

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Mise au point d'un milieu pour la dilution et la conservation du sperme de bélier

LESSIRE, Benoit

*Award date:*  
1991

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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

## Mise au point d'un milieu pour la dilution et la conservation du sperme de bélier

LESSIRE Benoît

### Résumé

Le but de ce mémoire était de mettre au point un milieu pour la dilution et la conservation du sperme de bélier. A cette fin, des comparaisons ont été effectuées entre un dilueur actuellement utilisé en insémination artificielle et notre milieu en ce qui concerne leur capacité à maintenir les spermatozoïdes en vie pendant un laps de temps le plus long possible.

Nous préconisons l'utilisation de tampon HEPES à une concentration de 150 mM avec comme substrat énergétique un mélange équipondéral (1,15g/50ml) de glucose et de fructose, un mélange ionique en  $\text{Na}^+$ /  $\text{Ca}^{++}$  respectivement de 112,5 mg et 12,5 mg/ 50 ml, le tout additionné de 150 mg de sulfanilamide, 2,5 mg de vitamine C et de 2  $\mu\text{l}$  de vitamine E et ce pour une conservation à 14°C.

Ce milieu permet la survie de plus de 60% des spermatozoïdes après 48 heures de conservation, il n'induit pas de réaction acrosomiale prématurée et ne semble pas présenter une toxicité supérieure au milieu actuellement utilisé en insémination artificielle. Il pourrait donc permettre de conserver la semence un temps suffisamment long que pour envisager des inséminations à longues distances.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1991

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J.L. Bister

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon promoteur, M<sup>r</sup> R. Paquay, qui a fait preuve d'une dévotion et d'une patience sans limite lors de la rédaction de ce mémoire.*

*J'exprime aussi ma sympathie au D<sup>r</sup> Jean loup Bister, qui m'a aidé lors de mes recherches expérimentales et qui a su mener à bien ce travail.*

*Que les membres du Laboratoire de Physiologie Animale soient ici remerciés pour leur sympathique assistance et l'accueil qu'ils m'ont réservé.*

*Enfin, j'exprime ma plus profonde reconnaissance à mes parents qui m'ont permis, par leur confiance et leur aide, d'arriver au terme de ces études, ainsi qu'à mes amis et amies pour leurs encouragements et aides multiples.*

TABLE  
DES  
MATIERES

<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Le sperme.....</b>	<b>1</b>
1.1. Le spermatozoïde.....	1
1.1.1. Structure et ultrastructure .....	1
1.1.1.1. La tête .....	1
1.1.1.2. Le col.....	2
1.1.1.3. Le flagelle.....	2
1.1.2. Anomalies morphologiques .....	3
1.1.3. Membrane plasmique.....	4
1.1.3.1. Structure .....	4
1.1.3.2. Composition.....	5
1.1.3.3. Particularités.....	5
1.2. Plasma séminal .....	6
1.2.1. Composition.....	6
1.2.1.1. Sucres .....	6
1.2.1.2. Lipides et prostaglandines .....	7
1.2.1.3. Protéines, acides aminés et enzymes .....	7
1.2.1.4. Stéroïdes .....	8
1.2.1.5. Constituants micellaires de nature organique .....	8
1.2.1.6. Ions.....	8
<b>2. Transformations du sperme dans les voies génitales femelles.....</b>	<b>10</b>
2.1. Elimination du plasma séminal.....	10
2.2. Capacitation .....	10
2.3. Réaction acrosomiale.....	10
2.3.1. Initiation .....	10
2.3.2. Mécanismes .....	11
2.3.3. "L'après-réaction acrosomiale" .....	12
2.3.4. Les inducteurs.....	13
2.3.5. Rôles du calcium.....	13
<b>3. Modifications lors de la conservation de la semence in vitro.....</b>	<b>14</b>
3.1. Pression osmotique et pH.....	14
3.2. Effets toxiques du plasma séminal .....	14
3.2.1. Effets propres au plasma.....	14
3.2.2. Effets des excréta des spermatozoïdes .....	15
3.2.3. Réaction acrosomiale prématurée .....	16
3.2.4. Effets membranaires du refroidissement.....	16

<b>4. Les protecteurs spermatozoïdes.....</b>	<b>17</b>
4.1. Protecteurs antioxydants : les vitamines.....	17
4.1.1. Les vitamines liposolubles.....	18
4.1.2. Les vitamines hydrosolubles.....	18
4.2. Protecteurs membranaires.....	19
4.2.1. La lécithine (phosphatidylcholine).....	19
4.2.2. Le tréhalose.....	19
4.2.3. Les protéines (BSA).....	20
4.3. Antibiotiques.....	20
 <b>CHAPITRE II : OBJECTIFS .....</b>	 <b>21</b>
 <b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.....</b>	 <b>23</b>
<b>1. Animaux expérimentaux.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Prélèvement de la semence.....</b>	<b>23</b>
2.1. Brebis.....	23
2.2. Matériel.....	23
2.3. Méthode.....	23
<b>3. Analyse de la semence.....</b>	<b>24</b>
3.1. Examens macroscopiques.....	24
3.2. Examens microscopiques.....	25
3.2.1. Motilité massale.....	25
3.2.2. Motilité individuelle.....	25
3.3. Examens morphologiques.....	26
3.3.1. Frottis morts/vivants.....	26
3.3.2. Etat de l'acrosome.....	27
3.4. Concentration.....	27
3.5. pH.....	28
3.6. Pression osmotique.....	28
<b>4. Dilution de la semence.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Refroidissement.....</b>	<b>29</b>
5.1. Refroidissement à 30°C.....	29
5.2. Refroidissement à 15°C.....	29
<b>6. Conditions de conservation.....</b>	<b>29</b>
<b>7. Composition et préparation des milieux ayant servi à la mise au point du dilueur.....</b>	<b>29</b>
7.1. Tampons.....	29
7.2. Sucres.....	30

7.3. Ions .....	30
7.4. Antibiotiques.....	30
7.5. Protecteurs .....	31
<b>8. Composition finale et préparation de notre dilueur (LB4).....</b>	<b>32</b>
<b>9. Méthodes d'analyses statistiques.....</b>	<b>32</b>

**CHAPITRE IV : RESULTATS, DISCUSSION, CONCLUSIONS ..... 34**

<b>1. Mise au point du milieu de base et choix d'une température de conservation.....</b>	<b>34</b>
1.1. Essai préliminaire.....	34
1.1.1. Schéma expérimental.....	34
1.1.2. Résultats.....	35
1.1.3. Discussion.....	35
1.1.4. Conclusions.....	35
1.2. Détermination de la molarité optimale du tampon.....	36
1.2.1. Schéma expérimental.....	36
1.2.2. Résultats.....	36
1.2.3. Discussion.....	37
1.2.4. Conclusions.....	37
1.3. Choix de la température de conservation et de la meilleure combinaison tampon-sucres .....	37
1.3.1. Schéma expérimental.....	38
1.3.2. Résultats.....	38
1.3.3. Discussion.....	39
1.3.4. Conclusions.....	40
<b>2. Choix de la meilleure combinaison ionique.....</b>	<b>40</b>
2.1. Schéma expérimental.....	40
2.2. Résultats.....	40
2.3. Discussion.....	41
2.4. Conclusions.....	42
<b>3. Choix d'un antibiotique .....</b>	<b>42</b>
3.1. Schéma expérimental.....	43
3.2. Résultats.....	43
3.3. Discussion.....	43
3.4. Conclusions.....	44
<b>4. Choix de protecteurs spermatiques.....</b>	<b>45</b>
4.1. Schéma expérimental.....	45
4.2. Résultats.....	45

4.3. Discussion.....	46
4.4. Conclusions.....	47
<b>5. Comparaison entre le dilueur actuel INRA et notre dilueur.....</b>	<b>47</b>
5.1. Schéma expérimental.....	47
5.2. Résultats.....	47
5.3. Discussion.....	48
5.4. Conclusions.....	48
<b>6. Comparaison de la fertilité obtenue par insémination artificielle avec les 2 milieux.....</b>	<b>49</b>
6.1. Schéma expérimental.....	49
6.2. Résultats.....	49
6.3. Discussion.....	50
6.4. Conclusions.....	51
<b>CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GENERALES.....</b>	<b>52</b>

**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

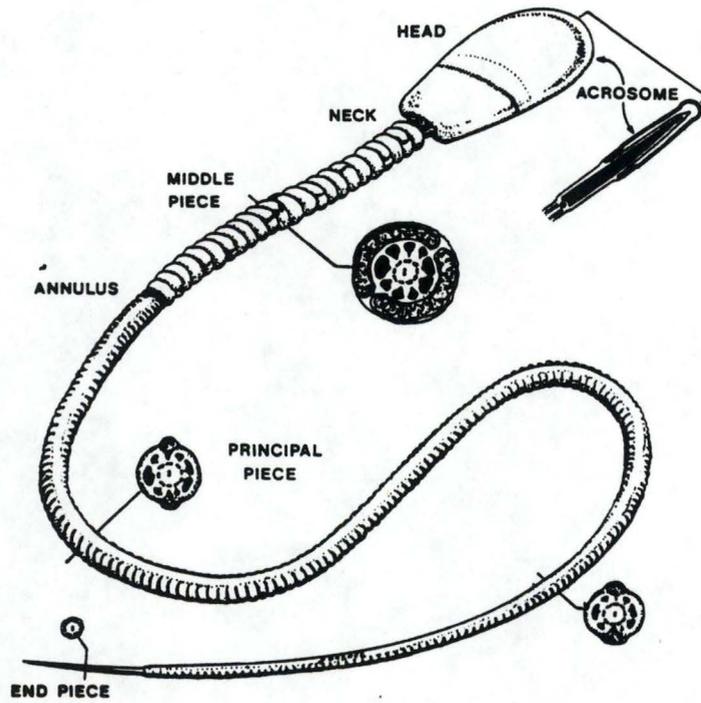


FIGURE 1: Ultrastructure d'un spermatozoïde (HAFEZ, 1980)

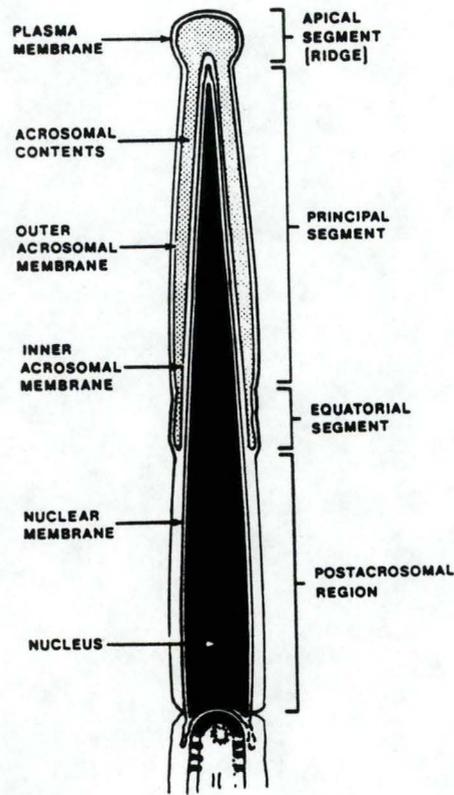


FIGURE 2: Coupe longitudinale de la tête d'un spermatozoïde (HAFEZ, 1980)

## 1. LE SPERME

Le sperme est un liquide blanchâtre émis lors de l'éjaculation. Il est constitué de deux fractions : la fraction cellulaire et la fraction fluide.

La fraction cellulaire comprend les éléments figurés ou spermatozoïdes produits par les testicules.

La fraction fluide est composée du plasma séminal; produit des testicules et des glandes annexes du tractus génital mâle.

### 1.1. LE SPERMATOZOÏDE

#### 1.1.1 Structure et ultrastructure

Le spermatozoïde est caractérisé par une ultrastructure bien spécifique, récemment mise en évidence par la microscopie électronique (fig.1). Il se compose essentiellement d'une tête, d'un col très court et d'un flagelle (de 75 à 80  $\mu\text{m}$ ) (Junqueira et al., 1987).

##### 1.1.1.1. La tête

La tête constitue la partie essentielle du spermatozoïde; elliptique chez le bélier, elle mesure 9  $\mu\text{m}$  de long sur 5  $\mu\text{m}$  de large (fig. 2).

Le noyau occupe un volume considérable. Il est creusé d'un godet d'implantation à sa base, bordée par les protubérances basales. On trouve dans le segment équatorial et à l'apex des vacuoles qui sembleraient provenir de la dissolution du plasma nucléaire au cours de la fixation.

L'acrosome recouvre le noyau dans sa partie antérieure; son épaisseur est de 600 à 700  $\text{Å}$ . Il recouvre la moitié de la tête chez le bélier et définit en grande partie le profil caractéristique de la tête. L'acrosome est bordé d'une simple membrane constituée de lipoglycoprotéines complexes dont la structure varie en fonction de la position de celle-ci par rapport au noyau et à la membrane cellulaire.

Des enzymes telles que l'hyaluronidase, la phosphatase acide, l'arylsulfatase, la  $\beta$ -N acétylglucosaminidase, la phospholipase A<sub>2</sub>, l'acétate estérase et autres protéases sont présentes dans l'acrosome. Ces protéases participent aux processus de fertilisation : l'hyaluronidase et la sulfatase permettent une digestion des substances unissant les cellules du cumulus oophorus (Mann, 1975). L'acrosine qui

se retrouve plus particulièrement dans la partie postérieure de l'acrosome permet la perforation de la zone pellucide de l'ovule (Derivaux et Ectors, 1986).

La coiffe post-nucléaire est, chez le bélier, principalement constituée d'un assemblage de microtubules.

Le perforateur est situé entre l'acrosome et le noyau, à deux endroits différents: dans le pôle antérieur de la tête et dans la zone équatoriale. C'est sans doute une modification de la membrane acrosomiale (Giffroy, 1978).

#### 1.1.1.2. Le col

Le col est une partie brève (2 à 3  $\mu$ ), constituée principalement de cytoplasme, reliant la partie postérieure de la tête à la queue du spermatozoïde.

C'est à cet endroit qu'on retrouve le centriole proximal d'où part l'axonème entouré d'une couronne de fibres pleines; ce filament se prolonge dans la queue. Le centriole proximal est considéré comme le centre de la motilité car même en l'absence de la tête, la pièce intermédiaire et la queue sont capables de mouvements.

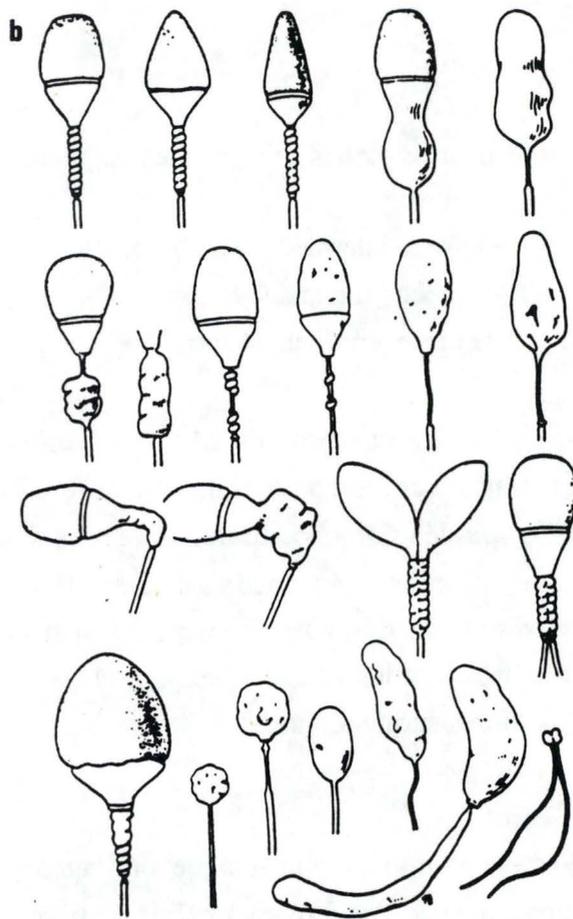
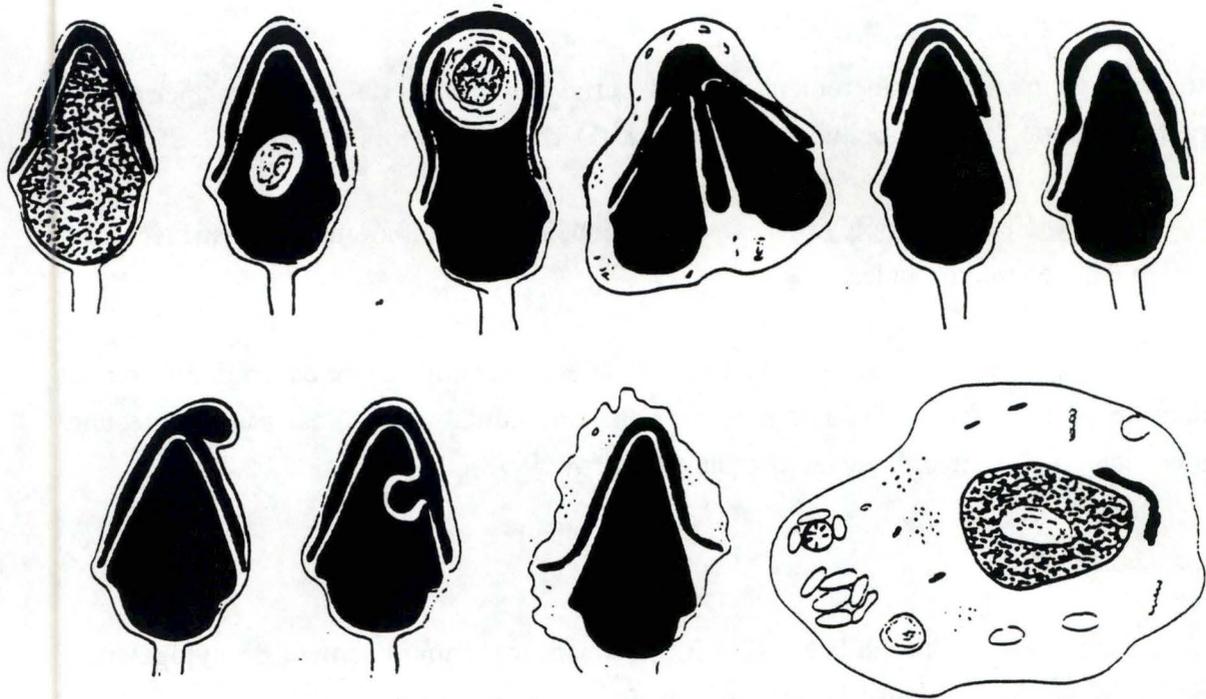
#### 1.1.1.3. Le flagelle.

Le flagelle est constitué de trois parties de différentes longueur:

- la pièce intermédiaire (15  $\mu$ m)
- la pièce principale (45  $\mu$ m)
- la pièce terminale (4  $\mu$ m)

La pièce intermédiaire va du centriole distal jusqu'à un épaissement de la membrane du flagelle: l'annulus ou anneau de Jensen. Elle diffère de la pièce principale par la présence d'une gaine spiralée mitochondriale, composée d'un système de deux hélices jointives interrompues selon une fréquence voisine de 3/4 de tour de spire. Cette gaine contient les enzymes responsables du métabolisme des spermatozoïdes. Au centre de la pièce intermédiaire se trouvent les filaments axiaux (1 paire centrale et 9 paires périphériques) et 9 paires de fibres surnuméraires.

La pièce principale est la portion la plus longue du flagelle. Elle est formée des 10 mêmes paires de filaments axiaux, des 9 mêmes paires de fibres surnuméraires, d'un



FIGURES 3 a et b : Les anomalies morphologiques de la tête (a) DERIVAUX et ECTORS, 1986; b) HAFEZ, 1980)

manchon fibreux (lipoprotéines) présentant deux épaissements latéraux et de la membrane cytoplasmique. Les fibres ont un diamètre qui décroît vers la partie postérieure du flagelle.

La pièce terminale est constituée uniquement des filaments axiaux dont on observe la désorganisation progressive, et de la membrane plasmique.

La structure interne des fibrilles constitutives des fibres et des filaments, et la nature chimique de la protéine fibrillaire (la spermosine) font encore l'objet de nombreuses recherches. Toutefois il paraît évident que les mouvements des spermatozoïdes sont très apparentés à la contraction musculaire et que la spermosine doit avoir de grandes similitudes avec l'actine et la myosine des fibres musculaires squelettiques. De plus des tests cytochimiques ont montré la présence d'ATP au niveau des fibres axiales (Derivaux et Ectors, 1986).

### 1.1.2. Anomalies morphologiques

Des anomalies morphologiques diverses peuvent être observées parmi les spermatozoïdes. Leurs causes sont très diverses: âge, carences en certains acides aminés essentiels ou en vitamine A, saison. La température, le repos sexuel prolongé, certaines affections héréditaires, les affections microbiennes testiculaires et des glandes annexes, les troubles généraux, l'insuffisance thyroïdienne ou l'entretien défectueux sont d'autres causes courantes d'anomalies (Courot, 1979).

Les anomalies structurales des spermatozoïdes peuvent concerner isolément ou simultanément les diverses parties constitutives: tête, col, pièce intermédiaire, partie principale de la queue. La plupart des informations sont originelles mais certaines sont artéfactuelles (lors de la préparation des frottis).

-Les anomalies de la tête peuvent affecter (fig. 3):

- Le noyau: chromatine nucléaire imparfaitement condensée ou absence de chromatine dense à certains endroits, noyaux multiples (rares).
- L'acrosome: écourté, décollé, montrant des expansions ou des épaissements.
- Le cytoplasme: mauvaise résorption, voire même persistance de la gouttelette protoplasmique. Une proportion de plus de 10% de

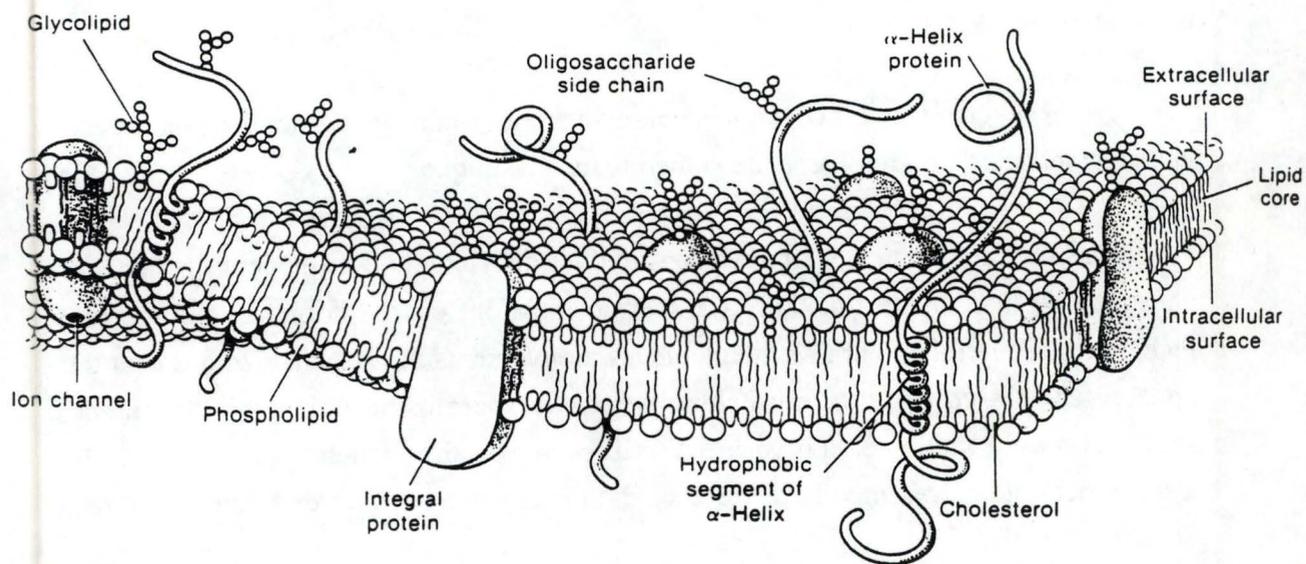


FIGURE 4 : Les anomalies morphologiques de la queue

spermatozoïdes possédant la gouttelette en position proximale indiquerait un trouble pathologique (Derivaux et Ectors, 1986). En position distale la gouttelette ne sera pas considérée comme pathologique.

-Pour le col, une mauvaise implantation de la queue, l'absence de queue ou la persistance de "bandes" de cytoplasme importantes au niveau du col, sont les anomalies les plus courantes.

-La pièce intermédiaire peut être élargie, craquée, raccourcie, double ou mal insérée au niveau de la tête.

-La pièce principale peut présenter des anomalies de longueur, de structure, de calibre, être absente ou enroulée sur elle même ou autour de la tête, ou encore présenter une duplication ou une triplication (cas extrêmement rare). Des pièces principales coudées sont aussi parfois observées (fig. 4).

En réalité, tout sperme renferme toujours une certaine proportion de formes anormales, mais la fécondité n'en est guère affectée si ce pourcentage ne dépasse pas 10% (Derivaux et Ectors, 1986).

### 1.1.3. Membrane plasmique

#### 1.1.3.1. Structure

La membrane plasmique délimitant le spermatozoïde présente l'organisation classique des membranes biologiques.

La microscopie électronique a permis une observation directe de sa structure. Cette membrane de 75 Å d'épaisseur est, en fait, constituée de trois couches qui diffèrent par leur contraste aux électrons : deux feuillets denses de 20 Å d'épaisseur (l'un externe, l'autre situé en regard de l'hyaloplasme) séparés par un couche plus claire de 35 Å. L'épaisseur généralement plus importante du feuillet externe trahit l'asymétrie de la membrane, présentant un revêtement fibreux externe constitué de glycolipides et de glycopeptides : le "cell-coat". Ce dernier joue un rôle à la fois dans les reconnaissances intercellulaires et de protection (Fournier-Delpech et Courot, 1980).

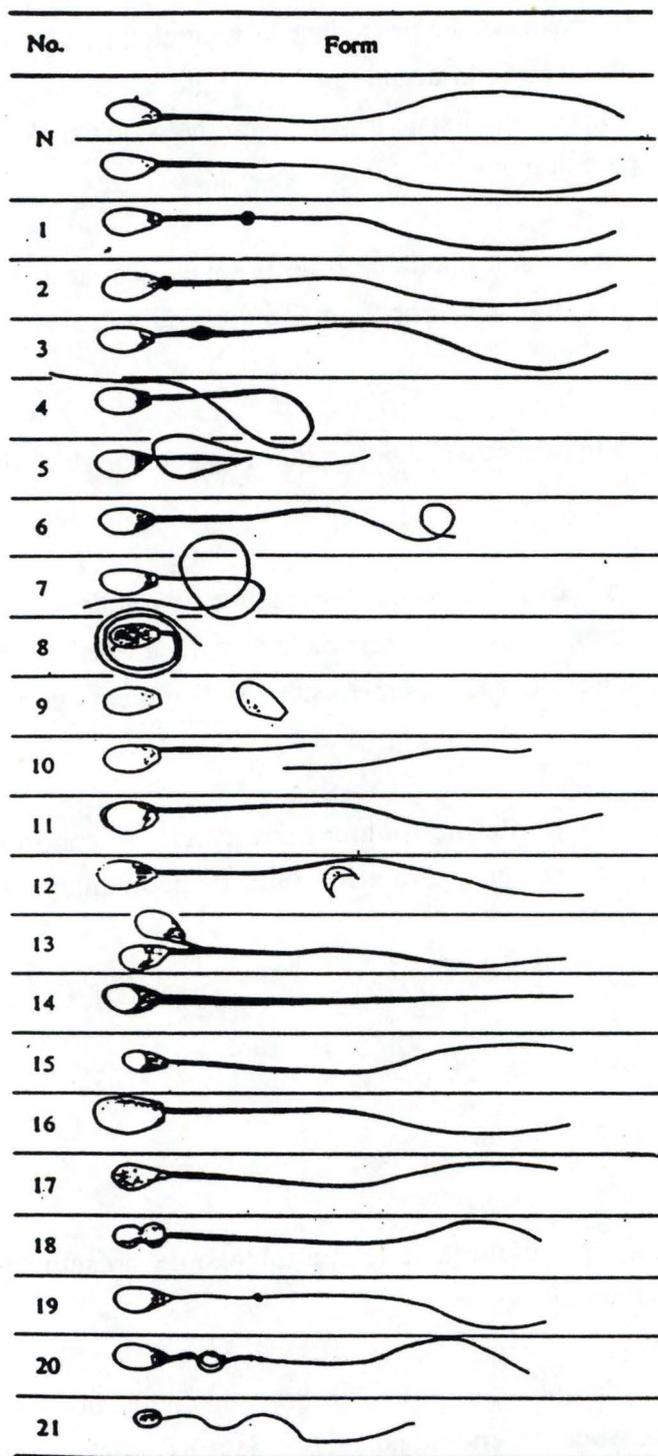


FIGURE 5: Structure tridimensionnelle d'une membrane biologique (ECKERTT, 1988)

### 1.1.3.2. Composition

Une membrane biologique est composée de trois constituants moléculaires principaux (fig. 5):

- des lipides, des phospholipides et du cholestérol(Quinn et White, 1967).
- des protéines ancrées de part et d'autre de la membrane ou enchâssées dans celle-ci.
- des glucides, généralement sous forme de chaînes polysaccharidiques liées de manière covalente aux protéines ou aux lipides.

Les lipides confèrent à la membrane sa structure, s'arrangeant spontanément en double feuillet : configuration d'énergie minimale.

Le feuillet bimoléculaire n'est pas statique; chaque couche monomoléculaire constitue un fluide à deux dimensions. Les molécules se déplacent latéralement et échangent leur position environ un millier de fois par seconde. Par contre dans la troisième dimension, la mobilité est relativement restreinte : le taux de mobilité d'une couche à l'autre ou "flip-flop" est très faible (Alberts et al., 1989). Ceci explique que la membrane plasmique possède une asymétrie de composition stable.

### 1.1.3.3. Particularités

La spécificité des interactions entre gamètes d'une même espèce est déterminée par les composants de la surface spermatique et de la zone pellucide de l'ovule. Les différences existant entre les compositions en glycoprotéines pourraient expliquer les différences observées dans les reconnaissances spermatozoïde-zone pellucide et contribuer aux faibles taux de fécondation interspécifique.

La membrane plasmique du spermatozoïde a aussi une composition biochimique particulière et caractéristique chez les bovins (Parks et al., 1987); elle contient 0,300 mg de protéine, 0,467 mg de phospholipides et 0,092 mg de cholestérol par  $5.10^9$  de spermatozoïdes.

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

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

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

TABLEAU 1: Caractéristiques et composition chimique du plasma séminal (HAFEZ, 1980)

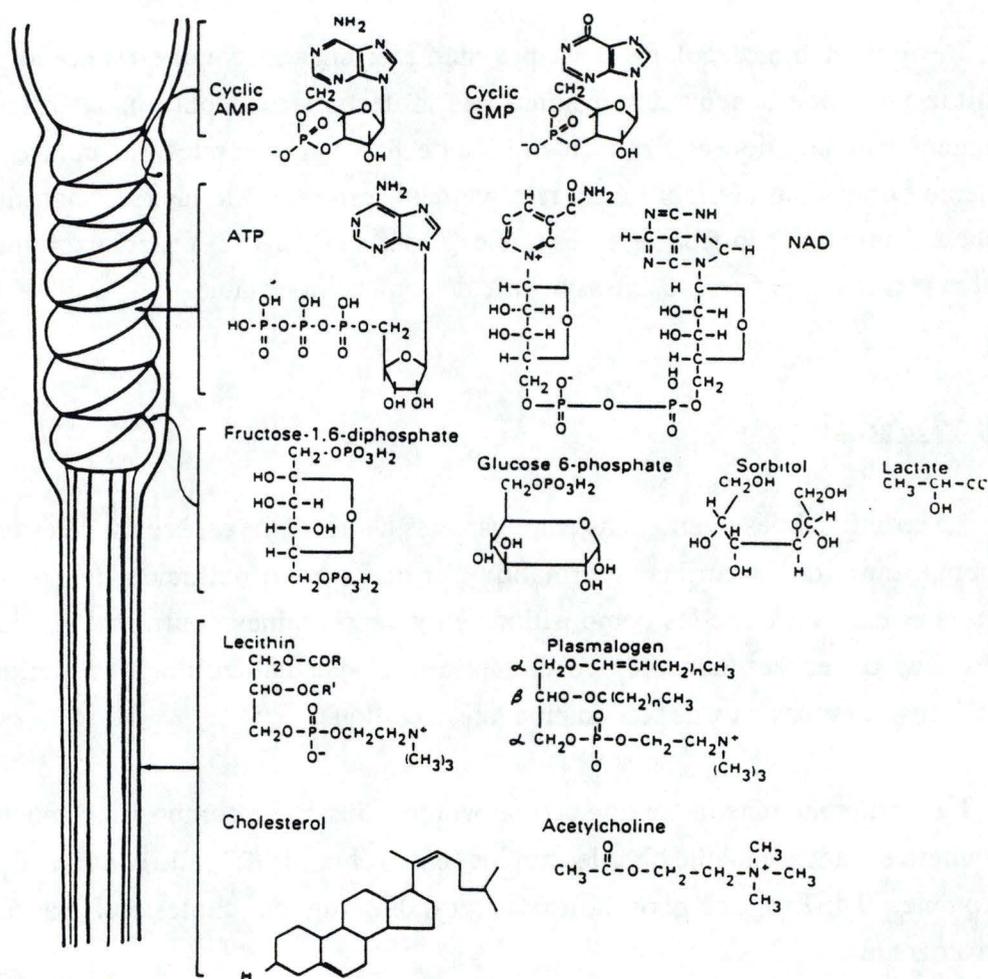


TABLEAU 2: Structure et localisation des différentes molécules biochimiques importantes (HAFEZ, 1980)

## 1.2. PLASMA SEMINAL

Chez les mammifères supérieurs, le plasma séminal résulte du mélange, au moment de l'éjaculation, des sécrétions épидидymaires contenant les spermatozoïdes avec celles des autres glandes du tractus génital, les glandes annexes.

Selon les espèces, l'éjaculation est plus ou moins rapide. Elle est quasi instantanée chez le bélier où le mélange de la semence se fait bien. Chez le chien par contre, un accouplement de 20 minutes correspondant au déversement successif des différentes glandes est nécessaire (Mann, 1964).

Le plasma séminal est la fraction dominante de l'éjaculat. C'est un milieu neutre et isotonique contenant beaucoup de sources d'énergie directement ou indirectement assimilables par les spermatozoïdes.

### 1.2.1. Composition

Beaucoup de composants organiques sont spécifiques au plasma séminal (fructose, sorbitol, inositol, acide citrique, ergothionéine etc...). On ne les retrouve nulle part ailleurs dans l'organisme à de telles concentrations.

Le tableau 1 reprend les divers constituants du plasma séminal, ainsi que diverses mesures physico-chimiques. Le tableau 2 montre la structure et la localisation de différentes molécules biochimiques importantes.

#### 1.2.1.1. sucres

-Le fructose est le sucre le plus abondant dans le plasma séminal du bélier. Les concentrations moyennes observées vont de 100 à 500 mg par 100 ml de plasma. Il provient du glucose sanguin. Son utilisation via la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof conduit à la formation d'acide lactique. Celui-ci tend à s'accumuler, bien qu'il puisse être oxydé en présence d'oxygène en  $\text{CO}_2$  et en  $\text{H}_2\text{O}$  par le cycle de Krebs (Mohri, 1970 cité par Volgmayr, 1975).

Le fructose provient de la vésicule séminale et représente une source importante d'énergie pour les spermatozoïdes, la fructolyse assurant l'apport énergétique principal. L'indice de fructolyse est une bonne méthode d'appréciation de la qualité de la semence (Derivaux et Ectors, 1986).



-Le glucose est en concentration beaucoup plus faible (40 à 100 mg/100 ml d'après Setchell et Hinck, 1967) que le fructose dans le plasma séminal du bélier. Il est métabolisé par les mêmes voies.

-L'inositol, le sorbitol et le manitol, se trouvent en quantité bien plus faible encore dans le plasma séminal du bélier. Leurs rôles énergétiques semblent moins évident, bien que le sorbitol puisse être oxydé en fructose et servir alors de substrat énergétique aux spermatozoïdes.

### 1.2.1.2. Lipides et prostaglandines

Les lipides les plus abondants du sperme de bélier sont:

- des phospholipides (phosphatidylcholine (fig.6), p-éthanolamine, p-inositol et p-sérine; cardiolipine; sphingomyéline)
- des lipides neutres
- du cholestérol
- des di et des triglycérides en faibles quantités

La teneur moyenne en lipides du sperme est de 1100 mg/100ml, dont seulement 15% se trouvent dans le plasma séminal.

Les prostaglandines sont des dérivés d'acides gras insaturés. La plupart des mammifères ont des taux plasmatiques de prostaglandines peu élevés: moins de 10µg/100 ml de plasma séminal chez le taureau et l'étalon. A l'inverse, ce taux est très élevé chez le bélier où il dépasse 4mg de PGE/100ml, soit 400 fois plus. La raison d'être de ce taux si important en prostaglandines est encore partiellement inconnue; mais il semblerait qu'en activant les contractions des muscles lisses, ces prostaglandines aident la progression des spermatozoïdes (Hafez, 1980).

### 1.2.1.3. Protéines, acides aminés, enzymes

La teneur en substances protéiques du plasma séminal fraîchement éjaculé varie de 3 à 7%, selon les espèces. A cela il convient d'ajouter les polypeptides résultant de la dégradation des protéines après éjaculation.

Les acides aminés proviennent directement des testicules ou du catabolisme des protéines. Ils peuvent protéger les spermatozoïdes de l'effet néfaste des métaux lourds du plasma en neutralisant ces métaux et en prévenant l'agglutination des cellules.

Les enzymes du plasma séminal peuvent provenir des vésicules séminales et des autres glandes annexes, mais aussi résulter d'une libération par le spermatozoïde lui-même lors de "cold-shocks" par exemple. Peu d'enzymes ont été isolés à l'heure actuelle chez le bélier. La phosphatase alcaline serait dominante et la phosphatase acide, présente.

#### 1.2.1.4. Stéroïdes

Des hormones sexuelles telles que les oestrogènes et les androgènes sont présentes dans le plasma séminal. Elles sont sécrétées par les cellules de Leydig des testicules et ont parmi tant d'autres, un rôle régulateur dans la concentration séminale de certaines substances.

#### 1.2.1.5. Constituants micellaires de nature organique

-Le glycérylphosphorylcholine ou GPC est produit par l'épididyme et se retrouve principalement comme constituant micellaire du plasma séminal. La majorité des espèces sont incapables de l'utiliser, mais chez le mouton, une enzyme présente dans les sécrétions du tractus génital femelle peut dégrader le GPC en phosphoglycérol assimilable par le spermatozoïde par voie glycolytique.

-L'acide ascorbique ou vitamine C est présent en quantité moyenne chez le bélier: 5,1 mg/100ml de plasma. Pour plus de détails sur cette substance, le lecteur peut se reporter au chapitre sur les protecteurs.

#### 1.2.1.6. Ions

-Le calcium, quoique présent en faible quantité (7mg/100ml) dans le plasma séminal (Quin et al., 1965), est l'ion dont les rôles sont les mieux connus.

Il est important dans la régulation du fonctionnement cellulaire car il agit en tant que messenger coordonnant de nombreuses réactions intracellulaires (Lehninger et al., 1969).

Une concentration optimale en calcium est apparemment maintenue par le spermatozoïde de mammifère grâce à des pompes ioniques associées aux membranes plasmiques et mitochondriales. Il semblerait que les pompes mitochondriales accumulent le calcium (Bradley et al., 1979 cité par Simpson, 1986), tandis que les systèmes de la membrane plasmique le rejettent à l'extérieur

via une ATPase à calcium  $Mg^{++}$  dépendante (Bradley et Forester, 1980; Breitbart et Rubinstein, 1983; Breitbart et al., 1983).

De plus, comme nous le verrons plus tard, la prise de calcium joue un rôle dans la réaction acrosomiale (Shamsborhan et Harrison, 1981; Birds, 1986), l'activation de l'adénylate cyclase et l'induction de la motilité (Morton et al., 1973).

Inversément, une concentration trop élevée en calcium dans le milieu extérieur réduit fortement la motilité du sperme, probablement par une augmentation excessive et toxique des niveaux calciques intracellulaires (Davis, 1978).

Quand le spermatozoïde de bélier subit des chocs thermiques, lors de refroidissements, la membrane plasmique perd son intégrité et la perméabilité en est altérée. Des études biochimiques semblent indiquer que ces chocs pourraient provoquer une augmentation importante du taux de calcium intracellulaire (Karagiannidis, 1976).

Le calcium semble donc jouer des rôles multiples et importants dans le métabolisme des spermatozoïdes et influence plus que probablement la viabilité de ceux-ci. La mise au point d'un milieu de conservation doit en tenir compte.

-Le sodium est l'ion métallique le plus abondant du plasma séminal (0,18g/100ml).

-Le potassium est également présent en quantité appréciable (0,09g/100ml); il améliorerait l'activité de spermatozoïdes maintenus dans une solution de NaCl.

-Le magnésium, en quantité bien inférieure (6mg/100ml), aurait la propriété de stimuler la glycolyse et la mobilité des spermatozoïdes (Hafez, 1980).

L'équilibre électrique de la semence est principalement maintenu par la présence d'ions  $Cl^-$  (86mg/100ml).

## **2. TRANSFORMATIONS DU SPERME DANS LES VOIES GENITALES FEMELLES**

### **2.1. ELIMINATION DU PLASMA SEMINAL**

La première transformation que subit le sperme dans les voies génitales femelles est l'élimination quasi complète de sa fraction fluide ou plasma séminal. Celui-ci reste confiné à la région vagino-cervicale chez la brebis, tandis que les spermatozoïdes, grâce à leur motilité propre, remontent et franchissent finalement le cervix. L'élimination du plasma séminal est une étape indispensable au bon déroulement de la fécondation. En effet le plasma est rapidement toxique pour le spermatozoïde hors du tractus génital mâle et contient des facteurs de décapacitation empêchant le processus de maturation ultérieur.

### **2.2. CAPACITATION**

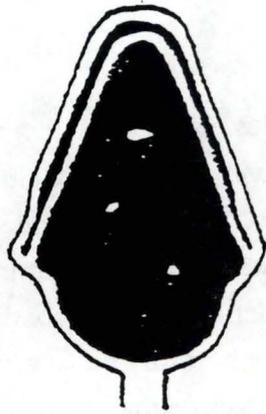
Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ne sont pas immédiatement féconds; ils doivent subir un processus de maturation appelé capacitation au terme duquel ils seront aptes à féconder l'ovule. Le mécanisme de la capacitation est encore partiellement inconnu. Il semble impliquer une modification des composants lipidiques et glycoprotéiques de la membrane plasmique (Yanagimachi, 1981), ainsi qu'une augmentation du métabolisme et de la motilité du spermatozoïde. L'ensemble est induit par les sécrétions du tractus génital femelle.

### **2.3. REACTION ACROSOMIALE**

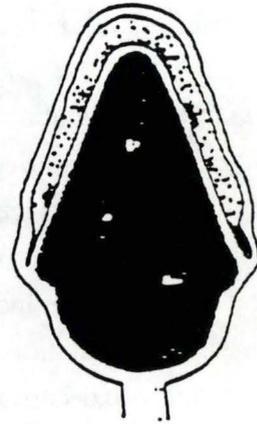
Pour la plupart des chercheurs, la dernière phase de la capacitation consisterait en la réaction acrosomiale proprement dite. Au cours de celle-ci aurait lieu le largage des enzymes lytiques nécessaires à la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule.

#### **2.3.1. Initiation**

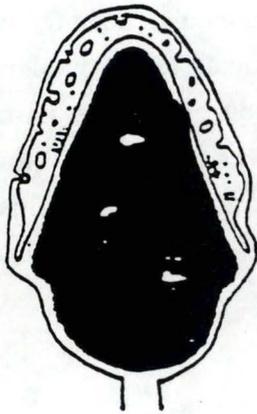
Les spermatozoïdes capités pénètrent l'enveloppe formée par les cellules folliculeuses entourant l'ovule et se fixent spécifiquement à une glycoprotéine majeure de la membrane pellucide. On suppose que cette même glycoprotéine, ainsi qu'un facteur sécrété par les cellules folliculeuses induisent la réaction acrosomiale que subit le spermatozoïde (Alberts et al., 1989).



STADE 1



STADE 2



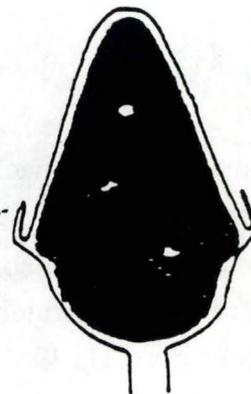
STADE 3



STADE 4



STADE 5



STADE 6

FIGURE 7: Différents stades de la réaction acrosomiale d'après NAGAE et al., (1986)

Chez les mammifères, les molécules impliquées dans le processus de reconnaissance seraient localisées dans la membrane plasmique plutôt que dans la membrane acrosomiale (cas des invertébrés aquatiques).

### 2.3.2 Mécanisme

Nagae et al: (1986) distinguent 5 phases dans la réaction acrosomiale, en plus du stade de départ (soit 6 étapes en tout). Chacune est caractérisée par des modifications morphologiques particulières, affectant l'acrosome et ses membranes ainsi que la membrane plasmique (fig.7).

#### -Stade 1: acrosome intact.

L'aspect morphologique du spermatozoïde est normal; toutes les membranes sont intactes. La matrice acrosomiale est homogène et dense aux électrons.

#### -Stade 2: gonflement de l'acrosome.

Il se produit un gonflement de l'acrosome ainsi qu'une décondensation partielle de la matrice acrosomiale. Les membranes sont encore intactes bien que l'on observe un plissement de l'acrosome et de la membrane plasmique.

#### -Stade 3: formation de vésicules dans la matrice.

Des vésicules de taille et de forme variables apparaissent dans la matrice mitochondriale. Selon la plupart des auteurs, ces vésicules se formeraient par une invagination de la membrane acrosomiale externe seule ou plus rarement accompagnée de la membrane plasmique (Nagae et al., 1986). L'invagination de la membrane acrosomiale interne à été observée, mais serait cependant exceptionnelle.

#### -Stade 4: libération du contenu de l'acrosome.

Chez le béliet il y aurait fusion en de nombreux points entre les membranes plasmiques et acrosomiales externes (Fléchon, 1985).

#### -Stade 5: exposition des vésicules et de la membrane acrosomiale interne.

Seule subsiste la membrane acrosomiale interne au voisinage de laquelle figure un nombre plus ou moins important de vésicules.

#### -Stade 6: Membrane acrosomiale interne nue.

Les vésicules se détachent progressivement de la membrane acrosomiale interne qui seule subsiste.

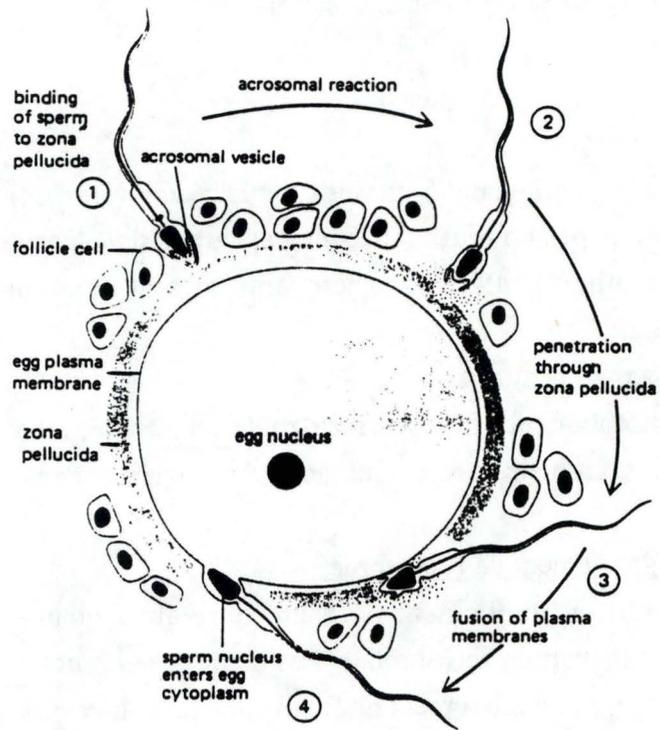


FIGURE 8: Pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide

### 2.3.3. L'"après-réaction acrosomiale"

Pour pénétrer la zone pellucide, le spermatozoïde secrète une lysine: l'acrosine, responsable de la digestion partielle de celle-ci.

Une fois la "tunellisation" de la zone pellucide de l'ovule achevée, le spermatozoïde arrive dans l'espace péri-ovulaire où il se trouve arrêté par les microvillosités qui couvrent la surface de l'ovule. Dès que le contact est réalisé, il s'établit une fusion de la membrane ovulaire et post acrosomique suivie d'une pénétration progressive du spermatozoïde dans l'ovule (fig.8). Dès ce moment les granules sous-corticaux libèrent des enzymes qui transforment la zone pellucide, empêchant toute pénétration ultérieure d'un autre spermatozoïde.

La fusion du spermatozoïde entraîne l'activation métabolique de l'ovule sous la dépendance de variations de concentrations ioniques à l'intérieur de celui-ci. Ces modifications peuvent être résumées comme suit (Alberts et al., 1989):

- 1) une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique au  $\text{Na}^+$  (et dans une moindre mesure au  $\text{Ca}^{++}$ ) provoque la dépolarisation de cette membrane en quelques secondes;
- 2) l'activation de la phospholipase C permet l'hydrolyse du phosphatidyl inositol diphosphate;
- 3) une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  libre cytosolique se produit; elle est due à la libération de  $\text{Ca}^{++}$  à partir de son compartiment intracellulaire de rétention, sous l'effet d'inositol triphosphate;
- 4) une activation de l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  (par la protéine kinase C) induit un flux sortant de  $\text{H}^+$  couplé à un influx de  $\text{Na}^+$ , et provoque une forte augmentation du pH intracellulaire;
- 5) cette augmentation induit un accroissement de la synthèse protéique;
- 6) enfin les pronucléi mâle (du spermatozoïde) et femelle se soudent en une masse unique et la prophase de la première mitose de l'embryon commence.

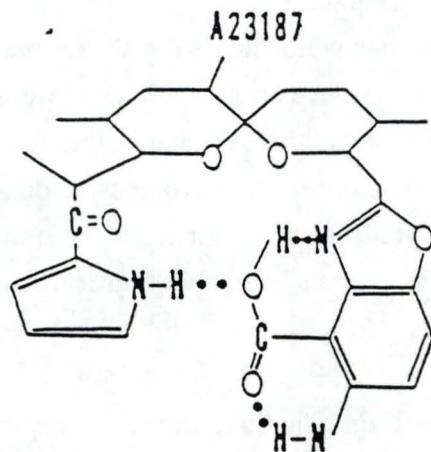


FIGURE 9: Formule chimique de l'ionophore A23187 d'après PRESSMAN (1976)

#### 2.3.4. Les inducteurs

L'inducteur de la réaction acrosomiale est vraisemblablement sécrété par les cellules folliculeuses (Mbizvo et al., 1990) et emporté par l'ovule. C'est ce qui ressort d'expériences utilisant le liquide folliculaire et les zones pellucides pour induire la réaction acrosomiale (Cross et al., 1988).

L'ionophore A23187 peut in vitro jouer le même rôle. Il s'agit d'un complexe liposoluble (fig. 9) dont la molécule serait cyclisée dans un arrangement tête-queue par des liaisons hydrogène (Pressman, 1976). Cet ionophore participerait au transport intramembranaire du calcium principalement.

#### 2.3.5. Rôles du calcium

Le fait que les inducteurs de la réaction acrosomiale ne puissent déclencher celle-ci dans des milieux sans calcium, semble suggérer que la concentration intracellulaire en calcium n'est pas suffisante en elle-même pour déclencher la réaction acrosomiale. Un apport de calcium extracellulaire est donc nécessaire (Yanagimachi, 1982).

Lors de la capacitation, certaines particules membranaires seraient déplacées ou altérées, démasquant ou activant les sites de fixation et les transporteurs de calcium dans la membrane plasmique. Ceci aurait lieu non seulement au niveau de la tête mais aussi du flagelle, ce qui expliquerait la motilité accrue des spermatozoïdes capités (Yanagimachi et Usui, 1974).

Au niveau des membranes biologiques, le calcium interviendrait dans de nombreuses fusions membranaires qui semblent conditionner fortement la réaction acrosomiale. Le rôle du calcium, lors des fusions membranaires reste encore controversé:

- Le calcium influencerait les ATPases membranaires. Une ATPase typique de la membrane plasmique transporterait le calcium du milieu extracellulaire jusqu'à l'espace entre les membranes plasmiques et acrosomiales externes (Gordon et al., 1967). L'accumulation de calcium dans cet espace serait à l'origine de la fusion des deux membranes (par neutralisation des charges négatives de la surface interne de la membrane plasmique et externe de la membrane acrosomiale externe). Le calcium activerait de plus l'ATPase

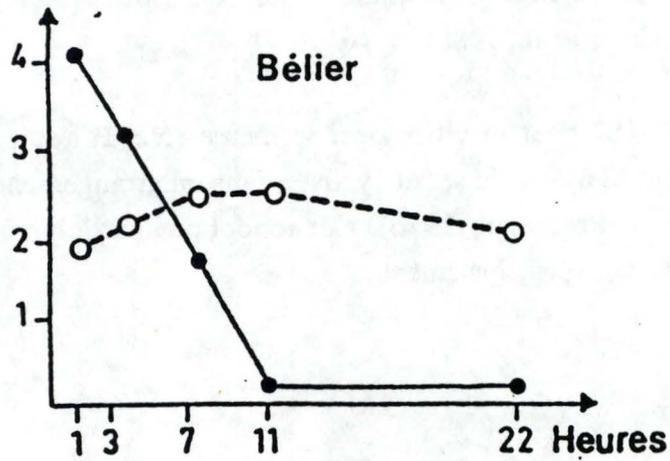


FIGURE 10: Devenir de la motilité des spermatozoïdes épидидymaire conservés à 30°C (o--o) ou sans plasma séminal (o--o) (Dott et al., 1979)

spécifique de la membrane acrosomique externe qui, à son tour, induirait son transport dans l'acrosome.

- Selon Yanagimachi et Usui (1974), la fusion membranaire serait plutôt une désintégration locale des membranes due à leur autolyse par les enzymes acrosomiques activées par hydratation et entrée d'ions extracellulaires comme les ions calcium.

### **3. MODIFICATIONS LORS DE LA CONSERVATION DE LA SEMENCE IN VITRO**

#### **3.1. PRESSION OSMOTIQUE ET PH**

Lors de la conservation de semence in vitro, deux paramètres physico-chimiques importants peuvent varier: la pression osmotique et le pH. La pression osmotique du plasma séminal (310 mosm/kg en conditions normales) peut varier rapidement suite à divers remaniements moléculaires (dégradations protéiques, lipidiques et glucidiques, ...). Une pression osmotique trop éloignée des valeurs physiologiques peut vite s'avérer létale pour le spermatozoïde. De même le pH, suite à une production très importante d'acide lactique par glycolyse, peut chuter de 2 à 3 unités en quelques heures, rendant rapidement le milieu inadéquat pour assurer la survie des spermatozoïdes.

#### **3.2. EFFETS TOXIQUES DU PLASMA SEMINAL**

##### **3.2.1. Effets propres au plasma**

Le rôle du plasma séminal dans la physiologie des spermatozoïdes reste encore très obscur et ce, en dépit des nombreuses investigations biochimiques. Toutefois les effets toxiques du plasma sur les spermatozoïdes éjaculés paraissent à présent indiscutables.

Des travaux de plus en plus nombreux montrent que le plasma séminal diminue globalement la motilité et la survie in vitro des spermatozoïdes de taureau (Shannon, 1965) et de bélier (Dott et al., 1979). Chez ce dernier, la motilité de spermatozoïdes maintenus dans leur plasma séminal non dilué est importante, mais chute très rapidement (fig. 10), tandis que celle de spermatozoïdes conservés dans du plasma séminal fortement dilué est inférieure mais constante et beaucoup plus durable; la motilité des spermatozoïdes dilués prend l'avantage en quelques heures par rapport à celle des non dilués (Dott et al., 1979).

Les glandes de cowper du bélier sécrètent une lécithinase à une concentration telle qu'elle permet l'hydrolyse des lécithines (phosphatidylcholines) du jaune d'oeuf avec libération importante d'acides gras et de lysolécithine (Roy, 1957). Il est possible que cette lécithinase soit aussi capable d'hydrolyser les phospholipides présents dans la membrane des spermatozoïdes. Selon sa concentration dans le milieu, la lysolécithine peut avoir les effets les plus divers sur les spermatozoïdes:

- mort immédiate de spermatozoïdes de verrat et de bouc introduits dans une dilution au 1/1000 (Aamdal et al, 1965 cité par Corteel, 1980).
- suppression de la membrane plasmique et endommagement des mitochondries des mêmes spermatozoïdes soumis à une concentration de 496  $\mu\text{g/ml}$  pendant 10 secondes (Jones, 1976).
- stimulation de la respiration de spermatozoïdes de bélier par 0,04 nmole/l (Hartree et Mann, 1960).
- inhibition de la respiration de spermatozoïdes de bélier par 0,5 nmole/l (Hartree et Mann, 1960).

La motilité plus élevée conférée aux spermatozoïdes par le plasma séminal non dilué en début de conservation, pourrait résulter d'une concentration faible mais croissante de lysolécithine, liée à l'hydrolyse naissante puis croissante des phospholipides membranaires du spermatozoïde. Lors de la conservation in vitro de la semence sans dilution préalable, compte tenu de l'activité lécithinasique élevée, le seuil de toxicité de la lysolécithine serait alors rapidement atteint pour les spermatozoïdes (Corteel, 1980). Le lavage des spermatozoïdes dès la récolte pourrait permettre de limiter l'effet de la lécithinase sur la déstabilisation des membranes.

### 3.2.2 Effets des excréments des spermatozoïdes

Le plasma éjaculé contient des cytochromes et leur équipement enzymatique, de l'hyaluronidase, de l'acrosine, des lipoprotéines, des protéines intracellulaires, etc... qui peuvent s'échapper de spermatozoïdes simplement endommagés, ou diffuser de spermatozoïdes morts (Mann, 1964). Les effets de la plupart de ces substances sur la survie in vitro des spermatozoïdes sont peu connus à l'exception de ceux des oxydases dans le sperme de bovin.

Dès 1950, Tosic et Malton ont montré que les spermatozoïdes de taureau étaient capables d'oxyder les acides aminés aromatiques. Cette oxydation produit des peroxydes qui inhibent la respiration, la survie et la motilité des spermatozoïdes. Les possibilités d'oxydations seraient d'avantage liées à la présence de spermatozoïdes morts qu' à celle de spermatozoïdes vivants (Shannon et Curson, 1972). Les conséquences de ces

oxydations seraient observées principalement après exposition du sperme à la lumière du jour (Norman et al., 1959). Les oxydases peuvent être celles des cytochromes, pigments intracellulaires capables d'absorber l'énergie lumineuse et de la transférer à une protéine cellulaire ou extracellulaire qui s'oxyde avec libération de peroxydes. Cet effet nuisible de l'oxydation photochimique est aggravé par le fait que le sperme des mammifères est dépourvu de catalase (Mann, 1964) qui détruit les peroxydes. L'EDTA protégerait les spermatozoïdes de leurs propres effets nocifs (Salisbury et al. cité par Corteel, 1980).

### 3.2.3 Réaction acrosomiale prématurée

Bien qu'assez rare, une réaction acrosomiale prématurée est parfois observée lors de conservation de semence in vitro. Elle peut être induite par une concentration ionique inadéquate ou par lésions des membranes acrosomiales. Une réaction acrosomiale prématurée enlève définitivement au spermatozoïde toute chance de parvenir à la fécondation de l'ovule (se reporter à "la réaction acrosomiale").

### 3.2.4. Effets membranaires du refroidissement

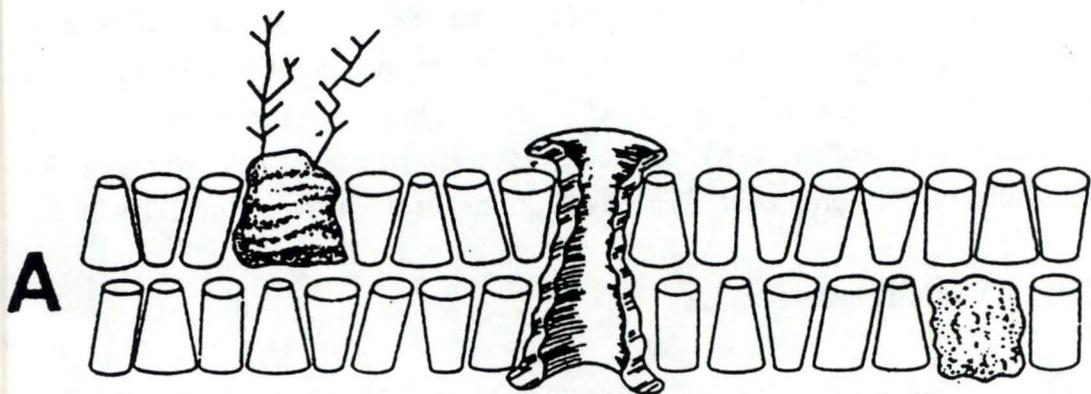
La membrane plasmique est souvent considérée comme la première structure endommagée lors de refroidissements (De Leeuw, 1990). Son intégrité est pourtant d'une importance cruciale pour le fonctionnement du spermatozoïde et plus particulièrement pour le maintien d'une bonne fertilité.

Des changements induits par le refroidissement dans l'organisation de la membrane du spermatozoïde ont été démontrés chez le bélier par Holt et North en 1984. Selon eux, des agrégations de particules se produisent dans la membrane plasmique, lors d'un refroidissement à 5°C.

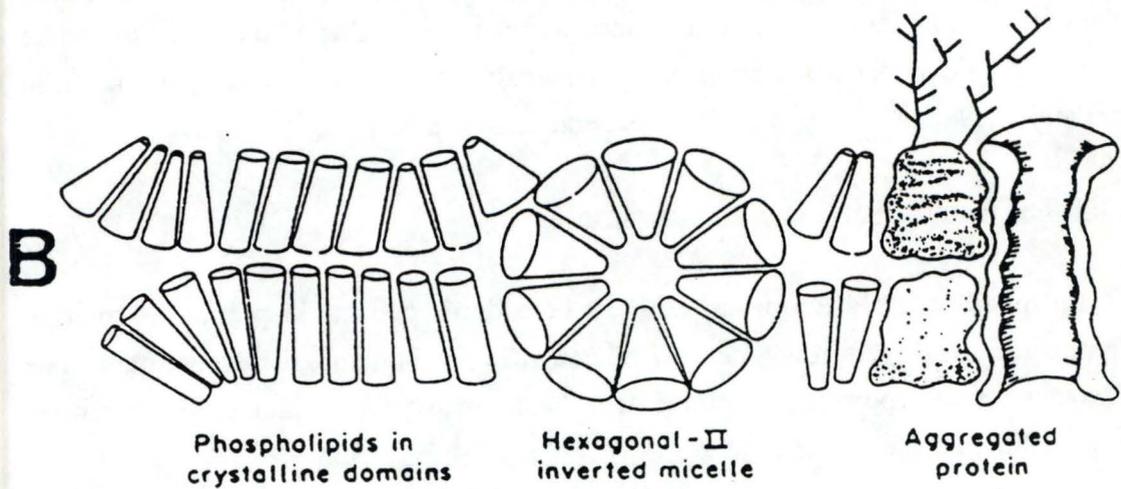
Selon Amann et Pickett (1987) l'intervalle de température compris entre 20°C et 1°C constitue la "phase de refroidissement" et de "cold-shock". Elle se traduit sur le spermatozoïde par:

- une baisse de la motilité,
- une diminution de la production énergétique,
- une augmentation de la perméabilité membranaire entraînant une perte de molécules intracellulaires et d'ions.

Les dommages dus aux "cold-shock" sont principalement liés à la composition des membranes et à leur perméabilité. La baisse de température modifie la fluidité de cette structure ainsi que son organisation. Cependant ces modifications seraient limitées



**A** Random arrangement of phospholipids and protein in lamellar bilayer



**B** Aggrégation protéique

FIGURE 11: Formes anormales de la bicouche: A. Forme "hexagonale II"  
B. Aggrégation protéique

lorsque le rapport cholestérol/phospholipides est suffisamment élevé. Le cholestérol permet de conserver plus longtemps l'agencement lamellaire initial de la membrane, lors de la descente en température.

Lors de "cold shock", les formes anormales de la bicouche lipidique peuvent être de deux ordres (fig.11):

-la forme dite "hexagonale-II" qui correspond à la formation, plus ou moins irréversible, de micelles phospholipidiques; les phospholipides homologues ayant tendance à se rapprocher. La disposition des pôles hydrophiles dans ces micelles créerait des canaux laissant passer les ions et les petites molécules (Amann et Pickett, 1987).

-l'aggrégation protéique qui modifierait la fluidité membranaire et pourrait masquer certains sites de reconnaissance sur les protéines agrégées.

La mise au point d'un milieu pour la conservation des spermatozoïdes à des températures inférieures aux températures physiologiques, doit donc tenir compte de ces éléments.

## 4. LES PROTECTEURS SPERMATIQUES

### 4.1. PROTECTEURS ANTIOXYDANTS: LES VITAMINES

La principale protection conférée par les vitamines est l'anti-oxydation. Il faut savoir que des nombreux ravages causés par les oxydations cellulaires, les plus dommageables semblent être ceux résultant des peroxydations lipidiques. Il semblerait en effet que celles-ci soient responsables de profondes désorganisations au niveau de la membrane des spermatozoïdes et provoquent finalement la perte irréversible de l'intégrité de cette membrane.

La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne qui nécessite un apport constant de radicaux libres ( $\text{ROO}\cdot, \text{RO}\cdot, \text{OH}\cdot$ ) pour l'amorce des peroxydations additionnelles. Le processus peut être décomposé en 3 étapes:

1) Initiation:  $\text{R-H} + \text{OH}\cdot, \text{R}\cdot$  (R=chaîne lipidique)

2) Propagation:  $\text{R}\cdot + \text{O}_2, \text{ROO}\cdot$

$\text{ROO}\cdot + \text{R}'\text{-H}, \text{ROOH} + \text{R}'\cdot$  (R'=autre chaîne lipidique)

3) Terminaison:  $\text{R}\cdot + \text{R}\cdot, \text{ROO}\cdot + \text{ROO}\cdot, \text{etc...}$

Afin de contrôler et de réduire la peroxydation on peut faire usage d'antioxydants tels que les vitamines (Burton et al., 1985).

#### 4.1.1. Les vitamines liposolubles

Les vitamines liposolubles sont des molécules hydrophobes apolaires et donc confinées à l'intérieur des membranes phospholipidiques.

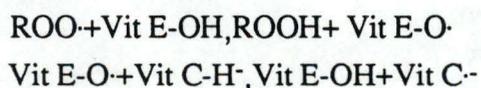
La vitamine liposoluble la plus efficace contre la peroxydation est la vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol). Les phospholipides des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques possèdent des affinités spécifiques pour l' $\alpha$ -tocophérol qui semble se concentrer à ces sites. La vitamine E semble donc être en première ligne, en ce qui concerne la défense des phospholipides membranaires. Les tocophérols agissent comme briseurs de chaîne par suite de leur capacité à transférer un hydrogène phénolique à un radical peroxyde. Le radical phénoxy en résultant est stabilisé par résonance et relativement peu réactif, excepté envers d'autres radicaux peroxyde (Mc Chay, 1985). L'effet antioxydant du tocophérol étant efficace à des concentrations élevées en oxygène, on peut espérer que cet effet protecteur se fera sentir dans le milieu de conservation (et de dilution) de la semence se trouvant en contact direct avec l' $O_2$  de l'air.

#### 4.1.2. Les vitamines hydrosolubles

Les vitamines hydrosolubles ont des structures chimiques diverses mais sont toutes des molécules polaires.

La plus efficace est la vitamine C ou acide ascorbique. Bien qu'elle soit hydrosoluble, elle peut protéger les membranes contre les peroxydations lipidiques en interceptant les radicaux libres générés dans la phase aqueuse (Bendich et al., 1986).

De plus, l'acide ascorbique agit en synergie avec la vitamine E en la protégeant des attaques radicalaires éventuelles et en la régénérant quand elle se trouve dans son état oxydé (Niki et al., 1982). Cette propriété peut être résumée comme suit:



## **4.2. PROTECTEURS MEMBRANAIRES**

### **4.2.1. La lécithine (phosphatidylcholine).**

La molécule de lécithine comprend non seulement des acides gras et du glycérol, comme celle des graisses simples, mais aussi de l'acide phosphorique et de la choline.

Les lécithines ont des fonctions métaboliques et structurales importantes dans les membranes (Granner et al., 1987). Les phospholipides membranaires étant activement dégradés et resynthétisés lors du turn-over, un séjour prolongé en dehors de leur milieu physiologique risque de causer de graves préjudices aux membranes plasmiques des spermatozoïdes. Une dégradation partielle des phospholipides et même des perforations localisées sont à craindre.

C'est pourquoi il pourrait s'avérer utile (Quin et White, 1967) d'incorporer au dilueur un des composants membranaire principaux: la lécithine. Pour éviter la formation de micelles de lécithine inutilisables par le spermatozoïde, des détergents en faible quantité pourraient s'avérer utiles.

### **4.2.2. Le tréhalose**

Le tréhalose est un disaccharide qui n'est pas assimilable par les spermatozoïdes. Il éviterait la formation d'une phase "gel" de la membrane (Rudolph et Crowe, 1985).

Storey (1989) affirme que des liaisons hydrogènes entre les parties polaires des lipides et le tréhalose assurent un étalement des lipides et une stabilisation accrue de la membrane plasmique.

### **4.2.3. Les protéines (BSA)**

Situmorang et al. (1984) affirment que les spermatozoïdes prélevés hors de leur plasma séminal et resuspendus dans une solution connue sans macromolécules, perdent leur mobilité et ont tendance à s'agglutiner. Cet effet serait partiellement supprimé par l'addition de sérum albumine bovine (BSA).

Les protéines du plasma séminal auraient pour fonction de stabiliser les membranes de la tête du spermatozoïde.

### 4.3. ANTIBIOTIQUES

Malgré toutes les précautions hygiéniques prises lors de la récolte et des manipulations qui accompagnent la dilution, les échantillons spermatiques renferment toujours un pourcentage varié de germes contaminants, susceptibles de jouer un rôle défavorable soit sur la conservation de sperme, soit sur la fertilité.

Les antibiotiques les plus utilisés dans la littérature sont la gentamicine, la lincomycine, la pénicilline (Luck et al., 1990), la streptomycine (la plus active contre *Campylobacter foetus*) et la sulfanilamide (Salisbury et Knodt; cité par Derivaux et al., 1986).

# OBJECTIFS

Le but de ce mémoire est de mettre au point un milieu pour la dilution et la conservation en frais du sperme de bélier, en vue de l'insémination artificielle.

Un dilueur performant doit au moins présenter les caractéristiques suivantes (Dimitropoulos, 1975):

- posséder une pression osmotique isotonique au sperme et être capable de la maintenir pendant la durée de stockage;

- renfermer des substances tampon afin de maintenir un pH favorable aux spermatozoïdes. Ces substances sont très importantes pour le sperme de bélier (ayant un pH variant aux alentours de 7) et de taureau qui, en raison de leur haute concentration en spermatozoïdes, présentent une production très importante d'acide lactique par glycolyse. Cette production peut faire chuter le pH de 2 à 3 unités en quelques heures;

- contenir des substances protectrices des gamètes (lipides, protéines, vitamines);

- comprendre des substances qui favorisent le métabolisme, la capacitation, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes (sucres et autres);

- comporter des substances freinant le développement des germes banaux et spécifiques qui peuvent exister dans le sperme (antibiotiques);

- maintenir et améliorer le pouvoir fécondant, être d'une préparation facile, se prêter aisément aux conditions d'asepsie et de stérilisation et être en même temps économique.

Les milieux disponibles jusqu'à présent sont empiriques et peu performants pour une conservation d'une durée supérieure à quelques heures. En effet, le dilueur le plus utilisé en Belgique pour l'insémination artificielle, chez le mouton, est celui préconisé par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique); il est préparé à base de lait en poudre, d'eau distillée et d'antibiotiques. Il nécessite un chauffage à 92°C pendant 10 minutes, afin de détruire l'action spermicide de la lacténine présente dans le lait. De plus, la composition du lait en poudre est variable et incontrôlable; le milieu ne contient que peu d'aliments énergétiques, pas de substances tampon ni de protecteur membranaire ou d'antioxydant et son équilibre ionique est variable. Ce milieu ne permet de conserver une proportion suffisante de spermatozoïdes vivants que pendant une dizaine d'heure.

Il était donc nécessaire de mettre au point un milieu entièrement contrôlé en laboratoire, de composition connue, d'efficacité supérieure dans le temps et qui puisse servir de base aux recherches ultérieures visant à développer un milieu pour la congélation du sperme de bélier, une des dernières semences de mammifères domestiques dont la congélation reste problématique.

Nous sommes partis sur les bases acquises lors de précédentes recherches effectuées au laboratoire. Il en est ressorti que le milieu de conservation de la semence doit avoir un pH avoisinant 7,2 et une pression osmotique d'environ 330 mOsm/kg; ce qui du reste paraît normal, ces valeurs étant très proches des valeurs physiologiques rencontrées dans le plasma séminal du bélier.

La présente étude consiste en une mise au point progressive d'un milieu de dilution et de conservation de la semence. Nous avons travaillé par étapes successives qui peuvent être résumées comme suit:

- mise au point d'un milieu de base comprenant un Tampon et une combinaison de sucres ainsi que détermination de la température de conservation idéale;
- choix de la meilleure combinaison ionique;
- choix d'un antibiotique;
- choix de protecteurs spermatiques;

Une fois le milieu donnant les meilleurs résultats déterminé, une comparaison est réalisée entre ce dilueur et celui actuellement utilisé en insémination artificielle (INRA).

Enfin, dans le but de vérifier *in vivo* la non toxicité de notre milieu, ainsi que l'avantage éventuel qu'il présente sur le dilueur de l'INRA, une expérience a été réalisée sur un cheptel de brebis Suffolk. Quarante-vingts brebis furent inséminées le 11 avril 1990 à Faulx-les-Tombes; 45 avec le dilueur INRA et 35 avec le milieu mis au point au cours de ce mémoire.

MATERIEL

ET

METHODES

## 1. ANIMAUX EXPERIMENTAUX

Une brebis "de réforme" est utilisée, ainsi que trois béliers d'élite destinés à l'insémination artificielle. Ces béliers donnent tous les trois une semence de "grande qualité" et acceptent facilement le prélèvement.

Les béliers présentent les caractéristiques suivantes:

- Liseron de Châtelet (N°132), race Hampshire, né le 05.01.87, 112kg au 12.06.89
- Khan de Trez (N°22), race Ile de France, né le 12.04.86, 111kg au 12.06.89
- Nesquick (N°3222), race Laitier Frison Allemand, né le 25.01.89

## 2. PRELEVEMENT DE LA SEMENCE

### 2.1. BREBIS

Une brebis est induite en chaleur par injection intramusculaire d'1,5 ml de Cypionate d'Oestradiol (ECP) 48h avant le prélèvement. Elle est attachée dans le local de prélèvement pour éviter une fuite éventuelle lors de la monte du bélier.

### 2.2. MATERIEL

La semence est récoltée à l'aide d'un vagin artificiel. Celui-ci consiste en un cylindre à double paroi contenant de l'eau. Cette eau a pour but de conserver le vagin à bonne température (40 à 42 °C), le plus longtemps possible. Le vagin est prolongé par un cône en caoutchouc terminé par un tube conique gradué. Placé à l'étuve à 50°C plusieurs heures à l'avance et enveloppé dans une gaine de feutrine doublée de skaï, il conserve une température optimale (40-42°C) sur le terrain, lors du prélèvement. Le montage du vagin ainsi que le prélèvement doivent être exécutés rapidement afin de réduire les pertes de chaleur. Cela permet d'éviter toute gêne au bélier lors du prélèvement et de réduire les chocs thermiques infligés à la semence.

### 2.3. METHODE

Le bélier est amené dans le local de prélèvement le plus calmement possible. Tandis qu'un opérateur maintient la brebis pour réduire ses mouvements, un autre se tient à genou à coté du bélier avec le vagin artificiel en main. Le bélier est lâché dans le local,

libre de ses mouvements. Au moment de la monte, l'opérateur dévie le pénis dans le vagin artificiel. Plusieurs sauts sont parfois nécessaires pour parvenir à l'éjaculation qui est "signalée" par un coup de rein très caractéristique.

Certains béliers, saillissant très bien en conditions naturelles et étant parfaitement féconds "refusent le caoutchouc", c'est à dire qu'ils n'éjaculent jamais dans le vagin artificiel. Il est alors possible de recourir à l'électroéjaculateur. Le rectum est préalablement lavé avec de l'eau salée à 5%, le fourreau est désinfecté et l'animal solidement attaché. Une électrode bipolaire est introduite dans le rectum. Toutes les deux ou trois secondes, des stimuli de plus ou moins 5 milliampères (5 à 6 volts) sont envoyés, et ceci à une vingtaine de reprises. Lorsqu'il y a extériorisation du pénis, on envoie 800 à 1500 milliampères pendant 5 à 6 secondes, ce qui provoque l'éjaculation.

Les béliers peuvent saillir 10 fois par jour. A cette fréquence, le volume et la concentration du sperme décroissent progressivement. Toutefois, un régime de 3 à 5 récoltes journalières pendant 4 à 5 jours ne cause pas de diminution de la qualité du sperme. Cette opération peut être répétée après un intervalle de 2 à 3 jours.

### **3. ANALYSE DE LA SEMENCE**

Une fois le prélèvement effectué, la semence est immédiatement ramenée au laboratoire pour être soumise aux premières analyses.

Avant tout, le sperme est observé à l'oeil nu, afin de déceler la présence de sang, d'urine ou encore pour s'assurer qu'il ne s'agit pas de présperme. Pendant toute la durée des analyses, le sperme est conservé au bain marie à 37°C.

#### **3.1. EXAMENS MACROSCOPIQUES**

Les examens macroscopiques du sperme consistent en la mesure du volume de l'éjaculat et en l'observation de la couleur, de l'aspect, de la consistance, de la viscosité et du poids spécifique. En pratique, seul le volume sera examiné.

Le volume de sperme éjaculé varie selon le bagage génétique (espèce, race, individu), l'état physiologique, l'âge, le nombre de saillies, la méthode de récolte et les facteurs hygiéniques et alimentaires. Le volume moyen d'un éjaculat de bélier est de 0,8 ml (0,5 à 2 ml), il est donné directement par lecture du tube gradué ayant servi à la récolte.

## 3.2. EXAMENS MICROSCOPIQUES

La motilité (mobilité) des spermatozoïdes constitue un élément important dans l'appréciation de la qualité du sperme. On en étudie deux types.

### 3.2.1. Motilité massale

La motilité massale se mesure au moyen d'un microscope (grossissement 10X15) sur lequel est placé une plaque chauffante maintenue à 37°C pour éviter les chocs thermiques. Sur une lame placée sur la plaque, une goutte de sperme est déposée. L'examen consiste en l'appréciation de l'intensité des mouvements tourbillonnaires (ou "vagues") provoqués par la réunion et la dispersion des spermatozoïdes. Cette motilité massale correspond donc à la somme des motilités individuelles, et est un signe de bonne vitalité des gamètes et d'une bonne concentration en spermatozoïdes.

Cet examen donne lieu à l'attribution d'une cote subjective comprise entre 0 et 5 selon les critères suivants:

- 0: Aucun mouvement, sperme mort.
- 1: Léger pétilllement, trahissant le nombre très restreint de spermatozoïdes vivants.
- 2: Mouvements plus amples de l'ensemble, sans toutefois que des regroupements intenses ne s'observent.
- 3 à 5: Intensité croissante des mouvements tourbillonnaires.

### 3.2.2. Motilité individuelle

La motilité individuelle est estimée avec le matériel utilisé pour la motilité massale, avec cependant un grossissement plus important (10X32).

Contrairement au test précédent, la motilité individuelle permet d'estimer le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Cette estimation est réalisée avec la semence diluée et demeure subjective.

On prélève une goutte de sperme dilué qu'on dépose entre lame et lamelle et qu'on observe au microscope relié à un moniteur vidéo. L'observateur estime le nombre de spermatozoïdes vivants, c'est à dire traversant le champ de vision, par rapport au nombre total de gamètes présents dans ce champ. Pour être précise la mesure doit être instantanée. En pratique on choisit au hasard 3 parties de la lame sur laquelle est déposée la semence et on effectue 3 estimations successives dont on tire une estimation moyenne.

Une semence de qualité doit posséder au moins 60% de spermatozoïdes motiles.

### 3.3. EXAMENS MORPHOLOGIQUES

#### 3.3.1. Frottis morts/vivants

La technique dite des colorations vitales consiste à colorer les gamètes de manière différentielle en vue de déterminer le pourcentage de gamètes morts par rapport aux vivants.

La différence de coloration entre les deux catégories relève des modifications de perméabilité membranaire. Les spermatozoïdes morts subissent une modification de leur perméabilité membranaire permettant au colorant de pénétrer la membrane et de colorer la tête du spermatozoïde. Par contre, les spermatozoïdes vivants empêchent activement une grande partie du colorant de traverser leur membrane et sont donc nettement plus clairs. Un pourcentage morts/vivants peut donc être établi.

Le colorant le plus utilisé est l'éosine (colorant la tête du spermatozoïde en rouge), mais d'autres substances telles les dérivés d'éosine, le vert de crésol ou le bleu de Bromophénol sont utilisables également.

Le colorant structural est doublé, dans les colorations vitales, d'un colorant de fond indispensable pour mettre la structure premièrement colorée en évidence. Dans le cadre de ce travail nous avons choisi la nigrosine, mais le bleu d'aniline et l'encre de Chine sont aussi parfois utilisés. Ces colorants ont été sélectionnés en raison de leur manque de toxicité.

Pour éviter d'endommager une partie des gamètes lors de frottis "morts/vivants", certaines règles sont à respecter: emploi de lames chauffées à 37°C pour éviter les chocs thermiques et solutions colorantes de pression osmotique et pH physiologiques. La solution colorante utilisée dans le cadre de nos recherches est celle mise au point par l'INRA. Sa préparation est la suivante: dissoudre 3,57 gr de citrate de sodium, 1 gr d'éosine et 2 gr de nigrosine dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O. Corriger le pH (alors trop basique), avec de l'acide citrique concentré, jusqu'à atteindre 6,8. Enfin ajuster la pression osmotique (alors trop élevée) avec de l'H<sub>2</sub>O, jusqu'à atteindre 310 mOsm/kg, à l'aide d'un osmomètre.

Le frottis se réalise de la manière suivante: on mélange sur une lame microscopique maintenue à 37°C grâce à la platine chauffante, une goutte de sperme à deux gouttes de solution colorante maintenue également à 37°C au bain marie. Le mélange est homogénéisé pendant 10 secondes avec une tige puis la coloration se poursuit pendant

50 secondes, après quoi on réalise le frottis. L'examen des spermatozoïdes s'effectue à un grossissement de 320 X. Trois parties de la lame sont choisies au hasard et pour chacune, 100 spermatozoïdes sont comptés et classés dans la catégorie mort ou vivant. On calcule ensuite la moyenne des trois estimations pour obtenir le pourcentage de spermatozoïdes vivants.

### 3.3.2. Etat de l'acrosome

Afin de déterminer si le spermatozoïde possède toujours son acrosome intact et donc n'a pas entamé de réaction acrosomiale prématurée, on réalise un frottis et une coloration au Giemsa.

La technique nous ayant donné les meilleurs résultats est la suivante: placer 40  $\mu$ l de semence sur une lame maintenue à 37°C par une platine chauffante, faire un frottis et le laisser sécher complètement quelques minutes. Plonger le frottis sec dans un bain de Giemsa (azur-éosine-bleu de méthylène, Merck diagnostica), à 5 ml de Giemsa par 200 ml d'H<sub>2</sub>O, pendant 4h1/2, l'égoutter et débarrasser la face opposée au frottis des résidus de colorant avec un papier absorbant. Laisser sécher 1 heure et observer au microscope, grossissement 320X.

Le Giemsa colore spécifiquement l'acrosome; si celui-ci est intact, la tête du spermatozoïde présente une "calotte" mauve foncé; par contre, si la réaction acrosomiale a déjà débuté, ou si la membrane acrosomiale a été endommagée lors de la conservation préalable dans le dilueur, seul un halo mauve plus ou moins clair subsiste.

### 3.4. CONCENTRATION

Il est nécessaire de déterminer la concentration de la semence en spermatozoïdes, de manière à connaître précisément la quantité de dilueur à ajouter pour obtenir le nombre voulu de gamètes par ml pour la conservation in vitro (soit 100.10<sup>6</sup> de spermatozoïdes/ml).

La concentration du sperme peut être mesurée par deux méthodes: numérotation directe (cellules de Thomas ou hématimètre) et néphélométrie.

La néphélométrie a été choisie en raison de la rapidité et de la facilité qu'elle apporte. Elle se base sur une mesure de densité optique déterminée par un lecteur d'absorbance. On prélève 50  $\mu$ l de semence fraîchement récoltée qu'on dilue dans 10 ml de sérum physiologique formolé (9 gr de NaCl et 2 ml de formol à 40% dans 1 litre d'H<sub>2</sub>O). Le tout est mélangé fortement et versé dans le lecteur, précédemment

étalonné à l'aide d'un blanc (sérum physiologique formolé, sans sperme). L'absorbance est lue à 500 nm et la concentration déterminée selon l'équation suivante: nombre de spermatozoïdes en milliards /ml =  $4,114 \times \text{abs} + 0,112$ . Cette opération est répétée trois fois et la concentration moyenne est établie.

### **3.5. PH**

Le pH du milieu de conservation est déterminé grâce à un pHmètre "WTW pH95" équipé d'une électrode de verre "WTW type E50 pHc, 3 m/l KCl". Cette sonde possède une bulle de verre de petit diamètre, qui épouse assez bien le fond arrondi des tubes contenant les spermatozoïdes dilués.

La composition particulière du sperme modifie les propriétés de cette électrode, ce qui nécessite son nettoyage fréquent à l'HCl et parfois à l'acétone, et un réétalonnage de l'appareil. Ces problèmes ayant été résolus, il nous a été possible de mesurer ce pH en routine.

### **3.6. PRESSION OSMOTIQUE**

La pression osmotique (P.O.) du milieu est mesurée à l'aide d'un osmomètre cryoscopique "osmomat 030, Gonatec". Celui-ci détermine la pression osmotique de 25  $\mu\text{l}$  de milieu préalablement placé dans un appendorf s'adaptant à l'osmomètre.

## **4. DILUTION DE LA SEMENCE**

La dilution s'effectue une fois tous les tests sur le sperme frais terminés. La quantité de sperme à ajouter au milieu pour obtenir une concentration de  $100.10^6$  de spermatozoïdes /ml est déterminée à partir de la concentration en spermatozoïdes de la semence récoltée. Une fois le volume de semence à ajouter déterminé, celui-ci est prélevé au moyen d'une micropipette dans le tube ayant servi à la récolte, et injecté dans le tube contenant le milieu de conservation à tester. Chaque tube contient 2 ml de milieu et celui-ci se trouve à 37°C (bain marie) au moment de la dilution de manière à éviter tout choc thermique ("cold-shocks") à la semence. En pratique, le volume de semence à ajouter aux 2 ml de milieu, pour obtenir une concentration de  $100.10^6$  de spermatozoïdes /ml, est d'environ 50  $\mu\text{l}$ .

## 5. REFROIDISSEMENT

### 5.1. REFROIDISSEMENT A 30°C

Le bain marie préréglé sur 37°C jusqu'à la dilution, est programmé à 30°C lors de l'adjonction du sperme. La température atteint 30°C en 30 minutes.

### 5.2. REFROIDISSEMENT A 15°C

Une fois la semence diluée, le bain marie (toujours à 37°C) est placé dans une chambre froide à 4°C. Le thermostat du bain est ensuite programmé pour maintenir une température de 15°C. La température du milieu diminue donc lentement et chute à 15°C en 2h1/2. Un refroidissement lent et régulier est capital pour réduire au maximum les "cold-shocks" que subissent les membranes des spermatozoïdes.

## 6. CONDITIONS DE CONSERVATION

Les spermatozoïdes sont conservés dilués, dans des tubes de 10 ml contenant 2 ml de milieu. Chaque tube (baignant pour moitié dans l'eau du bain marie) est agité fortement et continuellement (de manière à éviter le dépôt des gamètes au fond du tube) et gardé à l'abri de la lumière pour éviter au maximum les oxydations photochimiques.

## 7. COMPOSITION ET PREPARATION DES MILIEUX AYANT SERVI A LA MISE AU POINT DU DILUEUR

### 7.1. TAMPONS

Cinq tampons sont testés, chacun à 3 concentrations différentes: 25 millimolaire (mM), 100 mM et 150 mM.

-Tampon phosphate: 9 gr de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 10,62 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pour 11 d' $\text{H}_2\text{O}$ d (pour 150 mM). Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N.

-Tampon citrate: 38,75 gr de citrate de Na pour 11 d' $\text{H}_2\text{O}$ d (pour 150 mM). Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide citrique 1N.

-Tampon HEPES: 35,78 gr d' HEPES (Sigma, No. H-3375, PM: 238,3) pour 11 d'H<sub>2</sub>O (pour 150 mM). Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N.

-Tampon BES: 32,01 gr de BES (Sigma, No. B-9879, PM: 213,2) pour 11 d'H<sub>2</sub>O (pour 150 mM). Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N.

-Tampon MOPS: 31,43 gr de MOPS (Sigma, No. M-1254, PM: 209,3) pour 11 d'H<sub>2</sub>O (pour 150 mM). Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1N.

## 7.2. SUCRES

Quatre sucres sont utilisés.

-Glucose: sous forme de "D+ Dextrose" anhydre (UCB, No. 1290, PM: 180,16).

-Fructose: sous forme anhydre (UCB, No. 1427, PM: 180,16).

-Inositol: sous forme de méso-Inositol anhydre (UCB, No. 7809, PM: 180,16).

-Mannitol: sous forme anhydre (UCB, No. 1441, PM: 182,18).

## 7.3. IONS

Quatre ions sont utilisés sous forme de chlorure.

-K<sup>+</sup>: 1,7 gr de KCl (UCB, No. 1591, PM: 74,56) pour 11 de milieu.

-Mg<sup>++</sup>: 0,45 gr de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck, No.5833, PM:203,31) pour 11 de milieu.

-Ca<sup>++</sup>: 0,25 gr de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck, No. 2382, PM: 147,02) pour 11 de milieu.

-Na<sup>+</sup>: 2,25 gr de NaCl (UCB, No. 1723, PM: 58,44) pour 11 de milieu.

## 7.4. ANTIBIOTIQUES

Quatre antibiotiques sont testés.

-Streptomycine: 1 gr de Streptomycine sous forme de sesquisulfate anhydre (Sigma, No.S-6501, PM: 1457,4) pour 11 de milieu.

-Sulfanilamide: 3 gr de Sulfanilamide (p-Aminobenzenesulfonamide) anhydre (Sigma, No. S-9251, PM: 172,2) pour 1l de milieu.

-Gentamicine: 1 ml de Gentamicine à 50 ng/ml (Gibco, No. 043-05750 D) pour 1l de milieu.

-Lincomycine: 1 ml de Linco-Spectin à 50 ng/ml (Upjohn, No. 40'070 036) pour 1l de milieu.

## **7.5. PROTECTEURS**

Sept protecteurs sont testés.

-BSA: 30 gr d'Albumine Bovine en poudre (Sigma, No. A-8022) pour 1l de milieu.

-Glutamine: 100 mgr de Glutamine sous forme cristalline (Sigma, No. G-5763) pour 1l de milieu.

-Vitamine C: 50 mgr d'acide Ascorbique (L) anhydre (Sigma, No. A-0278) pour 1l de milieu.

-Vitamine E: 40 µl d' $\alpha$ -Tocophérol (D) 970 UI/g, extrait d'huile végétale (Sigma, No. T-3634) pour 1l de milieu.

-EDTA: 2 gr d'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) anhydre (Janssen Chimica) pour 1l de milieu.

-Tréhalose: 10 gr de Tréhalose dihydraté (Sigma, No. T-5251, PM: 378,3) pour 1l de milieu.

-Lécithine: 1,5 gr de Lécithine (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine) anhydre (Sigma, No. P-9671) pour 1l de milieu. Accompagnée ou non de triton X-100 selon trois concentrations différentes: 5 µl de triton 1%, 2% et 3% par 2ml de milieu.

## 8. COMPOSITION FINALE ET PREPARATION DE NOTRE DILUEUR (LB4)

### Composition pour 50 ml de milieu:

- 1,79 gr de tampon HEPES
- 0,6 gr de glucose
- 0,6 gr de fructose
- 112 mg de NaCl
- 12,5 mg de CaCl<sub>2</sub>
- 150 mg de Sulfanilamide
- 2,5 mg d'acide ascorbique (vit C)
- 2 µl d'α-tocophérol (vit. E)

### Mode opératoire pour 50 ml :

- Ajouter l'HEPES à 45 ml d'H<sub>2</sub>O distillée
- Mélanger et porter à pH 7,2 avec NaOH 1N
- Ajouter les sucres préalablement mélangés j'usqu'à obtenir une pression osmotique de 320 mOsm/kg (avec un osmomètre), en pratique entre 1,1 et 1,2 gr de mélange sucré sont nécessaires.
- Ajouter le NaCl et le CaCl<sub>2</sub>
- Ajouter 150 mg de Sulfanilamide
- Ajouter l'acide ascorbique et l'α-tocophérol, celle-ci ne se dissolvant quasiment pas dans le milieu, il faut l'appliquer sur les bord du récipient de manière à ce qu'elle reste en contact permanent avec le milieu.
- Mélanger fortement pendant 10 minutes

Le milieu ainsi préparé peut être conservé fermé, pendant une ou deux semaines au frigo (4°C).

## 9. METHODES D'ANALYSES STATISTIQUES.

Les résultats obtenus au cours des différentes expériences ont été tous traités selon le modèle de l'anova, exceptés les résultats de l'insémination artificielle traités par comparaisons de moyennes (chi-carré)

Nos schémas expérimentaux sont des blocs aléatoires, il n'y a donc pas de résiduelle.

Une transformation de variable est nécessaire, nos résultats étant sous forme de pourcentage. La transformation à réaliser pour rendre cette distribution homogène est  $\text{Arcsin}(x_{ij})^{1/2}$ .

Les critères significatifs sont ensuite testés par contraste de Scheffé.

RESULTAT

DISCUSSION

CONCLUSIONS

## 1. MISE AU POINT DU MILIEU DE BASE ET CHOIX D'UNE TEMPERATURE DE CONSERVATION

Les essais décrits dans cette partie comme dans les suivantes, ont été réalisés grâce à la technique du "pooling". Les semences récoltées lors des divers prélèvements successifs sont après examen de la semence (volume, concentration, motilité, nombre de spermatozoïdes vivants) regroupés en un seul échantillon, de manière à obtenir une semence de qualité moyenne et la plus constante possible d'un test à l'autre.

En premier lieu nous avons cherché des substances tampon ayant une efficacité maximale dans la zone de pH qui nous intéressait, c'est à dire avoisinant 7,2 . Nous avons sélectionné cinq tampons utilisés en cultures de cellules et donc jugés peu toxiques: Citrate, Phosphate, Hepes, Mops et BES. Ces cinq tampons ont été additionnés de combinaisons de sucres supposés pouvoir être utilisés par le spermatozoïde. Les sucres testés sont au nombre de quatre: fructose, glucose, inositol et mannitol. Nous avons aussi comparé 30°C et 15°C comme température de conservation.

### 1.1. ESSAI PRELIMINAIRE

La première expérience est réalisée afin de déterminer si les paramètres expérimentaux, tels que nous les avons fixés dans le schéma expérimental suivant, sont judicieux.

#### 1.1.1. Schéma expérimental

Un pool est constitué par prélèvement des 3 béliers.

La semence est diluée dans les différents milieux à tester: les cinq tampons retenus, additionnés chacun de quatre sucres répartis selon toutes les combinaisons possibles (soit 16 au total y compris un témoin sans sucre); ce qui représente en fin de compte 80 (5x16) milieux à tester. Pour ce premier essai, la molarité choisie en ce qui concerne les tampons est de 25 mM, valeur couramment rencontrée dans les milieux de cultures cellulaires. Les quatre sucres testés sont ajoutés en quantité équimoléculaire jusqu'à obtenir une pression osmotique de 330 mOsm/kg (valeur physiologique du sperme de bélier); en pratique environ 2,4 gr de sucres sont nécessaires. Les milieux sont maintenus constamment à 30 ° C (bain marie) et à l'abri de la lumière.

Le pourcentage de spermatozoïdes ayant survécu au stockage est estimé dans chacun des milieux après 16 heures (temps fixé arbitrairement), par examen de leur motilité individuelle. Le pH de chaque milieu est mesuré toutes les 2 heures environ, jusqu'à la fin de l'expérience.

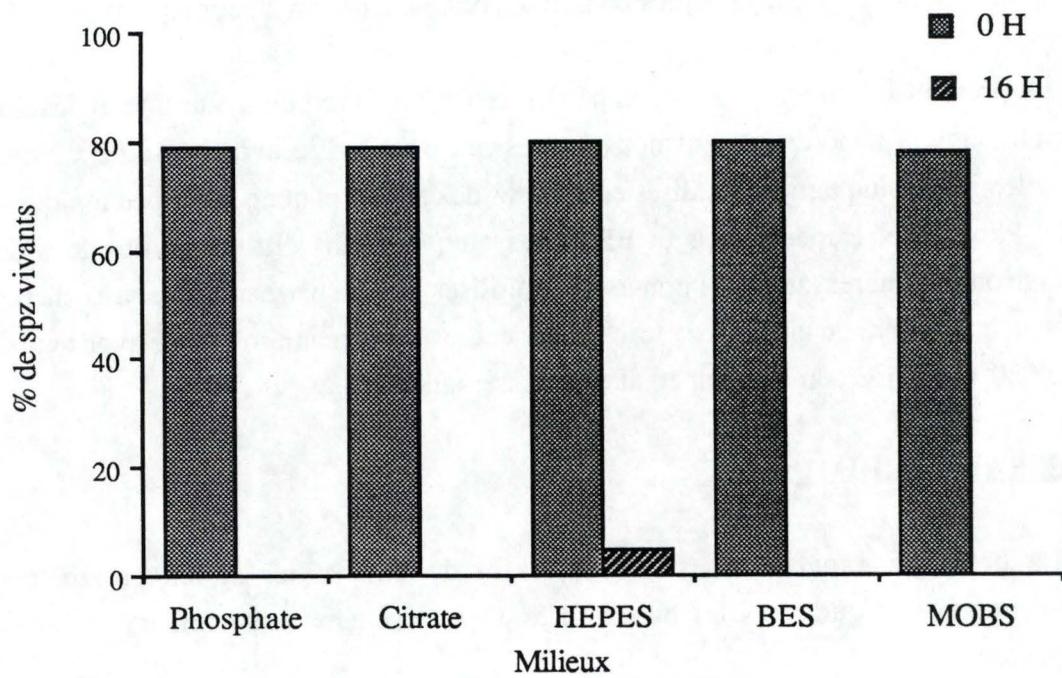


Fig 1: pourcentage de spz vivants en moyenne pour chaque tampon, après 16H

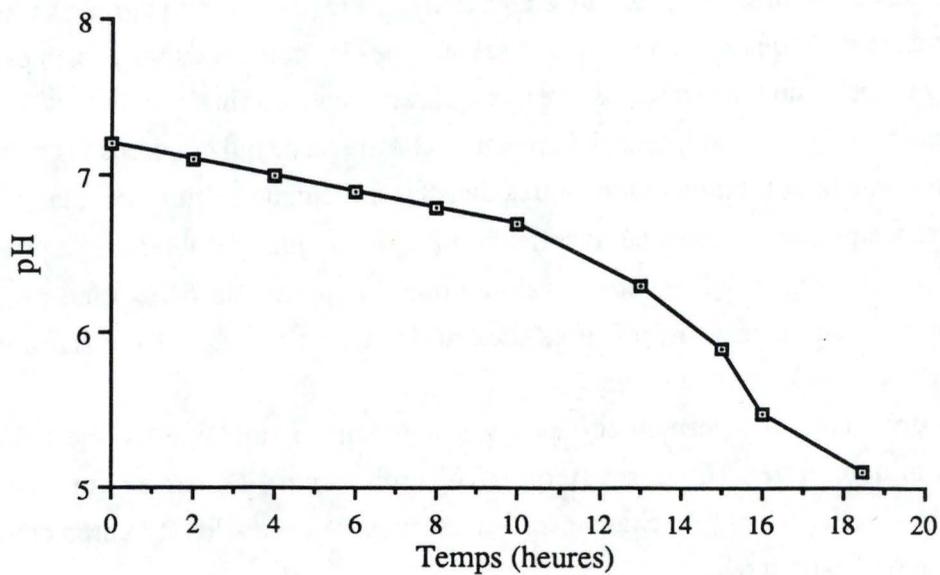


Fig 2: Evolution du pH en fonction du temps pour la moyenne des tampons

### 1.1.2. Résultats

La figure 1 montre qu'après 16 heures les spermatozoïdes ne survivent dans aucun milieu, excepté un faible pourcentage dans l'HEPES (5 % en faisant la moyenne des 16 combinaisons à base d'HEPES); alors que le pourcentage de spermatozoïdes vivants est d'environ 80 % pour chaque moyenne des combinaisons et pour chaque milieu en début de conservation (un sperme de qualité contient toujours une certaine proportion de gamètes morts ou anormaux).

Le pH chute très rapidement dans chaque tube, comme le montre la figure 2 représentant l'évolution pour la moyenne des tampons.

Des agrégats de spermatozoïdes sont observés au fond des tubes après quelques heures et des dépôts importants se forment après une dizaine d'heures.

### 1.1.3. Discussion

La diminution du pH résulte de la production d'acide lactique due à la métabolisation des sucres via la voie glycolitique d'Embden-Meyerhof (Hafez, 1980). La semence du bélier étant une des semences les plus concentrées, la production d'acide lactique est telle (Derivaux et Ectors, 1986) que le pH ne peut être stabilisé malgré les substances tampon essayées. Il est plus que probable qu'un pH trop acide s'avère rapidement toxique pour les spermatozoïdes, il serait donc intéressant de suivre dans le temps le pourcentage de spermatozoïdes survivant au stockage et ce, parallèlement à la variation de pH du milieu.

Postulant une toxicité possible de l'agrégation des spermatozoïdes sur leur survie, il fut décidé d'agiter constamment les milieux lors des expériences ultérieures.

### 1.1.4. conclusions

- Le tampon HEPES semble donner les meilleurs résultats.
- Toutefois, ce tampon et les autres, utilisés à 25 mM ne permettent de maintenir le pH au dessus de 7 que pendant quelques heures.
- Sans agitation, les spermatozoïdes s'aggrègent au fond des tubes.

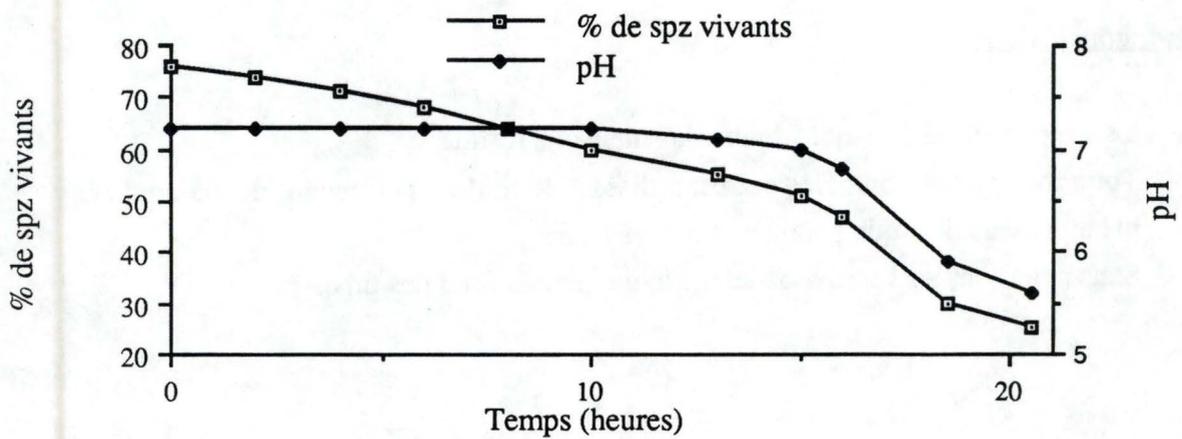
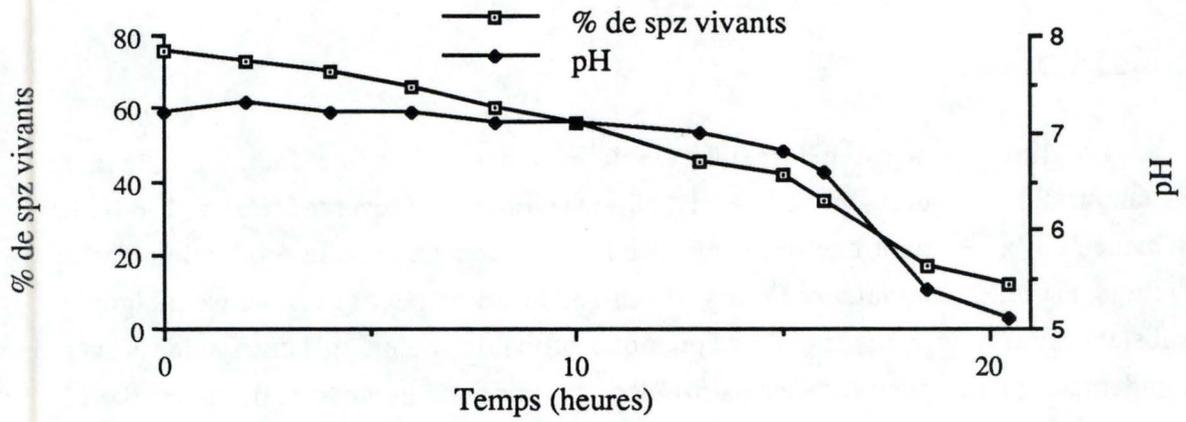
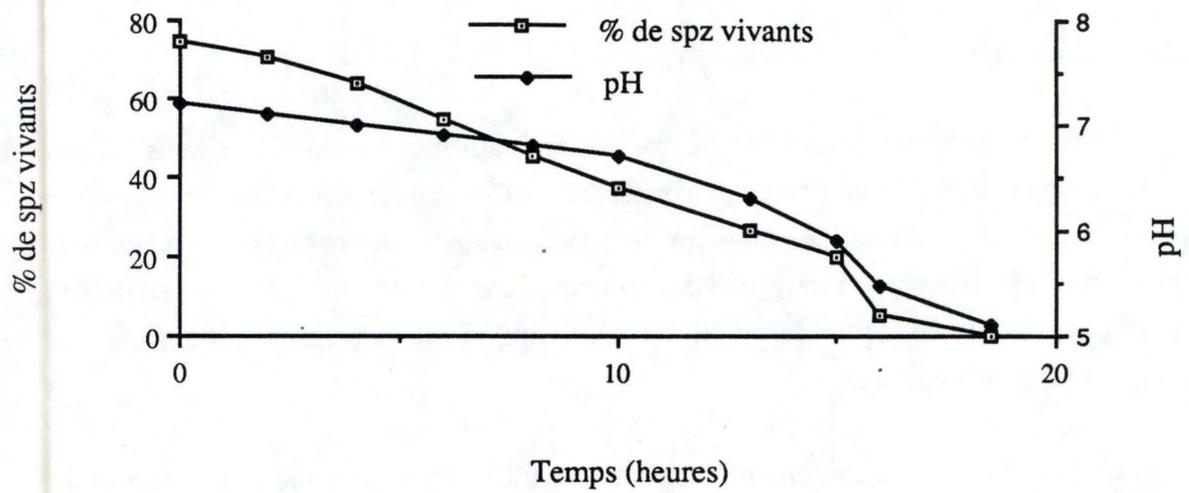


Fig 3: pourcentage de spz vivants et évolution du pH en fonction du temps pour à 25, 100 et 150 mM (tampon HEPES)

## 1.2. DETERMINATION DE LA MOLARITE OPTIMALE DU TAMPON

Le but de cette seconde expérience est de voir si des concentrations en tampon supérieures à celles utilisées lors de l'essai préliminaire permettent un meilleur maintien de la survie des spermatozoïdes et si la mortalité des spermatozoïdes est influencée ou non par la baisse du pH.

### 1.2.1. Schéma expérimental

Le tampon HEPES étant le seul à avoir permis la survie d'une partie des spermatozoïdes lors de l'essai préliminaire, il est choisi pour déterminer la concentration en tampon nécessaire au milieu afin de maintenir les spermatozoïdes en vie le plus longtemps possible. Trois concentrations en HEPES sont essayées : 25 mM, 100 mM et 150 mM; chacune avec les 16 combinaisons de sucres précédentes (équilibrant le milieu à une pression osmotique de 330 mosm/kg), soit 48 tubes au total. Ces tubes sont maintenus à 30°C et régulièrement, le pH ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes vivants sont déterminés pour chaque milieu (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle des frottis morts/vivants). L'expérience est répétée 3 fois.

### 1.2.2. Résultats

A 25 mM, les 16 combinaisons d'HEPES ne maintiennent en moyenne le pH aux alentours de 7 qu'environ 4 heures (fig. 3.1) et le pourcentage de spermatozoïdes vivants diminue rapidement.

A 100 mM, les milieux maintiennent le pH aux alentours de 7 pendant environ 13 heures (fig. 3.2) et le pourcentage de spermatozoïdes vivants diminue moins rapidement.

Enfin à 150 mM, le tampon HEPES permet de stabiliser le pH aux alentours de 7 durant plus de 15 heures (fig. 3.3) et l'on compte encore plus de 50 % de spermatozoïdes vivants après 15 heures.

Si on compare le pourcentage de spermatozoïdes toujours vivants après 20h30, on constate qu'il est en moyenne de 0 % pour les milieux à 25mM, de 12 % pour 100mM et de plus de 25% pour 150mM.

### 1.2.3. Discussion

Une concentration de 150 mM semble idéale car elle permet de maintenir le pH pendant un laps de temps supérieur par rapport aux autres concentrations testées (25mM et 100mM). De plus une concentration de 150 mM assure une viabilité aux spermatozoïdes nettement supérieure par rapport à une concentration de 25 mM, et supérieure par rapport à une concentration de 100 mM. Ceci montre la non toxicité du tampon HEPES utilisé à des concentrations relativement importantes (150 mM).

Une concentration de 150 mM semble être le compromis idéal. Elle représente en effet une teneur en substance tampon suffisante pour maintenir le pH dans des limites acceptables tout en permettant néanmoins l'adjonction d'une quantité importante de sucres (réserves énergétiques) sans dépasser la pression osmotique physiologique.

### 1.2.4. Conclusions

- Le tampon HEPES utilisé à 150 mM, plutôt qu'à 25 ou 100 mM, permet de maintenir le pH du milieu à 7 pendant plus de 12 heures et assure une bonne survie des spermatozoïdes.

- Le tampon permet un maintien du pH supérieur dans le temps par rapport aux autres molarités.

- Les expériences ultérieures seront réalisées avec des concentrations en tampon de 150 mM, la concentration choisie au départ (25 mM) ne donnant pas de bons résultats.

## **1.3. CHOIX DE LA TEMPERATURE DE CONSERVATION ET DE LA MEILLEURE COMBINAISON TAMPON-SUCRES**

La littérature mentionnant principalement deux températures de conservation en ce qui concerne la semence de bélier, nous avons voulu tester si l'une donne de meilleurs résultats par rapport à l'autre, en ce qui concerne la survie dans le temps, des spermatozoïdes. Ces deux températures sont 14°C et 30°C.

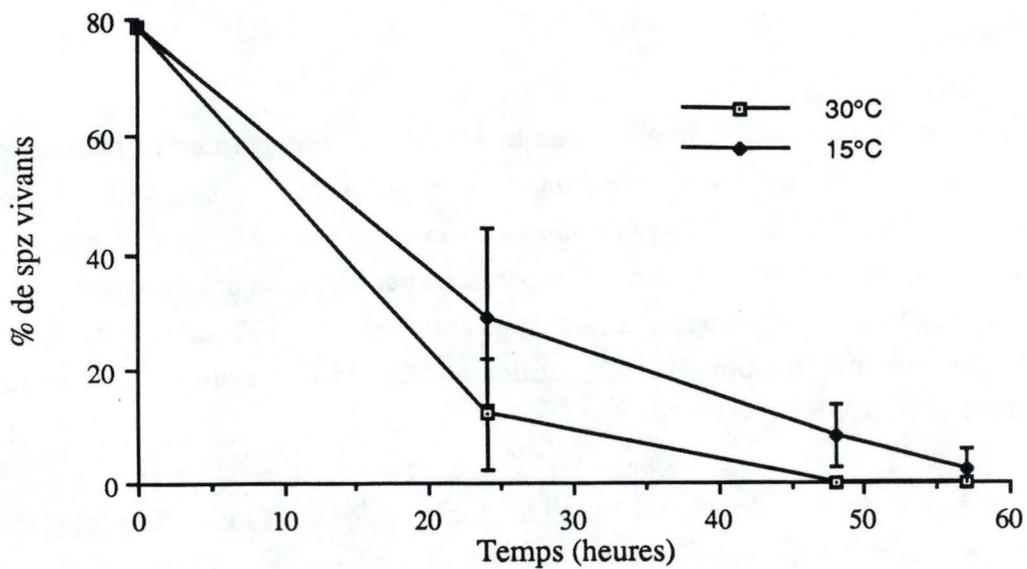


Fig 4.1: pourcentage de spz vivants en fonction du temps, pour la moyenne de toutes les combinaisons à 15 et 30°C

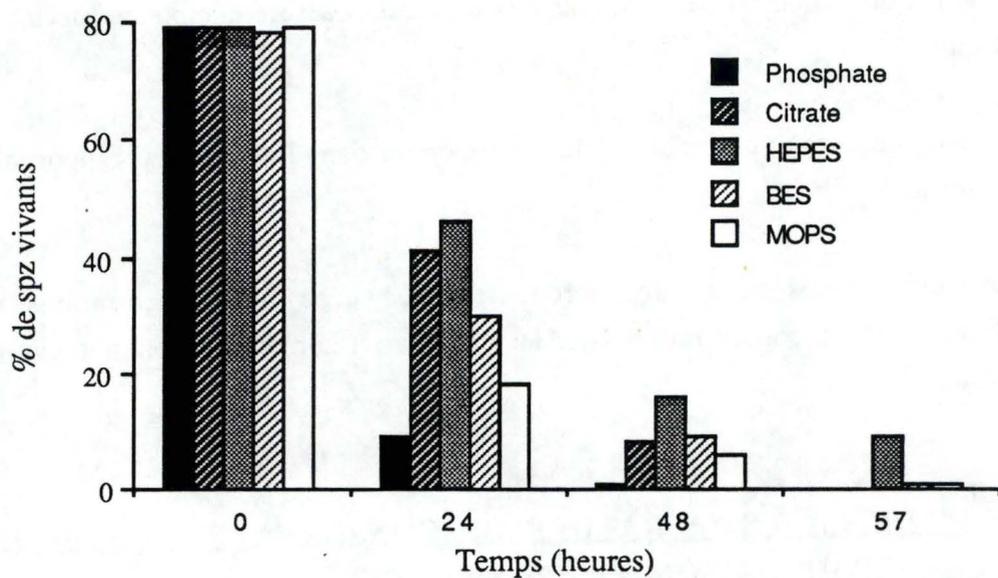


Fig 4.2: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour chaque tampons, à 30°C

### 1.3.1. Schéma expérimental

Les cinq tampons sont testés chacun avec les 16 combinaisons différentes de sucres, soit 80 milieux au total. La concentration en tampon est de 150 mM. Un lot comprenant les 80 milieux (additionnés des spermatozoïdes) est maintenu à 30°C et l'autre à 14°C. Le pourcentage de spermatozoïdes ayant survécu au stockage est déterminé dans chaque tube (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle des frottis morts/vivants), après dilution (0h) et après 24h, 48h et 58h. Ces temps supérieurs ont été choisis en raison de l'amélioration apportée par l'expérience précédente. L'expérience est réalisée 3 fois.

### 1.3.2 Résultats

Il apparaît très clairement que la conservation est bien meilleure à 14°C qu'à 30°C (fig. 4.1). En effet si on observe le pourcentage de spermatozoïdes vivants, dans chaque tampon (moyenne des 16 combinaisons de sucres pour chaque tampon) en fonction du temps de conservation, on remarque déjà après 24 heures la supériorité des milieux maintenus à 14° C (28 %) sur les mêmes maintenus à 30°C (12 %). Après 48 heures, on ne trouve plus aucun spermatozoïde vivant dans les 5 types de milieux (et leur 16 combinaisons de sucres) maintenu à 30°C, alors que le taux de survie est en moyenne de 8 % à 14°C.

Comparons à présent les milieux utilisés à 14°C. Les combinaisons donnant les meilleurs résultats sont celles à base d'HEPES (fig. 4.2). En prenant la moyenne des 16 combinaisons à base d'HEPES, on obtient encore 9 % de spermatozoïdes vivants après 58 heures de conservation, alors qu'on en obtient 1% seulement pour les milieux à base de tampon BES et MOPS et 0% pour ceux à base de tampon phosphate et citrate.

Les combinaisons à base d'HEPES donnant de meilleurs résultats en moyenne (à 14°C), il reste à déterminer la meilleure combinaison sucres-tampon (HEPES). A la fin de l'expérience, soit après 58 heures de conservation, la combinaison HEPES-glucose-fructose donne les meilleurs résultats (fig. 5) . 20% de spermatozoïdes vivants contre 15% pour la combinaison HEPES-inositol-manitol ( $p < 0.05$ ). Toutes les combinaisons (HEPES + sucres) donnent de meilleurs résultats que le témoin (tampon HEPES sans sucre) excepté la combinaison HEPES + glucose-fructose-mannitol.

Enfin, en ce qui concerne le pH, si la conservation à 30°C provoque encore une faible acidification du milieu à long terme (celui-ci chute d'une unité en moyenne après 24 heures), la conservation à 14°C se déroule jusqu'à la fin (mort de tous les

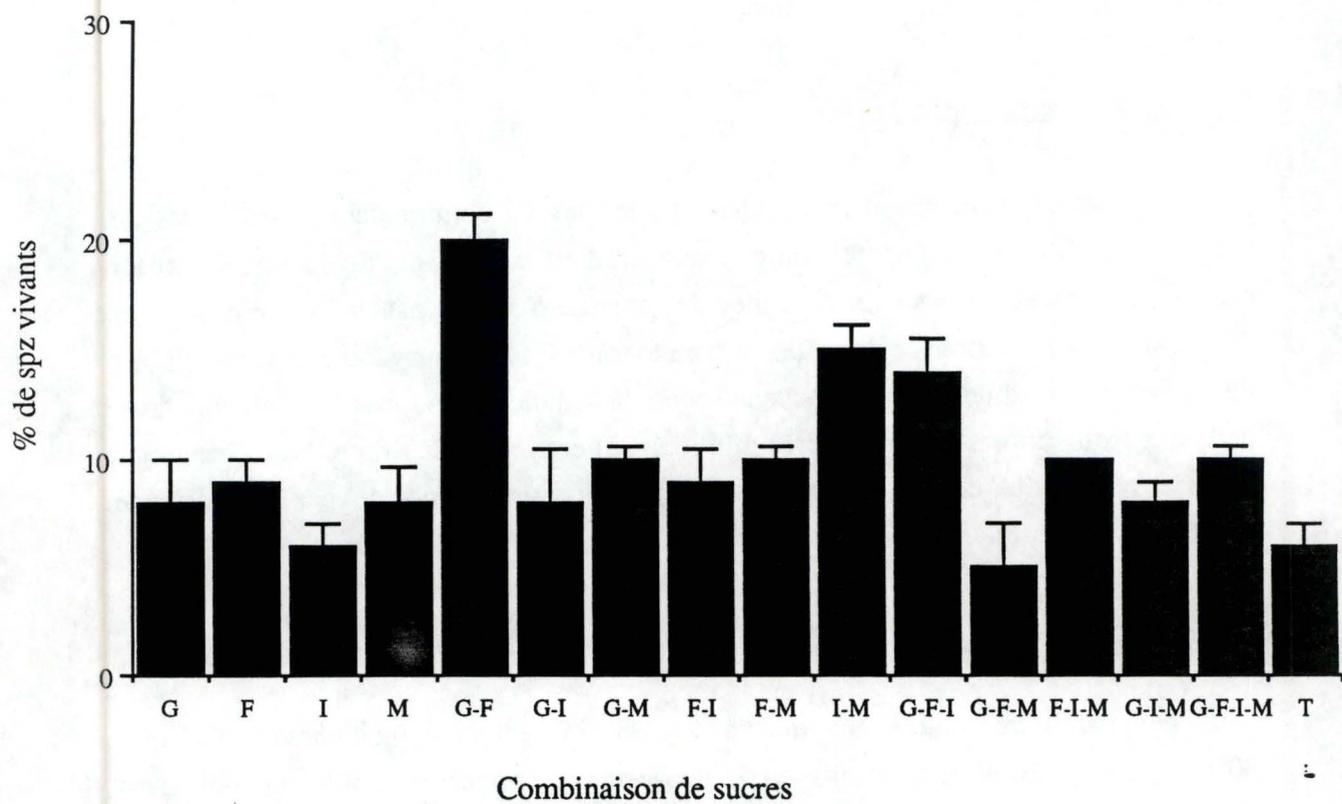


Fig 5: pourcentage de spz vivant après 58 heures pour chaque combinaison HEPES-sucres

spermatozoïdes) sans connaître de variations supérieures à quelques dixièmes d'unité (fig. 6).

### 1.3.3. Discussion

Il apparaît très nettement que la conservation à basse température (14°C) donne de meilleurs résultats par rapport à une conservation à 30°C, et ceci quel que soit le tampon utilisé. On peut émettre comme hypothèse qu'une température de 14°C permet une réduction importante du métabolisme des spermatozoïdes; ceci semble confirmé par la faible agitation observée parmi les spermatozoïdes conservés à 14°C par rapport à l'agitation importante observée dans les milieux maintenus à 30°C. Ce ralentissement métabolique pourrait permettre de réduire la production d'acide lactique par les spermatozoïdes, celui-ci s'avérant toxique après un certain temps; ceci expliquerait la diminution de pH plus faible dans les milieux à 14°C par rapport aux milieux à 30°C.

Ce ralentissement métabolique pourrait permettre de prolonger la survie des spermatozoïdes en réduisant leur besoins énergétiques; la quantité de substances énergétiques (sucres) fournie au départ s'épuisant moins vite.

En ce qui concerne le tampon, la supériorité de L'HEPES permet d'envisager deux hypothèses. Soit cette substance possède un pouvoir tampon supérieur aux autres, soit elle est à long terme moins toxique que les autres. La première hypothèse semble la moins plausible, car aucune différence significative n'a pu être observée entre les tampons à une concentration de 150 mM en ce qui concerne la diminution de pH. Il semble donc que l'HEPES soit, des cinq tampons essayés, le moins toxique pour une culture de longue durée. Ceci n'est en soi pas surprenant, ce tampon étant couramment utilisé en culture de cellules telles que lymphocytes, fibroblastes, cellules granulosales de follicules ovariens (Barret et Whates, 1990) et cellules lutéales (Kim et Greenwald, 1984; Barret et Whates, 1990).

Enfin, l'adjonction d'une combinaison équipondérale de glucose et de fructose donne des résultats supérieurs à toutes les autres combinaisons y compris celle sans sucre (témoin HEPES 150 mM seul). Le glucose et le fructose étant les substrats énergétiques quasi exclusifs des spermatozoïdes (via la voie glycolitique d'Embden-Meyerhof) dans le plasma séminal du bélier (Hafez, 1980), il était prévisible qu'ils jouent ce rôle également *in vitro*. Ils semblent être les seuls capables de fournir l'énergie nécessaire aux spermatozoïdes pour assurer le maintien de leurs fonctions vitales pendant le stockage. Ceci concorde avec le fait qu'à l'heure actuelle, les sucres autres que le glucose et le fructose n'ont pas de rôle énergétique connu chez le bélier (Derivaux et Ectors, 1986).

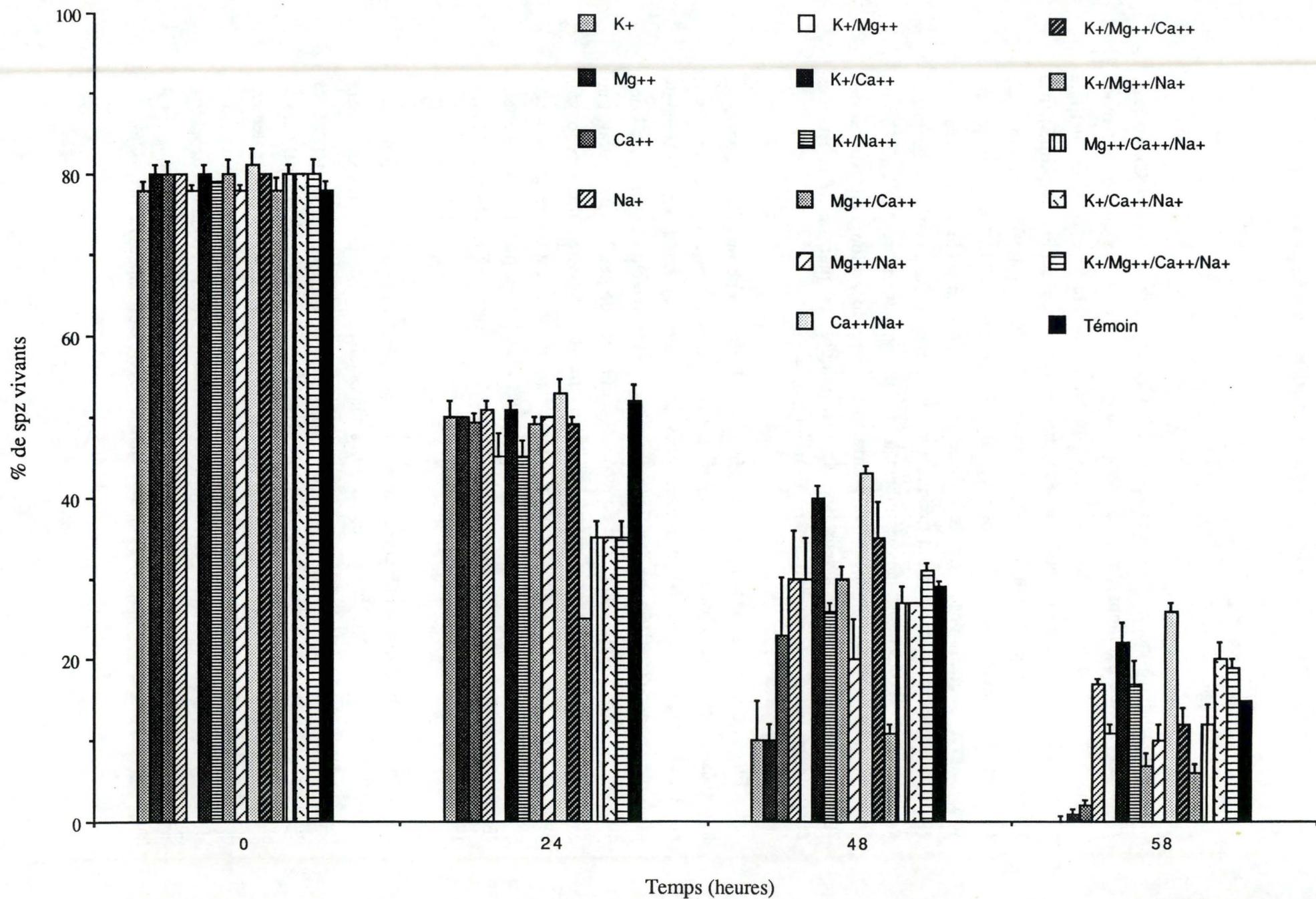


Fig 7: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour les différentes

### 1.3.4. Conclusions

Que ce soit pour la température, le tampon ou le mélange de sucres, l'expérience permet de tirer des conclusions précises.

Les expériences ultérieures se dérouleront donc à 14°C, avec l'HEPES comme tampon (à une concentration de 150 mM) et avec un mélange équimoléculaire de glucose et de fructose (1,15 g/50 ml de milieu).

## 2. CHOIX DE LA MEILLEURE COMBINAISON IONIQUE

Nous avons testé l'effet de 4 ions présents dans le plasma séminal de bélier ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) sur la survie des spermatozoïdes conservés dans notre milieu de base. Ces quatre ions ont été incorporés sous forme de chlorure, séparément et en combinaisons.

### 2.1. SCHEMA EXPERIMENTAL

L'expérience consiste à diluer la semence dans 16 tubes contenant chacun le milieu de base (tampon + sucres, à 14°C) additionné d'une des combinaisons d'ions (15 combinaisons différentes + un témoin: milieu de base sans ions). La littérature n'abonde pas sur les concentrations ioniques idéales à ajouter à un milieu de conservation de semence, en ce qui concerne le bélier, les ions ont été ajoutés selon les concentrations physiologiques du plasma séminal. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est estimé (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle du frottis mort/vivant) après dilution (0h) et après 24h, 48h et 58h. L'expérience est réalisée trois fois.

### 2.2. RESULTATS

Après 24 heures, on ne distingue aucune différence significative entre les milieux (additionnés d'ions) donnant les meilleurs résultats (milieu de base +  $\text{Na}^{++}$ , +  $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$  et +  $\text{Ca}^+/\text{Na}^+$ ) et le témoin (fig.7). Par contre on remarque déjà que la combinaison ionique  $\text{K}^+/\text{Mg}^{++}/\text{Na}^+$  est significativement moins favorable à la survie des spermatozoïdes que le témoin ( $p < 0.05$ ).

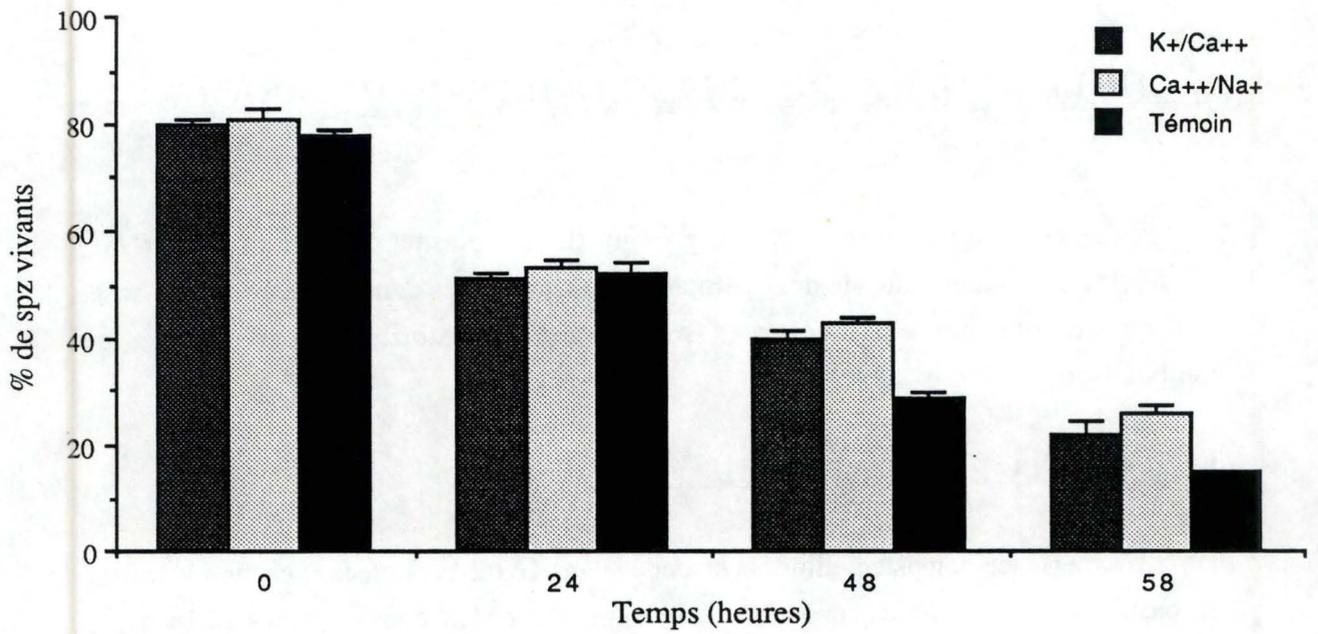


Fig 8: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour les 2 meilleures combinaisons ioniques, comparées au témoin.

Après 48 heures, des différences apparaissent entre le milieu de base additionné de la combinaison ionique  $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$  et le témoin; cette amélioration par rapport au témoin est significative ( $p < 0.05$ ). La combinaison ionique  $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$  donne également de meilleurs résultats que le témoin mais cette différence est statistiquement non significative. Par contre la moitié des combinaisons donne une survie moins bonne par rapport au témoin.

Enfin, après 58 heures, on peut voir que la plupart des combinaisons ioniques essayées donnent de moins bons résultats que le témoin (sans ions). Le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans 9 des combinaisons testées est en effet inférieur à celui du tube témoin. Les 6 autres combinaisons semblent apporter une amélioration par rapport au témoin; toutefois, seules les combinaisons ioniques  $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$  sont significativement différentes du témoin ( $p < 0.05$ ).

Le pH ne pose plus de problème et se maintient aux environs de 7 pendant toute la conservation; il est de 6,5 à la fin des 58 heures qu'a duré l'expérience.

### **2.3. DISCUSSION**

Si le rôle physiologique des ions dans le plasma séminal est de mieux en mieux connu et fait l'objet de nombreuses recherches et publications, peu d'auteurs s'accordent par contre sur les mécanismes leur permettant d'améliorer la survie de spermatozoïdes conservés *in vitro*. Peu de recherches ayant été réalisées en ce domaine, nous avons décidé d'adopter les concentrations ioniques physiologiques du plasma séminal de bélier. Il ressort des résultats que deux combinaisons ioniques donnent de meilleurs résultats que le témoin (sans ions); ce sont les combinaisons  $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ . Si l'on observe le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans ces deux milieux au cours de la conservation (fig. 8), on remarque qu'ils permettent une survie égale ou supérieure au témoin tout au long de la conservation.

Le calcium étant un régulateur important du fonctionnement cellulaire et coordonnant de nombreuses réactions intracellulaires (Lehninger et al., 1969; Breitbart et al., 1983), nous nous attendions à ce qu'il soit nécessaire de l'incorporer dans notre milieu de conservation. Toutefois il semblerait qu'une concentration trop élevée en calcium dans le milieu extérieur ait un effet néfaste sur la survie et la motilité du sperme de mammifères, probablement par une augmentation excessive et toxique des niveaux calciques intracellulaires (Davis, 1978). C'est pourquoi nous n'avons pas cherché à incorporer au milieu un taux de calcium supérieur à celui rencontré dans le plasma séminal du bélier.

Le sodium, bien qu'ayant un rôle physiologique encore flou en ce qui concerne le plasma séminal de bélier, est l'ion le plus abondant de celui-ci, avec une concentration de 0,18 g/100 ml. Sa concentration plasmatique est 25 fois supérieure à celle du calcium et il est probable qu'il joue un rôle dans le maintien de la PO et dans la régulation des échanges métaboliques. L'utilité du sodium en vue de maintenir les spermatozoïdes en vie en milieu artificiel s'explique donc aisément.

Le magnésium n'apporte aucune amélioration au milieu; au contraire, incorporé seul il donne des résultats nettement moins valables que le témoin ( $p < 0.05$ ) dès 48 heures, et après 58 heures le pourcentage de spermatozoïdes vivants est quasiment nul dans le tube contenant cet ion (fig. 7). L'effet néfaste du magnésium est atténué lors de combinaisons avec le calcium et / ou le sodium. Le magnésium ayant la propriété de stimuler fortement la glycolyse et la mobilité des spermatozoïde (Hafez, 1980), on peut émettre comme hypothèse que les spermatozoïdes maintenus dans un milieu additionné de celui-ci ne connaissent pas le même repos métabolique que les autres et consomment rapidement les substrats énergétiques mis à leur disposition (sucres). Ce "travail" inutile et l'"épuisement" en résultant pourraient après quelque temps éliminer la majorité des spermatozoïdes maintenus dans le milieu, surtout quand (après quelques heures de stockage) les substrats énergétiques commencent à manquer. Ceci expliquerait pourquoi l'effet néfaste du magnésium ne se fait pas sentir pendant les premières 24 heures.

#### 2.4. CONCLUSIONS

- Le magnésium a un effet défavorable sur la survie des spermatozoïdes, à long terme.
- Les mélanges ioniques  $Ca^{++}/Na^+$  et  $K^+/Ca^{++}$  sont préférables au milieu témoin (sans ion) et supérieurs à tous les autres mélanges.
- Le mélange  $Ca^{++} / Na^+$  (respectivement 12,5 mg et 112,5 mg par 50 ml de milieu) sera utilisé dans les expériences ultérieures, bien que nous n'ayons pu prouver statistiquement sa supériorité sur le mélange  $K^+/Ca^{++}$  ( $p < 0.05$ ).
- Le pH ne posant plus de problème ne sera plus testé par la suite.

### 3. CHOIX D'UN ANTIBIOTIQUE

Le but de cette expérience est de tester la capacité de différents antibiotiques à réduire la mortalité parmi les spermatozoïdes conservés dans le milieu retenu, et ce en réduisant les germes banaux et spécifiques présents dans la semence.

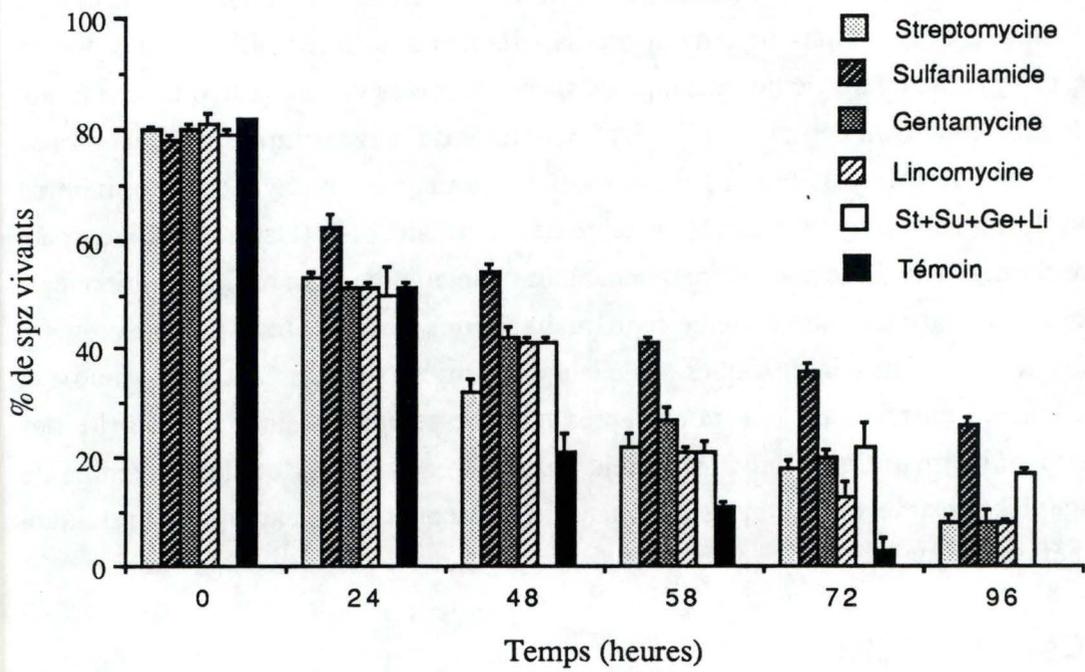


Fig 9: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour les différentes combinaisons d'antibiotiques.

### **3.1. SCHEMA EXPERIMENTAL**

L'expérience consiste à diluer la semence dans 6 tubes contenant chacun le milieu de base (tampon + sucres + ions, à 14°C) auquel est ajouté (dans les 4 premiers tubes) un des 4 antibiotiques à tester, ainsi que les 4 antibiotiques ensemble (5<sup>ème</sup> tube). Un témoin (milieu de base sans antibiotique) est également préparé. Les 4 antibiotiques (streptomycine, sulfanilamide, gentamicine et lincomycine) sont incorporés selon les doses couramment utilisées en milieu de culture. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est estimé (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle du frottis mort / vivant) après dilution (0h) et après 24h, 48h, 58h, 72h et 96h. L'expérience est réalisée trois fois.

### **3.2. RESULTATS**

Si l'on compare l'efficacité des antibiotiques entres eux, on constate qu'après 96 heures de conservation les deux milieux donnant les meilleurs résultats sont celui additionné de sulfanilamide seule et celui additionné des 4 antibiotiques. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est respectivement , dans ces deux milieux, après 96 heures, de 26% et de 14% (fig. 9). De ces deux milieux, seul celui comprenant la sulfanilamide seule donne des résultats significativement supérieurs aux autres combinaisons ( $p < 0.05$ ) et on peut mettre en évidence statistiquement une supériorité du milieu additionné de sulfanilamide par rapport à celui additionné des 4 antibiotiques ensemble ( $p < 0.05$ ).

Si l'on observe le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans les différents milieux en fonction du temps, on constate que les milieux contenant les antibiotiques (séparément ou tous ensemble) permettent tous, sans exception, une meilleure survie que le milieu témoin ne contenant pas d'antibiotique (fig. 10). Ceci s'observe à n'importe quel temps de la culture, depuis la dilution de la semence dans les milieux, jusqu'à la mort de la totalité des spermatozoïdes de chaque milieu.

### **3.3. DISCUSSION**

Les antibiotiques semblent être d'une importance vitale dans la mise au point d'un dilueur performant. En effet, malgré toutes les précautions hygiéniques prises lors de la récolte et des manipulations accompagnant la dilution de la semence, les échantillons spermatiques renferment toujours un pourcentage variable de germes contaminants, susceptibles de jouer un rôle défavorable sur la conservation et la fertilité du sperme de bélier.

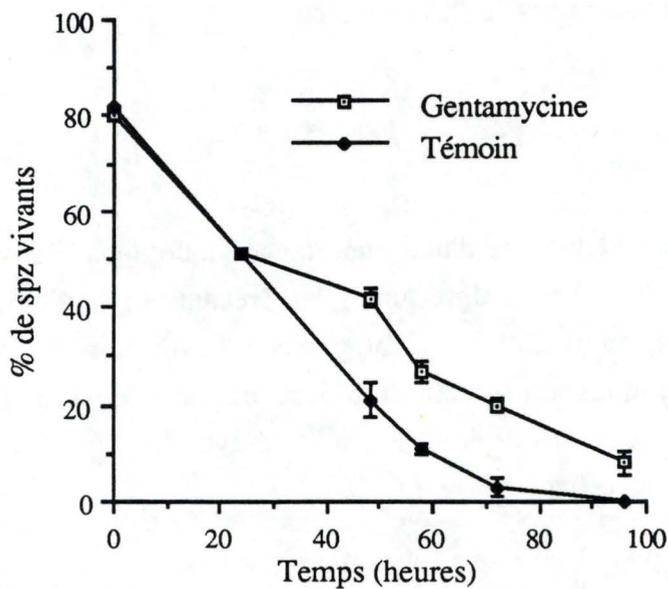
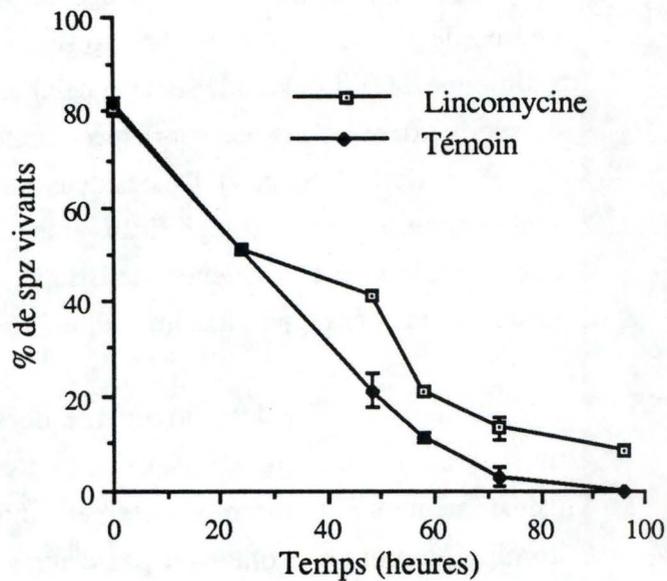
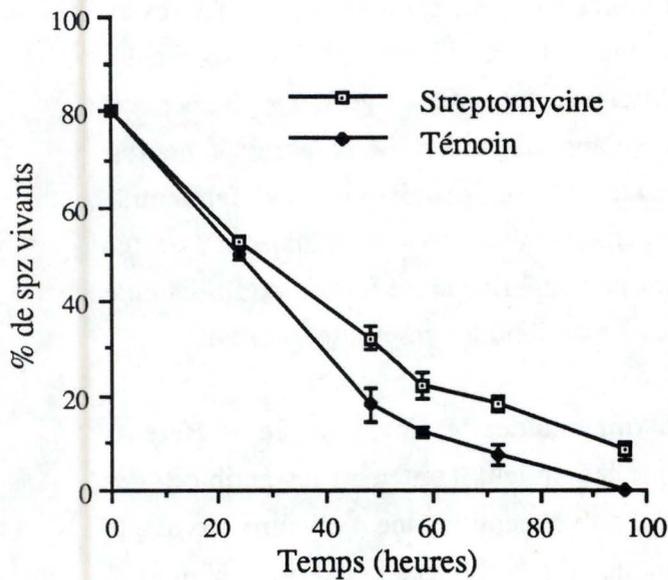
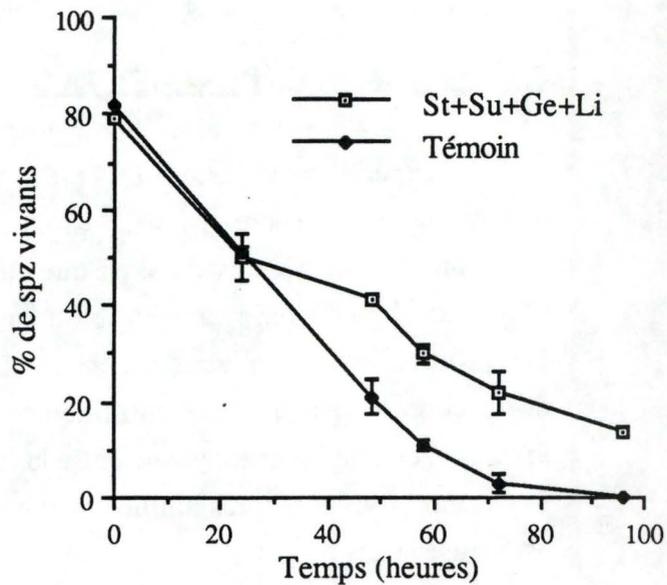
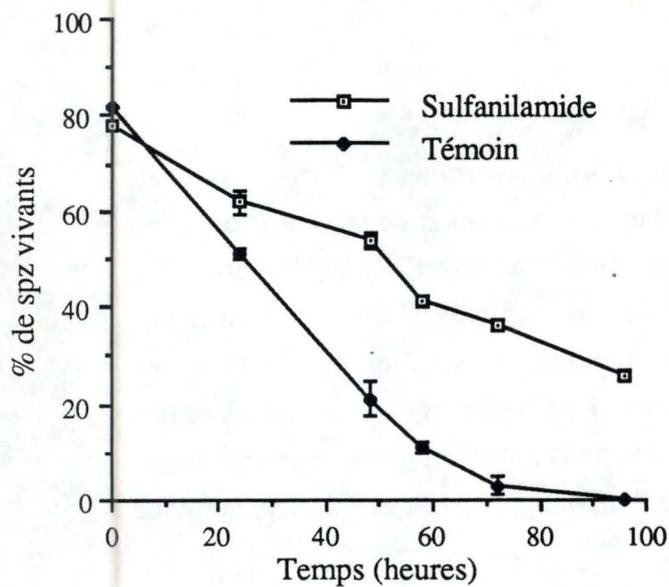


fig 10: pourcentage de spz vivants en fonction du temps. Chaque antibiotique étant comparé au témoin.

Les améliorations obtenues grâce à l'addition d'antibiotiques à notre milieu étaient attendues et confirment les résultats de la littérature. En effet la plupart des antibiotiques testés ici sont déjà largement connus pour leurs effets bénéfiques sur les cultures de tissus et les milieux actuels de dilution de la semence. La streptomycine est couramment employée dans le dilueur au lait écrémé actuellement recommandé par l'INRA et la gentamicine est par exemple utilisée comme antibiotique dans la culture *in vitro* de follicules ovariens de brebis (Demuynek, 1990).

En ce qui concerne l'amélioration spectaculaire apportée par l'addition au milieu de sulfanilamide à raison de 3 gr par litre, cela confirme les résultats obtenus par Salisbury et Knodt cités par Derivaux et Ectors (1986). Ils ont en effet remarqué qu'une adjonction de sulfanilamide de concentration identique à la nôtre, assurait une meilleure survie aux spermatozoïdes dilués. Ces auteurs affirment que la sulfanilamide n'aurait pas seulement un effet antibactérien mais qu'elle modifierait également le métabolisme du spermatozoïde, à savoir une diminution de la consommation d'oxygène et de glucose. Cet argument pèse en faveur de notre hypothèse selon laquelle une activité métabolique minimale et une économie dans la consommation des substrats énergétiques disponibles permettrait aux spermatozoïdes une survie bien supérieure dans le milieu de dilution (se reporter aux points 2.3.4. et 3.4.).

Le fait que le milieu contenant les 4 antibiotiques ensemble donne de moins bons résultats qu'avec la sulfanilamide seule, alors que chaque antibiotique seul donne de meilleurs résultats que le témoin, peut paraître étrange à priori. Pourtant il faut être conscient du fait que si les antibiotiques ont un effet néfaste à faibles concentrations sur les micro-organismes, à fortes concentrations ils peuvent exercer leur toxicité à l'encontre des spermatozoïdes présents dans le milieu. On sait par exemple que si une dose d'oxytétracycline augmente la survie de spermatozoïdes dilués, il suffit par contre de la tripler pour qu'elle s'avère toxique. Il est donc fort plausible qu'une addition de 4 antibiotiques, chacun à dose efficace, dépasse le taux maximal supportable par la semence.

### **3.4. CONCLUSIONS**

Pour une conservation du sperme de plus 10 à 20 heures, l'addition d'un antibiotique est utile. Le sulfanilamide est plus efficace que les autres substances testées utilisées seules, elle est plus efficace qu'un mélange de substances qui présente vraisemblablement une plus grande toxicité, le sulfamidé sera dorénavant ajouté au milieu à une dose de 150mg/50ml de milieu.

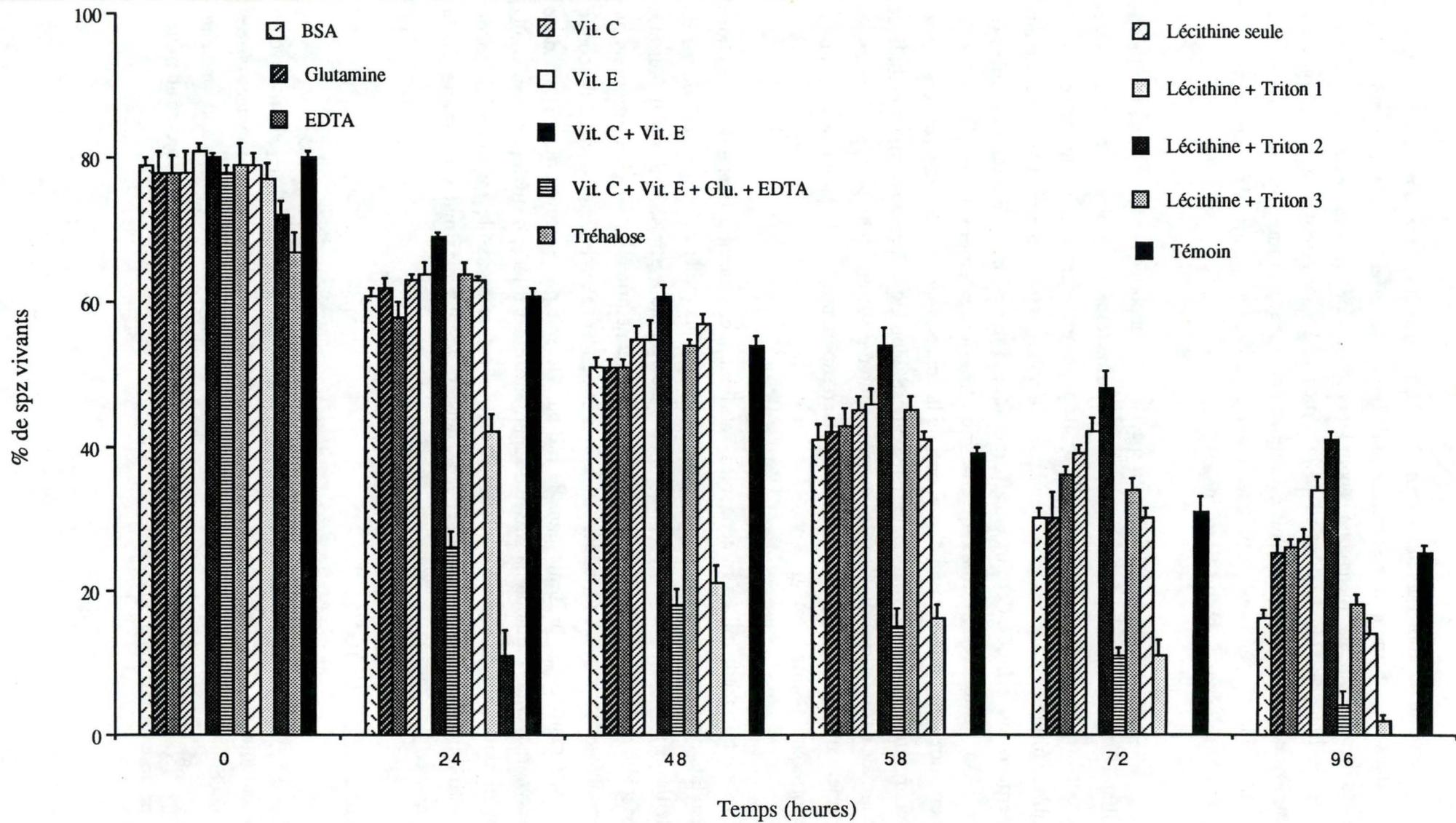


Fig 11: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour les différentes combinaisons de protecteurs.

## 4. CHOIX DE PROTECTEURS SPERMATIQUES

Nous avons aussi voulu tester divers protecteurs spermatiques rencontrés dans la littérature (antioxydants, protecteurs membranaires, ...) afin d'étudier les améliorations éventuelles qu'ils pourraient encore apporter à notre milieu de conservation et de dilution de la semence.

### 4.1. SCHEMA EXPERIMENTAL

L'expérience consiste à diluer la semence dans 13 tubes. Les 12 premiers contiennent chacun le milieu de base (tampon + sucres + ions + antibiotique, à 14°C) additionné d'une des combinaisons de protecteurs essayées (se reporter au tableau 1 pour la liste complète des combinaisons testées), le 13<sup>ème</sup> contenant le milieu de base sans protecteur et constituant donc le témoin de l'expérience. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est estimé (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle du frottis mort / vivant) après dilution (0h) et après 24h, 48h, 58h, 72 h et 96 h. L'expérience est réalisée trois fois.

### 4.2. RESULTATS

La figure 11 montre l'évolution du pourcentage de spermatozoïdes vivants en fonction du temps avec les différentes combinaisons testées. Après 96 heures de conservation, des différences importantes peuvent être observées. On peut statistiquement observer que certaines combinaisons donnent des résultats inférieurs au témoin ne contenant pas de protecteurs ( $p < 0.05$ ), ces combinaisons sont au nombre de 6: BSA; vit. C + vit. E + glutamine + EDTA; lécithine seule; lécithine + triton x-100 aux trois concentrations essayées. Il n'est pas possible de mettre en évidence des différences significatives entre le témoin et les combinaisons suivantes: glutamine; vit. C, EDTA et tréhalose. Par contre deux milieux donnent des résultats supérieurs au témoin: le milieu additionné de vitamine E seule et celui additionné de vitamine C et de vitamine E ensemble ( $p < 0.05$ ).

Si l'on compare les courbes de survies des deux meilleurs milieux aux cours du temps et par rapport au témoin (fig. 12), on remarque que le milieu contenant uniquement la vitamine E permet une survie plus ou moins identique pendant les premières 48 heures et ne devient significativement meilleur qu'après 72 heures ( $p < 0.05$ ). Quant au milieu contenant la vitamine C et la vitamine E, l'amélioration qu'il apporte par rapport au témoin est plus nette et plus rapide; on peut déjà trouver une différence significative après 58 heures ( $P < 0.05$ ).

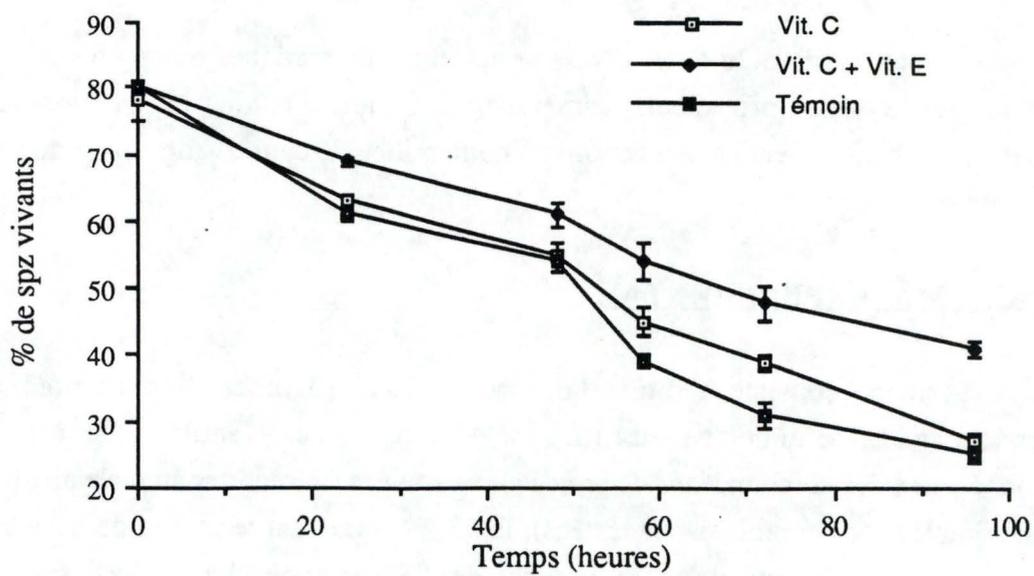


Fig 12: pourcentage de spz vivants en fonction du temps pour les deux meilleurs protecteurs, comparé au témoin.

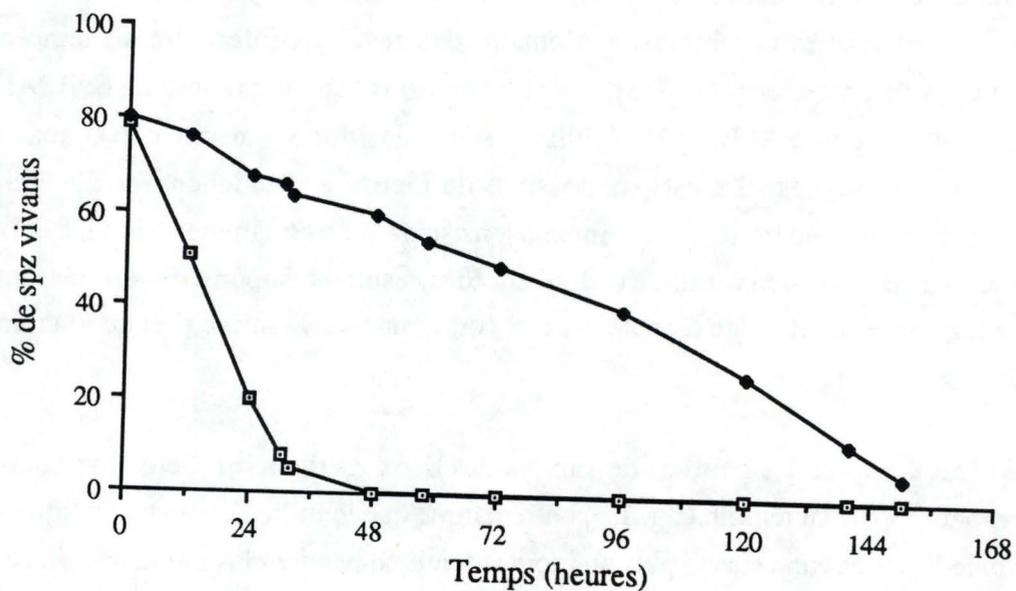


Fig 13: comparaison entre le pourcentage de spz vivants en fonction du temps avec le milieu INRA et notre dilueur (LB4).

### 4.3. DISCUSSION

Contrairement à ce que la littérature laissait espérer, la sérum albumine bovine (BSA) et la lécithine avec ou sans triton x-100 donnent toutes deux de mauvais résultats. Dans le cas de la lécithine (phosphatidylcholine), on peut postuler que sans l'adjonction de détergent, celle-ci reste sous forme inutilisable pour les spermatozoïdes (formation spontanée de micelles). La solution la plus simple paraissait être d'ajouter au milieu une quantité suffisamment importante de détergent pour empêcher la formation de ces micelles, et à la fois suffisamment faible pour ne pas déstabiliser les membranes plasmiques des spermatozoïdes. Ce compromis nous paraît en pratique difficilement réalisable et nous déconseillons l'emploi de lécithine en combinaison avec le Triton x-100, celui-ci entraînant à court terme une forte augmentation de la mortalité des spermatozoïdes, même à faible concentration (fig 11) et ceci probablement par déstabilisations membranaires.

Contrairement à Salisbury et al. (cité par Corteel en 1980) nous n'avons pas observé d'amélioration significative avec L'EDTA, sensé protéger les spermatozoïdes de leurs propres effets toxiques.

Le tréhalose sensé éviter la formation d'une phase gel de la membrane (Rudolph et Crowe, 1985) et assurer un étalement des lipides et une stabilisation accrue de la membrane plasmique des spermatozoïdes, ne nous a pas permis d'obtenir d'amélioration et nous avons constaté qu'il s'avérait même significativement moins bon par rapport au témoin ( $p < 0.05$ ). Nous déconseillons donc également l'addition de tréhalose dans un milieu de dilution de semence.

Par contre, nous avons pu prouver ( $p < 0.05$ ) le rôle protecteur d'un mélange de vitamine C et de vitamine E sur la conservation in vitro de la semence de bélier (fig. 12). Le mécanisme responsable de cette amélioration serait la protection conférée contre les peroxydations lipidiques par ces deux vitamines. La vitamine E étant la vitamine liposoluble la plus efficace contre les attaques radicalaires et la vitamine C permettant d'intercepter les radicaux libres générés dans la phase aqueuse (Bendich, 1986) et surtout de régénérer la vitamine E une fois dans son état oxydé (Niki et al., 1982); l'amélioration obtenue en additionnant ces 2 vitamines dans notre milieu nous permet d'imaginer que les spermatozoïdes sont victimes, lors d'une conservation de longue durée, d'importantes attaques radicalaires. Ces 2 vitamines agissant en synergie permettraient une réduction des attaques radicalaires subies par les membranes plasmiques et donc une amélioration de la survie de spermatozoïdes conservés in vitro. Cette synergie permettrait d'expliquer pourquoi l'amélioration apportée par l'addition d'un mélange de vitamine C et de

vitamine E est supérieure à l'amélioration apportée par l'adjonction de ces deux vitamines séparément.

#### **4.4. CONCLUSIONS**

La combinaison vitaminée (C+E) améliore significativement la survie des spermatozoïdes dilués. Etant la seule apportant une amélioration significative dans notre milieu, nous la préférons aux autres combinaisons testées et l'incorporerons dans celui-ci.

### **5. COMPARAISON ENTRE LE DILUEUR ACTUEL INRA ET NOTRE DILUEUR**

Après avoir terminé la mise au point de notre milieu de dilution et de conservation de la semence de bélier, l'objet de cette expérience est d'évaluer quantitativement la supériorité de notre dilueur sur celui actuellement préconisé par l'Institut National de la Recherche agronomique (INRA).

#### **5.1. SCHEMA EXPERIMENTAL**

L'expérience consiste à diluer la semence dans deux tubes. Le premier contient le dilueur actuel INRA (lait en poudre dissout dans de l'H<sub>2</sub>O + streptomycine) et le second notre dilueur dans sa version finale : Tampon HEPES + mélange Glucose-fructose + mélange calcium-sodium + sulfanilamide + mélange vit. C-vit. E. La température de conservation est de 14°C. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est estimé (par moyenne entre la technique de la motilité individuelle et celle du frottis mort/vivant) après dilution (0h) et pendant les 150 premières heures. A la fin de la conservation, une estimation du taux de réaction acrosomiale prématurée est réalisée (méthode de frottis au giemsa). L'expérience est réalisée trois fois.

#### **5.2. RESULTATS**

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants en fonction du temps pour les 2 milieux est donné à la figure 13.

Notre dilueur permet de conserver la semence au maximum une 150<sup>aine</sup> d'heures, contre une 40<sup>aine</sup> d'heures pour le dilueur INRA.

Des différences importantes sont observables rapidement; après une conservation de 10 heures, le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans le milieu INRA est déjà inférieur de 25 % à celui de notre milieu.

Le taux de réaction acrosomiale prématurée est (à la fin de la conservation) respectivement de 2% après 32 heures pour le dilueur INRA et de 3% après 150 heures pour notre dilueur .

### **5.3. DISCUSSION**

Etant donné que lors d'une insémination artificielle, une proportion minimale de 60 % de spermatozoïdes vivants est nécessaire pour avoir de bonnes chances de succès, on peut supposer que notre milieu permette de porter le laps de temps disponible entre le prélèvement et l'insémination de 10 heures (cas du dilueur INRA) à environs 48 heures(fig. 13).

Un élément crucial dans la conservation de spermatozoïdes *in vivo* est l'état de leur acrosome. En effet celui-ci contient les enzymes nécessaires à la fécondation de l'ovocyte et doit donc être intact jusqu'à la fin du stockage du spermatozoïde. Si la réaction acrosomiale a lieu dans le milieu, avant l'insémination, le spermatozoïde dépourvu des enzymes acrosomiaux, sera incapable de réaliser la fécondation. Le milieu diluant fortement les facteurs empêchant le spermatozoïde de se trouver dans les conditions propices pour subir la réaction acrosomiale, après quelques temps dans le milieu, les spermatozoïdes risquent de subir une réaction acrosomiale prématurée. Ce risque est encore renforcé par le fait que notre milieu contient du calcium et que celui-ci est justement un inducteur de la réaction acrosomiale (Yanagimachi, 1982) . C'est pourquoi nous avons voulu estimer le pourcentage de gamètes ayant subi une réaction acrosomiale prématurée pendant leur conservation dans le milieu.

Les résultats obtenus sont rassurants, 3 % seulement des spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomiale prématurée, ce qui laisse présager que la fécondité n'a pas été fortement altérée par la conservation prolongée dans notre milieu.

### **5.4. CONCLUSION**

Notre milieu permet de conserver une partie de la semence de bélier pendant environ 150 heures et n'induit pas de réaction acrosomiale prématurée importante

Il devrait permettre de réaliser avec succès des inséminations artificielles pendant les 48 premières heures suivant le prélèvement de la semence.

## **6. COMPARAISON DE LA FERTILITE OBTENUE PAR INSEMINATION ARTIFICIELLE AVEC LES 2 MILIEUX**

Après avoir déterminé in vitro la supériorité dans le temps de notre dilueur sur le dilueur INRA, nous avons voulu comparer notre milieu, in vivo, par rapport à ce même dilueur lors d'inséminations artificielles, afin de déterminer si notre milieu n'altère pas la fécondité des spermatozoïdes qui y sont dilués et conservés, et de déterminer si notre milieu apporte un éventuel avantage sur la fertilité des brebis inséminées.

### **6.1. SCHEMA EXPERIMENTAL**

L'expérience est réalisée avec 78 brebis Suffolk ayant mis bas en décembre-janvier. Deux lots sont constitués au hasard, le premier de 43 brebis est inséminé avec le dilueur INRA conservé à 14°C, le second avec notre dilueur conservé à 14°C également. L'insémination est effectuée le 11 avril 1991 à Faulx-les-Tombes. Après 40 jours, le 20 mai, le nombre de brebis gestantes est estimé par échographies. Il est important de signaler que ces inséminations ont été réalisées en pleine période d'anoestrus chez la brebis Suffolk, ce qui implique un taux de réussite assez faible (moins de 25%). Ce choix nous était imposé par les délais impartis pour réaliser cette étude.

### **6.2. RESULTATS**

Au total, 12 brebis sont déclarées gestantes parmi les 78 brebis inséminées, soit une fertilité équivalente à 15 %.

Des 43 brebis inséminées avec le dilueur INRA, 4 sont déclarées gestantes, soit une fertilité équivalente à 9 %.

Des 35 brebis inséminées avec notre dilueur, 8 sont déclarées gestantes, soit une fertilité équivalente à 23 %.

L'analyse statistique ne permet pas de mettre en évidence une supériorité significative de notre dilueur sur le dilueur INRA (Chi-carré de 3), néanmoins nous sommes très proche du seuil de significativité, la probabilité d'obtenir une telle valeur de Chi-carré (un degré de liberté) se situant entre 0.1 et 0.05. Nous pouvons affirmer la supériorité de notre dilueur avec une probabilité de nous tromper comprise entre 5 % et 10 %.

### 6.3. DISCUSSION

Les résultats de l'expérience précédente ont montré que notre dilueur présente des propriétés supérieures au dilueur couramment utilisé pour l'insémination artificielle et recommandé par l'INRA. Toutefois cette supériorité reste théorique car se basant sur des caractéristiques observées *in vitro*, telle qu'une survie des spermatozoïdes prolongée d'un facteur quatre et un meilleur maintien du pH du milieu. La conservation, même si elle se prolonge durant 150 heures n'induit pas de réaction acrosomiale prématurée; on peut donc espérer que les spermatozoïdes ayant survécu au stockage ont conservé leur capacité à pénétrer la zone pellucide entourant l'ovocyte.

Par contre, rien ne nous permet d'affirmer que la fécondité des spermatozoïdes ayant survécu à leur conservation dans notre milieu, n'a pas été altérée par celui-ci. Le meilleur moyen de s'en assurer était de comparer notre milieu et le dilueur INRA sur le terrain par une série d'inséminations artificielles.

Les résultats sont plus qu'encourageants car non seulement notre dilueur ne semble pas altérer la fécondité davantage que le milieu de l'INRA, mais de plus il semble donner de meilleurs résultats que celui-ci. Etant très proches du seuil de significativité, nous aurions probablement pu mettre en évidence une différence entre les deux dilueurs en ayant mené une expérience à plus grande échelle, la puissance du test statistique augmentant avec le nombre total d'observations.

Le faible nombre de brebis gestantes est dû à la période à laquelle a été réalisée l'expérience (brebis en anoestrus). La même expérience réalisée en saison de reproduction aurait probablement permis de mettre en évidence un avantage plus significatif de notre dilueur sur le milieu INRA.

L'expérience ayant été réalisée dans le but de comparer notre milieu avec le milieu INRA, le temps de conservation à été réduit au minimum, le diluant INRA ne permettant pas d'inséminer avec de bonnes chances de succès après une conservation de la semence supérieure à 10 heures. Ce temps de stockage réduit a masqué les différences entre les deux dilueurs, car pendant les premières heures de stockage le pourcentage de spermatozoïdes vivants est assez semblable dans les deux milieux (fig. 13) ce qui n'est plus du tout le cas après seulement 12 heures.

Le but principal de cette expérience n'était pas de mettre en évidence une quelconque supériorité de notre dilueur, mais bien de tester sa non toxicité lors d'inséminations artificielles. Son efficacité par rapport au dilueur INRA sera évidemment meilleure en cas de conservation longue durée, bien que ceci n'ait pas pu être quantifié faute de temps. Le fait que notre dilueur semble donner de meilleurs résultats même lors

d'inséminations avec dilution uniquement (sans longue conservation de la semence), nous laisse cependant espérer obtenir lors des tests futurs des résultats supérieurs quel que soit le temps de stockage de la semence.

#### **6.4. CONCLUSIONS**

Notre milieu de conservation ne semble pas être toxique pour les spermatozoïdes. Il n'altère pas la fécondité des spermatozoïdes davantage que le milieu INRA. Il semble permettre une fécondité supérieure au milieu INRA, même lors de stockages de la semence.

Ces résultats permettent d'envisager des inséminations à longues distances où des stockages de semence de plusieurs dizaines d'heures sont nécessaires (inséminations intercontinentales) ce qui est encore difficilement réalisable aujourd'hui, le procédé de congélation de la semence de bélier n'étant pas encore au point. Un dilueur permettant de conserver la semence pendant plusieurs dizaines d'heures pourrait donc s'avérer utile pour l'implantation, le développement et l'amélioration génétique de cheptels ovins dans de nombreux pays en voie de développement.

# BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTS B., DENNIS B., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WATSON J.D.**, 1990. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London, 2<sup>nd</sup> edition.
- AMANN R.P. et PICKETT B.W.**, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, 7 (3), 145-153.
- BARRETT J. et WATHES D.C.**, 1990. The effect of oxytocin on progesterone secretion and of PGF<sub>2α</sub> on oxytocin secretion from bovine luteal and granulosa cells in culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 22, 297-309.
- BENDICH A., MACHLIN L.J. et SCANDUWA O.**, 1986. The antioxydant role of vitamin C. *Adv. in Free Radical Biology & Medicine*, 2, 419-444.
- BIRDS J.M.**, 1988. Motility & acrosomal changes in ionophore treated bovine spermatozoa and their relationship with in vitro penetration of zona-free hamster oocytes. *Theriogenology*, 32 (2), 227-242.
- BRADLEY M.P. et FORRESTER I.T.**, 1980. A Ca<sup>++</sup>- Mg<sup>++</sup> ATPase and active Ca<sup>++</sup> transport in the plasma membranes isolated from ram sperm flagelle. *Cell Calcium*, 1, 381-390.
- BREITBART H., STERN B. et RUBINSTEIN S.**, 1983. Calcium transport and Ca<sup>++</sup>- ATPase activity in ram spermatozoa plasma membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 728, 349-355.
- BREITBART H. et RUBINSTEIN S.**, 1983. Calcium transport by bull spermatozoa plasma membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 732, 464-468.
- BURTON G. W., FOSTER D. O., PERLY B., SLATER T. F., SMITH C. P. et INGOLD K. V.**, 1985. Biological Antioxydants. *Phil. Trans, R. Soc. Lond.*, 311 (B), 565-578.
- CORTEEL J. M.**, 1980. Effets du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20 (4A), 1111-1123.

- COUROT M.**, 1979. Semen quality and quantity in the ram. In: Sheep breeding, second edition. Eds Tomes G. T., Robertson D. E. and Lightfoot R. J., p. 495-504, Butterwoths, London.
- CROSS N. L., MORALES O., OVERSTREET J. W. et HANSON F. W.**, 1988. Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 38, 235-244.
- DAVIS B. K.**, 1978. Effect of calcium on motility and fertilization by rat spermatozoa in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 157, 54-58.
- DE LEEUW F. E., HSIAO-CHING C., COLENBRANDER B. et VERKLEIJ A. J.**, 1990. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27, 171-183.
- DEMUYNCK F.**, 1990. Mise au point d'une technique de culture in vitro de follicules ovariens de brebis. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en sciences biologiques, FUNDP, Namur.
- DERIVAUX J. et ECTORS F.**, 1986. Reproduction chez les animaux domestiques. Cabay, Louvain la Neuve, troisième édition.
- DIMITROPOULOS E.**, 1975. Valeur comparative "in vitro" et "in vivo" de deux dilueurs du sperme de taureau: le laiciphos plus 470 et le D. 36. *Ann. Méd. Vét.*, 119, 167-180.
- DOTT H. M., HARRISON R. A. P. et FOSTER G. C. A.**, 1979. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 55, 113-124.
- FLECHON J. E.**, 1985. Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze-fracture. *Am. J. Anat.*, 174, 239-248.
- FOURNIER-DELPECH S. et COUROT M.**, 1980. Glycoproteins of ram sperm plasma membrane. Relationship of proteins having affinity for Con A to epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 96 (2), 756-761.
- GIFFROY J. M.**, 1978. Notes d'embryologie des animaux domestiques. Cours de 3<sup>ème</sup> candidature en science vétérinaire, F.N.D.P., Namur.

**GORDON M. et BARNETT R.J.**, 1967. Fine structural cytochemical localization of phosphatases activities of rat and guinea pig. *Exp. Cell. Res.*, 48, 395-412.

**GRANNER D.K., MAYES P.A., MURRAY R.K. et RODWELL V.W.**, 1987. *Harper's Biochemistry*. Lange Medical Publications, San Mateo (California), 21<sup>th</sup> edition.

**HAFEZ E.S.E.**, 1980. *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Philadelphia, 4<sup>th</sup> edition.

**HARTREE E.F., MANN T.**, 1960. Phospholipids in mammalian semen. *J. Reprod. Fert.*, 1, 23-29.

**HOLT W.V. et NORTH R.D.**, 1984. Partially irreversible cold induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.*, 230, 473-483.

**HSU C.J. et HAMMOND J.M.**, 1987. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive Insulin-like Growth Factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 120, 198-207.

**JONES R.C.**, 1976. The nature of ultrastructural changes induced by exposure of spermatozoa to lysolecithin. *Theriogenology*, 6, 656.

**JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. et LONG J.A.**, 1987. *Basic histology*. Appleton-Century-Crofts, Norwalk, 5<sup>th</sup> edition.

**KARAGIANNIDIS A.**, 1976. The distribution of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold-shocks. *J. Reprod. Fert.*, 46, 83-90.

**KIM I. et GREENWALD G.S.**, 1984. Further studies on in vitro steroidogenesis by luteal cells from long-term hypophysectomized rats. *Biology of reproduction*, 30, 824-832.

**LEHNINGER A.L., CARAFOLI E. et ROSSI C.S.**, 1969. Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. *Adv. Enzymol.*, 29, 259-320.

- LUCK M.R., RODGERS R.J. et FINDLAY J.K.**, 1990. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during in vitro differentiation of bovine granulosa cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2, 11-25.
- McCAY**, 1985. Vitamin E: Interactions With Free Radicals and Ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 323-340.
- MANN T.**, 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen & Co., Lond., J. Wiley and sons inc., New York, 493.
- MANN T.**, 1975. Biochemistry of semen. Handbook of physiology, section 7, Endocrinology (male reproductive system), Eds Hamilton D.W. and Greep R.O. *Am. Phys. soc.*, 5, 461-473. Washington D.C.
- MBIZVO M.T., BARKMAN L.J. et ALEXANDER N.J.**, 1990. Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertility & Sterility*, 54 (4), 708-712.
- MORTON B., HARRIGAN J., ALBAGLI L. et JOOSS T.**, 1973. The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis. *Biol. Reprod.*, 9, 71-72.
- NAGAE T., YANAGIMACHI R., SRIVASTAVA P.N. et YANAGIMACHI H.**, 1986. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 45, 701-707.
- NIKI E., TSUCHIYA J., TANIMURA R. et KAMIYA Y.**, 1982. Regeneration of vitamin E from  $\alpha$  chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chemistry letters*, 6, 789-792.
- NORMAN C., GOLDBERG E., JOHNSON C.E. et PORTERFIELD I.D.**, 1959. Effect of visible light on motility, life span and respiration of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 42, 937.
- PARKS J.E., ARION W.J. et FOOTE R.H.**, 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovin spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 37, 1249-1258.
- PRESSMAN C.B.**, 1976. Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 501-530.

- QUIN P.J. et WHITE I.G.**, 1967. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold-shock. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1205-1215.
- ROY A.**, 1957. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 79, 318-319.
- RUDOLPH A. et CROWE J.**, 1985. Membrane stabilization during freezing: the rôle of two natural cryoprotectants trehalose and proline. *Cryobiology*, 27, 367-377.
- SETCHELL B.P. et HIWAS N.T.**, 1967. The importance of glucose in the oxydative metabolism of the testis of the conscious ram and the role of the pentose cycle. *Bioch. J.*, 102, 623-631.
- SHAMS-BORHAN G. et HARRISON R.A.P.**, 1981. Production, characterisation and use of the ionophore-induced calcium dependent acrosome reaction in ram sperm. *Gamete Res.*, 4, 407-432.
- SHANNON P.**, 1965. Presence of a heat-labile toxic protein in bovine seminal plasma. *J. Dairy Sci.*, 48, 1362-1365.
- SHANNON P. et CURSON R.**, 1972. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *J. Dairy Sci.*, 55, 614-620.
- SIMPSON A.M. et WHITE I.G.**, 1986. Effect of cold-shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 12, 131-143.
- SITUMORANG P. et MARTIN I.C.R.**, 1984. Effect of non dialysable substances in ram seminal plasma on ram spermatozoa during dilution, cooling and deep freezing. *Aust. Soc. Reprod. Bio.*, 32, 94-95.
- STOREY K.B. et JANET M.**, 1989. Comment les animaux survivent au gel. *La recherche*, n° 208, 20, 332-341.
- TOSIC J. et WALTON A.**, 1950. Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxyde by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochem. J.*, 47, 199-222.

**VOLGMAYR J.K.**, 1975. Metabolic charges in spermatozoa during epididymal transit. In: Handbook of physiology, section 7, Vol. V.D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds), p. 437-460, Washington D.C., American Physiological Society.

**YANAGIMACHI R.**, 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. Fertilization and embryonic development in vitro, p. 82-182, New York, Plenum Press.

**YANAGIMACHI R.**, 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. Gamete Res., 20, 323-344.

**YANAGIMACHI R. et USUI N.**, 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell. Res., 89, 161-174.