

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Abd El Hamid Ibn Badis – Mostaganem**



**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
**Département d'Agronomie**

**Laboratoire de physiologie animale appliquée**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de**

**Master En sciences agronomiques**

**Spécialité : Génétique et Reproduction animale.**

**Soutenue publiquement le : 15/09/2019**

**THEME :**

**DOUBLE CONGELATION DE LA SEMENCE EQUINE**  
**(Effet de la concentration en glycérol et de la dilution finale sur la qualité spermatique)**

**Présenté par : MERAIMI Oussama**

**Devant le jury :**

Présidente : Mme.SIDHOUM RECHIDI Nadra M.C.B U. Mostaganem

Examineur : Mr.KEBIR Ahmed Docteur ES sciences L.R.V. Mostaganem

Encadrant : Mr. BELALA.Redha M.C.B U. Blida1

Co- Encadrant : Mr. HALBOUCHE Miloud Professeur. U. Mostaganem

**Année Universitaire : 2018- 2019**

## REMERCIEMENTS

Merci **ALLAH** de nous avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever nos mains vers le ciel et dire **ALHAMDOULLAH**

A Monsieur **BELALA Redha**, qui fut à l'origine de ce travail, Pour m'avoir proposé ce sujet et pour m'avoir accompagné et aidé pendant toute la réalisation de ce travail. Qui a bien voulu accepter la responsabilité de me guider, pour votre confiance, votre si grande disponibilité, votre investissement, Vos nombreux conseils et votre gentillesse. Je suis honorée de vous avoir comme professeur.

Hommage respectueux.

A Monsieur le **Professeur HALBOUCHE Miloud**, Pour m'avoir fait l'honneur de me co-encadrer pour votre pédagogie, votre bienveillance, votre disponibilité et votre confiance  
Merci pour cette opportunité pour cette agréable année.

Respect professeur

Au Dr. **SIDHOUM RACHIDI Nedra** qui a bien voulu accepter de présider l'examen de mon mémoire.

Hommage respectueux.

Au Dr. **KEBIR Ahmed**, qui a bien voulu accepter d'examiner mon mémoire.

Hommage respectueux.

A **MYRA pour** son accueil chaleureux, sa disponibilité, son sourire et son aide précieuse au cours de ce travail

Sincères remerciements.

Aux excellents étalons, qui ont bien voulu collaborer et rester calme pendant notre travail.

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents.

Pour leur soutien inconditionnel et leur bienveillance

Toute ma reconnaissance et mon amour

Ma grand-mère :

Qui me manque tellement, mais.....

Que Je garde dans mon cœur à tout jamais.

J'ai toujours rêvés de te partager ce

moment..... « **allah yarhmek** »

J'espère que tu serais fière de moi,

Me frères:

Ahmed, Mohammed, Abdelkader, Salah-eddine et Heythem

Mes chères sœurs :

Yasmine, Houda et Hanadi

Je vous souhaite à tous un brillant parcours dans la  
vie

À ma chère tante Louiza et mon oncle Mahmoud

Pour tous ces moments de bon humeur passés et a ceux  
qui restent à venir....

A Mohammed et à toute ma famille.....

A Omar et sa petite famille .....

Merci de m'avoir supporté durant toutes ces longues  
années ...

Ce fut très agréable de travailler avec toi

Mes amies d'enfance : Mhammed et Boualem

A notre amitié sincère qui a su résister au temps et a  
la distance

À Cheikhe krimou (Nasri Mohammed Abdelkarim) et sa  
famille ...

Merci pour votre hospitalité et merci pour tout le  
savoir que vous m'avez transmis.

A la famille d'endurance équestre que j'espère enfin  
trouver la sortie du tunnel...bon vent l'équipe

Mes amies de la faculté et de tous les horizons

A tous ceux qui m'ont transmis leur savoir et leur  
passion

MERAIMI Oussama

## Résumé

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'effet de la concentration en glycérol, la concentration finale des spermatozoïdes ainsi qu'un traitement avant recongélation au cholestérol et  $\alpha$ -tocophérol incorporés aux cyclo-dextrines sur la qualité du sperme équin à travers deux cycles de cryoconservation. Deux expériences ont été réalisées.

Dans l'expérience une, 18 éjaculat récoltés à partir de 6 étalons ont été utilisés. Chaque éjaculat a été évalué initialement (CASA & CMF), puis congelé dans un diluant commercial (INRA FREEZE®, 2,5% de glycérol) et quatre diluants expérimentaux composé à partir de (INRA96®) additionnée de 1%, 2%, 3% et 4% de glycérol respectivement ensuite décongelé et évalué à nouveau. Un deuxième cycle de congélation-décongélation a été effectué. La concentration en glycérol donnant le meilleur résultat sera retenue pour l'expérience2.

Dans la deuxième expérience, des paillettes congelées précédemment dans l'INRA-Freeze® ont été décongelées et recongelées dans trois dilutions (1 :10 ; 1 :20 ; 1 :100) traitées ou pas au cholestérol et la vitamine E incorporés au cyclo-dextrines. Une analyse (CASA et CMF) a été effectuée après décongélation.

La concentration de 2.5% en glycérol (INRA-Freeze®) a été optimale pour une recongélation des spermatozoïdes équins.

Une centrifugation de la semence équine avant recongélation (600xg, 10mn sur un coussin « Maxifreeze® ») a réduit le taux des pertes en cellules à 12% associé à une bonne viabilité-acrosome.

Un traitement de la semence avant recongélation au cholestérol et à l' $\alpha$ -tocophérol incorporés dans les cyclo-dextrines (CLC+TLC) a pu améliorer considérablement la qualité des spermatozoïdes équins (mobilité, intégrité membranaire et acrosomique et statut oxydatif) recongelés à une concentration faible de 1 million spermatozoïdes par millilitre, permettant une production de 100 à 300 paillettes ICSI à partir d'une paillette d'IA classique.

**Mots clefs** : Etalon, semence, congélation, recongélation, CASA, Cytométrie en flux.

## ملخص

إن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير تركيز الجلوسول، وتركيز الحيوانات المنوية النهائي، والمعالجة ما قبل الكوليسترول توكوفيرول ضمن سيكلو ديكسترين على نوعية الحيوانات المنوية في الخيول عبر دورتي حفظ بالتجميد. لأجل ذلك تم إجراء تجربتين اثنتين.

في التجربة الأولى، تم استخدام 18 عينة منوية تم استخلاصها من أصل 6 فحول. في البداية خضعت كل عينة إلى تقييم أولي (CASA & CMF)، ثم تم تجميدها في وسط تجاري (INRA-Freeze®) تحتوي على 2.5 بالمئة من الجليسيرول وأربعة مخففات تجريبية مؤلفة من الوسط INRA-96® بإضافة نسب 1٪، 2٪، 3٪ و 4٪ من الجلوسول على التوالي وتقييمها (CASA & CMF) مرة أخرى. سيتم تحديد تركيز الجليسيرول الذي يعطي أفضل نتيجة للتجربة 2.

في التجربة الثانية، تم إذابة العينات التي تم تجميدها سابقاً في الوسط (INRA-Freeze®) وإعادة تجميدها بثلاثة نسب تخفيف مختلفة (1:100 ; 1:20 ; 1:10) حيث عولج نصف كل واحدة منها بالكوليسترول وفيتامين هـ وترك النصف الآخر بدون علاج، ثم تمت اعادة تقييمها بعد الاذابة. لقد أفادت هذه الدراسة النتائج التالية:

إن نسبة 2.5 بالمئة من مادة الجليسيرول تبين أنها النسبة المثلى لإعادة تجميد أمشاج الخيول. إن عملية التدوير المركزي بسرعة 600 لمدة 10 دقائق باستعمال وسادة التدوير (Maxifreeze®) قبل التجميد سمحت بتقليص نسبة خسارة الخلايا المنوية إلى غاية 12 بالمئة والحفاظ على نسبة عالية من الخلايا الحية والسليمة. إن علاج الأمشاج قبل اعادة التجميد بالكوليسترول وفيتامين هـ المدمجين بالسيكلوديكتستين (CLC+TLC) قد سمح بتحسين نوعي للحيوانات المنوية للخيول (الحركية، سلامة الغشاء الخلوي والأكروزام وحالة التأكسد) التي تمت إعادة تجميدها بتركيز 1 مليون خلية بالملييلتر مما يسمح بإنتاج 100 الى 300 قصيبة إكسي (ICSI) انطلاقاً من قصيبة تلقيح اصطناعي واحدة فقط .

**الكلمات المفتاح:** فحل، أمشاج، تجميد، إعادة التجميد، التحليل المنوي بمساعدة الكمبيوتر (CASA)، القياس الخلوي عن طريق التدفق (CMF).

## Abstract

The objective of this study is to evaluate the effect of glycerol concentration, final sperm concentration, and treatment with cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclo-dextrins on equine sperm quality across two cryopreservation cycles. Two experiments were carried out.

In experiment 1, eighteen ejaculates harvested from six stallions were used. Each ejaculate was evaluated initially (CASA & CMF), then frozen in 1 commercial diluent (INRA FREEZE®, 2.5% glycerol) and four experimental diluents composed from (INRA96®) supplemented with 1%, 2%, 3% and 4% glycerol respectively thawed and evaluated again. A second freeze-thaw cycle was performed. The glycerol concentration giving the best result will be retained for the experiment 2.

In experiment 2, straws previously frozen in INRA-Freeze® were thawed and refrozen in three dilutions (1: 10, 1: 20, 1: 100) treated or not with cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclo-dextrins. An analysis (CASA and CMF) was performed after thawing. The concentration of 2.5% glycerol (INRA-Freeze ®) was optimal for a refreezing of equine spermatozoa.

Centrifugation of the equine seed before refreezing (600xg, 10mn on a "Maxifreeze®" cushion) reduced the rate of cell loss to 12% associated with good acrosome viability. Treatment of the cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclo-dextrins (CLC + TLC) significantly improved the quality of equine spermatozoa (mobility, membrane and acrosomal integrity, and oxidative status) refreezed at low concentration of 1 million spermatozoa per milliliter, allowing production of 100 to 300 ICSI flakes from a conventional flake of AI.

**Key words:** Stallion, semen, freezing, refreezing, CASA, flux Cytométrie.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
DEDICACES .....	3
Résumé .....	4
Abstract .....	6
Liste des tableaux .....	12
Liste des abréviations .....	13
INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE I - Les biotechnologies liées à la reproduction en espèce équine .....	16
1. L'insémination artificielle .....	16
2. Le transfert d'embryons chez les équidés .....	17
2.1. Principe : .....	17
2.1.1. Jument receveuse : .....	17
2.1.2. Synchronisation de la receveuse : .....	18
2.2. Technique .....	18
3. La fécondation in vitro dans l'espèce équine.....	21
Maturation .....	22
Capacitation.....	23
4. LA PONCTION OVOCYTAIRE (OPU) / Injection Intra Cytoplasmique du Sperm (ICSI) : .....	24
4.1. LA PONCTION OVOCYTAIRE .....	24
4.2. Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) .....	27
CHAPITRE II – La semence équine .....	31
1. Physiologie de la reproduction des mâles .....	31
1.1. Puberté.....	31
1.2. Ejaculation.....	31
1.3. Sperme.....	31
1.4. Sex ratio.....	31
2. Collecte du sperme .....	31
3. Les caractéristiques du sperme.....	33
3.1. Couleur : .....	33
3.2. Volume : .....	33
3.3. Concentration et nombre total des cellules : .....	33
3.4. Motilité : .....	33

4. Conservation du sperme .....	34
5. Evaluation de la semence équine. ....	35
5.1. Les examens de première intention : .....	35
5.2. Les examens de seconde intention : .....	37
5.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm ..	37
Analysis) : .....	37
5.2.2. La cytométrie en flux (CMF) .....	38
5.2.2.4. Application de la cytométrie en flux en reproduction équine .....	41
• Intégrité de la membrane plasmique (Test de viabilité) .....	41
• Capacitation et statut acrosomique(Le test PNA/FITC/IP) .....	42
Chapitre III-La cryoconservation de la semence équine .....	44
1.Définition .....	44
2.Objectifs de la cryoconservation .....	44
3.Le diluant de cryoconservation .....	44
3.1. Définition .....	44
3.2. Physique de la congélation et dommages subis par les cellules.....	44
4.La technique de congélation de la semence équine.....	46
4.1. Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle	46
congelées .....	46
4.2. Les étapes de la congélation de la semence équine.....	47
5. Rôle et caractéristique du dilueur .....	52
5.1. Les principaux diluants employés dans l'espèce équine.....	52
5.2. Les diluants de réfrigération.....	52
5.3. Les diluants de congélation .....	54
6.La technique de la double congélation (La recongélation) .....	55
MATERIELS ET METHODES .....	57
1. Objectifs .....	57
2. Lieux de l'expérimentation : .....	57
3. Animaux .....	57
4.Récolte de la semence : .....	59
4.1. Filtration de l'éjaculat : .....	59
4.2. Évaluation initiale de la semence : .....	60
5. Préparation des complexe d'inclusion aux cyclo-dextrines (CLC+ TLC).....	61
6. Préparation de la solution et dose de traitement à base de CLC+TLC .....	61
7. Dilution de la semence .....	61
7.1. Décence de la température à 22°C : .....	62
7.2. Décence de la température de 22°C à 4°C : .....	62

7.3. Centrifugation: .....	62
7.4. Elimination du surnagent et rajout du 2eme diluant : .....	62
8. Remplissage des paillettes.....	63
9. Congélation .....	63
9.1. Décente de la température de 4°C a -140°C.....	63
9.2. Le grand plongeon a -196°C .....	64
9.3. Le stockage.....	65
9.4. La décongélation .....	65
10. Techniques d'évaluation de la semence : .....	65
10.1. Analyse de la mobilité spermatique par système (CASA) .....	65
10.2. Analyse spermatique par cytométrie en flux (CMF).....	67
11. Protocole expérimental.....	68
11.1. Première expérience : .....	68
11.2. Deuxième expérience : .....	69
12. Analyse statistiques : .....	69
RESULTATS .....	70
La premiere expérience : .....	70
La deuxième expérience : .....	74
DISCUSSION .....	77
La deuxième expérience : .....	80
CONCLUSION .....	82
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	83

## Liste des illustrations

**Figure 1** : représentation schématique des étapes de la fécondation in vitro © F. Reigner, G. Duchamp, G. Goudet

**Figure 2** : représentation schématique d'un ovaire équin contenant un follicule préovulatoire avec un ovocyte mature et plusieurs petits follicules avec un ovocyte immature © G. Goudet

**Figure 3** : Ovocyte mature © F. Reigner, G. Duchamp, G. Goudet).

**Figure 4** : Anesthésie locale et technique d'échoguidage par voie transvaginale

**Figure 5** : Différents instruments pour réaliser une OPU (photo : Denis NECCI)

**Figure 6** : collecte d'ovocyte par voie transvaginale (photo : Denis NECCI)

**Figure 7**: recherche des ovocytes aspirés (photo : Denis NECCI)

**Figure 8** : ovocytes, blastulas, morula (AVENTEA)

**Figure 9** : Technique d'ICSI (photo : Denis NECCI)

**Figure 10** : Microscope inversé doté de micromanipulateur joystick

**Figure 11** : Etapes de l'injection du spermatozoïde dans l'ovocyte(AVENTEA)

**Figure 12** : mannequin de récolte pour étalons (Dr Letenre Jessica)

**Figure 13** : différents compartiment et montage d'un vagin artificiel (Dr Letenre Jessica)

**Figure 14** : Différents types de vagins artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)

**Figure 15**:Les paramètres cinétiques du spermatozoïde

**Figure 16** : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux (Tourrel-Cuzin, 2012)

**Figure 17** : Les différents systèmes intervenants dans le cytomètre en flux

**Figure 18** : Interaction de la lumière avec la cellule (University of Aberdeen, 2010)

**Figure 19** : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (Courbiere & Al 2009)

**Figure 20** : Le processus de congélation de la semence équine

**Figure 21** : mettre la semence dans un bain-marie a 22°C

**Figure 22** : Phase d'équilibration de la semence a 4°C

**Figure 23** : vagin artificiel type Colorado et ses accessoires utilisés dans ce travaille

**Figure 24** : récolte de l'étalon sur un mannequin.

**Figure 25 :** filtration de l'éjaculat.

**Figure 26:** Centrifugation a 600xg pendant 10min

**Figure 27:** Machine à remplir et a souder MRS I

**Figure 28 :** étalement des paillettes sur le rack portoir de congélation.

**Figure 29 :** courbe de congélation.

**Figure 30 :** Immersion des paillettes dans l'azote liquide.

**Figure 31 :** stockage des paillettes dans les cuves d'azote liquide

**Figure 32 :** paramétrage du système casa pour l'espèce équine

**Figure 33 :** Analyse casa

**Figure 34 :** Analyse au cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA)

**Figure 35 :** Effet de la centrifugation sur la concentration spermatique durant la deuxième congélation dans les différents diluants de cryoconservation (Exp1).

**Figure 36 :** Effet de la centrifugation sur les paramètres spermatiques durant la deuxième congélation dans les différents diluants de cryoconservation (Exp1)

**Figure 37 :** Comparaison des paramètres spermatiques entre la 1ere et la 2eme décongélation dans les trois dilutions étudiées

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Caractéristiques principales du sperme d'étalon

**Tableau 2** : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport

**Tableau 3** : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge

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

**Tableau 5** : Composition du dilueur à base de lait ½ écrémé [BARRIER-BATTUT I. & al 2014]

**Tableau 6** : Composition du dilueur de KENNEY ® pour 1 L (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) [BARRIER-BATTUT I. & al 2014]

**Tableau 7** : Composition chimique du diluant INRA 82 - Hépès ® (PILLET E, 2009)

**Tableau 8** : Composition chimique du diluant INRA 96 ® (PILLET E, 2009)

**Tableau 09** : Identification des échantillons (chevaux)

**Tableau 10** : Échelle d'appréciation de la motilité massale du sperme. (D'après l'échelle de MILOVANOV, 1962)

**Tableau 11** : les paramètres spermatiques initiaux après 03 heures de transports (T0-Exp1).

**Tableau 12** : les paramètres spermatiques initiaux après la première centrifugation (T1-Exp1) (p<0.05 ; n=18)

**Tableau 13** : les paramètres spermatiques après la première décongélation avec les différents taux de glycérol rajouté aux diluants (T2-Exp1)(p<0.05 ; n=18)

**Tableau 14** : les paramètres spermatiques après la deuxième décongélation avec les différents taux de glycérol rajouté aux diluants (T4-Exp1) (p<0.05 ; n=18)

**Tableau 15** : les paramètres spermatiques après la première décongélation (T0-Exp2) (p<0.05 ; n=18)

**Tableau 16** : les paramètres spermatiques après la deuxième décongélation dans les trois dilutions étudiées (T1-Exp2) (p<0.05 ; n=18)

**Tableau 17** : les paramètres spermatiques après la deuxième décongélation dans les trois dilutions étudiées avec (CLC+TLC) ou sans (NT) traitement (T1-Exp2)(p<0.05 ; n=18)

## Liste des abréviations

- OPU:** Ponction Ovocytaire (Ovum PICK UP)  
**CASA:** Computerized Assisted Sperm Analysis  
**FIV:** La Fécondation in Vitro  
**IA :** Insémination Artificielle  
**ICSI :** Intra Cytoplasmique Sperm Injection  
**SIRE :** LE Système d'Information Relatifs aux Equidés  
**MOT:** Motilité Totale  
**PROG:** Motilité Progressif  
**VIAB:** Viabilité  
**ACRO:** Réaction Acrosomique  
**ROS:** Réactif Oxygen Species  
**INRA :** Institut National de la Recherche Agronomique  
**CMF :** Cyto-Métrie en Flux  
**IP :** Iodure de Propidium  
**PNA/FITC:** Pisum Sativum Agglutinin-Fluorescein Iso Thio Cyanate  
**IAC :** Insémination Artificielle Congelée  
**IFCE :** Institut Français du Cheval et de l'Équitation  
**SD :** écart type  
**SEM :** Erreur Standard de la Moyenne  
**SPZ:** Spermatozoïdes  
**CLC:** Cholesterol Loaded Cyclodextrins  
**TLC:**  $\alpha$ -tocopherol Loaded Cyclodextrins

## INTRODUCTION

En espèce équine, la fécondation in vitro (FIV) n'a pas été couronnée de succès. Cet échec représente une contrainte au développement de la production d'embryons qui a mené les chercheurs comme les praticiens des centres spécialisés à recourir vers une technique de fertilisation alternative qui est l'injection intra-cytoplasmique du sperme (ICSI) après une ponction ovocytaire (Ovum Pick-Up). L'ICSI/OPU s'est avérée être une technique très efficace et est devenue parfaitement maîtrisée et largement usitée chez la jument.

Cependant, avec l'utilisation de l'ICSI chez la jument, une autre contrainte s'est érigée mais cette fois-ci par rapport aux gamètes mâles cryoconservés. En effet, contrairement à l'insémination artificielle (IA) où la dose inséminante est de l'ordre de 400 millions spz/ml, l'ICSI ne requiert qu'un seul spermatozoïde recruté parmi une faible quantité de cellules. La décongélation d'une paillette d'IA « 100 - 300 millions cellules par millilitre) (Galli et al., 2014) pour les besoins minime d'une ICSI serait un pur gaspillage de semence, notamment pour les stocks limités de paillettes disponible dans le monde et issus d'étalons de très grande valeur génétique et sportive. Ces derniers sont souvent déjà disparus lorsque leur valeur génétique a été confirmée (Galli et al., 2014). La réglementation internationale interdit de nos jours l'utilisation de ces stocks génétiques limités pour l'IA et les réserve strictement pour l'ICSI à des fins d'optimisation de la production (WBFSH, date).

Ainsi, la procédure de recongélation ou la double congélation de la semence équine vise à décongeler des paillettes cryoconservées à une concentration habituellement entre 100 et 300 millions de cellules par millilitre et les recongeler à nouveau dans des paillettes dites ICSI à une concentration beaucoup plus faibles (01 – 10 millions de cellules par millilitre), permettant ainsi de gagner considérablement en production d'embryon.

Chez le cheval, la recongélation de la semence a été réalisée la première fois en 2006 par Choi et ses collaborateurs et a donné suite à des spermatozoïdes immobiles. Ces derniers ont pu initier un développement embryonnaire après ICSI jusqu'au stade blastocyste mais avec un taux d'achèvement faible par rapport aux spermatozoïdes mobiles issus d'un seul cycle de congélation-décongélation. (Choi et al., 2006). Plusieurs études se sont succédées depuis mais n'ont pas réussi à obtenir une qualité satisfaisante (mobilité et intégrité) de la semence après recongélation (Van Gerwen, 2015).

En effet, la recongélation expose de façon répétitive la semence à des endommagements causant une détérioration de ses paramètres de mobilité et d'intégrité ainsi que son métabolisme conduisant ainsi à une réduction considérable de son pouvoir

fertilisant notamment pour le spermatozoïde équin qui est initialement fragile à l'effet délétère du froid à cause du faible ration membranaire cholestérol : phospholipides comparé à d'autres espèces (Ricker et al., 2006 ; Galli et al., 2014). Ces lésions consécutives à la congélation sont dues essentiellement au stress osmotique agissant conjointement au stress oxydatif par mauvaise élimination des radicaux libres (Park et Graham, 1992 ; Watson, 2000; Ball, 2008). De ce fait, un traitement de la semence avant recongélation au cholestérol et l' $\alpha$ -tocophérol pourrait augmenter la cryo-résistance du spermatozoïde équin en stabilisant la membrane plasmique et prévenant l'accumulation des radicaux libres (stress oxydatif).

Les agents Cryo-protecteurs (notamment le glycérol) protègent les spermatozoïdes durant la cryoconservation en minimisant leur exposition au stress osmotique et en stabilisant la structure de la membrane plasmique et réduisant l'effet délétère des radicaux libres (Park et Graham, 1992). Cependant, le glycérol a également un effet toxique dose-dépendant sur les spermatozoïdes notamment lors d'une exposition prolongée et/ou répétée à l'occasion d'une recongélation (Alvarez et al., 2014). Pour cette raison, sa concentration dans le diluant de congélation devrait être optimisée.

Devant cette problématique de recongélation de la semence qui représente un obstacle incontournable devant l'optimisation de la production d'embryons en espèce équine, il serait intéressant d'étudier tous les aspects pouvant agir à travers ce processus sur la qualité des spermatozoïdes recongelés.

Ainsi, notre présente étude a pour objectif d'évaluer l'effet de la concentration en glycérol, la concentration finale des spermatozoïdes ainsi qu'un traitement avant recongélation au cholestérol et  $\alpha$ -tocophérol incorporés aux cyclo-dextrines sur la qualité (mobilité, intégrité, stress oxydatif) du sperme équin à travers deux cycles de cryoconservation.

## **CHAPITRE I - Les biotechnologies liées à la reproduction en espèce équine**

### **1. L'insémination artificielle**

Utilisé par les Arabes au XIV<sup>e</sup> siècle chez le cheval l'insémination artificielle est une technique de monte qui consiste à récolter l'éjaculat du mâle, sans qu'il soit en contact avec une femelle. Elle présente des avantages essentiellement sanitaires et techniques. D'un point de vue sanitaire, l'absence de contact entre individus permet de réduire la circulation des maladies vénériennes (AIE : Anémie Infectieuse des Équidés, MCE : Métrite Contagieuse Équine, AVE : Artérite Virale Équine) et des maladies contagieuses (grippe et rhinopneumonie essentiellement) et Elle élimine les vulvoplasties répétées et les risques liés à des animaux vicieux.

D'un point de vue technique, l'insémination artificielle permet d'optimiser la gestion des étalons et des juments en diminuant le nombre de sauts à effectuer par les étalons et d'améliorer leur fécondité (Corde, 1985). Grâce à la division du sperme récolté en plusieurs doses, un étalon pourra réaliser moins de sauts et saillir un nombre plus important de juments, tout en étant moins soumis au risque de blessures pouvant survenir lors de la monte ou du transport. Elle permet aussi d'évaluer le sperme des étalons à chaque récolte et de constater des changements de qualité du sperme.

De plus, le développement des techniques de conservation de la semence par congélation permet aujourd'hui d'étaler les récoltes, ou d'obtenir de la semence lorsque l'étalon est indisponible (localisation géographique, carrière sportive, maladie, décès).

Pour les juments, la mise à la monte artificielle permet dans le cadre d'un suivi rapproché de la fonction ovarienne, de limiter le nombre de saillies et la quantité de sperme utilisée, réduisant ainsi le risque d'endométrite. Elle permet également de remettre à la reproduction des juments dont l'appareil génital a été traumatisé lors de la mise-bas précédente. Enfin d'un point de vue génétique, l'insémination artificielle offre un choix d'étalon plus large et une conservation du patrimoine génétique. En revanche, lors d'une utilisation déraisonnée, l'insémination artificielle peut également mener à une diminution de l'exploitation de ce patrimoine génétique lors de l'utilisation trop importante d'un étalon, et mener dans le futur à des risques de consanguinité.

L'inconvénient principal du développement de la monte artificielle est aujourd'hui son coût pour les propriétaires (suivi rapproché des juments, matériel, semence), et le niveau technique qu'elle implique, rendant ainsi les manipulations réservées uniquement à des techniciens formés ou des vétérinaires.

L'insémination artificielle peut être réalisée avec différents types de semence. Lors de l'insémination en semence fraîche, le sperme récolté est utilisé pour inséminer une jument dans les 30 minutes qui suivent la récolte. Ceci nécessite que les deux reproducteurs soient à proximité l'un de l'autre et de pouvoir procéder à la récolte de l'étalon dès que la jument est prête à ovuler. Lorsqu'un transport est nécessaire ou lorsque la jument ne peut être inséminée immédiatement, la semence récoltée peut être utilisée jusqu'à 24 heures après la récolte en étant refroidie à 4°C. Il s'agit alors de semence réfrigérée utilisée sur place ou transportée. Enfin, lorsque la semence est récoltée pour une conservation de durée indéterminée, elle est congelée dans l'azote liquide. Dans ce dernier cas, le suivi de la jument devra être strict pour obtenir une fécondation, car une fois décongelé le sperme ne sera viable que quelques heures.

## **2. Le transfert d'embryons chez les équidés**

Le transfert d'embryons est un moyen de reproduction qui permet de mettre à la reproduction des juments sans pénaliser leur carrière sportive, par exemple. Ce mode de reproduction requiert une grande technicité et s'avère être une bonne façon de multiplier la génétique de qualité par la voie femelle. Les premiers transferts équinés ont été réalisés au Japon par Oguri et Tsutsumi en 1972.

### **2.1. Principe :**

La jument dite donneuse est inséminée pendant sa chaleur. La chaleur est suivie à l'échographie pour pouvoir déterminer la date de collecte au plus juste après l'ovulation. La collecte est généralement réalisée 7 jours après l'ovulation. A ce stade, il est actuellement encore impossible de savoir, avant la collecte, s'il y a eu fécondation ou pas.

Le liquide de collecte est filtré. La recherche d'un éventuel embryon se fait sous loupe binoculaire dans un environnement stérile (hotte). S'il y a un embryon, il est lavé afin de le débarrasser des cellules et desquamations du liquide utérin. Ensuite, il est transféré dans une jument dite receveuse ou porteuse. C'est elle qui assurera le développement du fœtus, la mise bas et l'élevage du poulain jusqu'au sevrage.

#### **2.1.1. Jument receveuse :**

Le choix de la jument receveuse est important pour augmenter le taux de réussite du transfert d'embryon.

Race des porteuses utilisées en transfert d'embryon (monte 2015- SIRE) Ainsi il faudra choisir une jument dont la fertilité est connue possédant de bonnes qualités maternelles, ou une jeune maiden (jument qui n'a jamais été saillie), de préférence d'un gabarit supérieur à celui de la jument donneuse pour un meilleur développement du poulain. Les expérimentations récentes

ont montré l'importance du milieu utérin pendant la gestation sur le développement du fœtus in utero, sur sa croissance et son métabolisme après la mise bas. Le fœtus est capable de s'adapter à l'environnement utérin mais, dans l'idéal, il faudrait pouvoir utiliser des receveuses de la même race que la donneuse pour que le métabolisme ne soit pas modifié.

Actuellement, les juments receveuses utilisées sont pour la plupart des juments Trotteur français (3/4) réformées des courses, viennent ensuite s'ajouter des juments de selle. Les juments de race de trait sont de moins en moins utilisées. En effet, les juments Trotteuses réformées sont actuellement moins chères à l'achat. De plus, leur gabarit se rapproche davantage des juments de sang est plus appréciée.

### **2.1.2. Synchronisation de la receveuse :**

La jument receveuse doit être synchronisée avec la donneuse, c'est-à-dire qu'elle doit ovuler dans la même période que la donneuse.

Synchronisation ovulations donneuse/receveuse Ceci nécessite un suivi gynécologique très précis, une induction des ovulations et éventuellement un traitement de synchronisation des receveuses potentielles. En effet, les meilleurs taux de transfert (% de gestation à 14 jours après transfert d'un embryon) sont obtenus lorsque la receveuse est à J5, J6 ou J7 par rapport à l'ovulation de la donneuse (J7). Ainsi la receveuse doit avoir ovulé le même jour que la donneuse ou 1 ou 2 jours après. En dehors de cette plage de 3 jours, le taux de réussite est moindre

## **2.2. Technique**

### **2.2.1. La récolte**

L'embryon est récolté à J7 ou J8 (J0 = jour de l'ovulation de la donneuse) par 3 ou 4 siphonnages successifs de l'utérus de la donneuse avec un milieu tampon. Les milieux sont conditionnés en bouteille ou en poche. Le liquide est introduit via une sonde dans l'utérus de la jument. L'utérus est massé (par voie rectale) afin de répartir le liquide jusque dans les cornes utérines. Le liquide est alors récupéré et filtré directement derrière la jument. D'autres techniques de filtration peuvent être utilisées au laboratoire.

Une recherche de l'embryon est ensuite effectuée sous une loupe binoculaire dans les milieux récupérés. Les opérations sont réalisées au laboratoire dans une hotte à flux laminaire horizontal qui permet de manipuler l'embryon dans une ambiance la plus stérile possible.

### **2.2.2. Le transfert**

Le transfert dans la receveuse est l'étape la plus délicate et qui demande le plus d'expérience. Les deux techniques de transfert sont :

- Le **transfert cervical** : l'embryon est déposé dans l'utérus de la receveuse en passant par le col de l'utérus. L'embryon, conditionné dans une paillette, est transféré avec un pistolet spécial. C'est actuellement la technique la plus utilisée sur le terrain. La difficulté technique réside dans le passage du col de l'utérus de la receveuse en le manipulant le moins possible pour éviter la décharge de prostaglandines par l'utérus qui compromettrait la future gestation.
- Le **transfert chirurgical** : l'embryon est injecté directement dans la corne utérine après incision du flanc de la receveuse et extériorisation d'une corne utérine. Des traitements post-opératoires de la receveuse sont nécessaires. Cette technique n'est quasiment plus utilisée dans la pratique compte tenu du matériel, des soins et des traitements pharmacologiques à apporter lors de l'opération et par la suite. Elle pourrait être préconisée lorsque le col de la receveuse est très difficile à passer mais dans ce cas, il est préférable de réformer la jument receveuse.

### ***2.2.3 La réfrigération***

La réfrigération de l'embryon peut être effectuée ce qui permet de le transporter. L'embryon doit être transféré dans la receveuse dans les 24 heures. Cette technique permet de gérer les receveuses sur un autre site que les donneuses. Les résultats de transfert d'embryon frais ne montrent pas de différence avec des embryons réfrigérés lorsque les conditions de manipulation et de conservation sont bien respectées.

### ***2.2.4 La congélation***

L'embryon équin présente plusieurs caractéristiques qui en font un embryon difficile à cryoconserver (conserver par le froid) :

La capsule formée (membrane autour de l'embryon) à son arrivée dans l'utérus empêche les cryoprotecteurs de bien pénétrer dans l'embryon contrairement à des embryons d'autres espèces qui ne présentent pas de capsule

La taille très hétérogène et pouvant aller jusqu'à 700µm à 7 jours est un frein à la cryoconservation en raison des cristaux qui se forment dans la sphère liquidienne de l'embryon lors de la descente en température

Pour s'affranchir de ces contraintes, l'embryon est vidé d'une grande partie de son liquide par micro-aspiration avant de le mettre au contact des cryoprotecteurs (alcool et lipides limitant la cristallisation par la glace). Ensuite il est congelé par vitrification (procédé de congélation ultra rapide par lequel l'embryon est plongé directement dans de l'azote liquide) à -196°C et conservé ainsi jusqu'au transfert.

Cette technique est encore en cours de développement dans les laboratoires de recherche afin de simplifier le processus et le rendre applicable à plus grande échelle sur le terrain. En effet, à ce jour, la technique n'est réalisable que par des manipulateurs expérimentés en micro-manipulation et le matériel reste coûteux.

### ***2.3. Intérêts de la technique***

Mise à la reproduction de juments âgées ou posant des problèmes au cours de la gestation (le taux d'embryons récoltés risque d'être faible).

Conciliation entre une carrière sportive et une carrière de reproduction des juments de haute valeur.

Possibilité de faire naître plusieurs poulains la même année pour une même jument donneuse. Ainsi, l'intervalle de génération diminue ce qui favorise le progrès génétique.

Mise à la reproduction de jeunes juments de 2 ans prometteuses mais qui n'ont pas fini leur croissance pour supporter une gestation. Attention toutes les juments ne sont pas pubères et le taux de récolte est souvent faible.

Le développement de la technique de transfert d'embryon passe par une diminution des contraintes techniques et une augmentation de la productivité.

### ***2.4. Contraintes***

-La synchronisation des receveuses représente un coût très important (entretien et suivi gynécologique d'un troupeau de receveuses).

-Suivi gynécologique très précis de la donneuse

-Équipe d'opérateurs qualifiés et expérimentés

-Coût élevé du matériel de récolte et de transfert : matériel de laboratoire sophistiqué et - fournitures à usage unique et/ou stérilisé

-Équipements adéquats : laboratoire de transfert, barre de contention adaptée

### ***Perspectives***

Deux possibilités sont à l'étude pour réduire certaines contraintes :

- La **congélation** d'embryon qui permet de dissocier la récolte de l'embryon de l'acte de transfert (en temps et en lieu différents). Cette technique faciliterait la gestion de synchronisation nécessaire des receveuses et favoriserait les échanges commerciaux et la préservation de races menacées (cryobanque d'embryons).
- La technique de **super ovulation** afin de récolter plusieurs embryons viables par récolte augmentant la productivité de la collecte.

Ces deux possibilités font l'objet de recherches scientifiques, et ne sont actuellement pas applicables en routine sur le terrain bien que les chercheurs progressent dans le bon sens.

### **2.5. Résultats techniques**

**Taux d'embryon par récolte** : 30 à 60%. Les chances de récolter un embryon à chaque collecte est fortement dépendant de l'âge de la donneuse et du type de semence utilisée. Les meilleurs taux sont observés avec des jeunes juments et la meilleure réussite avec de la semence fraîche par rapport à de la semence congelée.

**Taux de gestation à J14** (diagnostic de gestation à 14 jours) par embryon transféré : 65 à 85%. Ce taux dépend de l'état physiologique et de la conformation de la receveuse (état du col de l'utérus). Il varie aussi avec le niveau d'expérience de l'opérateur.

**Taux de gestation à J45** (diagnostic de gestation à 45 jours) par embryon transféré : 50 à 75 %. Ce taux reflète la capacité de l'utérus de la jument receveuse à réaliser les différentes étapes de la placentation et du développement du fœtus.

Bien que rarissime dans l'espèce équine, une gestation gémellaire à l'issue du transfert d'un embryon n'est pas à écarter. Il est donc conseillé d'envisager cette éventualité lors des premiers diagnostics de gestation, idéalement avant J36.

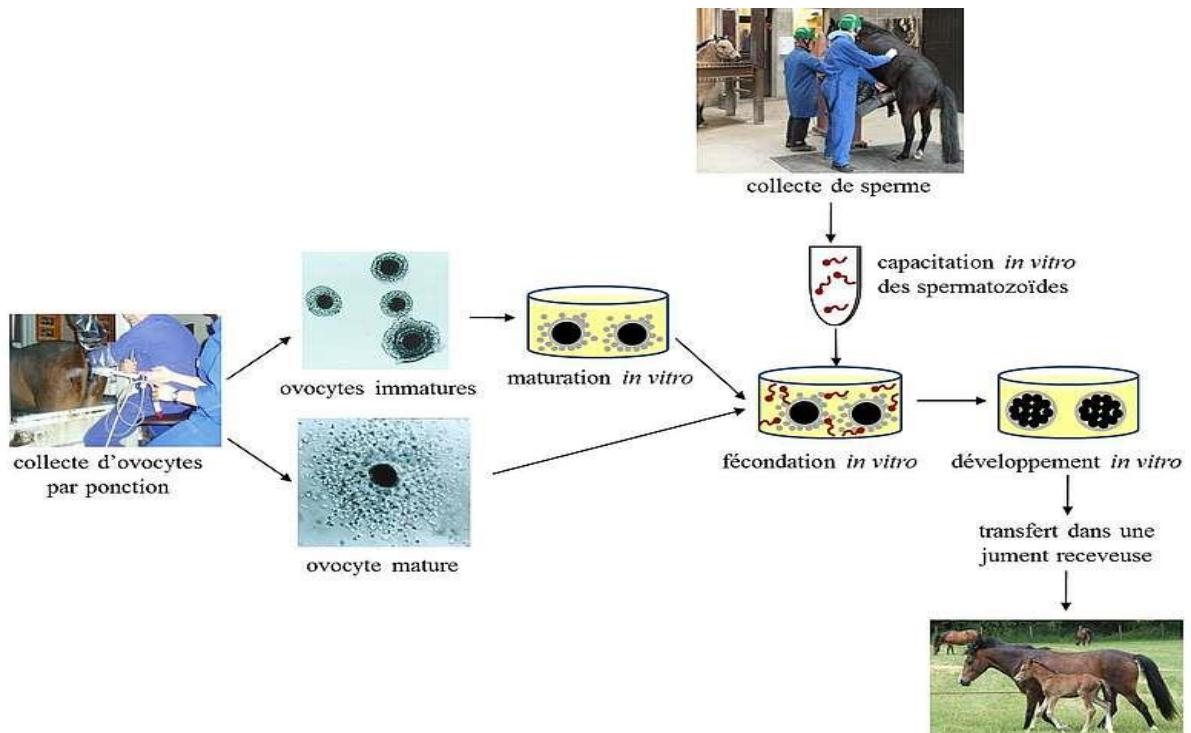
En raison de son coût, cette technique s'adresse à des reproducteurs de haute valeur génétique

### **3. La fécondation in vitro dans l'espèce équine**

La fécondation in vitro (FIV) est la mise en contact de gamètes femelles, les ovocytes, et de gamètes mâles, les spermatozoïdes. Cette mise en contact s'effectue dans un milieu artificiel au laboratoire en dehors de l'oviducte de la jument

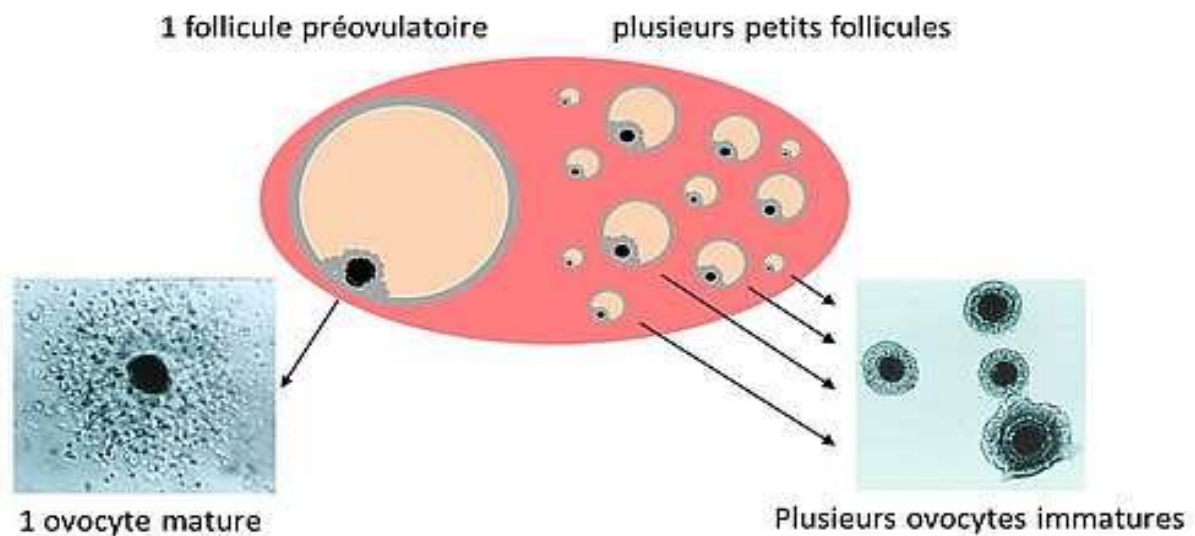
Lors de la fécondation in vitro, les gamètes femelles, les ovocytes et les gamètes mâles, les spermatozoïdes, sont mis en contact dans un milieu favorisant leur interaction (milieu de culture commercial additionné d'hormones, de sérum, de sucres et/ou d'albumine). Puis ce milieu est placé dans un incubateur permettant un environnement adapté à la culture cellulaire : 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air, 38,5°C, 100% d'humidité (figure 1).

Après quelques heures de co-incubation avec les spermatozoïdes, les ovocytes sont fécondés. Les embryons obtenus peuvent être transférés immédiatement dans l'oviducte d'une jument receveuse par chirurgie ou cultivés in vitro dans un milieu adapté au développement des embryons pendant quelques jours (figure 1) puis transférés dans l'utérus d'une jument receveuse. Après transfert, le développement de l'embryon aura lieu dans la jument receveuse qui assurera la gestation et la mise-bas.



**Figure 1** : représentation schématique des étapes de la fécondation in vitro © F. Reigner, G. Duchamp, G. Goudet, ; 2013

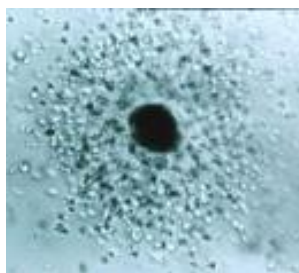
## Maturation



**Figure 2** : représentation schématique d'un ovaire équien contenant un follicule préovulatoire avec un ovocyte mature et plusieurs petits follicules avec un ovocyte immature © G. Goudet, ;2013

Pour être fécondés, les ovocytes doivent être matures. En effet, l'ovaire de juments porte de nombreux petits follicules qui contiennent chacun un ovocyte immature (figure 2).

Au cours du cycle, un follicule va poursuivre sa croissance jusqu'au stade pré ovulatoire puis ovuler. Il contient un ovocyte mature



**Figure 3** : Ovocyte mature © F. Reigner, G. Duchamp, G. Goudet, ;2013

Lors de l'ovulation du follicule préovulatoire, l'ovocyte mature est libéré dans l'oviducte où il pourra être fécondé. Pour réaliser une FIV, il faut donc avoir des ovocytes matures.

Pour cela, deux alternatives sont envisageables :

Les ovocytes matures peuvent être collectés dans des **follicules pré ovulatoires** juste avant l'ovulation, par ponction folliculaire sous contrôle échographique.

Les ovocytes matures peuvent être obtenus après collecte d'ovocytes immatures dans les **petits follicules par ponction folliculaire** sous contrôle échographique puis maturation in vitro.

La maturation in vitro est réalisée par culture des ovocytes immatures dans un milieu artificiel (milieu de culture commercial additionné d'hormones, de sérum et/ou de facteurs de croissance) dans un incubateur permettant un environnement adapté à la culture cellulaire (5% de CO<sub>2</sub> dans l'air, 38,5°C, 100% d'humidité).

### **Capacitation**

Pour féconder un ovocyte, les spermatozoïdes doivent être capités. En effet, lors d'une saillie ou d'une insémination artificielle, les spermatozoïdes remontent le tractus génital femelle (utérus et oviducte) et subissent de nombreuses modifications qui leur permettent d'acquérir leur pouvoir fécondant. Ces modifications sont appelées **capacitation**. Pour réaliser une fécondation in vitro, il faut donc avoir des **spermatozoïdes capités**. Le sperme collecté sur un étalon à l'aide d'un vagin artificiel n'est pas capité, il doit donc subir un traitement de capacitation in vitro. Pour cela, il est mis en contact avec des milieux contenant des agents capitants ou des agents induisant des modifications similaires à la capacitation (héparine, ionophore calcique, ions bicarbonates, albumine, procaine)

## 4. LA PONCTION OVOCYTAIRE (OPU) / Injection Intra Cytoplasmique du Sperm (ICSI) :

La ponction ovocytaire associée à l'ICSI est une révolution en matière de reproduction des individus de haute valeur génétique (grandes compétitrice ayant atteint un âge avancé, mères de performeurs,...). Permettant de réconcilier les juments devenues compliquées avec la semence des étalons dont la semence est rare ou même subfertile.

Les meilleurs résultats sont obtenus en ayant recourt au leader mondial AVANTEA pour la partie ICSI (Leur avance technologique leur assure un taux d'embryon congelé mais surtout de gestation très supérieur aux autres opérateurs plus novices)

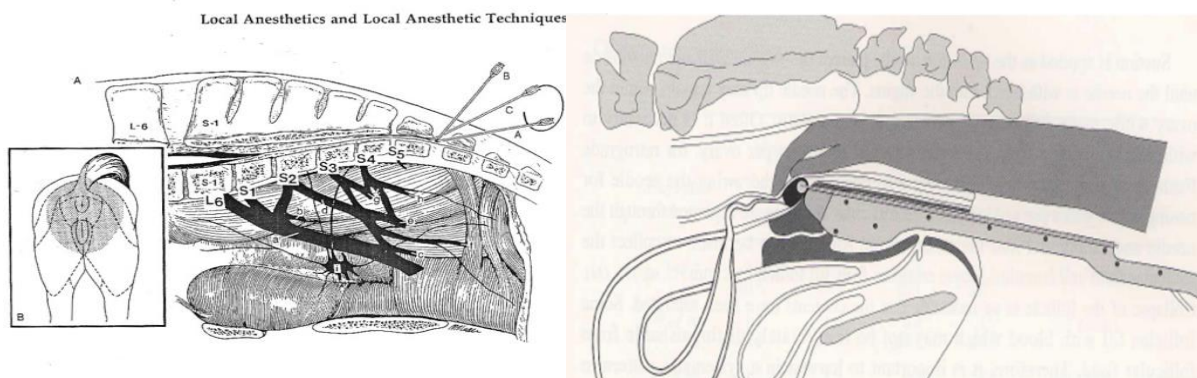
### 4.1. LA PONCTION OVOCYTAIRE

#### 4.1.1. Période :

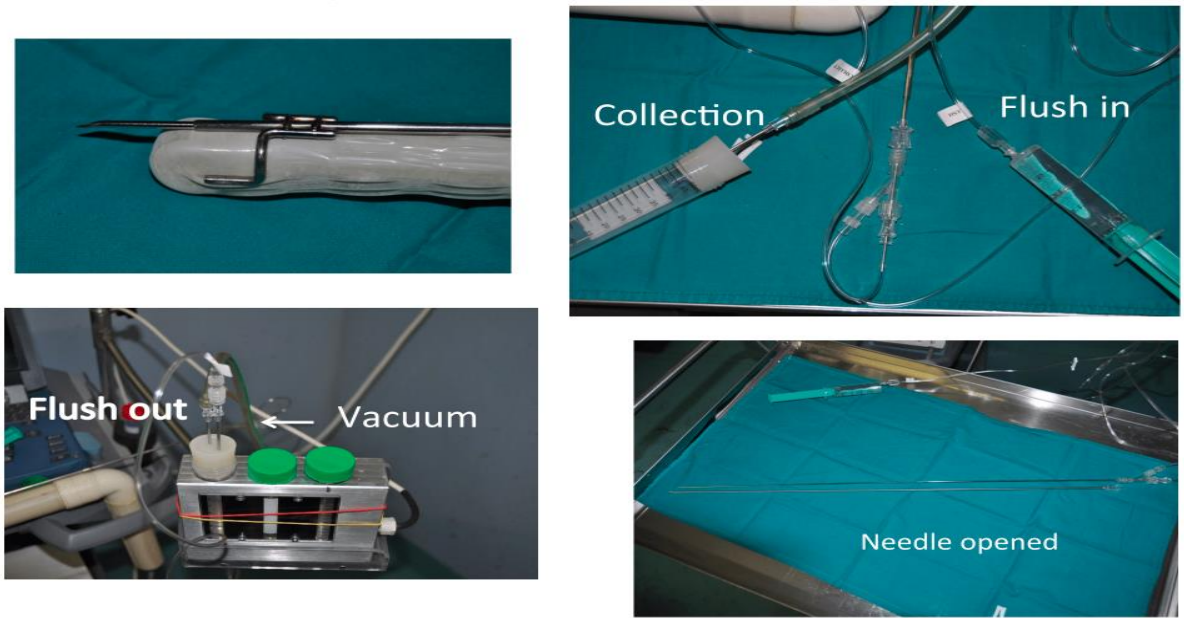
En période de transition ovarienne ou sur juments non cyclées (De septembre à Mars) répétable toutes les 3 semaines en fonction de la croissance folliculaire de la jument

#### 4.1.2. Technique :

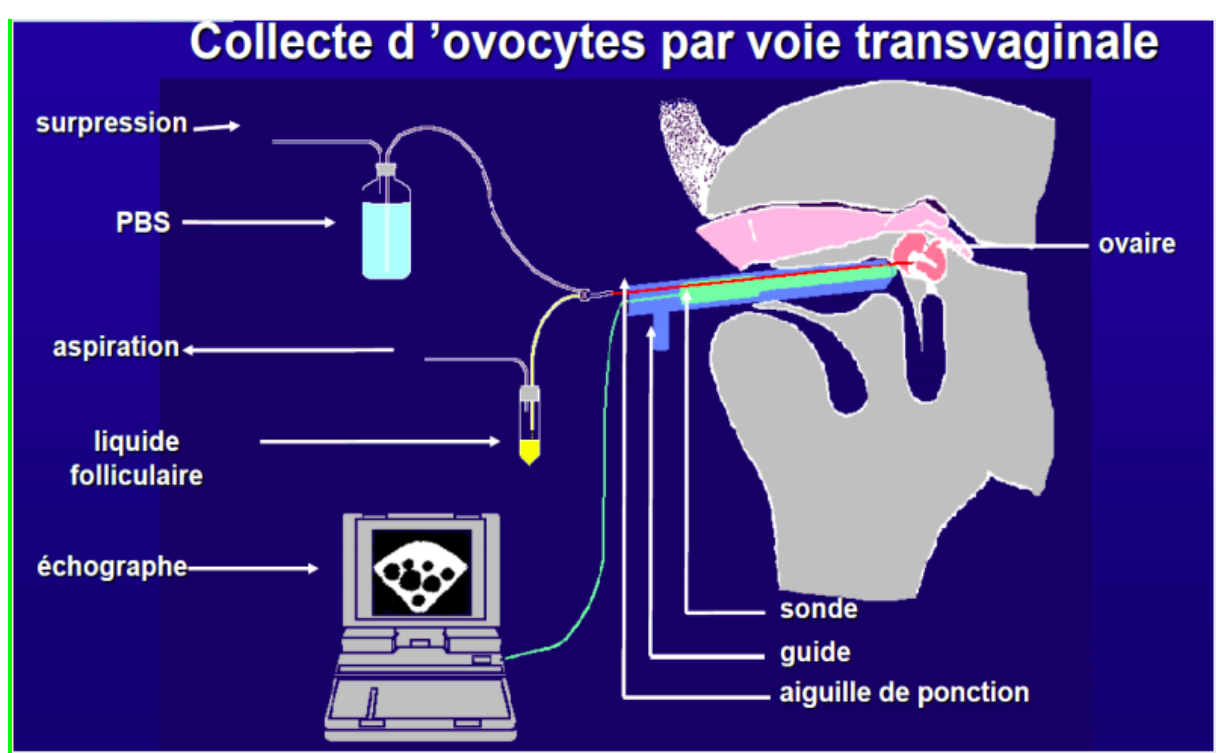
Une aiguille écho-guidée est introduite par voie transvaginale, l'ovaire placé contre la paroi du vagin permet à l'opérateur de ponctionner de manière indolore les follicules présents. La sédation épidurale assure l'immobilité de la jument pendant les 30 minutes nécessaires à la collecte.



**Figure 4** : Anesthésie locale et technique d'échoguidage par voie transvaginale (photo : Denis NECCI , ; 2017)



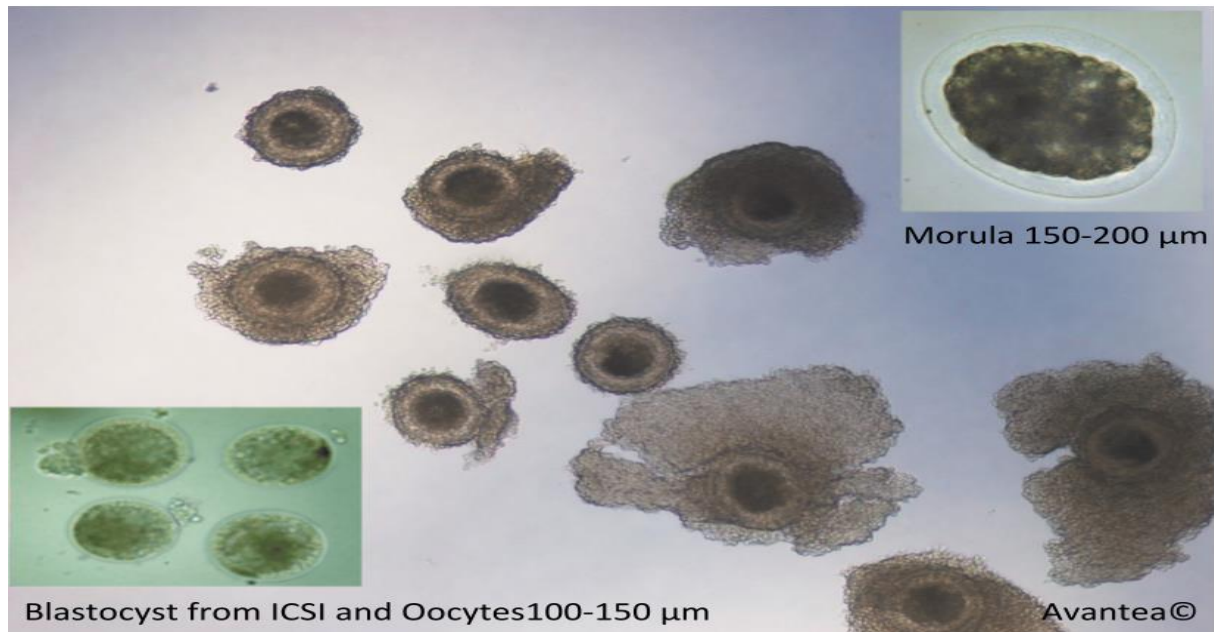
**Figure 5 :** Différents instruments pour réaliser une OPU (photo : Denis NECCI , ; 2017)



**Figure 6 :** collecte d'ovocyte par voie transvaginale (photo : Denis NECCI , ; 2017)

Lors de cette technique, Le fluide folliculaire des follicules de plus de 10mm est aspiré et observé sous loupe binoculaire pour la recherche des ovocytes.





**Figure 8 :** ovocytes, blastulas, morula (Avantea© 2013)

Si la jument est collectée dans une clinique vétérinaire qui est éloignée du laboratoire, les ovocytes sont transportés dans une enceinte maintenant une température de 20-22°C. Après le transport, ils sont mis en maturation dans un milieu de culture en incubateur pendant 26-28h comme précédemment.

Plusieurs études ont montré que l'expédition d'ovocytes a des effets négatifs limités sur la production d'embryons. Cela permet aux juments d'être collectées plus près de chez elles et évite qu'elles soient transportées sur de longues distances vers un laboratoire ICSI.

Après cette étape de maturation, les cellules entourant l'ovocyte sont mécaniquement retirées puis l'ovocyte est observé sous microscope afin de visualiser son stade nucléaire. S'il a atteint le stade métaphase II, il pourra alors être fécondé par ICSI. S'il n'a pas atteint ce stade, il ne pourra pas être utilisé et sera alors perdu.

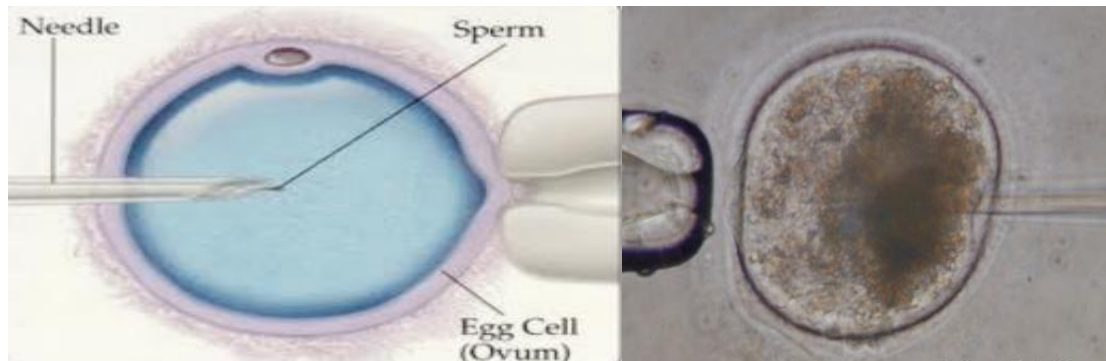
La semence (fraîche ou congelée) doit être préparée selon un protocole précis. Un spermatozoïde sera choisi « au hasard » et injecté dans un ovocyte. Cette étape se fait sous microscope à l'aide de joysticks et manettes de micromanipulation.

#### **4.2. Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)**

L'Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) est une biotechnologie de la reproduction qui consiste à féconder un ovocyte en lui injectant directement un spermatozoïde dans son cytoplasme. L'ovocyte ainsi fécondé est mis en développement dans un milieu de culture

pendant environ 5-6 jours afin qu'il atteigne le stade embryonnaire lui permettant d'être transféré dans un utérus ou bien d'être congelé en vue d'un transfert ultérieur.

Cette technique n'est pas une spécificité de l'espèce équine puisqu'elle est utilisée dans les hôpitaux proposant la procréation médicalement assistée pour les couples ayant des problèmes d'infertilité, et donc de conception, pour lesquels la fécondation in vitro classique ne fonctionne pas. Le 1er bébé issu d'ICSI est né en 1991.



**Figure 9 :** Technique d'ICSI (photo : Denis NECCI, 2017)

Dans l'espèce équine les études scientifiques sur le sujet ont débuté à la fin des années 90. Dans cette espèce, la fécondation in vitro classique ne donne pas de résultats satisfaisants d'où l'intérêt de développer l'ICSI pour les reproducteurs ayant une grande valeur génétique mais étant peu ou pas fertiles.

Il est possible d'avoir recours à l'ICSI dans le cas de juments ayant des problèmes d'ovulation (le follicule se lutéinise sans libérer l'ovocyte) ou de tractus génital (oviducte ou utérus) empêchant la remontée des spermatozoïdes vers l'ovocyte, le transport de l'embryon vers l'utérus ou le développement de l'embryon dans l'utérus. C'est aussi le cas pour des étalons ayant une semence de mauvaise qualité ou des étalons morts pour lesquels le stock de paillettes congelées ne permet pas de fournir un grand nombre de juments.

On pourrait également penser à l'ICSI pour une jument qui meure accidentellement. Ces ovaires pourraient être prélevés post mortem pour être amenés au centre de biotechnologie afin de prélever les ovocytes et les féconder par ICSI.

La technique d'ICSI présente plusieurs difficultés :

1) la microinjection peut créer des dommages sur les ovocytes qui perturbent le développement de l'embryon,

2) cette technique nécessite un matériel spécifique coûteux et un personnel formé et expérimenté,

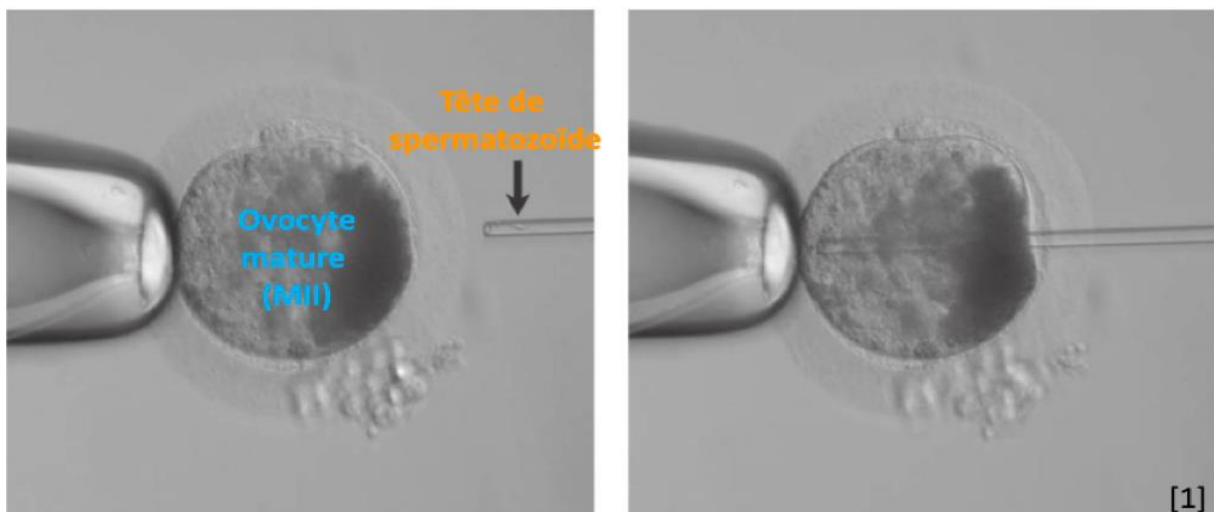
3) la microinjection ne peut être réalisée que sur un ovocyte à la fois, c'est donc une technique chronophage. Toutefois, bien que les rendements obtenus soient faibles et que la technique reste coûteuse pour un éleveur, l'ICSI reste la technique de choix pour produire des embryons équins in vitro si on compare avec la fécondation in vitro classique.



**Figure 10 :** microscope inversé doté de micromanipulateur joystick(photo : Denis NECCI, ; 2017)

***Les différentes étapes de l'ICSI :***

- Aspiration du spermatozoïde
- Introduction de la pipette dans l'ovocyte
- Injection du spermatozoïde
- Retrait de la pipette



**Figure 11 :** Etapes de l'injection du spz dans l'ovocyte (AVENTEA©, ; 2013)

L'ovocyte est ensuite placé dans un milieu de culture, puis incubé à 38,5°C pendant environ 7 jours afin qu'il atteigne le stade blastocyste. Le pourcentage de clivage après injection du spermatozoïde peut atteindre 70% pour les manipulateurs expérimentés.

A ce stade 2 possibilités pour l'embryon : soit il est transféré immédiatement dans l'utérus d'une jument receveuse synchrone (J5-J6 de sa propre ovulation), soit il est congelé pour être transféré ultérieurement quand une receveuse synchrone se présente ou que les conditions d'élevage le permettent (saison de reproduction).

## CHAPITRE II – La semence équine

### 1. Physiologie de la reproduction des mâles

#### 1.1. Puberté

La puberté apparaît vers 2,5 ans. Les étalons effectuent la monte à partir de 3 (poneys et chevaux lourds) ou 4 ans (BADINAND, 1985). La production de spz par les testicules commence entre 13 et 20 mois (NICOLICH, 1989).

#### 1.2. Ejaculation

L'étalon est sensible à des stimulations visuelles, olfactives (odeur de l'urine de jument en chaleur) et tactile entraînant le flehmen ou rictus sardonique : la lèvre supérieure est retroussée et la tête levée (CHEVALIER, 1980).

#### 1.3. Sperme

La spermatogenèse dure 55 jours environ (Nicolich, 1989) ou 35 à 42 jours (CHEVALIER, 1980). L'éjaculat est composé de 6 à 9 jets. L'éjaculation dure 6 à 7 secondes (NICOLICH, 1989).

Il est possible de distinguer :

- le pré-sperme, une sécrétion visqueuse qui coule pendant l'excitation sexuelle, avant le vrai sperme (rôle lubrifiant),
- la fraction riche des premiers jets, un mucus blanchâtre ou incolore, de 30 à 75 ml,
- le post-sperme, un gel trouble et visqueux, de 8 à 85 ml (rôle antimicrobien),
- la fraction post-coïtale, incolore, peu visqueuse et avec peu de gel (NICOLICH, 1989).

#### 1.4. Sex ratio

Etant donné la longueur de l'œstrus et que l'étalon saillit chaque femelle en œstrus de nombreuses fois, il ne peut servir qu'un nombre limité de juments : de 15 à 30 juments (VALON, 1985).

### 2. Collecte du sperme

Certains étalons sont habitués à monter sur un mannequin. En général il faut recourir à une jument en œstrus. L'aire péri-génitale de celle-ci est nettoyée, on lui met un tord-nez et on entrave ses membres postérieurs. Il vaut mieux que l'étalon soit manipulé par une personne qui le connaît, et dans un lieu qu'il connaît, sans stress. L'érection est plus ou moins rapide. L'éjaculation est relativement courte (VALON ET CHAFFAUX, 1983).

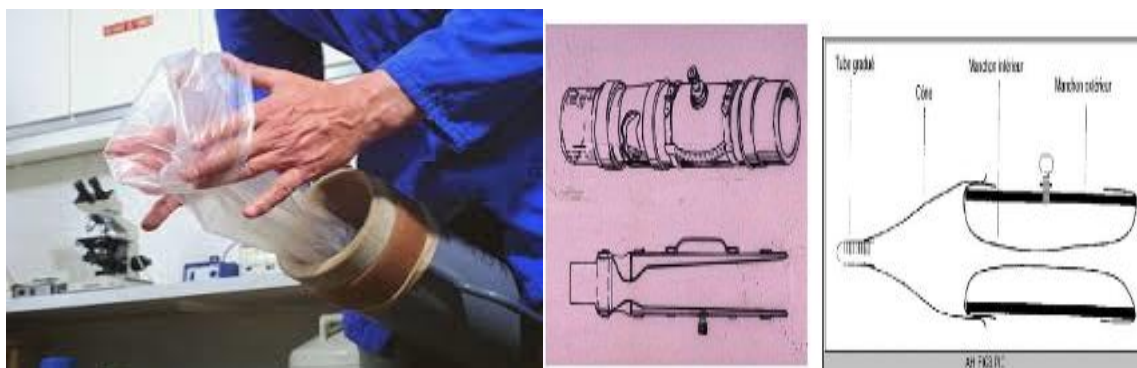
Le temps de réaction (entre le début des stimulations et la monte) est de 3,5 min (211 secondes) pour le 1er éjaculat et de 3,85 min (231 secondes) pour le 2eme, une heure plus tard en moyenne (NICOLICH, 1989)



**Figure 12 :** Mannequin de récolte pour étalons ( Letenre Jessica 29 avril 2016)

Le prélèvement peut être effectué dans le vagin de la femelle (mais pas pour l'insémination artificielle), avec un condom en caoutchouc ou en plastique souple, ou mieux, avec un vagin artificiel. La température de l'eau du vagin artificiel au départ varie de 42°C à 50°C selon le temps estimé que l'étalon prendra pour éjaculer. (VALON ET CHAFFAUX, 1983). La capote est lubrifiée avec de la vaseline et la pression doit être proche de celle exercée par le vagin de la jument (CHEVALIER, 1980). L'opérateur qui prélève est de côté par rapport à l'étalon. Il dévie le pénis au moment du saut et présente le vagin artificiel (CORDE, 1985).

Il faut en moyenne 30 minutes pour obtenir une éjaculation. La température de l'eau du vagin artificiel est comprise entre 42°C et 44°C au moment de la collecte (FAUQUENOT, 1987). La saillie elle-même dure 2 minutes environ. Le sperme doit être mis à l'abri de la lumière.



**Figure 13 :** Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)



**Figure 14 :** Différents types de vagins artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)

### 3. Les caractéristiques du sperme

Des substances gélatineuses sont élaborées par les vésicules séminales. En premier lieu, ce gel est retenu par un filtre.

#### 3.1. Couleur :

Normalement, le sperme est blanc laiteux.

#### 3.2. Volume :

Le volume est important. Il est plus faible pour les étalons de sang (30-50 ml) que pour les races lourdes (120-150 ml) (FAUQUENOT, 1987).

#### 3.3. Concentration et nombre total des cellules :

La concentration du sperme équin varie entre 100 et 200 millions spz par ml. En tenant compte du volume spermatique, elle correspond à un nombre total des spermatozoïdes de 10 milliards en moyenne.

#### 3.4. Motilité :

75 % en moyenne (BESSE, 1993).

**Tableau 1 :** Caractéristiques principales du sperme d'étalon

Volume total (ml)	Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	Nombre total (10 <sup>9</sup> )	Motilité (%)	Référence
70 (30-300)	120 (30-8000)			Kolb, 1975
60-120	50-350		60	Corde, 1985
60-100	150-300	5-15	40-75	Hafez, 1987
30-50 ou 120-150	100-200		60-80	Fauquenot, 1987
	200 (50-400)	10 (3-20)	75	Besse, 1993
52,5 ± 34,1	176 ± 125	7,8 ± 5,7	59±14	Langlois1977.

Ces caractéristiques varient avec la race (Tableau 2), l'âge de l'étalon (Tableau 3), la saison , de la fréquence d'éjaculation, etc.

**Tableau 2 :** Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)

Races	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. ( $10^6/ml$ )	Nbre de spz ( $10^6$ )	Spz morts (%)
P.S.A.	73	36,2	1,0	37,2	286,8	12 661	10,1
Quarterhorse	30	23,8	4,0	27,8	171,7	5 372	23,8
Pur Sang	141	28,3	2,7	31,0	114,3	5 027	21,6
Arabe 1/2 sang	73	33,2	5,5	38,7	116,1	4 854	17,1
A.Q.P.S.	111	30,2	3,1	33,3	97,2	4 738	15,4
Palomino	44	23,8	1,1	24,9	138,5	4 016	21,3
Appaloosa	18	23,3	2,0	25,3	90,4	3 331	15,8
Shetland	8	44,4	13,1	57,5	101,3	1 720	38,5
Poney	38	20,8	2,5	23,3	114,0	1 122	24,7
Moyenne		29,3	3,9	33,2	136,7	4 760	20,9

**Tableau 3 :** Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)

Age	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. ( $10^6/ml$ )	Nbre de spz ( $10^6$ )	Spz morts (%)
1-2 ans	28	15,6	0,4	16	43,4	481	30,8
3-13 ans	427	30,2	4	34,2	147,8	5 053	18,8
>13 ans	81	33,7	1,4	35,1	83,2	3 252	22,8

#### 4. Conservation du sperme

Le sperme peut être utilisé frais, réfrigéré progressivement à 12-14°C (dans les 24 à 96 heures) ou plus souvent 4°C (0-5°C, jusqu'à 8 jours) ou congelé dans l'azote liquide. Le sperme dilué peut être conservé au réfrigérateur réglé à 7 °C (DUSSAUGE, 1963 ; MAGISTINI, 1990).

Pour **le sperme frais**, les doses de 20 ml comprennent 400 millions de spz. Avec des doses de 400 millions de spz, et un rythme de 3 récoltes par semaine, au moins 20 doses de semence peuvent être produites par éjaculat (FAUQUENOT, 1987).

Pour le **sperme réfrigéré**, immédiatement après la récolte, le sperme est dilué dans un bain-marie maintenu à 35-37°C (MAGISTINI, 1990). La reproduction du cheval a été étudiée dans les années 1950 par Nishikawa au Japon qui a mis au point les premiers dilueurs pour la semence d'étalon (NISHIKAWA, 1975).

Les dilueurs ont un pH proche de celui du plasma séminal, apportent des éléments nutritifs et contiennent des substances tampon, des antibiotiques et des cryoprotecteurs, ces derniers protégeant les spz des effets de la congélation et de la décongélation

La vitesse du refroidissement doit être contrôlée et adaptée à la température de conservation. Pour la conservation à +4°C, une descente initiale de - 0,3°C par min est idéale soit 10 heures pour passer de +37°C à +4°C. Palmer (1984) utilise du lait écrémé ajouté d'antibiotiques comme dilueur. L'insémination doit être faite dès les 10 heures qui suivent la collecte (MAGISTINI, 1990)

## **5. Evaluation de la semence équine.**

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

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

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

### **5.1. Les examens de première intention :**

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

#### **5.1.1. Le spermogramme**

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

### **5.1.1.1. L'examen microscopique de la mobilité**

C'est un examen réalisé sur une platine chauffante (37°C) pour éviter le ralentissement des spermatozoïdes causé par leur refroidissement. Cette analyse doit être effectuée rapidement après le prélèvement. Il existe deux niveaux d'observation microscopique de la mobilité spermatique, à savoir la mobilité massale et la mobilité individuelle.

L'examen de la mobilité massale est l'observation des mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes sur une goutte de sperme mise sur une lame au grossissement 40. La notation se fait sur une grille de 0 à 5.

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

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

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

### **5.1.1.2. La numération**

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

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

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

$$\text{Equation 2: } N = (\text{moy} R1-5) \times V \times 100 \times 250 \times 1000$$

Légende : (N: nombre spz /éjaculat - n : somme R1-5 V : volume de fraction spermatique (ml) d : dilution)

### **3.1.2. Le spermocytogramme :**

Il s'agit de l'appréciation de la morphologie des spermatozoïdes. La lecture s'effectue sur un frottis coloré. Plusieurs anomalies sont rencontrées et classées en anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire (persistance gouttelette cytoplasmique) et du flagelle. La lecture de cent

spermatozoïdes est effectuée au grossissement 40 pour obtenir le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux dans la semence.

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

## **5.2. Les examens de seconde intention :**

### **5.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis) :**

L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres, obtenu grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde. Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement.

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

- **La motilité totale (TMOT) :** Ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.
- **Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) :** Ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP  $> 50 \mu\text{m}/\text{seconde}$  et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.
- **Le pourcentage des spermatozoïdes statiques :** Il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- **les mouvements rapides, moyens et lents** des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).
- **les différentes vitesses de progression :**  
La "VCL" (Velocity Curvilinear): Cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

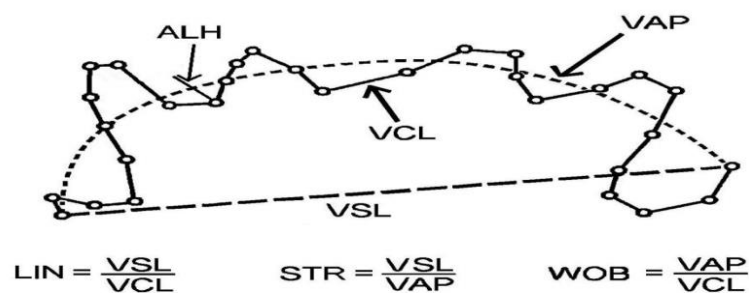
La "VSL" (Velocity Straight line) : Cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet.

La “**VAP**” (Velocity Average Pathway) : Cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.

L’**ALH** (Amplitude of Lateral Head Displacement) : Ce paramètre correspond à la distance, en  $\mu\text{m}$ , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.

Le **BCF** (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps).

Il s’agit d’une méthode d’analyse rapide qui permet d’analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage coûteux réservé pour les centres spécialisés



**Figure 15** : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde

## 5.2.2. La cytométrie en flux (CMF)

### 5.2.2.1. Définition

La cytométrie mesure les propriétés optiques d’une cellule, transportée par un liquide vecteur caractérisé par le flux, jusqu’à une source d’excitation lumineuse étant la plupart du temps un laser (DIAZ, 2014). En effet, elle effectue une analyse multiparamétrique, de cellules individualisées, à la vitesse de milliers d’évènements à la seconde. L’ordinateur associé calcule des statistiques sur la distribution des paramètres mesurés et les représentent sous forme d’histogramme ou cytogramme. Enfin, l’ultime fonction du Cytomètre est de séparer les sous-populations cellulaires en fonction de leurs propriétés optiques et permettre ainsi un tri cellulaire. (CAMBOURNAC, 2012)

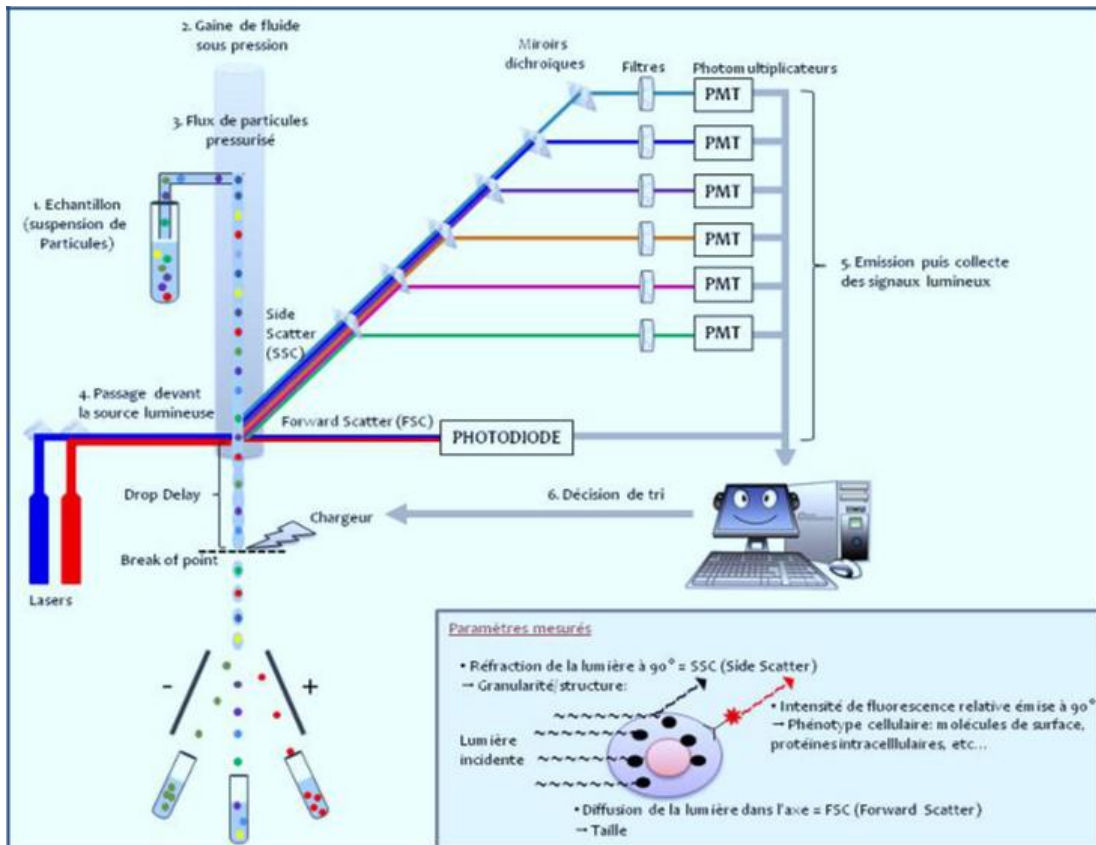


Figure 16 : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux (Tourrel-Cuzin, 2012)

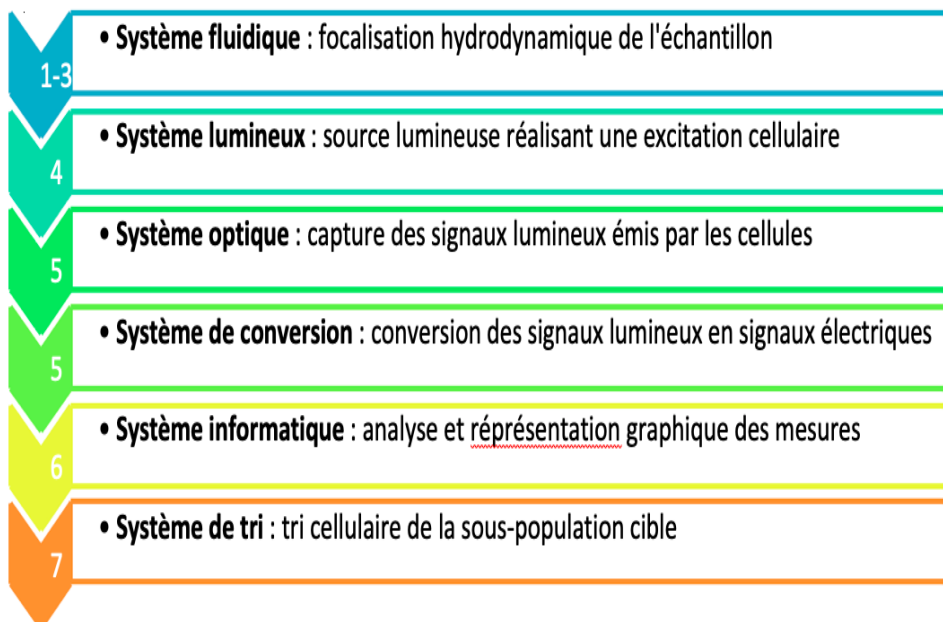


Figure 17 : Les différents systèmes intervenant dans le cytomètre en flux

### 5.2.2.2. Le système optique (Capture des signaux lumineux)

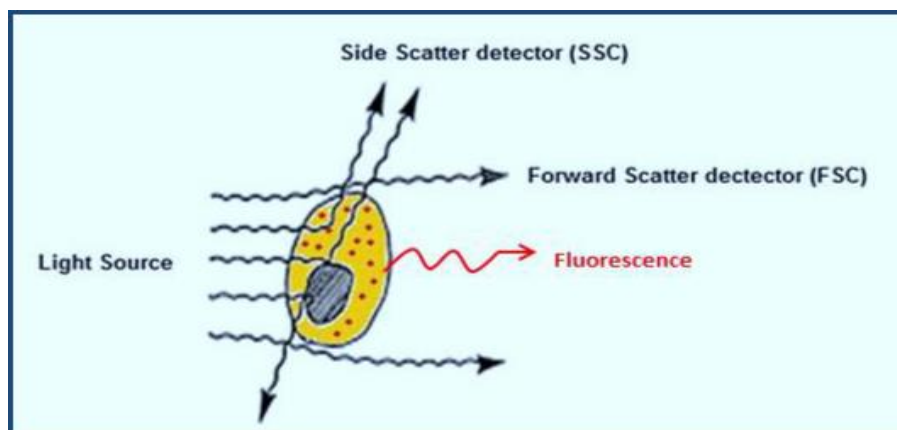
Le système optique intervient lors du passage des cellules au niveau de la source lumineuse. Ces dernières émettent en réponse à cette excitation différents signaux lumineux qui sont collectés et dirigés vers les photo-détecteurs à l'aide d'un banc optique.

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

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

La fluorescence émise à 90° dépend du phénotype cellulaire :

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



**Figure 18** : Interaction de la lumière avec la cellule (Aberdeen, 2010)

### 5.2.2.3. Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux

Les dernières années furent riches en progrès technique pour la détermination de la fertilité de la semence. Les analyses classiques de la semence par l'étude macroscopique, et microscopique de la mobilité et de la morphologie ont comme inconvénient d'être subjectives.

Aujourd'hui le gold-standard dans les laboratoires est une analyse de la mobilité grâce à l'analyseur d'images CASA, associée à des tests de fluorescence évaluant l'intégrité fonctionnelle de la semence (NIZANSKI ET AL., 2012). Ces dernières sont réalisées soit à la microscopie à fluorescence, soit au cytomètre en flux. Or la cytométrie en flux possède de nombreux avantages face à la microscopie à fluorescence :

- **Rapidité** : une analyse de plus de 10 000 cellules en 1 minute.

- **Répétabilité** : analyse objective et standardisée.
- **Sensibilité de détection** : mise en lumière de différences subtiles au sein de la semence, notamment lors de traitement *in-vitro* différents (PEÑA ET AL., 1999).
- **Analyse multiparamétrique, quantitative, de paramètres qualitatifs** : permet de mieux cibler le pouvoir fécondant de la semence (PETRUNKINA ET AL., 2007 ; PETRUNKINA AND HARRISON, 2011).
- **Analyse quantitative par dénombrement** : mise à disposition de nombreuses données pouvant permettre une étude statistique entre les variables étudiées et la fertilité de la semence (SELLEM ET AL., 2015 ; SILVA AND GADELLA, 2006).
- **Tri cellulaire de la population cible.**

Les principaux inconvénients de cette technique sont le coût du cytomètre en flux et des colorants fluorescents. Même si la cytométrie en flux est très utilisée dans les laboratoires d'andrologie humaine, cet investissement est encore très peu réalisé en médecine vétérinaire. Les autres inconvénients sont les réglages du Cytomètre qui doivent être réalisés minutieusement, et les risques dus aux matériels utilisés. On peut citer les risques chimiques et biologiques dus à l'origine même des échantillons. Il y a également un risque optique avec l'utilisation du laser et un risque électrique par l'utilisation de haute tension associée à une partie fluidique.

#### **5.2.2.4. Application de la cytométrie en flux en reproduction équine**

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

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

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

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

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

- Les spermatozoïdes verts : membrane plasmique intègre, spermatozoïde vivant.
- Les spermatozoïdes rouges : membrane plasmique lésée, spermatozoïde mort.

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

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

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

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

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

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

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

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

Il existe plusieurs sous-types de fluorochrome SYTO, certains vont émettre une fluorescence verte au contact de l'ADN (SYTO 9 à 25), certains une fluorescence orange (SYTO 80 à 86), d'autres une fluorescence rouge (SYTO 61 à 64), ou encore une fluorescence bleue (SYTO 40 à 45).

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

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

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

En plus du pourcentage de cellules présentant un acrosome intact, leur capacité à effectuer la réaction acrosomique après induction est également considérée comme un paramètre fonctionnel important. L'inducteur de la réaction acrosomique utilisé est l'ionophore  $\text{Ca}^{2+}$  (A23-187) qui provoque l'influx entrant de calcium dans les cellules. Selon la majorité des études réalisées chez les équidés lors de l'application d'ionophore calcique, l'induction de la réaction acrosomique a lieu en 5 minutes. Cet influx calcique entrant est mesurable par le cytomètre en flux grâce au fluorochrome fluo3-AM. Il dépend des facteurs d'incubation comme la présence ou non du plasma séminal et des conditions en aérobie ou anaérobie. L'induction de la réaction acrosomique grâce à l'ionophore  $\text{Ca}^{2+}$  est aussi mesurable à la cytométrie en flux grâce aux fluorochromes PNA/FITC/SYTO/IP décrits dans la partie précédente (MAGISTRINI ET AL., 1997; SZASZ ET AL., 2000).

## **Chapitre III-La cryoconservation de la semence équine**

Le succès de la congélation de la semence bovine a impulsé de nombreuses recherches pour développer ces techniques dans les autres espèces de mammifères domestiques, en particulier dans l'espèce équine.

Initialement, les techniques mises au point dans l'espèce bovine ont été extrapolées à l'espèce équine, et ont montré des résultats décevants. La persévérance des chercheurs a permis d'adapter ces techniques aux particularités de la semence équine, améliorant ainsi les résultats de fertilité par cycle.

### **1.Définition**

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

### **2.Objectifs de la cryoconservation**

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'année sans l'altérer. Elle permet donc de conserver le matériel génétique d'espèces de bonne qualité ou en danger.

### **3.Le diluant de cryoconservation**

#### **3.1. Définition**

Le diluant est un milieu spécifique est employé pour diluer la semence et qui protège Les spermatozoïdes contre les effets délétères de la congélation.

#### **3.2. Physique de la congélation et dommages subis par les cellules**

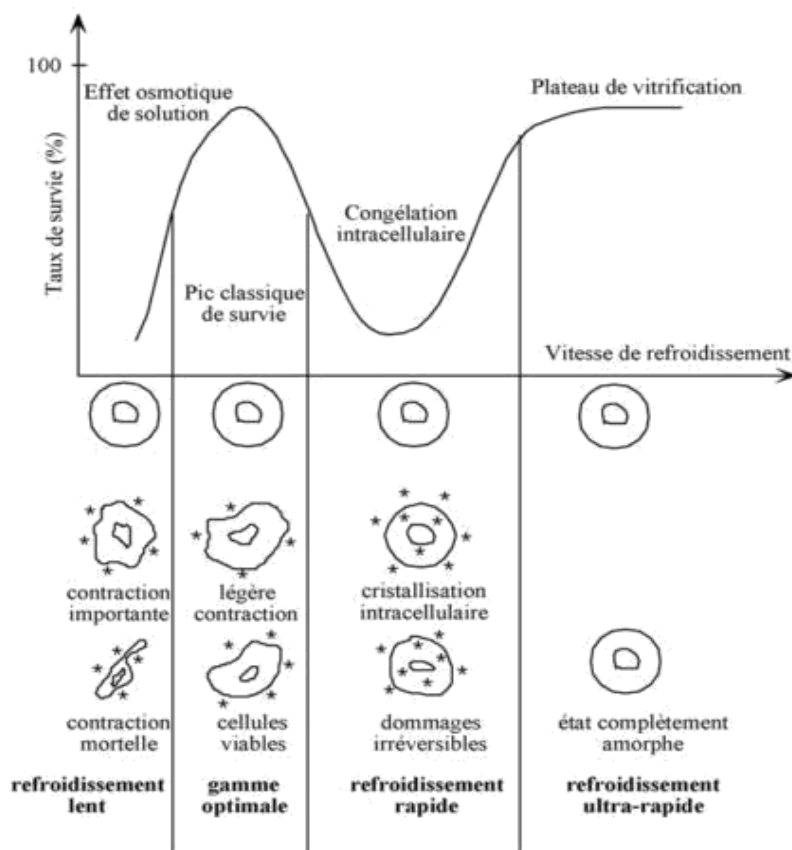
La cryoconservation des cellules consiste à utiliser des températures extrêmement basses pour préserver leur structure intacte et viable (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F,2014). Lors de la réfrigération, le métabolisme cellulaire est réduit, ce qui augmente la durée de conservation des spermatozoïdes (BARBAS J.P., MASCARENHAS R.D.:2008). Lors de la cryoconservation, l'activité cellulaire est interrompue (et rétablie après remise à température corporelle de la semence) (Diaz J.: NANTES: 2013), ce qui équivaut presque à interrompre le « cours du temps biologique » pour la cellule.

Il existe actuellement deux méthodes pour la cryoconservation des spermatozoïdes : la congélation et la vitrification. La première technique consiste à congeler de façon lente, tandis que dans la seconde, les taux de refroidissement sont très élevés.

Chacune de ces techniques nécessite l'emploi d'agents cryoprotecteurs, à des concentrations particulièrement élevées lors de la vitrification ce qui pose des problèmes de toxicité aux spermatozoïdes.

Enfin, lors du processus de cryoconservation des gamètes mâles, ces derniers sont exposés à plusieurs mécanismes aux effets délétères considérables s'ils ne sont pas maîtrisés :

- A. **Le cold-shock**, phénomène commun à la réfrigération et à la congélation de la semence, qui est détaillé plus haut
- B. **La cristallisation intracellulaire**, qui engendre des lésions mécaniques des structures intracellulaires telles que les organelles



**Figure 19** : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (COURBIERE & AL 2009)

Un refroidissement lent entraîne la formation de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire. Les cristaux de glace étant exclusivement composés d'eau pure, la concentration du milieu extracellulaire augmente ce qui entraîne une sortie de l'eau intracellulaire et donc une déshydratation cellulaire par effet d'osmose. Cette déshydratation s'accompagne d'une déformation cellulaire, à l'origine de contraintes mécaniques substantielles sur la membrane plasmique. Lorsque ce phénomène est trop marqué, ces contraintes mécaniques peuvent causer la mort des cellules.

Un refroidissement rapide empêche la déshydratation cellulaire par effet osmotique, car l'eau n'a pas le temps de quitter les cellules pour rétablir l'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique. Cela conduirait à la cristallisation intracellulaire. Il semble cependant qu'il n'y ait pas de preuve de formation de glace intracellulaire, et que les effets délétères du refroidissement rapide soient plutôt le fait d'un déséquilibre osmotique au moment de la congélation.

Il existe une vitesse de congélation optimale (ou plutôt la moins néfaste possible) pour chaque type cellulaire, associée à un taux de survie cellulaire maximum, qui est un compromis entre une vitesse suffisamment lente pour permettre à l'eau de sortir de la cellule et ainsi prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaire et une vitesse trop lente responsable de déshydratation cellulaire, qui engendre une compaction et une déformation du spermatozoïde. La vitesse de congélation optimale de la semence équine, en présence d'agent cryoprotecteur, est de  $-60^{\circ}\text{C}$  par minute.

Enfin l'intervalle de températures comprises, selon les sources, entre 0 et  $-80^{\circ}\text{C}$  ou entre  $-55$  et  $-70^{\circ}\text{C}$  est très délicat à traverser, tant au moment de la congélation que de la décongélation des spermatozoïdes. Le traverser rapidement permet de limiter les dommages cellulaires.

## **4. La technique de congélation de la semence équine**

### **4.1. Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle congelées (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014)**

Une dose d'IAC doit contenir au minimum 400 millions de spermatozoïdes totaux. Une dose est classiquement composée de 8 paillettes de 0,5 mL chacune, et la concentration en spermatozoïdes est de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre.

Pour exploiter un étalon en IAC, ses éjaculats doivent présenter un pourcentage de spermatozoïdes mobiles après décongélation supérieur à 35%. Vidament a proposé en 2005

un système pour harmoniser les doses d'insémination congelées commercialisées en France, selon les normes des Haras Nationaux. Ce système, présenté dans le tableau suivant, permettrait de mieux garantir la qualité des doses commercialisées.

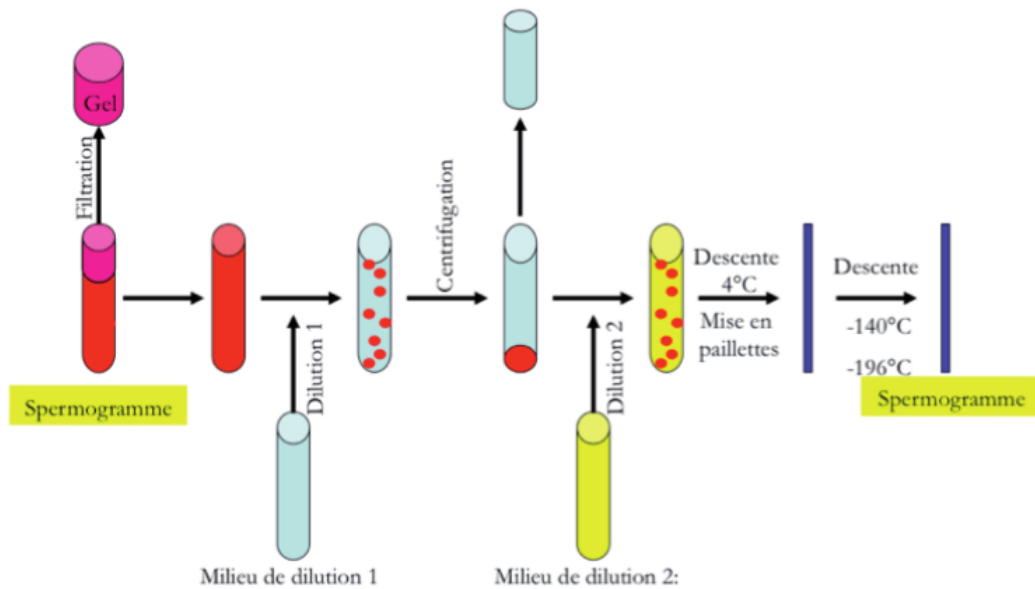
**Tableau 5:** Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par Vidament (2005) (PONTHIER J., & AL 2014)

CRITERE	INDICE	DEFINITION
Nombre de spermatozoïdes pour la saison	A***	> $3 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 3 cycles
	A**	> $2 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 2 cycles
	A*	> $1 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 1 cycle
	B	Autres offres ou non spécifié
% de mobilité rapide en décongélation	A	> 35%
	B	< 35% ou non spécifié
% de glycérol dans la paillette	A	< 4%
	B	> 4% ou non spécifié

Un indice, représenté par une lettre, est attribué à chacun des trois critères : l'indice A\*\*\*AA représente la qualité idéale, alors que l'indice BBB est la moins bonne.

#### 4.2. Les étapes de la congélation de la semence équine.

Dans le monde, il existe actuellement quatre techniques principales de congélation de la semence équine. Elles comportent globalement les mêmes étapes, dont l'enchaînement peut légèrement varier (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014). La technique utilisée en France est une adaptation de celle mise au point par Palmer décrite en 1984, et résumée dans le schéma ci-dessous.



**Figure 20 :** Le processus de congélation de la semence équine  
(PONTHER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)

Cette technique comprend la dilution de la semence, en deux étapes successives avec deux dilueurs de composition différente (le second contenant du glycérol) séparées par une centrifugation, un premier refroidissement suivi du conditionnement en paillettes puis la congélation.

#### 4.2.1. La première dilution

Immédiatement après la récolte, l'éjaculat est filtré sur gaze, et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

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

Pour un éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de  $\frac{1}{4}$  de sperme pour  $\frac{3}{4}$  de dilueur, sans jamais dépasser les 2,5 milliards de spermatozoïdes par pot.

#### 4.2.2. La première descente en température (de + 37°C à + 22°C)

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



**Figure21:**mettre la semence dans un bain-marie a 22°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)

#### 4.2.3. L'élimination du plasma séminal

Cette étape permet la concentration du sperme et la réduction des effets néfastes du plasma séminal. En effet des études ont permis de montrer les effets délétères de l'exposition prolongée des spermatozoïdes au plasma séminal : la mobilité des spermatozoïdes post-congélation est meilleure lorsque l'échantillon est incubé, avant congélation, avec 5% de plasma séminal, en comparaison aux échantillons en contenant 20%. Le contact prolongé avec le plasma séminal réduit donc le pouvoir fécondant des spermatozoïdes après décongélation, car l'environnement auxquels ils sont soumis est inapproprié, d'où l'intérêt de l'étape d'élimination du plasma séminal dans les protocoles de congélation de la semence équine.

Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour éliminer le plasma séminal :

- Par récolte à vagin ouvert, pour ne collecter que la fraction de l'éjaculat riche en spermatozoïdes
- Par centrifugation de l'éjaculat

L'option retenue en France est la centrifugation de l'éjaculat à température ambiante, pour éliminer totalement le plasma séminal. La semence est centrifugée pendant 10 minutes à 600 x g, puis le surnageant (composé de dilueur D1 et de plasma séminal) est enlevé par aspiration.

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

#### **4.2.4. La seconde dilution**

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

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

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

#### **4.2.5. La seconde descente en température (de + 22°C à + 4°C) suivie du conditionnement en paillettes.**

Les tubes de semence diluée sont bouchés puis placés à + 4°C pendant 1 heure 20 minutes. L'équilibration consiste à laisser incuber la semence avec le diluant de congélation avant d'effectuer la congélation des doses. Cette étape permet de stabiliser l'équilibre osmotique entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, donc permet la pénétration du glycérol à l'intérieur des spermatozoïdes.

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

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

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

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



**Figure 22** : Phase d'équilibration de la semence à 4°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)

#### **4.2.6. La congélation des paillettes (de + 4°C à -196°C)**

Deux dispositifs permettent la congélation des paillettes :

2. Soit en adaptant la hauteur des paillettes au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient contenant de l'azote liquide.

Placer les paillettes pendant 10 minutes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide. Les plonger ensuite dans le gobelet d'azote, et placer le gobelet dans la cuve de stockage remplie d'azote. Chaque gobelet contient un éjaculat.

3. Soit en utilisant un congélateur programmable, réglé avec une vitesse de refroidissement de -60°C par minute entre +4 et -140 °C.

Le contrôle de qualité consiste ensuite à observer au microscope 3 paillettes de chaque éjaculat, pour évaluer la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.

#### **4.2.7. La décongélation des paillettes**

L'étape de décongélation de la semence est une phase importante dans la préservation de la survie des spermatozoïdes (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014)

. La vitesse de décongélation dépend de la vitesse de congélation des paillettes.

Les 8 paillettes sont sorties de la cuve d'azote liquide à la pince, et rapidement plongées dans un bain-marie à +35°C pendant 30 secondes.

Les 8 paillettes sont sorties du bain-marie en deux séries successives de 4, essuyées et vidées dans un tube. Après agitation, la dose est aspirée dans un cathéter d'insémination artificielle et utilisée dans les 3 minutes. Un contrôle de la qualité est effectué au microscope sur une goutte de la dose.

## 5. Rôle et caractéristique du dilueur

Isotonicité : pour ne pas perturber les conditions osmotiques des spermatozoïdes. PH et

Pouvoir tampon : pH optimal se situe au niveau de la neutralité, et aussi a un pouvoir tampon pour éviter l'acidité causée par l'activité métabolique des spermatozoïdes.

Pouvoir nutritif : il contient des substances nutritives pour maintenir la survie des spermatozoïdes.

Pouvoir antioxydants : contre les radicaux libres.

Action stabilisante : comme le j'aune d'œuf protège les spermatozoïdes.

Action protectrice : contre les cristaux formés lors de la congélation.

Action antibactérienne : contient des antibiotiques.

### 5.1. Les principaux diluants employés dans l'espèce équine

Les principaux milieux de dilution de la semence utilisés dans l'espèce équine sont présentés ici. Il s'agit soit de préparations commerciales, soit de milieux à préparer. Le choix du milieu employé dépend de la durée de conservation souhaitée de la semence, du coût et de considérations pratiques (aboutissant au choix de fabriquer le milieu de dilution ou d'en acheter un prêt à l'emploi).

### 5.2. Les diluants de réfrigération

Les principaux diluants de réfrigération employés dans l'espèce équine sont le lait demi-écrémé additionné d'antibiotiques, l'INRA 96 ® et le KENNEY ®.

**Tableau 5** : Composition du diluant à base de lait ½ écrémé (BARRIER-BATTUT I.& AL 2014)

Composants	Quantité
Lait UHT ½ écrémé	1 L
Gentamycine	50 mg
Amoxicilline	100 mg

**Tableau 6 :** Composition du diluant de KENNEY ® pour 1 L (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014)

Composants	Quantité
Lait écrémé en poudre	6,1 g
Soluté isotonique de glucose 5%	250 mL
Volume total, une fois la poudre de lait dissoute	255 mL

Le diluant KENNEY ® n'est pas commercialisé : il faut compter 5 à 10 minutes pour le préparer. Il peut être additionné d'antibiotiques.

**Tableau 7 :** Composition chimique du diluant INRA 82 - Hépès ® (PILLET E, 2009)

Composants	Quantité (g/L)
Glucose	25
Lactose	1,5
Raffinose	1,5
Citrate de sodium	0,25
Citrate de potassium	0,4
Hépès (tampon) [Uniquement en cas de fabrication de diluant de congélation]	4,76
Eau distillée	Qsp 0,5L
Lait UHT écrémé	0,5L

Le diluant INRA 82 ® n'est pas commercialisé : il faut compter 30 à 40 minutes pour le préparer.

Lors de son utilisation pour la semence réfrigérée, il est additionné d'antibiotiques.

**Tableau 8** : Composition chimique du dilueur INRA 96 ® (PILLET E, 2009)

Composants	Quantité (g/L)
Glucose	13,21
Lactose	45,39
Hépès	4,76
Eau déminéralisée	Qsp 1L
PPCN	27
Dichlorure de calcium	0,14
Chlorure de potassium	0,4
Phosphate de potassium	0,06
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de sodium	1,25
Phosphate disodique	0,118
Bicarbonate de sodium	0,35
Citrate disodique	1,12

Ce dilueur est commercialisé prêt à l'emploi, et contient déjà des antibiotiques et un antifongique. Sa composition est chimiquement définie, et il contient une concentration en micelles de caséines deux fois supérieure à celle du milieu INRA 82 ®. De plus ces caséines sont présentes sous leur forme native dans le milieu INRA 96 ®, représentée par une fraction purifiée de caséines : la phosphocaséine native.

### 5.3. Les diluants de congélation

(AURICH C. :2008) (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014) (PILLET E. & AL 2008)

Les principaux diluants de congélation employés dans l'espèce équine sont l'INRA 82-Hépès Additionné de jaune d'œuf, de glycérol et d'antibiotiques, l'INRA 96 ® également additionné de jaune d'œuf et de glycérol, le milieu lactose-EDTA, le KENNEY® modifié, le BOTUCRIO ® et le milieu INRA-Freeze ®.

La fabrication du diluant de congélation à partir du milieu INRA 82 – Hépès ® dure une heure et demi. 2% de jaune d'œuf centrifugé et 2,5% de glycérol sont ajoutés au milieu de base. La même fabrication est réalisable à partir du milieu INRA 96 ®.

Le Botucrio ® et l'INRA-Freeze ® sont commercialisés prêts à l'emploi.

Une étude publiée en 2007 compare les résultats de fertilité obtenus avec de la semence équine congelée avec le milieu INRA 96 ® et le milieu INRA 82 ®, tous les deux additionnés

de 2% de jaune d'œuf et de 2,5% de glycérol. Deux expérimentations ont été effectuées successivement :

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

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

## **6.La technique de la double congélation (La recongélation)**

Le processus de congélation et décongélation a des effets négatifs graves sur les spermatozoïdes, dont beaucoup résultent de dommages sublétaux des cellules et réduction subséquente de la fertilité (RICKER ET AL., 2006).

La membrane plasmique est la première barrière qui protège le spermatozoïde du milieu ambiant et, en même temps, c'est le premier site de dégâts dus à la congélation - décongélation.

Le stress osmotique est une raison pour les dommages causés par la congélation - décongélation.

Le résultat du stress osmotique est un déséquilibre des flux d'ions et du potentiel membranaire. Cela peut entraîner une motilité réduite et augmenter la perméabilité de la membrane plasmique (RICKER ET AL., 2006).

Pendant la congélation, les cellules se déshydratent et rétrécissent. À cet égard, le taux de congélation est une étape importante pour la déshydratation progressive des spermatozoïdes et maintenir l'intégrité et la fonctionnalité cellulaires (PARKS & GRAHAM, 1992).

La décongélation est associée à l'expansion du volume. Le rétrécissement et le gonflement des cellules sont limités par leur capacité à résister à de tels changements (SIEME ET AL., 2008).

Une longue exposition à des diluants contenant du glycérol peut avoir un effet toxique sur les spermatozoïdes et cause un changement osmotique qui affectent la viabilité après la décongélation (ALVARENGA ET AL., 2005).

Pour obtenir la meilleure population de spermatozoïdes pour la congélation, une centrifugation à gradient de densité (EquiPure) peut être facilement ajoutée à la procédure normale de congélation de sperme (GUTIERREZ-CEPEDA ET AL., 2011).

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Objectifs

La maîtrise de la recongélation de la semence équine et un préalable incontournable à l'utilisation optimale par technique d'OPU/ICSI des anciens stocks limités de semence congelée issue d'étalons de très haute valeur génétique.

La recongélation de la semence équine a fait l'objet de plusieurs études depuis 2006 en passant par le traitement par addition des extraits spermatiques (Choi et al. 2006) jusqu'aux techniques d'enrichissement par centrifugation à gradient de densité (Van Geren, 2015). Cependant, les travaux effectués n'ont pas encore abouti à une qualité spermatique satisfaisante après deux cycles de cryoconservation.

Devant cette problématique, il serait intéressant d'étudier tous les aspects pouvant agir à travers ce processus sur la qualité des spermatozoïdes recongelés.

Ainsi, notre présente étude se veut un essai de recongélation de la semence équine et vise comme objectifs spécifiques d'évaluer l'effet :

- de la concentration en glycérol dans le diluant de congélation,
- de la concentration spermatique finale en paillettes,
- du cholestérol associé à l' $\alpha$ -tocophérol ajouté avant la recongélation,

sur la qualité (mobilité, intégrité, stress oxydatif) du sperme équin à travers deux cycles de cryoconservation.

## 2. Lieux de l'expérimentation :

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores de l'Université BLIDA1 (PBRC/U.BLIDA1) pendant le période du mois de mars au mois d'aout 2019 (Voir Annexe N° :1)

## 3. Animaux

Six chevaux, choisis parmi les étalons du Haras Hocine el Mansour Mostaganem et de la ferme équestre SAHEL HADJOUT, dénommés : MAROUAN DE MONLOT, AURHEIN, OMBIORIX, DZIRI D'HEM, QUOTB & RAHEF ont été utilisés. Les six sont des pur-sang arabes afin de lutter contre les variations raciales, Leur fertilité était connue grâce aux résultats d'IA en semence fraîche obtenus en 2018 et 2019 et (uniquement 2019 pour Dziri d'hem). De plus leur spermogramme était compatible avec une utilisation en sperme transporté pendant 12 heures

Des spermogrammes ont été réalisés aux printemps 2019. Les résultats sont présentés dans les tableaux en annexe.

Afin que l'échantillon soit représentatif de la population des étalons, il n'y a pas eu de sélection visant à garder les étalons ayant les meilleurs spermogrammes.

**Tableau 09** : Identification des échantillons (chevaux)

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



**Figure 23** : vagin artificiel type Colorado et ses accessoires utilisés pour récolter le sperme

#### **4.Récolte de la semence :**

Les étalons ont été récoltés au moins trois fois de suite dans la semaine précédant leur utilisation pour vider leur réserve extra-gonadique de spermatozoïdes et ainsi avoir une qualité constante de la semence. Une fois le protocole commencé, ils étaient récoltés au moins deux fois par semaine. Pour que la concentration en spermatozoïdes ne diminue pas, les collectes n'étaient pas réalisées deux jours consécutifs pour un même étalon. Les étalons étaient donc collectés par groupe de deux, alternativement.

La récolte se faisait de préférence en début d'après-midi pour des raisons de commodité, sur un mannequin, en présence d'une jument en chaleur « boute-en-train » ou directement sur jument pour les étalons non entraînés à la monte sur mannequin (cas de AURHEIN & DZIRI) et à l'aide d'un vagin artificiel fermé de type Colorado. Voir figure N °22



**Figure 24** : Récolte de l'étalon sur un mannequin.

#### **4.1. Filtration de l'éjaculat :**

Une fois récoltée, la semence était immédiatement filtrée dans un récipient gradué sur un papier filtre ou une double gaze stérile pour en retirer les impuretés et le « gel » qui contient le liquide séminal hautement toxique pour les SPZ en cryoconservation (jasko DJ., 1991). Figure N°23

L'ensemble est préalablement chauffé à l'étuve jusqu'à 37 °C pour éviter tout éventuel choc thermique. Le volume de l'éjaculat filtré était ensuite évalué puis aliquoté dans 4 tube de 50 ml préalablement placées dans une étuve à 37°C

Mettre les tubes dans un bain marie a 37 °C.



**Figure 25 :** Filtration de l'éjaculat.

#### **4.2. Évaluation initiale de la semence :**

Pour l'évaluation de la semence à l'état frais nous avons réalisé les tests suivants :

- Évaluation macroscopique des caractéristiques physico-chimiques de l'éjaculat à savoir le volume, la couleur, l'aspect, l'odeur.
- Évaluation de la concentration spermatique :

L'évaluation de la concentration spermatique sur cellule hématimétrique « Improved Neubauer » avec une dilution au 1/100<sup>ème</sup> (10µm de semence et 990µ de solution NaCl a 4%). Une goutte de cette semence diluée est disposée entre la cellule « Improved Neubauer » et lamelle et le comptage se fait sur les 2 chambres de grille de comptage de l'hématimètre de suite pour qu'on en fasse ensuite le calcul d'écart puis la concentration est calculée selon une équation spécifique à la cellule Neubauer selon le guide OMS 2010.

- Evaluation de la motilité spermatique selon les méthodes décrites ci-après :

**Motilité massale :** On met une goutte de semence fraîche sur une lame propre, dégraissée, préchauffée a 37°C et recouvert par une lamelle. Sous le microscope optique avec un grossissement x10 et x40 les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes sont notée de 0 à 5 (Tableau 10) selon l'échelle de Milovanov (Molovanov, 1962).

**Tableau 10 :** Échelle d'appréciation de la motilité massale du sperme.

(D'après l'échelle de MILOVANOV, 1962)

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

### 5. Préparation des complexe d'inclusion aux cyclo-dextrines (CLC+ TLC)

Le cholestérol et incorporé dans les cyclo dextrine (CLC : Cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin) a été préparé selon la technique rapportée par Purdy et Graham (Purdy et Graham, 2004) et l' $\alpha$ -tocophérol incorporé dans les cyclo dextrines (TLC :  $\alpha$ -tocopherol loaded methyl- $\beta$ - cyclodextrin) comme décrit par Koontz et ses collaborateurs (Koontz et al. 2009).

### 6. Préparation de la solution et dose de traitement à base de CLC+TLC

Deux solutions de traitement ont été préparées dans un diluant de base selon les concentrations suivantes : 10.86mg/ml (CLC) and 0.92mg/ml (TCL). L'association de CLC et TLC a été obtenue en mélangeant les deux solutions précédentes à égale proportion (v/v). La solution de traitement a été filtrée au filtre-seringue puis conserve à +4°C jusqu'à son utilisation.

La dose de traitement au CLC est 5mg/100x10<sup>6</sup>spz, celle du traitement au TLC est 0.1mM//100x10<sup>6</sup>spz. La dose du traitement par l'association (CLC+TLC) étant la demi-dose des deux traitements.

### 7. Dilution de la semence

Le diluant utilisé était l'INRA 96® (200 ml, IMV, L'aigle, France). Pour éviter des problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 200 ml après ouverture, l'INRA96 était reconditionné par 5, 10, 20 et 50 ml et congelé à -18°C pendant au moins 24 heures pour une bonne standardisation. Chaque jour de récolte, un volume d'INRA96 par dose à préparer étaient décongelés à température ambiante puis mis à 37°C dans un bain-marie pour la condition d'isothermie. L'INRA 96 est rajoute à la semence pour une dilution de 1 :3 c'est à dire rajouter 3 volume de dilueur pour 1 volume de sperme.

### 7.1. Décente de la température à 22°C :

Mettre les tubes contenant le sperme dilué dans un bain marie a 22 °C pendant 10 min.

### 7.2. Décente de la température de 22°C à 4°C :

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

Une fois à 4°C les doses étaient conditionnées dans des « Equitainer » isotherme de transport a 4°C et sont transportées à la plateforme de biotechnologie de reproduction des carnivores à Blida. Le temps de transport est estimé de 4 heures en moyenne.

### 7.3. Centrifugation:

Mettre 2 ml de coussin de centrifugation (MAXI-FREEZE, IMV, L'aigle, France) au fond de chaque tube de 10ml de centrifugation. Le coussin va jouer un rôle d'amortisseur mécanique pour éviter d'endommager les cellules spermatiques pendant la centrifugation à grande vitesse et de longue durée (au-delà de 600xg pdt plus de 10 min le coussin devient obligatoire (Mancil et Varner, 2008)

La semence est alors centrifugée a 600xg pendant 10min cette vitesse ne fait perdre qu'environ 15% des spermatozoïdes (Cochran et al. 1984 ; Heitland et al, 1996).



Figure 26 : Centrifugation a 600xg pendant 10min

### 7.4. Elimination du surnagent et rajout du 2eme diluant :

Après centrifugation le surnagent est éliminé et le culot est récupéré sans avoir récupéré le coussin de centrifugation

Calcule du volume du 2eme dilueur à rajouter :

Rajouter le ½ Vol de D2 théorique par pot

$VD2 \text{ théorique par pot} = N_{\text{pot}}/100 \cdot 10^6 = V_{\text{sperme/pot}} \cdot C_{\text{initiale}}$

Remise en suspension doucement a la main

Concentration hematimetrique : comptage comme décrit précédemment voir chapitre III.

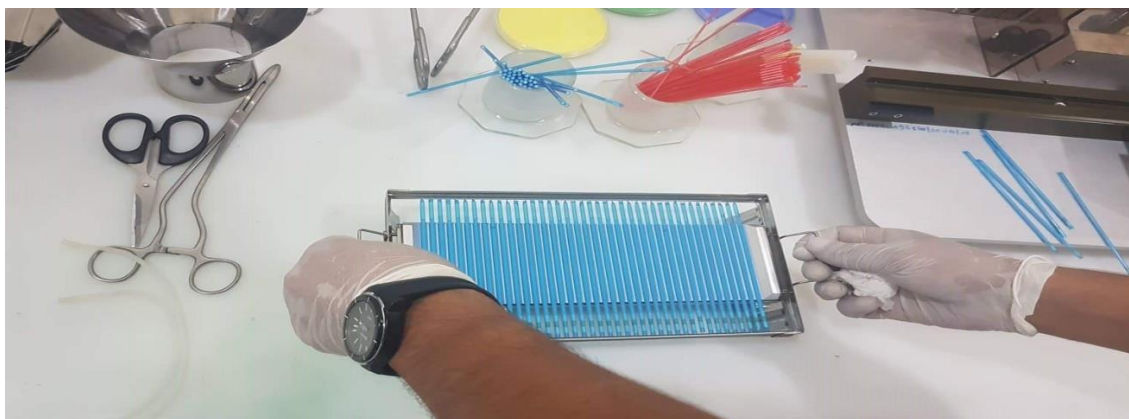
## 8. Remplissage des paillettes

Après 1h20 de temps de calibration les paillettes sont remplies et soudées avec une machine à remplir (MRS I dual V2) après avoir été identifier par une imprimante (Domino A420i)



**Figure27** : Machine à remplir et a souder MRS I

Après avoir été remplis les paillettes sont étalées sur des racks

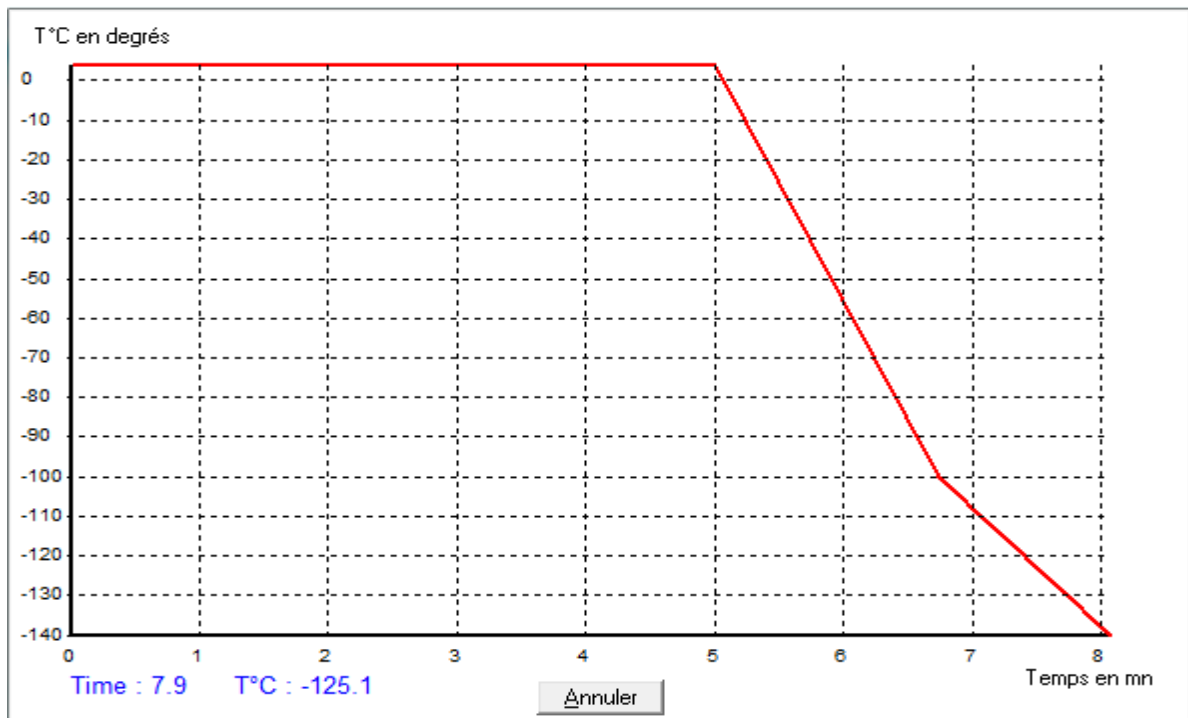


**Figure28** : Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation.

## 9. Congélation

### 9.1. Décente de la température de 4°C a -140°C

Le rack est mis par la suite dans un congélateur automatique (Micro Digit cool) dont la courbe de congélation est présentée en figure n30 :

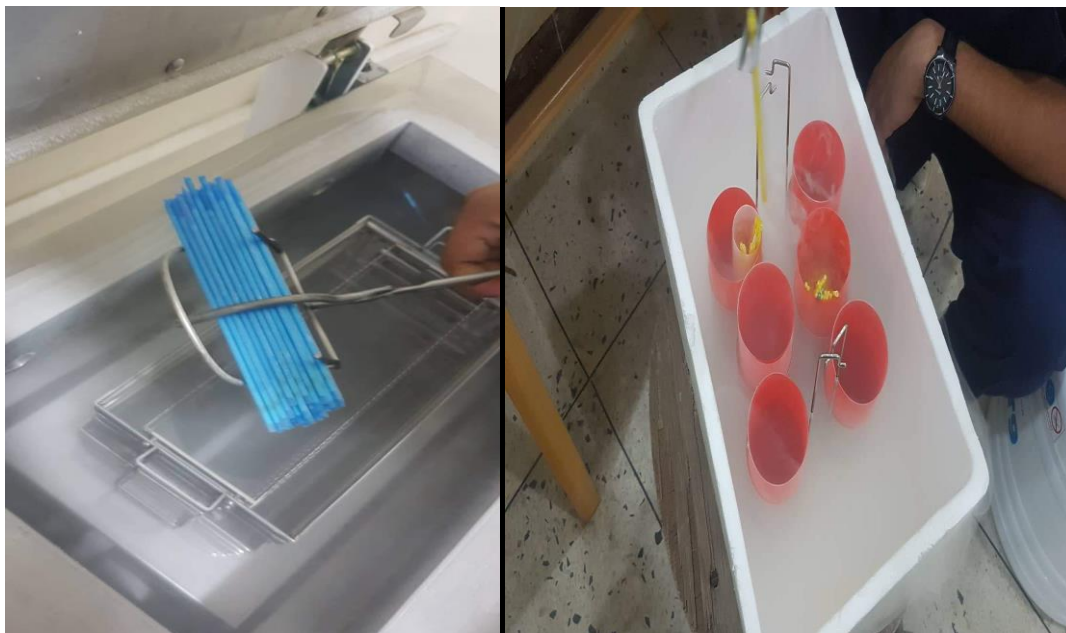


**Figure 29 :** courbe de congélation.

## 9.2. Le grand plongeon a -196°C

A la fin du cycle du congélateur le rack est récupéré et les paillettes sont immergées directement dans l'azote liquide.

On élimine les paillettes qui flottent à cause d'un défaut de remplissage



**Figure 30 :** Immersion des paillettes dans l'azote liquide.

### 9.3. Le stockage

Les paillettes ont été stockées dans des centaines d'azote liquide dont le niveau est contrôlé et l'appoint effectué régulièrement.



**Figure 31** : Stockage des paillettes dans les cuves d'azote liquide

### 9.4. La décongélation

- Laisser 72h de stockage
- Bain marie à 37°C pendant 30 secondes.

## 10. Techniques d'évaluation de la semence :

La semence a été évaluée à plusieurs niveaux au travers du protocole expérimental au moyen de deux techniques d'analyse à savoir :

### 10.1. Analyse de la mobilité spermatique par système (CASA)

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

Avant d'être analysée par le système IVOS II la semence a été diluée à la concentration de 25 million spz/ ml au moyen d'une solution tampon commerciale (EAZY BUFFER IMV, AIGLE, France) puis mise en incubation (Cuve MEMMERT) pendant 10 min.

L'analyse de la semence par l'IVOS II a été faite selon le paramétrage technique

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

**Figure 32 :** Paramétrage casa pour espèce équine



**Figure 33 :** Analyse CASA

Parmi la totalité des paramètres analysés par ce système, nous avons retenu pour notre étude, les deux paramètres les plus corrélés à la fertilité :

- Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles (**MOT**)
- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (**PROG**)

## 10.2. Analyse spermatique par cytométrie en flux (CMF)

Un cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA) a été utilisé pour notre étude, afin d'évaluer deux paramètres spermatiques à savoir : la viabilité couplée à l'intégrité acrosomique et le statu oxydatif.

Cet appareil a l'avantage de fonctionner avec des kits rapides prêts à l'emploi sous forme de microplaques contenant des fluorochromes dosés dans les puits. Après plusieurs étapes de dilution et préparation de la semence, cette dernière est ajoutée aux fluorochromes, incubée puis directement chargée et analysée par le cytomètre (Voir Figure 32).

Les deux kits utilisés dans notre étude, permettent d'évaluer :

- Le pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intact « Fluorochromes : FITC/PNA/PI » (**Viab-Acro**)
- Le pourcentage des spermatozoïdes vivants oxydés (**ROS**) en mesurant le taux des radicaux libres intracellulaires suivants :  $H_2O_2$ , HOCl,  $ONOO^-$ .



**Figure 34** : Analyse au cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA)

## 11. Protocole expérimental

Au total, deux expériences ont été menées. Les objectifs spécifiques étaient d'évaluer l'effet de :

- ✓ La concentration en glycérol dans le diluant de congélation.
- ✓ La concentration finale en spermatozoïdes ainsi que le traitement avant recongélation par addition du CLC+TLC.

Sur la qualité spermatique (paramètres de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomique, statut oxydatif) à travers deux cycles de congélation-décongélation (double congélation).

### 11.1. Première expérience :

Dix-huit (18) éjaculats récoltés à partir de 6 étalons ont été utilisés pour cette expérience. Chaque éjaculat a été filtré pour éliminer le gel puis soumis immédiatement à une évaluation initiale (numération et mobilité massale des spermatozoïdes) avant de subir une première dilution (1 :3) à l'INRA-96 puis refroidi à 4°C et transporté à cette température jusqu'au laboratoire « PBRC/U.Blida1 ». La semence a été alors évaluée à T0 (CASA & CMF), centrifugée (600xg, 10mn, +4°C, sur coussin « maxifreeze®) puis remise en suspension dans ½ volume de chacun des 5 diluants suivants : un diluant commercial (témoin) INRA FREEZE® (IMV, L'aigle, France) contenant 2,5% de glycérol et quatre diluants expérimentaux (INRA96+1%G, INRA96+2%G, INRA96+2%G, INRA96+4%G) composé à partir d'une base commerciale (INRA96®, IMV-Technologies, Aigles, France) additionnée de 1%, 2%, 3% et 4% de glycérol respectivement. La concentration spermatique a été évaluée (Neubauer®) après centrifugation et un volume du diluant correspondant a été calculé et ajouté (2<sup>ème</sup> dilution) pour avoir une concentration finale de  $100 \times 10^6$  spz/ml dans les cinq tubes. Ces derniers ont été évalués (CASA & CMF) après centrifugation (T1) puis mis en équilibration à 4°C pendant 120mn dans une vitrine réfrigérée. La semence a été ensuite conditionnée en paillettes moyenne (0.5ml) avant d'être congelée (Courbe : Début 4°C ; -60°C/mn jusqu'à -100°C ; -30°C/mn jusqu'à -140°C) avec un congélateur automatique (Micro Digit Cool, IMV, Technologies, Aigles, France), puis immergée dans l'azote liquide et stockée dedans pendant 3 jours avant d'être décongelée.

Trois paillettes de chaque lot ont été décongelées (+37°C pendant 30sec) dans cinq tubes différents, évaluées (CASA & CMF) (T2) puis centrifugées (600xg, 10mn, sur coussin « maxifreeze®) et remises en suspension dans ½ volume du diluant correspondant. La concentration spermatique a été évaluée après centrifugation et un volume du diluant calculé et ajouté pour avoir une concentration finale de  $10 \times 10^6$  spz/ml dans les cinq tubes. Ces

derniers ont subi une nouvelle évaluation (CASA & CMF) (T3) avant d'être recongelées exactement comme décrit pour le premier cycle de congélation puis décongelées (3 paillettes/lot) et évaluées (CASA & CMF) (T4). La concentration en glycérol donnant le meilleur résultat sera retenu pour l'expérience2.

### **11.2. Deuxième expérience :**

Sur la base des résultats de l'expérience1, le lot de paillettes congelées dans l'INRA-Freeze®, a été utilisé pour cette expérience.

A partir de ce lot, six paillettes (3ml) ont été décongelées comme décrit dans l'expérience1 puis analysée (CASA et CMF) à T0. Le volume total a été ensuite centrifugée (600xg pendant 10mn) et remis en suspension dans trois tubes à trois différents dilutions (1:10 ; 1:20, 1:100) correspondant à trois concentrations spermatisques finales ( $10 \times 10^6$  spz/ml ;  $5 \times 10^6$  spz/ml ;  $01 \times 10^6$  spz/ml respectivement). Chacun des 3 tubes a été aliquote en deux tubes dont un traité par addition de CLC+TLC et l'autre laissé sans traitement. Les six tubes résultants ont été mis à équilibrer, conditionnés en paillettes, congelés, stockés puis décongelés et analysés (CASA et CMF) exactement comme décrit dans l'expérience1.

### **12. Analyse statistiques :**

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

Microsoft Excel a été utilisé pour la tabulation ainsi que le graphisme.

Le logiciel SPSS a été utilisé pour :

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

Le seuil de significativité a été défini à 5% ( $p < 0.05$  ;  $n=18$ ) et les résultats ont été présentés sous forme de Moy $\pm$ SEM.

## RESULTATS

L'évaluation initiale de la semence immédiatement après collecte a montré une moyenne de concentration de  $155,5 \pm 4.21 \times 10^6$  spz/ml ainsi qu'une note moyenne de motilité massale de 4.3.

### La première expérience :

**Tableau 11** : les paramètres spermatiques initiaux après 3 heures de transports (T0-Exp1).

(p<0.05 ; n=18)

concentration (*10 <sup>6</sup> spz/ml)	155,5± 4.21
VIAB/ACRO+ (%)	54,0 ±2,30
ROS(%)	23,8 ± 0,73
MOT (%)	78,6± 1,55
PROG(%)	54,6±2.33

**Tableau 12** : les paramètres spermatiques initiaux après la première centrifugation (T1-Exp1) (p<0.05 ; n=18)

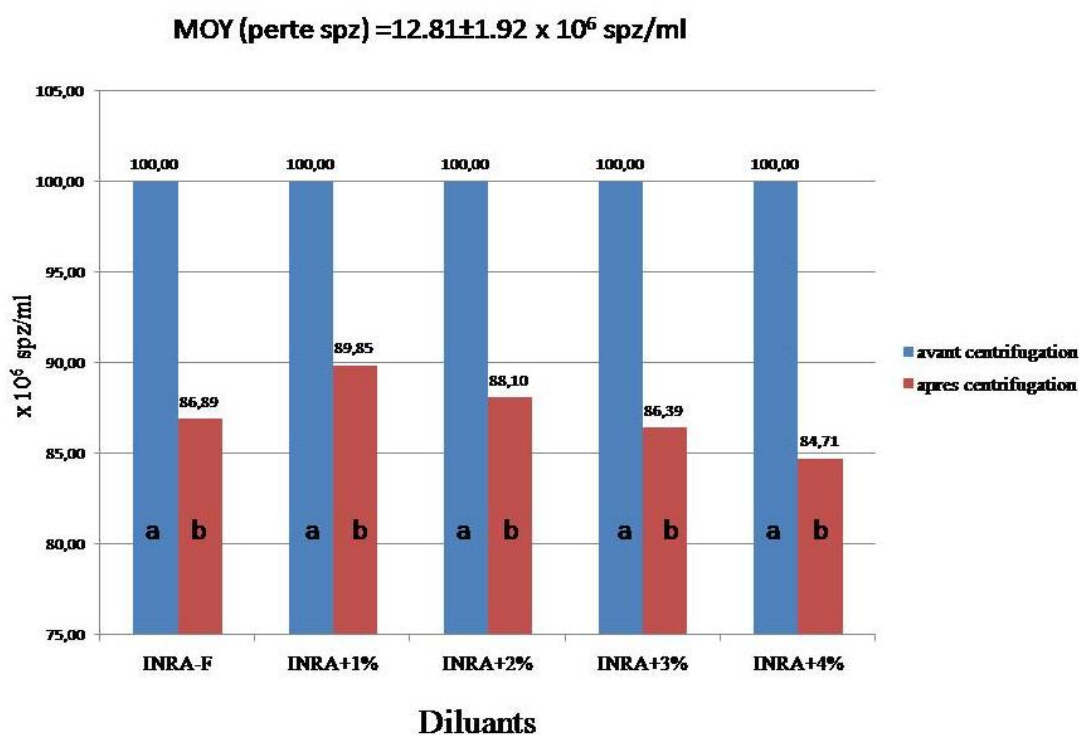
	INRA-freeze	INRA96+1 %	INRA96+2%	INRA96+3%	INRA96+4%
Concentration (*10 <sup>6</sup> sperm/ml)	132,63±3.49 <sup>a</sup>	130,43 ±3.45 <sup>a</sup>	127,95±3.44 <sup>a</sup>	132,63±3.49 <sup>a</sup>	132,34±3.38 <sup>a</sup>
VIAB/ACR(%) (+)	53,40±2.28 <sup>a</sup>	51,87 ±2.22 <sup>a</sup>	52.84±2.25 <sup>a</sup>	51,23±2.19 <sup>a</sup>	50,29 ±2.16 <sup>a</sup>
ROS(%)	23,54±0.72 <sup>a</sup>	23.35±0.71 <sup>a</sup>	23,79±0.73 <sup>a</sup>	23,06±0.71 <sup>a</sup>	22,64±0.69 <sup>a</sup>
MOT (%)	78,40±1.49 <sup>a</sup>	75,79 ±1.45 <sup>bc</sup>	76,56±1.44 <sup>a</sup>	73,04±1.38 <sup>ab</sup>	68,29 ±1.33 <sup>c</sup>
PROG (%)	53,64±2.29 <sup>a</sup>	52,61 ±2.24 <sup>a</sup>	53,13±2.24 <sup>a</sup>	50,69 ±2.15 <sup>a</sup>	49,21±2.08 <sup>a</sup>

**Tableau 13** : les paramètres spermatiques après la première décongélation avec les différents taux de glycérol rajouté aux diluants (T2-Exp1) (p<0.05 ; n=18)

	INRA-freeze	INRA96+1%	INRA96+2%	INRA96+3%	INRA96+4%
VIAB/ACR(+)(%)	52.84±2.25 <sup>a</sup>	45,02±1.43 <sup>b</sup>	51.32±2.23 <sup>ab</sup>	50.13±1.43 <sup>a</sup>	44.01±1.43 <sup>c</sup>
ROS(%)	26,90±0.67 <sup>a</sup>	33,78±0.51 <sup>b</sup>	30.88±0.84 <sup>c</sup>	29.10±0.51 <sup>ac</sup>	33.21±0.64 <sup>cb</sup>
MOT (%)	51,40±1.14 <sup>a</sup>	35,55±0.68 <sup>b</sup>	46,06±0.81 <sup>a</sup>	46,65±0.92 <sup>a</sup>	31,93±0.77 <sup>c</sup>
PROG (%)	42,74±1.68 <sup>a</sup>	30,79±0.73 <sup>b</sup>	41,97±1.10 <sup>a</sup>	40,68±1.34 <sup>a</sup>	29,25±0.90 <sup>c</sup>

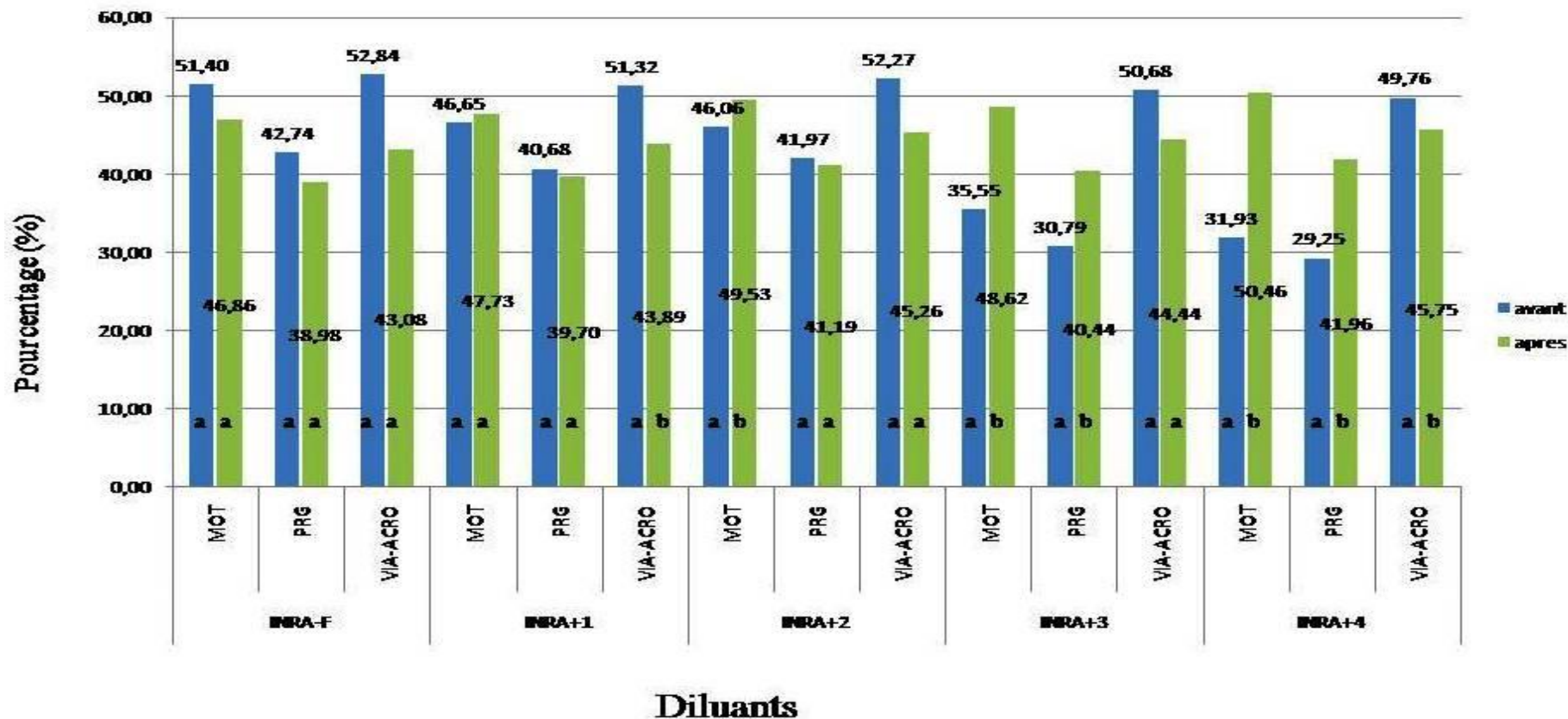
**Tableau 14** : les paramètres spermatisques après la deuxième décongélation avec les différents taux de glycérol rajouté aux diluants (T4-Exp1)(p<0.05 ; n=18)

	INRA-freeze	INRA96+1%	INRA96+2%	INRA96+3%	INRA96+4%
VIAB/ACR(%) (+)	21,39±1.02 <sup>a</sup>	18.90±0.77 <sup>b</sup>	21,17±1.01 <sup>a</sup>	20,52±0.99 <sup>a</sup>	17.68±0.63 <sup>b</sup>
ROS(%)	39,83±1.22 <sup>a</sup>	47,57±1.63 <sup>be</sup>	44,50±1.65 <sup>cd</sup>	45,88±1.70 <sup>d</sup>	50,44±1.59 <sup>e</sup>
MOT(%)	9,17±0.22 <sup>a</sup>	7,79±0.25 <sup>b</sup>	9,00±0.22 <sup>a</sup>	8,67±0.21 <sup>ab</sup>	7.38±0.28 <sup>cb</sup>
PROG (%)	7,63±0.32 <sup>a</sup>	6,35±1.18 <sup>b</sup>	7,49±0.31 <sup>a</sup>	7,22±0.31 <sup>ab</sup>	6,17±0.17 <sup>cb</sup>



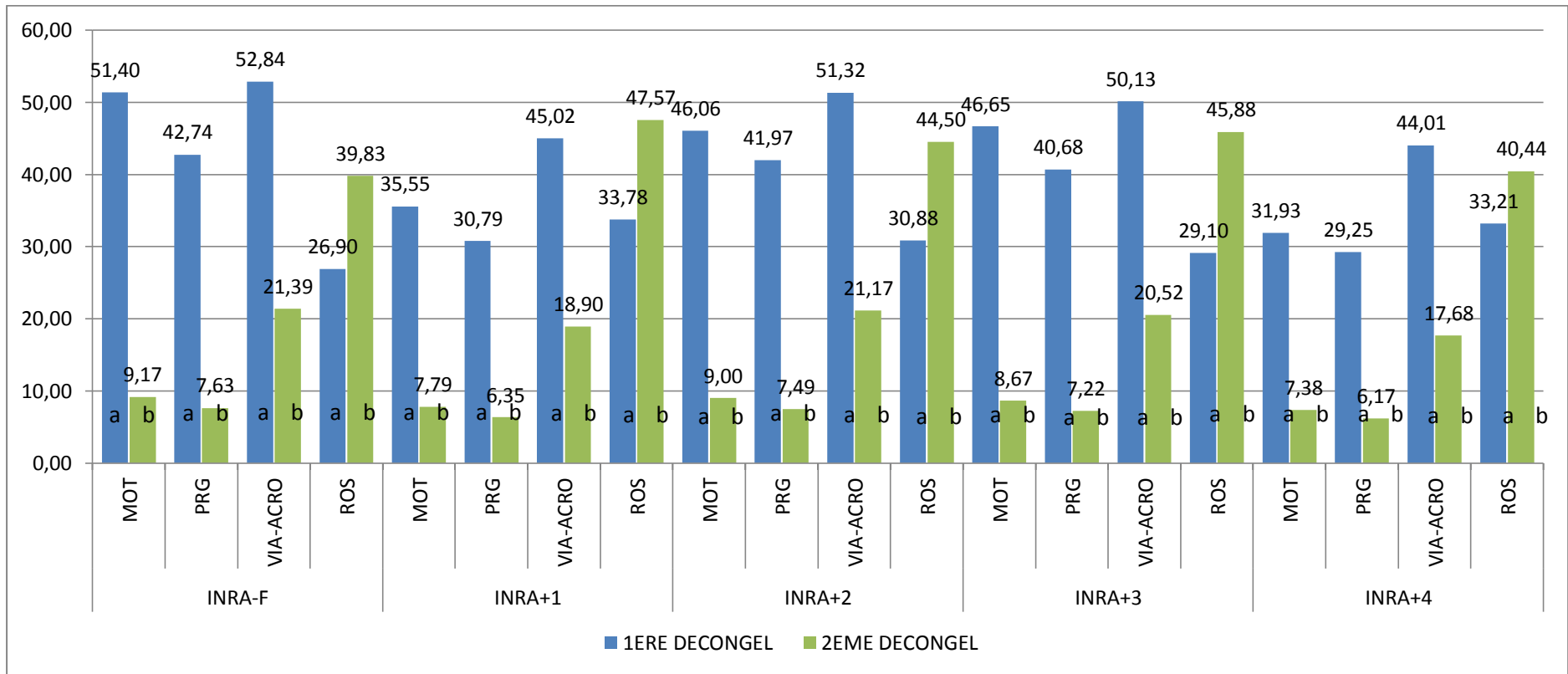
**Figure35** : Effet de la centrifugation sur la concentration spermatisque durant la deuxième congélation dans les différents diluants de cryoconservation (Exp1).

**Légendes** : INRA-F= INRA-FREEZ, INRA+2= INRA96 + 2% de glycérol, INRA+3= INRA96 + 3% de glycérol INRA+4= INRA96 + 4% de glycérol, Entre les deux barres du même paramètre et du même milieu les lettres différentes signifient une différence significative. (p<0.05 ; n=18)



**Figure 36** : Effet de la centrifugation sur les paramètres spermatisques durant la deuxième congélation dans les différents diluants de cryoconservation (Exp1)

**Légendes** : INRA-F= INRA-FREEZ, INRA+2= INRA96 + 2% de glycérol, INRA+3= INRA96 + 3% de glycérol INRA+4= INRA96 + 4% de glycérol, VIA-ACRO=pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intègre. Entre les deux barres du même paramètre et du même milieu les lettres différentes signifient une différence significative ( $p < 0.05$  ;  $n=18$ ).



**Figure 35 :** comparaison des paramètres spermiques entre la 1ere et la 2eme décongélation dans les différents diluants de cryoconservation

**Légendes :** INRA-F= INRA-FREEZ, INRA+2= INRA96 + 2% de glycérol, INRA+3= INRA96 +3% de glycérol INRA+4= INRA96 + 4% de glycérol, VIA-ACRO=pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intègre. Entre les deux barres du même paramètre et du même milieu les lettres différentes signifient une différence significative(p<0.05 ; n=18).

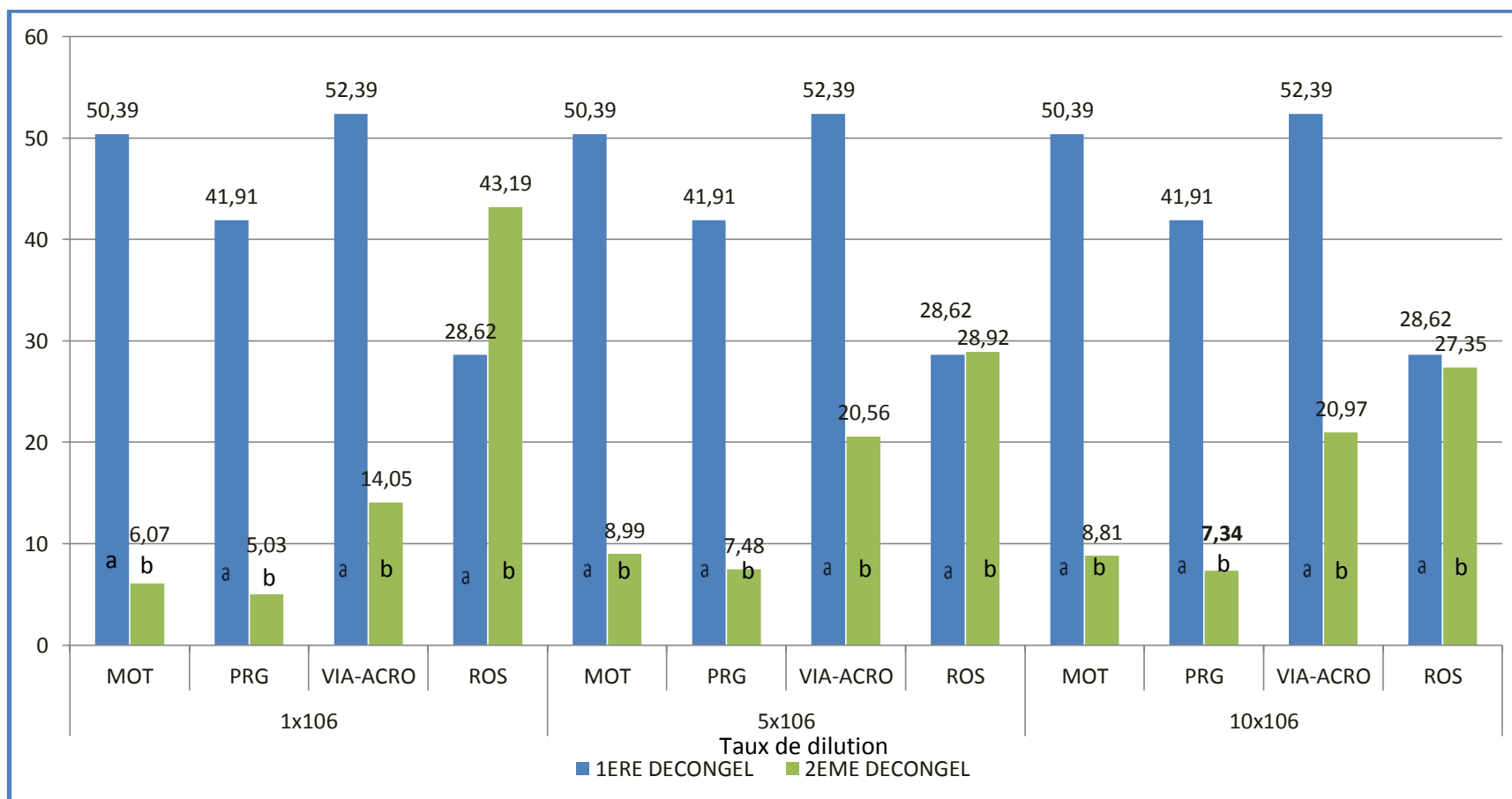
## La deuxième expérience :

Tableau 15 : les paramètres spermatiques après la première décongélation (T0-Exp2)(p<0.05 ; n=18)

	<b>1 :10</b>
VIAB/ACR (+)(%)	52,39±2.14
ROS(%)	28,62±0.92
Mot (%)	50,39±1.11
PROG (%)	41,91±1.66

Tableau 16 : les paramètres spermatiques après la deuxième décongélation dans les trois dilutions étudiées (T1-Exp2)(p<0.05 ; n=18)

	<b>1 :100</b>	<b>1 :20</b>	<b>1 :10</b>
VIAB/ACR(+)(%)	14,05±1.07 <sup>a</sup>	20,56±0.98 <sup>b</sup>	20,97±1.00 <sup>b</sup>
ROS(%)	43,19±1.62 <sup>a</sup>	28,92±1.83 <sup>b</sup>	27,35±1.61 <sup>b</sup>
Mot (%)	6,07±0.37 <sup>a</sup>	8,99±0.21 <sup>b</sup>	8,81±0.21 <sup>b</sup>
PROG (%)	5,03±0.36 <sup>a</sup>	7,48±0.31 <sup>b</sup>	7,34±0.31 <sup>b</sup>



**Figure 37 :** Comparaison des paramètres spermatisques entre la 1ere et la 2eme décongélation dans les trois dilutions étudiées

**Légendes :** 1x10<sup>6</sup> : Dilution 1:100 ; 5x10<sup>6</sup> : Dilution 1:20 ; 10x10<sup>6</sup> : Dilution 1:10. VIAB-ACRO=pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intègre. Entre les deux barres du même paramètre et du même milieu les lettres différentes signifient une différence significative (p<0.05 ; n=18).

**Tableau 17** : les paramètres spermatiques après la deuxième décongélation dans les trois dilutions étudiées avec (CLC+TLC) ou sans (NT) traitement (T1-Exp2)(p<0.05 ; n=18)

	Dilution 1:100(1x10 <sup>6</sup> )		Dilution 1:20(5x10 <sup>6</sup> )		Dilution 1:10(10x10 <sup>6</sup> )	
	NT	CLC+TLC	NT	CLC+TLC	NT	CLC+TLC
VIAB/ACR(%)	14,05±1.07 <sup>a</sup>	29,08±1.09 <sup>b</sup>	20,56±0.98 <sup>a</sup>	32,26±1.74 <sup>b</sup>	20,97±1.00 <sup>a</sup>	27,37±1.35 <sup>b</sup>
ROS(%)	43,19±1.62 <sup>a</sup>	32,93±1.04 <sup>b</sup>	28,92±1.83 <sup>a</sup>	21,48±1.59 <sup>b</sup>	27,35±1.61 <sup>a</sup>	22,85±1.59 <sup>b</sup>
MOT (%)	6,07±0.37 <sup>a</sup>	13,00±0.88 <sup>b</sup>	8,99±0.21 <sup>a</sup>	18,50±0.41 <sup>b</sup>	8,81±0.21 <sup>a</sup>	11,45±0.26 <sup>a</sup>
PROG (%)	5,03±0.36 <sup>a</sup>	11,79±1.07 <sup>b</sup>	7,48±0.31 <sup>a</sup>	11,94±0.59 <sup>b</sup>	7,34±0.31 <sup>a</sup>	8,83±0.39 <sup>a</sup>

# DISCUSSION

## La première expérience :

### **Effet de la centrifugation sur les paramètres de mobilité et d'intégrité du spermatozoïde équin pendant le premier cycle de cryoconservation.**

Dans notre étude, deux centrifugations ont été effectuées au cours des doubles congélations deux spermatozoïdes avec un protocole standard (600xg pendant 10mn). Cette procédure s'avère être indispensable lors de la préparation de la semence équine à la congélation et à la recongélation (Bliss et al., 2012). En effet, la première centrifugation permet d'éliminer le plasma séminal contenant beaucoup de gel à effet délétère sur la qualité spermatique ainsi que le diluant de centrifugation (INRA96®). La deuxième centrifugation permet d'éliminer l'ancien milieu de congélation déjà consommé et chargé en toxiques et de le remplacer par un milieu neuf pour le deuxième cycle de cryoconservation (Waite et al. 2008).

Cependant, la force centrifuge expose les spermatozoïdes d'une part au risque du choc mécanique altérant leur qualité et d'autre part au risque d'une perte de cellules dans le surnageant (Hoogewijs et al. 2010). Ainsi, nous avons évalué les paramètres de mobilité et d'intégrité ainsi que la concentration spermatique avant et après chaque centrifugation afin d'apprécier son effet sur la qualité de la semence équine.

Concernant la concentration des spermatozoïdes, les résultats de la première expérience ont montré une différence significative ( $p < 0.05$ ) avec un taux de perte de 12,81% en deuxième centrifugation (recongélation). Notre taux de perte en spermatozoïdes après centrifugation semble être légèrement supérieur (12,81% versus 15%) à celui rapporté par Cochran et ses collaborateurs (1984) et Heitland et collaborateurs (1996), et meilleur au taux de perte retrouvé par Hoogewijs et ses collaborateurs (2010) (15% versus 22%) pour le même protocole de centrifugation.

Quant à la mobilité (MOT et PTG) et la viabilité-acrosome, la différence n'était pas significative ( $p > 0.05$ ) avant et après centrifugation, ce qui signifie que notre protocole de centrifugation même s'il a causé une perte de spermatozoïdes, a permis de préserver les paramètres de mobilité et d'intégrité spermatique de façon satisfaisante.

La perte de spz dans nos résultats s'explique par la faible vitesse utilisée (600xg pendant 10mn) qui ne permet sans doute pas de récupérer la totalité des spermatozoïdes. Il a été rapporté que des vitesses de centrifugation plus élevées (1200, 1800, 2400xg) sont associées à des pertes certes plus faibles (23, 7.4, 2.1% respectivement) mais aussi à une qualité spermatique amoindrie consécutive au choc mécanique (Hoogewijs et al. 2010).

La préservation des paramètres de mobilité et d'intégrité spermatique après centrifugation montrée par nos résultats s'expliquerait également par l'utilisation d'un coussin de centrifugation (Maxi-Freeze©) qui empêche le choc de percussion des spermatozoïdes contre la paroi du tube. Cet effet protecteur a été largement rapporté dans la littérature (Knop et al. 2005 ; Sieme et al. 2006 ; Waite et al. 2008 ; Bliss et al., 2012). Selon certains auteurs, l'utilisation du coussin de centrifugation devient obligatoire au-delà de 600xg pdt plus de 10 min (Mancil et Varner, 2008).

Une mesure additionnelle de lutte contre le choc mécanique a été appliquée dans notre étude, en désactivant le frein du rotor de la centrifugeuse lui permettant ainsi de s'arrêter graduellement car son arrêt brusque augmente le choc mécanique infligé aux spermatozoïdes.

### **Effet d'un deuxième cycle de cryoconservation sur les paramètres de mobilité et d'intégrité du spermatozoïde équin (double congélation).**

Dans la première expérience, la comparaison des paramètres de mobilité et d'intégrité spermatique entre le premier et le second cycle de congélation montre que les spermatozoïdes équins souffrent considérablement à travers cette double congélation. Avec le diluant INRA-Freeze® par exemple, les pourcentages de spermatozoïdes mobiles (MOT), progressifs (PROG) et viables avec acrosomes intacts (Viab-Aros), chutent considérablement après recongélation avec des valeurs respectivement de 51,40 vs. 9,17% ; 42,74 vs. 7,63% ; 52,84 vs. 21,39%. Le statut oxydatif augmente considérablement 26,39 vs. 39,83%.

Cette dégradation excessive de la qualité des spermatozoïdes équin après une double congélation a été rapporté dans la littérature (Choi et al., 2006 ; Van Gerwen, 2015). Elle s'expliquerait par l'action du froid et du glycérol sur des cellules déjà fragilisées par un premier cycle de cryoconservation.

## **Effet de la concentration finale en glycérol sur les paramètres de mobilité et d'intégrité du spermatozoïde équin à travers deux cycles de cryoconservation (double congélation).**

Les lésions consécutives à la cryoconservation sont dues essentiellement au stress osmotique agissant conjointement au stress oxydatif par acculation des radicaux libres (Park et Graham, 1992 ; Watson, 2000 ; Ball, 2008).

Le glycérol est un agent cryo-protecteur qui protègent les spermatozoïdes durant la cryoconservation en minimisant leur exposition au stress osmotique (Park et Graham, 1992). Cependant, il a également un effet toxique dose-dépendant sur les spermatozoïdes notamment lors d'une exposition prolongée et/ou répétée à l'occasion d'une recongélation (Alvarez et al., 2014). Pour cette raison, nous avons évalué l'effet de plusieurs concentrations de glycérol (1%, 2%, 2.5% « INRA-Freeze® » 3% et 4%) dans le diluant de congélation à des fins d'optimisation.

Ainsi, nos résultats de l'expérience<sup>1</sup> suggèrent que le milieu INRA-Freeze® contenant 2.5% de glycérol offre une meilleure ( $p < 0.05$ ) préservation des paramètres de mobilité (MOT et PROG) et d'intégrité membranaire et acrosomique (Via-Acros) ainsi qu'une meilleure protection contre le stress oxydatif (ROS) comparé aux autres concentration étudiées durant les deux cycles de congélation.

Les concentrations de 1% et 4% ont donné des résultats faibles pour tous les paramètres étudiés différents de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) du diluant INRA-Freeze. En effet, 1% de glycérol serait insuffisant pour protéger efficacement les spermatozoïdes et semble très mal préserver les paramètres de mobilité, d'intégrité ainsi que le statut oxydatif. Quatre (4%) pourcent de glycérol serait par contre à la limite de la toxicité.

Les concentrations 2% et 3% ont donné des résultats légèrement faibles par rapport au diluant INRA-Freeze pour tous les paramètres étudiés (mobilité, intégrité membranaire, acrosomique et statut acrosomique) mais ne diffèrent pas significativement ( $p > 0.05$ ) du diluant de référence.

Ainsi, la concentration de 2.5% en glycérol, correspondant au diluant INRA-Freeze semble être la concentration optimale en glycérol compatible avec la meilleure préservation de la fonctionnalité, l'intégrité et l'équilibre oxydatif du spermatozoïde équin à travers deux cycles de cryoconservation.

## **La deuxième expérience :**

### **Effet de la dilution (concentration en spermatozoïdes) finale en paillettes sur les paramètres de mobilité, d'intégrité et stress oxydatif du spermatozoïde équin après deux cycles de cryoconservation (double congélation).**

Dans cette deuxième expérience, nous voulons évaluer d'abord l'effet de la dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes sur les paramètres de mobilité et d'intégrité du spermatozoïde équin. Trois dilutions sont étudiées (1 :10 ; 1 :20 ; 1 :100) correspondant respectivement à 3 concentrations finales en spermatozoïdes ( $10 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  ;  $1 \times 10^6$  spz/ml).

Les concentrations spermatisques de  $10 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  n'ont montré aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) entre elles par rapport à la mobilité et l'intégrité spermatisque ainsi que le statut oxydatif. Vu que les paillettes d'IA équine sont généralement dosées entre 100 et 300  $100 \times 10^6$  spz/ml, ces taux de dilution (1 :10 et 1 :20) permettent de produire 10 à 20 ou 20 à 40 ou 30 à 60 paillettes ICSI à partir d'une seule paillette d'IA concentrée à  $100 \times 10^6$  spz/ml ou  $200 \times 10^6$  spz/ml ou  $300 \times 10^6$  spz/ml respectivement.

La plus faible concentration ( $1 \times 10^6$  spz/ml) correspondant à une dilution de 1 :100 est très intéressante car elle permettrait de produire entre 100 et 300 paillettes ICSI à partir d'une seule paillette d'IA. Cependant, avec un diluant INRA-Freeze sans traitement ajouté, elle a donné des résultats faibles en mobilité et intégrité spermatisque et en statut oxydatif qui diffèrent significativement ( $p < 0.05$ ) des deux autres dilutions.

Aucune explication n'a pu être avancée à l'infériorité de la faible dilution comparée aux autres dilutions étudiées. Cependant, indépendamment des raisons pouvant expliquer ces résultats, il serait intéressant de développer un traitement de la semence capable d'améliorer ces résultats en augmentant la résistance des spermatozoïdes à la recongélation.

### **Effet du traitement au CLC+TLC avant recongélation sur les paramètres de mobilité, d'intégrité et stress oxydatif du spermatozoïde équin après deux cycles de cryoconservation (double congélation).**

Etant donné la pauvreté en cholestérol de la membrane cytoplasmique du spermatozoïde équin et l'augmentation du stress oxydatif par accumulation des ROS, nous avons supposé qu'un traitement de la semence avant recongélation à base de cholestérol et de la vitamine E (antioxydant) pourra mieux protéger le spermatozoïde équin contre la recongélation.

Le traitement de la semence avant recongélation avec une association de cholestérol et d' $\alpha$ -tocophérol incorporés dans les cyclo-dextrines (CLC+TLC) à la demi dose de 2.5mg/100x10<sup>6</sup>spz et 0.05mM//100x10<sup>6</sup>spz pour respectivement CLC et TLC a permis dans les conditions de notre travail expérimental d'apporter une amélioration considérable des paramètres de mobilité, d'intégrité et du statut oxydatif dans les trois dilutions étudiées à l'exception des paramètres de mobilité dans la dilution 1 :100 (10x10<sup>6</sup> spz/ml).

Dans la dilution 1 :100 (1x10<sup>6</sup> spz/ml) qui est la plus intéressante en matière de production de paillettes d'ICSI, nous avons enregistré grâce à ce traitement une amélioration considérable des pourcentages des spermatozoïdes mobiles (MOT), progressifs (PROG) et viables avec acrosomes intacts de l'ordre de (13,00% vs. 6.07%); (11.79% vs. 5.03%); (29.08% vs. 14,05%) respectivement. Pour le pourcentage des spermatozoïdes oxydés, une importante réduction a été observée après traitement (43,19 vs. 32,93)

Ces résultats s'expliqueraient par l'action protectrice et stabilisatrice du cholestérol sur la membrane plasmique du spermatozoïde équin pauvre initialement en cholestérol (Ricker et al., 2006) et par l'action antioxydante de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) notamment pour les cellules en souffrance et perturbation de leur métabolisme et mécanisme d'élimination des radicaux libres.

En plus de l'action protectrice du cholestérol et la vitamine E en soit, l'efficacité de ce traitement s'expliquerait également par la faculté du méthyl- $\beta$ -cyclodextrine à augmenter la solubilité dans le milieu aqueux du cholestérol et de la vitamine (molécules lipidiques) et à améliorer ainsi leur pénétration dans la membrane plasmique.

Afin d'améliorer encore plus ces résultats, il serait intéressant d'optimiser à l'avenir ce traitement en agissant sur la dose de traitement (optimisation) et le moment du traitement (traiter immédiatement après décongélation).

# CONCLUSION

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

- Une recongélation d'une semence équine congelée a été possible dans le diluant INRA-Freeze ® mais avec une réduction considérable des paramètres spermatiques de mobilité, d'intégrité et du statut oxydatif.
- La concentration de 2.5% en glycérol a été optimale pour une recongélation des spermatozoïdes équins.
- Une centrifugation de la semence équine avant recongélation à 600xg pendant 10mn sur un coussin (Maxifreeze®) a pu réduire le taux des pertes en spermatozoïdes au minimum (12%) associé à une bonne viabilité-acrosome.
- Un traitement de la semence avant recongélation au cholestérol et à l' $\alpha$ -tocophérol incorporés dans les cyclo-dextrines (CLC+TLC) a pu améliorer considérablement la qualité des spermatozoïdes équins (mobilité, intégrité membranaire et acrosomique et statut oxydatif) recongelés à une concentration faible de 1 million spermatozoïdes par millilitre, permettant une production de 100 à 300 paillettes ICSI à partir d'une paillette d'IA classique.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmadi A (1999). Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum. Reprod* 1999; 14; 2279-2285.
- Alvarez C, Gil L, González N, Olaciregui M, Luño V (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*; 69, 144-148
- Amann RP, Pickett BW (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7, 145-173.
- Amir Arav, Yoel Zeron, Haim Shturman, Haim Gacitua. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reproduction Nutrition Development*, EDP Sciences, 2002, 42 (6), pp.583-586.
- Ball A.B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 107 (2008) 257-267.
- Bliss, S.B. Voge, J.L. Hayden, S.S. Teague, S.R. Brinsko, S.P. Love, C.C. Blanchard, T.L. Varner, D.D. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology* 77 (2012) 1232–1239.
- Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. (2006) Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*. 1;65(4), 808-819.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2014). Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*; 81 , 138-151.
- Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vliegher S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Mirjan Thys J.G., Hoflack G., Soom A.V., de Kruif, A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74 (2010) 118–126.
- Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci* 2005;89:294 –7.
- KOONTZ J.L., MARCY J. E., O'KEEFE S.F., DUNCAN S.E.: Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants  $\alpha$ -Tocopherol and Quercetin. *J. Agr. Food Chem.*, 2009, 57, 1162–1171.
- Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 83; 209-222.

PURDY P.H., GRAHAM J.K.: Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 2004, 48, 36–45.

Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ (2006), Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 74, 359-365 .

Sieme H, Knop K, Rath D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees C for 24 h, and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. *Anim Reprod Sci* 2006;94:99 –103.

Van Gerwen, K. A. M. Refreezing equine semen for ICSI. Master thesis, 2015. Utrecht University.

Waite JA, Love CC, Brinsko SP, Teague SR, Salazar JL Jr, Mancill SS, et al. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 2008;70:704 –14.

Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61; 481-492.

## ANNEX N° :01

### Présentation de la PBRC



## Biotechnologies Platform in Carnivore Reproduction

B.P 270 Road of Soumâa –  
Blida

Phone /Fax:025.27.24.21  
Mob: 0661.721.940

pbrc.univ.blida1@gmail.com



#### Missions of the platform

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

#### Organization of the:

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

#### Fields of training:

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

#### Partners:

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



**ANNEX N° :02**

**Courbe de congélation équine (micro digit cool, IMV)**

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

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

Annuler  
 Enregistrer  
 Visualisation  
 Insérer  
 Supprimer  
 Imprimer

Saisir la Température Cuve à atteindre en degrés

ANNEX N° :03

Résultats d'analyse de viabilité-acrosome par Guva Easycyte HT

