu de dilution, permet de désceller la présence de contaminants.

1.7.2. Résultats

Encore une fois, si on observe les résultats de la motilité massale (fig. 17), on ne constate pas de différences significatives entre les différents milieux. Les deux milieux présentant les résultats les plus intéressants, sont le milieu témoin et le milieu additionné de gentamycine.

Au niveau du pourcentage de spermatozoïdes vivants (fig.18), aucune différence significative n'est observée. Malgré tout, le milieu additionné de sulfanilamide présente au deuxième jour un pourcentage de spermatozoïdes vivants supérieur aux autres milieux.

Il est à noter que le dilueur ne peut, sans antibiotiques, se conserver plus d'une dizaine de jours, au-delà desquels, on observe la présence de contaminants.

1.7.3. Discussion

Les faibles différences observées pour la motilité massale et pour le pourcentage de vivants entre le témoin et les antibiotiques, sont plutôt en faveur des recours aux antibiotiques. S'ils n'ont pas l'avantage d'améliorer la survie ou la motilité des spermatozoïdes, les antibiotiques ont malgré tout le bénéfice de ne pas diminuer les acquis du milieu de dilution. Si leur présence n'est pas limitante pour la survie des spermatozoïdes, ils vont pouvoir jouer le rôle qui leur est destiné: préserver le milieu d'une éventuelle prolifération pathogène.

Salisbury et Knodt (cités par Lamming, 1990) montrent que l'addition de sulfanilamide augmente le pourcentage de fertilité de près de 5%; malheureusement, ces résultats n'ont pu être confirmés ultérieurement. D'autre part, il a été observé (Dunn *et al.*, 1953 cités par Lamming, 1990) que le sulfanilamide réduit le pourcentage de récupération de spermatozoïdes après congélation. La gentamycine est utilisée dans de nombreux milieux de culture *in vitro*.

Afin de déterminer lequel des antibiotiques, entre le sulfanilamide et la gentamycine (antiobiotiques semblant être les moins limitant pour la survie et la motilité cellulaire), serait le plus approprié pour le milieu de dilution, une nouvelle comparaison est effectuée au cours de la dernière expérience où sont comparés différents milieux.

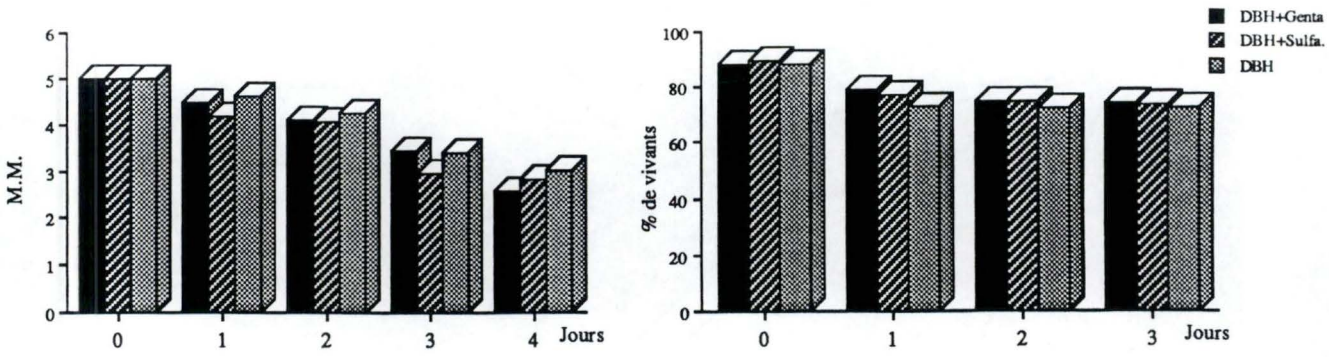


Fig. 19. M.M. et pourcentage de vivants pour la comparaison de la gentamycine,du sulfanilamide et d'un témoin.

Comme le montre la figure 19 aucune différence significative n'est observable entre les deux antibiotiques. Toutefois, les résultats semblent légèrement moins bons avec le sulfanilamide. De plus, comme le milieu que nous mettons au point est destiné à servir également de milieu de base pour des études sur la congélation, et que le sulfanilamide réduit la viabilité des spermatozoïdes congelés, le choix de l'antibiotique s'est porté sur la gentamycine.

1.7.4. Conclusions

- L'utilisation d'antibiotiques est nécessaire pour préserver le milieu contre tout envahissement pathogène.
- La gentamycine et le sulfanilamide présentent des résultats proches du milieu témoin et ne sont donc pas limitants pour la survie et la motilité des spermatozoïdes.
- Le sulfanilamide réduisant la survie des spermatozoïdes après congélation, la gentamycine est choisie comme antibiotique pour notre milieu.

1.8. COMPARAISON DE NOTRE MILIEU AVEC D'AUTRES MILIEUX DE DILUTION

Afin d'évaluer la capacité globale du milieu de dilution mis au point, une dernière expérience a été programmée avec pour objectif de le confronter à trois autres milieux généralement utilisés au laboratoire de Physiologie Animale pour la dilution du sperme d'ovin; le lait INRA, le Dulbecco (PBS) et le LB4 (Lessire, 1991).

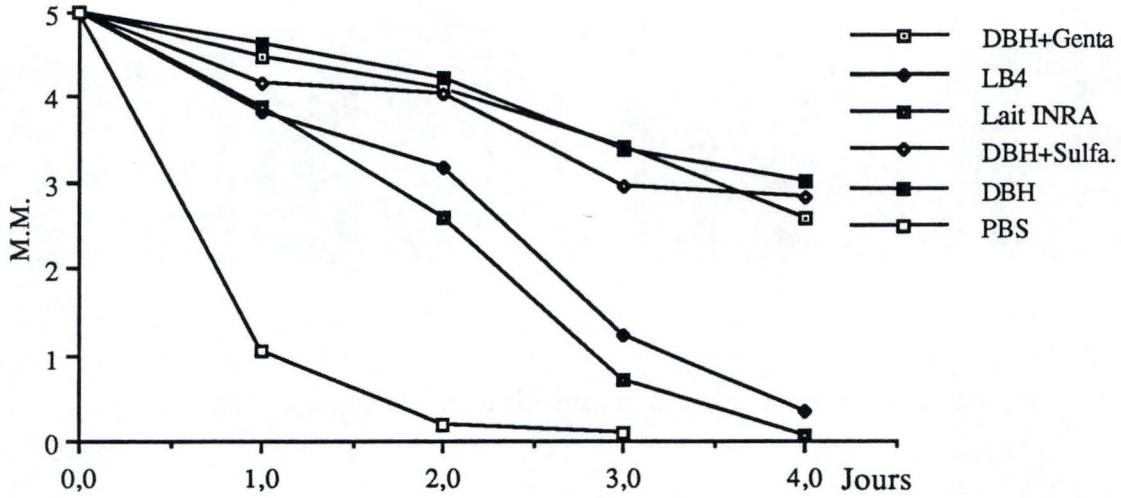


Fig. 20 Motilités massales estimées pour différents milieux de dilution (n= 4)

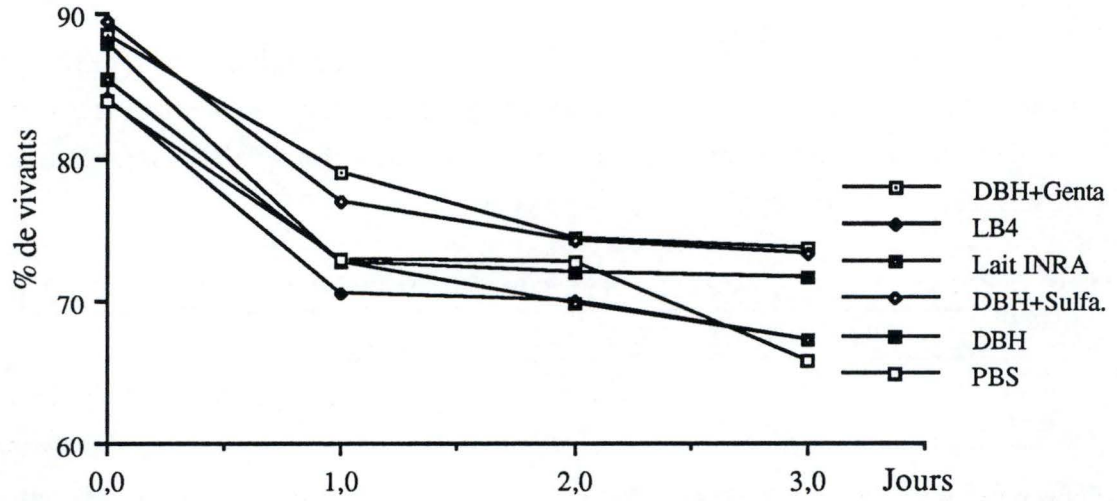


Fig. 21 Pourcentages de spermatozoïdes vivants calculés pour différents milieux de dilution (n=4)

1.8.1. Schéma expérimental

Les échantillons sont constitués de quatre milieux de dilution, le Dulbecco (constitué de $CaCl_2$, KCl, KH_2PO_4, $MgCl_2$, NaCl et de Na_2HPO_4), le lait INRA (constitué de poudre de lait écrémé additionné de sulfanilamide et chauffé à 85°C), le LB4 (constitué d'HEPES, lévulose, dextrose, NaCl, $CaCl_2$, sulfanilamide et vitamines E et C, le tout ajusté à pH 7.2 et à P.O. de 320 mOsm/kg) et notre milieu de dilution. Les échantillons sont testés (M.M. et pourcentages de vivants) 24, 48 et 72 heures après la dilution. L'essai est répété 4 fois. De plus une observation microscopique des frottis réalisés avec les spermatozoïdes ayant été conservés dans notre milieu, nous permet de faire une estimation des formes anormales ou des réactions acrosomiales.

1.8.2. Résultats

Avec une motilité massale (fig. 20) encore supérieure à 4 après 48 heures de stockage, notre dilueur apparaît comme significativement ($P<0,005$) plus performant que les autres milieux habituellement utilisés pour la dilution de la semence. Cette supériorité se confirme au-delà de 72 heures, où la motilité massale est toujours à un niveau au dessus de 3,2. On observe également que le PBS entraîne une perte rapide de la motilité, ce qui lui laisse peu de perspectives pour des inséminations au-delà de quelques heures.

Pour les pourcentages de spermatozoïdes vivants (fig. 21), l'avantage de notre milieu de dilution ($P<0,05$) se marque au bout de 72 heures, où on conserve un pourcentage de récupération de spermatozoïdes vivants de près de 75%. Les autres milieux gardent sur ce point, un potentiel acceptable (>60%).

Une observation microscopique des spermatozoïdes ayant été stockés dans notre milieu, ne met pas en évidence un taux excessif (plus de 10%) de formes anormales ou de réactions acrosomiales prématurées.

1.8.3. Discussion

Avec une motilité massale à un niveau supérieur à 4 après 48 heures, voir même à 3,2 après 72 heures, et un taux de survie supérieur à 75% après 72 heures, notre dilueur apparaît comme un atout important pour l'insémination artificielle.

La proportion minimale de spermatozoïdes vivants nécessaires pour qu'une insémination artificielle ait de bonnes chances de succès, est de 60% pour un sperme dilué. Or, notre dilueur présente encore après 72 heures toutes les qualités requises d'activité et de proportion de spermatozoïdes vivants pour une insémination artificielle. D'autre part, diverses substances sont susceptibles d'engendrer, de par leur composition,

des modifications au niveau du spermatozoïde qui hypothèqueraient la fertilité. C'est le cas par exemple du sorbitol qui entraîne l'apparition de formes anormales (queue recourbée ou enroulée), ou l'association albumine-Ca^{++} qui, comme l'héparine, favorise la capacitation des spermatozoïdes avec comme conséquence une hyperactivité et la réaction acrosomiale. Une analyse approfondie de la semence conservée dans le nouveau milieu DBH ne met en évidence aucun de ces problèmes. Il semble donc que l'insémination pourrait être retardée de plus d'un jour et même davantage après le prélèvement.

1.8.4. Conclusions

Notre milieu de dilution permet le maintien, après 48 heures, d'une motilité massale à un niveau minimum de 4 et d'un pourcentage de spermatozoïdes vivants de plus de 75%.

Il n'a pas été observé un taux excessif de formes anormales, ni de réactions acrosomiales prématurées.

Ce milieu constitue donc un atout important pour les inséminations artificielles. Il devra encore être testé *in vivo* pour la fertilité induite à l'insémination artificielle. Mais il peut dès à présent servir de base pour nos études de cryopréservation.

2. CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR LE MILIEU DE DILUTION

L'objectif de la première série d'expériences était la mise au point d'un milieu de dilution qui permettrait une conservation en frais de durée appréciable. Afin de répondre à cette attente, divers paramètres ont dû être analysés, pour que soient optimalisées les conditions de viabilité auxquelles doit répondre le milieu.

Pour qu'une conservation puisse se faire au-delà d'une dizaine d'heures, il apparaît utile de réduire l'activité métabolique des spermatozoïdes. Cette réduction permet une atténuation de la consommation du substrat énergétique par les spermatozoïdes, atténuation qui, parallèlement, limite l'acidification du milieu. Pour ce faire, les échantillons de sperme dilué sont conservés en chambre froide à **4°C**.

Malgré le ralentissement du métabolisme des spermatozoïdes, une réduction du pH est observée, l'éloignant de son optimum qui est de **7,2** pour les spermatozoïdes de bélier. Pour pallier cette acidification, notre milieu est maintenu à un pH convenable avec un tampon **HEPES-phosphate (100mM)** qui permet un excellent taux de survie et le maitien d'une bonne motilité.

Un substrat énergétique est nécessaire pour répondre aux besoins des spermatozoïdes. L'addition dans le milieu d'un mélange équipondéral d'**inositol** et de **fructose** donne les meilleurs résultats. Il permet aussi d'ajuster la pression osmotique à un optimum de **320mOsm/kg**.

Tout comme le plasma séminal du bélier contient des proportions variables de nombreux ions, une certaine balance ionique est nécessaire à la survie des spermatozoïdes dans le milieu. C'est ce qui explique que l'addition de Na^+, de Ca^{++} et de Mg^{++} dans le milieu assure de meilleurs résultats. Chaque ion est additionné de manière à obtenir des concentrations proches des concentrations physiologiques observées dans le sperme du bélier.

La protection membranaire qu'est susceptible d'offrir l'albumine contre les chocs thermiques, n'a pas pu être mise en évidence. L'action cette substance reste non décelable lors de nos essais, peut-être suite à une réduction lente de la température (0,2°C/min.). La présence d'albumine ne se justifie donc pas, d'autant que cette protéine pourrait favoriser une capacitation prématurée des spermatozoïdes.

L'utilisation de protecteurs spermatiques tels que la vitamine E et la vitamine C ne nous a pas apporté des résultats intéressants et leur usage ne sera pas préconisé.

Le milieu de dilution ne se conservepas plus d'une dizaine de jours; au-delà , on observe la présence de contaminants et l'adjonction d'antibiotiques semble nécessaire afin de limiter la colonisation du milieu par divers germes. La non-toxicité envers les spermatozoïdes pour la **gentamycine** nous a permis de répondre à ce besoin en antibiotiques.

Nous proposons donc au terme de cette partie de notre travail un milieu dont la composition est donnée dans le cadre ci-dessous et que nous appellerons **DBH**.

Le milieu, sous sa forme finale, est plus satisfaisant que les milieux usuellement utilisés au laboratoire de Physiologie Animale (lait INRA, Dulbecco et LB4). Il permet de maintenir la semence à un score minimum de **4** sur l'échelle des motilités massales après 48 heures où le pourcentage de récupération de spermatozoïdes vivants est encore supérieur à **75%**. Il constitue donc un atout important pour l'insémination artificielle, en laissant un laps de temps plus que suffisant entre le moment du prélèvement et celui de l'insémination.

Substances chimiques	Références	Quantités (g) *
HEPES	Sigma n° H-3375	119,0
Na_2HPO_4	UCB n° 1770	6,5
NaH_2PO_4	Merck n° 503A912146	0,65
$Mg_3(PO_4)_2$	Sigma n° M-1265	0,14
$CaCO_3$	Merck n° 2066	0,07
Fructose	UCB n° 9427	11,0
Inositol	UCB n° 7809	11,5
Gentamycine	Gibco bri n°043-05750D	50 **

* quantités calculées pour un litre. ** nanogramme

Ce milieu, éventuellement ajusté à pH 7,2 et à pression osmotique de 320mOsm/kg (préparation cfr. chap. III. 4.4.), servira aussi lors de la deuxième partie de notre travail, de solution de base pour la recherche d'un protocole de cryopréservation de la semence d'ovin.

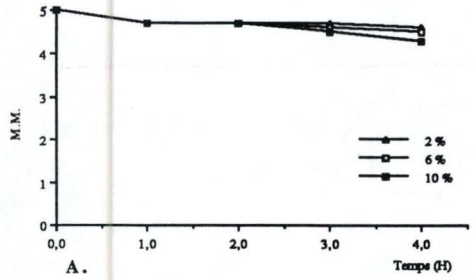
3. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONGÉLATION DE LA SEMENCE DE BELIER

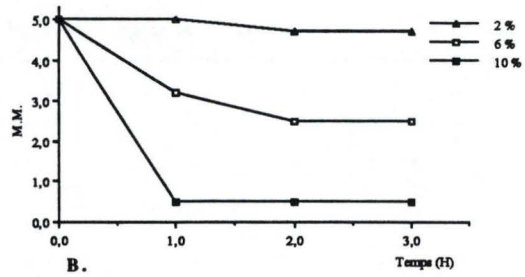
Lors de la conservation à court terme de la semence de bélier, la diminution de la température jusqu'à 4°C est suffisante pour réduire l'activité métabolique des spermatozoïdes, ce qui , avec le nouveau milieu de dilution (DBH) que nous proposons dans la première partie de notre travail, permet de repousser la limite temporelle pour une insémination artificielle d'une dizaine d'heures à plus de deux jours. Toutefois, cette conservation est, comme son nom l'indique, limitée à une courte période. Il est dès lors concevable qu'une conservation à plus long terme soit possible à des températures encore plus basses auxquelles l'activité métabolique des spermatozoïdes ne serait plus ralentie, mais suspendue. Malgré tout, les processus physiques se passant à ces températures conduisent à des altérations cellulaires entrainant une perte de viabilité pour les spermatozoïdes congelés. En réponse à ces dégâts cellulaires, l'utilisation de solutions cryoprotectrices permet, en synergie avec une vitesse de congélation optimale, de réduire l'impact du processus de congélation sur la survie des spermatozoïdes. D'autre part, toute une série de paramètres intervenant avant, pendant et après la congélation, influencent le pourcentage de spermatozoïdes survivant à la congélation.

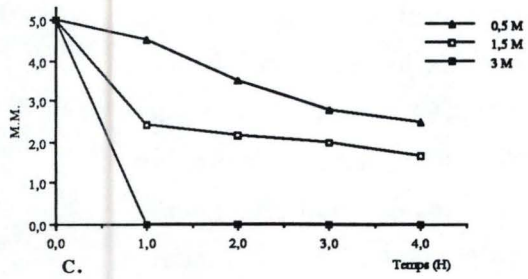
Au cours de notre mise au point du protocole de congélation de la semence de bélier, un certain nombre de paramètres ont alimenté notre recherche afin d'optimaliser chacune des étapes du processus de congélation. Les trois paramètres les plus déterminants qui ont fait l'objet de notre étude sont l'utilisation de cryoprotecteurs (CPA), la vitesse de congélation et la vitesse de décongélation. D'autres paramètres tel que le temps d'incubation du sperme avec le CPA avant la congélation, le mode de conditionnement de la semence et l'effet de race sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants ont également fait l'objet d'observations qui ont permis de mieux cerner le protocole à suivre pour une congélation optimale.

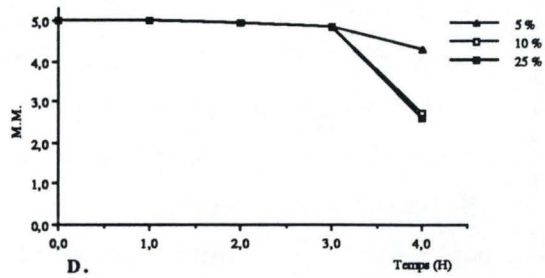
3.1. OBSERVATION DE LA SURVIE EN FRAIS DES SPERMATOZOÏDES DANS DIFFÉRENTES SOLUTIONS CRYOPROTECTRICES

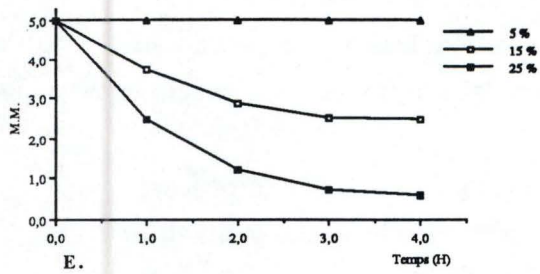
Comme une période d'équilibration est nécessaire au sperme dilué dans une solution cryoprotectrice afin que le cryoprotecteur puisse diffuser, nous avons dans une première expérience testé la toxicité relative de chacun des cryoprotecteurs à différentes concentrations sur les spermatozoïdes de bélier. Ceci permet en outre de choisir un compromis entre le temps d'équilibration et la toxicité du cryoprotecteur pour ne pas

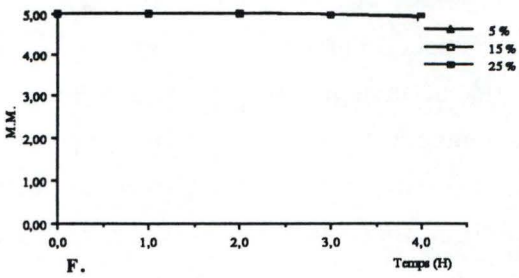


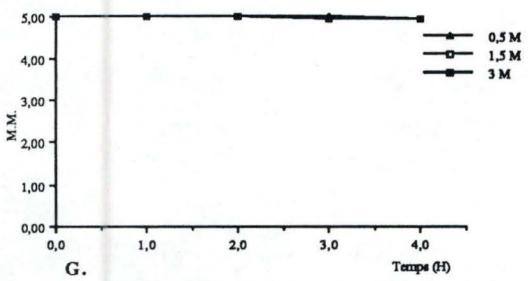


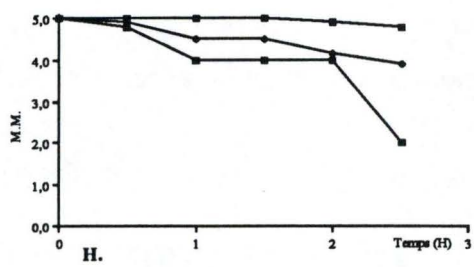












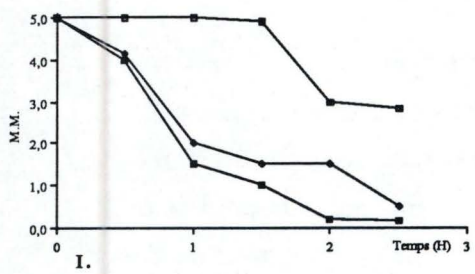


Fig. 22 Graphes de l'évolution de la motilité massale pour les spermatozoïdes additionnés dans différents milieux de cryoprotection. A: glycérol ajouté à 20°C, B: glycérol ajouté à 4°C, C: DMSO, D: Dextran, E: PG, F: PEG, G: HES, H: EG additionné à 20°C, I: EG additionné à 4°C.

réduire de façon excessive le potentiel de spermatozoïdes vivants avant même de débuter la congélation.

3.1.1. Schéma expérimental

Avant de tester dans un processus de congélation toute une fourchette de concentrations pour les cryoprotecteurs, trois concentrations (les deux extrêmes relevées dans la littérature et une centrale) servent à établir la toxicité relative du CPA.

Le temps d'équilibration n'étant jamais supérieur à 4 heures et rarement même supérieur à 2 heures, nous avons choisi de suivre l'évolution de la motilité massale pendant 4 heures. L'expérience a été reproduite 3 fois.

3.1.2. Résultats

Le glycérol à 20°C (fig. 22A) ne semble pas affecter nettement la motilité massale jusqu'à 2 heures après l'addition de CPA, qui reste malgré tout à un niveau supérieur à 4. Par contre si le CPA est additionné à 4°C (fig.22B), des concentrations supérieures à 6% se révèlent fortement limitantes et ce dès la première heure d'équilibration.

Le diméthylsulfoxyde (DMSO, fig. 22C) se révèle comme un composé relativement toxique pour les spermatozoïdes dont la motilité est réduite de façon importante dès les premiers temps après l'addition de CPA. Les faibles concentrations (0,5M) permettent malgré tout de maintenir la motilité à un score supérieur à 4 après une heure, mais par la suite, la motilité diminue fortement suggérant la destruction d'une quantité importante de spermatozoïdes.

Le dextran (fig. 22D), quelle que soit sa concentration, maintient quasiment un niveau maximal de motilité jusqu'à 3 heures après le début de l'équilibration. Ce délai passé, on observe une chute brutale des scores de motilité massale pour des concentrations supérieures à 10%.

A des concentrations élevées, le propylène glycol (PG, fig. 22E) semble toxique pour les gamètes, et déjà après une heure, on peut observer une réduction importante de la motilité massale, alors que les concentrations faibles (5%) n'entraînent pas de diminution de l'activité des spermatozoïdes.

Le polyéthylène glycol (PEG, fig. 22F), quelle que soit sa concentration, n'altère en rien la motilité massale qui reste à un niveau supérieur à 4,9 jusque 4 heures après la dilution.

Tout comme le PEG, l'hydroxyéthyl starch (HES, fig. 22G) est certainement non toxique pour la cellule car la motilité reste inchangée au cours de l'essai.

La toxicité de l'éthylène glycol (EG) additionné à 20°C (fig. 22H), semble ne se marquer qu'au bout d'une heure, mais elle reste relativement acceptable. Mais après 2

heures, à la concentration de 2M, la congélation ne pourrait plus être possible avec des chances de réussite acceptables.

Additionné à 4°C (fig. 22I), l'EG montre un effet limitant, dès la première heure d'équilibration passée pour des concentrations supérieures à 1,5M.

3.1.3. Discussion

Deux types de CPA sont reconnus en fonction de leur capacité à pénétrer ou non à l'intérieur de la cellule.

Les *pénétrants,* par diffusion au travers de la membrane cellulaire (Locksley, 1978), préviennent la cellule contre la formation de gros cristaux (Mazur, 1984)et réduirent les concentrations salines excessives par diminution de la quantité de cristaux de glace. C'est le cas du DMSO, de l'EG et du PG utilisés pour cette étude (Hayat, 1989).

Les *non-pénétrants* créent une différence de pression osmotique entre le milieu extra-et intracellulaire provoquant une perte d'eau avant même que la concentration en soluté n'augmente en réponse à la cristallisation externe (Locksley, 1978). Ceci réduit la toxicité ionique extracellulaire. C'est le cas du dextran, du PEG et de l'HES utilisés également dans notre étude (Mac Kenzie, 1977).

Une mention toute particulière est à faire pour le glycérol qui, additionné à 20°C, est pénétrant, alors qu'additionné à 4°C, il est non-pénétrant.

Cette division des CPA en deux groupes se retrouve dans cette expérience, avec une toxicité plus importante pour les CPA pénétrants. En général, au-delà d'une heure, la congélation ne pourrait plus être tentée avec des chances appréciables de récupération d'un pourcentage suffisant de spematozoïdes vivants. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la pénétration du CPA dans le spermatozoïde entraînerait des altérations se soldant par un disfonctionnement métabolique du spermatozoïde et/ou par la perte de l'intégrité morphologique de la cellule. Il est en outre reconnu (Skaer, 1982) que des composés tel que le DMSO sont toxiques pour la cellule.

L'observation d'une toxicité plus marquante suite à une addition de CPA à 4°C plutôt qu'à 20°C, peut être expliquée par une fragilisation membranaire du spermatozoïde par le froid, qui le rendrait plus sensible aux modifications du milieu induites par la présence du CPA. Malgré le désavantage apparent de l'addition de CPA à 4°C plutôt qu'à 20°C, nous avons préféré ajouter nos CPA à 4°C. Ce choix s'explique par les expériences effectuées par Colas (1975) et Fiser et Fairfull (1989) qui montrent que l'action du glycérol en tant que CPA non-pénétrant (additionné à 4°C) permet la récupération d'un pourcentage de spermatozoïdes vivants plus important après le processus de congélation. De plus, si la semence est diluée à 20°C, la diminution rapide de température dans le processus de congélation pourrait entraîner des chocs thermiques (se situant aux alentours

de 7°C) qui ne seraient pas observés si la semence avait été refroidie jusqu'à 4°C comme pour la conservation en frais (Chap. I. 1.3.1.1.).

Pour le glycérol, toute la littérature donne une période d'équilibration de deux heures, alors que Colas (1975) a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la survie des spermatozoïdes congelés après un temps de stabilisation de 20 minutes et de deux heures.

3.1.4. Conclusion

Les cryoprotecteurs pénétrants deviennent relativement vite toxiques pour les gamètes lors d'une période d'équilibration.

Les cryoprotecteurs non-pénétrants n'ont pas montré de toxicité marquante au cours d'une courte concervation en frais.

Afin de limiter les chocs thermiques pouvant survenir suite à une addition de CPA à 20°C, ce qui seraient plus dommageables aux spermatozoïdes que l'ajout des CPA à 4°C, nous optons pour l'addition des CPA à 4°C. Cet ajout de CPA est fait en deux fois afin de limiter le stress osmotique.

3.2. CHOIX D'UN CRYOPROTECTEUR ET D'UNE VITESSE DE CONGÉLATION

Face à toutes les altérations que peut entraîner la congélation par des processus physiques complexes, la vitesse de congélation optimale peut être vue comme celle présentant un compromis entre les altérations causées par la formation de cristaux, et les désagréments provenant de l'effet de solution. Cette vitesse est fonction du type cellulaire, mais aussi de la présence de CPA qui modifie les données. De fait, ces substances diminuent le point de congélation et retardent la surconcentration en soluté jusqu'à des températures plus basses, auxquelles les dégâts cellulaires sont moins marqués.

3.2.1. Schéma expérimental

Sept CPA ont été testés à des concentrations variables et à des vitesses de congélation différentes (-3, -5, -9, -13 et -19°C/min.). Les 7 CPA sont le glycérol (de 2 à 10%), l'éthylène glycol (de 0,25 à 2M), le DMSO (de 0,5 à 3M), le HES (de 5 à 25%), le propylène glycol (de 5 à 25%), le dextran (de 5 à 25%) et le polyéthylène glycol (de 0,5 à 3M), ont été étudiés sucessivement. Les CPA sont additionnés, après équilibration, en deux fois afin de limiter les chocs osmotiques résultant de l'addition du nouveau composé (Fiser et Fairfull, 1989). La semence traitée, est conditionnée dans des paillettes

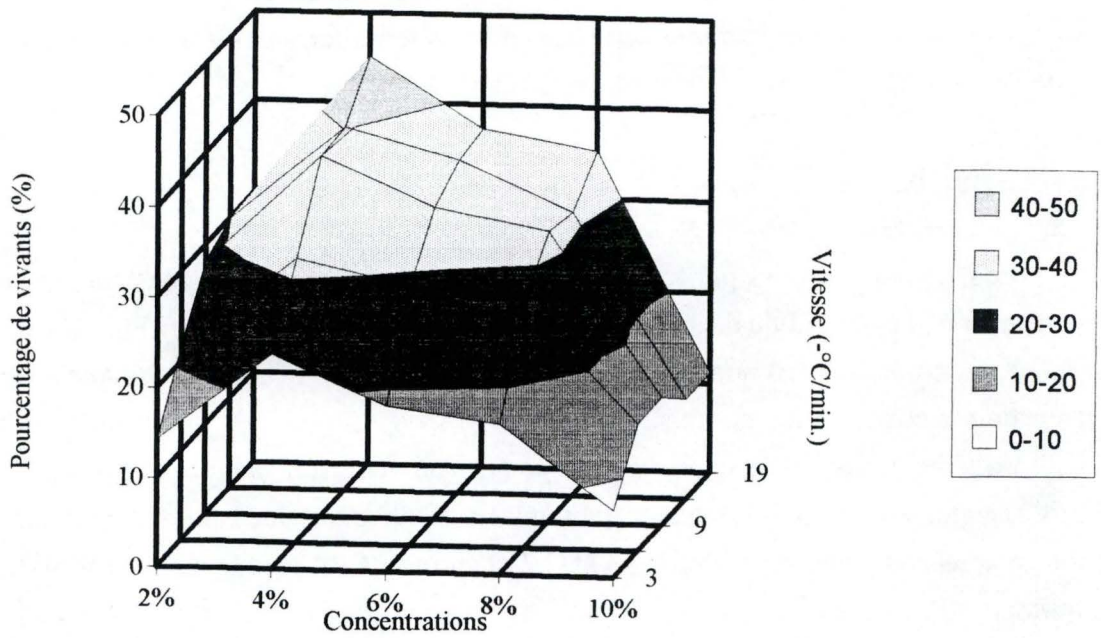


Fig. 23 Pourcentages de spermatozoïdes motiles après congélation à différentes vitesses pour des milieux de cryopréservation de concentrations croissantes en glycérol.

Table. 1 Tableau représentant les pourcentages de spermatozoïdes motiles après congélation à différentes vitesses dans des milieux de cryopréservation de concentrations croissantes en glycérol.

Vitesse de congélation	CONCENTRATIONS				
	2 % *	*4 %* *	*6 %* *	*8 %* *	*10 %* *
-3°C/min	14,3	24,0	18,5	16,8	7,5
-5°C/min	21,8	31,7	29,0	27,5	14,2
-9°C/min	28,2	40,0	34,7	32,3	14,3
-13°C/min	30,0	40,2	36,8	31,5	11,2
-19°C/min	28,2	45,17	37,3	37,2	11,2

* moyennes en % des spermatozoïdes motiles au cours des 4 essais (fois 2 paillettes)

de 0,25 ml. Pour étudier la survie et la motilité des spermatozoïdes, la décongélation des paillettes est réalisée immédiatement avant l'observation par immersion dans un bain à 37°C pendant 30 secondes. Le nombre de spermatozoïdes survivant à ces processus est mesuré au cours de 4 essais successifs sur 2 paillettes par essai.

3.2.2. Résultats

Glycérol:

L'effet cryoprotecteur du glycérol montre une variabilité hautement significative (P<0,005) en fonction de la concentration et de la vitesse de refroidissement (fig. 23 et tabl. 1). Les concentrations les plus favorables sont comprises entre 4 et 8%, quelle que soit la vitesse de congélation. Une concentration de 10% apparaît comme significativement défavorable pour les spermatozoïdes. La concentration la plus satisfaisante est sans conteste (P<0,005) le glycérol à 4%.

Les résultats montrent clairement qu'une augmentation de la vitesse de congélation est bénéfique pour la survie cellulaire, avec un optimum observé pour des vitesses de l'ordre de -19°C/min. Il aurait été intéressant de pouvoir étudier des vitesses supérieures à -19°C/min., afin de voir si accélération avait encore permis un accroissement du pourcentage de spermatozoïdes vivants après congélation, mais notre appareillage n'est pas conçu pour pouvoir atteindre des vitesses supérieur à -19°C/min.

Finalement, l'interaction entre la vitesse et la concentration, est également très significative (P<0,005) et se marque bien sur la figure 23. Cette interaction se traduit par un optimum à -19°C/min. pour une concentration de 4% en glycérol.

Ethylène glycol:

Les essais réalisés avec l'EG montrent une faible supériorité pour des concentrations de 0,5M, qui n'est toutefois pas significative (fig. 24 et tabl. 2). Par comparaison avec le glycérol, on constate que le meilleur taux de survie n'atteint pas 10%, et est bien en dessous de celui du glycérol (45%).

Pour la vitesse de congélation, les résultats confirment ce qui a été observé pour le glycérol; à savoir qu'une augmentation de la vitesse de congélation se traduit par un accroissement du pourcentage de spermatozoïdes vivants. Mais, pour l'EG, les variations ne sont pas importantes entre des vitesses allant de -9 à -19°C/min.

L'interaction significative entre la vitesse et la concentration, n'a pas pu être mise en évidence.

Autres CPA:

Les résultats obtenus avec le DMSO, l'HES, le dextran, le PEG et le PG, ne dépassent pas dans le meilleur des cas les 5% de survie des spermatozoïdes ; ces

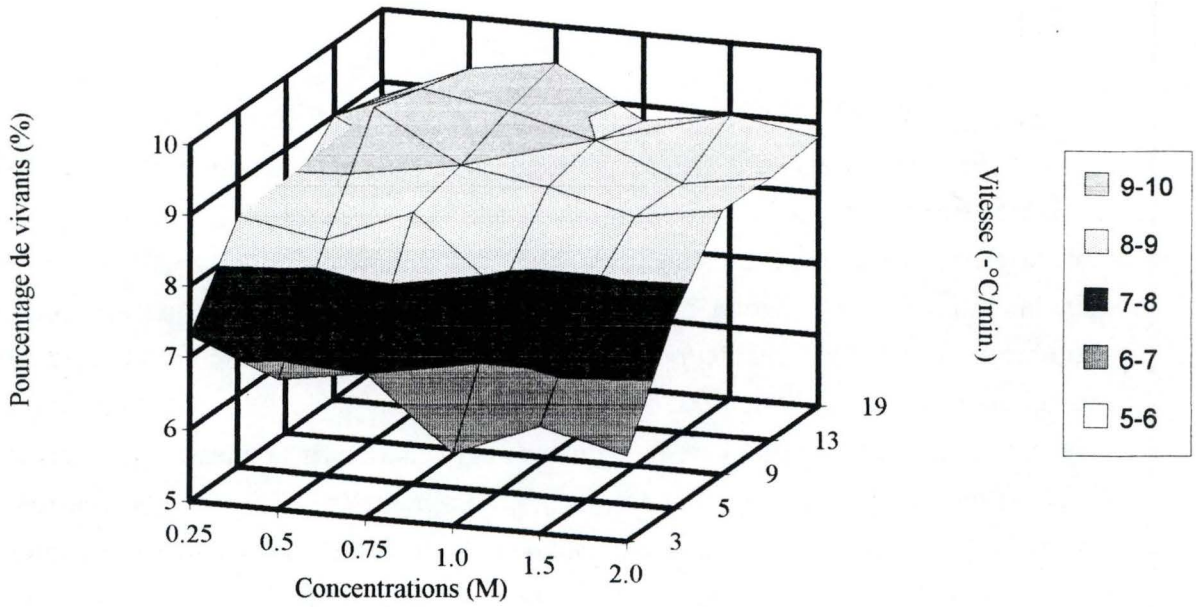


Fig. 24 Pourcentages de spermatozoïdes motiles après congélation à différentes vitesses pour des milieux de cryopréservation de concentrations croissantes en éthylène glycol.

Tabl. 2 Tableau représentant les pourcentages de spermatozoïdes motiles après congélation à différentes vitesses dans des milieux de cryopréservation de concentrations croissantes en éthylène glycol

Vitesse de congélation	CONCENTRATIONS					
	0,25 M *	*0,5 M* *	*0,75 M* *	*1,0 M* *	*1,5 M* *	*2,0 M* *
-3°C/min	7,3	6,8	7,0	6,0	6,5	6,2
-5°C/min	8,5	8,3	8,8	7,8	7,8	7,7
-9°C/min	8,3	9,7	9,0	8,8	8,5	8,7
-13°C/min	9,0	9,5	9,3	9,0	8,5	8,7
-19°C/min	8,8	9,3	9,5	8,8	9,0	8,8

* moyennes en % des spermatozoïdes motiles au cours des 4 essais (fois 2 paillettes).

composés ne présentent aucun intérêt pour nos investigations pour la mise au point d'un protocole de cryopréservation de la semence d'ovin.

3.2.3. Discussions

Glycérol:

Nos résultats montrent que la concentration optimale du milieu de conservation est de 4% final pour le glycérol. Ils recoupent les observations de plusieurs auteurs (Colas, 1975, Fiser et Fairfull, 1984, Fiser *et al.*, 1986, Fiser et Fairfull, 1989, Abdelhakeam *et al.*, 1991, et Wallace, 1992). Néanmoins, les dilueurs couramment utilisés contiennent des quantités de glycérol de 5% (INRA, communication personnelle), de 6% (Angleterre), de 6,4% + jaune d'oeuf (Suisse), ou de 3% + jaune d'oeuf (Derycke, communication personnelle). La vitesse de congélation de -19°C/min est en accord avec celle préconisée par Fiser *et al.* (1986). Il est cependant à noter que si quelques protocoles comportent un refroidissement lent d'environ -5°C/min, la plupart des centres d'insémination prônent un placement direct des paillettes dans les vapeurs d'azote à environ -70°C. Ceci correspond peut-être à une descente de température de -50°C/min qui est la valeur optimale théorique donnée par Duncan et Watson (1992). Malheureusement nous sommes limités par l'appareil de congélation qui ne permet pas un refroidissement plus rapide que -19°C/min et nous souhaitons pouvoir contrôler ce refroidissement plutôt que de placer nos paillettes dans une atmosphère à température approximative.

Ethylène glycol:

Le choix de l'EG comme CPA pour nos études s'est fait suite aux résultats de Hanadp et Nagase (1980) sur le sperme de lapin, et de Klebe et Mancuso (1983) sur les cellules de mammifère, qui présentaient l'EG comme plus performant que le glycérol.

La différence entre les résultats de ces auteurs et les nôtres ne peut se justifier que par des paramètres cellulaires différents, étant donné que la diffusion des CPA pénétrants dépend fortement du coéfficient de perméabilité de la cellule, et que le spermatozoïde est une cellule tout à fait particulière, contenant très peu de cytoplasme.

Autres CPA:

On aurait pu s'attendre à des résultats plus satisfaisants de la part du DMSO qui est utilisé pour la cryopréservation de nombreuses semences (oiseaux, poissons et certains mammifères). Les résultats négatifs obtenus peuvent rouver une justification dans la toxicité du DMSO lors du temps d'équilibration avant la congélation.

Les très faibles résultats observés pour le PG peuvent aussi s'expliquer par une toxicité trop importante avant la congélation.

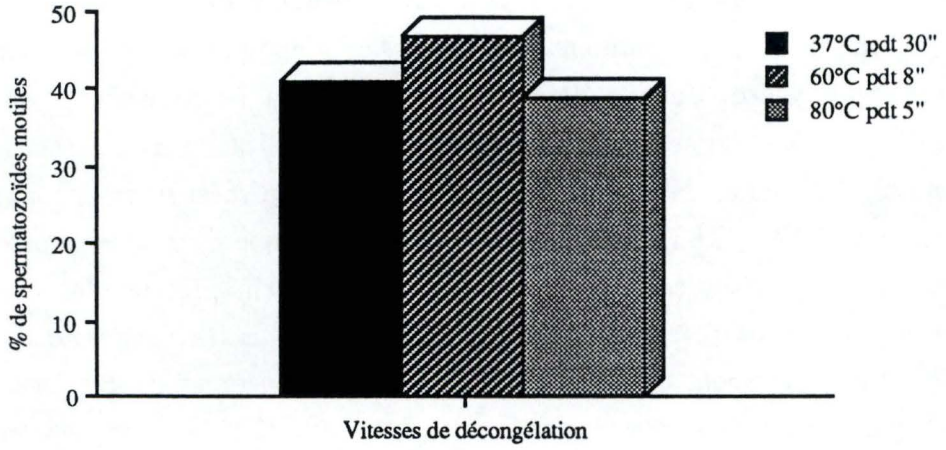


Fig. 25 Pourcentages de spermatozoïdes motiles après décongélation à différentes vitesses, pour une vitesse de congélation de -19°C/min avec une solution cryoprotectrice de glycérol à 4% final (n= 3 * 2).

Le dextran et l'HES n'ayant pas permis un taux de survie supérieur à 5%, on peut supposer que leur action sur la cellule est absente, ce qui expliquerait également leur absence de toxicité lors des tests précédents (Fig. 22 D et G). Schmell *et al.* (1986) voient dans le dextran et l'HES, un complément parfait au glycérol, car ils augmenteraient le pourcentage de spermatozoïdes motiles après congélation. Dans ce travail, nous n'avons pas eu le temps de tester des combinaisons de CPA.

De même que pour ces deux composés, l'absence de résultats pour le PEG peut s'expliquer par une absence d'action sur la cellule, traduit par un très bon maintien de la motilité massale lors des tests de toxicité (fig.22F).

3.2.4. Conclusions

La vitesse optimale pour la congélation des spermatozoïdes du bélier, est d'au moins -19°C/min.

Le CPA le plus satisfaisant est le glycérol, à une concentration de 4%.

3.3. CHOIX D'UNE VITESSE DE DÉCONGÉLATION

Dernière étape du processus de conservation à long terme, la décongélation apparaît comme capitale pour la récupération d'un maximum de spermatozoïdes vivants. Cette vitesse de décongélation semble (Mazur,1984) en relation avec la vitesse de congélation.

3.3.1. Schéma expérimental

En accord avec la littérature, trois vitesses de décongélation sont testées. L'échantillon est constitué d'un sperme dilué dans du DBH glycérolé, afin d'obtenir une concentration finale en CPA de 4%. L'addition du glycérol est faite en deux étapes, afin de limiter la possibilité d'apparition d'un stress osmotique. La vitesse de congélation est fixée à -19°C/min. La semence traitée est conditionnée dans des paillettes de 0,25ml qui sont examinées (pourcentage de spermatozoïdes motiles) après décongélation soit dans un bain à 37°C pendant 30 sec., soit dans un bain à 60°C pendant 8 sec., soit dans un bain à 80°C pendant 5 sec. Le nombre de spermatozoïdes survivant à ces processus est mesuré au cours de 3 essais successifs sur 2 paillettes par essai.

3.3.2. Résultats

Si on observe la figure 25, on constate que la décongélation réalisée dans un bain à 60°C pendant 8 secondes est significativement ($P<0,05$) plus performante que les deux autres vitesses de décongélation utilisées. On remarque également que la première vitesse

(37°C pendant 30 sec.) est plus favorable que la deuxième (80°C pendant 5 sec.) en permettant une récupération supplémentaire de 2% de spermatozoïdes vivants.

3.3.3. Discussion

Mazur (1984) explique qu'une semence congelée à une vitesse infra-optimale doit être décongelée à faible vitesse et qu'une semence congelée à vitesse supra-optimale doit être décongelée rapidement (cfr. chap.I. 3.2.3.), il existe une vitesse de décongélation correspondant à chaque vitesse de congélation.

Dans nos conditions, la meilleur vitesse de décongélation est celle où l'échantillon est placé dans un bain à 60°C pendant 8 sec.; ce qui confirme les données observées par Fiser et Fairfull (1986) qui ont montré qu'une semence congelée à une vitesse de -20°C/min. permet une bonne récupération de vivants. Là où nos résultats divergent, c'est pour la troisième vitesse de décongélation (dans un bain à 80°C pendant 5"). A cette vitesse, les auteurs obtiennent une récupération de spermatozoïdes vivants supérieure à la deuxième vitesse (dans un bain à 60°C pendant 8"), ce qui n'est pas le cas dans nos observations. Toutefois nous sommes totalement en accord avec Pontbriand *et al.* (1989) qui ne voient pas de variations de motilité pour une décongélation dans un bain à 60°C pendant 8".

3.3.4. Conclusions

Au stade actuel de nos essais, nous optons pour une décongélation de la semence à 60°C/min. pendant 8 secondes qui semble être la vitesse de décongélation optimale pour nos paillettes congelées à une vitesse de -19°C/min.

3.4. CHOIX D'UN MODE DE CONDITIONNEMENT

Pickett *et al.* (1978) ont observé des variations dans l'efficacité de la cryopréservation en fonction du mode de conditionnement. Une expérience a été réalisée avec pour objectif de rechercher le mode de conditionnement le plus approprié pour la semence de bélier.

3.4.1. Schéma expérimental

L'échantillon est constitué d'un sperme dilué dans du DBH glycérolé, à une concentration finale en CPA de 4%. Trois conditionnements (paillettes de 0,25 ml,

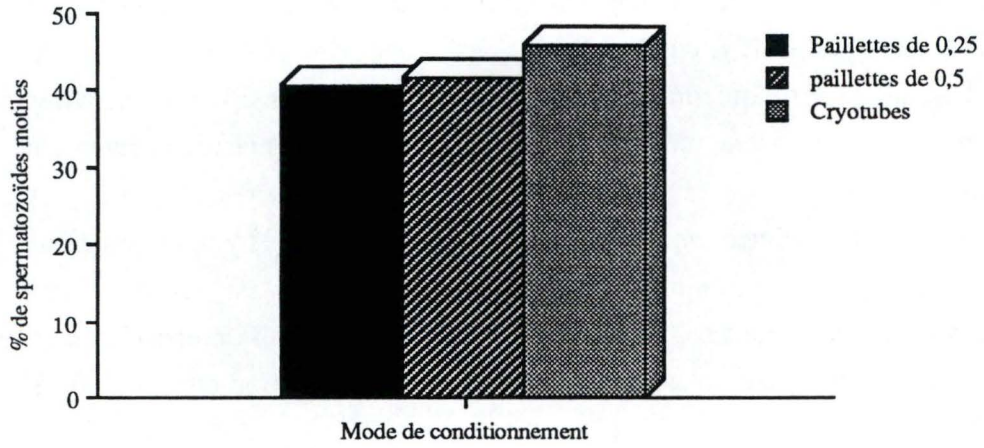


Fig. 26 Pourcentages de spermatozoïdes motiles après congélation à une vitesse de -19°C/min avec une solution cryoprotectrice de glycérol à 4% final, pour trois modes de conditionnement (n= 3 * 2)

paillettes de 0,5ml et cryotubes contenant 0,5ml) sont testés (pourcentage de spermatozoïdes motiles) après congélation à une vitesse de -19°C/min. La décongélation est faite dans un bain à 60°C pendant 8 secondes. Le nombre de spermatozoïdes survivant à ces processus est mesuré au cours de 3 essais successifs sur 2 paillettes par essai.

3.4.2.Résultats

La comparaison des trois modes de conditionnement, n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre ces techniques (fig. 26).

Néanmoins, on constate que la congélation dans un cryotube permet une récupération plus importante de spermatozoïdes vivants après décongélation.

On a constaté une grande variabilité du pourcentage de spermatozoïdes vivants en fonction de la paillette, ce qui entraîne une grande variabilité dans les résultats.

3.4.3. Discussions

La faible supériorité (bien que non significative) du cryotube, pourrait s'expliquer par des imperfections au moment du conditionnement en paillette. Il peut arriver qu'un mauvais conditionnement entraîne la pénétration de bulles d'air dans la paillette, ce qui s'avère néfaste pour la survie des cellules. Il est possible de pallier cette pénétration en bulle d'air, en ne conditionnant pas le fond du prélèvement qui peut être d'un volume inférieur à celui de la paillette, ce qui provoque un remplissage du volume manquant par de l'air.

La variabilité du pourcentage de spermatozoïdes vivants observée tout le long de la paillette peut s'expliquer par une toxicité des substances utilisées pour boucher la paillette, ou par une vitesse de refroidissement différentielle. D'autre part, la forte variabilité observée entre des paillettes ayant subi des traitements apparemment identiques laisse supposer la présence déterminante de facteurs inconnus et non contrôlés. On pourrait suspecter notamment la place de la paillette dans la chambre de congélation ou le transport de la paillette de cette chambre vers la cruche d'azote liquide ou de la cruche vers le bain-marie de décongélation,... .

Le cryotube pose également de gros problèmes notamment lors de la décongélation. Son volume important, ne permet pas de suivre les processus de décongélation tels qu'ils ont été exécutés préalablement (bain à 60°C pendant 8 secondes). Toutefois les parois de ce container étant transparentes, la décongélation peut être suivie à vue. On laisse donc le tube à décongeler dans un bain chauffé tant que la semence présente l'apparence d'un bloc.

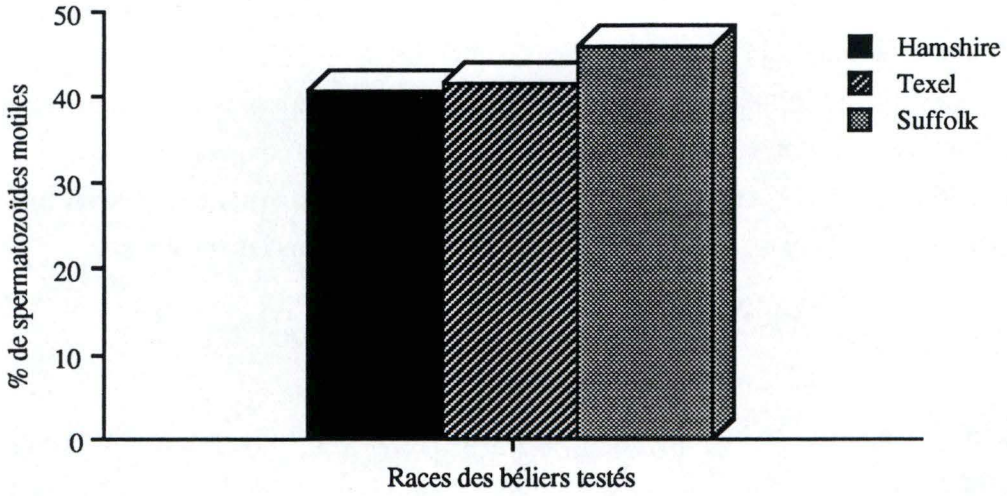


Fig. 27 Pourcentages de spermatozoïdes motiles pour 3 béliers différents après congélation à une vitesse de -19°C/min avec une solution cryoprotectrice de glycérol à 4% final (n= 3 * 2)

3.4.4. Conclusions

Aucune différence n'a été observée entre les trois modes de conditionnement utilisés: paillettes de 0,25 et de 0,5 et cryotube.

Le conditionnement en paillettes est le plus pratique pour l'insémination artificielle, mais il doit être fait avec précaution et une attention particulière doit être apportée à la manipulation des paillettes pendant et après le processus de congélation. De plus la législation Européenne en matière d'exportation du sperme, exige une identification aisée, tel celle présentée par le marquage sur paillette (Wallace, 1992).

3.5. OBSERVATION DES VARIATIONS RACIALES OU INDIVIDUELLES

Ayant toujours travaillé sur des pools de spermes, nous avons voulu vérifier si notre technique était aussi soumise aux aléas de variations individuelles de résistance à la congélation dont de nombreuses communications personnelles nous ont fait état.

3.5.1. Schéma expérimental

Afin de ne pas faire intervenir des paramètres supplémentaires (jour du prélèvement et nombre de prélèvements), 3 béliers de race différentes (Texel, Suffolk et Hamshire) sont prélevés pour les 3 essais en une seule fois et à un même moment. La semence est diluée dans un milieu DBH glycérolé à 4%, mise en paillette de 0,25ml, congelée à une vitesse de -19°C/min., et dégelée dans un bain à 60°C pendant 8 secondes. Le nombre de spermatozoïdes survivant à ces processus est mesuré au cours de 3 essais successifs sur 2 paillettes par essai.

3.5.2. Résultats

Une variabilité importante est observée entre les trois béliers (fig. 27). En dépassant les 50% de récupération de spermatozoïdes vivants après congélation, le sperme du Hamshire apparaît comme significativement plus résistant à la congélation que celui du Suffolk ou du Texel. Par rapport à la valeur observée pour les pools de semence traités dans les mêmes conditions, les résultats du Hamshire sont meilleurs et ceux du Texel sont moindres.

3.5.3. Discussion

Cette expérience ne traduit qu'une variabilité individuelle à un moment précis de la "congélabilité" du sperme. Les trois béliers testés Préféré (Hamshire), Rollcar (Texel français) et Nestor (Suffolk) étaient les seuls représentants mâles de leur race disponible au Centre au moment de l'essai. Il n'est donc pas possible de déterminer si les différences observées ont pour origine des variations inter-raciales de "congélabilité", des différences individuelles au sein même de la race, ou des variations dans le temps pour chacun des animaux.

Toutefois, ces résultats montrent qu'il existe bien une différence de "congélabilité" d'un sperme à l'autre et des essais complémentaires sont indispensables. Il serait important dans le cadre d'un centre de sélection tel que celui de Faulx-Les-Tombes, de connaître les conditions idéales de congélation et la qualité de résistance à la congélation pour la semence de chaque bélier individuellement, afin d'optimaliser le processus pour chacun. Ceci nous conduirait à un protocole de congélation propre à chaque individu.

3.5.4. Conclusions

Il existe des variations de "congélabilité" entre les semences de différents béliers.

4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR LA MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CONGÉLATION

Au cours de cette deuxième partie de notre travail, l'objectif de nos expériences était d'optimaliser certains paramètres jouant un rôle dans la congélation, afin de pouvoir récupérer après décongélation un pourcentage de spermatozoïdes motiles suffisant pour les inséminations artificielles.

La congélation de la semence a pour but de conserver la fertilité des spermatozoïdes par suspension de l'activité métabolique. Car, malgré les améliorations apportées par notre dilueur mis au point lors de la première partie et qui permet une conservation à court terme au-delà de deux jours, le métabolisme des spermatozoïdes bien que ralenti, entraîne toujours une consommation du substrat énergétique se soldant une acidification du milieu qui devient toxique pour la cellule.

Le premier paramètre analysé est le temps d'équilibration de la semence additionné d'un CPA. Il a été constaté que, au-delà d'une heure, la toxicité des CPA pénétrants rendait la congélation inefficace.

Les paramètres suivants qui ont été étudiés sont la nature et la concentration finale des CPA couplées à la vitesse de congélation. Le CPA ayant donné les meilleurs résultats est le **glycérol** à une concentration de **4%**. L'ajout du CPA se fait à **4°C** et en **deux étapes** afin de réduire le stress osmotique pouvant survenir lors de l'addition brutale du nouveau composé. Un accroissement du taux de survie est observé suite à une augmentation de la vitesse de congélation qui, pour nos expériences, montre un optimum à **-19°C/min.**

La vitesse de décongélation a ensuite été étudiée dans les condition de congélation définies ci-dessus, (glycérol 4% et -19°C/min). Les meilleurs résultats de motilité sont obtenus après un réchauffement de la semence dans un **bain à 60°C pendant 8 secondes**.

Nous avons aussi montré qu'il n'y a pas de différences significatives pour le conditionnement de la semence en **paillettes** ou en **cryotube** et qu'il existe des variations individuelles de "congélabilité" de la semence. On observe également de fortes différences d'une paillette à l'autre, mais la raison n'en est pas connue.

Le protocole mis au point a permis une récupération moyenne de près de **45%** de spermatozoïdes motiles; pour certaines semences ce pourcentage est de plus de 50%.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelhakeam A.A., Graham E.F. & Vazquez I.A. (1991)
Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28, 36-42.

Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. (1990)
Molecular biology of the cell. 2nd edition, Garland, New York.

Bearer E.L. & Friends D.S. (1990)
Morphology of mammalian sperm membranes during differenciation, maturation, and capacitation. *J. of electron microscopy technique*, 16 281-297.

Bedford J.M. (1982)
Reproduction in mammals. C.R. Austin & R.V. Short, eds, Vol.1, 128-163.

Birds J.M. (1988)
Motility and acrosomal changes in ionophore treated bovine spermatozoa and their relationship with in vitro penetration of zona-free hamster oocytes. *Theriogenology*, 32, 227-242.

Bork K., Chevrier C., Paquignon M., Jauannet P. & Dacheux J.L. (1988)
Analyse de la motilité et du mouvement flagellaire des spermatozoïdes de verrat au cours du transit épididymaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 28, 1307-1315.

Bousette C. (1990)
Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques: Contribution à la mise au point d'un dilueur pour la conservation du sperme de bélier. FUNDP, Namur.

Burton G.W., Foster D.O., Perly B., Slater T.F., Smith C.P. & Ingold K.V. (1985)
Biological antioxydants. *Phil. Trans., R. Soc. Lon.*, 311(B), 565-578.

Chevrier C. & Dacheux J.L. (1987)
Analysis of the flagellar bending waves of ejaculated ram sperm. *Cell mot.. cytosk.*, 8, 261-273.

Chevrier C. & Dacheux J.L. (1988)
Maturation des spermatozoïdes de bélier. Etude préliminaire du mouvement flagellaire, caractéristique des formes de transition du corps de l'épididyme. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28, 1301-1305.

Chevrier C.a & Dacheux J.L. (1990a)
Analysis of the evolution of the flagellar beat of ram spermatozoa in relation to the degree of maturation. In thèse de doctorat: C. Chevrier publication IV.

Chevrier C.b & Dacheux J.L. (1990,b)
Motility characteristics of ram sperm after capacitation, condition "in vitro" and "in vivo". Analysis of the flagellar movement of hyper actived sperm. Cell motility and cytoskeleton. In thèse de doctorat: C. Chevrier , publication VI.

Clegg E.D. & Foote D.J. (1973)
Mecanisme of mammalian sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.*, 34, 372-383.

Colas G. (1975)
Effect of initial freezing temperatur, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing and fertilizing ability of deep-frozen ran semen. *J. Reprod. Fert.*, 42, 277-285.

Colas G. (1984)
Semen technology in the ram. In M. Courot (ed): The male in farm animal reproduction. Martinus Nijhoff, Boston, 219-236.

Cortell J.M. (1980)
Effet du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20 (4A), 1111-1123.

Dacheux J.L. & Paquignon M. (1980)
Relation between the fertilizing ability, motility and metabolisme of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dévelp.*, 20 (4A), 1085-1099.

Dacheux J.L., Chevrier C. & Lanson Y. (1987)
Motility and surface transformation of human spermatozoa during epididymal transit. Annals New york academy of sciences., 520-563.

Davis I.S., Bratton R.W. & Foote R.H. (1963)
Livability of bovin spermatozoa at 5°, -25° and -85°c in tris-buffered and citrate-buffered yolk glycerol extenders. *Journal of Dairy Science*, 46, 333-336.

Derivaux J. & Ectors F. (1986)
Reproduction chez les animaux domestiques. Cabay, Louvain-la-Neuve, 3th ed.

Dott H.M., Harrison R.A.P. & Foster G.C.A. (1979)
The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 55, 113-124.

Duncan A.E. & Watson P.F. (1992)
Predictive water loos curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observations. *Cryobiology*, 29, 95-105.

Evans G. & Maxwell (1987)
Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.

Fiser D.S. & Fairfull R.W. (1983)
Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 20, 684-689.

Fiser P.S. & Fairfull R.W. (1984)
The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21, 542-551.

Fiser D.S. & Fairfull R.W. (1986a)
The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg-yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23, 518-524.

Fiser D.S., Fairfull R.W. & Marcus G.J. (1986b)
The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology*, 23, 141-149.

Fiser P.S. & Fairfull R.W. (1989)
The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26, 64-69.

Gatti J.-L., Billard R. & Christen R. (1990)
Ionic regulation of the plasma membrane potentatial of rainbow trout spermatozoa: Role in the initiation of sperm motility. *J. Cellular Physio.*, 143, 546-554.

Gatti J.-L., Chevrier C., Paquignon M., Dacheux J.L. & Christen R. (1992)
Relation between internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. "Comparative spermatology 20 years after", Raven press, 369-371.

Hafez E.S.E. (1980)
Reproduction in farm animals. Lea & Febiger, Philadelphia, 4th ed.

Hafez E.S.E. (1980)
Human reproduction: conception et contraception, Harper and rows, 2nd ed.

Hammekstedt R.H., James K.G. & Noran J.P. (1990)
Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. of andrology.*, Vol.11, 73-88.

Hanada A. & Nagase H. (1980)
Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 60, 247-252.

Hayat M.A. (1989)
Principes and techniques of electron microscopy: biological application.3th ed Mac Millan.

Hinkovska-Galcheva V;, Petroka D. & Koumanov K. (1989)
Changes in teh phospholipid comosition and phospholipid asymetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, 26, 70-75.

Holt W.V. & North R.D. (1984)
Partially irreversible cold induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domaine: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.*, 230, 473-483.

Hunter R.H.F. (1987)
Peri-ovulatory physiology of the oviduct,with special reference to progression, storage, and capacitation of spermatozoa. In New horizons in sperm cell research, H. Mohri,ed pp. 31-45.

Klebe R.J. & Mancuso M.G. (1983)
Identification of new cryoprotective agents for cultured mammalian cells. *In vitro* 19, 167-170.

Lamb J.C. & Foster P.M. (1988)
Physiology and toxicology of male reproduction. Academic press, inc.

Lamming G.E. (1990)
Marshall's physiology of reproduction. Vol.2 Reproduction in the male 4th ed.

Lehninger A.L. (1985)
Principes de Biochimie. Fammarion Medecine-Sciences. New-York

Lessire B. (1991)
Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques: Mise au point d'un milieu pour la dilution et la conservation du sperme de bélier. FUNDP, Namur.

Lindemann C.B., Gotz J.S. & Kanous K.S. (1987)
Regulation of activation state and flagellar wave form in epididymal rat sperm: evidence for the involvement of both Ca++and AMPc. *Cell motility.*, 8, 324-332.

Locksley E.M. (1978)
Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15, 382-390.

Mac Kenzie A.P. (1977)
Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous system. *Phil. Trans. R. soc. Lond.*, 278, 167-189.

Mann T. (1975)
Biochemistry of semen, Handbook of physiology, section 7, Endocrinology (male reproduction system), eds Hamilton Dow. & Greep R.O., An. Phys. Soc, Washington D.C., 5,461-473.

Martin I.C.A. & Emmens C.W. (1961)
Effects of time of equilibration and addition of fructose on the survival and fertilty of bull semen deep-frozen to -79°c. *J. of Reprod. and Fert.*, 2, 404-410.

Mazur P. (1969)
Kinetic of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. of General Physio.*, 47, 347-365.

Mazur P. (1977)
The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14, 251-272.

Mazur P. (1984)
Freezing of livings cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247 (cell physiol. 16), 125-142.

Meryman H.T., William R.J. & Douglas S.T.J. (1977)
Freezing injury from "solution effests" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, 14, 287-302

Metz C.B. & Monroy A. (1985)
Biology of fertilization. (Vol.2 biology of the sperm), academic press, inc. Orlando.

Picket B.W., Bernattson W.E. & Sullivan J.J. (1978)
Influence of seminal additives and packaging system on fertility of frozen bovine spermatozoa. *J. An. Sci.*, 47, 12-47.

Pontbriand D., Howard J.G., Schiewe M.C., Stuart L.D. & Wildt D.E. (1989)
Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26, 341-354.

Quinn P.J., White I.G. & Voglmayr J.K. (1970)
Use of a continous flow dialysis apparatus to determine the effect of cations, buffer and osmotic pressure on ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 22, 253-260.

Roy A. (1957)
Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 79, 318-319.

Roy M., Ales D., Wallace S., Dokis A. & Lester C. (1978)
Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperme.*Biol. of Rep.*, 18, 686-696.

Schmehl M.K., Vazquez I.A. & Graham E.F. (1986)
The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to test-yolk-glycerol on the post-thaw motility spermatozoa. *Cryobiology*, 23, 512-517.

Setchell B.P. & Hinks N.T. (1966)
The importance of importance of glucose in the oxydative metabolisme of the testis of the conscious ram and the role of the pentose cycle.
Bioch. J., 102, 623-631

Shani B.S., Check J.H., Bollendorf A., Lee M.A., Press M. & Kastoff (1988)
Basic and computer-assisted semen analysis: methods and pitfalls. Assisted human reproductive technology, 173-187.

Skaer H. (1982)
Chemical cryoprotection for strustural studies. *J. of Microscopy*, 125,137-147.

Swan M.A. (1993)
A method for reactivation of the movement of demembraned ram sperm models with decondensed nuclei and a description of their ultrastructure. *Biology of Reproduction* 48, 987-997

Töpfer-Petersen E., Friess A.E. & Schill W.-B. (1988)
The acrosome reaction in boar spermatozoa. *Human reproduction* Vol.3 3, 319-326.

Watson P.F. (1976)
The protection of ram and bull spermatozoa by the low density fraction of egg-yolk during storage at 5°c and deep-freezing. *J. of Thermal Biology*, 1, 137-141

Wallace J.M. (1992)
Artificial insemination and embryo transfer. In "Progress in sheep and goat research", A.W. Speedy, CAB international.

Watson P.F. (1979)
The preservation of semen in mammals. Finn Ca (ed) Oxford Rev. of Repr. Bio., vol.1, 283-350.