

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du

Diplôme de Docteur Vétérinaire

*La LDL dans la réfrigération de la semence
bovine, extraction et comparaison avec les
milieux conventionnels*

Présenté par

Mlle. DERGUINI *Assia*

Soutenu le : Samedi 04 Juin 2016

Devant le jury composé de:

Président :	Dr. LAMARA A.	Maître de conférences classe A	ENSV
Promoteur :	Dr. IDRES T.	Maître-assistant classe A	ENSV
Examineur 1 :	Dr. BENHENIA K.	Chercheur permanent	CRBt
Examineur 2 :	Dr. AINOUZ L.	Maître-assistant classe A	ENSV

Année universitaire :

2015-2016

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon cher promoteur **Dr. IDRES TAKFARINAS**, maitre-assistant classe A, à l'école nationale supérieur vétérinaire. Vous êtes un excellent promoteur et enseignant. Votre volonté, votre soif du savoir et votre passion pour le travail ont réussi à m'inspirer. Durant cet encadrement, vos précieux conseils m'ont aidée à forger ma personnalité, à avoir confiance en moi, à me surpasser et surtout à avoir toujours envie d'apprendre. J'ai évolué, et ce grâce à vous. Vous avez toujours été disponible pour mon travail et à chaque fois que je trébuchais vous étiez là pour m'aider à me relever. J'espère un jour être à la hauteur de vos espérances. Je vous en suis vraiment reconnaissante et vous remercie **Dr IDRES** d'avoir été mon enseignant, mon maître et mon mentor.

Au **Dr. LAMARA** de l'école nationale supérieure vétérinaire d'avoir fait l'honneur d'être mon président de jury à la soutenance.

Mes sincères remerciements.

Au **Dr. BENHIA** du CRBT de Constantine, je vous remercie tout d'abord pour votre précieuse aide et aussi de vous être déplacé pour examiner mon travail.

Je vous en suis profondément reconnaissante.

Au **Dr. AINOUZ**, de l'école nationale supérieur vétérinaire, pour avoir accepté de faire partie du jury de mon travail.

Prière d'accepter mes sincères remerciements

Au **Dr. MILLA**, de l'école nationale supérieure vétérinaire, votre gentillesse et votre modestie font de vous une enseignante hors du commun des mortels et qu'on aimerait avoir toute sa vie à ses côtés.

Merci pour tout.

Dédicaces

Ca fait des années que tu attendais avec impatience ce moment, le voilà enfin arrivé mais malheureusement sans toi. Chère grand-mère **Zahra** je te dédie aujourd'hui ce travail avec un cœur attristé à l'idée de ne plus jamais te revoir. Tu as laissé un incommensurable vide que nul ne pourrait combler. Tu es l'exemple de courage, de sagesse et surtout de bonté. Tu nous as toujours voué un amour viscéral. Avec toi j'ai appris qu'il fallait toujours se battre dans la vie et qu'il ne faut jamais désespérer. Tu as toujours été une femme battante et ce jusqu'à ton dernier souffle. Ton image me suit partout, aucun moment ne passe sans que je ne pense à toi depuis que tu nous as quitté. J'aurai tant aimé que tu sois parmi nous aujourd'hui et que tu partages ce moment qui n'a aucun goût sans toi. J'espère un jour être la femme que tu as été. Repose en paix Nana je t'aime.

Hommages particuliers !

A la mémoire de ma grand-mère paternelle et de mes deux grands-pères que je n'ai pas eu la chance de connaître. Reposez en paix.

A vous, mes parents, les deux piliers de ma vie, ma raison d'être, si je suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à vos sacrifices, à votre amour, et à votre soutien. Vous avez toujours cru en moi et en mes capacités, reconnaissance éternelle. Je vous dédie mes chers parents ce modeste travail dans l'espoir qu'il ne sera qu'un début de succès. Merci d'avoir été toujours là pour moi. Vous êtes les meilleurs parents du monde. Nous vous aimons, plus que de raison !

A mes petits protégés **Arris et Dihya**... tout notre amour et nos espoirs pour vous.

A mes chères et adorables sœurs **Elissa, Lamina, Sabiha et Khalissa**, je ne saurais imaginer une vie sans vous.

A mes deux très chers frères **Mohand et Tarik**, vous êtes les meilleurs frères qu'on puisse avoir. Merci de m'avoir traitée comme une petite princesse et d'être toujours là pour moi. J'espère qu'on sera toujours aussi proche. Je vous aime

A vous, **Dr. IDRES**, pour votre amabilité, votre présence, votre dévouement et vos encouragements m'ont prise par la main pour égayer mes jours, naguère sombres, je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir traitée telle une petite sœur tout au long de ces deux années écoulées.

A mes neveux ; **Tinhinene, Ilyass, Rayane et Amine** et à ceux qui arrivent bientôt, de la part de votre Tata qui vous aime tant.

A mes belles sœurs **Sihem et Nora**, vous êtes pour moi deux véritables sœurs. Merci pour tout.

A mes beaux-frères **Zahir, Sofiane & Karim**, merci d'être toujours là pour ma famille.

A khali Cherif et sa femme. Khali, ton intelligence m'a toujours impressionnée, je vois en toi un deuxième Einstein, j'aimerais hériter ne serait-ce que d'un dixième de ta logique et de ton raisonnement. Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé pendant ces années.

A mon oncle Mokhtar et sa femme, vous êtes pour moi mes deuxième parents.

A mon unique Tante maternelle « Khalti Noria », en plus d'être une tante, tu es une amie. On t'aime khalti.

A mes amis (e) de l'école, nous avons passé des moments inoubliables, de dur labeur, de sacrifices, des moments de folie, de crises de larmes et de fous rires, vous êtes une deuxième famille pour moi. Dans l'espoir que notre amitié soit éternelle.

A mes cousins et cousines (Hamza, Jugurtha Akli, Ahmed, Nahida, Fouzia, Fatima, Chehla Djaouida, Nassima.....) Heureusement que vous êtes nombreux et que je ne peux pas tous vous citer.

Au **Dr Amrane**, merci pour tout ce que vous aviez fait.

« Pour faire qu'un rêve devienne vrai, la première vertu c'est d'avoir une grande capacité à rêver, la seconde c'est la persévérance, c'est-à-dire la foi dans le rêve. »

HANS Selye

Résumé

L'objectif de notre présent travail est d'attester de l'efficacité de la LDL du jaune d'œuf dans la conservation de la semence bovine sans qu'il y ait un risque de contamination par les autres composants du jaune d'œuf. De ce fait nous avons extrait la LDL du jaune d'œuf en utilisant un protocole d'extraction rapporté dans la bibliographie.

Notre expérimentation a portée sur trois testicules dont la semence a été prélevée à partir de l'épididyme par la méthode du flushing rétrograde. Nous avons utilisé trois milieux pour la réfrigération à +4°C à savoir : le milieu témoin (**3,028g** de Tris, **1,70g** d'acide citrique monohydrate et de **1,25 g** de Fructose), le milieu à *20% de jaune d'œuf* (40ml de la solution A, **20ml** du jaune d'œuf), le milieu à *8% de LDL* (**40ml** de la solution A et **3.6g** de LDL). Après dilution des semences dans les trois milieux, nous les avons réfrigérés à +4°C. Par la suite nous avons évalué l'efficacité de chaque protocole au moyen de trois tests, la mobilité individuelle, le test HOST et le test à l'éosine à H0, H12, H36, H48, H72, H84, H96, H108, H120, H132 et à H144.

Les résultats des moyennes des trois essais se présentent comme suit : *pour le milieu témoin*, la mobilité individuelle H0=4,75, H12=4,00, H24=3,67, H36=2,50, H48=2,50, H60=2,00, H72=1,50, H84=1,67, H96=0,75, H108=0,75, H120=0,83, H132=0,75, H144=0,50. Les résultats au test à l'Eosine sont : H0=95,00, H12=82,33, H24=73,33, H36=55,00, H48=47,33, H60=36,33, H72=26,00, H84=21,00, H96=13,00, H108=10,33, H120=6,00, H132=4,33, H144=2,00. Les résultats au test HOST sont : H0=94,33, H12=87,33, H24=74,00, H36=63,33, H48=52,00, H60=44,00, H72=33,33, H84=25,67, H96=20,00, H108=15,00, H120=9,33, H132=7,00, H144=2,93. Pour le *milieu à 8% de LDL*, les résultats de la mobilité individuelle sont : H0=4,75, H12=4,00, H24=3,50, H36=3,75, H48=3,67, H60=3,50, H72=3,00, H84=2,75, H96=2,75, H108=2,75, H120=2,00, H132=2,00, H144=1,83. Les résultats au test à l'Eosine sont: H0=96,67, H12=95,00, H24=90,33, H36=88,33, H48=86,00, H60=84,00, H72=79,33, H84=75,67, H96=70,67, H108=67,67, H120=63,67, H132=60,67, H144=55,33. Les résultats au test HOST sont : H0=97,67, H12=96,67, H24=95,00, H36=93,00, H48=89,67, H60=87,67, H72=84,33, H84=81,33, H96=77,00, H108=72,00, H120=68,33, H132=64,33, H144=60,67. Pour le *milieu 20% de Jaune d'œuf*, les résultats de la mobilité individuelle sont : H0=4,75, H12=4,00, H24=3,75, H36=3,83, H48=3,00, H60=2,67, H72=2,00, H84=1,50, H96=1,67, H108=1,33, H120=1,00, H132=0,50, H144=0,75. Les résultats au test à l'Eosine sont: H0=95,33, H12=87,67, H24=82,33, H36=76,67, H48=68,00, H60=56,33, H72=49,00, H84=38,67, H96=35,00, H108=30,00, H120=24,33, H132=19,67, H144=12,33. Les résultats au test HOST sont : H0=95,00, H12=91,00, H24=86,00, H36=78,67, H48=72,33, H60=62,67, H72=55,33, H84=45,67, H96=42,33, H108=34,33, H120=26,67, H132=21,00, H144=10,33.

Les résultats obtenus suggèrent un rendement meilleur de la LDL en termes de spermatozoïdes utilisables pour l'IA après réfrigération.

Mots clés : LDL, Jaune d'œuf, conservation, sperme épidydimmaire, Insémination artificielle.

Abstract

The aim of our work was to attest the efficiency of *Low Density Lipoprotein* of egg yolk without a risk of contamination with the other egg yolk's compounds. Thereby, we extracted the Low Density Lipoprotein by using a protocol of extraction reported in bibliography.

Our experiment included three testicles which semen was collected in the epididymis by the method of retrograde flushing. We used three mediums for the refrigeration at +4°C which are: a witness medium (3,028g de Tris, 1,70g d'acide citrique monohydrate and 1, 25 g of Fructose.). The medium containing 20% of egg yolk (40ml of solution A and 20 ml of egg yolk). The medium with 8% of LDL: (40ml of solution A and 3.6g of LDL). After dilution of semen in the three medium, we refrigerated them at 4°C. Thereafter, we assessed the efficiency of three test by individual motility, HOST and Eosine tests at H0, H12, H36, H48, H72, H84, H96, H108, H120, H132 and H144.

The results of the average of the three experiments are as following: for the medium witness, the individual motility were: H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,67, H₃₆=2,50, H₄₈=2,50, H₆₀=2,00, H₇₂=1,50, H₈₄=1,67, H₉₆=0,75, H₁₀₈=0,75, H₁₂₀=0,83, H₁₃₂=0,75, H₁₄₄=0,50, the results of the test eosine : H₀=95,00, H₁₂=82,33, H₂₄=73,33, H₃₆=55,00, H₄₈=47,33, H₆₀=36,33, H₇₂=26,00, H₈₄=21,00, H₉₆=13,00, H₁₀₈=10,33, H₁₂₀=6,00, H₁₃₂=4,33, H₁₄₄=2,00, the results of the test HOST: H₀=94,33, H₁₂=87,33, H₂₄=74,00, H₃₆=63,33, H₄₈=52,00, H₆₀=44,00, H₇₂=33,33, H₈₄=25,67, H₉₆=20,00, H₁₀₈=15,00, H₁₂₀=9,33, H₁₃₂=7,00, H₁₄₄=2,93. The medium of 8% of LDL, the individual motility was: H₀=4, 75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,50, H₃₆=3,75, H₄₈=3,67, H₆₀=3,50, H₇₂=3,00, H₈₄=2,75, H₉₆=2,75, H₁₀₈=2,75, H₁₂₀=2,00, H₁₃₂=2,00, H₁₄₄=1,83, the results of the test eosine are: H₀=96,67, H₁₂=95,00, H₂₄=90,33, H₃₆=88,33, H₄₈=86,00, H₆₀=84,00, H₇₂=79,33, H₈₄=75,67, H₉₆=70,67, H₁₀₈=67,67, H₁₂₀=63,67, H₁₃₂=60,67, H₁₄₄=55,33, the results of test HOST are : H₀=97,67, H₁₂=96,67, H₂₄=95,00, H₃₆=93,00, H₄₈=89,67, H₆₀=87,67, H₇₂=84,33, H₈₄=81,33, H₉₆=77,00, H₁₀₈=72,00, H₁₂₀=68,33, H₁₃₂=64,33, H₁₄₄=60,67. For the medium of 20% of egg yolk, the individual motility was: H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,75, H₃₆=3,83, H₄₈=3,00, H₆₀=2,67, H₇₂=2,00, H₈₄=1,50, H₉₆=1,67, H₁₀₈=1,33, H₁₂₀=1,00, H₁₃₂=0,50, H₁₄₄=0,75, the results of test eosine H₀=95,33, H₁₂=87,67, H₂₄=82,33, H₃₆=76,67, H₄₈=68,00, H₆₀=56,33, H₇₂=49,00, H₈₄=38,67, H₉₆=35,00, H₁₀₈=30,00, H₁₂₀=24,33, H₁₃₂=19,67, H₁₄₄=12,33 , the results of test HOST are : H₀=95,00, H₁₂=91,00, H₂₄=86,00, H₃₆=78,67, H₄₈=72,33, H₆₀=62,67, H₇₂=55,33, H₈₄=45,67, H₉₆=42,33, H₁₀₈=34,33, H₁₂₀=26,67, H₁₃₂=21,00, H₁₄₄=10,33.

Obtained results suggest a best efficiency of LDL in semen conserving in order to be used for artificial insemination.

Key words: LDL, Egg yolk, conservation, epididymis semen, artificial insemination

ملخص

الهدف من تجربتنا هو إثبات نجاعة ل. د. ل المستخلص من صفار البيض في الحفاظ على مني الثيران في درجة حرارة +4° لذلك قمنا باستخلاص ل. د. ل من صفار البيض باتباع منهج تجريبي معتمد عليه .
تجربتنا خصت ثلاث عينات مني مستخلصة من بربخ ثلاث خصي باستعمال تقنية الغسل الرجعي .
استعملنا ثلاث أوساط : الوسط الشاهد :

3,028g de Tris, 1,70g d'acide citrique monohydrate et de 1,25 g de Fructose

الوسط ب 20% صفار البيض
40ml de la solution A, 20ml du jaune d'œuf

و الوسط ب ل. د. ل 8%

40ml de la solution A et 3.6g de LDL

قمنا بعد ذلك بتبريد العينات في درجة حرارة 4° بغرض معاينتها باستعمال ثلاثة معايير : الحركة الفردية , معيار هوست و معيار ابوزين , وكل ذلك في

H0, H12, H36, H48, H72, H84, H96, H108, H120, H132 et à H144

نعرض النتائج المتحصل عليها كالتالي : الوسط الشاهد , الحركة الفردية

H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,67, H₃₆=2,50, H₄₈=2,50, H₆₀=2,00, H₇₂=1,50, H₈₄=1,67, H₉₆=0,75, H₁₀₈=0,75,
H₁₂₀=0,83, H₁₃₂=0,75, H₁₄₄=0,50.

معيار ابوزين

H₀=95,00, H₁₂=82,33, H₂₄=73,33, H₃₆=55,00, H₄₈=47,33, H₆₀=36,33, H₇₂=26,00, H₈₄=21,00, H₉₆=13,00,
H₁₀₈=10,33, H₁₂₀=6,00, H₁₃₂=4,33, H₁₄₄=2,00.

و معيار هوست

H₀=94,33, H₁₂=87,33, H₂₄=74,00, H₃₆=63,33, H₄₈=52,00, H₆₀=44,00, H₇₂=33,33, H₈₄=25,67, H₉₆=20,00,
H₁₀₈=15,00, H₁₂₀=9,33, H₁₃₂=7,00, H₁₄₄=2,93.

, الحركة الفردية وسط ب 8% ل. د. ل

H₀=4, 75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,50, H₃₆=3,75, H₄₈=3,67, H₆₀=3,50, H₇₂=3,00, H₈₄=2,75, H₉₆=2,75, H₁₀₈=2,75,
H₁₂₀=2,00, H₁₃₂=2,00, H₁₄₄=1,83.

معيار ابوزين وسط ب 8% ل. د. ل

H₀=96,67, H₁₂=95,00, H₂₄=90,33, H₃₆=88,33, H₄₈=86,00, H₆₀=84,00, H₇₂=79,33, H₈₄=75,67, H₉₆=70,67,
H₁₀₈=67,67, H₁₂₀=63,67, H₁₃₂=60,67, H₁₄₄=55,33.

8% ل. د. ل و معيار هوست

H₀=97,67, H₁₂=96,67, H₂₄=95,00, H₃₆=93,00, H₄₈=89,67, H₆₀=87,67, H₇₂=84,33, H₈₄=81,33, H₉₆=77,00,
H₁₀₈=72,00, H₁₂₀=68,33, H₁₃₂=64,33, H₁₄₄=60,67.

وسط ب 20% صفار البيض
الحركة الفردية

H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,75, H₃₆=3,83, H₄₈=3,00, H₆₀=2,67, H₇₂=2,00, H₈₄=1,50, H₉₆=1,67,
H₁₀₈=1,33, H₁₂₀=1,00, H₁₃₂=0,50, H₁₄₄=0,75

معيار ابوزين

H₀=95,33, H₁₂=87,67, H₂₄=82,33, H₃₆=76,67, H₄₈=68,00, H₆₀=56,33, H₇₂=49,00, H₈₄=38,67,
H₉₆=35,00, H₁₀₈=30,00, H₁₂₀=24,33, H₁₃₂=19,67, H₁₄₄=12,33

و معيار هوست

H₀=95,00, H₁₂=91,00, H₂₄=86,00, H₃₆=78,67, H₄₈=72,33, H₆₀=62,67, H₇₂=55,33, H₈₄=45,67,
H₉₆=42,33, H₁₀₈=34,33, H₁₂₀=26,67, H₁₃₂=21,00, H₁₄₄=10,33.

النتائج المتحصل عليها تثبت أن ل. د. ل مرد ودية أحسن بالنسبة للنطف القابلة للاستعمال في التلقيح الاصطناعي بعد المحافظة عليها.

الكلمات الدالة : ل. د. ل , صفار البيض , المنى البربخي و التلقيح الاصطناعي .

Liste des abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
GnRH:	Gonadotropin-releasing hormone
FSH:	Folliculo-stimulating hormon
LH:	Lutéinizing hormon
ABS:	Androgen binding protein
BSB:	Binding sperm protein
Ca⁺⁺:	Ion de Calcium
HDL:	High density lipoprotein
AMPc:	Adenosine monophosphate cyclique
ZP:	Glycoprotéine au niveau de la zone pellucide
PIP₂:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
IP₃:	L'inositol triphosphate
pH:	Le potentiel hydrogène
°C:	Degré Celsius
H:	Heures
ROS:	Reactive oxygen species
ATP:	Adénosine triphosphate
CASA:	Computer assisted sperm analysis
UV:	Ultraviolet
LDL:	Low density lipoprotein
VCL:	Average path velocity
MOT:	Motility
PMOT:	Progressive motility
g:	Gramme
µl:	Microlitre
ml:	Mililitre
spz	Spermatozoïde
T :	Testicule
Tris :	Hydroxy méthyleAmino-méthane
l:	Litre
mm	Milimètre
HOST	Hypo Osmotic Swelling Test

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermatogenèse.	4
Figure 02 : Régulation hormonale de la fonction sexuelle mâle	7
Figure 03 : Schema representant la structure d'un spermatozoïde.....	8
Figure 04 : Anomalies majeures des spermatozoïdes.....	10
Figure 05 : Tractus génital du taureau.....	13
Figure 06 : Figure représentant les différents mouvements de spermatozoïdes en fonction de leur activation. (Ho H-C., et Suarez S-S., 2001)	19
Figure 07 : Schéma représentant les mécanismes de capacitation.....	21
Figure 08 : Schéma représentant la fixation d'un spermatozoïde à une cellule de l'oviducte.	25
Figure 09 : Photo d'un vagin artificiel	30
Figure 10 : Photo d'un électroéjaculateur.	31
Figure 11 : Photo représentant une collecte épидидymaire chez le bélier	32
Figure 12 : Cellule hématimètre Neubauer	36
Figure 13 : Schéma représentant le mécanisme d'action de la LDL.....	43
Figure 14 : Testicule dénudé de sa vaginal cliché personnel	47
Figure 15 : Les épидидymes séparés de leurs	47
Figure 16 : L'individualisation du canal déférent	47
Figure 17 : L'enlèvement des vaisseaux sanguins	48
Figure 18 : La ponction du canal déférent	48
Figure 19 : La collecte de la semence au niveau de la queue de l'épididyme.....	49
Figure 20 : Composants de la solution A	49
Figure 21 : Schéma représentant la cellule Malassez.....	52
Figure 22 : Eppendorfs étiquetés.....	54
Figure 23 : Spermatozoïde vivants (Flagelles en queue de cochon) lors du test HOST	56
Figure 24 : Révélation de la mort des spermatozoïdes par le test de viabilité à l'éosine	57
Figure 25 : Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°1 lors du test HOST , dans les trois milieux et en fonction des heures.	59
Figure 26 : Courbes qui représentent l'évolution de la motilité individuelle de l'essai n°1 dans les trois milieux et à différentes heures.....	60
Figure 27 : Courbes qui représentent l'évolution des résultats de l'essai n°1 au test à l'éosine dans les trois milieux et à différentes heures.....	60

Liste des figures

Figure 28: Courbes qui représentent l'évolution de la motilité individuelle de l'essai n°2 dans les trois milieux et à différentes heures.....	61
Figure 29 : Courbes qui représentent l'évolution des résultats de l'essai n°2 au test à l'éosine dans les trois milieux et à différentes heures	62
Figure 30 : Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°2 lors du test HOST , dans les trois milieux et en fonction des heures.	62
Figure 31 : Courbes qui représentent l'évolution de la motilité individuelle de l'essai n°3 dans les trois milieux et à différentes heures	63
Figure 32: Courbes qui représentent l'évolution de la viabilité des spermatozoïdes de l'essai n°3 dans les trois milieux et en fonction des heures	64
Figure 33: Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°3 lors du test HOST , dans les trois milieux et en fonction des heures	64
Figure 34: Graphes qui représentent l'évolution des motilités individuelles de la moyenne des trois essais dans les trois milieux.....	66
Figure 35: Graphes représentant l'évolution des résultats du test de la viabilité de la moyenne des trois essais dans les trois milieux.....	67
Figure 36: Graphes qui représentent l'évolution de Test Host de la moyenne des trois essais dans les différents milieux.	68

Liste des tableaux

Tableau 01: Durée de spermatogenèse chez différentes espèces	3
Tableau 02: Notes des motilités individuelles des spermatozoïdes	34
Tableau 03: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle	35
Tableau 04: Les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes mesurés par le système	38
Tableau 05: Résultats de l'évaluation macroscopique des semences collectées.	58
Tableau 06: Résultats de l'évaluation microscopique des semences collectées	59

Sommaire

PREREQUIS THEORIQUES	1-45
Introduction générale	01
I. Physiologie de la reproduction chez le mâle	02
I.1. La Spermatogenèse	02
I.2. La spermiogénèse	03
I.3. Durée de la spermatogenèse chez quelques espèces	03
II. La régulation neuro hormonale de la fonction de reproduction	04
II.1. L'hypothalamus	05
II.2. L'antéhypophyse	05
II.3. Les gonades	06
III. Le spermatozoïde	07
III.1. Sa morphologie	07
III.2. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes	09
IV. L'épididyme	11
IV.1. Sa morphologie	11
IV.2. Les différentes fonctions de l'épididyme	11
V. Le plasma séminal	13
V.1. Les glandes annexes	13
V.1.1. Anatomie des glandes annexes	13
V.2. Le liquide séminal	14
V.2.1. Les protéines majeures du plasma séminal	14
V.2.2. Rôle du plasma séminal	14
CHAPITRE II: Le spermatozoïde dans l'appareil génital femelle	16-25
I. Le spermatozoïde dans le tractus génital femelle	16
II. Qu'est-ce que la capacitation ?	16
II.1. Le cholestérol	16
II.2. Le bicarbonate	17
II.3. Le calcium	17
III. Hyper activation des spermatozoïdes	18
IV. Induction de la capacitation par l'héparine	19
V. Induction de la capacitation par la High Density Lipoprotein (HDL)	20
VI. La réaction de l'acrosome	21

Sommaire

VI.1.La structure de l'acrosome	21
VI.2.Définition de la réaction de l'acrosome	21
VI.3.Le mécanisme de la réaction de l'acrosome	22
VII. Le réservoir oviductal	23
VII.1.Les propriétés chimiques du fluide de l'oviducte	24
VII.2.Le mucus	24
VII.3.La température	24
CHAPITRE III : La cryobiologie.....	26-45
I. La cryobiologie	26
II. Conservation à court terme	26
II.1. La réfrigération	26
III.Conservation à long terme	27
III.1. Définition de la cryoconservation.....	27
III.2.Objectifs	27
III.2.1.L'amélioration génétique	27
III.2.2. Intérêt sanitaire	27
III.2.3. Intérêt économique	27
III.3. Les inconvénients de la cryoconservation	28
III.3.1. Le stress oxydatif	28
III.3.2. Le stress thermique	29
IV. La récolte de la semence	30
IV.1. Le vagin artificiel	30
IV.2. L'électro-éjaculateur	31
IV.3. La récolte epididymaire	32
IV.4. Le massage transrectal	32
V. L'évaluation de la semence	33
V.1. Les critères macroscopiques	33
V.1.1. Le volume	33
V.1.2. La couleur	33
V.1.3. La viscosité du sperme	34
V.1.4. Le pH	34

Sommaire

V.2. Les critères microscopique	34
V.2.1. La motilité massale	34
V.2.2. La motilité individuelle	35
V.2.3. la concentration du sperme	35
V.2.3.1 Comptage par hématimètre	35
V.2.3.2 La néphrométrie	37
VI. Les examens objectifs pour l'évaluation de la semence	37
VI.1. le CASA (computer assisted sperma analysis)	37
VI.2. La cytométrie en flux	38
VII. Les agents cryoprotecteurs	39
VII.1. Les cryoprotecteurs pénétrants	39
VII.1.1. Le glycérol	39
VII.2. Les cryoprotecteurs non pénétrants	40
VII.2.1. Le jaune d'œuf	40
VII.2.1.1 Sa composition	40
VII.2.1.2 Le jaune d'œuf et la conservation de la semence	41
VII.2.2. La lipoprotéine de faible densité (LDL)	42
VII.2.2.1 Mécanisme d'action de la LDL	42
VII.2.2.2. La LDL et la spécificité d'espèces	44
VII.2.2.2.1. Le macaque rhesus	44
VII.2.2.2.2. Le chien	44
VII.2.2.2.3. Le porc	44
VII.2.3. Le lait	44
VIII. Jaune d'œuf et lait : Résultats comparés.....	45

Sommaire

Travaux & résultats personnels	46-75
I. Introduction	46
II. Matériels et Méthodes	46
II.1. Les matières premières	46
II.1.1. le sperme.....	46
II.1.1.1. La collecte de la semence	47
II.1.2. La Low Density Lipoprotein (LDL)	50
II.1.3. Le Jaune d'œuf.....	51
II.2. L'évaluation de la qualité de la semence avant conservation	51
II.2.1. Evaluation macroscopique	51
II.2.2. Evaluation microscopique	51
II.2.2.1. La mobilité massale	51
II.2.2.2. La mobilité individuelle	52
II.2.2.3. La concentration.....	52
II.3. Calcul de taux de dilution	53
II.4. Composition des milieux	53
II.5. Les tests après conservation.....	55
II.5.1. La motilité massale.....	55
II.5.2. Le Test HOST	55
II.5.3. Le test à l'éosine.....	56
III. Résultats	58
III.1. Résultats d'extraction de la LDL	58
III.2. Résultat de l'évaluation de la semence avant conservation	58
III.2.1. L'évaluation macroscopique	58
III.2.2. L'évaluation microscopique	58
III.3. Résultats après conservation	59
III.3.1. Approche par essai.....	59
III.3.1.1. Résultats du premier essai	59
III.3.1.2. Résultats du second essai	61
III.3.1.3. Résultats du troisième essai	63

Sommaire

III.3.2. Résultats globaux	65
IV. Discussion des méthodes utilisées.....	69
IV.1. Le liquide de rinçage utilisé (la solution A).....	69
IV.2. Les méthodes d'évaluation avant réfrigération.....	69
IV.2.1. Evaluation macroscopique	70
IV.2.1.1. Le volume	70
IV.2.1.2. La couleur	70
IV.2.2. Evaluation microscopique	70
IV.2.2.1. La motilité massale	70
IV.2.2.2. La motilité individuelle	70
IV.2.1.3. La concentration	70
IV.3. le choix du milieu à 20% de jaune d'œuf et le milieu à 8% de LDL	71
IV.4. Le choix et discussion des tests effectués après réfrigération	71
IV.4.1. Le test à l'éosine.....	71
IV.4.2. Le test HOST.....	71
IV.4.3. La motilité individuelle	71
IV.5. Discussion des résultats obtenus après réfrigération	71
V. Conclusion générale	74
VI. Recommandations	75
VII. Références bibliographiques	

Prérequis Théoriques

L'insémination artificielle, biotechnologie de reproduction très largement répandue dans le monde, fut appliquée, pour la première fois, en **1977** par le physiologiste italien Lauro Spallanzani sur une chienne en chaleur en utilisant une semence fraîche et en l'injectant à l'aide d'une seringue à l'intérieur du vagin. (Bathgate R., 2004) Cette biotechnologie a connu un grand succès après la mise au point de la congélation du sperme par Poldge et Rowson. En **2000**, il y a eu une production de **232** millions de doses dont **11** millions ont été utilisées fraîches et le reste congelées. (Hanzen C., 2009-2010)

Chez les ovins, la semence pour l'insémination artificielle est principalement fraîche, et ce, à cause de la baisse importante du pouvoir fécondant que subissent les spermatozoïdes après une conservation au froid. Chez les bovins, la semence exploitée dans l'insémination artificielle peut être conservée pendant **2 à 3** jours à une température proche de **5°C**, elle peut également être conservée à long terme « congélation » nécessitant ainsi l'utilisation de cryoprotecteur. (Hanzen C., 2009-2010)

La cryoconservation de la semence joue un rôle important dans la reproduction, d'une part, elle permet d'avoir une banque de matériels génétiques d'animaux reconnus de haute valeur et d'autre part, elle permet une utilisation à long terme de la semence. Cependant, la cryoconservation ne reste pas sans effets sur la qualité du sperme et sa réussite dépend de plusieurs facteurs entre autre l'agent cryoprotecteur. Le glycérol appelé aussi Glycérine, fut le premier cryoprotecteur non pénétrant à être découvert et reste jusqu'à nos jours le plus utilisé, néanmoins il peut être une source toxique pour la cellule s'il est utilisé à des concentrations inadéquates. (Chian R-C., 2010)

D'autres substances d'origine animale se sont avérées bénéfiques pour la conservation des semences telle que le jaune d'œuf, mais le risque de contamination par cette denrée animale n'en reste pas moindre, ajouter à cela, le jaune d'œuf renferme des composants qui sont néfastes pour la survie des spermatozoïdes. (Chaudhari D-V., *et al.*, 2015)

L'inconvénient qu'a présenté le jaune d'œuf dans la conservation de la semence, a incité les scientifiques à extraire de cette denrée la molécule responsable de cet effet cryoprotecteur.

CHAPITRE I :**Physiologie de la reproduction chez le mâle****Introduction**

Les êtres vivants sont dirigés par la même loi naturelle qui est la reproduction. Cette dernière assure la préservation de l'espèce et la croissance des individus. Le phénomène de reproduction est très vaste et surtout différent d'une espèce à une autre. Les organismes unicellulaires se reproduisent par scissiparité. Pour les organismes supérieurs, il y a production de gamètes qui se développent soit spontanément c'est-à-dire reproduction asexuée ou par fusion avec un gamète de l'autre sexe. Chez les mammifères mâles, la production de gamètes a lieu au niveau des testicules sous l'influence d'une hormone qui est la testostérone. (Mekedjou A-N., 1972-1973)

I. Physiologie de la reproduction chez le mâle**I.1. La Spermatogenèse**

Phénomène qui apparaît dès la puberté, la spermatogénèse comprend l'ensemble des multiplications et différenciations des cellules de la lignée germinale diploïdes ($2n$ chromosomes) aboutissant à la formation de cellules haploïdes (n chromosome). (Thibaut C., et Levasseur M-C., 2001)

Survenant de la périphérie des tubes séminifères vers le centre, la spermatogénèse est un processus continu durant toute la vie de l'animal. Le cycle spermatogénétique est constitué de 3 étapes :

Phase de multiplication : les spermatogonies situées au niveau de la membrane basale du tube séminal, entre les cellules de Sertoli, subissent une division équationnelle appelée « mitose ». Cette division donnera naissance à **2** cellules filles diploïdes, dont l'une d'elle remplacera la cellule mère. C'est ainsi que le stock de cellules germinales est en perpétuel renouvellement. La deuxième cellule fille quant à elle subira à son tour plusieurs mitoses, donnant à la fin un spermatocyte I.

Phase de croissance : les spermatocytes I subissent à la fois une croissance du cytoplasme et du noyau. (Bouabdallah N, 2014-2015) Durant cette phase, il y a répllication de l'ADN et le noyau devient arrondi.

Phase de maturation : Les spermatocytes I après la croissance rentrent en méiose et passeront par deux divisions successives :

- ✓ **La première division méiotique réductionnelle** : durant cette étape, les chromosomes homologues issus des deux parents seront séparés. Le spermatocyte I à $2n$ chromosomes se transformera en spermatocyte II à n chromosome.
- ✓ **La deuxième division méiotique équationnelle** : les chromatides du même chromosome se séparent, le produit final de cette division équationnelle est le spermatide. (Thibaut C., et Levasseur M.C., 2001)

I.2. La spermiogénèse

Phase finale de la formation des gamètes mâles, aucune division cellulaire n'est observée durant la spermiogénèse. Les spermatides subiront des changements au niveau du noyau et du cytoplasme les conduisant à leur métamorphose. Le produit final de la spermiogénèse est une cellule effilée « spermatozoïde » qui sera libérée dans la lumière des tubes séminifères « spermiation ».

I.3. Durée de la spermatogénèse chez quelques espèces

La durée entre la première division de la spermatogonie et sa sortie de l'épididyme est constante pour la même espèce.

Tableau 01 : Durée de spermatogénèse chez différentes espèces (Soltner D., 2001).

Espèces	Durée (jours)
Homme	74
Taureau	61
Bélier	49
Verrat	50
Lapin	44
Etalon	49

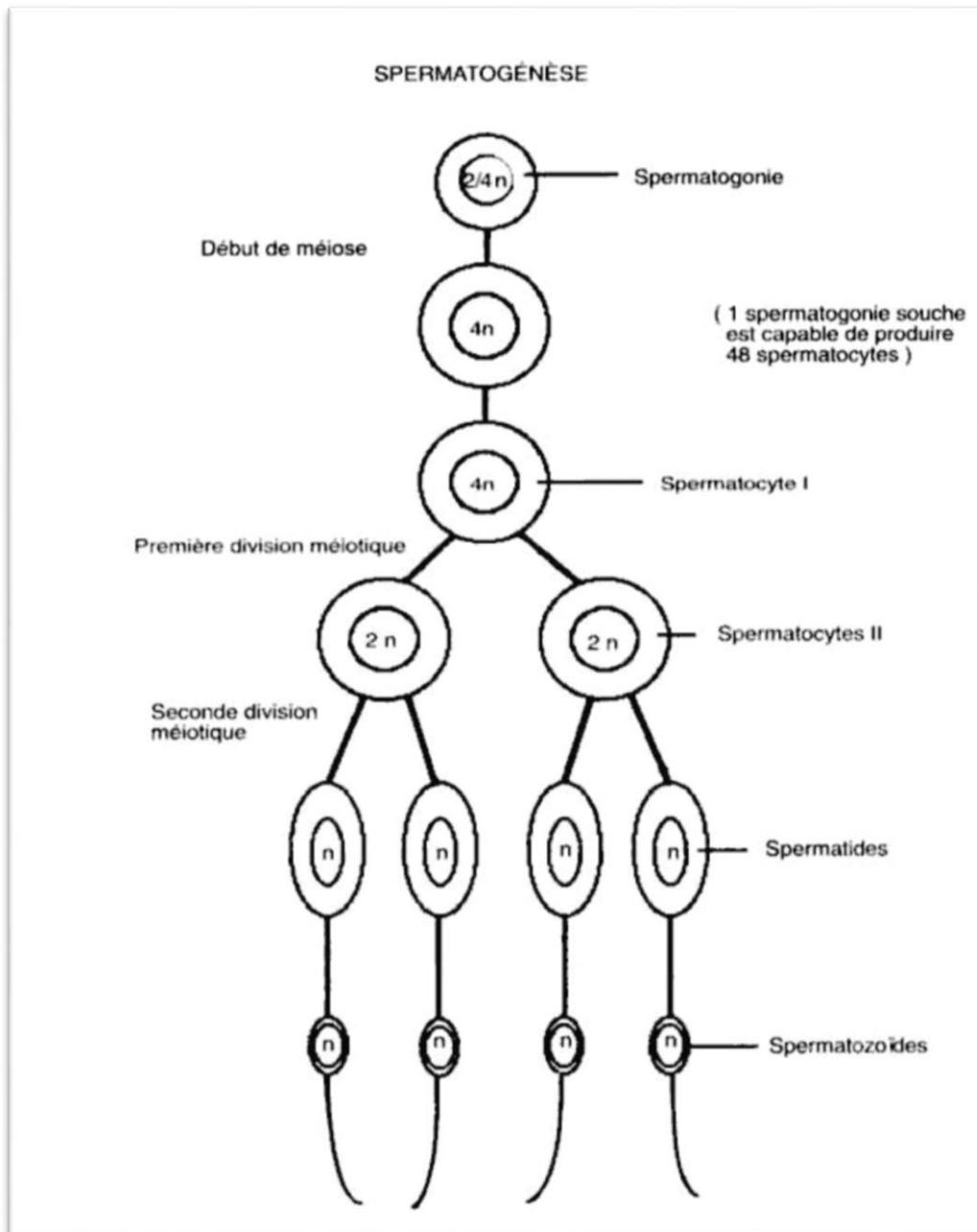


Figure 01 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermatogénèse.

(Baril G., *et al.*, 1993)

II. La régulation neuro hormonale de la fonction de reproduction

La fonction de reproduction dépend d'un ensemble fonctionnel regroupant le système nerveux central et le système endocrinien. (Gilbert *et al.*, 2011) L'axe hypothalamo-hypophysaire et les testicules par l'intermédiaire des substances qu'ils élaborent, sont à l'origine de la fonction sexuelle.

II.1. L'hypothalamus

Considéré comme le point de départ de la fonction de reproduction, l'hypothalamus est constitué de cellules neuro sécrétrices responsables de la sécrétion des neurohormones. La neurohormone impliquée dans l'activité sexuelle est la gonadolibérine « GnRH »

La GnRH : C'est une neuro hormone de nature protidique. Elle est synthétisée par les noyaux hypothalamiques. La sécrétion de la GnRH dépend de facteurs internes en relation avec la fonction de reproduction, externes comme le stress. La gonadolibérine est sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus puis gagne l'antéhypophyse ou la posthypophyse grâce au « système porte » hypothalamo-hypophysaire.

II.2. L'antéhypophyse

L'hypothalamus contrôle les sécrétions de l'antéhypophyse par l'intermédiaire de la GnRH. (Gilbert *et al.*, 2011) L'antéhypophyse est à l'origine de la sécrétions de six hormones dont deux agissent directement sur les testicules chez le mâle et les ovaires chez la femelle. Ces deux hormones sont appelées gonadotropines et elles comprennent la FSH et la LH. La GnRH agit en stimulant les cellules gonadotropes à sécréter ces dernières.

Les gonadotropines sont de nature protidique. Elles ont des propriétés trophiques sur les cellules cibles, et ont une action sur leur stériogénèse. Suite à des études expérimentales, il a été constaté que la sécrétion de LH dépend plus par rapport à celle de FSH vis-à-vis de GnRH. (Thibaut C., et Levasseur M.C., 2001) Chez la majorité des espèces, la quantité de LH est **5 à 10** fois plus importante que celle de FSH.

- **FSH (folliculo stimulating hormone ou follitropine) :** La FSH a des récepteurs membranaires au niveau des cellules de Sertoli, ce qui lui permet d'exercer trois rôles importants au niveau du testicule, à savoir :
 - ✓ Stimulation de la spermatogénèse et développement des tubes séminifères.
 - ✓ Stimulation de la synthèse d'une protéine de transport « l'ABP ».
 - ✓ Stimulation de la synthèse de l'inhibine. (Bouabdallah N., 2014-2015)
- **La LH (releasing hormone ou lutropine) :** l'hormone lutéinisante quant à elle chez le mâle a des récepteurs membranaires au niveau des cellules interstitielles « cellules de Leydig », les stimulant ainsi à fabriquer des androgènes, principalement la testostérone. La LH stimule aussi la maturation des spermatozoïdes.

II.3. Les gonades

Les testicules ont une double fonction : une fonction exocrine chargée de la production des spermatozoïdes qui occupent les $3/4$ du volume de la gonade et une fonction endocrine assurée par les cellules de Leydig (les androgènes) et les cellules de Sertoli (inhibine et ABP).

Les androgènes : La principale hormone est la testostérone. Elle est sécrétée par les cellules de Leydig et libérée dans la lumière du tube séminifère. Cette hormone a plusieurs rôles dont les principaux sont les suivants. (Florence *et al.*, 2011)

- ✓ Différenciation des voies génitales mâles au cours de la vie embryonnaire.
- ✓ Apparition des caractères sexuels secondaires.
- ✓ Maintien de la spermatogenèse.
- ✓ Action sur l'hypothalamus en inhibant la libération de la GnRH, empêchant ainsi l'antéhypophyse de produire la FSH et LH.
- ✓ Stimulation de la synthèse de FSH et LH en agissant directement sur l'hypophyse.
- ✓ Développement et l'activité des glandes annexes.
- ✓ Différenciation de l'épididyme et sa fonction.

L'inhibine : Glycoprotéine synthétisée par les cellules de Sertoli, l'inhibine exerce un feedback négatif sur l'hypothalamus, inhibant ainsi la sécrétion des gonadotropines mais préférentiellement celle de la FSH. (Thibaut C., et Levasseur M.C., 2001)

ABP (Androgen binding protein) : Secrétée par les cellules de Sertoli, elle sert de transporteur de la testostérone vers l'épididyme lui permettant ainsi d'exercer ses fonctions. (Bouabdallah N, 2014-2015)

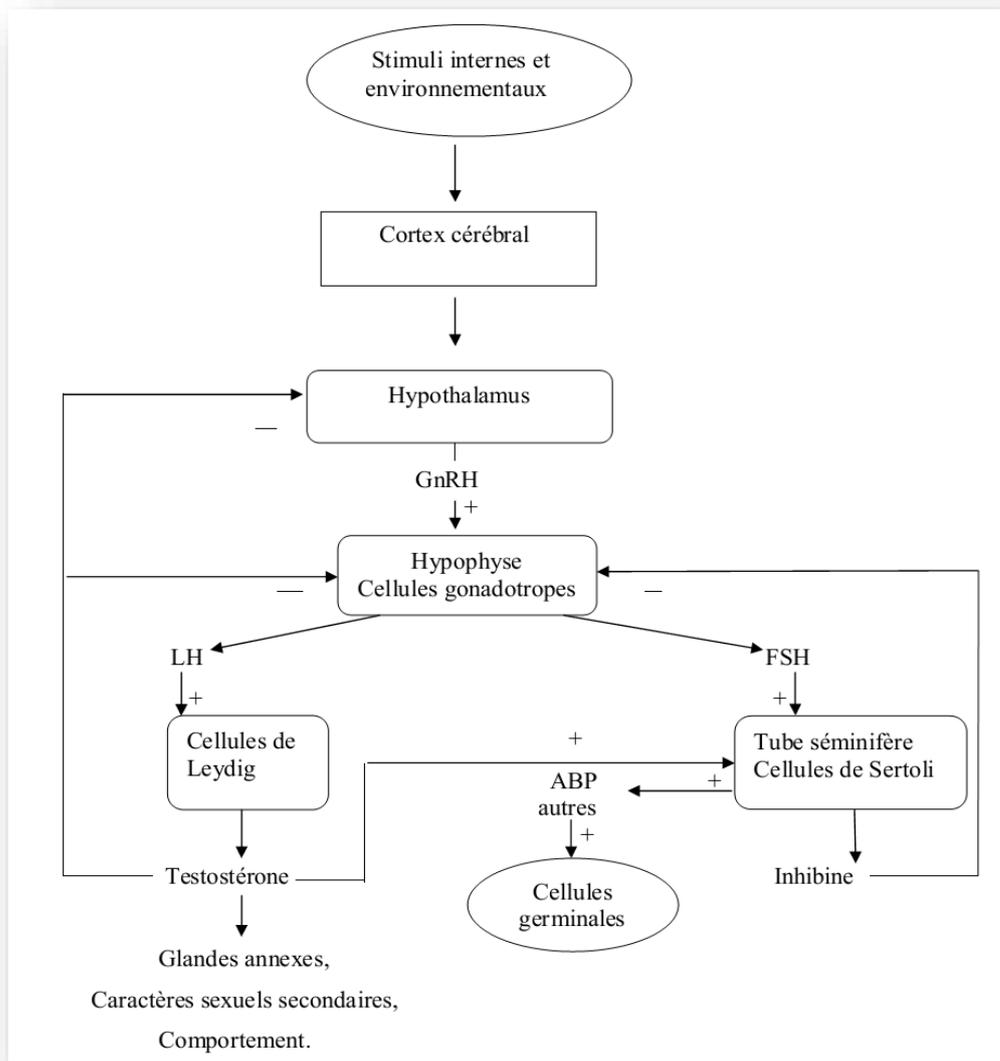


Figure 02: Régulation hormonale de la fonction sexuelle mâle. (Van Der Molen *et al*, 1975 ; Bonnes *et al.*, 2005 ; Silverthorn *et al.*, 2007 in Sematti M., et Mekki M., 2012-2013)

I. Le spermatozoïde

I.1. Sa morphologie

Le spermatozoïde est composé de deux parties : la tête et le flagelle.

La tête : elle renferme un noyau haploïde, c'est-à-dire ne contenant qu'un seul chromosome de chaque paire et un acrosome. L'acrosome a comme origine l'appareil de Golgi, il est formé par 2 membranes, une membrane intérieure appelée membrane acrosomique et une membrane extérieure collée à la membrane plasmique.

Pendant la fécondation, la pénétration de l'ovule se fait grâce aux enzymes libérées par l'acrosome. Certaines de ces enzymes sont spécifiques aux spermatozoïdes des mammifères tels que l'acrosine. (Lusignan M-F.,2011)

Le flagelle : élément moteur du spermatozoïde, il est formé de quatre pièces :

- ✓ la connective : comme son nom l'indique, elle connecte la tête au flagelle.
- ✓ L'intermédiaire : contient une couche de mitochondries, servant de source d'énergie pour la motilité des spermatozoïdes.
- ✓ La principale : entourée par une couche fibreuse, cette dernière sert d'échafaudage aux protéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes et la réaction de l'acrosome.

le flagelle renferme un complexe de microtubules allant de la tête jusqu'à la partie distale de la queue, ce complexe est appelé axonème central. (Lusignan M-F.,2011)

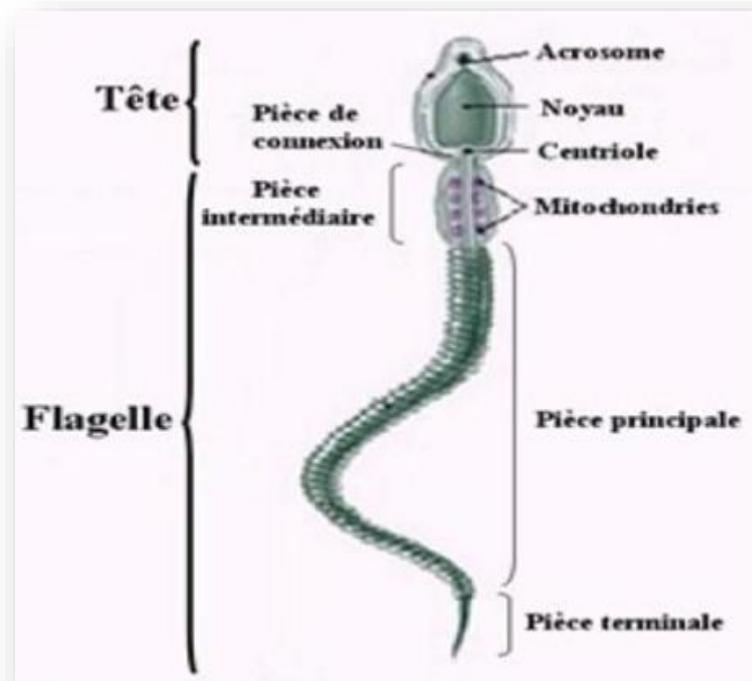


Figure 03 : Schéma représentant la structure d'un spermatozoïde. (Lusignan M., 2011)

I.2. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Elles sont classées selon deux critères :

L'origine :

- ✓ Primaires : les anomalies apparaissent durant la spermatogenèse c'est-à-dire au niveau du testicule.
- ✓ Secondaires : les anomalies surviennent dans l'épididyme c'est-à-dire durant la maturation.

L'effet sur la fertilité :

- ✓ Majeures : ces anomalies ont un effet négatif sur la fertilité.
- ✓ Mineures : la fertilité de l'animal est préservée.

Ces lésions peuvent toucher diverses parties du spermatozoïde.

- **Anomalies dites « majeures »** : Elles concernent généralement la tête et la queue.
- **Anomalies de la tête**
 - ✓ Bouton de l'acrosome : anomalie qui apparaît pendant la spermiogénèse. C'est un découpage anormal ou un aplatissement de la courbe de l'acrosome.
 - ✓ Aspect filiforme : la zone postacrosomique est plus effilée.
 - ✓ Vacuoles nucléaires : dans ce cas-là, on observe une invagination de la membrane nucléaire dans le cytoplasme conduisant à la formation de vacuoles uniques ou multiples.
 - ✓ Tête détachée.
 - ✓ Condensation anormale de l'ADN.
 - ✓ Absence de la queue.
- **Anomalies de la queue**
 - ✓ Gouttelettes cytoplasmiques proximal: cette lésion a été attribuée à un trouble de la spermatogenèse. Cette gouttelette apparaît auprès de la tête du spermatozoïde.
 - ✓ Aspect en tire-bouchon : la lésion touche la mitochondrie au niveau de la pièce intermédiaire. On observe une dégénérescence ou une aplasie de l'enveloppe mitochondriale.
 - ✓ Enroulement total.

- **Anomalies mineures**

Anomalies de la tête

- ✓ Micro et macrocéphalie : apparait durant la méiose, due à une distribution anormale des chromosomes.

Anomalies de la queue

- ✓ Gouttelette cytoplasmique distal : cette lésion a été associée à un trouble lors de la maturation du spermatozoïde.
- ✓ Implantation abaxiale.
- ✓ Extrémité de la queue recourbée. (Hanzen C., 2008-2009)

D'autres anomalies peuvent aussi être observées au niveau du flagelle : le flagelle peut être :

- ✓ Court : il est, à ce moment-là, incapable d'assurer un mouvement et une vitesse d'ascension satisfaisante au spermatozoïde.
- ✓ Double : les mouvements sont asynchrones et bien souvent le spermatozoïde fait des mouvements rotatoires et n'avance pas.

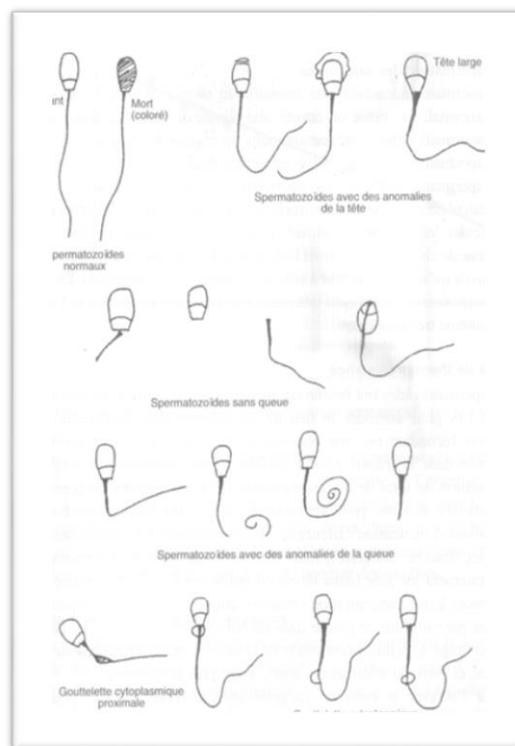


Figure 04 : Anomalies majeures des spermatozoïdes. Zaidi I

III. L'épididyme

L'épididyme joue un rôle capital dans la qualité du sperme éjaculé. A son niveau, le spermatozoïde subit des modifications très importantes ce qui lui permet ainsi son pouvoir fécondant.

III.1. Sa morphologie

L'épididyme est un tube de longueur variable selon les espèces, chez le taureau sa longueur est de **40** mètre. (Thibaut C., et Levasseur M.C., 2001) Sur le plan anatomique, l'épididyme est composé de trois régions : la tête, le corps et la queue.

- ✓ **La tête** : elle est épaisse et coiffe le pôle postérieur du testicule.
- ✓ **Le corps** : il est aplati d'un côté à l'autre, attaché latéralement au mésorchium du testicule par le mésépididyme.
- ✓ **La queue** : attachée de façon solide au testicule, elle n'est pas en continuité de substance avec lui. (Baron R., 1978)

L'épididyme contient aussi deux types de canaux :

- ✓ **Canaux efférents** : ils font suite au rete testis, et forment au niveau de la tête des flexuosités nombreuses. Ces flexuosités se regroupent en pelotons entourés de tissu conjonctif et forment ainsi des lobules.
- ✓ **Canal épididymaire** : c'est un conduit très long, mesurant chez le taureau **50** mètres, **70 à 80** mètres chez le cheval et **1.5 à 3** mètres chez le chat. Son calibre augmente progressivement jusqu'au canal déférent. Le canal épididymaire est le résultat des canaux efférents qui confluent.

Sur le plan physiologique, chaque région de l'épididyme a une activité bien précise.

III.2.les différentes fonctions de l'épididyme

L'épididyme, par son épithélium, assure plusieurs fonctions aboutissant à la différenciation post gonadiques des spermatozoïdes. (Dacheux J-L., et Paquignon M., 1987) Dans les canaux efférents, les spermatozoïdes sont immobiles et infertiles, ils acquièrent ces deux pouvoirs après leur passage dans l'épididyme. Parmi ses fonctions, nous citons les suivantes :

- ✓ **Fonction de réabsorption**

Au niveau de l'épithélium épидидymaire, il y a réabsorption des ions, des protéines et de l'eau. Cela conduit à une augmentation de la concentration en spermatozoïde de l'éjaculat. Il a été constaté que cette réabsorption hydrique est très importante au niveau de la région antérieure de l'épididyme.

✓ **Synthèse des protéines épидидymaires**

Cette synthèse est tributaire de la testostérone. (Thibault C., Levasseur M., 2001)
L'épithélium épидидymaire produit différents composés tels que : glycérylphosphorylcholine, et d'autres protéines spécifiques. Ces protéines se fixent sur des régions précises du flagelle et de la tête. (Thibault C., Levasseur M., 2001)

✓ **Transport des spermatozoïdes**

Au niveau du liquide testiculaire les spermatozoïdes sont immobiles. Le principal rôle du tube épидидymaire est d'assurer le transport des spermatozoïdes depuis le testicule jusqu'à ce qu'ils soient éjaculés.

Grâce au fluide testiculaire produit par les cellules de Sertoli, les spermatozoïdes seront acheminés en dehors des tubes séminifères et arrivent au niveau du rete testis (partie centrale du testicule). Cette région du testicule est connectée à l'épididyme par les canaux efférents.

Ce rôle dans le transport des spermatozoïdes est assuré par la gaine des fibres musculaires lisses qui entourent le tube.

✓ **Barrière hémato-épидидymaire**

L'épithélium épидидymaire joue le rôle de barrière entre le milieu sanguin et l'intérieur du tube, ce qui permet au spermatozoïde d'avoir un milieu adéquat et favorable à leur survie. (Dacheux J.L., et Paquignon M., 1987)

A la fin du transit épидидymaire, le spermatozoïde a acquis son pouvoir fécondant, et aussi sa mobilité. Cette dernière est mise en évidence déjà au niveau du corps. Entre les éjaculations, les spermatozoïdes sont stockés au niveau de la queue de l'épididyme.

L'acquisition de la motilité et du pouvoir fécondant du spermatozoïde au niveau de l'épididyme se fait à des endroits bien précis. Des changements sont observés au niveau du noyau de la membrane plasmique, et du matériel locomoteur. Pour ce qui est de la gouttelette cytoplasmique, elle disparaît. Durant ce voyage, la survie du spermatozoïde dépend de la production des androgènes, ces derniers stimulent les cellules de l'épididyme. Les

spermatozoïdes matures sont stockés au niveau de la queue de l'épididyme jusqu'à l'éjaculation. (Baril G., *et al.*, 1993)

I. Le plasma séminal

I.1. Les glandes annexes

Les spermatozoïdes matures retrouvés au niveau de la queue de l'épididyme seront suspendus dans les sécrétions des glandes annexes. Ces sécrétions renferment environ les trois quart du plasma séminal. (Thibaut C., et Levasseur M.C., 1991) Les principales glandes annexes retrouvées chez les mammifères sont : l'ampoule, la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Cowper. (Cormier N., 1998) D'autres glandes sont aussi mises en évidence mais dont l'existence ne se limite que chez certains mammifères comme la glande préputial ou de tyson.

I.1.1 Anatomie des glandes annexes

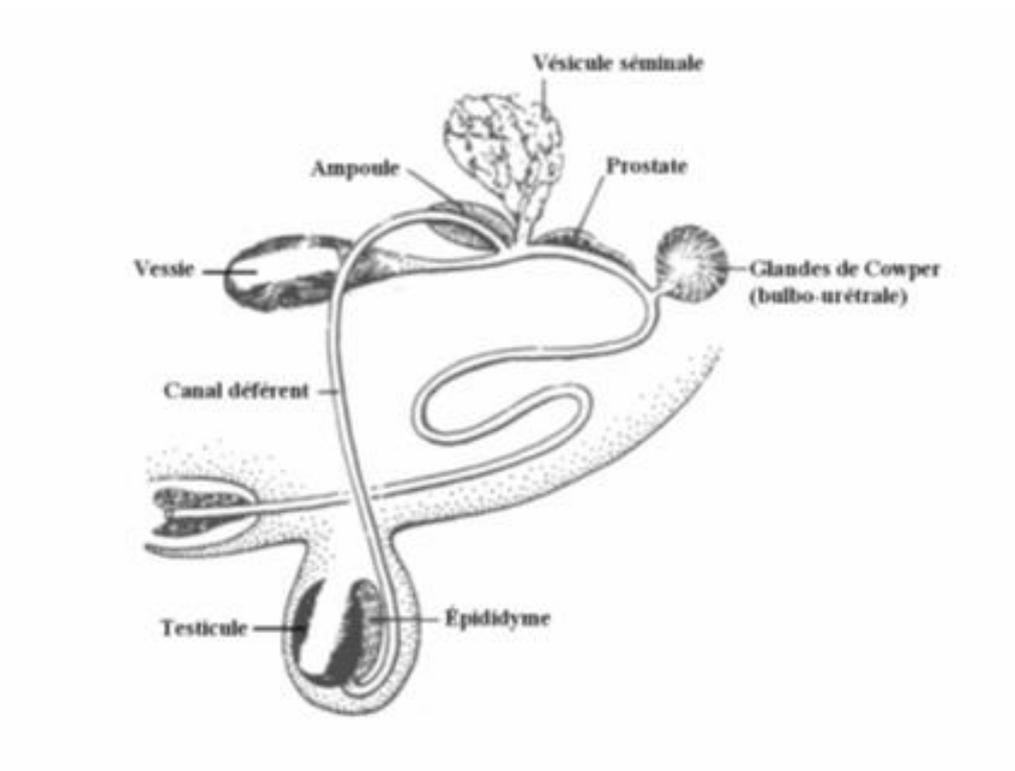


Figure 05 : Tractus génital du taureau. (Lusignan M-F., 2011)

- ✓ **La prostate :** c'est une glande annexée à l'urètre. La prostate est un complexe glandulaire muni de canaux excréteurs. Elle se forme chez l'embryon à partir de la paroi du sinus uro-génital. Ses sécrétions sont légèrement acides et elles

renferment chez le taureau environ **5 à 6** pour cent du plasma séminal. (Baron R., 1978)

- ✓ **Glande bulbo-urétrale** : aussi appelée glande de Cowper, elle a une forme globuleuse chez le taureau. Les sécrétions de cette glande jouent un rôle important dans la coagulation de l'éjaculat grâce à la sialomucine.
- ✓ **Les glandes vésiculaires** : ce sont deux glandes qui déversent leur sécrétion dans l'urètre par le canal éjaculateur. Ces sécrétions renferment environ **60** pour cent du volume du sperme et contiennent plusieurs substances dont le mucus qui sert de lubrifiant pour l'urètre, le fructose qui est utilisé comme source d'énergie par le spermatozoïde et une substance antibiotique. (Gilbert B., *et al.* 2005)

II. le liquide séminal

Le plasma séminal est un milieu très complexe de par sa composition biochimique. Cette composition est le résultat des différentes sécrétions des glandes annexes, du rete testis et de l'épididyme. Les concentrations des différents composants du liquide séminal sont sensibles aux régimes alimentaires ainsi qu'à la taille des glandes annexes, ceci explique la variation de sa fonction chez les différentes espèces. (Mahutin V-S., 2015) **30 à 60** pour cent du liquide séminal a comme origine les sécrétions des vésicules séminales par contre les sécrétions de la prostate représentent **25 à 40** pour cent du liquide. Au moment de l'éjaculat chez le taureau, le volume est de **2 à 6** millilitres. (Florencia A., et Susan S., 2014)

II.1. Les protéines majeures du plasma séminal

Les Binding Sperm Proteins (BSP) sont les protéines dominantes dans le plasma séminal d'ailleurs elles représentent **64** pour cent des protéines totales. (Lusignan M-F., 2011) Ces protéines sont sécrétées par les vésicules séminales et elles renferment trois protéines : *BSP1*, *BSP2*, *BSP3*. Les BSP semblent avoir un rôle très important dans la capacitation des spermatozoïdes.

II.2. Rôle du plasma séminal

Les différentes études effectuées donnent des résultats contradictoires. Certaines soulignent des effets bénéfiques du plasma séminal sur les spermatozoïdes et d'autres démontrent au contraire des effets néfastes. (Cormier N., 1998) La mise en évidence du rôle

qu'exerce le plasma séminal peut se faire à partir de spermatozoïdes epididymaires ou éjaculés, c'est ce qui peut expliquer les contradictions.

▪ **Les effets bénéfiques sur le spermatozoïde**

✓ **La motilité** : le plasma séminal comprend une protéine appelée PDC-109 qui pendant le passage du spermatozoïde au niveau du canal défèrent se fixe sur la pièce intermédiaire augmentant ainsi sa mobilité.

✓ **La stabilisation des membranes spermatiques** : cette stabilisation est due aux protéines BSP. Ces dernières empêchent le départ des phospholipides de la membrane en se fixant à eux. (Mahutin S-V., 2015)

✓ **Rôle dans l'interaction du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovule.**

✓ **Suppression de la réponse immunitaire de la femelle contre le spermatozoïde.**
(Moreau R., 1998).

✓ **Stimulation de la capacitation.**

✓ **Protection des spermatozoïdes contre les peroxydations.**

✓ **Les protéines BSP permettent aux spermatozoïdes de se fixer sur l'épithélium oviductal afin de former un réservoir.** (Florencia A., et Susan S., 2014)

▪ **Les effets néfastes sur les spermatozoïdes**

Il s'est avéré que le plasma séminal contient des facteurs qui agissent de manière négative sur les spermatozoïdes. Parmi ces facteurs y a ceux qui empêchent la capacitation et ceux qui inhibent la motilité du spermatozoïde. (Lusignan M., 2011) Les protéines BSP semblent aussi avoir un effet néfaste durant la conservation du sperme conduisant à une diminution de la fertilité. (Florencia A., et Susan S., 2014)

CHAPITRE II

Le spermatozoïde dans le tractus génital femelle

II. Le spermatozoïde dans le tractus génital femelle

En 1951, Chang et Austin ont démontré que les spermatozoïdes éjaculés n'avaient encore pas la capacité de féconder l'ovocyte. Ils n'acquièrent cette capacité qu'après avoir séjourné quelques heures dans le tractus génital femelle (Salicioni A., *et al.*, 2007). Les spermatozoïdes subiront alors un ensemble de changements qui leur permettront d'acquérir le pouvoir fécondant, ce processus est appelé capacitation.

II.1. Qu'est-ce que la capacitation ?

La capacitation peut être définie comme étant un ensemble de changements biochimiques et physiologiques subis par les spermatozoïdes dans l'appareil génital femelle. (Landim-Alvarenga F-C., *et al.*, 2004)

Le spermatozoïde, durant la capacitation, subira une réorganisation de ses protéines membranaires, des changements du métabolisme des phospholipides et enfin une diminution du niveau de cholestérol. (Dibyajyoti T., *et al.*, 2015)

Ce processus donne lieu à des modifications fonctionnelles des spermatozoïdes, ces derniers auront une mobilité distincte appelée l'*hyper activation* qui est caractérisée par des mouvements prononcés du flagelle avec une trajectoire non linéaire. Une autre finalité de ce processus est l'acquisition des spermatozoïdes de la capacité à subir une réaction de l'acrosome suite à un stimulus physiologique. (Baldi E., *et al.*, 1996)

Durant la capacitation, en plus des modifications observées au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde, un changement dans la concentration des ions est aussi à noter.

II.1.1. Le cholestérol

Le cholestérol est un élément essentiel dans la stabilisation des membranes et dans la réduction de la perméabilité membranaire. Le ratio cholestérol/phospholipides est très important dans la détermination de la fluidité et de la stabilité membranaires. Le cholestérol s'incorpore dans le spermatozoïde durant sa maturation, son taux varie d'une région à une autre mais semble plus élevé au niveau de la tête régulant ainsi la fluidité membranaire.

(Naseer Z., *et al.*, 2014) Le ratio cholestérol/phospholipide de la membrane plasmique varie d'une espèce à une autre, il est évalué, à titre d'exemples : chez l'étalon à **0.36**, chez le verrat à **0.20** et chez le taureau à **0.40**. (Cross N-L., 1998)

Durant la capacitation, la membrane plasmique du spermatozoïde éjaculé est déstabilisée suite à la perte du cholestérol membranaire, ceci constitue une étape importante pour la capacitation. (Martínez P., et Morros A., 1996) Cette perte de cholestérol induit une augmentation de la fluidité membranaire et par conséquent une entrée de Ca^{++} au niveau de la cellule.

In vitro, l'incubation du sperme bovin avec le fluide oviductal a causé un transfert d'environ **25%** de cholestérol vers la lipoprotéine de grande densité (HDL). L'albumine présente un niveau du liquide utérin joue également le rôle de récepteur pour le cholestérol. (Cross N-L., 1998)

II.1.2. Le bicarbonate

La capacitation est un processus qui dépend du bicarbonate. Ce dernier est transporté dans la cellule par l'intermédiaire du Co-transporter membranaire NA^+/HCO_3^- . Le mouvement transmembranaire du bicarbonate est associé à une augmentation du pH intracellulaire. Le bicarbonate stimule une Adényl-cyclase qui induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cette dernière permet l'activation d'une protéine kinase A qui est à l'origine de la phosphorylation sur tyrosine des protéines membranaires du spermatozoïde (Salicioni A-M., *et al.*, 2007).

La concentration de cet ion est plutôt faible dans le liquide épидидymaire, à l'inverse du plasma séminal et du tractus génital femelle dans laquelle elle est plus élevée, c'est ce qui prévient la capacitation précoce du spermatozoïde dans l'épididyme. (Visconti P-E., et Kopf G-S., 1998)

II.1.3. Le calcium

Dans les spermatozoïdes des mammifères, le calcium intracellulaire joue un rôle important dans le control de la motilité et de la capacitation. Le site d'entrée de cet ion est la membrane plasmique et la membrane mitochondriale. (Cordoba M., *et al.*, 1997) L'entrée du calcium dans la cellule est possible grâce à l'efflux de cholestérol et à l'augmentation de la fluidité membranaire (Lefebvre J., 2009). Le calcium a le même effet que le bicarbonate c'est-

à-dire qu'il induit l'activation de l'adényl cyclase, l'augmentation de l'AMPc et enfin la phosphorylation sur tyrosine des protéines.

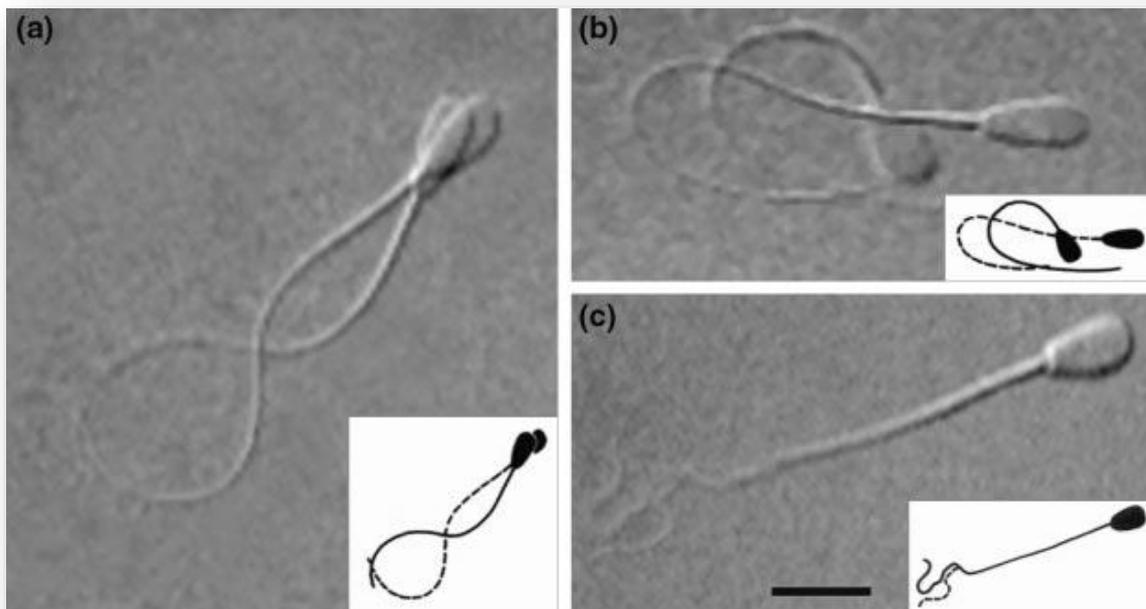
L'augmentation du calcium dans le flagelle provoque l'hyper activation, ce phénomène est observé chez plusieurs espèces. (Mitra M., et Shivaji S., 2005)

II.2. Hyper activation des spermatozoïdes

Yanagimachi en 1994 a défini la *motilité activée* des spermatozoïdes matures comme suit : les spermatozoïdes dans l'épididyme sont inactifs ou légèrement mobiles. Une fois libérés dans le plasma séminal, *in vivo* ou dans un milieu physiologique *in vitro*, les spermatozoïdes commencent à avoir une trajectoire presque droite. (Ho H-C., et Suarez S-S., 2001)

L'*hyper activation* est un type de mobilité qui se caractérise par un battement flagellaire asymétrique et de haute amplitude, l'initiation et l'entretien de cette mobilité sont associés à une augmentation de la concentration du calcium à l'intérieur du flagelle. Le calcium, comme cité plus haut, joue un rôle primordial dans l'hyper activation des spermatozoïdes, il provient soit de l'ouverture des canaux calciques au niveau de la membrane plasmique ou de la libération du calcium emmagasiné à l'intérieur du spermatozoïde. (Olson S-D., *et al.*, 2011)

L'hyper activation est considérée comme l'une des étapes du processus de capacitation des spermatozoïdes. Cette mobilité est indispensable pour la survenue de la fécondation. (Mirihasimu M., *et al.*, 2004)



(a) le battement flagellaire symétrique d'un spermatozoïde activé. (b) battement flagellaire asymétrique d'un spermatozoïde hyper activé. (c) la natation progressive d'un spermatozoïde hyper activé dans une solution épaisse viscoélastique à longue chaîne polyacrylamide

Figure 06 : Figure représentant les différents mouvements de spermatozoïdes en fonction de leur activation. (Ho H-C., et Suarez S-S., 2001)

II.3. Induction de la capacitation par l'héparine

D'après Parrish *et al*, l'héparine fixée au niveau de la surface du spermatozoïde stimulerait la perte de facteurs décapacitants, l'ouverture de canaux à protons induisant une augmentation du pH intracellulaire et un influx de calcium. Les deux derniers événements stimulent l'adényl cyclase provoquant ainsi une augmentation de l'AMPc. Contrairement à la HDL, l'héparine ne provoque aucun efflux de cholestérol. (Moreau R., 1998)

Les BSP fixées sur le spermatozoïde agissent comme récepteurs de l'héparine, cette dernière est retrouvée dans le liquide folliculaire. (Lane M-E., *et al.*, 1996)

II.4. Induction de la capacitation par la High Density Lipoprotein (HDL)

La présence d'albumine et de HDL facilite l'efflux de cholestérol durant la capacitation. Ces deux molécules sont présentes dans le tractus génital femelle. La HDL semble être la seule lipoprotéine présente dans les follicules et le fluide oviductale des bovins, la quantité de cette dernière augmente pendant la période d'œstrus.

La HDL joue le rôle de récepteurs pour le cholestérol c'est-à-dire que durant la capacitation, le cholestérol migre de la membrane plasmique des spermatozoïdes vers le tractus génital de la femelle, et se fixe sur la HDL. (Moreau R., 1998)

Les BSP du plasma séminal accélèrent la capacitation des spermatozoïdes mais n'ont cette capacité qu'en présence de la HDL et /ou l'héparine, le mécanisme d'action n'est pas encore expliqué, mais il semble qu'il y'ait une interaction entre la HDL et les BSP participant ainsi aux changements de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant la capacitation. Moreau R., *et al.*, en 1998 ont été les premiers à mettre en évidence le rôle du plasma séminal dans la capacitation mais ces résultats sont contradictoires aux autres études qui attribuent au plasma séminal un rôle décapacitant. Les spermatozoïdes épидидymaires traités avec les BSP ont une capacité similaire à celle des spermatozoïdes éjaculés. (Thérien I., *et al.*, 1997).

Pour ce qui est de l'albumine, elle représente la majorité des protéines du liquide folliculaire et peut également avoir le même rôle que la HDL c'est-à-dire récepteur de cholestérol. (Thérien I., *et al.*, 1997).

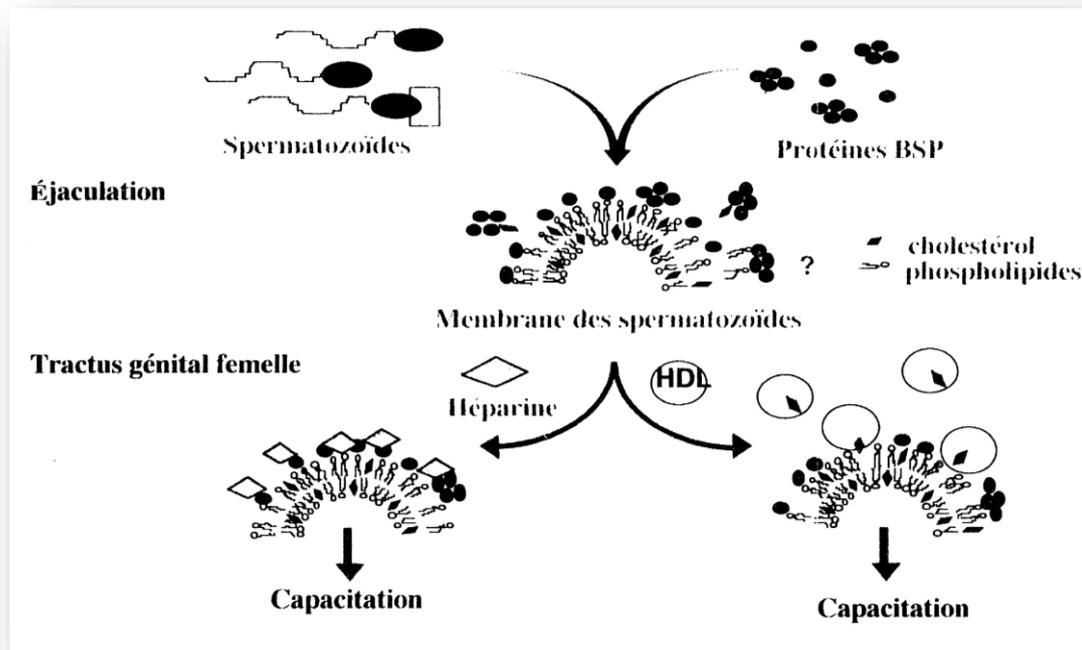


Figure 07: Schéma représentant les mécanismes de capacitation. (Moreau R., 1998)

II.1. La réaction de l'acrosome

II.1.1. La structure de l'acrosome

Organelle qui a comme origine l'appareil de Golgi, c'est une structure vésiculaire qui coiffe la tête du spermatozoïde. Sa **membrane interne** recouvre la partie antérieure de la membrane externe du noyau et sa **membrane externe** est située sous la membrane plasmique interne. (Hébert A., 2011) L'acrosome renferme deux parties : le contenu acrosomal dans lequel se trouvent des enzymes et le segment équatorial qui est vide. (Maher G., 2012) Les principales enzymes acrosomiales sont : la hyaluronidase, l'acrosine et la f3-N-acétylglucosaminidase, d'autres enzymes sont aussi présentes comme la neuraminidase et de la phosphatase acide.

II.1.2. Définition de la réaction de l'acrosome

Décrite pour la première fois chez les oursins et l'étoile de mer par Dan, la réaction de l'acrosome est la fusion progressive de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. (Thibaut C., et Levasseur M-C., 2001)

La réaction de l'acrosome est un phénomène d'exocytose qui est dépendant du calcium, d'ailleurs, dans un milieu où ce dernier est absent, la réaction de l'acrosome n'aura pas lieu. La fusion de ces membranes est à l'origine de leur rupture, la formation de vésicules membranaires ainsi que des ouvertures permettant la libération des enzymes acrosomiales. (Yanagimachi R., 2011)

Les ovocytes prêts à être fécondés sont entourés d'un cumulus constitué de cellules et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Ce cumulus disparaît rapidement lors de l'ovulation mais quand il est toujours présent, seuls les spermatozoïdes capables peuvent le pénétrer. (Gayard V., 2007)

La zone pellucide a deux principaux rôles, elle permet la fixation du spermatozoïde et, ainsi, le déclenchement de la réaction de l'acrosome. La zone pellucide est formée, chez le bovin, par 3 glycoprotéines qui sont : ZP₁, ZP₂ et ZP₃.

Au niveau de la tête du spermatozoïde, il y a un récepteur spécifique pour la ZP₃. La fixation de cette dernière sur son récepteur semble être l'élément déclencheur de la réaction de l'acrosome. (Stamboulian S., 2005) La ZP₂, quant à elle, serait clivée en deux fractions au niveau des ovocytes fécondés, conduisant ainsi au durcissement de la zone pellucide et empêchant la pénétration d'autres spermatozoïdes dans cet œuf. (Fraser B., 2013)

Les différentes études menées sur l'induction de la réaction de l'acrosome donnent des résultats disparates. Certains auteurs soutiennent l'hypothèse que l'élément déclencheur de la réaction acrosomiale est la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide, d'autres, par contre, avanceraient que le cumulus qui entoure l'ovule joue aussi un rôle de déclencheur. (Fraser B., 2013)

II.1.3. Le mécanisme de la réaction de l'acrosome

Une fois en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte, l'acrosome va libérer les enzymes citées plus haut, c'est donc un phénomène d'exocytose. Les étapes suivantes décrivent les différentes étapes observées durant ce phénomène :

1. Le spermatozoïde se fixe sur la zone pellucide ce qui induit une dépolarisation de la membrane et une ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Le calcium va ainsi rentrer dans le milieu intracellulaire ;

2. L'augmentation de la concentration en calcium à l'intérieur du spermatozoïde, va activer une phospholipase C (Mahutin S-V., 2015) ;
3. La phospholipase C hydrolyse une PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), et donne du diacyl-glycérol et de l'inositol triphosphate (IP₃).
4. L'IP₃ dispose de récepteurs sur la membrane de l'acrosome et de l'enveloppe nucléaire, une fois le récepteur activé, il y a libération du calcium à partir de l'acrosome ;
5. Cette libération de calcium activera d'autres canaux calciques situés au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde, ce qui permet une deuxième entrée de calcium. (Stamboulia S., 2005)

De ce fait, l'induction de la réaction de l'acrosome nécessite l'augmentation du calcium intra spermatique. Nous observons aussi une augmentation du pH à l'intérieur du spermatozoïde. La fixation de la ZP₃ sur son récepteur activera une protéine appelée G₁, cette dernière est responsable de l'augmentation du pH en induisant une cascade de signalisation. (Mahutin S-V., 2015). Un pH basique est nécessaire pour l'activation des enzymes acrosomales, au même titre que la transformation de la proacrosine en acrosine. (Cormier N., 1991)

L'augmentation de la concentration du calcium et du pH intra spermatique est essentielle pour déclencher la réaction de l'acrosome donc le phénomène d'exocytose. L'acrosome va libérer ses enzymes qui digèrent la zone pellucide. (Hébert A., 2015)

Après Le premier attachement du spermatozoïde à la zone pellucide, la réaction de l'acrosome aura lieu. Une deuxième liaison sera observée, cette dernière se fera grâce aux battements flagellaires du spermatozoïde et à des protéines qui étaient initialement inaccessibles mais qui le sont devenues après la réaction de l'acrosome. Il semblerait que pendant cette liaison secondaire ce sont les ZP₂ qui joueraient un rôle important. (Fraser B., 2013)

II.3. Le réservoir oviductal

L'oviducte chez la femelle est formé par trois régions distinctes : infundibulum, l'isthme et l'ampoule. Chacune de ces régions joue un rôle physiologique. Des études ont démontré que les spermatozoïdes se fixent aux alentours de l'ovulation au niveau de l'isthme et forme un réservoir. (Bosh P., et Wright J., 2005)

L'oviducte assure la disponibilité des spermatozoïdes pour l'ovulation mais prévient aussi la polyspermie. (Suarez S., 1991) D'un autre côté, il procure un environnement adéquat pour le développement précoce de l'embryon. (Bosh P., et Wright J., 2005)

L'isthme est caractérisé par une lumière très étroite et une épaisse tunique. Il semblerait que cette forme joue un rôle dans la formation du réservoir. Les spermatozoïdes se fixent sur les cellules épithéliales de l'oviducte. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la formation de ce réservoir parmi lesquels nous citons : les propriétés chimiques des fluides de l'oviducte, le mucus sécrété et la température.

II.3.1. Les propriétés chimiques du fluide de l'oviducte

Ce fluide est composé d'ions, de macromolécules solubles dans l'eau et de certains constituants qui dérivent du plasma sanguin. La concentration du potassium est élevée, par contre celle du calcium est relativement faible. Cette composition intervient dans la formation du réservoir de l'oviducte pendant la période péri ovulatoire. (Bosh P., et Wright J., 2005)

II.3.2. Le mucus

Suarez *et al* ont observé, après une congélation, sur des coupes histologiques effectuées sur l'isthme, du mucus. La production de mucus se fait par l'épithélium et semble augmenter pendant la période d'œstrus. (Boutelis S., 2011) Ce mucus semble provoquer une inhibition temporaire de la motilité des spermatozoïdes, aidant ainsi à la formation du réservoir. (Bosh P., et R W Wright J., 2005)

II.3.3. La température

Le changement de température peut être impliqué dans la formation du réservoir de l'oviducte. Hunter et Nichol, en 1986, avaient mesuré la température tout au long de l'oviducte pendant la période péri ovulatoire, les résultats étaient comme suit : l'isthme présentait une température inférieure de **0.75°C** par rapport à celle mesurée au niveau de l'ampoule. Ces résultats peuvent être expliqués par la différence de vascularisation de ces différentes régions. (Bosh P., et Wright J., 2005)

La fixation du spermatozoïde au niveau de l'oviducte est un processus réversible, qui implique la fraction oligosaccharide de la membrane des cellules de l'oviducte. Les BSP bovines semblent aussi jouer un rôle dans la liaison des spermatozoïdes aux cellules.

(Lusignan M-F., 2011) Certaines études rapportent que le spermatozoïde se lie seulement aux cellules ciliées intactes. (Suarez S., 1991)

Des expériences réalisées sur des sangliers ont démontré que l'œstradiol peut aussi jouer un rôle dans la formation du réservoir, cette dernière augmente d'ailleurs les liaisons du spermatozoïde aux cellules de l'oviducte.

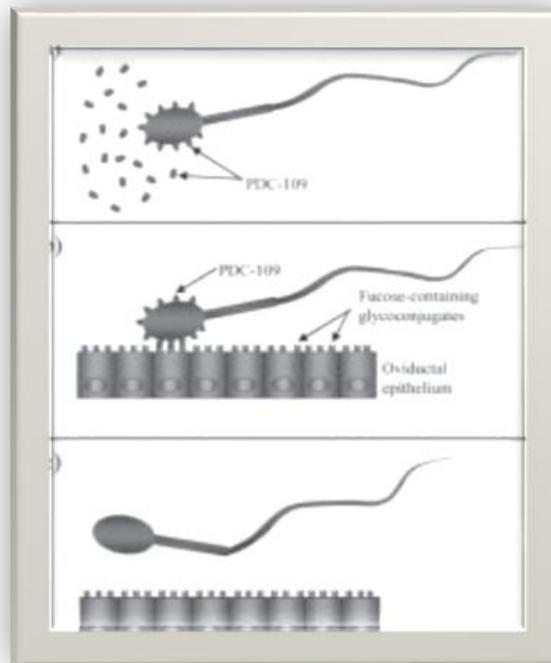


Figure 08 : Schéma représentant la fixation d'un spermatozoïde à une cellule de l'oviducte.

(Bosch P., Wright J., 2005)

CHAPITRE III :**La cryobiologie****I. La cryobiologie**

La cryobiologie est la science qui étudie le comportement de certains organismes à basses températures. Elle a été utilisée pour la première fois en 1950. (Chian R-C., 2010) L'italien physiologiste Spallanzani fut le premier en 1779 à observer que les spermatozoïdes réfrigérés sous l'effet de la neige ne présentaient aucune activité mais pouvaient par contre revivre s'il y a ensuite réchauffement. En 1949, Polge, Smith et Parks ont découvert l'effet cryoprotecteur du glycérol. La semence de la volaille a été la première expérience pour la conservation après est venue celle des bovins. (Day J-G., et Stacey G-N., 2007)

II. Conservation à court terme : réfrigération.**II.1. La réfrigération**

La réfrigération est la conservation de la semence à $+4^{\circ}\text{C}$ en présence de substances cryoprotectrices. Cette semence doit être utilisée dans les **48H**, au-delà de cette durée, la qualité du sperme peut être affectée. Cette méthode est utilisée dans les pays où l'azote liquide n'existe pas (Tainturier D., *et al.*, 2013).

La dilution du sperme à $+32^{\circ}\text{C}$ et son refroidissement progressif à $+5^{\circ}\text{C}$ est indispensable au maintien de la vitalité des spermatozoïdes. Des études ont montré que la dilution de la semence à $+32^{\circ}\text{C}$ avant de baisser la température assurerait une meilleure motilité des spermatozoïdes comparativement aux températures suivantes : 37°C , 26°C et 15°C . Parmi plusieurs températures effectuées, $+5^{\circ}\text{C}$ s'est avérée la plus adéquate pour la conservation de la semence.

Lors de refroidissement, la semence subit un choc thermique qui peut affecter sa qualité. Selon Wales et White, l'intégrité des spermatozoïdes n'est affectée qu'à des vitesses de refroidissement au-dessus de $+15^{\circ}\text{C}$, c'est-à-dire au-dessous de cette température la vitesse de refroidissement de la semence diluée n'a pas d'effets délétères. En d'autres termes, la période critique de refroidissement se situe entre 32°C et 15°C . (Adamou - N'diaye M., *et al.*, 2002)

Les milieux à base de lait écrémé semble les plus utilisés pour la conservation de la semence à l'état liquide à +4°C. (Lebœuf B., *et al.*, 2003)

III. Conservation à long terme : la cryoconservation

III.1. Définition de la cryoconservation

La cryoconservation est l'utilisation de températures basses dans de l'azote liquide à -196°C, pour préserver les cellules vivantes et les tissus. Cette température arrête toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les échanges intra et extracellulaires. (Maher G., 2012) La cryoconservation permet de stocker ces cellules et tissus pendant plusieurs années. Elle est réalisée aussi bien chez les animaux que les humains. Les premières cellules à être congelées sont les spermatozoïdes, cela a été effectué par Polge, Smith et Parkes. Le développement des protocoles de conservation de la semence du taureau a commencé dans les années 1950. (Eric M., *et al.*, 2009)

III.2. Objectifs

La cryoconservation de la semence a pour objectif de renforcer l'insémination artificielle. Cette pratique a débuté chez les bovins qu'en 1947 par Polge et Coll après la découverte du glycérol. L'insémination artificielle est la première biotechnologie de la reproduction à être apparue. La conservation de la semence et l'utilisation de l'insémination artificielle permettent :

III.2.1. L'amélioration génétique

Ces biotechnologies offrent une diffusion facile des semences provenant d'animaux avec des potentiels génétiques importants ou en voie d'extinction. (Soltner D., 2001)

III.2.2. Intérêt sanitaire

Conserver la semence et l'utiliser par insémination artificielle épargne les risques de transmission de maladies par voie sexuelle. (Soltner D., 2001)

III.2.3. Intérêt économique

Favoriser la fonction de reproduction et permettre le désaisonnement. (Labbé C., *et al.*, 2003)

III.3. Les inconvénients de la cryoconservation

Durant les dernières années, l'amélioration des techniques de cryoconservation était l'objectif majeur de différentes études. La congélation de la semence n'est pas sans effets sur sa qualité. Il s'est avéré qu'à des températures basses, les spermatozoïdes connaissent des changements très importants affectant leur qualité et leur fertilité. Les membranes plasmiques et mitochondriales peuvent être endommagées lors de la congélation et décongélation, le matériel génétique peut ainsi être affecté. (Andrabi S., 2008)

L'exposition des spermatozoïdes à des températures basses provoque des changements biophysiques très importants, altérant ainsi la structure de certains organites et modifiant le métabolisme du spermatozoïde. Les causes principales de ces changements sont : le stress thermique, le choc osmotique et le stress oxydatif. (Almeyehu L., 2011)

III.3.1. Le stress oxydatif

Lors de sa sortie de l'épididyme le spermatozoïde contient des enzymes intracellulaires antioxydantes, le plasma séminal en contient aussi. Parmi ces enzymes, nous avons : la catalase, le glutathion peroxydase, le glutathion réductase. La quantité et l'activité de ces molécules varient d'une espèce à une autre, et dans la même espèce d'un individu à un autre. (Sicherle S., *et al.*, 2010)

Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la formation des espèces réactives de l'oxygène et leur élimination par l'organisme. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres dérivant du métabolisme de l'oxygène dans un milieu anaérobique. (Abolfazl A., et Gholami-Ali J., 2013)

Les différentes sources de production des ROS dans la semence sont les leucocytes et les spermatozoïdes immatures ou ayant une anomalie et les sites de production sont la mitochondrie et la membrane plasmique. La présence de ROS en quantité excessive est toxique pour les spermatozoïdes, leurs mécanismes d'action sont multiples. Les lipides présents dans la membrane plasmique semblent être les plus susceptibles à une attaque par les ROS, ces derniers induisent une chaîne de réactions chimiques provoquant la peroxydation des lipides. Cette modification conduit à une redistribution et réorientation des lipides au niveau de la membrane plasmique changeant ainsi sa fluidité.

Des études récentes démontrent que les ROS se fixent de manière covalente sur les protéines, les rendant plus susceptibles à la protéolyse. (Anghel A., *et al* 2013) En ce qui concerne l'ADN, en présence de quantité excessive de ROS, il subit une fragmentation. L'activité de la catalase est également affectée du fait de la diminution de la production d'ATP. (Sicherle S., *et al.*, 2010).

Afin de réduire les dommages causés par le stress oxydatif, des antioxydants non enzymatiques sont rajoutés dans les milieux de dilution. Cette méthode n'est pas vraiment bénéfique du fait que ces molécules ne sont régénérées après avoir été oxydées. (Grignard E., 2005)

III.3.2. Le stress thermique

Les spermatozoïdes des mammifères sont sensibles au refroidissement, ce dernier cause un choc thermique conduisant à un changement de la perméabilité de la membrane et une perte irréversible de la motilité des spermatozoïdes après décongélation. Les lipides de la membrane sont normalement en phase de cristallin liquide mais après refroidissement ils se transforment en glace altérant ainsi la fonction de la membrane. (Johnson L., *et al.*, 2006)

Contrairement au taureau, la semence de l'homme et celle du singe ne sont pas vraiment susceptible au choc thermique. Ceci peut être expliqué par l'importance du ratio cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique de ces derniers. (Muino-Blanco T., 2008)

Lorsque la température extracellulaire est au-dessous du point de congélation, les cristaux de glace se forment, augmentant ainsi la concentration. De ce fait, la pression osmotique intracellulaire est inférieure à celle extracellulaire, ceci va provoquer la sortie de l'eau et une déshydratation progressive de la cellule. (Stanescu M., et Birtoiu A., 2011)

Lorsque le refroidissement est effectué de manière rapide, l'eau n'a pas assez de temps pour sortir du spermatozoïde, donc elle se transforme en cristaux de glace intracellulaires, provoquant des dommages au niveau des membranes et des différents composants intracellulaires. Cependant les problèmes de déshydrations et la concentration des solutés sont moins importants lors d'un refroidissement rapide. (Almeyehu L., 2011)

IV. La récolte de la semence

C'est la première étape en vue de réaliser l'insémination artificielle. Il existe pour cela plusieurs techniques, la plus utilisée est le vagin artificiel chez toutes les espèces. Chez la jument, il est possible de recueillir le sperme directement au niveau du vagin et chez le chien par masturbation. (Deriveau J.,1989) Pour ce qui est du taureau les méthodes suivantes sont utilisées :

IV.1. Le vagin artificiel

Le rôle du vagin artificiel est de reproduire les sensations procurées au moment du coït dans les voies génitales femelles. (Rigal F., 2008) Formé par deux parties, un cylindre extérieur qui permet une isolation thermique car il est fait en caoutchouc dur et épais et comporte une ouverture qui est fermée par un bouchon. Le deuxième cylindre interne en latex ou en caoutchouc est introduit dans le cylindre externe et ses extrémités sont rabattues et maintenues par un élastique. La cavité ainsi formée est remplie d'eau de température de +41°C à 42°C, dont la pression doit être équivalente à celle du vagin de la femelle.

Une extrémité du vagin artificiel sera introduite dans le pénis après avoir mis de la vaseline, et l'autre contient un cône en caoutchouc sur lequel est adapté un tube afin de collecter le sperme. Le matériel doit être propre et bien désinfecté. L'extrémité du fourreau doit aussi être bien nettoyée avant la manipulation. L'éjaculation est rapide parfois même brutale. (Hanzen C., 2008-2009)



Figure 09 : Photo d'un vagin artificiel. <http://www.imv-technologies.com>

IV.2. L'électro-éjaculateur

Cette méthode consiste en la stimulation électrique des centres nerveux responsables de l'éjaculation avec des pulses de faibles voltages et ampérage afin de provoquer l'érection du pénis et l'éjaculation. Il est utilisé chez les animaux qui ne présentent par le coup de rein concomitant avec l'éjaculation. Réalisé sur animaux debout ou couchés. Le matériel est formé d'un stimulateur électrique et d'une sonde rectale munie d'électrodes. (Marc S., 2015)

Les impulsions électriques sont de **0.3 A** et durent **0.5** secondes, il y a des périodes de repos de **1.5** secondes. Nous mettons une quantité d'eau de **2 à 3** litres dans le rectum afin de le vider et de permettre le passage de la sonde. A l'extrémité d'un manche, il y a un appareil de récolte, formé par un entonnoir en verre ou en plastique relié à un tube collecteur. Cette méthode de récolte provoque d'une part une sécrétion urétrale très abondante d'où une concentration faible en spermatozoïdes. (Deriveaux J.,1989)

Le problème majeur de l'électroéjaculateur réside dans le fait que **25 %** des jeunes taureaux et **2 %** des taureaux âgés, de plus de deux ans, s'affaissent durant le prélèvement suite à la tétanisation des membres postérieurs.

La réalisation de l'électro-éjaculation sur des animaux anesthésiés ne donne aucun résultat. (Barcaldo M., *et al.*, 2007)



Figure 10: photo d'un électroéjaculateur. <http://pejnews.com>

IV.3. La récolte epididymaire

Technique utilisée chez les bovins, équins, canins et félins. Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît au niveau de l'épididyme chez tous les mammifères. Les spermatozoïdes alors fertiles et mobiles restent au niveau de la queue de l'épididyme. Guérin Y., *et al.*, 2003, ont effectué une récolte de semence d'un ovin en suivant le protocole suivant :

Les testicules ont été prélevés après abattage ou castration de l'animal. Une aiguille a été insérée au niveau de la lumière du canal déférent de la partie caudal de l'épididyme. Une perfusion est effectuée à l'aide de l'huile de paraffine. Le sperme est alors récolté en incisant l'épididyme au niveau de la région caudale.



Figure 11: photo représentant une collecte épидидymaire chez le bélier. (Guérin Y., *et al.*, 2003).

Ils ont également essayé de récolter de la semence en effectuant des microponctions tout le long du canal déférent mais chez des sujets plus âgés. Des petites quantités de semence ont été prélevées mais sont insuffisantes pour être congelées (Guérin Y., *et al.*, 2003).

IV.4. Le massage transrectal

Cette technique nécessite deux personnes, une pour faire le massage et l'autre pour collecter la semence. Afin de stimuler les glandes, le praticien introduit sa main dans le rectum et effectue des mouvements longitudinaux d'avant en arrière sur l'ampoule, la prostate et des fois l'urètre. Au bout de 2 à 3 minutes, s'il n'y a pas de semence, la collecte a échoué. (Rigal., 2008)

D'un côté, cette technique n'est pas douloureuse et évite la douleur engendrée par l'électro-éjaculateur mais d'un autre côté, ses inconvénients sont nombreux, parmi lesquels nous citons les suivants :

1. Le praticien doit être qualifié.
2. Cette technique ne permet pas d'évaluer la libido du taureau, sa capacité d'accouplement et l'érection du pénis.
3. La concentration de la semence en spermatozoïde peut être très variable. (Bracaldo M., *et al.*, 2007)

V. L'évaluation de la semence

Directement après la collecte, la semence est examinée afin d'évaluer la fertilité des taureaux. Les différents critères d'évaluation sont les suivants :

V.1. Les critères macroscopiques

V.1.1. Le volume

La quantité de sperme produite, varie d'une espèce à une autre, et dans la même espèce d'un individu à un autre. Elle dépend de l'état physiologique des animaux, la méthode de récolte et de la saison. Chez le taureau, le volume varie de **2** à **15** ml. (Hanzen C., 2008-2009)

V.1.2. La couleur

La couleur du sperme est normalement blanchâtre, mais il existe des variations. Nous observons parfois des semences de couleur jaunâtre, cela peut être dû à une alimentation riche en carotène, mais peut avoir aussi une cause pathologique avec présence de pus dans le sperme. Une coloration rosée traduit la présence de sang suite à une lésion de l'urètre ou de la verge. (Cabannes C., 2008)

V.1.3. La viscosité du sperme

Elle reflète la concentration en spermatozoïdes et en ions. La viscosité du sperme de taureau est de **3.7** comparée à celle de l'eau distillée qui est de **1**.

V.1.4. Le pH

Sa valeur est comprise entre **6.5** et **6.8**. La mesure du pH doit être faite directement après la récolte afin d'éviter l'acidification par l'acide lactique produit après l'utilisation de sucre.

V.2. Les critères microscopiques

V.2.1. La motilité massale

La motilité des spermatozoïdes constitue un élément important dans l'appréciation de la semence. Ce critère doit être examiné le plus tôt possible. Le sperme ne sera pas dilué et sera observé à faible grossissement. Les mouvements des spermatozoïdes donnent naissance à des vagues. Ces vagues traduisent des mouvements de réunion du spermatozoïde suivi de leur dispersion. (Derivaux J.,1989) L'examen doit être effectué avec une plaque chauffante afin d'offrir aux spermatozoïdes une température proche de la physiologique. (Cabannes C., 2008) Une classification a été attribuée selon l'intensité des vagues comme suit :

Tableau 02 : Notes des motilités individuelles des spermatozoïdes
(Cabannes C., 2008).

Nature et intensité du mouvement

-
- 0** Aucun mouvement à la surface de la goutte
 - 1** Léger mouvement à la surface de la goutte
 - 2** Mouvement net mais ne formant pas de vague
 - 3** Début de vagues
 - 4** Vagues très nettes
 - 5** Tourbillons nettement visibles

La semence de bonne qualité, présente une notation égale ou supérieure à **3**.

V.2.2. La motilité individuelle

Le test est réalisé après dilution du sperme au **1/10** avec du sérum physiologique. Le sperme sera examiné entre lame et lamelle. Ce test permet de connaître le taux de spermatozoïdes vivants. Une notation est affectée au sperme de **0** à **5**. (Kabera F., 2008)

Tableau 03 : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle

Notes	Critères
0	Aucun mouvement
1	Légers mouvements
2	Mouvements rapides
3	Mouvements très rapides
4	Mouvements fléchant
5	Tourbillon

Un sperme de bonne qualité, doit avoir au moins **60** à **70** % de spermatozoïdes vivants.

V.2.3. la concentration du sperme

La concentration représente le nombre de spermatozoïde par ml. Elle peut être calculée directement par comptage de spermatozoïde avec un hématimètre, ou indirectement par néphrométrie ou comptage électronique.

V.2.3.1. Comptage par hématimètre

Le sperme doit être dilué dans une solution de chlorure de sodium à **3** % ou solution de formaldéhyde à **1** % (solution de Hancock). Ces dernières dispersent les spermatozoïdes mais peuvent aussi les tuer. Chez le taureau le taux de dilution est généralement de **1** %.

Il existe plusieurs cellules hématimètres qui diffèrent selon la surface et la profondeur de leurs chambres de numération par exemple, Malassez, Thomas et Neubauer. La cellule de

Thomas est quadrillée en **16** grands carrés divisés en **16** petits carrés. Après dépôts d'une goutte de sperme sur la cellule de Thomas, nous allons la recouvrir avec une lame. La lecture se fera avec un grossissement **400** sur une surface qui correspond à **4** grands carrés.

Le lecteur doit prendre en considération que les têtes des spermatozoïdes situées à l'intérieur des deux lignes parallèles qui délimitent un grand carré ou les têtes qui se trouvent sur les lignes gauches et supérieures délimitant un grand carré (Hanzen C., 2008-2009).

La concentration sera calculée comme suit : $= N \times 4 \times 10 \times D$

N représente le nombre de spermatozoïdes dans 4 grands carrés.

4 parce que la surface totale des 16 grands carrés est de **1** mm²

10 parce que la hauteur des chambres de numération est de **0.1** mm

D c'est le taux de dilution.

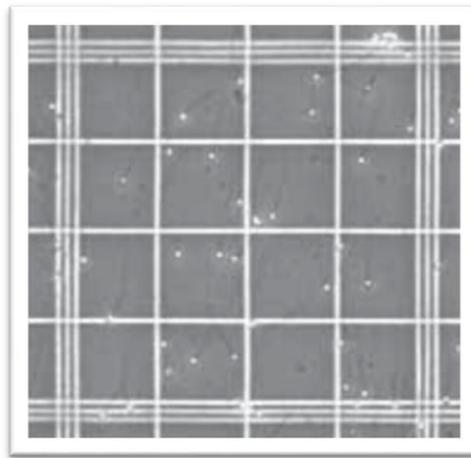


Figure 12: cellule hématimètre Neubauer (Ong F., 2010).

V.2.3.2. La néphrométrie

C'est la mesure à l'aide d'un spectrophotomètre de l'absorption d'un flux lumineux par le sperme dilué. En d'autres termes c'est la détermination de la densité optique de l'échantillon de sperme utilisé. (Derivaux J., 1989).

En pratique nous utilisons un échantillon de **20** ou **40** ul de sperme dilué dans du sérum physiologique, nous obtenons ainsi un volume final de **1** ml dans la cuvette du spectrophotomètre. Il y a une corrélation à la concentration en spermatozoïdes entre le rapport de la densité optique finale sur le rapport de la densité optique émise.

Cette méthode est très simple et ne nécessite pas un matériel cher. (Barcaldo M., *et al.*, 2007)

VI. Les examens objectifs pour l'évaluation de la semence

VI.1. le CASA (computer assisted sperma analysis)

La mobilité des spermatozoïdes est un critère très important dans l'évaluation de sa qualité. Les analyses traditionnelles de ce critère restent subjectives. Récemment, des systèmes automatisés assistés par ordinateur ou CASA ont été développés permettant des résultats plus fiables et objectifs. (Magistrini M., 1999)

Le système CASA est composé d'un microscope pour visualiser l'échantillon, une caméra numérique pour capturer des images et un ordinateur doté d'un logiciel spécialisé afin d'analyser le déplacement des spermatozoïdes. Avec ce système, les différents mouvements des spermatozoïdes sont beaucoup plus détaillés contrairement aux autres méthodes. Cependant, plusieurs facteurs sont connus pour affecter les résultats donnés par le CASA tels que le type de chambre utilisé pour l'étude de l'échantillon qui peut changer le mouvement du spermatozoïde. Une température inadéquate peut aussi modifier les résultats. Les diluants utilisés pour la cryoconservation s'avèrent aussi importants, d'ailleurs certains d'eux comme le lait et le jaune d'œuf contiennent des débris d'une taille identique à celle de la tête d'un spermatozoïde et qui seront inclus dans le système CASA. (Vincent P., *et al.*, 2012)

Le système CASA permet une mesure immédiate de la concentration d'un éjaculat ainsi que le nombre d'insémination possible à partir d'un éjaculat. Actuellement certaines machines sont équipées d'un module d'excitation UV permettant de donner le pourcentage de

spermatozoïdes vivants et morts après utilisation de sonde fluorescente vitale. Le mouvement du spermatozoïde change pendant la capacitation et l'hyper activation, le CASA nous donne une estimation détaillée de ces changements. (Agnieszka P., *et al.*, 2012)

Parmi les paramètres mesurés par le CASA, les suivants :

Tableau 04: les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes mesurés par le système CASA. (Agnieszka P., *et al.*, 2012)

Le paramètre	L'unité	La description
MOT	%	Mobilité-une population de cellules qui se déplacent à une ou au-dessous d'une vitesse minimale.
PMOT	%	Mobilité progressive-la population de cellule qui se déplacent activement vers l'avant.
VCL	µm/s	vitesse de piste - est définie comme la vitesse moyenne mesurée sur la piste réelle point à point suivi par la cellule.

VI.2. La cytométrie en flux

Au cours des dernières années, différentes sondes fluorescentes sont utilisées afin d'évaluer la semence. La fluorescence de la semence peut être estimée à l'aide d'un microscope à fluorescence ou cytométrie en flux. Cette technique permet d'évaluer différents paramètres tels que la taille des spermatozoïdes, leur forme ainsi que tous leurs composants capables d'être détectés par un fluorochrome . (Agnieszka P., *et al.*, 2012)

Le système de cytométrie en flux est composé de : fluides, système optique, système électronique et un logiciel. La suspension cellulaire passe à travers un système tubulaire exposé à un laser et recevant des lumières à des endroits particuliers. Les différentes réactions des cellules aux lumières sont enregistrées et traitées par la suite à l'aide d'un ordinateur. Pendant leur passage avec le fluide sous les lumières, les différents paramètres d'absorbance de la cellule et de diffusion de la lumière sont mis en évidence. Les marqueurs peuvent ainsi être utilisés de façon rapide sur un grand nombre de spermatozoïde afin de détecter les différents dommages dus à la congélation et décongélation. (Hossain S., *et al.*, 2011)

VII. Les agents cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs sont des produits chimiques solubles dans l'eau. En dehors de la cryobiologie, ces produits chimiques sont aussi appelés : antigels. Le mode d'action des cryoprotecteurs n'est pas clair mais semble être multifactoriels. Certaines théories disent que les cryoprotecteurs agissent dans les cellules cryoconservées en réduisant la formation de glace intracellulaire. (Steven F., *et al.*, 2007) Cette dernière propriété est due au fait que les cryoprotecteurs forment des liaisons hydrogènes avec de l'eau, la maintenant ainsi à l'état liquide. L'ajout de ces molécules dans les milieux de dilution semble être indispensable, mais peut aussi être toxique si les concentrations ne sont pas bien calculées.

Les cryoprotecteurs sont classés en deux groupes : les pénétrants et les non pénétrants.

VII.1. Les cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants sont des molécules de faibles poids moléculaires, capables de traverser la membrane cellulaire. Leur rôle est de réduire la déshydratation de la cellule ainsi que la formation de glace. (Wowk B., 2007) Parmi ces cryoprotecteurs pénétrants nous avons : le méthanol, l'éthylène glycole, le glycéroletc

Le glycérol est le cryoprotecteur pénétrant le plus utilisé.

VII.1.1. Le glycérol

Le glycérol a trois groupements hydroxyles (OH), il agit comme une membrane perméable permettant la protection de la cellule. L'ajout du glycérol produit dans un premier temps la déshydratation de la cellule à cause de l'efflux d'eau intracellulaire. (Nitira A., 2013)

D'après certaines études, malgré l'effet bénéfique du glycérol qui est la sortie de l'eau intracellulaire et l'augmentation de l'osmolarité à l'extérieur de la cellule, il peut causer une diminution de la motilité, de la fertilité et une réaction de l'acrosome précoce s'il est utilisé dans des semences à 30°C et 5°C. (Soylu M-K., 2007)

Le cryoprotecteur est ajouté à la semence avant la congélation. Au début, la cellule perd son eau et se rétrécit car elle est en présence d'un milieu hyper-osmotique. Par la suite le cryoprotecteur pénètre à travers la membrane et induit une augmentation de solutés intracellulaires d'où afflux d'eau du milieu extracellulaire. Tous ces changements de pression

osmotique peuvent créer des dommages cellulaires importants. (Areepan Sophonsritsuk MD., et Aram Rojanasakul MD., 2003)

VII.2. Les cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants sont de grosses molécules ajoutées aux solutions de dilution. Ils agissent en empêchant la formation de glace sans pénétrer à l'intérieur de la cellule. Pour les mêmes concentrations, ils sont moins toxiques que les cryoprotecteurs pénétrants. Comme exemple nous avons : le Polyethylene glycol et polyvinylpyrrolidone. (Wowk B., 2007)

Certains sucres monosaccharides semblent avoir un pouvoir cryoprotecteur vis à vis des cellules des différents mammifères. C'est le cas du D-Allose et du Tréhalose qui est un disaccharide. (Benkeddache D., 2012).

Ces substances créent une pression osmotique extracellulaire, ce qui provoque la déshydratation de la cellule avant la congélation, réduisant ainsi les dommages dus à la glace intracellulaire. Expérimentalement, certaines substances telles que la proline, la glutamine et la glycine, sont des cryoprotecteurs non pénétrant, mais ce pouvoir n'est observé qu'en présence de glycérol et de jaune d'œuf. (Abdussamad M., 2013)

Au cours des dernières **65** ans, le lait et le jaune d'œuf sont aussi utilisés dans les solutions de dilution afin de protéger les spermatozoïdes durant la congélation. Le mécanisme par lequel ces molécules protègent la cellule n'est pas encore bien compris. Le jaune d'œuf de poule est le plus couramment utilisé, cela est dû à sa disponibilité et sa facilité d'utilisation. (Manjunath P., 2012)

VII.2.1. Le jaune d'œuf

VII.2.1.1. Sa composition

Le jaune d'œuf contient des lipides **32%**, des protéines **16%**, des carbones d'hydrates à raison de **1%**, qui sont sous formes d'oligosaccharide liés aux protéines et des minéraux **1%**. (Zambrowicz A., *et al.*, 2014) La majorité des protéines du jaune d'œuf sont sous formes de lipoprotéines, il y a deux catégories : les LDL (low density lipoprotein) et HDL (high density lipoprotein). D'autres composants ont été identifiés tels que la lipovitelline, phosvetine livetine et immunoglobuline. (Himali S., *et al.*, 2011)

Les lipides renferment principalement des triglycérides, phospholipides et cholestérol. (Abdou A-M., *et al.*, 2013)

VII.2.1.2. Le jaune d'œuf et la conservation de la semence

Le jaune d'œuf a été utilisé pendant longtemps pour la conservation des spermatozoïdes des mammifères. Dans les milieux de dilution, il est utilisé à une concentration de **20%**. Ses effets bénéfiques sur la semence ont été mis en évidence pour la première fois en **1939** par Philips. (Faward U-R., *et al.*, 2013) C'est l'un des cryoprotecteur non pénétrant les plus utilisé et commercialisé. Il s'est avéré que son ajout dans les milieux de dilution protégeait les cellules du choc thermique et augmentait ainsi les fonctions du spermatozoïde et sa fertilité après conservation sous forme liquide ou congelé. (Bergeron A., *et al.*, 2003)

Le mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'œuf n'est pas encore très clair. Dans les années **60**, son rôle dans la protection de la membrane plasmique et acrosomal lors de températures basses a été attribué aux phospholipides, au cholestérol et à la LDL (Anaud M., 2014).

Cependant, l'utilisation du jaune d'œuf durant la conservation de la semence a été limitée dans certains pays. Cela est dû aux risques immunologiques et hygiéniques engendrés par cette substance d'origine animale. Le jaune d'œuf outre le fait qu'il protège le spermatozoïde durant la conservation, il contient des éléments qui interfèrent avec le métabolisme du spermatozoïde et ont un effet néfaste sur la respiration et la mobilité de ces derniers. (Chaudhari D-V., *et al.*, 2015)

Afin d'assurer la biosécurité, le jaune d'œuf a été remplacé par d'autres substances d'origines végétales tels que la lécithine de soja. Cette dernière est une source importante de phospholipides pour le spermatozoïde durant la conservation. Utilisée à une concentration de **25%** dans les milieux de dilution, elle protège la membrane plasmique et acrosomal du spermatozoïde et améliore sa mobilité. (Faward U-R., *et al.*, 2013)

Certaines études se sont plutôt intéressées à la fraction du jaune d'œuf responsable de la protection des cellules lors de températures basses et de son extraction. Ces effets bénéfiques ont largement été attribués aux lipoprotéines de faible densité (LDL) contenues dans le jaune d'œuf. (Akal E., *et al.*, 2014)

VII.2.2. La lipoprotéine de faible densité (LDL)

La lipoprotéine de faible densité est la protéine majeure du jaune d'œuf, d'ailleurs elle représente **70%** des protéines. Elle est caractérisée par sa capacité émulsifiante. (Abdou A-M., *et al.*, 2013) Elle contient **11 à 17%** de protéines et **83 à 89 %** de lipides. Elle est formée de molécules sphériques, les lipides et les triglycérides sont dans le noyau entourés de protéines. (Faward U-R., *et al.*, 2013) La densité de la LDL est de **0.982 g/ml**. (Akal E., *et al.*, 2014)

VII.2.2.1. Mécanisme d'action de la LDL

Durant le processus de conservation de la semence et après décongélation, la fertilité et la mobilité des spermatozoïdes sont affectées. Pace et Graham en **1974**, démontra que les lipoprotéines de faible densité contenues dans le jaune d'œuf avaient un effet cryoprotecteur. Le mécanisme d'action de la LDL n'est pas très clair et plusieurs hypothèses sont alors apparues. (Simonik O., *et al.*, 2013)

L'un des mécanismes inclue les BSP du plasma séminal. Ces dernières ont un effet bénéfique sur la fertilité des spermatozoïdes et interviennent durant le processus de capacitation en participant à la modification des lipides au niveau de la membrane plasmique. Lorsque les spermatozoïdes sont conservés, les BSP deviennent néfastes en stimulant l'efflux de cholestérol et de la choline phospholipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Manjunath a mis en évidence la liaison des BSP aux LDL lors de cryoconservation car ces dernières contiennent des phospholipides choline. La LDL a une forte capacité de liaison avec les BSP, cette interaction est stable pendant le processus de congélation-décongélation. (Manjunath P., *et al.*, 2012)

Bergeron et son équipe, ont démontré que la présence de la LDL dans le milieu de dilution, diminuait de **50 à 80%** la liaison des BSP à la membrane plasmique des spermatozoïdes. En l'absence de cette molécule ou du jaune d'œuf, l'efflux de cholestérol et de phospholipides est toujours observé dans une semence conservée à **+4°C** pendant **24H**.

Lusignan M-C., *et al.*, en 2011, ont étudié la thermodynamique de l'interaction LDL-BSP. La protéine utilisée est la BSP 1 car c'est la plus abondante dans le plasma séminal. Les résultats ont laissé supposer que les phospholipides cholines de la LDL sont les sites de liaison avec la BSP1. Il a été estimé qu'une molécule de LDL pouvait se lier à **104** molécules de BSP.

Graham et Foote en 1987, ont supposé que la LDL est une source de phospholipides pour les spermatozoïdes. C'est-à-dire que la LDL protège ces derniers en remplace les phospholipides perdus lors de la cryoconservation.

Nous pouvons aussi supposer que lors de cryoconservation, les apoprotéines qui signifient la partie protéique de la LDL, se gélifient et forment un film protecteur autour de la membrane plasmique des spermatozoïdes, prévenant ainsi les effets néfastes des cristaux de glace intracellulaires. (Hu J-H., *et al.*, 2005)

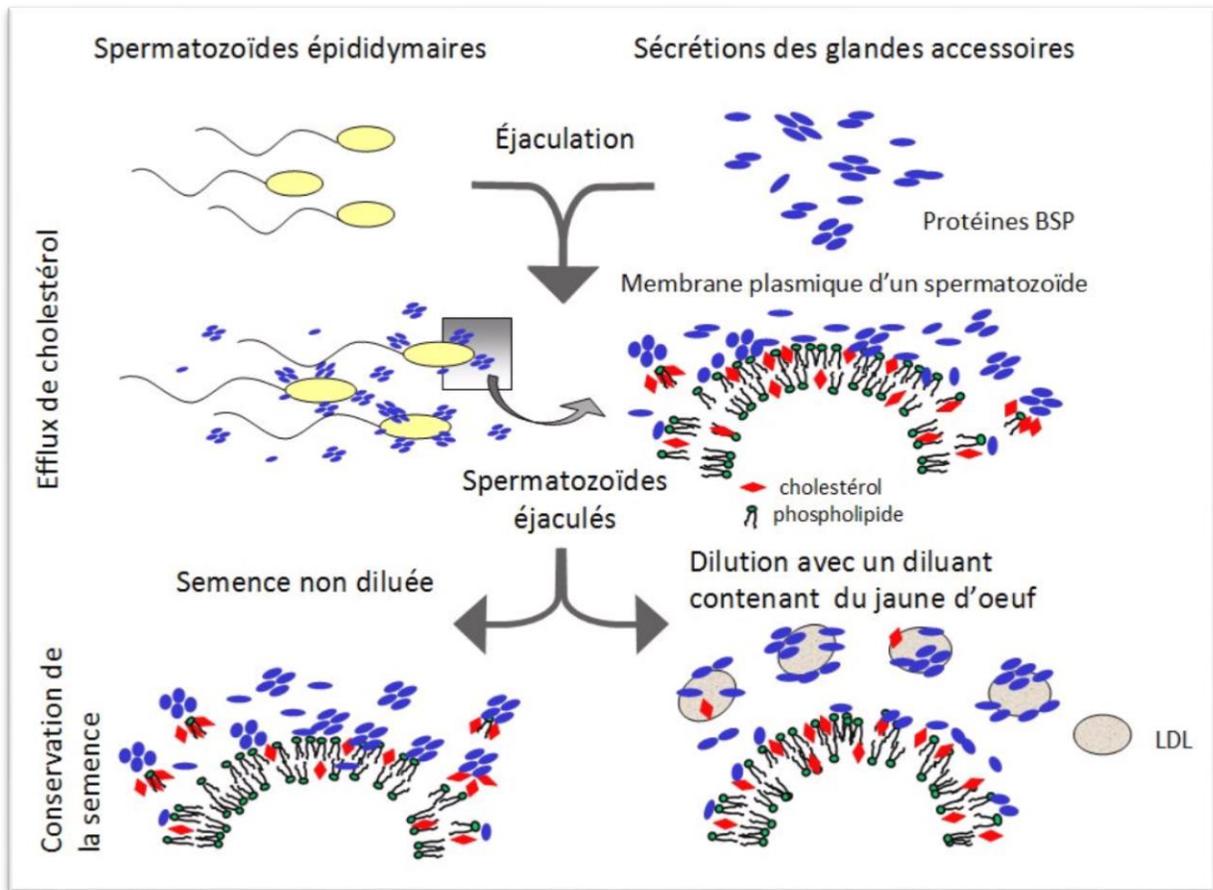


Figure 13 : schéma représentant le mécanisme d'action de la LDL. (Manjunath P., *et al.*, 2002)

VII.2.2.2. La LDL et la spécificité d'espèces

VII.2.2.2.1. Le macaque rhésus

La cryoconservation de la semence du macaque avec de la LDL, n'a pas de meilleurs effets sur la motilité après la décongélation que lors de l'utilisation de **20%** de jaune d'œuf. La LDL utilisée à une concentration de **6 à 10 %** donne des résultats identiques comparé à un milieu de dilution à base de jaune d'œuf et en présence de glycérol. Cependant la concentration de la LDL efficace pour la protection de la semence du macaque varie selon la présence ou l'absence de cryoprotecteur pénétrant. (Dong Q-X., *et al.*, 2011)

VII.2.2.2.2. Le chien

L'étude de l'effet de la LDL sur la semence du chien a été faite pour la première fois en **2008**. Le remplacement du jaune d'œuf par de la LDL a donné de meilleurs effets sur la motilité et l'intégrité de la membrane plasmique après décongélation de la semence. Lors de réfrigération, l'utilisation de la LDL a permis de conserver les spermatozoïdes avec une motilité allant jusqu'à **50 %** pour des périodes plus longues. (Varela Junior A-S., *et al.*, 2008)

VII.2.2.2.3. Le porc

L'utilisation de la LDL à une concentration de **9%** dans les milieux de dilution, a abouti à des résultats très significatifs après décongélation de la semence. La LDL peut remplacer le jaune d'œuf avec de meilleurs résultats en termes de mobilité et d'intégrité de la membrane plasmique et acrosomal des spermatozoïdes. (Hu J-H., *et al.*, 2005)

VII.2.3. Le lait

Le lait entier est constitué d'eau **87,5 %**, de protéines **3.2 %**, de sucres **4,6 %**, de lipides **3,7 %** et de minéraux **0.8 %**. (Salmon M-V., 2015)

Le lait entier et écrémé c'est-à-dire ne contenant pas de lipides sont utilisés pour la conservation des semences à **+4°C**, ou pour la congélation mais en présence de glycérol. L'absence de lipides dans le lait écrémé n'a pas d'impact sur la conservation de la semence, cela prouve que le mécanisme d'action du lait ne fait pas intervenir les lipides ou les lipoprotéines contrairement au jaune d'œuf. Les composants du lait responsables de la protection des spermatozoïdes durant la conservation semblent être les caséines, ces dernières représentent la

majorité des protéines du lait (27 g/L de la totalité des protéines du lait). Le mécanisme d'action des caséines est identique à celui de la LDL, c'est-à-dire qu'elles interviennent en séquestrant les BSP du plasma séminal empêchant ainsi leurs effets délétères. D'autres mécanismes peuvent exister mais ne sont pas encore mis en évidence. (Bergeron A., 2007)

VIII. Jaune d'œuf et lait : résultats comparés

Les deux diluants non pénétrants d'origine animale sont utilisés pour la conservation des semences des différentes espèces animales. Leurs mécanismes d'action ne sont pas encore bien expliqués, cependant des hypothèses sont apparues.

Le point en commun entre les caséines du lait et les LDL du jaune d'œuf est qu'elles protègent les spermatozoïdes durant la conservation en séquestrant les BSP du plasma séminal qui s'avèrent néfastes durant la conservation. La liaison entre les BSP et ces deux diluants est stable durant toute la conservation. Un autre point en commun est étant donné que les deux molécules sont d'origine animale, elles présentent un risque de transmission bactériologique.

La différence entre le lait et le jaune d'œuf est que dans le cas du lait la protection se fait avec une interaction protéine-protéine c'est-à-dire entre les caséines et les BSP. Pour ce qui est du jaune d'œuf la nature de l'interaction est lipoprotéine-protéine (LDL-BSP). Les travaux de Lusignan M-F, Bergeron A, Lafleur M et Manjunath P, ont rapporté que l'interaction entre les protéines du lait et les BSP est d'affinité plus faible que celle entre la LDL et Les BSP. Cependant pour que le lait puisse donner le même résultat que le jaune d'œuf, il doit être utilisé à une quantité dépassant le double de la quantité de la LDL. Le lait est généralement utilisé chez les espèces dont le plasma séminal contient une faible quantité de BSP. Certains auteurs disent qu'une quantité de 20 % de jaune d'œuf séquestre beaucoup de BSP menaçant ainsi la fécondité des spermatozoïdes (Lusignan M-F., *et al.*, 2011).

Travaux
&
résultats personnels

I. Introduction

La conservation de la semence bovine dans de l'azote liquide et l'utilisation du glycérol ont permis la disponibilité de la semence et ont optimisé l'insémination artificielle. Durant les dernières années, les méthodes de conservation ont connu une amélioration remarquable. L'utilisation de nouvelles molécules afin de conserver le sperme dans de basses températures a donné de meilleurs résultats pour ce qui est de la préservation de la qualité du sperme et par conséquent une élévation du taux de réussite de l'insémination artificielle.

Notre présent travail a pour objectif en premier lieu l'extraction de la Low Density Lipoprotein (LDL) à partir du jaune d'œuf. En second lieu l'utilisation de la LDL à **8%** dans un milieu de réfrigération à **+4°C** de la semence bovine et la comparaison des résultats obtenus avec un autre protocole à base de jaune d'œuf à **20%**.

II. Matériels et Méthodes

Notre partie expérimentale a eu lieu au niveau du laboratoire de physiologie de la reproduction de l'école nationale supérieure vétérinaire.

II.1. Les matières premières

II.1.1. le sperme

Le travail a été effectué sur de la semence bovine d'origine épидидymaire. Les testicules proviennent de taureaux abattus au niveau de l'abattoir d'El Harrach et de Boufarik. Nous avons au préalable au total, prélevé pas moins de 07 testicules, mais en raison de la qualité médiocre de certaines semences candidates, seuls 03 furent retenus pour l'expérimentation.

Afin d'assurer une comparaison significative entre le milieu à base de la LDL et celui à base de jaune d'œuf, nous avons procédé à la répétabilité de l'étude sur trois testicules.

Toutes les manipulations faites durant cette expérimentation sont identiques pour les trois testicules.

II.1.1.1. La collecte de la semence

La méthode utilisée est le « flushing retrograde » c'est-à-dire le rinçage épидидymaire. Le testicule a été tout d'abord rincé avec de l'eau pour éviter toute contamination, une incision nette au niveau du côté opposé de l'épididyme est effectuée avec une lame de bistouri préalablement montée sur un manche. Le testicule est alors déshabillé de sa vaginale. Afin de séparer le complexe épидидymaire du testicule, nous avons fait à une boutonnière entre le testicule et le corps de l'épididyme.



Figure 14: Testicule dénudé de sa vaginal cliché personnel

Le complexe épидидymaire est séparé du testicule, le canal défèrent est individualisé et débarrassé de toute la gaine qui l'entoure afin d'éviter sa rupture sous la pression du liquide de rinçage.



Figure 15: Les épидидymes séparés de leurs testicules (clichés personnels)



Figure 16: L'individualisation du canal défèrent

Avec une aiguille, nous avons enlevé le contenu des vaisseaux se trouvant au niveau de la queue de l'épididyme pour que la semence ne soit pas contaminée.

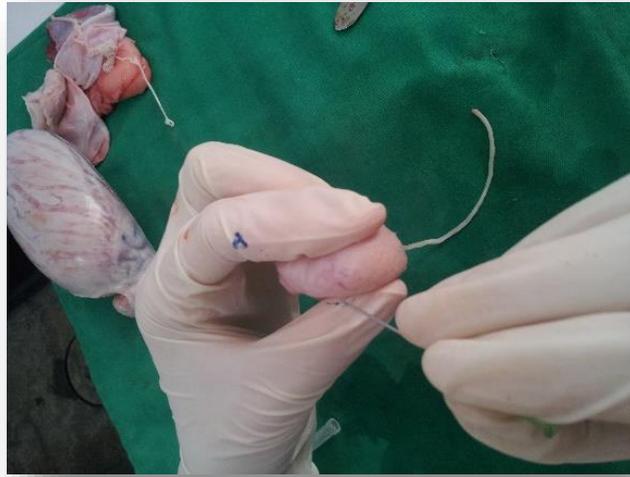


Figure 17 : l'enlèvement des vaisseaux sanguins
Cliché personnel

Nous procédons ensuite à une ponction du canal déférent au niveau de sa partie la plus proximale à l'aide d'une aiguille épicroânienne montée sur une seringue.



Figure 18: La ponction du canal déférent (Cliché personnel)

L'aiguille est clampée à l'aide d'une pince pour ne pas se détacher du canal déférent. La seringue contient **1 cc** de solution A et **2 cc** d'air dans le but de pousser le liquide vers la queue. Nous exerçons une pression constante en vérifiant au fur et à mesure l'intégrité du canal déférent et le gonflement des tubes séminifères suite au remplissage avec le liquide.

Nous allons effectuer une incision avec la lame de bistouri au niveau de la queue de l'épididyme, la semence sera récoltée dans un eppendorf.



Figure 19 : La collecte de la semence au niveau de la queue de l'épididyme



Figure 20 : Composants de la solution A.

La solution A a été préparée comme suit : avec une balance de précision, nous avons pesé : **3,028g** de Tris (hydroxy méthyleAmino-méthane), **1,70g** d'acide citrique monohydrate et de **1,25 g** de Fructose. Ces molécules seront diluées dans **100mL** d'eau distillée.

II.1.2. La Low Density Lipoprotein (LDL)

Son extraction

Avant de commencer la manipulation allumer la centrifugeuse et la mettre à +4°C.

1. Casser les œufs et les rouler dans du papier Joseph afin d'enlever le maximum de blanc ;
2. Ponctionner au moyen d'une aiguille stérile la surface du jaune d'œuf et aspirer ce dernier dans un Becher ;
3. Peser le jaune d'œuf récupéré et ajouter le même poids de NaCl à **0.17** mol/l ;
4. Agiter pendant une heure à +4°C ;
5. Mettre la solution (jaune d'œuf + NaCl) dans des tubes de centrifugation puis centrifuger à **10,000g** pendant **45** minutes ou à **7,000** pendant **50** minutes à +4°C ;
6. Eliminer le culot et récupérer le surnageant, recentrifuger ce dernier à **10,000g** pendant une heure à +4°C ;
7. Après centrifugation, récupérer le mélange dans un Earlen Mayer (Afin d'évaluer le volume) ;
8. Verser le surnageant dans un becher en cours d'agitation magnétique et rajouter délicatement le sulfate d'Ammonium (**205g/l**) puis laisser agiter pendant une heure à +4°C ;
9. Centrifugation à **7,000** g pendant une heure ;
10. Préparer les membranes de dialyse (les mettre dans un Becher contenant de l'eau distillée et mettre au micro-onde pendant **10** minutes environ afin de pouvoir ouvrir le film) ;
11. Verser le surnageant à l'intérieur de la membrane de dialyse et clipper le bout ouvert ;
12. Mettre le tout dans un Earlen Mayer contenant de l'eau distillée et mettre dans un agitateur, le tout dans un réfrigérateur à +4°C pendant **24** h en changeant l'eau distillée chaque **2** h ;
13. Aux termes des **24** h, nous remarquerons deux zones de couleurs différentes dans la membrane de dialyse, orange ou jaune ;
14. Verser le contenu dans des tubes de centrifugation et centrifuger **7,000** g pendant une heure à +4°C.

II.1.3. Le jaune d'œuf

Nous avons incisé la membrane vitelline avec une aiguille afin d'éviter qu'elle soit en contact avec le jaune d'œuf car elle a des propriétés spermicides. A l'aide d'une aiguille, nous avons collecté le jaune d'œuf.

II.2. L'évaluation de la qualité de la semence avant conservation

II.2.1. Evaluation macroscopique

L'évaluation macroscopique renferme l'évaluation du volume, de la couleur et du pH de la semence. Chez un taureau en bonne santé le volume de la semence varie de **2** à **15** ml. La couleur est blanche et le pH est entre **6.5** à **6.8**.

Nous avons évalué dans notre travail les trois paramètres.

II.2.2. Evaluation microscopique

Elle renferme la mobilité massale, individuelle et la concentration.

II.2.2.1. La mobilité massale

Doit être observée sur du sperme pur et directement après la collecte car il est très sensible à la lumière. Nous déposons une goutte de semence sur une lame chauffée à **37°C** et nous observons sous grossissement **100**. Le mouvement des vagues est évalué sur une échelle de **0** à **5**.

- 0** Aucun mouvement à la surface de la goutte.
- 1** Leger mouvement à la surface de la goutte.
- 2** Mouvement net mais ne formant pas de vague.
- 3** Début de vagues.
- 4** Vagues très nettes.
- 5** Tourbillons nettement visibles.

II.2.2.2. La mobilité individuelle

La semence est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ avec la solution A. Nous avons mélangé **10ul** de sperme avec **90ul** de solution A. La dilution permet au spermatozoïde une meilleure amplitude des mouvements. L'évaluation se fait entre lame chauffée à $+37^{\circ}\text{C}$ et lamelle, nous observons plusieurs champs à grossissement **40** afin d'évaluer la mobilité individuelle. L'échelle de notation va de **0** à **5**.

- 0** aucuns mouvements
- 1** Légers mouvements
- 2** Mouvements rapides
- 3** Mouvements très rapides
- 4** Mouvements fléchant
- 5** Tourbillons

II.2.2.3. La concentration

Pour le calcul de la concentration, nous avons utilisé une lame de comptage cellulaire qui est la cellule malassez. Cette dernière est composée d'une lame de verre épaisse, formée au centre d'un quadrillage correspondant à la zone de comptage. Nous observons au niveau de la lame des rectangles divisés chacun en **20** carrés.

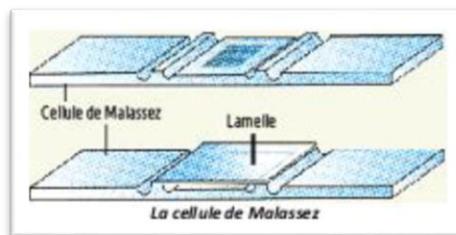


Figure 21: Schéma représentant la cellule Malassez.

Nous allons diluer la semence à $1/200$ avec du formol à **3.5%**, c'est-à-dire **10ul** de semence fraîche avec **1990ul** de formol. Ce dernier agit en fixant les spermatozoïdes. Le dénombrement des spermatozoïdes se fait sous microscope optique au grossissement **40**. Nous

avons compté les spermatozoïdes dans **2** lignes de carré d'un rectangle c'est-à-dire **10** carrés. Nous avons utilisé la formule suivante pour calculer la concentration du sperme :

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Nombre de spz} \times \text{le taux de dilution}}{\text{Nombre de carrés} \times \text{volume du carré}} \text{ SPZ/mm}$$

Le volume du carré = $5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$

Taux de dilution = **200** ($10 \mu\text{l} / 2000 \mu\text{l}$)

Nombre de carré = **10**

$1 \text{ mm}^3 = 10^{-3} \text{ ml}$

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Nombre de spz} \times 200}{10 \times 5 \times 10^{-4} \times 10^{-3} \text{ ml}} = \text{Nombre SPZ} \times 0.04 \times 10^9 \text{ SPZ/ml}$$

II.3. Calcul de taux de dilution

Après collecte, évaluation macroscopique et microscopique de la semence, nous allons calculer le nombre de dilution. Cette manœuvre permet de fractionner l'éjaculat et d'apporter les substances nutritives nécessaires.

La dilution vise à obtenir une dose d'insémination artificielle zootechniquement acceptable chez les bovins qui est de **10** à **20** millions de spermatozoïdes par paillète de **0.25** ml, soit 80 millions de spermatozoïdes par 1ml. Pour le calcul du nombre de dilution, nous allons procéder comme suit :

$$\text{Taux de dilution} = \frac{\text{Concentration de la semence fraîche}}{\text{Concentration recherchée}}$$

Le nombre de dilution est : Testicule n°1 : **5** Testicule n°2 : **5.62** et Testicule n°3 : **3**

II.4. Composition des milieux

Notre expérimentation s'est portée sur trois milieux de réfrigération qui sont :

Le milieu témoin.

Le milieu à base de 20% de jaune d'œuf.

Le milieu à base de 8% de LDL.

	La solution A	Le jaune d'œuf	La LDL
Le milieu témoin	40 ml	--	--
Le milieu à base de 20% de jaune d'œuf	40 ml	8 ml	--
Le milieu à base de 8% de LDL	40 ml	--	3.6 ml

Nous avons fractionné chacun de ces milieux en **12** eppendorfs étiquetées afin de faciliter l'évaluation de la semence dans différentes heures. Après avoir ajouté le sperme dans les eppendorfs, nous avons fait passer au vortex puis au réfrigérateur à +4°C.



Figure 22 : Eppendorfs étiquetés.

Cliché personnel

II.5. Les tests après conservation

Nous avons effectué des évaluations à H0, H12, H24, H36, H48, H60, H72, H84, H96, H108, H132, H144 pour les trois milieux.

Les examens utilisés pour analyser la qualité de la semence après conservation sont : la mobilité massale, le test HOST et le test à l'éosine. Avant chaque examen les eppendorfs sont vortexer afin d'homogénéiser le contenu.

II.5.1. La motilité massale

La motilité massale a été examinée en mélangeant une goutte de sperme avec une goutte de la solution A afin de procurer aux spermatozoïdes une source d'énergie qui est le fructose. L'évaluation se fait de la même façon décrite pour la semence avant la conservation.

II.5.2. Le Test HOST

Créé pour la première fois par Jeyendran en 1984, ce test a pour objectif l'évaluation de la fonction et de l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes chez l'être humain. Chez l'homme et différentes autres espèces, les spermatozoïdes se gonflent en présence d'un milieu hypo-osmotique, ceci est dû à l'afflux d'eau et l'expansion de la membrane plasmique. (Jeyendran R-S., *et al.*, 1984)

Ce test est basé sur la semi perméabilité de la membrane plasmique. L'exposition d'un spermatozoïde avec une membrane plasmique intacte à un milieu hypo-osmotique conduit au gonflement de la queue, ce qui veut dire que le passage de l'eau à travers la membrane plasmique se fait normalement. (Zekariya N., *et al.*, 2005)

Les spermatozoïdes morts, connaissent un gonflement incontrôlé de la queue avec un redressement de cette dernière. En d'autres termes, les spermatozoïdes morts ne réagissent pas au test. Cependant le test HOST a des limites, ceci est expliqué par le fait que même un spermatozoïde vivant peut avoir une membrane plasmique non fonctionnelle. (Sergey I., *et al.*, 2013)

Dans notre expérimentation nous avons dilué la semence à $1/10^{\text{ème}}$ avec du NaCl, par la suite nous avons incubé pendant à 37°C dans un bain marie pendant **45** minutes. Les spermatozoïdes sont observés entre lame et lamelle au grossissement **40**.

Nous avons calculé **50** spermatozoïdes (morts et vivants) dans **6** champs différents de la lame. Pour obtenir le % des spermatozoïdes vivants nous avons appliqué l'équation suivante :

$$\% \text{ de spz vivants} = (n \times 100) / 200$$

n : nombre de spermatozoïdes vivants repérés.

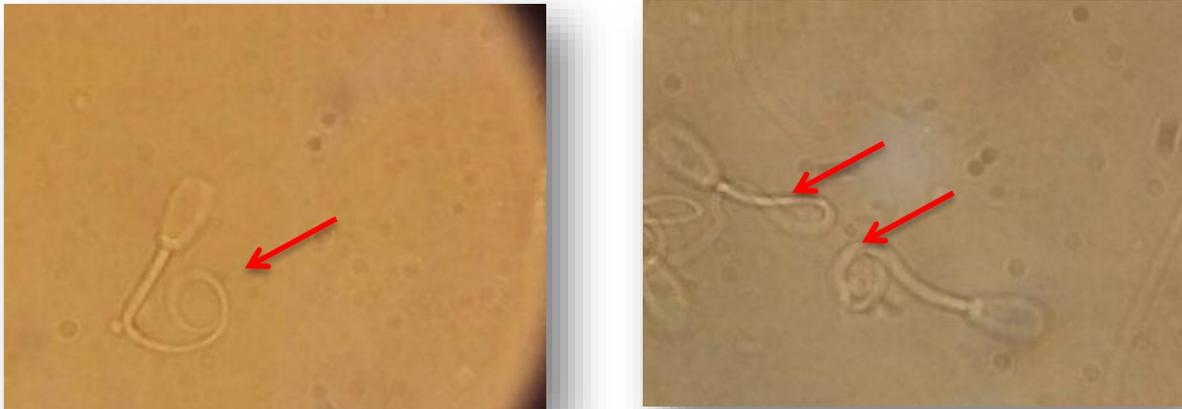


Figure 23: Spermatozoïde vivants (Flagelles en queue de cochon) lors du test HOST
(Clichés personnels).

II.5.3. Le test à l'éosine

La coloration à l'éosine permet de déterminer le pourcentage des spermatozoïdes morts et vivants. La membrane d'un spermatozoïde vivant est intacte donc imperméable au colorant, par contre celle d'un spermatozoïde mort laisse pénétrer le colorant à l'intérieur de la cellule lui conférant ainsi une coloration rose.

Nous allons faire le test en étalant une goutte de sperme avec une goutte de l'éosine à **0.5%** sur lame recouverte par une lamelle et nous allons observer sous microscope optique au grossissement **40**.

Par la suite, nous dénombrerons **50** spermatozoïdes vivants et morts dans **4** champs différents et nous calculerons comme suit :

$$\% \text{ de spz vivants} = (n \times 100) / 200$$

n : nombre de spermatozoïdes vivants repérés.



Figure 24: Révélation de la mort des spermatozoïdes par le test de viabilité à l'éosine.

(clichés personnels)

III. Résultats

III.1. Résultats d'extraction de la LDL

A l'issue de la réalisation du laborieux protocole d'extraction de la LDL, nous avons pu obtenir un produit final d'une pureté avoisinant les 85%, cette pureté a été évaluée par spectrophotométrie.

III.2. Résultat de l'évaluation de la semence avant conservation

Après plusieurs collectes, nous n'avons retenu que la semence provenant de trois testicules, le reste des tentatives était voué à l'échec en raison, d'une part, de l'immaturation des mâles desquels étaient prélevés les testicules et, d'autre part, de l'évaluation défavorable de la semence prélevée dans certains testicules. Les tableaux résumés les résultats obtenus pour les trois testicules.

III.2.1. L'évaluation macroscopique

Rappelons que les paramètres d'évaluation macroscopique du sperme sont le volume, le pH, la couleur et l'odeur. Nous avons jugé important de ne garder, pour notre expérimentation, que les testicules répondant à une bonne évaluation, car ce faisant, nous écartons le facteur individuel, de la variabilité hypothétique des résultats.

Tableau 05 : Résultats de l'évaluation macroscopique des semences collectées.

	Testicule n°1	Testicule n°2	Testicule n°3
Volume (ml)	1.5	0.8	1.5
pH	6.6	6.8	6.4
Couleur	Blanc ivoire		

III.2.2. L'évaluation microscopique

D'entre les testicules retenus, certains ont été évalués favorablement aux paramètres macroscopiques mais ont été rejetés à l'évaluation microscopique car, d'emblée, les spermatozoïdes ne montraient aucun mouvement témoignant d'une faible viabilité ou d'un taux de spermatozoïdes morts trop important.

Tableau 06: Résultats de l'évaluation microscopique des semences collectées.

	Testicule n°1	Testicule n°2	Testicule n°3
La mobilité massale	5	5	4.5
La mobilité individuelle	5	5	5
La concentration (spz/mL)	400X 10⁶	450 X 10⁶	240 X 10⁶

III.3. Résultats après conservation

Après réfrigération et évaluation des trois semences, nous avons fait une étude statistique pour chaque essai et dans chaque milieu de réfrigération.

III.3.1. Approche par essai

Pour chaque essai, nous avons évalué la qualité de la semence en utilisant trois paramètres: la mobilité individuelle, le test HOST et le test à l'éosine. Cette appréciation s'est faite pour chaque essai dans les trois milieux de réfrigération à différentes heures : H0, H12, H24, H36, H48, H72, H84, H96, H108, H120, H132, H144. Les résultats sont présentés dans des courbes comme suit.

III.3.1.1. Résultats du premier essai

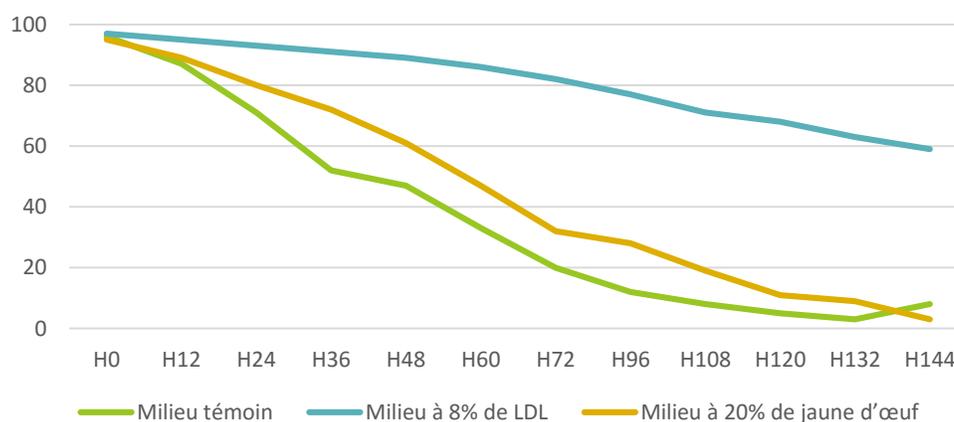


Figure 25: Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°1 lors du **test HOST**, dans les trois milieux et en fonction des heures.

Nous constatons une diminution du % de spz vivants pour le milieu témoin à partir de **H12**, ce qui est le cas aussi pour le milieu à **20%** de jaune d'œuf. Le milieu à **8%** de LDL reste plus ou moins stable. A **H72**, le % de spz vivants dans le milieu témoin est de **20%** et de **32%** dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf. Dans le milieu à **8%** de LDL, à **H72** le % de spz vivants est de **82%**.

A **H144**, le milieu témoin renferme **0.8%** de spz vivants, le milieu à **20 %** de jaune d'œuf **3%** et le milieu à **8%** de LDL **59%**.

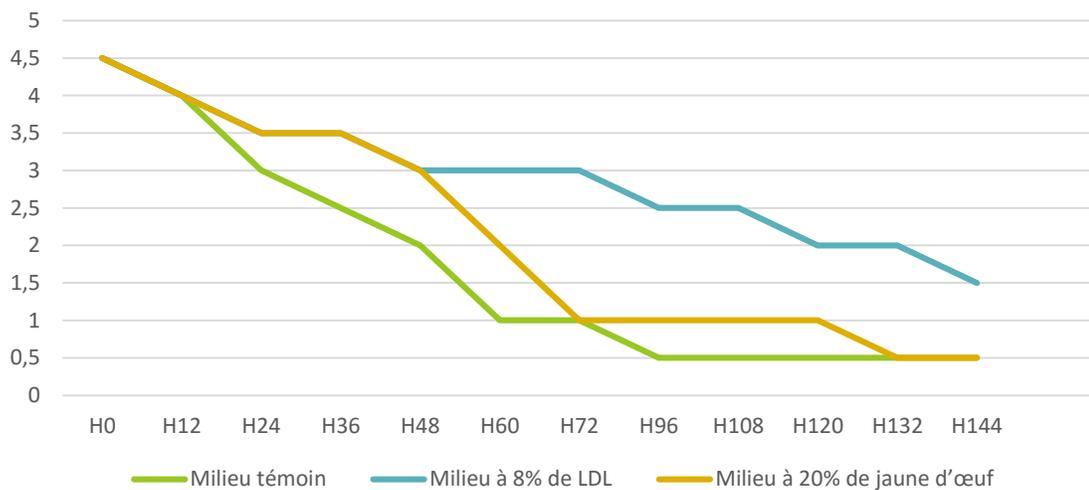


Figure 26 : Courbes qui représentent l'évolution de la **motilité individuelle** de l'essai n°1 dans les trois milieux et à différentes heures.

La motilité individuelle du milieu témoin à **H60** est de **1**. Tandis que celle du milieu à **20%** de jaune d'œuf est de **2** mais régresse de manière plus rapide dans les heures qui suivent. Dans le milieu à **8%** de LDL, la motilité individuelle diminue mais de manière lente par rapport aux autres milieux d'ailleurs de **H48** à **H72** elle est de **3**.

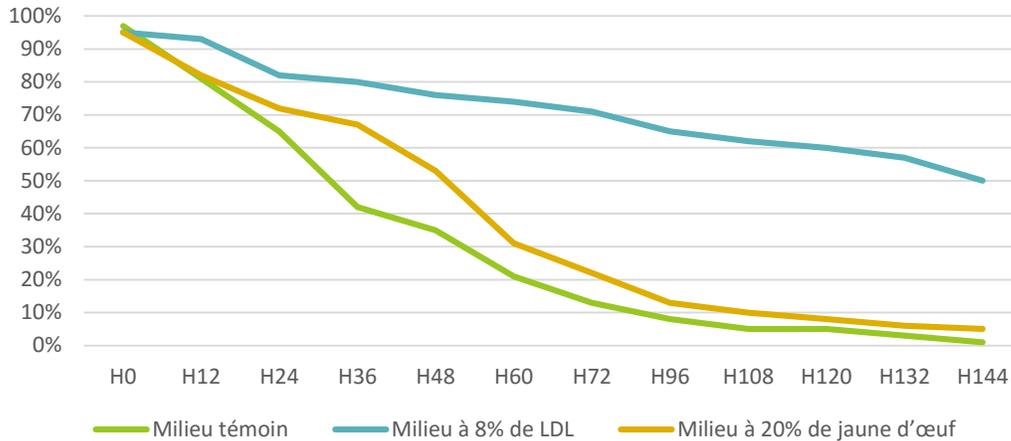


Figure 27: Courbes qui représentent l'évolution des résultats de l'essai n°1 au test à l'éosine dans les trois milieux et à différentes heures.

Nous constatons une diminution de la viabilité dans le milieu témoin et qui est plus marquée que dans le milieu à 20% de jaune d'œuf. Dans le milieu à 8% de LDL, la diminution de la viabilité est légère, d'ailleurs de H0 à H144, elle est supérieure à 50%.

III.3.1.2. Résultats du second essai

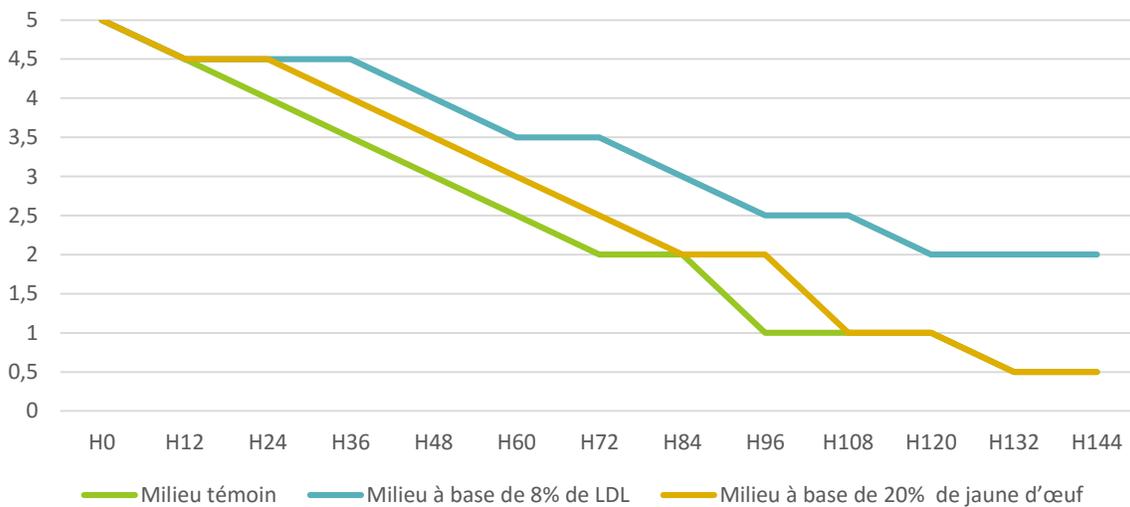


Figure 28: Courbes qui représentent l'évolution de la motilité individuelle de l'essai n°2 dans les trois milieux et à différentes heures.

De H0 à H12, l'évolution de la motilité individuelle est identique pour les trois milieux, elle régresse par la suite dans le milieu témoin et le milieu à base de 20% de jaune d'œuf. Le

milieu à base de **8%** de LDL préserve une meilleure motilité individuelle par rapport aux autres milieux durant les différentes heures.

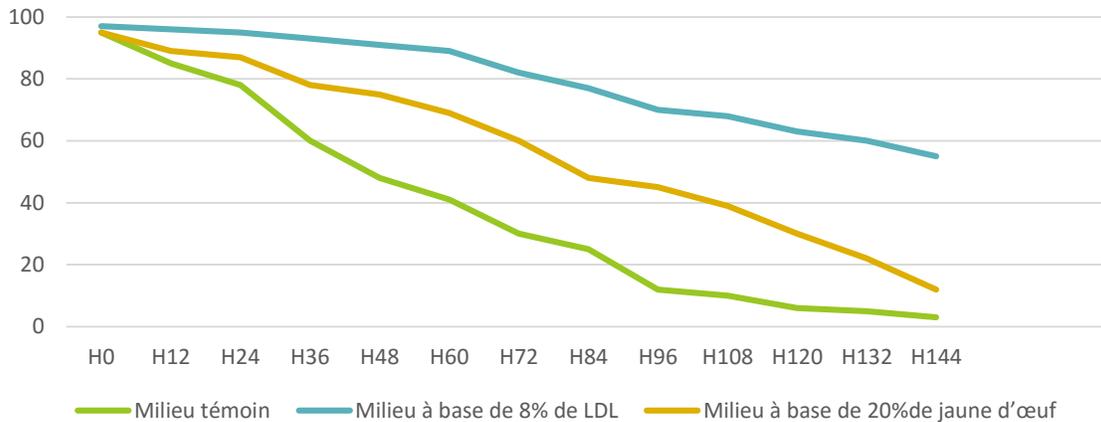


Figure 29 : Courbes qui représentent l'évolution des résultats de l'essai n°2 au **test à l'éosine** dans les trois milieux et à différentes heures.

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants est plus important dans le milieu à **8%** de LDL que dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf. Dans le milieu témoin, le % diminue de manière rapide et atteint à **H72 30%**. Dans le milieu à **8%** de LDL, nous avons **82%** de spermatozoïdes vivants à **H72** et **60%** dans le milieu à 20% de jaune d'œuf.

A **H144**, dans le milieu témoin le % des spermatozoïdes vivants est de **3%**, dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf, il est de **12** et dans le milieu à **8%** de LDL, la viabilité est supérieure à **50%**.

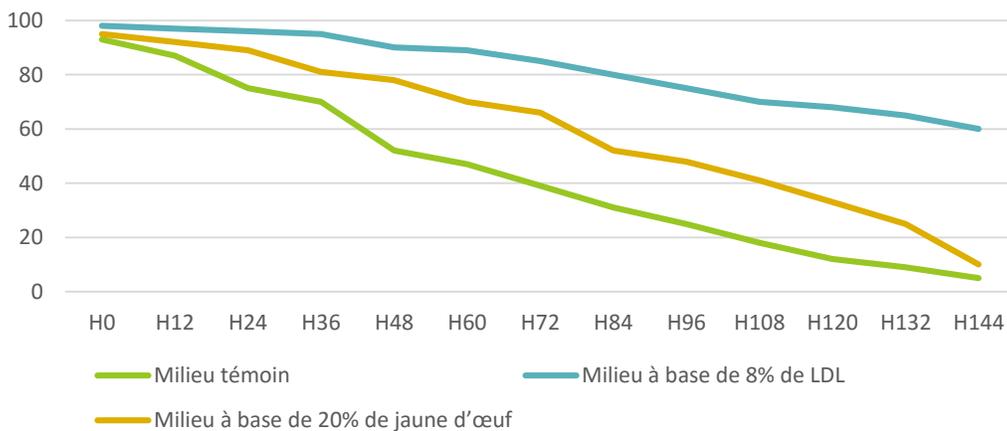


Figure 30 : Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°2 lors du **test HOST**, dans les trois milieux et en fonction des heures.

Les résultats au test HOST sont variables entre les trois milieux. A **H144**, dans le milieu à **8%** de spermatozoïdes, nous avons **60%** de spermatozoïdes vivants contrairement aux autres milieux ou le % est inférieur ou égale à **10%**.

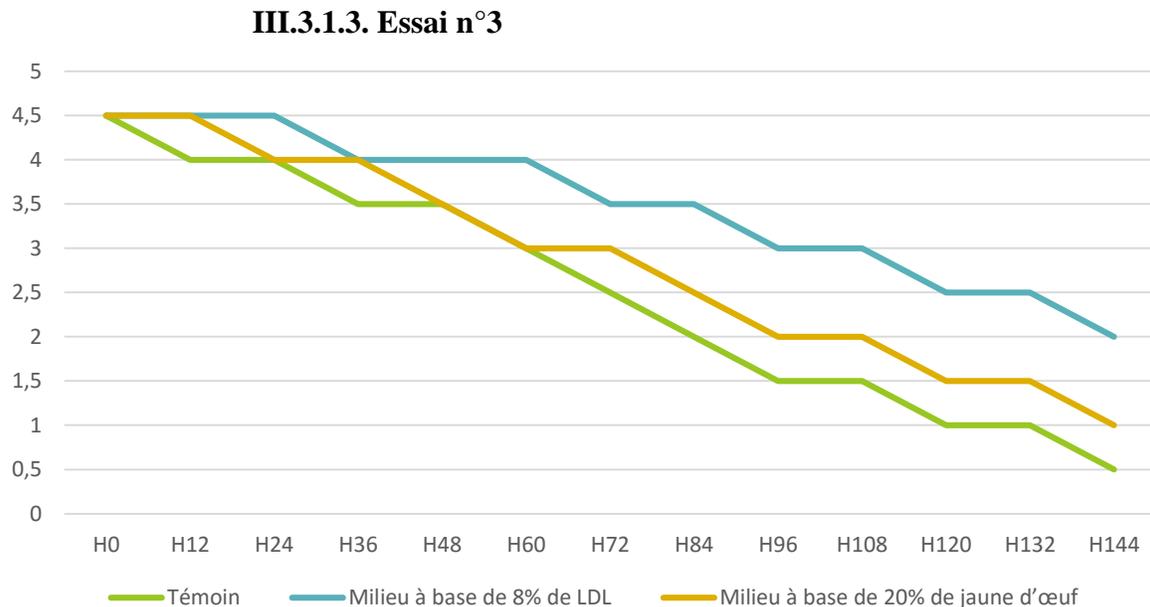


Figure 31 : Courbes qui représentent l'évolution de **la motilité individuelle** de l'essai n°3 dans les trois milieux et à différentes heures.

La motilité individuelle est plus importante dans le milieu à **8%** de LDL que dans les autres milieux. A **H144**, elle est d'une note de **0.5** dans le milieu témoin, de **1** dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf et de **2** dans le milieu à **8%** de LDL.

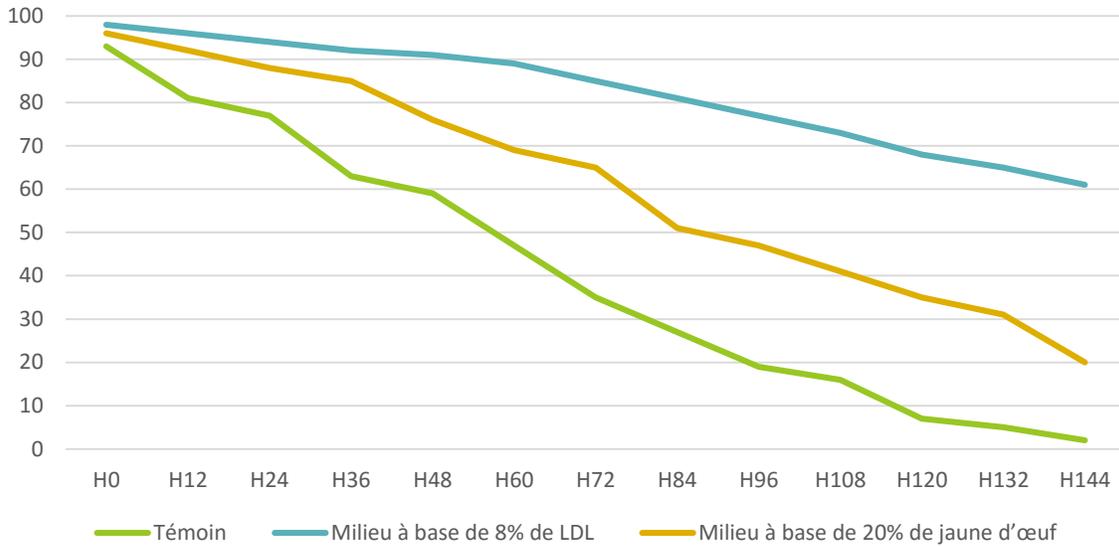


Figure 32: Courbes qui représentent l'évolution de la **viabilité** des spermatozoïdes de l'essai n°3 dans les trois milieux et en fonction des heures.

Dans le milieu à **8%** de LDL, la viabilité est plus au moins stable de H0 à H60 et elle est supérieure à **80%**. A H96, le % est de **19%** dans le milieu témoin, de **47%** dans le milieu à 8% de jaune d'œuf et de **77%** dans le milieu à **8%** de LDL.

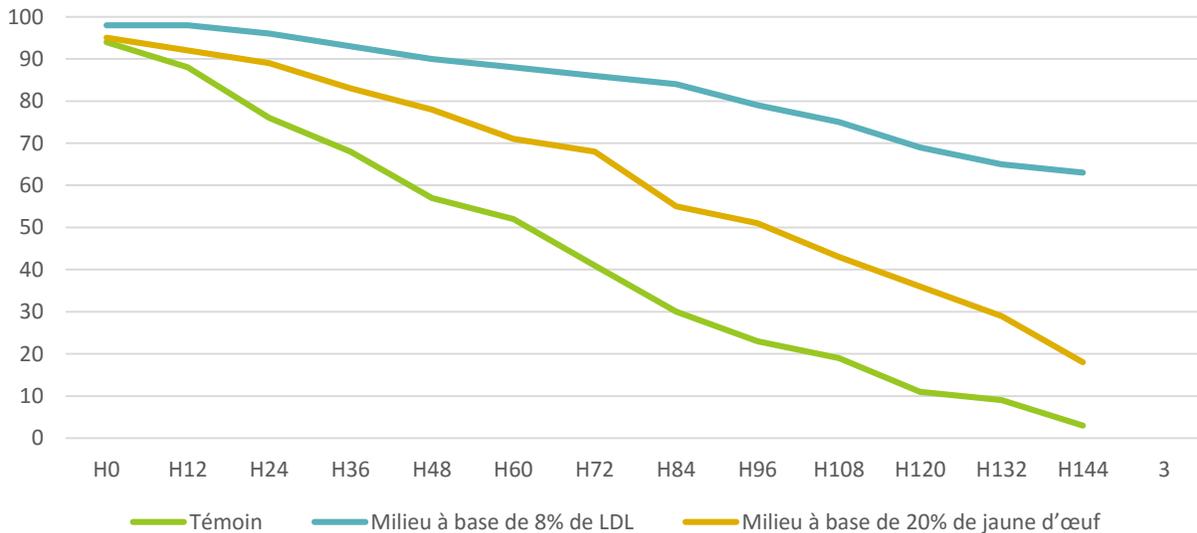


Figure 33: Courbes présentant l'évolution des résultats de l'essai n°3 lors du **test HOST**, dans les trois milieux et en fonction des heures.

La viabilité des spermatozoïdes reste importante dans le milieu à **8%** de LDL dans les différentes heures et est supérieure à **60%** même après **144** heures. Dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf, la viabilité est inférieure à **50%** depuis **H108**.

III.3.2. Résultats globaux

Afin de mieux mettre en exergue l'effet de l'un ou l'autre des milieux, nous avons abordé les résultats avec une approche globale c'est-à-dire, une analyse des résultats d'ensemble des trois essais. C'est ainsi que les moyennes des résultats de la motilité individuelle, des résultats du test HOST et de l'éosine des trois essais, ont été comparées à différents temps de lecture. Nous présentons les résultats globaux dans les graphes suivants.

La moyenne de la motilité individuelle est plus élevée dans le milieu à **8 %** de LDL que les deux autres milieux durant les différentes heures de lecture. Dans le milieu témoin, à l'instar milieu à **20 %** de jaune d'œuf la moyenne de la motilité individuelle est inférieure à **2** depuis **H72**, Par contre, dans le milieu à **8%** de LDL, la moyenne de la motilité individuelle baisse mais de manières légères en fonction des heures. (Figure **34**)

Nous constatons que la moyenne des résultats de la viabilité des trois essais chute de manière remarquable dans le milieu témoin, et de manière progressive dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf. Dans le milieu à **8%** de LDL, la viabilité reste cependant importante durant toutes les heures d'évaluation et est supérieure à **50%** à **H144**. (Figure 35)

D'après les résultats au test HOST, la viabilité des spermatozoïdes dans le milieu à **8%** de LDL n'a connu qu'une légère diminution par rapport aux autres milieux durant les différentes heures cependant cette diminution est plus importante dans le milieu témoin que dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf. (Figure **36**)

EVOLUTION DES MOTILITÉS INDIVIDUELLES DE LA MOYENNE DES TROIS
ESSAIS DANS LES TROIS MILIEUX

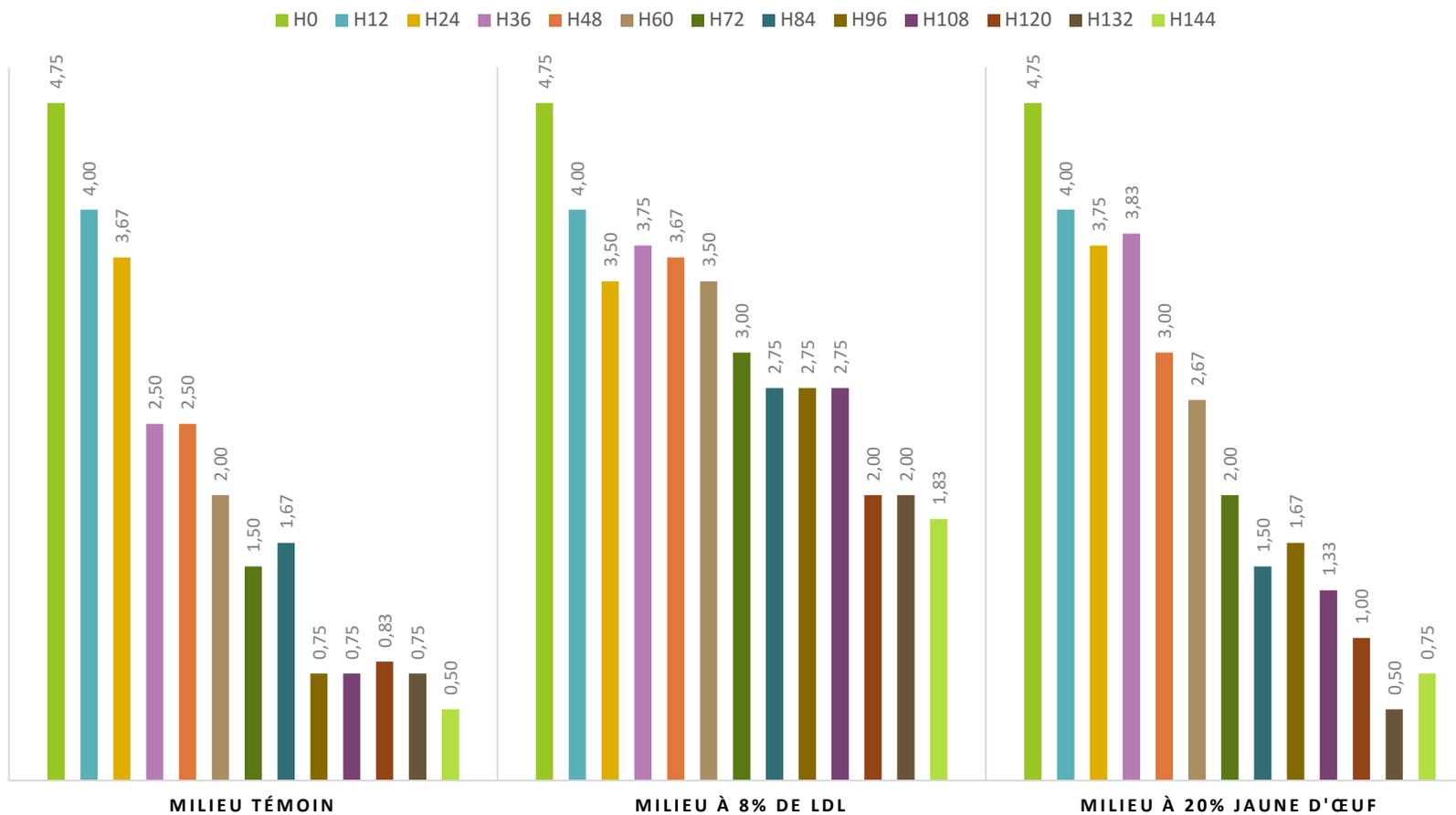


Figure 34: Graphes qui représentent l'évolution des motilités individuelles de la moyenne des trois essais dans les trois milieux.

EVOLUTION DES RESULTATS DU TEST DE LA VIABILITÉ DE LA MOYENNE DES TROIS ESSAIS DANS LES TROIS MILIEUX

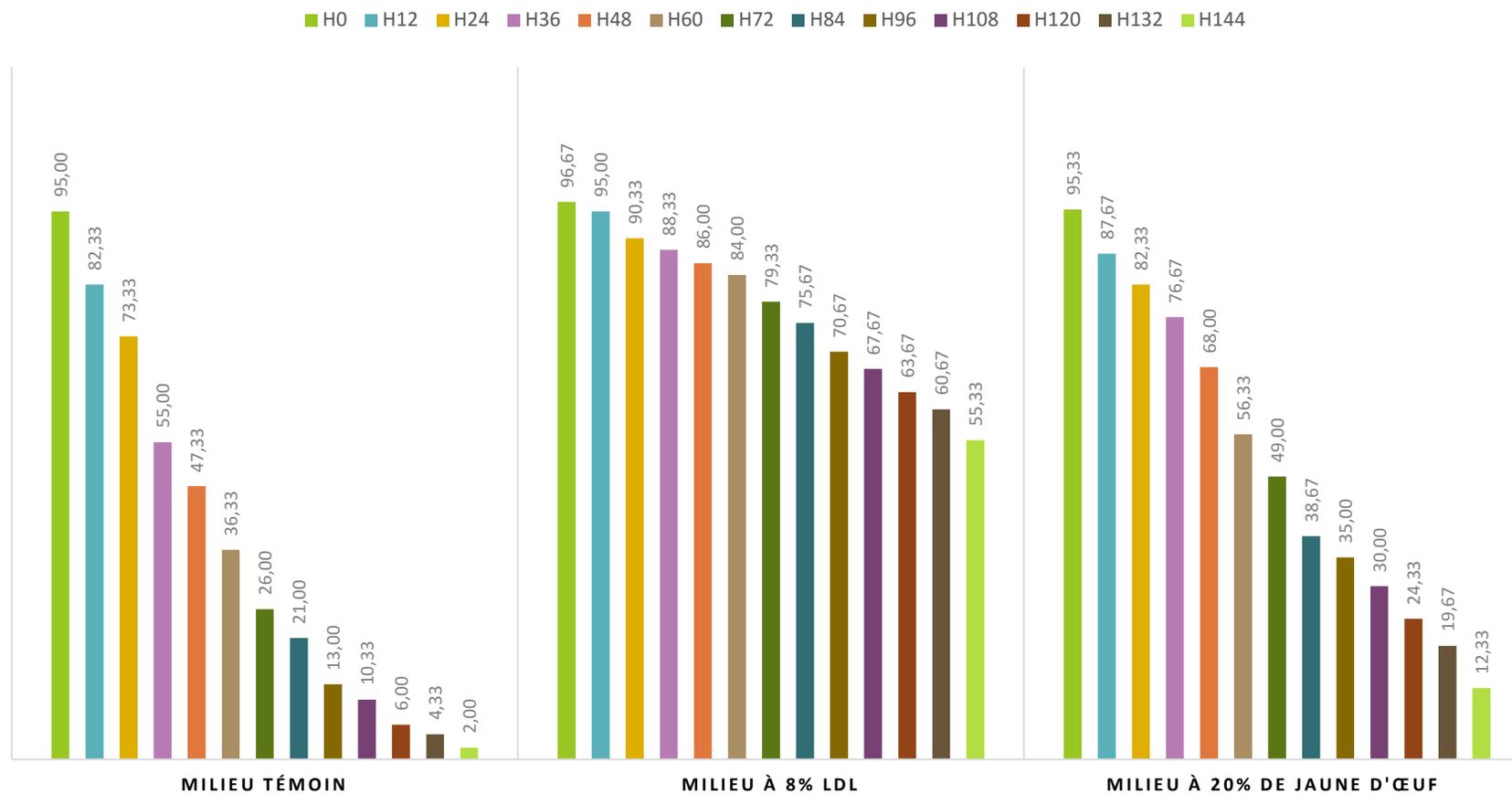


Figure 35: Graphes représentant l'évolution des résultats du test de la viabilité de la moyenne des trois essais dans les trois milieux.

Evolution des resultats du test HOST de la moyenne des trois essais dans les trois milieux.

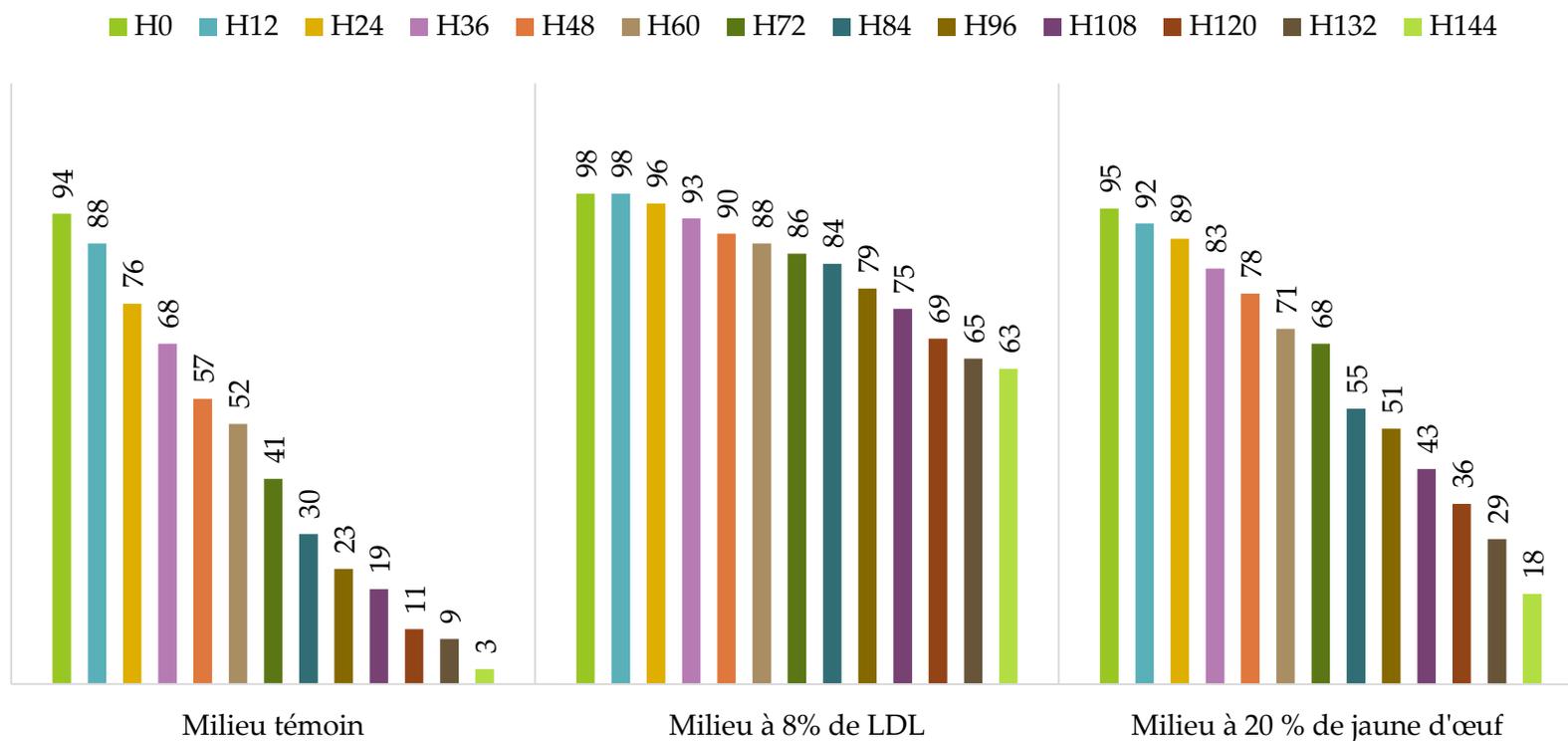


Figure 36: Graphes qui représentent l'évolution de Test Host de la moyenne des trois essais dans les différents milieux.

IV. Discussion des méthodes utilisées

IV.1. Discussion de la méthode de collecte

La semence epididymaire a été utilisée pour la première fois pour l'insémination des juments en 1957 par Barker et Gandier. Le taux de gestation était de **17%**. Les spermatozoïdes acquièrent leur fertilité et leur mobilité durant leur transit epididymaire. Les spermatozoïdes fertiles restent stockés dans la queue de l'épididyme, où ils peuvent par la suite être collectés.

Guérin et al, ont fait une comparaison entre la semence epididymaire et la semence éjaculée et ils ont constaté qu'elles avaient le même pouvoir fécondant. (Guérin Y., *et al.*, 2003)

Il existe deux techniques de collecte du sperme epididymaire : le flushing rétrograde et le « Float Up ». Le flushing rétrograde consiste en l'injection d'un liquide dans le canal déférent et la collecte par la suite de la semence en effectuant de nombreuses incisions au niveau de la queue. Le « Floap Up » est une technique facile qui consiste en des incisions multiples au niveau de la queue de l'épididyme et de son immersion dans un liquide pendant **10** minutes. (Roels K., *et al.*, 2013) Les travaux de Mwaanga S-E *et al* sur le sperme epididymaire du bouc ont montré qu'il y avait des anomalies principalement au niveau des gouttelettes cytoplasmiques. (Mwaanga S-E., *et al.*, 2014). Dans notre présent travail, nous avons collecté le sperme epididyamaire par la méthode du flushing rétrograde.

IV.1. Le liquide de rinçage utilisé (la solution A)

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé la solution A qui est composée de : **3,028g** de Tris (hydroxy méthyleAmino-méthane), **1,70g** d'acide citrique monohydrate et de **1,25 g** de Fructose. Ces molécules seront diluées dans **100mL** d'eau distillée. Ce milieu a été utilisé dans différents travaux de recherche. (Smatti M., Mekki et M., 2012-2013)

IV.2. Les méthodes d'évaluation avant réfrigération

Avant réfrigération à **+4°C**, nous avons évalué les différents paramètres macroscopiques et macroscopiques afin d'attester de l'éligibilité des spermés collectés, ce qui explique le nombre important de tentatives de collectes opérées avant le choix des trois testicules retenus.

IV.2.1. Evaluation macroscopique

IV.2.1.1. Le volume

Nous nous sommes référés aux travaux de Hanzen C. le volume de la semence collectée de T1 T2 et T3 sont respectivement : **1.5 ml**, **0.8 ml** et **1.5ml** sachant que le volume normal d'un éjaculat chez le taureau est de **2 à 15ml**. Nos résultats peuvent être interprétés par le jeune âge des animaux utilisés pour notre étude d'une part et d'autre part par le fait que nous ignorons à quel rythme les mâles se sont-ils reproduits avant l'abattage, il est à noter que l'éjaculation correspond à la vidange du **1/5^{ème}** du contenu épидидymaire, de ce fait une hypothétique éjaculation **24 H** avant l'abattage serait de nature à influencer le volume collecté.

IV.2.1.2. La couleur

La couleur des trois semences étaient blanc ivoire, et ceci confirme la normalité du sperme selon ce qui a été rapporté par Hanzen.

IV.2.2. Evaluation microscopique

IV.2.2.1. La motilité massale

Les notes de la motilité massale de T1, T2, T3 sont respectivement **5**, **5** et **4.5**.

Pour T3, nous avons observé des vagues très nettes et pour T1 et T2, les mouvements étaient en tourbillons nettement visibles. Ces résultats de la motilité massale sont corrélés à une bonne qualité de la semence.

IV.2.2.2. La motilité individuelle

Les notes de la motilité individuelle de T1, T2 et T3 sont identiques pour les trois et elles sont de **5**, cela veut dire que les spermatozoïdes des trois testicules avaient un mouvement en tourbillons.

IV.2.1.3. La concentration

Les concentrations obtenues pour T1, T2 et T3 sont respectivement **400×10⁶** spz/ml, **450×10⁶** spz/ml et **250×10⁶** spz/ml. D'après les travaux de Dumont, la semence doit avoir une concentration de **≥ 0,5×10⁹**spz/ ml.

IV.3. le choix du milieu à 20% de jaune d'œuf et le milieu à 8% de LDL

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé le milieu à **20%** de Jaune d'œuf qui est composé de **40 ml** de la solution A, et 8 ml de jaune d'œuf. Le milieu à **8%** de LDL est composé de **40ml** de la solution A et **3.6g** de LDL.

Mon choix s'est porté sur ces deux milieux, afin d'attester de l'efficacité de la LDL sans qu'il y ait un risque de contamination par les autres composants du jaune d'œuf.

IV.3. Le choix et discussion des tests effectués après réfrigération

IV.3.1. Le test à l'éosine

Le résultat le plus pertinent pour l'utilisation de la semence pour l'insémination artificielle est le % des spermatozoïdes vivants après conservation, mais cette appréciation reste approximative. (Cabannes C., 2008)

IV.3.2. Le test HOST

Le test HOST nous permet d'évaluer la capacité de la régulation de l'osmolarité dans un milieu hypo-osmotique en d'autre termes il nous permet d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique après conservation de la semence. (Sergey I-M., Clifford L-L., 2013).

IV.3.3. La motilité individuelle

Ce paramètre témoigne de l'intégrité morphologique et fonctionnelle du spermatozoïde et est un excellent indicateur de la fertilité future de ce dernier.

IV.4. Discussion des résultats obtenus après réfrigération.

A **H0**, les résultats des tests pour la moyennes des trois essais est presque identique pour les trois milieux.

Pour le milieu témoin les résultats de la moyenne des trois essais sont comparés avec les résultats du travail d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z., sur la semence ovine.

A **H0**, la mobilité individuelle de la moyenne des trois essais dans le milieu témoin est de **4.75** et de **5** dans le travail d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z.,

A H24 la motilité individuelle est de **3.75** dans notre présent travail ou elle a chuté à un **1** dans le travail d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z.,

Pour les résultats au test HOST la moyenne des trois essais dans le milieu témoin est de **94%** à H0, **74%** à H12, **63%** à H24 et **33,3%** à H72 et de **2.93%** à H144. Dans le travail d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z., nous constatons une diminution de la viabilité à partir de H24 qui est de **39.83%** et qui atteint **10%** au bout de **72** heures.

Pour le milieu à **20%** de jaune d'œuf, les résultats obtenus au test HOST sont de **91.00%** à H12, **86.00%** à H24 et **72.32%** à H48, c'est résultats sont supérieurs à ceux obtenus dans le travail de Smatti M., et Mekki M., qui avaient utilisé la jaune d'œuf à **15%**, leur résultats sont comme suit : **72.8%** à H0, **75.55%** à H24 et **57.7%** à H48.

Les résultats de la motilité individuelle dans le milieu à 20% de jaune d'œuf sont presque identiques à ceux obtenus dans le travail d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z., qui avaient également utilisé un milieu à base de **20%** de jaune d'œuf. A partir de H48 les résultats d'Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z., commencent à chuter d'ailleurs à H48 la note de lamotilité individuelle est de **2.5** alors qu'elle est de **3.83** dans notre travail et de **0.75** à H144.

Dans le milieu à **8%** de LDL, nos résultats restent nettement supérieurs à ceux obtenus dans le milieu à **20%** de jaune d'œuf et le milieu témoin ceci est confirmé par les travaux de Moussa *et al.*, 2002 qui ont obtenus des résultats supérieurs en ce qui concerne la mobilité individuelle en remplacement un milieu à base de **20%** de jaune d'œuf par un milieu à **8%** de LDL.

Amirat L., *et al.*, en 2004, ont comparé un milieu à LDL avec un milieu commercial à base de jaune d'œuf « Optidyl ». Ils ont évalué la viabilité dans les deux milieux après congélation-décongélation en utilisant le test HOST, les résultats sont : **47.3%** de spz vivants dans le milieu LDL et **46.4%** spz vivants dans l'optidyl.

Une autre étude faite par Amirat L., *et al* en 2005, dont l'objectif était de comparer entre trois milieux de conservation à savoir le milieu LDL, le Trifadyl et le Biocephos après congélation-décongélation. Les semences sont évaluées à H1 d'incubation, H4 et H24. Dans le Trifadyl à H1, **46%** des spermatozoïdes sont intacts **18%** des membranes plasmiques sont rompues et **36%** des spermatozoïdes ont eu une réaction de l'acrosome, alors que dans le milieu

LDL et Biociphos, aucune modification n'est observée. A H4 seulement **11.6%** des spermatozoïdes sont restés intacts dans le Trifady, **47%** des spz intacts dans le Biociphos, alors que dans le milieu LDL **89.7%** des spz sont intacts. Après **24** heures d'incubation dans le Trifadyl, **5%** des spermatozoïdes sont normaux, **52%** ont eu une rupture de la membrane plasmique et **43%** des spz ont eu une réaction de l'acrosome. Dans le milieu Biociphos, après **24**heures, **23%** des spz n'ont eu aucun changement et dans le milieu LDL, **63%** des spz étaient normaux.

Hu J-H., *et al* en 2005 ont comparé la semence du verrat dans trois milieux, le premier à base de LDL, le deuxième milieu (Tris, Acide Citrique, Glucose et jaune d'œuf) et le troisième milieu (Tris, Acide Citrique, Fructose et jaune d'œuf. Après congélation et décongélation la motilité des spermatozoïdes a été évaluée et les résultats sont comme suit : le pourcentage de spermatozoïde ayant une motilité linéaire dans le deuxième milieu est de **30.4** et dans le troisième milieu le % est de **30.1**.

Pour le milieu LDL, différentes concentrations ont été utilisées: Dans le milieu à **6%** de LDL, **37.5%** de spz ont une motilité linéaire, à **7%** de LDL **46.6%**, à 8% de LDL **68.4%**, à **9%** de LDL **70.3%** et à **10%** de LDL, **65.3%**. Nous remarquons qu'au-delà d'une certaine concentration de la LDL, la motilité individuelle des spermatozoïdes est affectée, et c'est ce qui a été constaté dans les travaux de Moussa *et al* en 2002. Ceci peut être dû à la présence de granules HDL lors de concentrations élevées de LDL, sachant que la HDL cause une régression significative de la motilité des spermatozoïdes.

V. Conclusion générale

L'objectif de notre travail était de démontrer l'efficacité de la LDL extraite du jaune d'œuf dans la préservation du pouvoir fécondant de la semence bovine réfrigérée à +4°C et la comparant au milieux conventionnels (milieu témoin sans agent protecteurs et un milieu enrichi à 20% de jaune d'œuf), et ce, tout au long des période d'évaluation qui se sont étalées à H144.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation attestent que l'utilisation de la portion lipoprotéique du jaune d'œuf (LDL) est plus bénéfique que l'utilisation du jaune d'œuf entier. La mobilité individuelle, qui est un paramètre témoin de la fertilité des spermatozoïdes, semble être mieux préservée dans le milieu à 8% de LDL. Les résultats du test HOST et du test à l'éosine sont également plus marqués dans le milieu à 8% de LDL que dans le milieu à 20% de jaune d'œuf.

De par ces résultats, nous constatons que le jaune d'œuf contient en plus de la LDL, d'autres composants qui s'avèrent néfastes pour les spermatozoïdes.

VI. Recommandations

La cryoconservation est une biotechnologie qui n'a pas connue un grand succès en Algérie et rares sont les études qui ont été entreprises dans ce domaine. A l'issue de notre travail, nous constatons que l'utilisation d'une molécule extraite du jaune d'œuf « Low density Lipoprotein » pourrait préserver la qualité de la semence bovine réfrigérée à +4°C et ce jusqu'à **144** heures d'incubation, nous constatons également que le sperme epididymaire pourrait être utilisé en vue de l'insémination artificielle tout comme le sperme éjaculé. Afin de potentialiser l'efficacité de ces nouvelles molécules et d'assurer de bonnes caractéristiques de la semence nous recommandons de :

- ✓ Prélever le sperme epididymaire dans les heures qui suivent l'abattage et cela ne doit pas dépasser les 24 heures.
- ✓ Utilisation de nouvelles molécules synthétiques dans la réfrigération ou la congélation de la semence pour éviter toute contamination d'origine animale.
- ✓ Mettre en place des méthodes objectives d'évaluation de la semence telles que le CASA et la cytométrie en flux.
- ✓ Etendre le temps des observations au-delà de 144 heures afin de tester l'efficacité de ces molécules en fonction du temps.
- ✓ Tester des concentrations différentes pour chaque molécule afin d'avoir les limites de toxicité.
- ✓ Comparer les résultats obtenus par les différentes molécules et choisir par la suite celle qui permet une conservation de la semence pendant une longue durée avec un minimum d'altérations.

L'utilisation de ces nouvelles molécules telles que la LDL assurerait une bonne conservation de la semence, en d'autres termes la fertilité des spermatozoïdes serait préservée ceci nous permet d'avoir un taux plus élevée de réussite à l'insémination artificielle.

A

1. **Abdussamad M.**, (2013). *Attempts to promote the use of cryopreserved bovine semen: Effect of prostaglandin F2-alpha, sucrose and short-term dry ice storage*. Thèse doctorat. Germanie.
2. **Abolfazl A., et Gholami-Ali J.**, (2013). *The Effect of Oxidative Stress and Antioxidants on Men Fertility*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences.
3. **Adamou- N'diaye M., Gbangboche A-B., Adjovia A., Hanzen C., Jondet R.**, (2002). *Refroidissement de 32°C à 5°C de sperme dilué du taureau de la race borgou au benin*. Annales des sciences agronomiques du Benin.
4. **Adham M-A., Mujo K.,Kenji S.**, (2013). *Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin*. Chapter 5.
5. **Agnieszka P., Wojciech N., Malgorzata O.**, (2012). *Methods of assessment of cryopreserved semen*. Cours en ligne. University of Environmental and Life Sciences Poland. Consulté le 16 Février 2016.
6. **Akal E., Koçyiğit A., Selçuk M.**, (2014). *Role of Low Density Lipoproteins in Semen Preservation*.
7. **Almeyehu L.**, (2011). *Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility*. Université Addis Ababa. Ethiopie.
8. **Amari F., Bedrani N., et Yakoub F-Z.**, (2014-2015). *Conservation à court terme de la semence ovine, quel cryoprotecteur utiliser ?* Thèse de mémoire. Algérie.
9. **Amirat A., Tainturier D., Jeanneau L., Thorina C., Gerard O., Courtenc J-L., Anton M.**, (2004). *Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender*. Theriogenology 61 (2004) 895–907.
10. **Amirat L., Anton M., Tainturier D., Chatagnon G., Battut I.,Courtens J-C.**, (2004). *Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: biociphos, low density lipoprotein and triladyl, before, during and after freezing and thawing*. Université de Nantes.
11. **Anand M., Yadav S., Shukla P.**, (2014). *Cryoprotectant in semen extender: From egg yolk to low-density lipoprotein (LDL)*. Livestock research international.
12. **Andrabi S.**, (2008). *Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (Bubalus bubalis) Bull Spermatozoa*. Reprod Dom Anim 44, 552–569.
13. **Anghel A., Zamfirescu S., Coprean D.**, (2013). *The Oxidative Stress, Cryoconservation and Fertility. Aspects of Molecular Oxidation and its Effects on the Reproductive Functions off Ram*. Academy of Romanian Scientists.
14. **Areepan Sophonsritsuk MD., Aram Rojanasakul M-D.**, (2003). *Cryopreservation of Human Spermatozoa*.

B

15. **Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., Forti G.,** (1996). *Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways*. *Frontiers in Bioscience* 1, d189-205.
16. **Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Le bœuf B., Orgeur P., Vallet J-C.,** (1993). *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et caprins*. P17-27. P262
17. **Baron R.,** (1978). *L'anatomie comparée des mammifères domestiques « Splanchnologie »*. P153 P181. P951. France.
18. **Benkeddache D.,** (2012). *Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances*. thèse doctorat. Algérie.
19. **Bergeron A., Brindle Y., Blondin P., Manjunath P.,** (2007). *Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage*. *Biology of reproduction* 77, 120–126.
20. **Bergeron A., Crete M-H., Brindle Y., Manjunath P.,** (2003). *Low-Density Lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane*. *Biology of reproduction* 70, 708–717.
21. **Bosh P., Wright J.,** (2005). *The oviductal sperm reservoir in domestic mammals*. *Arch. Med. Vet.* 37, N° 2.
22. **Bouabdallah N.,** (2014-2015). *Spermatogenèse*. Cours en ligne consulté le 13 décembre 2015.
23. **BOUTELIS S.,** (2011-2012). *Étude des changements cytologiques et histologiques des*

C

24. **Cabannes C.,** (2008). *Comparaison des methodes d'évaluation de la qualite de la semence dans les especes bovine, canine et humaine*. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Toulouse.
25. **Chaudhari D-V., Dharni A-J., Hadiya H-H., Patel J-A.,** (2015). *Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen*. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
26. **Chian R-C.,** (2010). *Cryobiology: an overview*. Cambridge University Press.
27. **Cordoba M., Santa Coloma T-A., Beorlegui N.B., Beconi M-T.,** (1997). *Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm*. *Biochemistry and molecular biology international*.
28. **Cormier N.,** (1991). *L'implication de la cryopréservation sur la physiologie des spermatozoïdes bovins*. Thèse pour l'obtention du grade de maitre des sciences université Laval.

29. **Cross N-L.**, (1998). *Role of Cholesterol in Sperm Capacitation*. Biology of reproduction.

D

30. **Dacheux J-L., Paquignon M.**, (1987). *Maturation epididymaire des spermatozoïdes, influence sur la qualité des gamètes*. Journées rech porcine en France.
31. **Day J-G., Stacey G-N.**, (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. P303. P365. 2ème édition Humana press New Jersey.
32. **Derivaux J.**, (1989). *Reproduction chez les animaux domestiques*. Vol I. Academia (eds.), édition et diffusion, Louvain la neuve, 57-506.
33. **Dibyajyoti T., Kutubuddin A., Sourabh D., Gopal C.D.**, (2015). *Heparin-induced in vitro recapacitation changes of swamp buffalo spermatozoa*. Turk J Vet Anim Sci.
34. **Dong X-Y., Rodenburg S-E., Hill D., VandeVoort C-A.**, (2011). *The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation of rhesus monkey*. Asian Journal of Andrology (2011) 13, 459–464.

E

35. **Eric M., Walters, James D., Benson, Erik J., Woods, Crister J-K.**, (2009). *The history of sperm cryopreservation*. Cambridge University Press.

F

36. **Fawad U-R., Zhaoa C., Shah M-A., Qureshib M-S., Wan X.**, (2013). *Semen extenders and artificial insemination in ruminants*. School of Biological Sciences and Medical Engineering Chine.
37. **Fraser B.**, (2013). *Liaison de la protéine spermatique bovine Spam-1 à la zone pellucide de l'ovule*. Thèse pour l'obtention du grade de maitre des sciences. Université Laval.

G

38. **Gayrard V.**, (2007). *Physiologie de la reproduction des mammifères*. Ecole nationale vétérinaire Toulouse.
39. **Gilbert B., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Le loc'H A., Montméas L., Robin G.**, (2005). *Reproduction des animaux d'élevage*. P36-37. P408. Deuxième édition. Edition educagri.
40. **Grignard E.**, (2005). *Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires, et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères ; Equus caballus, Bos*

41. **Guérin Y., Locatelli Y., Comizolli P., Mauget R., Mermillod P., Legendre X., Gatti J-C., Dacheux J-L.,** (2003). *Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro*. Les Actes du BRG, 4 (2003) 173-183.

H

42. **Hanzen C.,** (2008-2009). *Propédeutique de l'appareil génital mâle des ruminants*. Cours en ligne consulté le 15 Novembre 2015.
43. **Hanzen C.,** (2009-2010). *L'insémination artificielle chez les ruminants*. Cours en ligne consulté le 3 janvier 2016.
44. **Hebert A.,** (2011). *Caractérisation de l'activité phosphodiesterase chez les spermatozoïdes bovins*. Thèse pour l'obtention du grade de maitre des sciences.
45. **Himali S., Wan-gang Z., Eun Joo L., Dong U. A.,** (2011). *Egg Yolk Phosvitin and Functional Phosphopeptides*. Concise reviews in food science.
46. **Ho H-C., Suarez S-S.,** (2001). *Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation*. *Reproduction* (2001) **122**, 519–526
47. **Hossain S., Johannisson A., Wallgren M., Nagy S., Pimenta Siqueira A., Rodriguez-Martinez H.,** (2011). *Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art*. State of the art, 2011, *Asian journal of andrology*, (13), 3, 406-419.
48. **Hu J-H., Li G-W., Li G., Chen X-Y., Hai-Yang, Zhang S-S., Wang L-Q.,** (2005). *The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins*. College of animal science and technology, Chine.

J

49. **Jeyendran R-S., Van der Ven H-H., Perez-Pelae M., Crabo B-G., Zaneveld L-J-D.,** (1984). *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics*. *Journal of reproduction and fertility* ,GBR.
50. **Johnson L-A., Weitze k-f., Fiser P., Maxwell W-M-C.,** (2006). *Storage of boar semen*. *Animal Reproduction Science* 62.

L

51. **Landim-Alvarenga F.C., Graham J.K., Alvarenga M.A., Squires E.L.,** (2004). *Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during in vitro capacitation.* Anim. Reprod., v.1, n.1., p.96-105.
52. **Lane M-E., Therien I., Moreau R., Manjunath P.,** (1999). *Heparin and High-Density Lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms.* Biology of reproduction 60.
53. **Leboeuf B., Restall B., Salamon S.,** (2003). *Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle.* University of Sydney.
54. **Lefebvre J.,** (2009). *Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain : clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques.* Thèse doctorat université de Montréal.
55. **Lusignan M-C.,** (2011). *Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait.* Thèse pour l'obtention du grade de philosophe docteur université Montréal.

M

56. **Magistrini M.,** (1999). *La qualité des spermatozoïdes et du plasma séminal : quelles sont les fonctions explorables.* Équipe reproduction équine.
57. **Maher G.,** (2012). *Comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insémination artificielle chez la chèvre.* Thèse pour l'obtention du grade maître des sciences université Laval.
58. **Mahutin V-S.,** (2015). *Le cholestérol comme agent cryoprotecteur pour la congélation des semences animales.* Thèse de doctorat université Laval.
59. **Manjunath P.,** (2012). *New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components.* Anim. reprod., v.9, n.4, p.809-815
60. **Martínez P., Morros A.,** (1996). *Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation.* Frontiers in bioscience 1, d103-117.
61. **Mekedjou A.N.,** (1972-1973). *Physiologie de la reproduction.* Institut national d'agronomie.
62. **Mirihassimu M., Yasufumi S., Yu S., Reiko M., Takeshi A.,** (2004). *Impaired hyperactivation of human sperm in patients with infertility.* J Med Dent Sci 2004; 51: 99–104.
63. **Mitra M., Shivaji S.,** (2005). *Proteins implicated in sperm capacitation.* Indian journal of experimental biology.
64. **Moreau R.,** (1998). *Le rôle d'une famille de protéines du plasma séminal bovin dans le transport lipidique et la capacitation du spermatozoïde.* Thèse pour l'obtention du grade de philosophe docteur université Montréal.

65. **Muino-Blanco T., Pe´rez-P R., Cebria -Pe´rez J-A.,** (2008). *Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress*. ISSN 0936-6768.
66. **Mwaanga S-E., Kataba A., Pares-Casanova P-M., Phiri E., Lundu T.,** (2014). *Caudal epididymal sperm morphology and body measurements relationships of the Gwembe Dwarf bucks*. International Journal of Agricultural Policy and Research Vol.2 (10), pp.356-351.

N

67. **Nair S-A., Abraham T-K., Jaya D-S.,** (2008). *Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea (Vigna unguiculataL) varieties*. Journal of Environmental Biology.
68. **Naseer Z., Ahmad E., Aksoy M.,** (2014). *Cholesterol efflux from sperm: approaches and applications*. Turk J Vet Anim Sci.
69. **Nitira A., Junpen S., Theerawat T., Nawapen P., Jinda S., Mongkol T.,** (2013). *Glycerol Concentration Effects on Quality and Longevity of Post-thaw Goat Semen*. Thai J Vet Med. 2013. 43(2): 179-186.
70. **Olson S-D., Fauci L-J., Suarez S-S.,** (2011). *Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation*. Molecular human reproduction, Vol.17, No.8 pp. 500–510.

O

71. **Ong F.,** (2010). *Semen analysis and sperm preparation*. Reproductive Medicine Centre (Tsim Sha Tsui). Cours en ligne consulté le 2 janvier 2016.

P

72. **Ponthier J., Van Den Berghe F., Parrilla-Hernandez S., Hanzen C., Deleuze S.,** (2014). *Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives*. Ann Méd Vét.

R

73. **Roels K., Leemans B., Ververs C., Govaere J., Hoogewijs M., Van Soom A.,**(2013). *Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa*. Diergeneeskunding Tijdschrift.

S

74. **Salicioni A.M., Platt M.D., Wertheimer E.V., Arcelay E., Allaire A., Sosnik J., Visconti P.E.**, (2007). *Signalling pathways involved in sperm capacitation*. *Spermatology*. SRF VOL 65.
75. **Sergey I-M., Clifford L-L.**, (2013). *Methods of sperm vitality assessment*. Chapter 2, *Spermatogenesis Methods and protocols*, éditions Carrell et Aston. Hardcover
76. **Sicherle C-C., Maia M-S., Bicudo S-D., Rodello L., Azevedo H-C.**, (2010). *Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox*. *Small Ruminant Research*.
77. **Simonik O., Stadnik L., Rajmon R., Beran J., Sichtar J., Duchacek J.**, (2013). *Influence of LDL addition on cryoprotective properties of bovine semen extenders*. 10.7251/AGSY13031027S.
78. **Smatti M., Mekki M.**, (2012-2013). *La conservation de la semence ovine*. Mémoire de fin d'étude. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'Alger.
79. **Soltner D.**, (2001). *La reproduction des animaux d'élevage*. P33. P79. P222. Tome 1. 3^{ème} édition : éditions sciences et techniques agricoles « Le clos lorelle »
80. **Soylu M-K., Nur Z., Ustuner B., Dogan I., Sagirkaya H., Gunay U., Kemal A.**, (2007). *Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen*. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, 241-246.
81. **Stamboulian S.**, (2005). *Canaux calciques des spermatozoïdes de mammifères « Caractérisation des interactions fonctionnelles et moléculaires au cours de la réaction acrosomique »*. Thèse de doctorat. Grenoble.
82. **Stanescu M., Birtoiu A.**, (2011). *Freezing of dog's sperm*. *Romanian Biotechnological Letters*.
83. **Steven F., Mullen, Critser J-K.**, (2007). *The Science of Cryobiology*. Chapter 7.
84. **Suarez S., Redfern K., Raynor P., Martin F., Phillips M-D.**, (1991). *Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir*. *Biology of reproduction* 44, 998-1004.

T

85. **Tainturier D., Bencharif D., Briand L., Topie E., Kamga-waladjo A-R.**, (2013). *Production et conservation de la semence animale*. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*.
86. **Therien I., Soubeyrand S., Manjunath P.**, (1997). *Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High-Density Lipoprotein*. *Biology of reproduction* 57.

87. **Thibaut C., et Levasseur M.C.,** (2001). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, INRA éditions : Paris 928p.

V

88. **Varela Junior A-S., Corcini C-D., Ulguim R-R., Alvarenga M-V-F., Bianchi I., Correa M-N., Lucia Jr., Deschamps J-C.,** (2008). *Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen.* *Animal Reproduction Science* 115 (2009) 323–327.
89. **Vincent P., Underwood S.L., Dolbec C., Bouchard N., Kroetsch T., Blondin P.,** (2012). *Bovine semen quality control in artificial insemination centers.* *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.153-165.
90. **Visconti P.E., and Kopf G.S.,** (1998). *Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm.* *Biology of reproduction* 59.

W

91. **Wowk B.,** (2007). *How Cryoprotectants Work.* *Cryonics magazine.*

Y

92. **Yanagimachi R.,** (2011). *Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization?* DOI:10.1095/biolreprod.111.092601.

Z

93. **Zambrowicz A., Dabrowska A., Bobak L., Szoltysik M.,** (2014). *Egg yolk proteins and peptides with biological activity.* *Postepy hig med dosw.*
94. **Zekariya N., Ibrahim D., Ulgen G., M. Kemal S.,** (2005). *Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of saanen goat bucks.* *Bull Vet Inst Pulawy* 49, 183-187.

Résumé

L'objectif de notre présent travail est d'attester de l'efficacité de la LDL du jaune d'œuf dans la conservation de la semence bovine sans qu'il y ait un risque de contamination par les autres composants du jaune d'œuf. De ce fait nous avons extrait la LDL du jaune d'œuf en utilisant un protocole d'extraction rapporté dans la bibliographie.

Notre expérimentation a porté sur trois testicules dont la semence a été prélevée à partir de l'épididyme par la méthode du flushing rétrograde. Nous avons utilisé trois milieux pour la réfrigération à +4°C à savoir : le milieu témoin (3,028g de Tris, 1,70g d'acide citrique monohydrate et de 1,25 g de Fructose), le milieu à 20% de jaune d'œuf (40ml de la solution A, 20ml du jaune d'œuf), le milieu à 8% de LDL (40ml de la solution A et 3.6g de LDL). Après dilution des semences dans les trois milieux, nous les avons réfrigérés à +4°C. Par la suite nous avons évalué l'efficacité de chaque protocole au moyen de trois tests, la mobilité individuelle, le test HOST et le test à l'éosine à H0, H12, H36, H48, H72, H84, H96, H108, H120, H132 et à H144.

Les résultats des moyennes des trois essais se présentent comme suit : *pour le milieu témoin*, la mobilité individuelle H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,67, H₃₆=2,50, H₄₈=2,50, H₆₀=2,00, H₇₂=1,50, H₈₄=1,67, H₉₆=0,75, H₁₀₈=0,75, H₁₂₀=0,83, H₁₃₂=0,75, H₁₄₄=0,50. Les résultats au test à l'Eosine sont : H₀=95,00, H₁₂=82,33, H₂₄=73,33, H₃₆=55,00, H₄₈=47,33, H₆₀=36,33, H₇₂=26,00, H₈₄=21,00, H₉₆=13,00, H₁₀₈=10,33, H₁₂₀=6,00, H₁₃₂=4,33, H₁₄₄=2,00. Les résultats au test HOST sont : H₀=94,33, H₁₂=87,33, H₂₄=74,00, H₃₆=63,33, H₄₈=52,00, H₆₀=44,00, H₇₂=33,33, H₈₄=25,67, H₉₆=20,00, H₁₀₈=15,00, H₁₂₀=9,33, H₁₃₂=7,00, H₁₄₄=2,93. Pour le *milieu à 8% de LDL*, les résultats de la mobilité individuelle sont : H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,50, H₃₆=3,75, H₄₈=3,67, H₆₀=3,50, H₇₂=3,00, H₈₄=2,75, H₉₆=2,75, H₁₀₈=2,75, H₁₂₀=2,00, H₁₃₂=2,00, H₁₄₄=1,83. Les résultats au test à l'Eosine sont: H₀=96,67, H₁₂=95,00, H₂₄=90,33, H₃₆=88,33, H₄₈=86,00, H₆₀=84,00, H₇₂=79,33, H₈₄=75,67, H₉₆=70,67, H₁₀₈=67,67, H₁₂₀=63,67, H₁₃₂=60,67, H₁₄₄=55,33. Les résultats au test HOST sont : H₀=97,67, H₁₂=96,67, H₂₄=95,00, H₃₆=93,00, H₄₈=89,67, H₆₀=87,67, H₇₂=84,33, H₈₄=81,33, H₉₆=77,00, H₁₀₈=72,00, H₁₂₀=68,33, H₁₃₂=64,33, H₁₄₄=60,67. Pour le *milieu 20% de Jaune d'œuf*, les résultats de la mobilité individuelle sont : H₀=4,75, H₁₂=4,00, H₂₄=3,75, H₃₆=3,83, H₄₈=3,00, H₆₀=2,67, H₇₂=2,00, H₈₄=1,50, H₉₆=1,67, H₁₀₈=1,33, H₁₂₀=1,00, H₁₃₂=0,50, H₁₄₄=0,75. Les résultats au test à l'Eosine sont: H₀=95,33, H₁₂=87,67, H₂₄=82,33, H₃₆=76,67, H₄₈=68,00, H₆₀=56,33, H₇₂=49,00, H₈₄=38,67, H₉₆=35,00, H₁₀₈=30,00, H₁₂₀=24,33, H₁₃₂=19,67, H₁₄₄=12,33. Les résultats au test HOST sont : H₀=95,00, H₁₂=91,00, H₂₄=86,00, H₃₆=78,67, H₄₈=72,33, H₆₀=62,67, H₇₂=55,33, H₈₄=45,67, H₉₆=42,33, H₁₀₈=34,33, H₁₂₀=26,67, H₁₃₂=21,00, H₁₄₄=10,33.

Les résultats obtenus suggèrent un rendement meilleur de la LDL en termes de spermatozoïdes utilisables pour l'IA après réfrigération.

Mots clés : LDL, Jaune d'œuf, conservation, sperme épidydimmaire, Insémination artificielle.