

Université Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 5

CIRAD-EMVT
Campus International de Baillarguet
TA 30 / B
34398 MONTPELLIER Cedex 5

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

Année 2004-2005

RAPPORT DE STAGE

**ESSAIS DE CONSERVATION DE
SEMENCES DE BELIERS A L'ETAT
FRAIS OU CONGELE EN VUE DE
L'INSEMINATION ARTIFICIELLE**

Par

Amina BOUGUERA

Le 13 octobre 2005

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



**BA
TH1309**

**Laboratoire d'accueil : Unité de Recherche Physiologie de la Reproduction et des
Mouvements INRA-Nouzilly, Tours**

Responsable de stage: Xavier DRUART

CIRAD



000073230

REMERCIEMENTS

A l'ensemble du personnel de l'unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA de Nouzilly, de m'avoir permis de faire mon stage au sein de l'équipe « Gamète mâle », qui a pu me faire une place en un temps record.

A Xavier Druart, mon maître de stage, qui m'a parfaitement encadrée, conseillée tout en me faisant confiance et en me laissant beaucoup d'autonomie dans mon travail.

A tous les membres de l'équipe « gamète mâle » et en particulier à J.L.Gatti, aux stagiaires, thésards ou non, et techniciens pour l'ambiance joyeuse au laboratoire.

A l'équipe de la bergerie.

A Messieurs C. Meyer et Mr J.P. Poivey du CIRAD pour leur précieuse aide et encouragements tout au long du stage.

A Messieurs F. Achard, F. Bocquier et J.P. Boutonnet qui m'ont orientée et aidée dans les premières démarches du stage.

A Mesdames Marie-Agnès Martin d'Insem Ovin et Laurence Sagot de la ferme expérimentale du Mourier, je leur exprime toute mon admiration devant l'énergie et la motivation qu'elles déploient dans leur travail.

A la promotion 2004/2005 du DESS PARC avec un merci chaleureux à Hélène Gares.

A mes proches, qui ont su être présents à mes côtés malgré les distances.

A l'INRA d'Algérie, pour m'avoir permis d'avoir cette expérience qui nous sera sans doute fructueuse à l'avenir.

Et enfin, merci à tous les Béliers, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible!!



- RESUME

**Essais de conservation de semences de béliers à l'état frais ou congelé
en vue de l'insémination artificielle**

Le développement de l'insémination artificielle (IA) ovine est limité par l'aptitude du sperme du bélier à la conservation dans le laps de temps « collecte - insémination ».

L'IA réalisée avec de la semence réfrigérée représente la technique de reproduction sur laquelle sont aujourd'hui basés les programmes de sélection. Cependant la durée de conservation limitée de la semence fraîche restreint les possibilités d'extension géographique et temporelle de cette technique. La seule méthode pratique de conservation sur une longue durée est la congélation. Cependant la semence, une fois décongelée, présente elle aussi une faible fertilité. L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité de six composants (A, B, C, D, E, F) supposés exercer une action de protection des spermatozoïdes au cours d'une conservation de longue durée (jusqu'à 51 h après collecte) et d'analyser leur effet sur la prolongation de la durée de conservation et/ou l'amélioration la qualité de la semence conservée. Ces six composés sont additionnés au dilueur (lait ou lait-glycérol-jaune d'œuf) au moment de la conservation. Ces effets sont observés sur les paramètres de motilité des spermatozoïdes.

Les résultats de la conservation de la semence fraîche nous ont permis de constater que l'ajout des composés A, B et C a permis de modifier le mouvement des spermatozoïdes en particulier pour les doses de 5 et 10 milliMolaire.

Pour la semence congelée, l'ajout de A améliore le taux des spermatozoïdes progressifs de 18 % dans le cas où il est incorporé au début de la dilution avec le lait - glycérol (phase de l'équilibration de la température).

A l'issue de cette étude, nous constatons que les composés A, B et C modifient le mouvement des spermatozoïdes et leur permettent d'augmenter leur résistance dans le temps. Ceci peut se traduire *in vivo* par une meilleure survie des spermatozoïdes dans le tractus génital de la brebis et de là une meilleure fertilité.

Mots-clés : Bélier, spermatozoïde, motilité, conservation, insémination artificielle, reproduction.

SOMMAIRE

- RESUME	3
- INTRODUCTION.....	7
Première partie : l'Insémination Artificielle (IA) ovine et la semence du bélier ...	8
A. Quelques données sur l'IA ovine.....	8
1. Historique de l'IA.....	8
2. Les spécificités de l'IA ovine	8
B. Caractéristiques du sperme du bélier	9
C. Méthodes de conservation de la semence ovine.....	9
1. Généralités sur les différents dilueurs	9
a) Caractéristiques d'un bon dilueur	9
b) Exemples de dilueurs expérimentés.....	9
2. Conservation de la semence fraîche et réfrigérée.....	10
3. Semence congelée.....	11
Deuxième partie : Matériel et méthodes	13
A. Matériel biologique utilisé : Animaux et sperme	13
1. Animaux	13
2. Le contrôle du sperme	13
a) La motilité massale.....	13
b) La concentration en spermatozoïdes	14
B. Techniques de conservation de la semence ovine	14
1. En milieu liquide	14
a) Préparation du dilueur.....	14
b) Dilution de la semence	14
c) Conditionnement de la semence.....	15
d) Diminution de la température à 15°C et conservation	15
2. A l'état congelé	15
a) Préparation des deux dilueurs	15
b) Dilution de la semence	15
c) Conditionnement de la semence dans des paillettes	16
d) Congélation dans de l'azote liquide et conservation	16
C. Analyse automatisée de la semence	16
D. Analyses statistiques des données.....	17
Troisième partie : Résultats et discussion.....	18
A. Obtention d'une courbe d'étalonnage d'un spectrophotomètre.....	18
B. Mesures du volume, de la motilité massale et de la concentration des pools de semences conservées.....	19

C. Evolution de la motilité de la semence conservée (de J0 à J2)	20
1. Semence conservée à l'état liquide (15°C)	20
a) Dilueur + composé A	20
b) Dilueur + composé B	20
c) Dilueur + composé C	21
d) Dilueurs + composés D, E ou F	21
2. Semence congelée	24
a) « A » ajouté dans le dilueur 1	24
b) « A » ajouté dans le dilueur 2	24
c) « A » ajouté juste avant la mise en paillettes	24
- CONCLUSION	26
- BIBLIOGRAPHIE	28
- ANNEXES	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Volumes des éjaculats des pools conservés	16
Tableau 2 : Motilité massale des éjaculats des pools conservés	16
Tableau 3 : Concentration des pools conservés	17

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques de l'analyse automatisée de la motilité des spermatozoïdes (Hamilton, 2004)	14
Figure 2 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre	15
Figure 3 : Mobilité des spermatozoïdes au cours de la conservation pendant 48 h à 15°C dans le dilueur A. Les données représentent la moyenne de 3 expériences différentes.	19
Figure 4 : Mobilité des spermatozoïdes (taux de spz fléchants) au cours de la conservation pendant 48 h à 15°C dans les dilueurs B, C, D, E, et F. Les données représentent la moyenne de 3 expériences différentes.	20
Figure 5 : Mobilité des spermatozoïdes après congélation. Au cours de 3 expériences successives ou le composé A a été ajouté à trois étapes différentes	22

Liste des annexes

Annexe 1 : Détermination de la note de la motilité massale	28
Annexe 2 : Résumé des différentes étapes du traitement de la semence de bélier pour utilisation sous forme liquide	29
Annexe 3 : Préparation du dilueur pour la semence de bélier utilisée sous forme liquide (un jour avant la collecte de semence)	29
Annexe 4 : Résumé des différentes étapes du traitement de la semence de bélier pour utilisation sous forme congelée	30
Annexe 5 : Préparation des dilueurs 1 et 2 pour la semence de bélier utilisée sous forme congelée	30
Annexe 6 : Mesure de la concentration au spectrophotomètre	31
Annexe 7 : Comptage des spermatozoïdes à l'hématimètre	32
Annexe 8 : Composition des milieux d'incubation des spermatozoïdes utilisés au cours des différentes manipulations	33

- INTRODUCTION

Une meilleure productivité des troupeaux, ovins ou autres, est un objectif zootechnique qui peut être rempli. L'objectif le plus visé par les éleveurs est d'augmenter la productivité numérique d'animaux de « bonne qualité génétique » par l'amélioration des performances de reproduction. A cet objectif peuvent être associés d'autres objectifs comme l'augmentation des performances de croissance, de production laitière, mais toujours par une meilleure maîtrise de la reproduction.

Afin d'accroître son rendement reproductif, l'élevage ovin a recours aux techniques artificielles de reproduction. L'insémination artificielle (IA) est la technique la plus répandue et utilisée à grande échelle, en particulier pour le cas de la France depuis plus de trente ans.

Cette technique est utilisée afin d'augmenter la fertilité, lutter contre les maladies transmissibles lors de la monte, ainsi que l'emploi optimum des reproducteurs sélectionnés pour améliorer la conformation des races locales et augmenter les productions. Elle est aussi et surtout un outil pour l'amélioration génétique.

Cependant, le développement de l'insémination artificielle chez cette espèce se trouve, malheureusement, limité par le court laps de temps « collecte de la semence - insémination » sans que la fertilité ne soit affectée, c'est-à-dire dans les 10 heures qui suivent la collecte (dans le cas de la conservation à l'état frais). Il est donc nécessaire de prolonger la durée de conservation de la semence, ce qui fait l'objet de cette présente étude.

Première partie : l'Insémination Artificielle (IA) ovine et la semence du bélier

A. Quelques données sur l'IA ovine

1. Historique de l'IA

L'expérimentation scientifique concernant l'IA a en effet commencé au début du siècle dernier en Russie et aux Etats-Unis, chez la poule ; elle s'est poursuivie, à partir des années 30, chez la brebis, la jument, la truie et la vache. En France, l'utilisation de l'IA s'est développée chez les bovins à partir de 1945-50 ; elle s'est ensuite étendue aux ovins, porcins et caprins, avant de connaître une véritable explosion chez les espèces avicoles à partir des années 1965-75. Selon l'INRA (2005), il se fait actuellement au niveau mondial environ 100 millions d'inséminations par an pour les bovins, et plus de 300 millions pour les espèces avicoles. La technique est également utilisée en aquaculture (poissons et crustacés) et en apiculture.

En France, plus de 5 millions d'interventions sont réalisées annuellement chez les bovins, près de 800 000 chez les ovins et 60 millions chez les oiseaux (répartis à peu près également entre dindes, canes et pintades). Pour les porcs, l'IA est en pleine expansion. L'IA s'exerce en France dans un cadre juridique fixé par la loi sur l'élevage de 1966 (espèces avicoles exceptées) ; elle est pratiquée par des Centres d'insémination agréés.

Pour l'espèce ovine, l'introduction de l'IA, même dans une faible proportion, induit un accroissement considérable du progrès génétique. Un des exemples les plus spectaculaires est celui de l'augmentation de la production laitière des brebis Lacaune du Rayon de Roquefort : la production par brebis est passée de 113 litres par lactation en 1970 à 260 litres en 1995. Dans le même temps, le nombre d'IA a progressé de 20 000 en 1971 à 340 000 en 1994, et la totalité des éleveurs sélectionneurs utilisent actuellement l'IA (INRA, 2005).

2. Les spécificités de l'IA ovine

Dans l'espèce ovine, l'IA présente certaines spécificités. Ainsi, l'IA est majoritairement effectuée sur des femelles dont l'oestrus est induit par traitement hormonal. Contrairement à d'autres espèces de rente (bovins, porcins), la période de collecte des béliers et de l'IA est très réduite. Ainsi la majorité des inséminations est réalisée de mai à août en France. Cette forte saisonnalité a des répercussions sur les pratiques d'élevage. Au cours d'une saison de reproduction, les IA ne sont pas répétées chez une même brebis. En cas d'échec de l'IA, une saillie naturelle est effectuée au cycle suivant pour assurer un regroupement le plus important possible des agnelages.

L'insémination artificielle réalisée avec de la semence réfrigérée représente la technique de reproduction sur laquelle sont aujourd'hui basés les programmes de sélection.

Cependant la durée de conservation limitée de la semence fraîche restreint les possibilités de l'IA ; des solutions techniques ont donc été recherchées pour lever cette contrainte. Actuellement, la méthode de conservation sur une longue durée la plus utilisée est la congélation dans l'azote liquide, à -196°C.

Les techniques de congélation de la semence de bélier disponibles actuellement n'en permettent pas encore l'utilisation à grande échelle dans des programmes de sélection ovine : l'insémination intra-utérine avec de la semence congelée demeure une technique chirurgicale très lente et peu applicable au niveau de l'exploitation ; l'insémination cervicale avec de la semence congelée présente un taux de fertilité inférieur et un coût supérieur par rapport à ceux obtenus avec de la semence fraîche. Tout ceci suggère la nécessité d'étudier la rentabilité du point de vue fertilité ainsi qu'économique des différentes stratégies d'utilisation de la semence congelée dans l'élevage ovin.

Dans tous les cas, il est nécessaire de mettre au point des formes de conditionnement et des modalités de conservation adaptées : dilueur, taux de dilution du sperme, température de conservation (frais 4° ou 15°C, congelé).

B. Caractéristiques du sperme du bélier

Le sperme de bélier se caractérise par une concentration très élevée et un volume réduit. La mobilité des spermatozoïdes est assez élevée, en comparaison avec d'autres espèces de rente. Toutefois, son aptitude à la conservation est limitée.

C. Méthodes de conservation de la semence ovine

1. Généralités sur les différents dilueurs

a) Caractéristiques d'un bon dilueur

A la fin des années 90, 41 % des femelles laitières et 5,1 % des allaitantes étaient inséminées (Perret, 1999 in Alencar de Araujo, 2000). C'est dans ce dernier secteur que la demande concernant la conservation de la semence est la plus pressante. A cet effet, nous enregistrons une diminution du nombre des centres d'IA mais une nette augmentation de la zone d'influence des centres en activité. Dans ces 99,5% des cas, la semence est collectée, diluée et mise en place entre 6 et 8h après collecte. De cette manière, d'assez bons résultats de fertilité sont obtenus (65% chez les adultes et 68 % chez les agnelles). En revanche, après 24 heures de conservation à 15°C, la fertilité peut baisser jusqu'à 30 %.

b) Exemples de dilueurs expérimentés (Mies Filho, 1982 in Alencar de Araujo, 2000)

Un bon dilueur doit présenter les caractéristiques suivantes :

- absence de toxicité,
- pH favorable,
- préparation simple et
- moindre coût.

En plus de ces caractéristiques, le dilueur doit permettre le maintien de la survie ainsi que la fonctionnalité des spermatozoïdes en leur apportant des substances nutritives et en les protégeant des chocs thermiques.

Exemples de dilueurs expérimentés

Ils sont de nature biologique, utilisés en particulier dans la méthode de conservation en milieu liquide à 4 - 5°C ou bien à 15°C. Les plus connus sont :

- le lait
- le jaune d'œuf,
- l'eau de coco.

Ils ont l'avantage d'avoir un prix de revient très faible et leur utilisation peut être appliquée à grande échelle. Par contre, la substance responsable dans la protection et la conservation des gamètes est difficile à définir étant donnée la complexité de ces milieux.

2. Conservation de la semence fraîche et réfrigérée (forme liquide)

C'est après 1950 que de nombreuses publications ont commencé à paraître sur l'IA avec de la semence de bélier fraîche ou réfrigérée, utilisant le plus souvent comme dilueurs ceux fabriqués à base de lait de vache ou de jaune d'oeuf. La technique du conditionnement de la semence en paillettes, décrite par Colas *et al.* en 1973 (Gabina, 1990), a été utilisée chez les ovins laitiers en France et a été adoptée par d'autres pays ultérieurement. Avec ce type de semence, les brebis sont inséminées par voie cervicale, sur chaleurs induites par un traitement avec des éponges vaginales suivi d'une injection de PMSG au moment de leur retrait.

Les dilueurs à base de lait de vache écrémé sont les plus utilisés dans ce genre d'IA. Le lait est chauffé à 95°C pour détruire la lacténine, une fraction protéique contenant des radicaux libres de soufre, toxiques pour les spermatozoïdes.

Le lait de vache stérilisé a donné des conservations favorables à 15°C (Evans et Maxwell, 1987).

Une fraction protéique du lait, la caséine, a une action cryoprotectrice. Cet effet est abordé dans l'étude sur le choc thermique de Choong et Walles en 1962 et qui démontre cette action protectrice à 5°C (Alencar de Araujo, 2000).

En résumé, avec un dilueur à base de lait écrémé, les taux de fertilité obtenus pour la semence fraîche (à 15°C) oscillent entre 65 et 75% pour une durée inférieure à 5 h. Conservée entre 4 et 5°C la semence garde un bon pouvoir fécondant pendant 10 h, au-delà de 24 h il y a une perte accrue de ce pouvoir. Actuellement en France, les centres d'insémination artificielle utilisent ce dilueur pour une conservation à 15°C.

Des essais expérimentaux ont comparé le lait de vache et lait de brebis, utilisés comme dilueurs de la semence du bélier (Alencar de Araujo, 2000). Les résultats ont montré que le lait de vache chauffé était meilleur que le lait de brebis.

Les résultats de fertilité *in vivo* après I.A. avec de la semence liquide varient selon les races ovines et connaissent une nette amélioration ces dernières années. Selon Gabina, 1990, le taux de fertilité le plus élevé se situe autour de 65% et est observé chez la race Lacaune-laitière.

La diminution de la fertilité après IA cervicale avec de la semence conservée sous forme liquide a pour cause principale le transport et le faible taux de survie des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle (Maxwell et Salamon 1993, in Le bœuf, 2003).

3. Semence congelée

Les dilueurs à base de jaune d'œuf sont les plus utilisés pour la conservation de la semence de plusieurs espèces.

Le jaune d'œuf a une action protectrice sur les membranes de l'acrosome et de la mitochondrie contre le choc thermique dû au refroidissement (Blackshaw, 1954).

Selon Watson, 1981, la fraction active du jaune d'œuf est une lipoprotéine qui s'attache à la surface du spermatozoïde et qui représente l'agent cryoprotecteur.

A cet effet, l'incorporation de 18 % de jaune d'œuf dans le milieu de conservation avant congélation améliore la motilité des spermatozoïdes après décongélation.

D'autres expériences ont montré que l'addition de 3 % de jaune d'œuf dans un milieu à base de glucose/phosphate a diminué de manière significative les altérations acrosomiques et de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes de bélier conservés 72 h à 5°C (John et Martin, 1973, Alencar de Araujo, 2000).

La mise au point d'une technique opérationnelle d'IA utilisant de la semence congelée est essentielle afin de permettre aux éleveurs, isolés ou éloignés des grands centres d'IA, de profiter des bonnes valeurs génétiques des béliers et améliorer la génétique et la productivité de leurs troupeaux.

Le problème qui se présente pour la congélation de la semence de bélier réside dans la viabilité et la motilité réduites des spermatozoïdes lors de la décongélation des doses. Cet inconvénient rend difficile la présence d'un nombre suffisant de spermatozoïdes viables dans le cervix pour permettre la fécondation des brebis.

Pour remédier à cette limite, la semence est déposée directement au niveau des cornes utérines. C'est la technique de l'IA intra-utérine. Cette dernière donne de meilleurs résultats mais est difficile à appliquer ce qui en réduit les possibilités d'utilisation à grande échelle. Dans ce cas, la fertilité peut atteindre 60% (Boukhliq, 2002).

Les résultats relatifs aux inséminations avec de la semence congelée par voie cervicale, montrent une fertilité inférieure de 15 à 30 % à celle obtenue par les inséminations de référence avec de la semence réfrigérée (Gabina, 1990). De plus, l'utilisation de semence congelée présente divers inconvénients et limites résumés par Gabina dans les points qui suivent :

- La nécessité de sélectionner les béliers sur l'aptitude à la conservation de leur semence ;
- Le tri des éjaculats avant et après congélation ;
- Le nombre « élevé » des spermatozoïdes par dose (si la mise en place est par IA cervicale) ;
- Le coût élevé de la préparation de ces doses ;
- La grande complexité de mise en place ce qui fait élever aussi son coût.

Deuxième partie : Matériel et méthodes

A. Matériel biologique utilisé : Animaux et sperme

Le développement de l'I.A. ovine est tributaire du court laps de temps « collecte de la semence - insémination » qui affecte de façon significative la garantie de bons résultats de la fertilité et ceci par une méthode de conservation optimale.

Cette étude a été effectuée dans le cadre des travaux de recherche menés par l'équipe « Gamète Mâle » de la station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA-Nouzilly du 15 avril au 31 juillet 2005.

Pendant cette période, nous avons testé des composés ajoutés aux dilueurs dans le but d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes, conservés sous forme liquide (à 15°C) et congelée (dans de l'azote liquide) et prolonger leur durée de conservation.

1. Animaux

Pour cette étude, six béliers de race Lacaune, âgés entre 3 et 4 ans, ont servi pour la collecte de la semence.

Ces béliers sont entraînés régulièrement à la collecte, ce qui facilite l'obtention de plusieurs éjaculats en un court laps de temps et améliore aussi la qualité de la semence.

L'activité sexuelle des béliers est maintenue par un traitement photopériodique qui consiste à alterner un mois de jours longs (16 h de lumière : 8 h de nuit) et 1 mois de jours courts (8 h de lumière et 16 h de nuit). Ce traitement permet aux béliers de produire en pleine contre-saison, de la semence en grande quantité et d'une fécondance maximale.

La semence est collectée au vagin artificiel en présence d'une brebis boute-en-train à une fréquence de deux fois par semaine. Une à deux éjaculations successives sont effectuées par mâle et par collecte en un délai de 30 minutes.

2. Le contrôle du sperme

a) La motilité massale

Aussitôt après la récolte, le volume de l'éjaculat est relevé à travers le tube collecteur gradué.

Juste après, la qualité des éjaculats est contrôlée par une analyse de la motilité massale selon une notation de 0 à 5 décrite dans l'annexe 1, par observation au microscope à contraste de phase, d'une goutte de sperme pur, déposée sur une lame.

Les éjaculats jugés bons (note de motilité massale \geq à 4) sont mélangés en pool et conservés dans un bain-marie à 34°C.

b) La concentration en spermatozoïdes (spz)

La mesure de la concentration de la semence est nécessaire pour l'étalonnage du spectrophotomètre. Pour cette manipulation, le sperme est dilué dans du sérum physiologique formolé (Annexe 8) à différents taux : 100, 200 et 400 fois.

Ces dilutions vont servir pour deux opérations :

- la mesure de la densité optique (D.O.) au spectrophotomètre et
- le comptage à l'hématimètre pour la conception de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

Après l'obtention de la courbe, la concentration était systématiquement mesurée en diluant la semence 400 fois dans du sérum physiologique formolé (10 μ l de sperme pur dans 4 ml de sérum physiologique). 1 ml de cette dilution est prélevé pour lecture directe de la D.O. et qui correspondra à une valeur de concentration donnée sur la courbe d'étalonnage.

B. Techniques de conservation de la semence ovine

Juste après la mesure de la concentration, la semence est diluée selon le mode de conservation.

1. En milieu liquide

Cette forme de conservation est effectuée selon les étapes suivantes :

a) Préparation du dilueur

La veille de la collecte, 11,1g de lait écrémé en poudre est dilué dans 100 ml d'eau bidistillée et chauffé à 95°C pendant 15 mn dans un bain-marie dans un flacon fermé. Il est refroidi à température ambiante et conservé jusqu'à la collecte à 4°C.

b) Dilution de la semence

Au moment de la collecte, le dilueur est réchauffé dans un bain-marie à 34°C pour procéder à la prédilution afin de minimiser le temps pendant lequel le sperme reste pur. Le dilueur est ajouté à une quantité équivalente à celle du sperme. Un complément de dilueur est rajouté pour arriver à une concentration finale de 1 milliard de spz/ml de semence, toujours à 34°C. Selon le volume final obtenu, il est nécessaire de rajouter de la gentamicine à une dose de 50 μ g/ml de semence pour éviter toute activité bactérienne lors de la conservation.

c) Conditionnement de la semence

Après la dilution, la semence est mise dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. 1 ml de semence est déposé dans chaque tube. Six composés supposés exercer une action de protection des spermatozoïdes au cours d'une conservation de longue durée sont additionnés à concentrations égales dans le dilueur : 1 milliMolaire (mM), 2,5 mM, 5 mM, 10 mM et 25 mM. Pour des raisons de confidentialité industrielle, la nature de ces composés n'est pas mentionnée dans ce document. Les composés seront nommés A, B, C, D, E ou F. La concentration de 25 mM ne concerne que le composé A, elle n'a pas pu être testée pour les autres composés pour des problèmes de précipitation à fortes concentrations. 2 tubes témoins sont prévus avec chaque manipulation.

d) Diminution de la température à 15°C et conservation

Les tubes ainsi conditionnés sont bien fermés pour préserver de bonnes conditions d'anaérobie et mis à équilibrer dans un incubateur réfrigéré à une température de 15°C. L'analyse automatisée de la motilité est faite après 3 h d'équilibration pour le J0, après 27 h pour le J1 et après 51 h pour le J2.

2. A l'état congelé

Comme pour la première technique, la congélation suit elle aussi plusieurs étapes :

a) Préparation des deux dilueurs

Pour la congélation, il est nécessaire de préparer deux dilueurs différents (Annexes 4 et 5) :

1^{er} dilueur : Lactose jaune d'œuf

10,3 g de lactose sont dissous dans 100 ml d'eau bidistillée stérilisée. Cette solution est chauffée pour faciliter la dissolution. Cette solution se conserve jusqu'à 5 jours à 4°C.

Le jour de la collecte, 20 ml de jaune d'œuf sont ajoutés à 80 ml de lactose dissout (soit 20% de jaune d'œuf final).

2^{ème} dilueur : lait glycérol

15,1 g de poudre de lait écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau bidistillée et mis à bouillir pendant 15 mn au bain-marie.

Après refroidissement à température ambiante, 10 ml de glycérol sont ajoutés à 90 ml de lait (soit 10 % de glycerol final).

La gentamicine est ajoutée à une concentration finale de 50 µg/ml. Ce dilueur est conservé à 4°C même au moment de la dilution.

b) Dilution de la semence

Après mesure du volume, de la motilité massale et de la concentration, la semence est prédiluée avec le dilueur 1 avec un volume égal à celui du sperme. Le tube de cette première dilution est maintenu dans un verre plein d'eau, et mis pour équilibration à 4°C pendant 3 h dans une chambre froide (+6°C).

Le complément de la dilution est effectué avec le dilueur 2, après le calcul du volume à ajouter pour obtenir une concentration finale de 800×10^6 spz/ml. Le dilueur 2 est incorporé en trois étapes successives en laissant équilibrer à chaque fois pendant $\frac{1}{4}$ h à 4°C. Le contrôle de la température est suivi avec un thermomètre placé dans l'eau qui entoure le tube.

Cette expérience a été réalisée dans trois conditions différentes. Le composé A a été ajouté à différentes concentrations (5, 10 et 50 mM) et à différentes étapes : dans le dilueur 1, dans le dilueur 2 et juste avant la congélation.

c) Conditionnement de la semence dans des paillettes

Le conditionnement se fait par aspiration de la semence dans des paillettes de 0,25 ml. Les paillettes sont différenciées par leur couleur selon la concentration du composé ajouté : vertes pour la semence témoin, rouges pour la semence avec le composé à 5 mM, jaunes pour 10 mM et bleues pour 50 mM. Les paillettes sont par la suite obturées avec de la poudre polyvinylique.

d) Congélation dans de l'azote liquide et conservation

Les paillettes sont disposées de façon à baigner pendant 8 mn dans les vapeurs d'azote (-75°C). Elle seront plongées juste après dans l'azote liquide à -196°C où elles seront conservées.

C. Analyse automatisée de la semence

La motilité de la semence conservée à 15°C est analysée après un temps d'équilibration et de conservation de 3 h, 27 h et 51 h (J0, J1, J2). Pour cela, la semence est diluée à une concentration finale de $20 \cdot 10^6$ spz/ml dans du PBS-BSA à 37°C (Annexe 8).

Pour la semence congelée, les paillettes sont décongelées directement dans une eau à 30°C. La semence est diluée à une concentration finale de $20 \cdot 10^6$ spz/ml dans du PBS-BSA à 37°C.

L'analyse a été effectuée avec 2 répétitions par échantillon et un nombre minimum de 500 spermatozoïdes (≈ 3 champs) pour chaque répétition. Les tubes de dilution sont incubés pendant 5 mn dans un bain-marie à 37°C avant l'analyse à l'HTM.

L'HTM (Hamilton Thorn Motility Analyser, HTM-2000, version 12.0L) est un analyseur automatisé, programmé au préalable pour l'analyse de la semence du bélier. De nombreuses mesures ont été réalisées pour déterminer la moyenne des paramètres de taille, de brillance et de vitesse des spermatozoïdes du bélier. Ces paramètres sont entrés en mémoire et permettent à l'appareil de reconnaître les spermatozoïdes parmi les impuretés du dilueur ou les autres cellules.

Les mesures effectuées pour caractériser la motilité des spermatozoïdes sont les suivantes (figure 1) (Hamilton, 2000) :

- VCL = track speed : c'est la vitesse moyenne des vitesses du spermatozoïde mesurées entre chaque point de son déplacement.
- VAP = Path velocity : c'est la vitesse moyenne du spermatozoïde sur le tracé lissé effectué lors de son déplacement.
- VSL = Progressive velocity : c'est la vitesse moyenne du spermatozoïde sur une distance linéaire entre le point de départ et le point d'arrivée.
- LIN = Linéarity : c'est la valeur moyenne du ratio VSL/VCL. Elle mesure le niveau d'éloignement du spermatozoïde de sa voie.

$$\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$$

- STR = Straightness : c'est la valeur moyenne du ratio VSL/VAP. Elle mesure le niveau d'éloignement du spermatozoïde de son chemin.

$$\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$$

- ALH = Amplitude of Lateral Head displacement : définie comme la largeur moyenne de la surface maximale balayée par les oscillations de la tête du spermatozoïde par rapport à sa voie de déplacement. L'ALH n'est mesurée que chez les spermatozoïdes qui présentent une STR > 80% (seuil des progressifs) et n'est pas mesurée chez les spermatozoïdes lents.
- Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs : c'est le pourcentage des spermatozoïdes progressant à une vitesse VAP $\geq 75\mu\text{m}/\text{sec}$ avec une STR $\geq 80\%$.

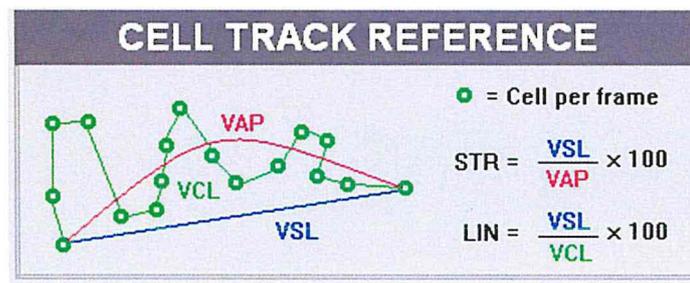


Figure 1: Caractéristiques de l'analyse automatisée de la motilité des spermatozoïdes (Hamilton, 2004)

D. Analyses statistiques des données

Les paramètres de mobilité de la semence mesurés au cours de la conservation ont été analysés par analyse de variance avec la procédure GLM du logiciel SAS. Les effets des composés, de la dose utilisée et de la durée de conservation ont été évalués par le test de Student Newman Keuls avec un seuil de signification inférieur à 5 %.

Troisième partie : Résultats et discussion

A. Obtention d'une courbe d'étalonnage d'un spectrophotomètre

La relation entre la concentration en spermatozoïdes dans un milieu biologique et la densité optique du milieu mesurée au spectrophotomètre est utilisée pour établir une courbe d'étalonnage en vue de déterminer la concentration en spermatozoïdes.

Trente huit éjaculats de béliers ont été utilisés pour établir cette courbe d'étalonnage. La variabilité individuelle ainsi que les différentes dilutions utilisées nous ont permis d'avoir une grande dispersion des concentrations en spermatozoïdes le long de la courbe.

L'équation de la droite ainsi obtenue est :

$Y = 38,595D.O. - 0,4066$ avec un coefficient de détermination $r^2 = 0,94$ (figure 2).

(Y étant la concentration en spermatozoïdes (en millions par ml) et D.O. la densité optique).

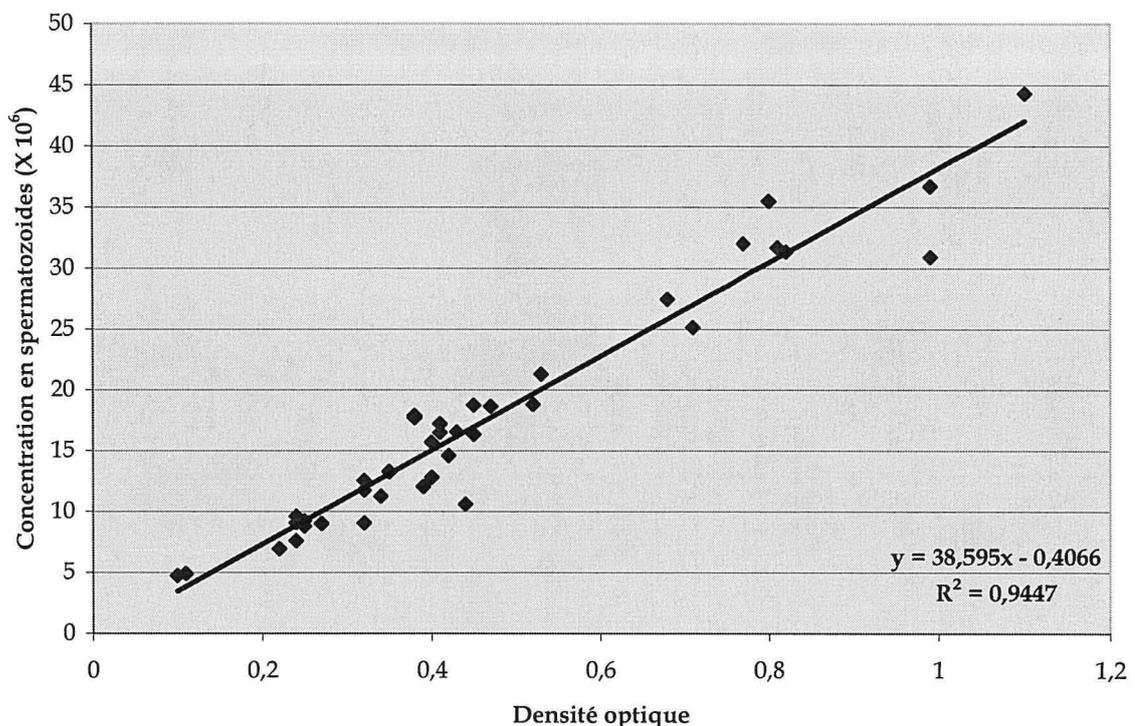


Figure 2 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre

B. Mesures du volume, de la motilité massale et de la concentration des pools de semences conservées

Le volume moyen de l'éjaculat est de $0,98 \pm 0,37$ ml. Dans le tableau 1, notons que le volume varie entre un minimum de 0,2 ml et un maximum de 2,7 ml. Cette variation est observée d'un éjaculat à un autre mais elle est plus marquée entre les individus.

La motilité massale varie entre 3 et 5. Toutefois, les éjaculats inférieurs à une note inférieure à 4 ne sont pas inclus dans les pools, cas du bélier N°4 qui présente dans la moitié des collectes une motilité égale à 3 (tableau 2, Annexe 1).

La concentration en spermatozoïdes des pools conservés varie de 4,1 à $9,8 \cdot 10^9$ spz/ml avec une moyenne de $6,6 \pm 2,1 \cdot 10^9$ spz/ml (tableau 3).

Tableau 1 : Volumes des éjaculats des pools conservés

N° du bélier	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6
9	2,7	1,5	1,2	1,2	1,4	1,3
4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,6	0,45
18	0,3	0,6	1,2	0,4	1	1
13	1,2	1,1	1,5	0,5	0,7	0,7
11	1	1	1,1	0,6	1,8	1,2
24	1,2	1	1,1	1	1,2	0,8

Moyenne : 0,98 ml Ecart-Type : 0,37 Max : 2,7 ml Min : 0,2 ml

Tableau 2 : Motilité massale des éjaculats des pools conservés

N° du bélier	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6
9	4	5	5	5	5	4
4	4	5	4	4	4	5
18	5	5	5	4	5	5
13	5	5	5	5	5	5
11	5	5	4	5	4	4
24	3	3	4	3	4	4

Tableau 3 : Concentration des pools conservés

N°série	Concentration (milliards spz/ml sperme)
Série 1	9,8
Série 2	4,1
Série 3	7,2
Série 4	5,1
Série 5	5,5
Série 6	7,9

Moyenne : 6,6 milliards
Ecart type : 2,1
Min. : 4,1 milliards, Max. : 9,8 milliards

C. Evolution de la motilité de la semence conservée (de J0 à J2)

1. Semence conservée à l'état liquide (15°C)

a) Dilueur + composé A (figure 3)

Nous n'observons aucun effet positif du « dilueur+A » sur le taux de spermatozoïdes progressifs, sur les 2 jours de conservation. A fortes doses (10 et 25 mM), nous constatons une diminution significative à J1 et J2 ($p < 0.01$).

La VCL est significativement augmentée à partir de 10 mM à J0 et à partir de 5 mM à J1 et J2. L'effet dose est important à J0 mais diminue au cours de la conservation. Ainsi la dose de 25 mM entraîne une forte augmentation (+50 %) dès J0 mais cet effet spécifique à haute dose ne se maintient pas dans le temps puisque la VCL à J1 et J2 n'est plus différente à 10 et 25 mM.

L'ALH présente une dose réponse similaire à celle observée pour la VCL. La dose de 25 mM à J0 induit également une forte augmentation de l'ALH.

b) Dilueur + composé B (figure 4)

Le dilueur additionné du composé B n'a lui aussi aucun effet positif sur le taux de spermatozoïdes progressifs sur les deux jours de conservation. Une diminution de ce taux est observée à J1 et J2 pour les deux doses 5 et 10 mM ($p < 0.05$).

La VCL est légèrement augmentée à J1 à partir de 2,5 mM ($p < 0.05$). Cette dose semble également optimale à J2 même si l'effet n'est pas significatif. L'augmentation de l'ALH est très significative pour le J2 en particulier en comparant le témoin aux doses de 5 et 10 mM.

c) Dilueur + composé C (figure 4)

Une légère augmentation des spermatozoïdes progressifs pour les deux doses 1 et 2,5 mM est observée à J0. Pour J1 et J2 l'effet est nul et est même négatif à 10 mM. La VCL augmente significativement à J1 à partir de 5 mM. Pour les J0 et J2, aucun effet n'est observé.

L'ALH est supérieure au témoin à la dose de 10 mM particulièrement pour J2.

d) Dilueurs + composés D, E ou F (figure 4)

Concernant ces trois dilueurs, aucune amélioration n'a été constatée sur les 48 h de conservation. Par contre des effets négatifs très marqués sont constatés sur le taux de progressifs, visibles à J2 à la dose de 10 mM pour les trois dilueurs et à J1 à la dose de 5 mM pour les dilueurs E et F. Un effet négatif est observé aussi sur la VCL à J1 et J2 à partir de 2,5 mM du dilueur additionné du composé F.

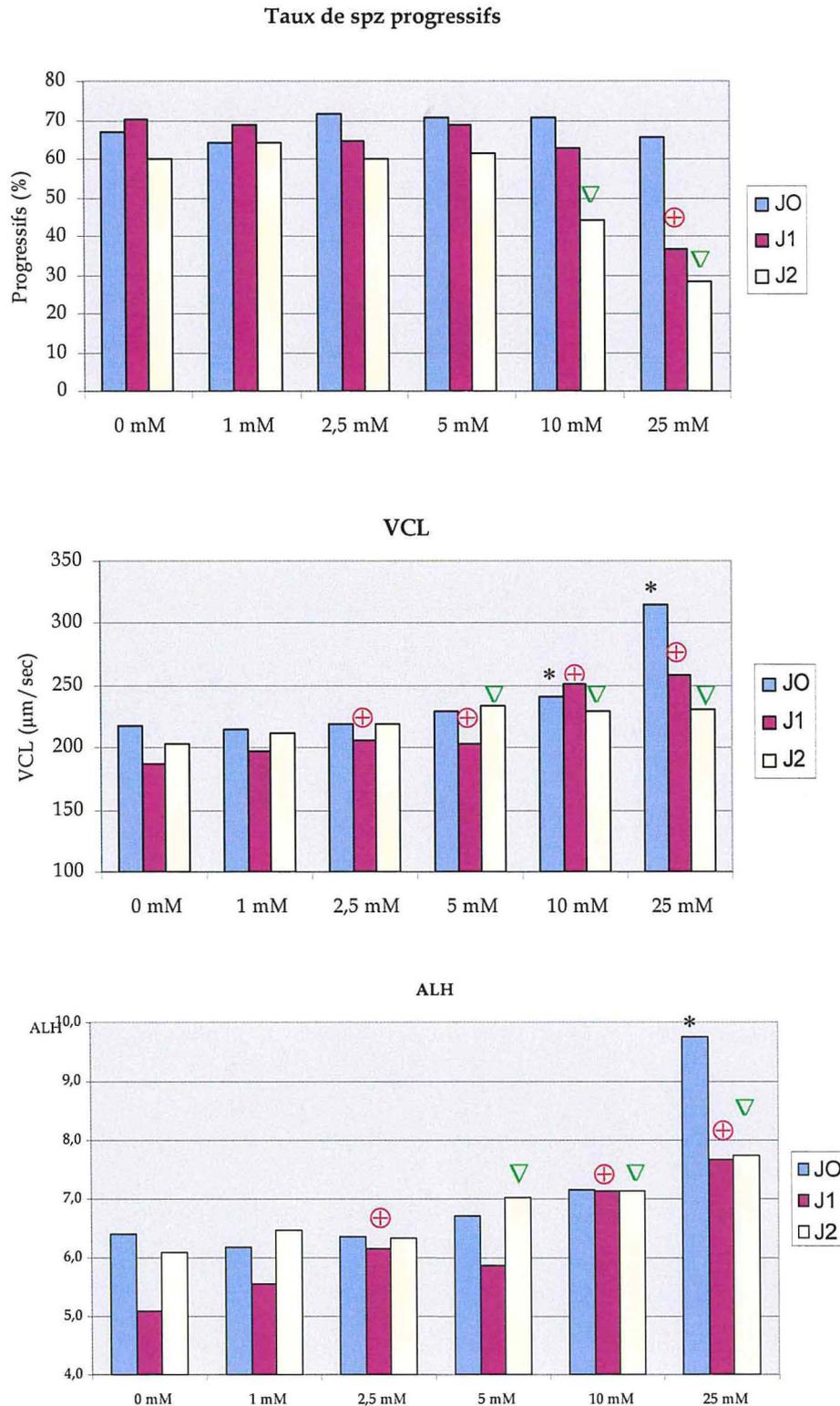


Figure 3 : Mobilité des spermatozoïdes au cours de la conservation pendant 48 h à 15°C dans le dilueur additionné du composé A. Les données représentent la moyenne de 3 expériences différentes.

* indique une différence significative par rapport au témoin pour J0 ($p < 0.05$)

⊕ indique une différence significative par rapport au témoin pour J1 ($p < 0.05$)

▽ indique une différence significative par rapport au témoin pour J2 ($p < 0.05$)

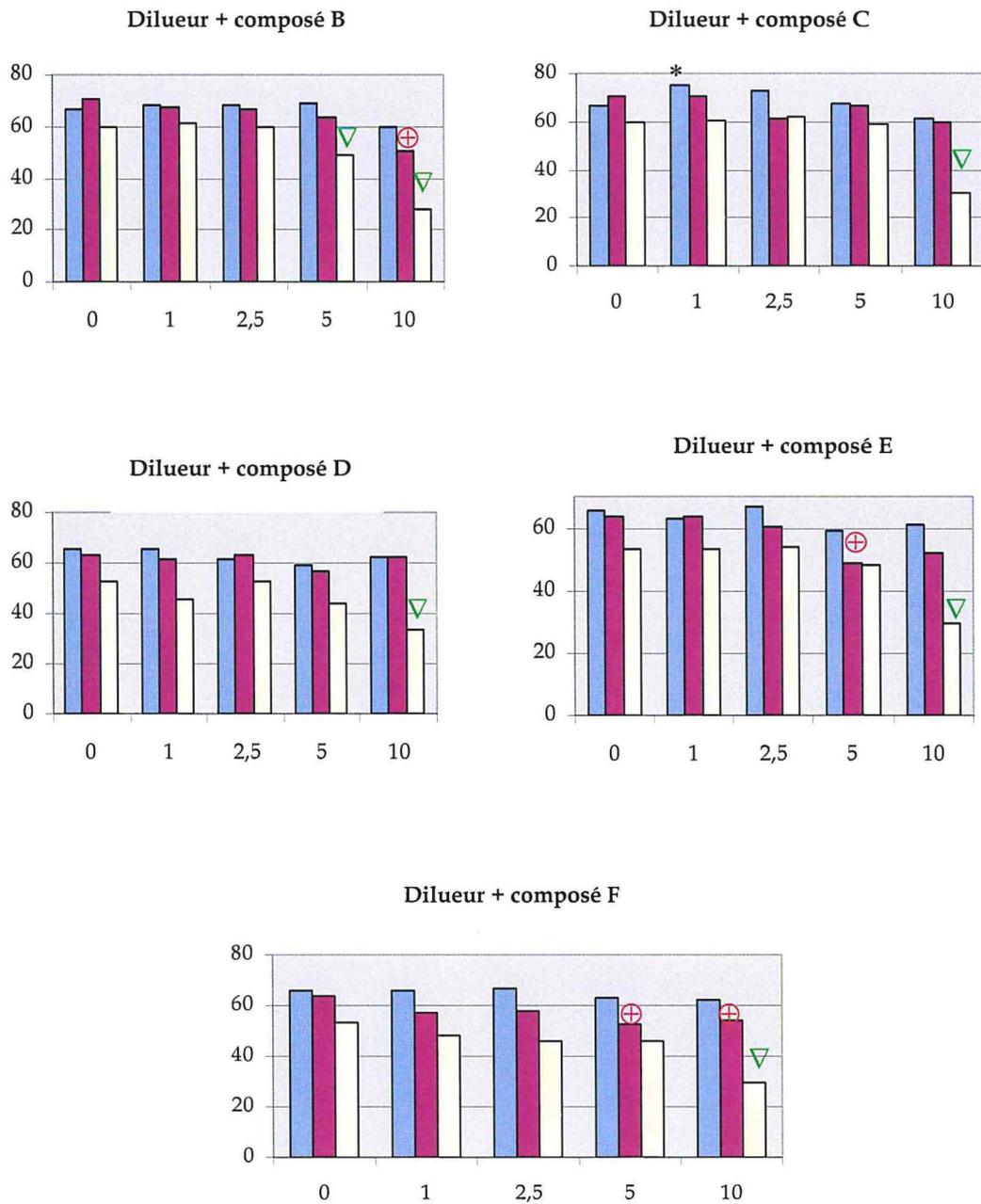


Figure 4 : Mobilité des spermatozoïdes (taux des spz. progressifs) au cours de la conservation pendant 48 h à 15°C dans le dilueur additionné des composés B, C, D, E, ou F. Les données représentent la moyenne de 3 expériences différentes.
 * indique une différence significative par rapport au témoin pour J0 (p<0,05)
 ⊕ indique une différence significative par rapport au témoin pour J1 (p<0,05)
 ∇ indique une différence significative par rapport au témoin pour J2 (p<0,05)

2. Semence congelée (figure 5)

a) « A » ajouté dans le dilueur 1

En comparant avec le témoin, nous constatons que le taux de spermatozoïdes progressifs est amélioré de 9% sous l'effet de A en particulier à 5 mM.

La VCL ne présente une amélioration que pour la dose de 5 mM. Pour les deux autres concentrations, l'effet est plutôt négatif.

L'ALH augmente nettement elle aussi à 5 mM et légèrement moins à 10 mM.

L'ajout de A à ce niveau de la dilution semble être bénéfique aux trois paramètres à la dose de 5 mM.

b) « A » ajouté dans le dilueur 2

L'incorporation de A à ce niveau de la dilution accroît de 18% le taux des progressifs à une dose de 10 mM. Pour la VCL, on note une seule légère augmentation de 20 μ m/s à la dose de 5 mM.

c) « A » ajouté juste avant la mise en paillettes

Aucun effet significatif n'est observé sur les deux premiers paramètres de motilité dans ce cas de figure si ce n'est l'effet négatif noté aux doses de 5 et 50 mM.

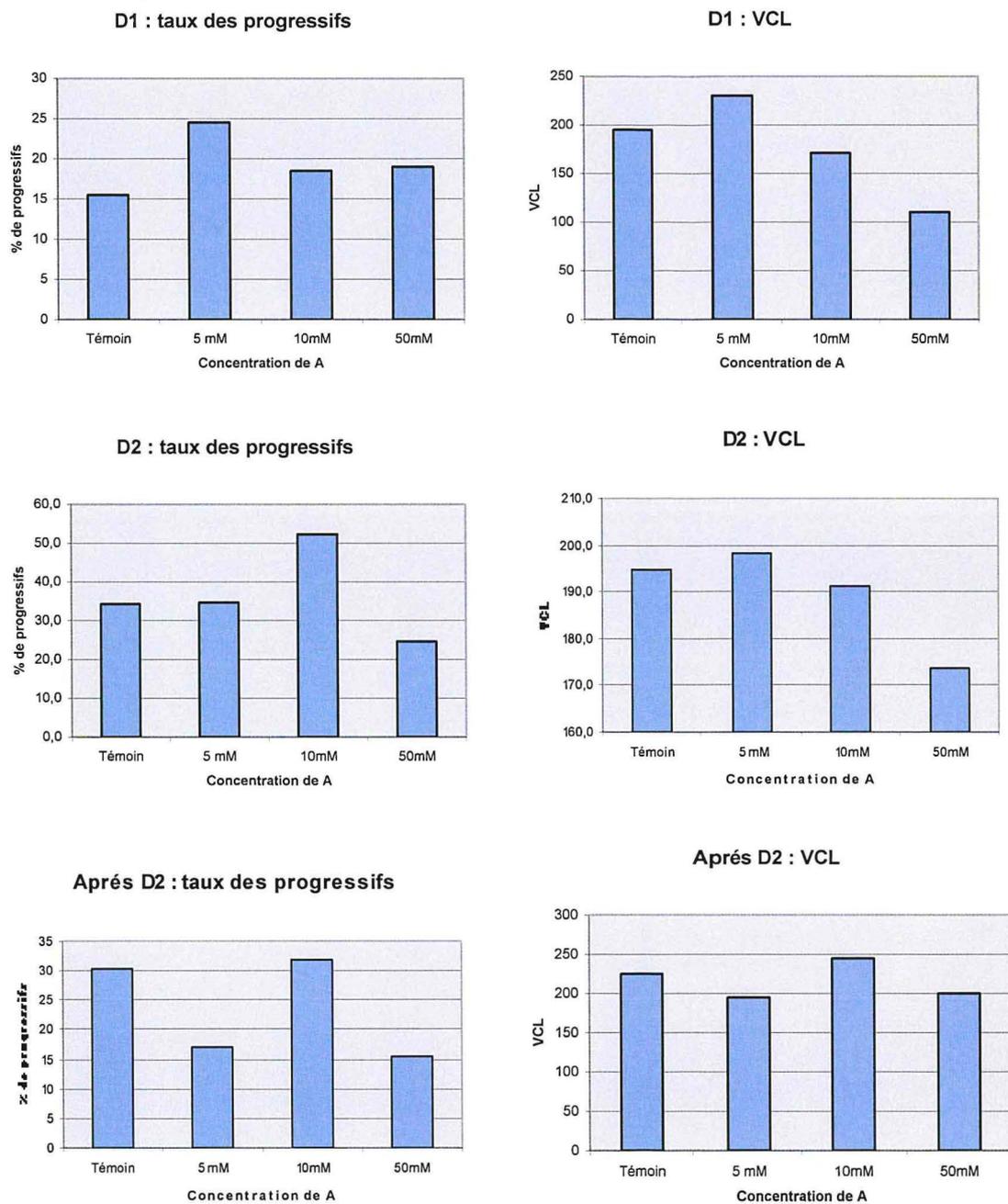


Figure 5: Mobilité des spermatozoïdes après congélation. Au cours de 3 expériences successives ou le composé A a été ajouté à trois étapes différentes :
 Dans le dilueur 1
 Dans le dilueur 2
 Juste avant la mise en paillette (avant congélation)

- CONCLUSION

La réussite de l'IA repose sur la qualité de la semence inséminée. C'est pour cela que la recherche s'intéresse de très près à des méthodes qui permettent d'utiliser le sperme, frais ou congelé, de la façon la plus efficace possible, et sur un rayon touchant les régions les plus éloignées des centres de collecte. Ceci exige une conservation du sperme la plus longue possible, sans que les changements de conditions puissent en altérer le pouvoir fécondant, ainsi qu'une parfaite réussite dans l'organisation de la synchronisation des opérations de préparation de la semence, de transport et d'utilisation.

Le maintien et/ou l'amélioration d'une motilité progressive est nécessaire pour permettre à un grand nombre de spermatozoïdes déposés lors de l'IA, de migrer dans le tractus génital de la femelle et de féconder l'ovule.

Le contrôle de la motilité de la semence est étroitement lié à la maîtrise de l'oxydation des spermatozoïdes par l'utilisation de dilueurs additionnés de composants limitant cette action.

L'étude que nous avons menée consiste à comparer des dilueurs de conservation de la semence du bélier sous la forme liquide (15°C) pour une utilisation au delà de la limite des 10 h (après collecte), et sous forme congelée afin d'améliorer sa qualité après décongélation.

Les résultats de la conservation de la semence fraîche nous ont permis de constater que l'ajout dans les dilueurs des composés A, B et C a permis de modifier le mouvement des spermatozoïdes en particulier pour les doses de 5 et 10 mM. Cette modification se traduit par l'augmentation à J1, de la VCL à un premier degré et de l'ALH à un degré moindre.

De façon générale le taux de progressifs n'est pas influencé par les additifs à l'exception du composant C qui, à une dose de 1 mM, augmente à J0 la progressivité d'environ 8 % en gardant la même vitesse que le témoin.

Notons la particularité du composant A, qui a un effet plus marqué sur la VCL et l'ALH entre 5 et 10 mM, dans le deux premiers jours de conservation (J0 et J1), tout en gardant le même taux de progressifs que le témoin.

Le reste des dilueurs testés ont eu un effet nul ou négatif sur la conservation en frais.

Pour la semence congelée, il est bien clair d'après les résultats que la phase la plus propice pour l'incorporation du composant A est au début de la dilution avec le lait - glycérol. Cette phase est très critique pour les spermatozoïdes car c'est durant cette étape que se fait l'équilibration de la température (descente de 34° à 4°C) et où les gamètes ont besoin le plus de protection. L'ajout de A à ce stade améliore le taux des progressifs de 18%.

A l'issue de cette étude, nous constatons que les composés A, B et C modifient le mouvement des spermatozoïdes et leur permettent d'augmenter leur résistance dans le temps. Ceci peut se traduire *in vivo* par une meilleure survie des spermatozoïdes dans le tractus génital de la brebis et de là une meilleure fertilité.

Cependant, les résultats obtenus doivent être confirmés par plus d'essais. Des études complémentaires devront être envisagées afin d'établir les doses précises de composants à ajouter pour une motilité optimale des spermatozoïdes. Il serait important de compléter cette étude par des essais de fertilité *in vivo*.

- BIBLIOGRAPHIE

Alencar de Araujo A. 2000. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. Tours : Université François Rabelais, 80p. Thèse (Dr. Sciences de la vie).

Baril G., Chemineau P., Cognie Y, Guerin Y, Lebœuf B., Orgeur P. et Vallet J.C. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO production et santé animale N°83, Rome - Italie, 231p.

Blackshaw A.W., 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. Australian Journal of biology Science, N°7, p 82

Boukhliq R. 2002. Cours en ligne sur la reproduction ovine : I.A. utérine par voie laparoscopique [En ligne] [2005/04/28]
<URL : <http://www.refer.org.ma/ovirep/cours4/ialaparo2.htm>

Chevrier C, 1990. Motilité des spermatozoïdes de mammifères et facteurs susceptibles de l'influencer. Tours : Université François Rabelais, 92p. Thèse (Dr. Sciences).

Colas G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. Fert., N°42, p 277-285.

Colas G., Tryer M., Guerin Y., Aguer D. 1980. Survival and fertilising ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. Proceeding du 9^{ème} congrès sur la Reproduction Animale et Insemination Artificielle, Madrid, 1980.

Evans G., Waxwell W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney , Butterworths, 200 p.

Gabina D. 1990. Les nouvelles techniques de la reproduction et les programmes de sélection chez les ovins laitiers, p49-55. In Les petits ruminants et leurs productions laitières dans la région méditerranéenne, Options Méditerranéennes, série. A N°12, 1990, éd : CIHEAM -IAM Montpellier France.

González López, J., Espejo Díaz M., Brice, G., Jardon, C. 1980. Insémination Artificielle de brebis avec de la semence fraîche à grande distance du lieu d'insémination, p 129-134. Options Méditerranéennes, N°81/III, 1980, éd : CIHEAM -IAM Saragosse.

Hamilton Thorne Research, 2000. Technical Guide for IVIS, TOX IVOS, CEROS, october 31, 2000. Version 12. Ed. Hamilton Thorne Research, USA.

Hamilton Thorne Biosciences, 2004. IVOS and CEROS Sperm Analyzers. [en ligne] [2005/07/13]

<URL : <http://www.hamiltonthorne.com/research/documentation/demo.htm>

I.N.R.A., 2005. Fiche : Insémination Artificielle [En ligne] [2005/02/08]<URL :

<http://www.inra.fr/Intranet/Directions/DIC/SAQfiches/inseminartif.htm>

Lebœuf B., Restall B., Salamon S. 2003. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. Productions animales [En ligne] 16 : 91-99 [2005/04/26]

<URL : <http://www.inra.fr/productions-animales/an2003/tap2003/bl232.pdf>

Magistrini M. 1994. Maturation des spermatozoïdes. Appréciation de la qualité de la semence, p 99-101. In Premières Journées de la Reproduction Animale. Les 3-4-5 juin 1994, Joué-les-Tours France.

Watson P.F., 1981. The role of lipid protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. J. Repro. Fertil. N°4, p 81-92.

ANNEXES

Annexe 1 : Détermination de la note de la motilité massale
(Baril *et al*, 1993)

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide sans tourbillons
5	Motilité massale rapide avec tourbillons

Annexe 2 : Résumé des différentes étapes du traitement de la semence de bélier pour utilisation sous forme liquide (Colas, 1980)

Jour -1		Préparation du dilueur
Jour 0	0 minute	Collecte du sperme (32°C) Mesure du volume et identification du tube de collecte
	30 secondes	Motilité massale + concentration + calcul de la concentration finale Prédilution de l'éjaculat (28-30 °C)
	10 minutes	Dilution finale (28-30°C), bouchage et homogénéisation de la solution. Placer le tube de collecte dans un verre plein d'eau (28-30°C) avec une ampoule congelée d'acide acétique et un thermomètre. Placer le tout dans un réfrigérateur (+6°C)
	40 minutes	Conditionnement en mini paillettes (0,25ml) et conservation dans une bouteille thermos avec une ampoule d'acide acétique
	8 heures	Limite pour l'utilisation en I.A.

Annexe 3 : Préparation du dilueur pour la semence de bélier utilisée sous forme liquide (un jour avant la collecte de semence) (Colas, 1980)

- 100 ml d'eau bidistillée, stérilisée
 - Chauffer à 60°C
 - Dissoudre 0,33 g de sulfamides
 - Refroidir à 20-25°C
 - Dissoudre 11,1 g de poudre de lait de vache écrémé
 - Faire bouillir au bain-marie durant 15 minutes
 - Refroidir à température ambiante
 - Ajouter 0,11 g de streptomycine et 100 000 UI de pénicilline
 - Conserver à 4°C à 2 à 3 jours au maximum
-

Annexe 4 : Résumé des différentes étapes du traitement de la semence de bélier pour utilisation sous forme congelée (Colas, 1975)

Jour -1		Préparation des dilueurs
Jour 0	0 minute	Collecte du sperme (32°C) Mesure du volume et identification du tube de collecte
	30 secondes	Motilité massale + concentration + calcul de la concentration finale Prédilution de l'éjaculat (28-30 °C)
	10 minutes	Dilution finale avec le dilueur 1 (28-30°C), bouchage et homogénéisation de la solution. Placer le tube de collecte dans un verre plein d'eau (28-30°C) avec une ampoule congelée d'acide acétique et un thermomètre. Placer le tout dans un réfrigérateur (+6°C)
	2 h 10 min	Ajouter la première partie du dilueur 2 (+4°C)
	2 h 30 min	Ajouter la deuxième partie du dilueur 2 (+4°C)
	4 heures	Conditionnement en paillettes (0,5ml) et congeler dans les vapeurs d'azote pendant 8 minutes et conserver dans l'azote liquide (-196°C)

Annexe 5 : Préparation des dilueurs 1 et 2 pour la semence de bélier utilisée sous forme congelée (Colas, 1975)

Dilueur 1 : Lactose - jaune d'œuf

- Dissoudre 10,3 de lactose dans 100 ml d'eau bidistillée, stérilisée (cette solution peut être conservée 5 jours à +4°C)
- Chaque jour d'utilisation, dissoudre 20 ml de jaune d'œuf dans 80ml de la solution précédente

Dilueur 2 : Lait écrémé glycérolé

- Identique au dilueur utilisé pour la semence liquide (voir plus haut), auquel sont ajoutés 0,4g de lait écrémé en poudre par 100 ml, afin d'accroître la pression osmotique jusqu'à 450 milliosmoles
 - Ajuster à un pH de 6,6 - 6,7 avec du citrate trisodique
 - Ajouter le glycérol dans le rapport de 9 parts de la solution précédente à 1 part de glycérol
 - Ajouter le dilueur 2 afin d'aboutir à une concentration finale de glycérol de 4 pour cent dans la semence à congeler
-

Annexe 6 : Mesure de la concentration au spectrophotomètre.

PRINCIPE DE LA METHODE ET TYPES D'APPAREILS

Principe : un faisceau lumineux d'intensité I_0 à traverser l'éprouvette d'épaisseur L contenant une solution de concentration C . Une partie de la lumière est absorbée par le produit, l'autre partit à traverser la solution et se mesure à l'aide d'un appareil de mesure. Cette mesure permet de déterminer la concentration du produit. Une certaine approximation est faite en appliquant des corrections de réfraction.

Relation de Beer-Lambert $I = I_0 e^{-KCL}$
 Dans laquelle I est une caractéristique du produit, C , la concentration et L l'épaisseur de l'éprouvette traversée par le rayon.
 On appelle densité optique D_0 l'expression $D_0 = KCL$ avec même épaisseur $D_0 = KCL$
 Si $L=1$, pour un même produit la concentration est proportionnelle à la densité optique.

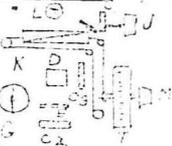
Deux circuits types et utilisés le plus dans les centres d'insémination :

LUMETRON : appareil de mesure gradué en D_0 , échelle logarithmique. **SCBIN-YVON** : appareil gradué en D_0 de comparaison gradué en D_0 de mesure.

MATÉRIEL

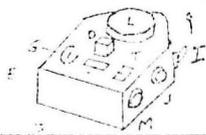
Dilution : même matière que pour la numération de 6 à 10 cmètre. On l'aide d'homogénéisateur.

Mesure : spectrophotomètre SCBIN-YVON



C_1, C_2 et C_3 : cellules photoélectriques. C_1 (traverse) est montée en opposition avec C_2 pour la mesure de la densité optique. C_3 pour la mesure de la densité optique.

- 1. Lampe
- 2. Lentille
- 3. Fente
- 4. Détecteur
- 5. Courant continu
- 6. Bobine de tarage
- 7. Tamis pour éliminer les D_0 de D_0
- 8. Détecteur de mesure
- 9. Galvanomètre
- 10. Courant continu
- 11. Courant continu



- Précautions à prendre :**
- la pression d'entrée du transformateur sera en celle des cellules.
 - le commutateur est en la position de mesure.
 - la cure ou le tube est à l'extérieur.
 - le tamis est à la position 100.
 - le filtre en papier est à l'extérieur de l'appareil (si celui-ci est présent).

MESURE

1. Brancher l'appareil et laisser chauffer pendant 15 minutes.
2. Préparer une dilution de spermatozoïdes dans le sérum physiologique tamisé (voir le chapitre précédent).
3. Remplir la cure avec le sérum physiologique mélangé dans la dilution. Placer la cure dans son logement, face droite vers la gauche (côté galvanomètre).
4. A l'aide du bouton de tarage amener l'aiguille du galvanomètre en face du trait de repère.
5. Vider la cure du sérum qu'elle contient, la rincer avec de la dilution, puis la remplir de dilution préalablement homogénéisée.
6. Attendre 4 minutes et ramener l'aiguille en face du repère en déplaçant le tamis.
7. Lire la graduation du tamis qui se trouve en face du trait de repère et se reporter à l'échelle.

TRACE DE L'ABACQUE

1. Recueil des données

X	Y
27	1340
29	1120
35	1350
...	...
119	1100
ΣX	ΣY
\bar{X}	\bar{Y}

Sur un millimètre de 80 carreaux qu'on divise par 100 pour les axes. On trace une même échelle de 0 à 100 sur les deux axes, sans faire une lecture sur le spectrophotomètre et reporter le résultat dans la colonne \bar{X} et \bar{Y} du tableau ; l'autre part consiste à numérotiser les carreaux et à noter la moyenne dans la colonne \bar{X} et \bar{Y} du tableau. Calculer \bar{X} moyenne des données de la colonne \bar{X} .

2. Trace rapide de la droite

Porter sur un graphique des points pour les coordonnées \bar{X} et \bar{Y} de chaque ligne du tableau. Les points s'alignent.

Faire la moyenne \bar{Y} de tous les \bar{Y} et \bar{X} . Faire la moyenne \bar{X} des \bar{X} et \bar{Y} . Porter sur le graphique le point B de coordonnées \bar{X} et \bar{Y} .

De même faire la moyenne \bar{Y} des \bar{Y} et \bar{X} et celle \bar{X} des \bar{X} et \bar{Y} . Porter le point B de coordonnées \bar{X} et \bar{Y} et tracer AB.

3. Paramètres de la droite de régression

a) être tracé par le point moyen \bar{X} et \bar{Y} de coordonnées \bar{X} et \bar{Y} .

b) la pente est calculée en tenant compte de ce que les \bar{X} et les \bar{Y} sont en fonction de \bar{X} et \bar{Y} .

$$b = \frac{COV X Y}{\sigma^2 X}$$

Annexe 7 : Comptage des spermatozoïdes à l'hématimètre.

PRÉPARATION DU SÉRUM PHYSIOLOGIQUE FORMOLÉ



- 1) compléter avec de l'eau jusqu'au trait de jauge
- 2) ajouter 20ml de formol du commerce - homogénéiser
- 3) introduire 500 à 600 ml d'eau osmométrique pour d'osmose le sel
- 4) 9g de sel ordinaire

Filtrer et conserver dans un récipient à bouchage hermétique

N.B. On peut remplacer le sérum physiologique formolé par de l'eau salée à 5%

MATERIEL

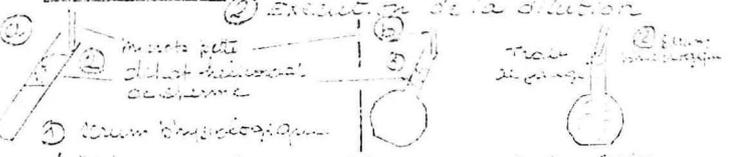
- Dilution
- Pipette de précision de 0,1 ml, burette, œil ou de 1 ml (Verat)
 - pipette de 10 ml graduée en 1/100 et tube à essai de 10 ml
 - flacon jaugé de 50 ml (burette, bélier) ou de 10 ml (Verat)

- Comptage
- microscope, grossissements identifiés phases objectif x25 ou x40
 - Hématimètre (cellule de Thoma ou autre modèle) avec lamelle spéciale
 - Compteur

DILUTION

1) TAUX DE DILUTION RECOMMANDÉS

Espèces	Nb. x	Homogénéisation	
		écumé	écume
Truques	1/100	0,3	0,1
Bouillottes	1/20	20,00	2,25
Verats	1/10	13,5	2,5



Important: il faut exactement mouiller l'opercule du micro-pipette avec un papier filtre et mouiller également du sperme, maintenir la micro-pipette verticalement en la gardant au contact de la paroi intérieure ou face à l'écumé ou au col de la bouillotte. Il faut éviter au lieu qu'il y ait un mouvement de rotation entre l'opercule qui se déplace en accélérant sur la paroi, recrée une bulle.

- 1) Soigner dans la pipette pour insérer les spermatozoïdes par un
- 2) Boucher le récipient (tube ou flacon). Le boucher soigneusement à plusieurs reprises pour obtenir une émulsion homogène de spermatozoïdes.

NUMERATION PROPREMENT DITE



- 1) placer la lamelle lourde sur le hémacytètre
- 2) à l'aide d'un agitateur ou d'une pipette ajouter une goutte de dilution et la laisser sécher le long de la lamelle lourde que la liquide, par capillarité, se répartisse entre la lamelle et la grille qui porte la grille - une fois séché il y a toujours beaucoup de spermatozoïdes dans les rainures au centre de la grille - renouveler l'opération (Fig 1)
- 3) Placer à l'hématimètre sur la platine du microscope et attendre environ 5 minutes pour que les spermatozoïdes se sédimentent et se déposent sur la grille
- 4) En utilisant le compteur, dénombrer les spermatozoïdes sur 5 grands carrés de la grille (Fig 2). Dans le cas où il y a un bon type de spermatozoïdes dans le compteur, on peut aussi compter sur 4 grands carrés en bas de la grille (Fig 3). En ce cas, on compte les spermatozoïdes à cheval sur un grand carré de dilution ne comptant que ceux qui sont à l'intérieur des deux petits carrés adjacents et un autre (Fig 4)

5) Filtrer le sérum en accélérant le long de la paroi

Nombre	Volume	Calcul
100	10000	100 x 10000 = 1000000
100	10000	100 x 10000 = 1000000
100	10000	100 x 10000 = 1000000
100	10000	100 x 10000 = 1000000

Annexe 8 : Composition des milieux d'incubation des spermatozoïdes utilisés au cours des différentes manipulations

Sérum physiologique formolé : Eau bidistillée additionnée de 0,9% de NaCl et 0,1% de formol.

PBS-BSA : 300 mg de BSA dans 100 ml de PBS.

- PBS (milieu phosphate-salin) (Chevrier, 1990) : 136 mM NaCl, 15,6 mM KCl, 6,7 mM Na_2HPO_4 , 2 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 5mM glucose, 2 mM lactate de sodium et 1 mM pyruvate de sodium.
- BSA : Albumine sérique bovine (Bovine Serum Albumin)