

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

En

Médecine vétérinaire

THEME

CRYOCONSERVATION DE SEMENCE CAPRINE : ESSAI DES DILUEURS LOCAUX

Présenté par :

Monsieur : AIACHINE Badr eddine

Soutenu le : 12/07/2023

Devant le jury composé de :

- Président : souames S (MCA- ENSV)
- Promoteur : Lamara A (Professeur- ENSV)
- Examinatrice : Aouane N (MCB – ENSV)
- DECLARATION SUR L'HONNEUR

Déclaration sur l'honneur

- Je, soussignée **Monsieur AIACHINE Badreddine**, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
- En conséquence, j'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire de fin d'étude.

Remerciements

Nous remercions tout d'abord ALLAH tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Dr Souames samir pour nous avoir fait l'honneur d'être président du jury de ce mémoire.

Tous mes remerciements à Mme Dr Aouane nedjma, d'avoir accepté d'examinatrice travail.

Nous tenons particulièrement à remercier notre promoteur de mémoire Dr Lamara ali, de nous avoir offert l'opportunité de travailler avec lui, notre reconnaissance pour ces précieux conseils, son esprit critique et sa rigueur scientifique.

Nous le remercions d'avantage pour sa patience, sa gentillesse et sa confiance en nous, qui nous avons donné la force d'être à la hauteur des espérances.

Sans oublier bien sûr à remercier notamment toutes personnes ayant contribuées à la réalisation de ce travail.

Dédicaces :

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chers frères Mohamed Brahim pour leur appui et leurs encouragements,

A mes chers souer Hadjira, Marwa, a tout ma famille, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire en particulier,

A mes meilleurs amis : Midou et Yassine.

Sans oublier ma deuxième famille : ilyas, raouf, nassim, rafik, bilal, khaled,abdou, selsa, lina

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et fuit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Résumé

Ce projet de fin d'études vise à améliorer la filière caprine en Algérie en introduisant l'insémination artificielle (IA) pour diffuser les gènes précieux de l'espèce à grande échelle. La cryopréservation du sperme à des températures négatives est essentielle pour assurer la survie des spermatozoïdes et préserver la diversité génétique des races caprines locales. Cependant, la recherche dans ce domaine se poursuit pour trouver les meilleures formules chimiques qui garantissent la stabilité des cellules spermatiques pendant la cryoconservation.

Actuellement, les composants nécessaires à la cryoconservation sont importés en Algérie, ce qui a créé une dépendance aux produits étrangers. Pour réduire cette dépendance, une nouvelle politique encourage la production locale. Dans le cadre d'un projet national de recherche, l'étudiant a intégré une équipe travaillant sur l'évaluation de l'efficacité de trois dilueurs locaux pour la cryoconservation de la semence caprine.

L'objectif principal de l'étude est de comparer ces dilueurs en termes de préservation de la viabilité et de la qualité des spermatozoïdes après congélation. Les résultats obtenus permettront d'améliorer les protocoles de cryoconservation et d'optimiser les performances de la semence utilisée dans les programmes d'élevage caprin. Cette recherche contribuera à la durabilité et à la préservation des ressources génétiques caprines en Algérie.

Mots clés : insémination artificielle, gènes précieux, cryopréservation, sperme,

Abstract

This final year project aims to improve the goat industry in Algeria by introducing artificial insemination (AI) to widely disseminate valuable genes of the species. Cryopreservation of sperm at negative temperatures is essential for ensuring the survival of spermatozoa and preserving the genetic diversity of local goat breeds. However, research in this field continues to find the best chemical formulas that guarantee the stability of sperm cells during cryopreservation.

Currently, the components required for cryopreservation are imported to Algeria, creating a dependence on foreign products. To reduce this dependence, a new policy encourages local production. As part of a national research project, the student has joined a team working on evaluating the effectiveness of three local diluents for the cryopreservation of goat semen.

The main objective of the study is to compare these diluents in terms of preserving the viability and quality of spermatozoa after thawing. The obtained results will contribute to improving cryopreservation protocols and optimizing the performance of semen used in goat breeding programs. This research will contribute to the sustainability and preservation of goat genetic resources in Algeria.

Keywords: artificial insemination, valuable genes, cryopreservation, sperm.

ملخص

يهدف هذا المشروع الختامي إلى تحسين صناعة تربية الماعز في الجزائر من خلال إدخال التلقيح الاصطناعي لنشر الجينات القيمة للنوع بشكل واسع. تعد التجميد البارد للحيوانات المنوية أمرًا ضروريًا لضمان بقاء حيوانات المنوية والحفاظ على التنوع الوراثي لسلاسل الماعز المحلية. ومع ذلك ، تستمر الأبحاث في هذا المجال لإيجاد أفضل الصيغ الكيميائية التي تضمن استقرار خلايا المنوية أثناء التجميد.

حاليًا ، يتم استيراد المكونات اللازمة للتجميد البارد إلى الجزائر ، مما يؤدي إلى اعتمادية على المنتجات الأجنبية. لتقليل هذه الاعتمادية ، تشجع السياسة الجديدة الإنتاج المحلي. كجزء من مشروع بحث وطني ، انضم الطالب إلى فريق يعمل على تقييم فعالية ثلاثة مخففات محلية لتجميد المني الماعز .

الهدف الرئيسي للدراسة هو مقارنة هذه المخففات فيما يتعلق بالحفاظ على قابلية البقاء وجودة حيوانات المنوية بعد التجميد. ستساهم النتائج المحصل عليها في تحسين بروتوكولات التجميد البارد وتحسين أداء المني المستخدم في برامج تربية الماعز. ستساهم هذه الأبحاث في الاستدامة والحفاظ على الموارد الوراثية للماعز في الجزائر

كلمات مفتاحية: التلقيح الاصطناعي، الجينات القيمة، التجميد البارد، المني

Liste des figures

Figure 01 : Appareil génital du bouc

Figure 02 : représentation d'un testicule avec l'épididyme (source : Baril et al., 1993)

Figure 03 : Glandes annexes chez les mâles des mammifères : exemple du verrat (source : BARIL et al., 1993)

Figure 03 : Spermatogenèse (Source: Blancou et al., 2011)

Figure 04 : Régulation et contrôle de la spermatogenèse (source : PHILIPPE et al., 2011).

Figure 05 : Cniaag (Ennahare online ; 2015)

Figure 06 : caprin de race arabia

Figure 07 : spectrophotométrie

Figure 08 : microscope optique

Figure 09 : Logiciel de traçabilité de la semence

Figure 10 : Dispositif de mise en paillette

Figure 11 : machine de refroidissement programmable Minidigitcool d'IMV Technologies®

Figure 12 : récolte de la semence caprine par électro-éjaculateur

Figure 13 : disposition d'une goutte de la semence sur une lame

Figure 14 : décongélation les paillettes

Figure 15 : les colorants éosine négrosine

Figure 16 : observation de la viabilité des spermatozoïdes après la coloration

Liste des tableaux

Tableau 01 : Concentration moyenne des principales composantes du plasma séminal chez le bouc Adapté de Maher G et al (2012)

Tableau 02 : motilité massale (FAO, 1993)

Tableau 03 : motilité individuelle (FAO, 1993)

Liste des abréviations

BUSpg60 : bulbo-urétral secretion glycoprotéique de 55-60 kilodaltons

CASA : Computer Assisted Semen Analysis

CNIAAG : Centre Nationale d'insémination artificielle et de l'amélioration génétique

EYCE: Egg Yolk Coagulating Enzyme

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GNRH : Gonadotropin Releasing Hormone

IA : Insémination Artificiel

ITELV : Institue des techniques d'élevages

LH: Luteinzing Hormone

PLA2: phospholipase A2

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre I Anatomie et physiologie de la reproduction chez les boucs | 3 |
| Anatomie de l'appareil génital male | 3 |
| I.1. Les testicules | 3 |
| I.2. L'épididyme | 4 |
| I.3. Les glandes annexes | 5 |
| II. La spermatogénèse..... | 6 |
| II.1. Spermatogénèse | 6 |
| II.2. Méiose..... | 6 |
| II.3. Spermiogénèse | 6 |
| II.4. Le contrôle neuroendocrinien de la spermatogénèse | 8 |
| III.1. La puberté..... | 9 |
| I.1. La saisonnalité..... | 9 |
| II. Composition de la semence du bouc..... | 10 |
| II.1. Les spermatozoïdes | 10 |
| II.2. Plasma séminal | 10 |
| Enzyme EYCE..... | 11 |
| BUSpg60 | 11 |
| Chapitre II Cryobiologie | 13 |
| I. Introduction..... | 13 |
| II. Historique cryoconservation dans la médecine vétérinaire | 13 |

| | |
|---|----|
| III. Intérêt de la cryoconservation dans la reproduction..... | 14 |
| IV. Protocole de cryoconservation chez les boucs | 15 |
| IV.1. Collection des semences | 15 |
| IV.1.1. Sélection des reproducteurs | 15 |
| IV.1.2. Collecte du sperme..... | 16 |
| IV.1.2.1. Le vagin artificiel..... | 16 |
| IV.1.2.2. L'électro-éjaculateur | 16 |
| IV.2. Évaluation de la qualité du sperme | 16 |
| IV.2.1. Examen macroscopique | 16 |
| IV.2.1.1. Volume De L'éjaculat..... | 16 |
| IV.2.1.2Couleur et consistance du sperme..... | 17 |
| IV.2.2. Examen microscopique..... | 17 |
| IV.2.2.1. Motilité massale | 17 |
| IV.2.2.2 Mobilité individuelle..... | 18 |
| IV.2.2.3. Concentration de semence | 19 |
| IV.3. Préparation et conservation de semence | 19 |
| IV.3.1. Composition du milieu de dilution | 19 |
| IV.3.1.1. Les cryoprotecteur | 20 |
| IV.3.1.1.1. Les cryoprotecteur pénétrants | 20 |
| IV.3.1.1.2. Les cryoprotecteur non pénétrants | 21 |
| IV.3.1.1.2.1. Jaune d'œuf..... | 21 |
| IV.3.1.1.2.2. Lait écrémé | 22 |
| IV.3.1.2Les substances nutritives | 23 |
| IV.3.1.3. Les antibiotiques | 23 |
| IV.3.1.4. Substance tampon | 23 |
| IV.4. Conservation de la semence..... | 24 |
| IV.4.1. Conservation à court terme | 24 |

| | |
|---|----|
| IV.4.2. Cryoconservation à long terme | 25 |
| IV.4.2.1. Congélation lente | 26 |
| IV.4.2.2. Congélation rapide | 27 |
| IV.4.2.2 Les dommages cellulaires liés aux congélations | 27 |
| A. Les dommages liés à la cristallisation | 27 |
| B. Les dommages liés à la pression osmotique | 28 |
| IV.5. Entreposage..... | 28 |
| IV.6. Décongélation | 29 |
| Partie expérimentale | 30 |
| I. L'objectif : | 30 |
| II. Matériels et méthodes | 30 |
| A. Matériels | 30 |
| 1. Lieux de l'expérimentation..... | 30 |
| 2. Animaux | 30 |
| 3. Semence..... | 30 |
| 4. Cryoprotecteur | 30 |
| A. A base de jaune d'œuf..... | 30 |
| B. A base de lécithine (origine animal) | 31 |
| C. A base de lécithine et de complexe de vitamine | 31 |
| 5. Matériels d'évaluation de la concentration et de la qualité avant et après conservation. | 31 |
| 6. Matériels de conditionnement de la semence pour la congélation | 31 |
| 7. Outils de congélation classique | 32 |
| B. Méthode | 32 |
| 1. Récolte de la semence de bouc | 32 |
| 2. Évaluation de la semence fraîchement récoltée..... | 34 |
| a. Détermination de la motilité massale | 34 |
| b. Détermination de la mobilité individuelle | 34 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 3. Protocole de conservation..... | 34 |
| a. Dilution | 35 |
| b. Mise en paillette | 35 |
| c. Équilibration | 35 |
| d. Congélation..... | 36 |
| e. Décongélation | 36 |
| f. Évaluation de la semence | 37 |
| III. Les résultats | 38 |
| 1. Viabilité des spermatozoïdes | 38 |
| 2. La motilité massale..... | 39 |
| IV. Discussion..... | 39 |
| V. Conclusion..... | 42 |
| VI. Recommandation..... | 42 |

Introduction

En Algérie, l'élevage caprin compte parmi les activités agricoles les plus traditionnelles associées à l'élevage ovin. Il demeure marginal par rapport aux élevages bovins et ovins si bien que sa population ne représente que 13% du cheptel national (**Meskini ; 2017**).

Depuis quelques années, un engouement pour l'espèce caprine s'est manifesté de la part des agriculteurs, en raison de la forte demande de ses produits par les consommateurs : viande, lait et produits dérivés dont les valeurs diététiques et gustatives sont bien connues. Afin de favoriser le développement et l'amélioration de la filière caprine en termes génétiques et de production, il est essentiel d'adopter de nouvelles approches de gestion, notamment, par l'introduction de l'insémination artificielle (IA) dans les élevages.

En effet, l'IA est un bon moyen de diffuser, rapidement et à grande échelle, les gènes précieux de l'espèce, par la semence male. Cela sous-entend le maintien en vie des spermatozoïdes pour une durée indéfinie afin qu'ils puissent assurer leur impact génétique dans les espaces les plus lointains. Pour atteindre cet objectif, la cryopréservation du sperme à de températures négatives sur une durée indéterminée est toute indiquée. Cela nécessite l'aide des cryoprotecteurs qui permettent la survie des spermatozoïdes, pendant de longues périodes, sans en altérer la viabilité et la fécondité. Si bien qu'elle est utilisée pour préserver la diversité génétique des espèces ou races rares ou menacées d'extinction, pour garantir la disponibilité du matériel génétique de haute valeur pour l'amélioration génétique future, la conservation des caractéristiques uniques des races caprines locales, contribuant ainsi à la durabilité et à la préservation de ces précieuses ressources génétiques.

Le processus de cryoconservation de la semence est réalisé dans des conditions extrêmes de températures négatives (-196°C) mettant à rude épreuve le gamète male dont la survie est due à l'efficacité des composants biologiques utilisés dans le milieu de conservation qui permettent sa stabilité.

Depuis de nombreuses années, des équipes de recherche tentent de trouver la meilleure formule chimique pour conserver le spermatozoïde à des températures négatives en proposant

diverses molécules biologiques pour maintenir la stabilité de la cellule au niveau membranaire. Il est clair que l'efficacité des milieux proposés varie d'une équipe à une autre si bien que la recherche dans ce domaine se poursuit pour atteindre des niveaux d'efficacité élevé et économiquement acceptables.

En Algérie, les composants des milieux de conservation sont importés à ce jour. Cette dépendance s'est faite ressentir lors de la pandémie de la COVID19 comme pour tous les produits importés. De ce fait une nouvelle politique des autorités du pays est mise en place pour encourager la production locale afin de réduire la facture d'importation.

Dans ce contexte, j'ai eu la chance d'intégrer une équipe de recherche qui travaille, dans le cadre d'un PNR (Projet National de Recherche), sur la mise en place, localement, d'un milieu de conservation en comparant l'efficacité de trois dilueurs sur de qualité des spermatozoïdes caprins après congélation.

Chapitre I Anatomie et physiologie de la reproduction chez les boucs

Anatomie de l'appareil génital male

Les organes reproducteurs du bouc comprennent les testicules, les épидидymes, les glandes annexes et les organes d'évacuation.

Dans le système reproducteur male, chaque organe joue un rôle spécifique. Les testicules, dont l'activité est régulée par les sécrétions gonadotropes de l'hypophyse, produisent principalement les spermatozoïdes et la testostérone. Les spermatozoïdes passent du testicule à l'épididyme, où ils deviennent mobiles et fécondants, et où ils sont stockés. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont propulsés à travers le canal déférent et l'urètre, où ils se mêlent aux sécrétions des glandes annexes pour former l'éjaculat (**Baril et al ; 1993.**)

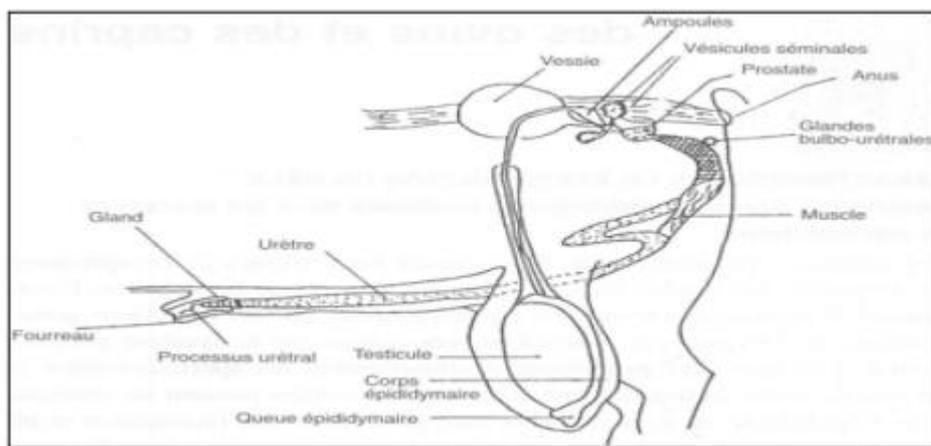


Figure 01 : Appareil génital du bouc

I.1. Les testicules

Les testicules sont situés à l'extérieur de la cavité abdominale, en position sous-inguinale, de sorte que leur température est inférieure de 3 à 5°C à celle du corps, condition nécessaire à une spermatogenèse normale chez les ruminants. Les testicules sont dits pendulaires car ils sont de forme ovale et verticale. Chez le bouc adulte, le testicule moyen a une hauteur de 7,5 à 11,5 cm et une largeur de 3,8 à 6,8 cm. La circonférence scrotale, correspondant à la mesure du diamètre maximal, est de 28 à 30 cm. Ces mesures varient en fonction de la saison sexuelle (**Smith et Sherman ; 1994**)

Le cordon testiculaire relie le testicule à la cavité abdominale : il est constitué du canal déférent pour le transit des spermatozoïdes et du cône vasculaire qui assure la vascularisation

et l'innervation du testicule. Le plexus pampiniforme est un réseau d'anastomoses veineuses qui assurent le refroidissement du sang artériel (**Smith et Sherman ; 1994**).

I.2. L'épididyme

L'épididyme est un organe allongé, aplati le long du testicule, et composé de trois parties : la tête, le corps et la queue. Il est constitué d'un très long système canaliculaire enroulé, commençant par les différents canalicules, qui se rejoignent au niveau du corps de l'épididyme pour former un canal unique, le canal épидидymaire, qui peut mesurer jusqu'à 60 mètres de long chez la chèvre. L'épididyme est responsable du stockage des spermatozoïdes, de leur transport vers les organes éjaculateurs et de leur maturation (acquisition de la mobilité et de la fertilité) (**Barone ; 1978**).

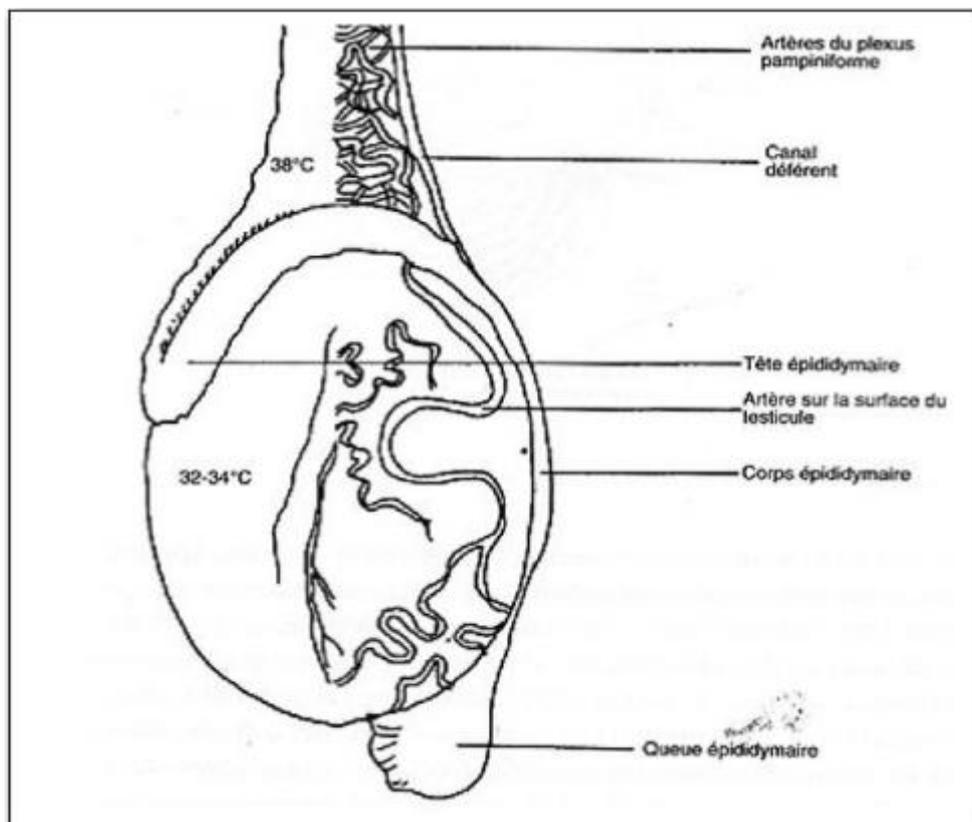


Figure 02 : représentation d'un testicule avec l'épididyme (**Baril et al ; 1993**)

I.1. Les glandes annexes

Les ampoules : sont des dilatations de l'extrémité urétrale du canal déférent. C'est aussi un lieu de stockage pour les spermatozoïdes avant l'éjaculation.

Les vésicules séminales : situées de chaque côté de l'attache de la vessie. Ils élaborent la majeure partie du plasma séminal.

La prostate : est diffuse et ne pénètre pas la couverture musculaire de l'urètre

Les glandes de Cowper : appelées aussi glandes bulbo-urétrales. Elles sont situées dans la région caudale de l'urètre. Bien que très petites (de la taille d'une noisette), quelques-uns de leurs produits de sécrétion sont importants du point de vue qualitatif, en particulier chez le bouc.

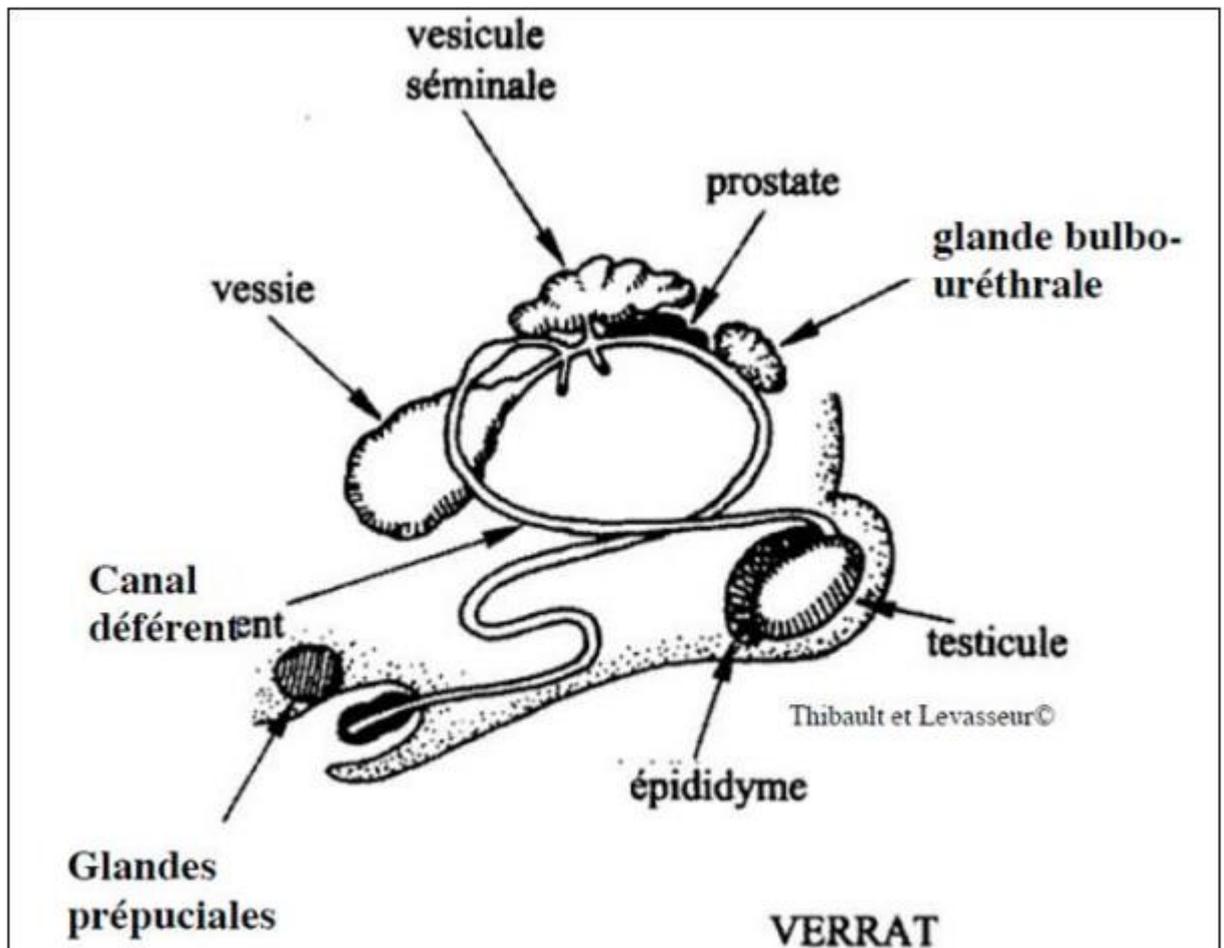


Figure 03 : Glandes annexes chez les mâles des mammifères : exemple du vertrat (BARIL et al ; 1993)

II. La spermatogénèse

La spermatogénèse chez les boucs est un processus continu qui débute à la puberté. Il se déroule dans les tubes séminifères, où les cellules germinales de la lignée spermatogénique interagissent avec les cellules de soutien appelées cellules de Sertoli (**Thibault, C, Levasseur, M ; 2001**)

II.1. Spermatogénèse

La spermatogonie souche chez les boucs constitue le stock de renouvellement à partir duquel les différentes lignées spermatogénétiques sont initiées tout au long de la vie reproductive du mâle adulte. Les spermatogonies sont des cellules essentiellement diploïdes ($2n = 60$ chez le bouc) et sont désignées comme Ad (sombres, type A). Par mitose, elles se divisent en une spermatogonie Ad et une spermatogonie Ap (pâle, type A), également appelée "poussièreuse". La division de cette dernière donne les spermatogonies B, également appelées "croûteuses". Les spermatogonies croûteuses subissent une à trois divisions supplémentaires pour produire des "spermatocytes du premier ordre" ou "spermatocytes I" (**George G ; 1996**)

II.2. Méiose

Une fois transformé en spermatocyte primaire, le spermatocyte I devient une grande cellule ovale et réplique son ADN avant d'entrer en méiose. Pendant cette étape, le phénomène de crossing-over se produit, ce qui permet l'échange de portions de chromosomes entre les parents maternels et paternels, contribuant au brassage génétique caractéristique de la reproduction sexuée. La première division de méiose réduit le nombre de chromosomes et donne des spermatocytes de deuxième ordre, appelés spermatocytes II. Ces cellules subissent rapidement la deuxième division de méiose, qui sépare les deux chromatides des chromosomes pour produire des cellules haploïdes appelées spermatides. (**Meskinia, 2017**)

II.3. Spermiogénèse

La spermiogénèse est l'étape de différenciation cytoplasmique : les spermatides se transforment en spermatozoïdes avec de nombreuses modifications structurales et chimiques. On distingue quatre phases : les phases de golgi, de capuchon, d'acrosome et de maturation. Les vésicules de Golgi fusionnent et se concentrent sur la partie antérieure du noyau pour former l'acrosome. Les centrioles s'orientent à l'opposé de l'acrosome pour donner naissance au flagelle. Les mitochondries se déposent en antérieure du noyau pour former l'acrosome.

Les centrioles s'orientent à l'opposé de l'acrosome pour donner naissance au flagelle. Les mitochondries se déposent en anneau autour des filaments du flagelle, tandis que le cytoplasme résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli sous la forme d'une gouttelette cytoplasmique.

La spermiogenèse est définie comme l'ensemble des modifications nucléaires et cytoplasmiques survenant entre les spermatides et les spermatozoïdes. Il s'agit d'une étape essentielle qui conditionne la qualité finale des gamètes

Réorganisation du noyau

Il s'aplatit latéralement, se déplace vers le pôle acrosomique et sa condensation se poursuit.

Développement du système acrosomique

Au pôle antérieur du noyau, les vésicules du système golgien s'étalent pour former l'acrosome

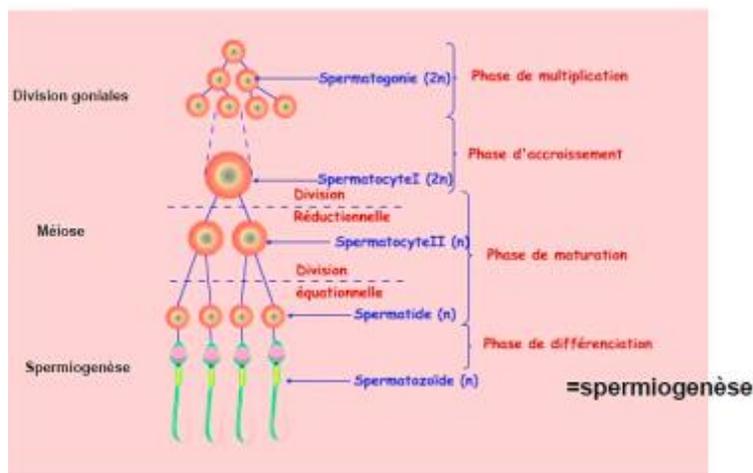
Assemblage des structures du flagelle

Les formations flagellaires apparaissent à partir du col marqué par le centriole distal

Spermiation

C'est l'étape finale de la spermatogenèse : la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère

Figure 03 : Spermatogenèse (Blancou et al ; 2011)



II.4. Le contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse

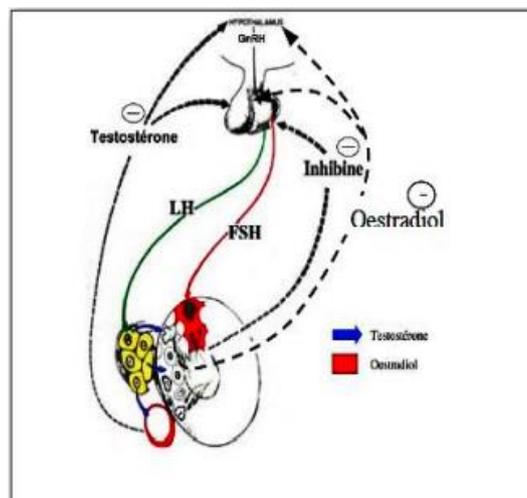
La fonction de reproduction est contrôlée par le système nerveux central via l'axe hypothalamo-hypophysaire. Plusieurs facteurs environnementaux, dont la photopériode, agissent sur le système nerveux central (Meskini Z ; 2017).

L'initiation et le maintien de la spermatogenèse dépendent des hormones hypophysaires gonadotropes. Cependant, alors que la FSH exerce ses effets directement sur l'épithélium séminifère, la LH exerce son effet stimulant indirectement, via la testostérone produite par les cellules de Leydig. Mais il est admis que la prolactine est également impliquée (Meskini Z ; 2017).

La GnRH est sécrétée de façon pulsatile par les neurones hypothalamiques, l'hypophyse sécrétant deux autres hormones, la FSH et la LH. FSH et LH. La LH est libérée par impulsions, séparées par des périodes de repos pendant lesquelles la sécrétion basale est enregistrée. Ces changements brusques de la concentration plasmatique de LH entraînent une stimulation rapide des cellules de Leydig, qui réagissent en libérant de la testostérone dans la circulation sanguine. Chaque impulsion de LH est suivie d'une impulsion de testostérone, dont l'amplitude varie en fonction de la situation physiologique de l'homme.

La FSH est sécrétée d'une manière complexe et semble être continue plutôt qu'épisodique. La FSH assure le bon déroulement de la spermatogenèse en stimulant d'une part la production de testostérone et d'autre part la synthèse de l'ABP par l'intermédiaire des cellules de Sertoli.

Figure 04 : Régulation et contrôle de la spermatogenèse (PHILIPPE et al ; 2011).



III. Aspect spécifique de la reproduction chez les boucs

III.1. La puberté

La puberté est associée à une augmentation de la sécrétion de testostérone, de la spermatogénèse et du comportement sexuel. La copulation et l'éjaculation de spermatozoïdes viables ont lieu à l'âge de 4 à 6 mois, lorsque le poids corporel du jeune bouc représente 40 à 60 % du poids vif de l'adulte. L'activité sexuelle du bouc est influencée par la longueur du jour. Le pic d'activité sexuelle coïncide avec l'augmentation de la testostérone plasmatique qui se produit en automne (**Zarouk A et al ; 2001**).

Entre 4 et 6 mois, **Guillot J (2002)** a observé une augmentation rapide de la qualité et de la quantité de sperme chez les chevreaux alpins et poitevins. Ce stade marque la transition entre la puberté (éjaculation des premiers spermatozoïdes) et la maturité sexuelle (production des premiers éjaculats de bonne qualité), permettant l'utilisation des animaux pour la reproduction.

L'âge de la puberté varie en fonction de la saison de mise bas. Les chevreaux nés au printemps ont une puberté plus précoce que ceux nés en automne, en relation avec la saison sexuelle (**Guillot J ; 2002**).

I.1. La saisonnalité

Chez les boucs, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la production de sperme varient au cours de l'année en fonction de la photopériode. La qualité des éjaculats est également influencée par la saison, avec une meilleure mobilité des spermatozoïdes et un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes mobiles pendant la saison sexuelle. En revanche, le nombre d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes augmente pendant la contre-saison. Les variations saisonnières de l'activité sexuelle sont contrôlées par la durée de sécrétion de la mélatonine, qui est synchronisée avec la durée de la nuit. La mélatonine agit sur la sécrétion de GnRH, affectant ainsi la fonction de reproduction. Un traitement photopériodique permet de supprimer les variations saisonnières de l'activité sexuelle chez les mâles, tels que les béliers ou les boucs. (**Delgadillo Sanchez ; 1990**).

II. Composition de la semence du bouc

II.1. Les spermatozoïdes

Toute anomalie conduit au déclassement de la qualité de la semence. Sous microscope optique, il est possible de les visualiser :

- Spermatozoïdes sans queue.
- Spermatozoïdes présentant une anomalie de la tête (acrosome anormal, tête petite ou étroite, tête en forme de poire, etc. tête en forme de poire, etc.)
- Spermatozoïdes présentant des flagelles anormaux.
- Spermatozoïdes présentant une gouttelette cytoplasmique proximale.
- Spermatozoïdes présentant une gouttelette cytoplasmique distale.

II.2. Plasma séminal

Il s'agit d'un liquide complexe sécrété par l'épididyme et les glandes annexes lors de l'éjaculation. Son but est de transporter les spermatozoïdes de tractus génital male vers les voies génitales femelle. Les sécrétions des glandes annexes représentent 50 à 95 % du plasma. **(thibault C , Levasseur ; 2001)**

Les principales composantes du plasma séminal de la semence de boucs sont caractérisées dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Concentration moyenne des principales composantes du plasma séminal chez le bouc
Adapté de **Maher G et al (2012)**

| Composantes | Concentration moyenne |
|---|--|
| Riboflavine | Jaune : 5,38 ul / mL |
| (Varie selon la coloration de la semence) | Jaune pâle : 3,09 ul /mL Blanc : 1,72 ul / 100 mL |
| Fructose | 857 mg / 100 MI |
| Acide acitique | 331 mg / 10 mL |
| Acide lactique | 73 mg / 100 mL |
| Glucose | 6,7 mg / 100 mL |
| Glycérylphosphorylcholine | 191 mg / 100 mL |
| L-alpha-glycérophosphate | 3,3 mg / mL |
| Glycérol | 1,76 mg / 100 mL |

Enzyme EYCE

Le plasma séminal de la semence de bouc est caractérisé par la présence de l'EYCE << Egg Yolk Coagulating Enzyme ". Cette enzyme a été identifiée comme une phospholipase A2 (PLA2), sécrétée par les glandes bulbo-urétrales sous l'influence des saisons (**Maher G et al ; 2012**). Le jaune d'œuf est fréquemment utilisé comme base diluant pour le sperme de bouc dans les processus de cryoconservation. Au contact du jaune d'œuf, le plasma séminal EYCE hydrolyse les phospholipides de l'œuf et la membrane phospholipidique des spermatozoïdes, libérant un acide gras insaturé et un lysophospholipide, la lysolécithine. Ce dernier composé a des effets différents sur l'intégrité des spermatozoïdes, qui dépendent non seulement de sa concentration dans le plasma séminal, mais aussi du pH du plasma séminal, de la température et de la saison de production des semences. Par conséquent, la concentration de lysolécithine aura différents impacts sur l'intégrité des spermatozoïdes. Une faible concentration de lysolécithine permet d'activer la motilité (**Maher G ; 2012**)

BUSpg60

Le SBU III est une glycoprotéine de 55-60 kda nommée BUSgp60 **par Pellicer (1995)**. Selon **Leboeuf et al. 2003**, dans un environnement lacté, il provoque une détérioration de la motilité, de la qualité du mouvement, de l'intégrité de l'acrosome et même la mort des spermatozoïdes. Son action toxique consiste à hydrolyser les triglycérides du lait, les transformant en acides gras dont l'acide oléique (le composé toxique) (**Pellicer et Combarous ;1998**).

On a découvert que BUSgp60 ressemble à la lipase pancréatique de type 2 : PLRP2 (Pancreatic Lipase Related Proteins 2) (**Pellicer et al., 1997 ; Sias 2000**). Contrairement aux lipases conventionnelles, qui hydrolysent sélectivement les triglycérides, la PLRP2 possède à la fois des activités phospholipase (**Thirstrup et al ; 1994**) et galactolipase (**Andersson et al 1996**)

Les recherches menées par Sias en 2000 ont montré que la protéine BUSgp60 est active dans le jaune d'œuf. En 2003, LeBoeuf a suggéré que la phospholipase A de l'EYCE et BUSgp60 pourraient être une seule et même enzyme.

Chapitre II CRYOBIOLOGIE

I. Introduction

Cette technique est utilisée pour préserver des cellules et des tissus vivants structurellement intacts en utilisant des températures très basses. L'origine de la cryoconservation remonte à 1776, lorsque Spallanzani a congelé du sperme dans la neige et a démontré sa motilité après le réchauffement. Un siècle plus tard, Mantegazza a rapporté la survie de spermatozoïdes humains congelés à -17 °C pendant plus de 4 jours (**Curry., 1995**)

La cryobiologie est la science qui étudie les effets des basses températures sur les cellules vivantes et ses domaines d'application. Elle a fait l'objet d'expérimentations depuis au moins 1787 (**Luyet et Gehenio, 1940**). C'est un domaine multidisciplinaire qui rassemble les recherches et les avancées réalisées dans les laboratoires de theriogenologie, de biologie moléculaire, d'ingénierie, de médecine humaine et vétérinaire, ainsi que dans l'élevage d'animaux terrestres et marins (**Royere et al., 1996**).

Elle permet de stocker des échantillons biologiques pour des études ultérieures, de préserver des lignées cellulaires et des modèles animaux génétiquement modifiés, ainsi que de faciliter le transport et le partage de matériel biologique entre les laboratoires (**Fahy, G.M. et al. 2014**)

Historique cryoconservation dans la médecine vétérinaire

En médecine vétérinaire, la préservation du sperme est étroitement liée au développement de l'insémination artificielle (IA). Le premier rapport sur la cryoconservation du sperme remonte à 1776, avec les travaux du prêtre italien et physiologiste Spallanzani, qui a tenté de congeler le sperme en utilisant de la neige (**Spallanzani., 1776**) et qui a réalisé la première insémination réussie chez un chien en 1785 (**Spallanzani.,1785**). Environ 100 ans plus tard, en 1885, Repiquet a publié son ouvrage intitulé "Sur les possibilités théoriques de l'utilisation pratique de l'insémination artificielle" à l'Académie Vétérinaire Française, posant ainsi les bases de l'application réussie de l'insémination artificielle en tant qu'outil de reproduction. Au cours du XXe siècle, le développement de l'insémination artificielle et la préservation du sperme ont connu des avancées significatives. À Moscou, Ivanov (**Ivanov II ;1907 ;1912**) a initié des recherches sur l'IA chez les moutons, et Milovanov (1927, cité par Salamon & Maxwell (**Salamon S et al ; 2000**)) a poursuivi ce travail. Dès 1927, l'IA a été utilisée dans de grands programmes d'élevage de bovins. La détection du jaune d'œuf pour éviter ou réduire les effets du choc thermique a été une étape importante dans l'utilisation à grande échelle du

sperme réfrigéré (Milovanov & Selivanova 1932, cité par Salamon & Maxwell (**Salamon S et al ; 2000**)). Bernstein et Petropavlovsky (**Bernstein AD et al;1937**) ont été les premiers à décrire l'utilisation d'une solution de glycérol à 9,2 % pour la cryoconservation de spermatozoïdes de mammifères (taureau, verrat, cobaye, lapin, bélier, étalon) et d'oiseaux (poule, canard). Les propriétés cryoprotectrices du glycérol ont été étudiées par Polge et al (**Polge C et al ; 1949**) ainsi que par Polge and Rowson (**Polge C et al;1952**)

II. Intérêt de la cryoconservation dans la reproduction

Préservation de la génétique précieuse : La cryoconservation permet de préserver la génétique de boucs de valeur, notamment ceux présentant des caractéristiques souhaitables telles que des traits de croissance, une meilleure résistance aux maladies ou une meilleure productivité laitière (**Sánchez-Ajofrín et al., 2018.**)

Diffusion de la génétique : La cryoconservation permet la conservation à long terme des semences, facilitant ainsi la diffusion de la génétique des boucs d'élite à travers une large population de chèvres. Cela contribue à améliorer la diversité génétique et la productivité globale du troupeau (**Kasapi et al., 2020**)

Flexibilité dans la planification de l'élevage : La cryoconservation des semences offre aux éleveurs caprins la possibilité de planifier la reproduction de manière plus flexible. Ils peuvent stocker les semences pendant une longue période et les utiliser au moment le plus opportun pour obtenir une meilleure synchronisation des chaleurs et optimiser les performances reproductives (**Berlinguer et al., 2020.**)

Prévention des pertes génétiques : La cryoconservation permet de sauvegarder la génétique des boucs en cas de maladies, de décès ou d'accidents. Cela aide à prévenir les pertes génétiques potentielles et à maintenir la diversité génétique de la population caprine (**Ortiz et al., 2020**)

Lutte contre les infections vénériennes : L'IA a également été introduite dans le but de lutter contre les infections vénériennes qui peuvent causer des avortements épidémiques chez les animaux, telles que Brucella et Tritrichomonas fetus. L'utilisation de techniques de conservation du sperme dilué et réfrigéré a déjà contribué à atteindre cet objectif. Cependant, c'est la cryoconservation du sperme qui permet un stockage à long terme et une disponibilité pratiquement illimitée du sperme

III. Protocole de cryoconservation chez les boucs

IV.1. Collection des semences

IV.1.1. Sélection des reproducteurs

Les donneurs de sperme doivent être choisis en fonction de leurs caractéristiques génétiques et de leur santé :

L'aptitude reproductrice de ces jeunes mâles est appréciée après regroupement des animaux en centre d'élevage, à partir de l'âge de 3 mois. La première étape dans le choix des mâles concerne leurs caractéristiques phénotypiques : sont éliminés les animaux présentant des défauts d'aplombs, des anomalies du tractus génital ou une croissance insuffisante au cours de la période 3 à 7 mois.

Lors de la seconde étape, les mâles sont sélectionnés sur leur aptitude à produire de la semence en grande quantité et présentant une bonne qualité suite aux opérations de congélation/décongélation. L'appréciation de la fonction de reproduction des jeunes mâles âgés de 7 à 9 mois, et entretenus en cases individuelles, est réalisée à partir des 15 premières sollicitations à la collecte au début de la première saison sexuelle. Au cours de cette période, les mâles sont sollicités à la collecte seulement 2 fois par semaine.

IV.1.2. Collecte du sperme

La semence de bouc est habituellement récoltée à l'aide d'un vagin artificiel ou par électroéjaculation. Alors que la première méthode nécessite l'entraînement des boucs à la collecte, la seconde peut s'effectuer sur des boucs inexpérimentés à la récolte

IV.1.2.1. Le vagin artificiel

Le vagin artificiel est constitué d'un entonnoir en silicone fixé à une extrémité à un tube en caoutchouc gonflé d'eau à une extrémité à un tube en caoutchouc rempli d'eau à 37°C et à l'autre à une éprouvette graduée remplie d'eau à 37°C. Les vagins artificiels sont conservés dans une armoire maintenue à 37°C avant utilisation. Avant le prélèvement, le fourreau du bouc et son intérieur doivent être soigneusement nettoyés avec une solution saline de NaCl à 0,9% (**Baril et al., 1993**). Le bouc est amené derrière la chèvre en chaleur qui est immobilisée. La récolte se fait à l'intérieur du vagin artificiel en interceptant le pénis en érection. Le sperme frais doit être conservé à 37°C pour l'analyse.

IV.1.2.2. L'électro-éjaculateur

L'électro-éjaculateur est un appareil composé d'une sonde rectale (longueur 26 cm, diamètre 2,5 cm) et d'un système électronique permettant d'envoyer des impulsions électriques cycliques par l'intermédiaire de la sonde. Ces impulsions stimulent la sphère génitale, en excitant la zone médullaire lombosacrée et donc les zones déterminant l'érection et l'éjaculation. Bien que la fertilité du sperme recueilli soit similaire à celle obtenue avec le vagin artificiel, certaines données récentes suggèrent que le sperme de bélier obtenu par induction électrique est plus sensible au choc froid et présente une moins bonne résistance des spermatozoïdes à la réfrigération et à la congélation (**Kamli et Saidni., 2016**).

IV.2. Evaluation de la qualité du sperme

L'évaluation de la qualité spermatique est indispensable à réaliser avant toute utilisation de la semence pour détecter d'éventuelle anomalies de spermatozoïdes (**Posiere, 2002**)

IV.2.1. Examen macroscopique

IV.2.1.1. Volume De L'éjaculat

Le volume de l'éjaculat est estimé soit par lecture directe sur des tubes gradués soit par pesée. Le volume est en moyenne de 0.5 à 2ml chez le bouc avec une grande variabilité d'un éjaculat à l'autre et d'un mâle à l'autre (**Refsal 1986**)

IV.2.1.2. Couleur et consistance du sperme

Chez la plupart des espèces animales, la couleur du sperme peut varier du blanc clair aujaune brillant (**Ezekwe, 1988**).

Chez le bouc, le sperme est de couleur blanc jaunâtre. Cette coloration est due à la présence d'un pigment lipochrome élaboré par la vésicule séminale. La couleur des spermatozoïdes peut être modifiée pour des raisons physiologiques (concentration) mais le plus souvent pathologiques.

Chez les caprins, le sperme est un liquide épais, crémeux, inodore et assez visqueux (**Marquis, 1990**).

La consistance de la semence est fonction du rapport entre les spermatozoïdes et le plasma séminal. Ainsi, le sperme de forte consistance contient beaucoup plus de spermatozoïdes que celui de faible consistance (**Salamon, 1976 ; Hafez, 1987**).

IV.2.2. Examen microscopique

IV.2.2.1. Motilité massale

Cette manipulation est très facile à réaliser et l'opérateur n'a besoin que d'un microscope équipé d'une platine chauffante maintenue à une température de 37-38°C et de lames en verre. La motilité massale du sperme pur diminue rapidement à cette température, généralement en 15 à 20 secondes, donc l'examen microscopique est réalisé immédiatement après la récolte de la semence.

L'observation se fait avec un grossissement de x80, en plaçant simplement une goutte de sperme sur la lame, sans la recouvrir d'une lamelle. Cette méthode permet d'évaluer la motilité massale des spermatozoïdes et de distinguer les échantillons avec des spermatozoïdes mobiles de ceux où ils sont peu mobiles ou immobiles.

Tableau 02 : motilité massale (FAO, 1993)

| Notes | Aspect des mouvements |
|-------|---|
| 0 | Immobilité totale. |
| 1 | Mouvements individualisés. |
| 2 | Mouvements très lents. |
| 3 | Motilité massale générale de faible amplitude |
| 4 | Motilité massale rapide, sans tourbillons. |
| 5 | Motilité individuelle |

IV.2.2.2. Mobilité individuelle

L'examen de la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez les caprins implique l'observation individuelle de chaque spermatozoïde avec la possibilité de les classer en fonction de leur vitesse, de leur rectitude et de leurs mouvements latéraux. Ce processus est réalisé à l'aide d'un grossissement de x200 et d'une platine chauffée à une température de 37-38°C. Dans cette technique, le sperme est dilué à des concentrations de 60 à 200 millions de spermatozoïdes par millilitre. Ensuite, il est placé entre une lame et une lamelle. La motilité individuelle est évaluée sur une échelle de 0 à 5, tout comme la motilité en masse. **(Lyna et al ;2016)**

Tableau 03 : motilité individuelle (FAO, 1993)

| Notes | Motilité individuelle |
|-------|--|
| 0 | Pas de déplacement de spermatozoïdes. |
| 1 | Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblement spermatozoïde, oscillation de la queue |
| 2 | Déplacement lent, tremblement, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement. |
| 3 | Les spermatozoïdes effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement. |
| 4 | Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autre avec une trajectoire courbe |
| 5 | Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes. |

IV.2.2.3. Concentration de semence

L'évaluation de la concentration de semence chez les caprins peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes. L'une des méthodes couramment utilisées est la méthode de comptage au microscope, où un échantillon de sperme est dilué et une quantité spécifique est placée sur une lame de microscope. Les spermatozoïdes sont ensuite comptés dans un certain nombre de champs de vision pour déterminer la concentration. Une autre méthode est l'utilisation d'un spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance du sperme dilué, ce qui permet d'estimer la concentration. (Lyna et al ;2016)

IV.2.3 CASA

CASA est un système d'analyse de la semence assistée par ordinateur. Cette méthode permet d'obtenir des résultats précis sur la moyenne de spermatozoïdes mobiles et la qualité de leurs mouvements. Il suit aussi chaque spermatozoïde dans le temps et l'espace. Plusieurs paramètres peuvent être étudiés grâce à ce procédé, ceux qui nous ont intéressés dans notre recherche sont : ALH, VSL, VCL, BCF, VAP. CASA utilise la comparaison de ces paramètres pour détecter les spermatozoïdes capacités. Ces tests peuvent être appliqués sur un semence fraîche, réfrigérée ou congelée (Rijsselaere et al., 2005; Allimant, 2010).

IV.3. Préparation et conservation de semence

Après l'évaluation de la qualité de la semence et confirmé que la qualité de la semence est satisfaisante, la concentration et la motilité sont adéquates, la semence caprine peut être directement diluée avec le dilueur contenant les cryoprotectants dans des proportions appropriées pour atteindre la concentration souhaitée pour la cryoconservation

IV.3.1. Composition du milieu de dilution

Les chercheurs qui s'intéressent à la conservation des semences ont rapidement souligné la nécessité de diluer les semences dès leur récolte, sinon leur durée de conservation n'excède pas une heure ou deux (Katila, 1997) et leur pouvoir fertilisant est fortement réduit.

Il n'existe pas de composition idéale de diluant. Mais les diluants contiennent des agents cryoprotecteurs pénétrants ou non pénétrants dont le rôle est la survie des spermatozoïdes

. D'autres composés sont également présents dans les diluants tels que les antibiotiques, les nutriments tels que les sucres et les sels, et même les sels et les détergents. **(Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponthier et al.2014 ; et al. 2011).**

Le diluant doit avoir plusieurs propriétés pour améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique avec le sperme pour éviter les chocs osmotiques, avoir un pH compatible avec la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée (300mOsm /L avec un ph de 7,4 à 7,6), avoir une action stabilisante et protectrice des membranes, contenir des substances nutritives comme les sucres et des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser **(Barbas et Mascarenhas 2009 ; Hanzen 2014).**

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Un nombre de spermatozoïdes d'au moins 200 millions par dose d'insémination artificielle doit être obtenue, avec un volume maximum de 1/3 de sperme pur pour 2/3 de dilueur **(Isabelle., 2013)**

IV.3.1.1. Les cryoprotecteur

Un cryoprotecteur peut être défini comme un additif qui permet un meilleur taux de survie des cellules après décongélation qu'un milieu sans cryoprotecteur. Plus précisément, la présence d'un cryoprotecteur limite la formation de cristaux de glace. **(Fuller BJ,2004)**

IV.3.1.1.1. Les cryoprotecteur pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants ont un faible poids moléculaire et sont perméables à la membrane plasmique des spermatozoïdes **(Bakhach et al., 2007).**

Ils induisent des réarrangements lipidiques et protéiques de la membrane cellulaire, ce qui a pour effet d'augmenter la fluidité de la membrane, de moduler le niveau de déshydratation cellulaire et d'améliorer la survie pendant la cryoconservation. Ils remplacent également une partie de l'eau intracellulaire et se lient à l'eau restante, limitant ainsi la formation de glace à l'intérieur de la cellule (mais aussi à l'extérieur). **(Karima ; 2020)**

Après le glycérol, premier cryoprotecteur utilisé en 1949 (**Polge C, 1949**), d'autres cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG), le polyéthylène glycol (PEG) ou les amides ont été utilisés dans divers protocoles de congélation. L'avantage

Du DMSO et de l'EG est leur capacité à pénétrer rapidement les cellules, contrairement au glycérol qui pénètre lentement mais est moins toxique. En effet, malgré les propriétés protectrices de ces molécules, leur toxicité peut être importante lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations élevées. (**Fuller ; 2004**)

D'un point de vue osmotique, le glycérol est responsable de l'hyperosmolarité du milieu lorsqu'il est incorporé. Une forte concentration de glycérol peut conduire à un choc osmotique. Aussi, si l'on décongèle des cellules en utilisant un milieu hypo-osmotique, le glycérol n'a pas le temps de sortir de la cellule avant que l'eau n'y soit déjà massivement rentrée, ce qui peut provoquer l'éclatement de la cellule. D'un point de vue biochimique, le glycérol est capable de se lier aux phospholipides, réduisant ainsi la fluidité de la membrane et déplaçant les protéines qui y sont intégrées. Contrairement à la toxicité osmotique, la toxicité biochimique diminue au fur et à mesure que le temps de contact avec la cellule diminue. (**Gordon, 1997 ; Momlina, 1994 ; Singh, 1995**).

IV.3.1.1.2. Les cryoprotecteur non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants, qui sont des molécules hydrosolubles, sont généralement des saccharides ou des macromolécules (ficoll, dextran) qui ne peuvent pas traverser les membranes plasmiques des cellules. Ces saccharides ont la particularité de n'agir que sur le milieu extracellulaire, et d'avoir un effet osmotique plus limité que les cryoprotecteurs pénétrants (**Meryman HT ; 2007**)

Ils protègent les spermatozoïdes contre la perte de cholestérol et de phospholipides de la membrane en réduisant la liaison des protéines plasmatiques séminales à la membrane plasmique (**BERGERON, 2007**)

IV.3.1.1.2.1. Jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est un composant couramment utilisé pour conserver le sperme de nombreuses espèces. Il a un effet conservateur bien connu sur la mobilité, le métabolisme et la fertilité des spermatozoïdes conservés à +5°C (**Mayer et al, 1945 ; O'shea , 1967 ; Roberston , 1987**).

Le jaune d'œuf contient des composants, tels que les lipoprotéines, qui ont des propriétés cryoprotectrices. Ces composants aident à réduire la formation de cristaux de glace, protégeant ainsi les spermatozoïdes des dommages causés par la congélation.

Les phospholipides LDL forment un film protecteur à la surface des spermatozoïdes ou remplacent les phospholipides perdus ou endommagés dans leur membrane lors de la cryoconservation. (**Graham et al, 1978; Foulkes et al, 1980**).

La quantité de jaune d'œuf la plus fréquemment utilisée dans les dilueurs est de 20 %. La conservation des spermatozoïdes caprins avec leur liquide séminal (sperme) dans un dilueur à base de jaune d'œuf aurait été néfaste. En effet, la lécithine du jaune d'œuf est hydrolysée par la phospholipase A du liquide séminal en lysolécithine et en acides gras, qui ont un effet spermicide. D'autres inconvénients sont que la préparation du jaune d'œuf est un peu complexe, puisqu'il doit d'abord être étalé sur du papier absorbant pour éliminer tout résidu de blanc d'œuf, puis filtré une fois ajouter au dilueur, sans compter que le jaune d'œuf peut contenir des agents pathogènes. (**amari et al ; 2015**)

IV.3.1.1.2.2. Lait écrémé

Il est le composant de base de nombreux diluants. Il fournit aux spermatozoïdes des phosphates, des citrates et des sucres, a un pH proche de celui des spermatozoïdes et est facile et peu coûteux à préparer. (**Karima ; 2020**)

Le composant du lait censé protéger les spermatozoïdes semble être les caséines, les protéines les plus concentrées dans le lait (80% m/m) (**Amiot J, 2002, Farrell., 2004**). Des études montrent que les caséines isolées du lait protègent les spermatozoïdes de taureaux, d'étalons et de béliers pendant le stockage à 4-5°C (**Leboeuf et al, 2003**).

IV.3.1.2. Les substances nutritives

Les diluants de semence caprine préservent la qualité et la viabilité et longévité du sperme grâce à des substances nutritives telles que sels, sucres, acides aminés, vitamines et antioxydants

Les sucres comme le fructose et le glucose fournissent de l'énergie aux spermatozoïdes en produisant de l'ATP, essentiel à leur motilité et survie. Les acides aminés tels que la glutamine et l'arginine sont cruciaux pour le métabolisme des spermatozoïdes, fournissant les blocs de construction nécessaires à la synthèse des protéines et à leur survie. (**Kumar et al., 2016 ; Paiva et al., 2020**)

les vitamines comme vitamine C et vitamine E. Elle est considérée comme l'antioxydant le plus puissant. Elle est connue comme une substance efficace pour prévenir ou stopper la peroxydation des lipides membranaires en neutralisant les ERO. La vitamine E a été aussi considérée comme un composant stabilisateur de la membrane cellulaire, particulièrement pour les cellules ayant u taux élevées en acides gras polyinsaturés. Cette stabilité est liée à sa localisation dans les noyaux lipidiques et à ses liaisons avec les phospholipides (**Urano et al., 1987, 1988**).

IV.3.1.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont ajoutés aux diluants de semence caprine pour prévenir la croissance de bactéries indésirables et maintenir la qualité du sperme. Ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle des infections bactériennes potentiellement préjudiciables à la viabilité des spermatozoïdes pendant le stockage et le transport du sperme. La plupart du temp on utilise les associations pénicilline-streptomycine ou pénicilline-gentamicine (**Molinia, 1994**)

IV.3.1.4. Substance tampon

Le diluant doit contenir un tampon pour maintenir un PH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes (entre 6,7 et 7), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350

Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de TRIS ou de citrate de sodium (**Vishwanath R et al, 2000**)

Le trishydroxyméthylaminométhane est le plus couramment utilisé, en combinaison avec l'acide citrique. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible.

Les tampons phosphates, tels que le phosphate de sodium, sont également utilisés pour stabiliser le pH des diluants de semence caprine. Ils agissent en régulant les niveaux d'acidité

et d'alcalinité pour maintenir un pH approprié pour la survie des spermatozoïdes.

IV.4. Conservation de la semence

IV.4.1. Conservation à court terme

La conservation des spermatozoïdes par réfrigération consiste à abaisser la température des spermatozoïdes en présence d'un diluant pendant 48 heures, afin de maintenir les spermatozoïdes à des températures qui réduisent leur mobilité et leur métabolisme sans atteindre le seuil des températures négatives (**Decuado, 2004**).

La plupart des auteurs recommandent de centrifuger le sperme afin de minimiser le risque d'effets délétères du liquide prostatique (bien qu'il n'ait pas d'effets négatifs sur la motilité, la vitalité et l'intégrité acrosomique) sur les spermatozoïdes réfrigérés pendant une période plus longue.

Le sperme est refroidi à une température d'environ 4°C. Pour éviter un choc thermique, cette température doit être atteinte progressivement à une vitesse moyenne de refroidissement de 0,5°C/minute entre 37 et 22°C, et de 1°C/minute entre 22 et 4°C.

Le sperme peut conserver son pouvoir fécondant pendant 2 à 3 jours (**Hanzen, 2010**).

Afin de prolonger la survie et la capacité de fécondation des spermatozoïdes caprins réfrigérés à 4°C, l'utilisation d'un dilueur spécifique, tel que le jaune d'œuf ou le lait écrémé, est nécessaire. Ces dilueurs contenant des protéines offrent une protection et une stabilisation des membranes des spermatozoïdes, ce qui maintient la mobilité, la vitalité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes après la réfrigération. Les IA utilisant un dilueur montrent des taux de gestation significativement plus élevés par rapport aux IA sans dilueur pour la semence réfrigérée.

Les lésions de refroidissement (choc de froid)

Le changement de la température provoque des lésions cellulaires est communément appelé le choc au froid. Ce dernier survient entre la température du corps et une température proche de point de congélation. Au-dessous de la température +15 C°, les lésions du choc au froid sont plus sévères (**Amann et al, 1987**)

Dans des conditions physiologiques normales, les membranes cellulaires se trouvent dans une phase fluide, avec une conformation très désordonnée, dans laquelle les phospholipides et les protéines peuvent se déplacer de différentes manières à l'intérieur de la bicouche lipidique. En dessous de cette température de transition, la bicouche lipidique passe d'un état fluide à un état de gel compact, avec des chaînes d'AG pratiquement immobilisées, régulièrement ordonnées et proches les unes aux autres.

Le choc froid entraîne également la destruction de l'acrosome et la perte de son contenu, ce qui empêche le spermatozoïde de pénétrer dans l'ovocyte. Il augmente également la perméabilité membranaire, altérant l'équilibre hémodynamique de la cellule et sa capacité intracellulaire à réguler le calcium nécessaire à la fécondation (**Karow et al, 1997 ; Amann et al, 1987**).

La réduction de l'impact du choc froid nécessite un refroidissement lent et l'utilisation de substances protégeant les membranes. Le taux de refroidissement $<10^{\circ}\text{C/h}$ pourrait réduire considérablement les dommages causés par le choc froid, mais pas entièrement (**Karow et al, 1997**).

IV.4.2. Cryoconservation à long terme

La congélation est définie comme le processus de conservation des cellules à très basse température, souvent dans l'azote liquide à -196°C . Il s'agit d'une technique biotechnique qui arrête toutes les réactions chimiques, gelant ainsi les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires. (**Bakhach et al, 2007**)

La cryoconservation du sperme est utilisée dans un certain nombre de domaines : technologies de reproduction assistée (ART), conservation des espèces menacées, ou à des fins médicales en cas d'incapacité à se reproduire ou de décès. Il s'agit d'une biotechnologie importante pour prévenir la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, éliminer les barrières géographiques et préserver le matériel génétique d'un animal pendant une période théoriquement illimitée (**Neto et al. 2014 ; Day et Stacey 2007**).

IV.4.2.1. Congélation lente

En dessous de 5°C/min , la congélation est dite lente. C'est une technique qui a été développée en premier lieu pour les embryons (**Maurer RR ; 1978**), puis pour les PSC (**Li Y, Ma T ; 2012**,

Hunt C ; 2011). Elle est le plus souvent réalisée grâce à des congélateurs programmables permettant des cinétiques variant de 0,1°C/min à 45°C/min). Une solution moins coûteuse est l'exemple d'enceintes contenant de l'isopropanol et permettant d'obtenir une cinétique de 1°C/min.

Technique :

Des cellules (spermatozoïdes) sont placées dans un milieu isotonique et refroidies. Dans un premier temps, les cellules et le compartiment externe sont en surfusion, puis ce dernier va connaître une formation accrue de cristaux d'eau pure, entraînant une augmentation excessive des sels dissous, ce qui provoque un échappement de l'eau intracellulaire par osmose. Le milieu intracellulaire est toujours en surfusion en raison de la protection offerte par la membrane cytoplasmique et de la pression de vapeur élevée à l'intérieur des cellules, ce qui induit une déshydratation progressive des cellules. En plus de la pression de vapeur élevée à l'intérieur des cellules, ce qui induit une déshydratation progressive des cellules.

La déshydratation rapide des cellules réduit ou élimine la formation dommageable de glace intracellulaire lorsque les échantillons sont immergés dans l'azote liquide, mais a également des conséquences néfastes liées à la concentration accrue de sels intracellulaires, induisant des changements (altérations) dans la conformation de la membrane cellulaire et le rétrécissement des cellules.

La déshydratation peut être inversée par un appel d'eau lié au cryoprotecteur qui a pénétré dans les cellules. Pendant cette phase de rééquilibrage, le volume cellulaire précédemment diminué tend à revenir à son état initial, sans toutefois y parvenir complètement

Seeding : l'induction de la cristallisation

Pour éviter ce phénomène, une induction contrôlée de la nucléation est parfois nécessaire : c'est l'ensemencement. Au-dessus de la température critique de nucléation (ou plutôt de la température de fin de fusion T_m), un matériau froid (tige métallique ou coton trempé dans l'azote liquide) est placé sur la paille, abaissant la température et induisant la nucléation et donc la cristallisation (**Liebermann J et al ;2003, John et al ;2013**). Cette étape n'est pas nécessaire pour les spermatozoïdes congelés en petits volumes (0,25 ml ou 0,5 ml)(

Saragusty J et al ; 2016). En effet, il a été démontré que la tête du spermatozoïde est piégée dans une phase vitreuse pendant la congélation et n'est donc pas sujette aux dommages associés à la croissance chaotique des cristaux (**John G et al ;2012**)

IV.4.2.2. Congélation rapide

La vitrification est un processus particulier au cours duquel aucun cristal de glace ne se forme (**Baudot A et al ;1998**). En effet, la vitesse de refroidissement associée à la vitrification est si importante que l'eau contenue dans le milieu extracellulaire et intracellulaire n'a pas le temps de se transformer en glace. L'eau se trouve dans un état amorphe stable : l'état vitreux. Cet état doit être maintenu jusqu'au réchauffement pour éviter la dévitrification, c'est-à-dire la recristallisation lors du réchauffement (**Mazur P et al ; 2008**). Cependant, la vitrification nécessite des concentrations très élevées de cryoprotecteurs, notamment pour augmenter la viscosité du milieu extracellulaire. Ces cryoprotecteurs sont souvent ajoutés à la solution de congélation à des concentrations de 30 %, voire 40 %.

IV.4.2.2. Les dommages cellulaires liés aux congélations

A. Les dommages liés à la cristallisation

La cristallisation intracellulaire n'a pas été démontrée dans les spermatozoïdes. En effet,

Morris et al ont démontré que la vitrification a lieu dans le compartiment intracellulaire du spermatozoïde en testant une très large gamme de cinétique (1°C/min à 3000°C/min).

Cependant, si la glace intracellulaire n'explique pas la mortalité des spermatozoïdes lors de la congélation, c'est le risque de recristallisation lors du réchauffement qui pourrait l'expliquer. Lors du réchauffement à -40°C, les auteurs ont montré que le compartiment intracellulaire était toujours à l'état vitreux, alors que le compartiment extracellulaire était à l'état liquide et donc sujet à la recristallisation. C'est cette phase de réchauffement qui induit des dommages aux membranes des spermatozoïdes. (**John G et al ; 2012**)

A. Les dommages liés à la pression osmotique

Les dommages liés à la pression osmotique varient en fonction deux facteurs

L'effet de solution, lié à la croissance des cristaux dans le milieu extracellulaire, va induire

une augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur de la cellule. Cet équilibre osmotique induit une sortie d'eau intracellulaire de la cellule vers le milieu extracellulaire : la cellule se déshydrate alors jusqu'à un seuil où les dommages sont irréversibles (**Karlsson JOM, Toner M ;1996**)

Les différences de concentration en cryoprotecteur entre les milieux intra et extracellulaires peuvent avoir un effet néfaste sur la cellule. Ces dommages peuvent survenir au moment de l'ajout du cryoprotecteur, avant la congélation et également pendant/après le réchauffement lorsque les cryoprotecteurs sont retirés (**Meryman HT ; 2007**). En fait, l'ajout de cryoprotecteurs induit deux phénomènes consécutifs :

- premièrement, la sortie de l'eau de la cellule en raison d'un environnement hypertonique (équilibre osmotique) ;
- deuxièmement, les cryoprotecteurs pénètrent dans la cellule en raison de leur perméabilité plus faible que celle de l'eau (**Mullen SF, Critser JK ;2007**)

A l'inverse, après congélation - décongélation, la cellule se retrouve dans un environnement hypotonique et va donc d'abord laisser entrer l'eau, puis laisser sortir les cryoprotecteurs. Le refroidissement et le chauffage induisent tous deux des changements de volume des cellules. Ces changements de volume peuvent être dommageables s'ils sont effectués trop brutalement. C'est pourquoi certains protocoles de congélation incluent l'ajout de cryoprotecteurs

IV.5. Entreposage

La température de l'azote liquide est de -196°C . À ces températures, toutes les réactions cellulaires sont gelées (**Bakhach et al., 2007**). Par conséquent, les semences peuvent être stockées pendant des centaines d'années sans être endommagées. L'azote doit être conservé sous forme liquide, car toute évaporation entraîne une variation de la température.

IV.6. Décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, le plus souvent lors d'une insémination artificielle. Le plus souvent Quelle que soit l'espèce, la décongélation s'effectue de manière similaire, à l'aide d'un bain-marie. Les paillettes sont transférées directement de l'azote liquide au bain-marie (**Ponthier et al. 2014**). Dans la majorité des cas, les paillettes de 0,5 ml sont

décongelées à 37°C pendant 30 secondes, alors que certains chercheurs ont suggéré qu'une décongélation de ces paillettes à 75°C pendant 7 secondes pourrait entraîner une augmentation de la mobilité des spermatozoïdes après décongélation, alors que certaines décongélation, alors que d'autres chercheurs ont suggéré qu'une température de 46°C pendant 20 minutes pourrait être recommandée, bien que cela puisse être le cas (**Steven P. et al. 2011**)

Partie

Expérimentale

I. L'objectif :

L'objectif principal de cette étude est de comparer l'efficacité de trois dilueurs locaux en termes de préservation de la viabilité et de la qualité des spermatozoïdes caprins après congélation. On cherche à déterminer si l'utilisation de différents dilueurs peut influencer les performances post-décongélation, notamment en ce qui concerne la viabilité et la motilité massale.

En évaluant les semences après utilisation des dilueurs, cette étude permettra d'obtenir des données précieuses sur l'efficacité de chaque dilueur dans la cryoconservation de la semence caprine. Les résultats obtenus pourront fournir des informations importantes pour améliorer les protocoles de cryoconservation et optimiser les performances de la semence utilisée dans les programmes d'élevage caprin.

II. Matériels et méthodes

A. Matériels

1. Lieux de l'expérimentation

L'expérimentation a eu lieu dans CNIAAG (Centre Nationale d'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique), qui est le seul centre de production de semence animale (bovine) en Algérie, et il a été utilisé comme source de chèvres sur lesquelles notre semence a été récoltée

Figure 05 : Cniaag (Ennahare online ; 2015)



2. Animaux

Figure 06 : caprin de race arabia



Deux boucs (3) de boucs de population arabya : les trois de l'âge 3 ans utilisé pour l'électro-éjaculation

3. Semence

Nous avons travaillé sur de la semence éjaculée obtenue par l'électro-éjaculateur.

4. Dilueurs

A. Dilueur à base de jaune d'œuf

Ce produit est composé de plusieurs ingrédients qui agissent en synergie pour assurer une protection efficace lors de la congélation. Tout d'abord, le jaune d'œuf qui contient de la lécithine, ensuite les substances nutritives présentes dans la solution cryoprotectrice aident à maintenir l'intégrité des cellules en réduisant la formation de cristaux de glace, ce qui prévient les dommages structuraux. De plus, la solution tampon maintient un pH optimal pour la stabilité des cellules, tandis que l'eau et les antibiotiques préviennent la contamination bactérienne indésirable.

B. Dilueur à base de lécithine (origine animal)

Cryoprotecteur couramment utilisé est celui à base de lécithine d'origine animale. Lécithine est un composé chimique constitué principalement d'acides gras, de glycérol, d'acide phosphorique et de choline, et fait partie des phospholipides. C'est un produit entièrement naturel que l'on trouve dans le jaune d'œuf, le soja, les graines de tournesol et les cellules de

graines végétales. Ce produit cryoprotecteur est également composé des substances nutritives, d'une solution tampon, d'eau et d'antibiotiques.

C. Dilueur à base de lécithine et de complexe de vitamine

Le dilueur innovant à base de lécithine et de complexe de vitamines (E et C). Enrichi en substances nutritives, il offre un soutien métabolique essentiel pour la survie cellulaire. Le tampon de pH intégré garantit une stabilité optimale du pH, tandis que la présence d'antibiotiques prévient toute contamination microbienne potentielle.

5. Matériels d'évaluation de la concentration et de la qualité avant et après conservation

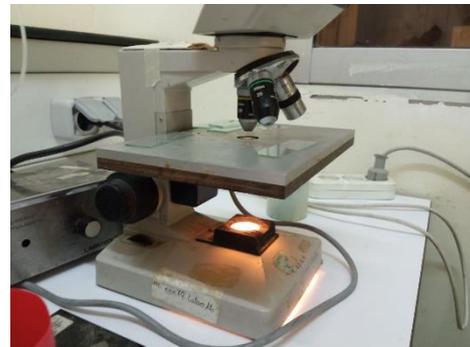
Microscopes optiques (OPTIKA®, HT50 minitüb®) respectivement pour l'évaluation de la motilité massale et mobilité individuelle).

Spectrophotomètre (imv technologies®) pour déterminer la concentration.

Figure 07 : spectrophotométrie



Figure 08 : microscope optique



6. Matériels de conditionnement de la semence pour la congélation

LINX 6800® (imv® technologies) **MRS 3** : une machine à triple fonction qui combine le remplissage, le sondage et l'impression, le tout à une température de 4°C grâce à une vitrine réfrigérante

Figure 09 : Logiciel de traçabilité de la semence



Figure 10 : Dispositif de mise en paillette



Outils de congélation classique

Nous avons utilisé une machine de refroidissement programmable, le Minidigitcool d'IMV Technologies®, qui suit une courbe de refroidissement standard. En complément, nous avons également utilisé une bonbonne d'azote liquide

Figure 11 : machine de refroidissement programmable Minidigitcool d'IMV Technologies®



B. Méthode

1. Récolte de la semence de bouc

La semence les trois boucs au volume de 2 ml chacune est maintenue dans les cônes à une température de 37°C pendant 30 minutes avant le début de l'analyse

Le matériel utilisé pour la récolte de la semence comprend un désinfectant, un électro-éjaculateur, deux cônes de récolte spécifiquement conçus pour les semences de petits ruminants, de la vaseline et de l'eau tiède à une température de 37°C.

Figure 12 : récolte de la semence caprine par électro-éjaculateur



2. Evaluation de la semence fraîchement récoltée

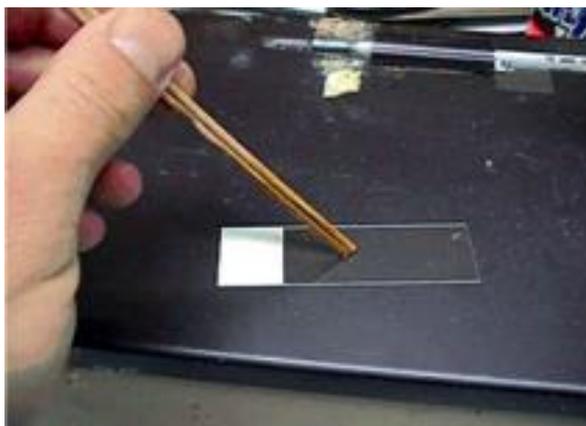
a. Détermination de la motilité massale

Une microgoutte de la semence est déposée sur une lame et examinée sous l'objectif x10 d'un microscope optique afin d'évaluer la motilité globale.

b. Détermination de la mobilité individuelle

Une microgoutte de la semence est aspirée à l'aide d'une micropipette réglable (10 μ l) dans un tube Eppendorf, puis elle est diluée au ratio de 1/100 à l'aide d'un des dilueurs. Ensuite, cette solution diluée est placée entre une lame et une lamelle, et observée sous l'objectif x40 d'un microscope optique pour évaluer la mobilité individuelle des spermatozoïdes.

Figure 13 : disposition d'une goutte de la semence sur une lame



3. Protocole de conservation

Avant d'effectuer la cryoconservation de la semence, nous évaluons sa concentration, ce qui

déterminera le taux de dilution nécessaire et le nombre de paillettes à produire. Pour ce faire, nous utilisons un pipeteur automatique (HAMILTON 500 series microlab®) pour prélever un volume de semence, que nous transférons dans une cuvette à spectrophotomètre contenant 1 volume de sperme 4 volumes de solution saline isotonique (NaCl). Ensuite, nous utilisons un spectrophotomètre (imv® technologies) préalablement calibré pour les petits ruminants, en le réglant sur une longueur d'onde de 530 nm.

Le spectrophotomètre automatisé nous permet de mesurer le nombre de spermatozoïdes (concentration) présents dans l'échantillon, de déterminer le taux de dilution requis pour obtenir une concentration spécifique par paillette, et de calculer le nombre de paillettes nécessaires en fonction de ces paramètres.

a. Dilution

L'opération de dilution de la semence avec trois dilueurs différents commence par la mise des dilueurs à température ambiante afin de garantir leur stabilité. Ensuite, nous prélevons un volume de la semence, qui contient environ 4 milliards de spermatozoïdes, et nous le mélangeons avec un volume de dilueur. Après avoir laissé le mélange reposer pendant 15 minutes dans température ambiante, permettant une meilleure dispersion des spermatozoïdes dans le dilueur, nous ajoutons le reste du dilueur nécessaire pour atteindre un volume total de 50 ml.

b. Mise en paillette

Une fois que le code d'identification spécifique à chaque échantillon, en fonction de l'origine de la semence, est saisi dans le logiciel connecté à l'automate MRS3, l'échantillon contenu dans un flacon est intégré dans la chaîne de production. À ce stade, l'aspiration automatique de la semence traitée dans les paillettes débute. Ensuite, les paillettes sont fermées hermétiquement par application de pression thermique. À la fin de cette opération, les codes d'identification sont imprimés sur les paillettes pour assurer leur traçabilité. Par la suite, les paillettes contenant la semence traitée sont placées sur des chariots en préparation de leur introduction dans la machine de refroidissement programmable. Cela marque la fin de cette étape du processus.

c. Equilibration

L'étape d'équilibration consiste à placer les paillettes dans la vitrine réfrigérante à une température de +4°C pendant une période définie. Cette étape permet de stabiliser la semence traitée avant de l'exposer aux températures extrêmement basses, atteignant -196°C. En laissant les paillettes dans la vitrine réfrigérante, on permet à la semence de s'adapter progressivement aux conditions de froid intense qui seront rencontrées lors de la cryoconservation. Cette période d'équilibration est essentielle pour préserver la viabilité et la qualité des spermatozoïdes avant leur stockage à très basse température.

d. Congélation

Nous avons opté pour la méthode classique de congélation lente, étant donné que le laboratoire du CNIAG dispose déjà d'une machine de refroidissement programmable. Après une période d'incubation de 7 minutes, au cours de laquelle la température chute progressivement de 4°C à -140°C, les paillettes sont directement placées dans la bonbonne d'azote liquide à une température de -196°C. Cette méthode permet une congélation contrôlée et progressive, assurant ainsi la préservation optimale de la semence dans les conditions de basse température. En stockant les paillettes dans la bonbonne d'azote liquide, nous garantissons une conservation à très basse température, essentielle pour maintenir la viabilité des spermatozoïdes sur une longue période.

e. Décongélation

Après la congélation, les paillettes sont soigneusement retirées de l'azote liquide et placées dans un bain-Marie réglé à une température de 37°C. Elles y sont décongelées pendant une durée de 30 secondes. Cette étape de décongélation contrôlée permet de ramener progressivement les paillettes à une température compatible avec la survie des spermatozoïdes. Le bain-Marie à 37°C offre un environnement propice à la décongélation de la semence cryoconservée, facilitant ainsi sa réactivation et sa viabilité.

Figure 14 : décongélation les paillettes



f. Evaluation de la semence

Après la décongélation de la semence, nous procédons à l'évaluation en utilisant la méthode de coloration avec de l'éosine et de la négrosine. Pour ce faire, une goutte d'éosine, une goutte de négrosine et deux gouttes de semence décongelée sont déposées sur une lame. Après le séchage de la lame, nous effectuons l'évaluation de la motilité massale en observant l'échantillon sous l'objectif x10 d'un microscope optique. Cette étape nous permet d'apprécier la motilité générale des spermatozoïdes. Ensuite, nous passons à l'évaluation de la mobilité individuelle en observant l'échantillon sous l'objectif x40 du microscope optique. Cette observation plus détaillée nous permet de déterminer la mobilité et la qualité individuelle des spermatozoïdes après la congélation. Ces évaluations sont cruciales pour évaluer l'efficacité de la cryoconservation et la viabilité des spermatozoïdes décongelés.

Figure 15 : les colorants éosine négrosine

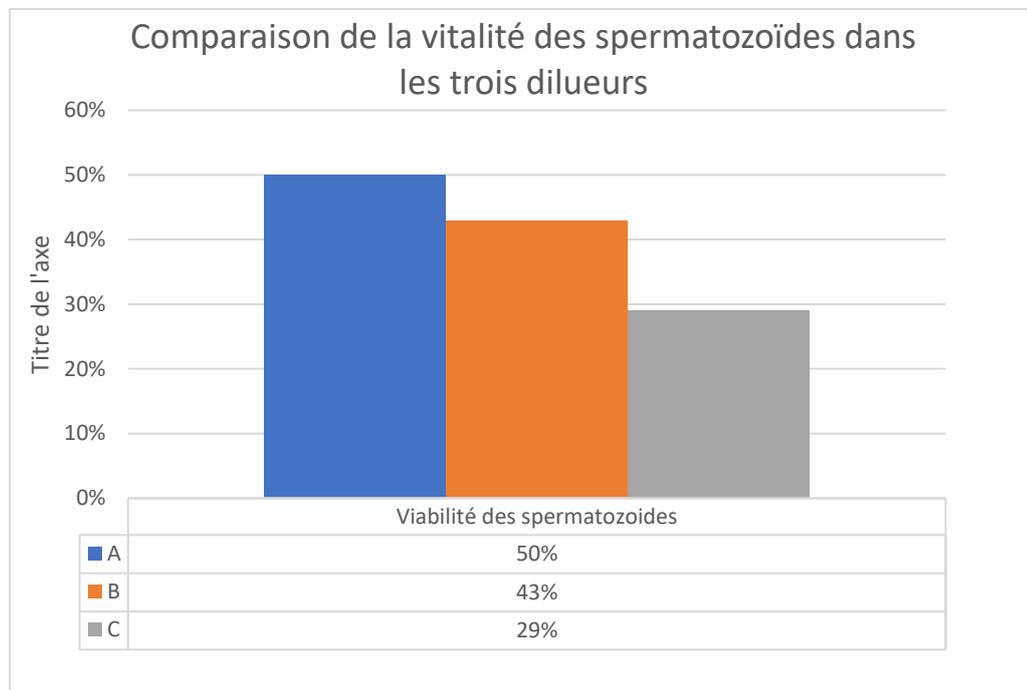


Figure 16 : observation de la viabilité des spermatozoïdes après la coloration



III. Les résultats

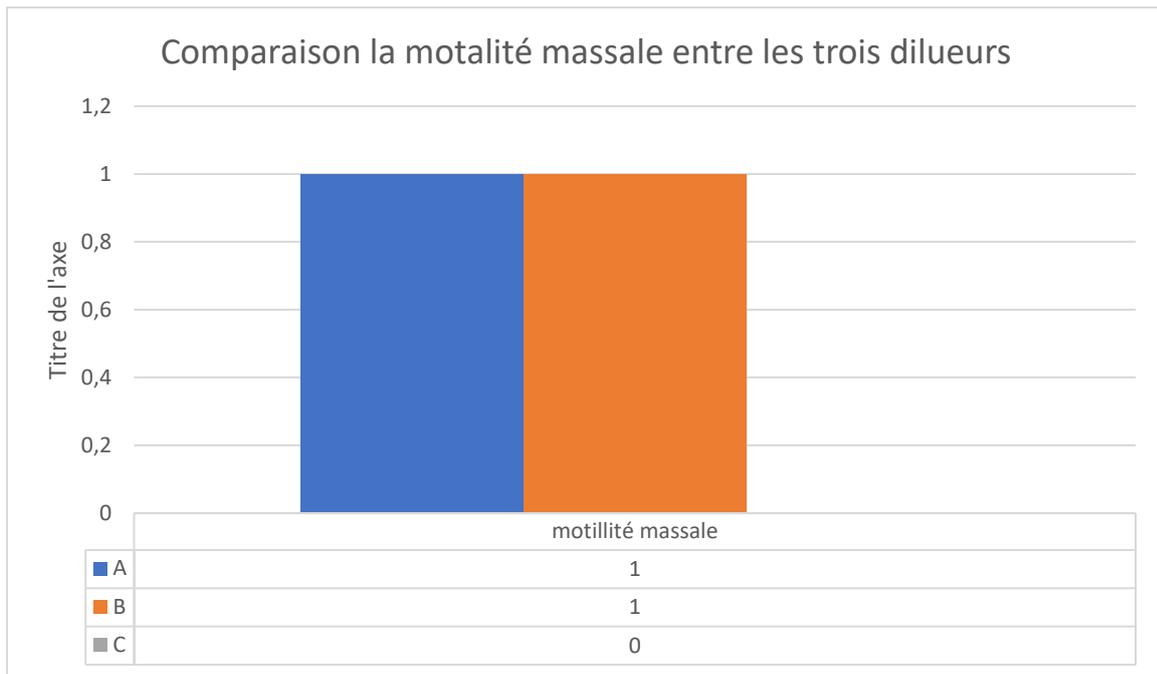
1. Viabilité des spermatozoïdes



- **Le dilueur A**, à base de jaune d'œuf, a montré la plus haute vitalité avec 57% des spermatozoïdes restant viables.
- **Le dilueur B**, à base de lécithine, a présenté une vitalité légèrement inférieure, avec 43% des spermatozoïdes restant viables.
- **Le dilueur C**, à base de lécithine et de complexe de vitamine, a affiché la vitalité la plus basse, avec seulement 29% des spermatozoïdes restant viables.

Ces résultats suggèrent que le dilueur à base de jaune d'œuf peut être plus favorable pour préserver la vitalité des spermatozoïdes, tandis que l'ajout de lécithine seule ou en combinaison avec un complexe de vitamine peut avoir un impact négatif sur la vitalité des spermatozoïdes.

2. La motilité massale



Les dilueur A et B ont généré une motilité massale de niveau 1 avec des mouvements individualisés des spermatozoïdes. Quant au dilueur C, la motilité massale s'est révélée nulle, indiquant une immobilité totale des spermatozoïdes.

IV. Discussion

L'objectif de cette étude est de mettre au point un milieu de cryoconservation pour la semence caprine en Algérie. Pour cela, nous avons testé et évalué l'efficacité de différents composés, contenus dans les dilueurs, dans le maintien de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes à des taux acceptables après décongélation de la semence. Les premiers résultats montrent une viabilité plus ou moins acceptable des spermatozoïdes selon le dilueur utilisé (à base de jaune d'œuf, de lécithine ou de complexe lécithine-VitE/VitC) et une motilité massale globalement faible.

Dans notre étude, le meilleur résultat en termes de viabilité (57%) est obtenu avec le dilueur à base de jaune d'œuf sans pour autant les niveaux de performance souhaités. En effet, Johnson et al. (2004) a évalué l'effet du dilueur à base de jaune d'œuf sur la viabilité des spermatozoïdes caprins qui a atteint 70%. Cette différence de taux observée pourrait être attribuée à des variations dans les protocoles expérimentaux, aux caractéristiques spécifiques des échantillons de semences utilisés ou à d'autres facteurs environnementaux. Comme cela pourrait être imputable à la technique utilisée dont le défaut réside peut-être dans l'application d'un temps d'équilibration trop long. Par ailleurs, le plasma séminal du bouc contient une enzyme du type phosphatidase A capable d'hydrolyser la molécule de lécithine du jaune d'œuf en un acide gras et une lysolécithine nuisibles aux spermatozoïdes (**IRITANI et al, 1963 ; ANMDAR, et al, 1965**). Cette réaction d'hydrolyse est favorisée par un temps d'équilibration long. Ce qui suggère que la réduction du temps d'équilibration permettrait d'atteindre la cristallisation avant que la réaction enzymatique ne soit suffisamment engagée pour porter atteinte aux spermatozoïdes.

De plus, **Fourouzanfar et al. (2010)** rapportent que la motilité et la viabilité des spermatozoïdes après décongélation dépendent de la concentration du jaune d'œuf utilisée dans le dilueur. En effet, les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration de 20 % de jaune d'œuf par rapport à 15 %. D'autres études, d'ailleurs, confirment que l'augmentation de la concentration en jaune d'œuf améliore la préservation de la qualité du sperme (**Amirat et al, 2004 ; Alcay et al, 2016**).

Des études complémentaires devraient être envisagées pour étudier ces paramètres inhérents au jaune d'œuf.

Dans le dilueur B, nous avons testé la lécithine d'origine animale, un émulsifiant couramment utilisé, souvent préféré en raison de ses propriétés protectrices des spermatozoïdes.

Dans notre étude, il a été enregistré un taux de viabilité de 43% avec le dilueur à base de lécithine. Ce qui est en deçà du taux rapporté par Smith *et al.* (2011) qui enregistre un taux de viabilité de 65% avec un dilueur contenant de la lécithine de Soja.

Il est intéressant d'étudier de façon approfondie l'impact de la lécithine sur la qualité de la semence selon son origine végétale ou animale. Au vu des résultats, l'alternative prometteuse est en faveur de la lécithine de soja. Il est donc nécessaire de mener davantage de recherches pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et déterminer les conditions optimales d'utilisation de la lécithine de différentes origines comme dilueur pour les semences caprines.

Quant au dilueur C à base d'une combinaison de lécithine et de complexe de vitamine E et C, le plus bas taux de viabilité est enregistré, soit 29 %.

Les vitamines E et C sont souvent utilisées comme antioxydants pour protéger les spermatozoïdes du stress oxydatif. La Vit E est considérée comme stabilisateur des membranes riche en acide gras polyinsaturés et comme un antioxydant puissant protégeant le sperme contre la peroxydation des lipides durant la cryoconservation (Niki *et al.*, 2004 ; Urano *et al.*, 1987, 1988). Cependant, dans ce cas précis, la combinaison de ces nutriments n'a pas eu les effets bénéfiques escomptés. Il est possible que les concentrations utilisées dans le dilueur n'étaient pas appropriées pour les spécificités des spermatozoïdes caprins.

Dans notre étude, nous avons utilisé la coloration éosine négrosine pour l'évaluation de la qualité de la semence. Nos résultats indiquent que la plupart des spermatozoïdes ont subi des endommagements au niveau membranaires entraînant leur mortalité. Ceci étant dit, il aurait été préférable d'utiliser un moyen d'appréciation de la qualité de la semence (mobilité, vitesse, mortalité...) plus efficace et plus d'actualité à travers l'outil CASA (Computer Analysis Sperm Assisted). Malheureusement, cet outil n'existe pas dans le laboratoire qui m'a accueilli.

V. Conclusion

A l'issue de notre expérience, nous constatons que les résultats escomptés n'ont pas été atteints en termes de viabilité et mobilité acceptables. Cela pourrait être attribué aux conditions difficiles qui ont prévalu lors de la préparation des milieux de conservations. En effet, des travaux d'entretien avaient été entamés dans le laboratoire avec toutes les interruptions et les perturbations que ceux-ci pouvaient entraîner. Des facteurs tels que des mesures inexactes, des contaminations croisées ou des altérations des ingrédients peuvent survenir pendant cette période, ce qui peut avoir un impact négatif sur les résultats obtenus lors de l'évaluation des échantillons de sperme. De ce fait, il est essentiel de mettre en place des protocoles stricts de préparation des dilueurs et de veiller à ce que les conditions de laboratoire soient optimales pour éviter de tels déficits.

La production locale de milieux de conservation des semences permet de réduire les coûts liés à l'importation. En établissant des installations de production sur place, les entreprises ou les institutions peuvent éviter les frais élevés de transport, de douane et de logistique associés à l'importation de milieux de conservation de semences. De plus, la production locale offre la possibilité de contrôler la qualité et la disponibilité des milieux de conservation, ce qui permet de répondre plus rapidement et efficacement aux besoins du secteur agricole local. Cela favorise également l'autonomie et la durabilité de l'industrie des semences au niveau national.

VI. Recommandations :

- Travailler dans de meilleures conditions de laboratoire
- Augmenter le nombre d'échantillons et de répétitions
- Refaire l'expérimentation avec les mêmes milieux de conservation en s'assurant une meilleure préparation.
- Utiliser CASA pour mieux apprécier l'efficacité de l'impact des milieux de conservation sur la qualité de la semence congelée.
- Faire des essais d'IA avec les semences traitées pour en apprécier la qualité des procédés de congélation à travers la fertilité, la fécondité et mise bas.

Références bibliographiques

Allimant ., 2010: Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, pages: 138

Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 7, 145-173. doi: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4

AMARI Fella, BEDRANI Nassima, YAKOUB Fatma-Zohra 2015 : thème sur conservation à court terme de la semence ovin quel cryoprotecteur utilise ?

Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P. et Simpson, R. (2002). Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait in Science et Technologie du lait ; Transformation du lait. Éditions presses international polytechnique, Montréal.

Andersson L., Carrière F., Lowe M.E., Nilsson A., Verger R., 1996: Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyses galactolipids. Biochim. Biophys. Acta, pages: 236-240.

Bakhach, J., Casoli, V et Guimberteau, JC. (2007). La cryopréservation des tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. Ann. Chir. Plas. Est. 52 : 531-547

Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D. (2009) Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. Cell Tissue Bank, 10, 49-62

BARIL G., CHEMINEAU., COGNIE Y., GUERIN Y., LEBOEUF B., ORGEUR P. et VALLET JC., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins.- Rome : FAO.- Production et Santé Animales.-261-273)

Baril, G., P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Leboeuf, P. Orgeur et J.C. Vallet. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Nouzilly.

Barone, R., 1996. Anatomie comparée des mammifères domestiques, tome 4. Splanchnologie 2 : appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Vigot.

Baudot A, Boutron P. Glass-Forming Tendency and Stability of Aqueous Solutions of Diethylformamide and Dimethylformamide. *Cryobiology*. 1998;37:18799.

Berlinguer et al., 2020. Cryopreservation of goat semen: State of the art and perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(S2), 12-20

Bernstein AD, Petropavlovsky VV. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull Eksp Biol Med* 1937; 3: 41–3

Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Methods Mol Biol*. 1995;38:189–97

Dacuadro-Hansen, G. (2004). La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience, *Gynécologie Obstétrique et fertilité* 32 (2004) 887-893.

Day John G. ET Stacey Glyn N. 2007. *Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc.* 365p.

Delgadillo J.A, 1990. « Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques » Thèse Montpellier, France, 119p

Ezekwe A, 1988a. « Ejaculate characteristic of two breeds of tropical bulls N'dama and Muturu » Joint seminar on animal of African countries, Addis-Ababa

Fahy, G.M. et al. (2014). Cryopreservation of mammalian systems. CRC Press

Farrell Jr, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., et al. (2004) Nomen-clature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. Journal of Dairy Science, 87, 1641-1674

Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. Cryoletters. 2004 ;25 :37588.

George G., 1996. « Cours d'histologie ». Cours du PCEM

Guillot J., 2002. La calcification testiculaire chez les boucs de centres d'IA : étude clinique et répercussion sur la reproduction de semence [en ligne]. Thèse de doctorat en science vétérinaire. Paris : université Paul-Sabatier de Toulouse, 116 p.

Hafez E.S.E, 1987. « Reproduction in farm animals » 1vol. Leo-Febiger, 5ème éd., 633p

HANZEN Christian (2014) Biotechnologies : L'insémination artificielle chez les ruminants

Hanzen, Ch. (2010). Facteurs d'infertilité et d'infécondité en reproduction bovine.
orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/70544/1/RO

8_Facteurs_generaux_2012.pdf. Consulté le 22 septembre 2011

Isabelle Barrier-Battut. 2013. Collecte et traitement de la semence d'étalon : quoi de neuf ? Le magazine en ligne de l'actualité technique et scientifique équine. Institut Français du Cheval et de l'Equitation.

Ivanov II. Artificial fecundation of domestic animals. Schaper, Hannover, 1912.

Ivanov II. De la fecundation artificielle chez les mammifères. Arch Sci Bio Inst Imp Méd Exp, St. Pétersbourg, 1907; 12: 377–511.

John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. Cryobiology. 2012;64:7180

John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. Cryobiology. 2012;64:7180.

John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. Cryobiology. 2013;66:8592.

Kamli Naima, Saidani Imane., 2016. Caractérisation de l'activité reproductive du bélier de race blanche : mensuration morphométriques et suivi histologiques testiculaires [en ligne]. Mémoire de master en Gestion et amélioration de ressource biologique. Tlemcen : université de Tlemcen, 112 p.

Karlsson JOM, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials. 1996;17:24356.

Karow, A.M., Critser, J.K., 1997. Reproductive tissue banking: scientific principles. Edit, ACADEMIC PRESS, page 472.

Kasapi et al., 2020. Cryopreservation of goat semen: A review. Animal Reproduction Science, 221, 106584

LALOUI Karima 2020 Thème Cryoconservation de la semence équine par le milieu Kenney modifié

LEBOEUF , B.; RESTALL, B.; SALAMON , S. Production Et Conservation De La Semence De Bouc Pour l'insémination Artificielle. INRAE Prod. Anim. 2003, 16, 91-99.

Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? Reproductive BioMedicine Online. 2003;7:62333.

Luyet, Basile J.-Gehenio, Marie Pierre, 1940: Life and death at low temperatures, Publication info: Normandy, Mo.,Biodynamica, 1940. Contributed by: MBLWHOI Library

Maher G, Maurice C, Lessard C, Thériault M, Castonguay F, Cinq Mars D, Bernier J, Baily J., 2011. Egg yolk or milk ? Which is preferred by buck spermatozoa ? Centre de recherche en biologie de la reproduction, 1 p.

Maher G., 2012. Comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et l'insémination artificielle chez la chèvre [en ligne]. Mémoire de master en sciences animales. Québec : université Laval, 115 p.

Marquis P-H, 1990. « Synchronisation de l'oestrus et insémination artificielle dans l'espèce caprine ». Ecolen Nationale Vétérinaire de Toulouse. Thèse pour le doctorat vétérinaire, diplôme d'état. 156p

Mayer. DT, Lasley. JF; 1945. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities and fertilising capacity of mammalian spermatozoa. J Anim Sci; 4:261.

Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. Biology of Reproduction. 2008;78:212.

Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. Transfusion. 2007;47:93545.

Meskini Zakaria, thème ; L'INSEMINATION ARTIFICIELLE CHEZ LES CAPRINS DE LA RACE ARBIA DANS LA REGION DE TIARET 2017 ; page 14

Meskini Zakaria., 2017. L'insémination artificielle chez les caprins de la race Arbia dans la région de Tiaret [en ligne]. Mémoire de master en génétique et reproduction animale. Mostaganem : université Abdelhamid Ibn Badis, 94 p

Mickelsen W. Memon MA. Infertility and diseases of the reproductive organs of bucks. In Youngquist R. Current Therapy in Large Animal Theriogenology Philadelphie Ed. WB. Saunders Company 1997: 489-493.

Molina F.C., Evans G., Maxwell W.M.C., (1994). Effect of polyols on the post thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. Theriology, 42,15-23

MRABET Lyna, DERGUINI Kenza (2016) thème sur cryoconservation de la semence caprine : utilisation de l'andromed et l'association andromed cyclodextrine pour la congélation de la semence de boucs arabya et alpin p ; 24

Mullen SF, Critser JK. The Science of Cryobiology. Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors [Internet]. Springer, Boston, MA; 2007 [cité 10 juill 2018]. p. 83109. Disponible sur:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72293-1_7

Neto C.R., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa F.O., Dellaqua JR. J.A. et Alvarenga M.A. 2014. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability Journal of Equine Veterinary Science. Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.

Ortiz et al., 2020. Cryopreservation of goat semen: A review. Animals, 10(8), 1363

O'shea T., Walles R-G., (1967). The metabolism of ram, bull, dog and rabbit spermatozoa after cooling to 5°C. Aust J Biol Sci. 20:447-60.

Pellicer M.T., 1995: Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrío implicado en el deterioro de la calidad de los espermatozoides diluidos en leche. Tesina de Licenciatura, Universidad de Murcia, page: 200.

Pellicer-Rubio MT1, Combarrous Y. 1998: Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk- based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60

Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79 °C. Nature 1952; 169: 626-7.

Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature London. 1949;1646.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification at low temperatures. Nature 1949; 164: 666-7.

PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. (2014) Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.

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

Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Mae D., De Kruif A., 2005: New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. Theriogenology, Vol. 64, n° 3, pages: 706-719.

Robertson. L, Watson. PF, 1987. The effect of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. *Animal Reprod Sci.* 15:177-187.

Royere D., Barthelemy C, Hamamah S et Lansac J, 1996: Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. Reproductive Biology Unit, Department of Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction, CHU Bretonneau, Faculte de Medecine, Universite F Rabelais, 27 044 Tours Cedex,

Salamon S, 1976. « Artificial insemination in sheep » Animal husbandary department university of Sydney, 139p.

Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77–111

Sánchez-Ajofrín et al., 2018. Cryopreservation of goat sperm: Advantages and challenges. *Small Ruminant Research*, 168, 24-32.

Saragusty J, Osmers J-H, Hildebrandt TB. Controlled ice nucleation—Is it really needed for largevolume sperm cryopreservation? *Theriogenology.* 2016;85:132833.

Sias B., 2000: Etudes des lipases pancréatiques apparentées de type2 (PLRP2): Clonage, production, caractérisation biochimique et cinétique. DEA Nutrition aspects moléculaires et cellulaires, Université Aix-Marseille II.

Singh M.P., Sinha A.K., Sinsh B.K., (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43,1047-1053.

Smith MC. Sherman DM. Goat medicine philadelphie Ed. A lea and febiger book, Awaverly company 1994:439-451.

Spallanzani L. Esperimenti che servono nella storia della generazione di animali e piante. Barthelmi Ciro, Genova, 1785

Spallanzani L. Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell' uomo e degli animali. Opuscoli di Fisica Animale e Vegetabile, Modena, 1776.

Steven P. Brinsko, Terry L. Blanchard, Dickson D. Varner, James Schumacher, Charles C. Love, Katrin Hinrichs, David L. Hartman. 2011. Manual of equine reproduction – 3rd edition, 325p (p161-162)

T Katila, GB Combes, DD Varner, TL Blanchard. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. Theriogenology, 48 (1997)

Thibault, C. et M.C. Levasseur. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses éd, Pari, 928 pp

Thibault, C., Levasseur, M.-C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme, Nouv. éd. entièrement refondue. ed. INRA ;Ellipses, Paris

Thirstrup K., Verger R., Carriere F., 1994: Evidence for pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. Biochemistry, pages: 2748-2756.

Urano, S., Iida, M., Otani, I., Matsuo, M., 1987. Membrane stabilization of vitamin E; interactions of α -tocopherol with phospholipids in bilayer liposomes. Biochem Biophys Res Commun 146, 1413–1418

Urano, S., Yano, K., Matsuo, M., 1988. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. Biochem Biophys Res Commun 150, 469–475

Vishwanath R. Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 2000; 62 (10924819): 23-53

Zarouk A, Souilem O, Drion P.-V, Beckers J.-F., 2001. Caractéristique de la reproduction de l'espèce caprine. Ann. Méd. Vét, 2001, vol. 1458, pp. 98-105.