

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEM
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SU
SCIENTIFIQUE



819THV-2

UNIVERSITE DE BLIDA I



Institut des Sciences Vétérinaires

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Dans le but de l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème

**ETUDE DE L'EFFET DE LA CYCLODEXTRINE, DU CHOLESTEROL ET DE LA
VITAMINE E SUR L'AMELIORATION DE LA CONSERVATION DE LA
SEMENCE EPIDIDYMAIRE BOVINE.**

Présenté par :

CHERIFI NOUREDDINE

SELMI YOUSOUF

Devant le jury composé de :

Dr ADEL Djalal, maître assistant A à l'université Blida I

Président

Dr SAIDANI Khelef, maître assistant A à l'université Blida I

Examineur

Dr AIT BELKACEM Amar, maître assistant A à l'université Blida I

Promoteur

Blida, juin 2014.

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la foi et la force pour achever ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et toute notre gratitude à notre promoteur **Dr AIT BELKACEM Amar** maître assistant A à l'institut des sciences vétérinaire à l'Université Blida I, pour nous avoir proposé ce sujet et dirigé nos travaux, pour ces conseils précieux, ces orientations et surtout sa patience, sa simplicité et ainsi sa disponibilité tout au long de notre travail.

Nous remercions chaleureusement :

Dr ADEL Djalal, maître assistant A à l'université Blida I, pour avoir présidé le jury, ainsi que :

Dr SAIDANI Khelef, maître assistant A à l'université Blida I, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions énormément **Dr Nabi Ibrahim** de son soutien au long de notre expérimentation, et ainsi que :

Dr BELLALA Ridha et son binôme **IMAD** et **ABD ERRAHMANE** de ses soutiens au long de notre expérimentation.

Le binôme **MUSTAPHA** et **NACER** pour ses aides à l'expérimentation.

Enfin, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leurs aides et ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette année universitaire.

Que Dieu veille sur nous tous et illumine nos chemins.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail avec un grand plaisir , spécialement à ceux qui ont été mes anges gardiens et mes guides dans la vie :

A mes très chers parent .mon père et ma mère qui ont le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consenti pendant la durée de mes études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé. **Que le dieu vous protège.**

A ceux qui toujours su être présent à vous mes cher frères.

A mes deux adorables sœurs

A mon binôme ami et frère : **YOUSSEUF** avec qui j'ai partagé les bon comme les mauvais moment et tout sa famille.

A tous mes amis(es) en souvenir les plus agréables pour tous les bons moments partagés.

Pourtant de gentillesse et de disponibilité. Grace auxquels ces années ont été ponctuées de moment d'évasion.

A tous (tes) les enseignants (es) qui ont contribué à notre formation.

A tous ceux qui je ne peux citer, mais qui se reconnaîtront.....

NOUR EDDINE

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail avec un grand plaisir, à tous ceux qui ont cru en moi, spécialement à ceux qui ont mes guides dans la vie :

A mes chers parents mon père et ma mère qui m'ont entouré de leur amour et de leur protection ainsi que leur générosité, durant toute la durée de mes études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé. **Que dieu vous protège.**

Mes remerciements et mes respects sont adressés également

A tous mes très chers frères.

A tous mes très chères sœurs.

A mon très cher ami et frère **NOUR EDDINE.**

A toute ma famille.

A tous mes amis surtout les plus agréables, pour tous les bons moments partagés .Grâce auxquels ces années ont été ponctuées des moments d'évasion.

A tous ceux qui je ne peux citer, mais qui se reconnaîtront.....

Yousseuf

SOMMAIRE

PARTIE BIBLIOGRAPHIE

Introduction	1
1. Structure de l'épididyme	2
1.1. Anatomie de l'épididyme	2
1.1.2 Histologie de l'épididyme	2
a. Les cellules principales	3
b. Les cellules basales	3
c. Les cellules apicales et étroites	4
d. Les cellules claires	4
e. Les cellules en halo	4
1.2. Fonction de l'épididyme	6
1.2.1. Fonctions et régulation de l'épithélium épидидymaire	6
1.2.2 La résorption de l'épithélium épидидymaire	6
1.2.3. La régulation androgénique de la structure et des fonctions de l'épididyme	7
1.2.4 Maturation épидидymaire des spermatozoïdes	7
2. Intérêt du sperme épидидymaire et les différents techniques de récolte	8
2.1. Intérêt du sperme épидидymaire	8
2.2. Techniques de récoltes du sperme épидидymaire	10
a. Méthode de float-up	10
b. méthode de rétrograde flushing	10
3. Méthodes d'évaluation de la qualité du sperme	11
3.1. Évaluation macroscopique	11
3.1.1. Volume	11
3.1.2. Couleur	11
3.1.3. Viscosité	11
3.1.4. Etude physico-chimique et biochimique du sperme	12
3.2. Evaluation microscopiques	12
3.2.1. Evaluation avec méthode classique	12
3.2.1.1. Motilité massale	12
3.2.1.2. Motilité individuelle	13
3.2.1.3. La numération	14
3.2.1.4. La vitalité	15
3.2.1.5. La morphologie des spermatozoïdes bovins	16

3.2.1.6. Les anomalies morphologiques	16
3.2.1.6. Les anomalies morphologiques	16
3.2.2. Evaluation avec analyseur	17
4. Analyse du spermogramme	18
4.1. Préparation et conservation de la semence en vue de l'insémination artificielle	18
4.1.1. Critères de décision pour la conservation du sperme	19
4.1.2. Principe de Préparation et conservation de la semence	19
4.1.3. La Conservation de la semence	21
a. Semence fraîche	21
b. Semence congelée	21
4.1.4. Techniques de préparation et conservation de la semence	21
4.1.5. Dilution de la semence	21
4.1.6. Refroidissement de la semence	22
4.1.7. Le conditionnement de la semence	23
4.1.8 La congélation	24
4.2. Protection antioxydante et conservation du sperme	24
4.2.1. Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés	24
4.3. Traitement de la semence épидидymaire en vue de l'amélioration de sa conservation	25
4.3.1. Rôle du cholestérol (CHL)	25
4.3.2. Rôle de la cyclodextrine(CLD)	25
4.3.3. Rôle de la vitamine E	26
4.3.4. Le TRIS	26

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Objectif	27
2. Période et lieu de stage	27
3. La récolte des semences	27
4. Matériels et méthodes	28
4.1. Matériels biologiques	28
4.1.1. Les testicules	28
4.2.2. Matériels utilisés	28
4.3. Méthodes	29

4.3.1. Récolte du sperme	29
5. Caractéristiques du sperme après récolte	30
5.1. Evaluation visuelle	30
5.2. Evaluation microscopique	31
5.2.1. La motilité massale	31
5.2.2. La motilité individuelle	31
5.2.3. La concentration	31
6. Préparation, conservation et traitement du sperme épидидymaire	32
7. Résultats et discussion	35
8. Conclusion et Recommandation	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique	12
Tableau II : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale	13
Tableau III : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5	14
Tableau IV : Critères de décision pour la conservation de l'éjaculat	20
Tableau V : Composition des dilueurs les plus utilisés	22
Tableau VI : la couleur des trois récoltes.	35
Tableau VII : le volume des trois récoltes.	36
Tableau VIII : la concentration des trois récoltes.	36
Tableau IX : La motilité massale et la motilité individuelle des trois récoltes.	37
Tableau X : traitement des tubes de la première récolte.	37
Tableau XI : traitement des tubes de la deuxième récolte.	38
Tableau XII : traitement des tubes de la troisième récolte.	39

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Structure interne du testicule	2
Figure n°2 : Représentation schématique de différents types cellulaires épидидymaires des mammifères	5
Figure n°3 : Fonctions de sécrétion et de réabsorption de l'épithélium épидидymaire	5
Figure n°4 : Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde mûr	10
Figure n°5 : Comptage des spermatozoïdes à la cellule de Thoma	15
Figure n°6 : Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine	17
Figure n°7 : photo de l'analyseur « CASA »	17
Figure n°8 : Schéma d'une paillette « CASSOU »	24

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pour cent

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

ABP : Androgen-binding protéine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis

CHL : Cholestérol.

Cl : Chlore

CLD : Cyclodextrine

cm : Centimètre

CNAG : Centre national de l'amélioration génétique

DHS : Dihydrostreptomycine

DHT : Dihydrotestostérone

g : Gramme

IA : Insémination artificielle

IVT : Illinois, Variable, Température.

K⁺ : Potassium

M indiv : Motilité individuelle

m : Mètre

Mg⁺ : Magnésium

ml : Millilitre

MM : Motilité massale

Na : Sodium

spz: Spermatozoïde

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

TRT : Traitement

Vit E : Vitamine E

RESUME

Les résultats obtenus ont montré que la qualité du sperme épидидymaire est dans les standards rapportés dans la littérature pour tous les paramètres spermatiques à savoir le volume, la concentration, la mobilité, la morphologie et la viabilité.

Des milieux utilisés ont montré un potentiel à conserver la mobilité spermatique après l'ajout des cyclodextrines qui permettent une meilleure potentialisation de l'effet du cholestérol et la vitamine E en augmentant leur solubilité, de même, l'association des trois molécules en même temps semble offrir une meilleure solution avec une bonne solubilisation.

Le cholestérol agit sur la membrane cytoplasmique pour augmenter sa solidité et la vitamine E en luttant contre le stress oxydatif.

Mots clés : sperme épидидymaire, conservation, cyclodextrine, cholestérol, vitamine E.

المخلص

أظهرت النتائج أن نوعية الحيوانات المنوية البربخية في المعايير التي أعلن عنها في الأدب لجميع معلمات الحيوانات المنوية من اجل كل المعايير، التركيز، والقدرة على الحركة، مورفولوجيا وقدرتها على البقاء حية.

وقد أظهرت الاوساط المستخدمة المحتملة للحفاظ على الحيوانات المنوية وعلى الحركة بعد إضافة السيكلودكسترين أنها تسمح بتقوية تأثير الكوليسترول والفيتامين ه عن طريق زيادة ذوبانها، وإن الجمع بين الثلاث جزيئات في وقت واحد يقدم أفضل حل مع الانحلالية الجيدة من خلال استخدام السيكلودكسترين.

يعمل الكوليسترول على زيادة قوة الغشاء الهبولي والفيتامين ه في القتال ضد الاكسدة.

كلمات البحث: الحيوانات المنوية البربخية، الحفظ، السيكلودكسترين، الكوليسترول، الفيتامين ه.

:

SUMMARY

The results showed that the quality of epididymal sperm is in the standards reported in the literature for all sperm parameters, namely the volume, concentration, motility, morphology and viability.

The media used have shown potential to maintain sperm motility after adding cyclodextrins allow better potentiating the effect of vitamin E and cholesterol by increasing their solubility, as well, the combination of three molecules simultaneously appears offer a better solution with good solubilization by use of cyclodextrin.

Cholesterol acts on the cytoplasmic membrane to increase its strength and vitamin E in fighting against oxidative stress.

Keywords: epididymal sperm, conservation, cyclodextrin, cholesterol, vitamin E.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Le succès de l'insémination artificielle dépend en grande partie de la qualité de la semence, c'est pourquoi il est important de disposer de techniques analytiques fiables permettant de l'évaluer. C'est pourquoi de nombreuses méthodes ont été développées pour tenter d'évaluer la fertilité d'un reproducteur par l'analyse in vitro de sa semence.

L'espèce bovine a bénéficié en premier lieu du développement de ces techniques de congélation de la semence. En effet, jusqu'en 1952, on ne savait conserver la semence que pendant 2 à 3 jours à la température de +5°C, la maîtrise de la congélation de la semence bovine combinée au développement de l'insémination artificielle a permis de différer dans le temps et l'espace la diffusion des gènes des meilleurs taureaux. Aujourd'hui, la pratique de l'insémination artificielle à l'aide de sperme congelé est très largement répandue dans le monde pour l'espèce bovine.

Si les principes de base de congélation de la semence bovine sont, de nos jours, assez bien maîtrisés, de nombreux travaux sont actuellement réalisés afin d'améliorer le taux de survie des spermatozoïdes après la phase de congélation-décongélation. L'intégration de nouvelles substances cryoprotectrices aux dilueurs a été envisagée afin de réduire la quantité et donc la toxicité des cryoprotecteurs classiques.

L'objectif du présent travail vise en premier lieu à collecter le sperme épидидymaire après abattage afin de vérifier si la semence peut être conservée.

Comme le sperme subit d'intenses actions oxydatives lors de sa conservation, nous avons préparé des milieux de conservation contenant du cholestérol pour renforcer la membrane cytoplasmique et la vitamine E connue pour être un puissant antioxydant. Cependant l'action de ces deux molécules est limitée en raison de leur faible solubilité dans les milieux de conservation, c'est pourquoi nous avons utilisé la cyclodextrine qui présente une cavité lipophile pour protéger le cholestérol et la vitamine E et une périphérie hydrosoluble pour dissoudre parfaitement dans les milieux de conservation. Cette étude expérimentale est précédée d'un travail bibliographique permettant de rappeler et de mieux comprendre les différentes étapes et manipulations nécessaires à la récolte et la congélation de la semence épидидymaire bovine.

1. Structure de l'épididyme

1.1. Anatomie de l'épididyme :

L'épididyme est un organe, formé d'un long canal tortueux hautement spécialisé, reposant sur la partie dorso latérale du testicule que l'on retrouve chez tous les mammifères supérieurs. Il est directement relié au testicule par les canaux efférents qui entrent par le pôle supérieur, ou tête de l'épididyme, et il se continue au niveau de sa queue, dans le canal déférent (Charrois, 1973). Les canaux efférents sont les prolongations du rete testis, ce petit bout de canal effectuant la jonction entre les différents tubules séminifères du testicule. L'épididyme se divise généralement en 3 régions: la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda). Celles-ci sont caractérisées par une variation dans la dimension du tubule et de l'épithélium, incluant une diminution de l'épaisseur cellulaire et, une augmentation du diamètre tubulaire et de la couche musculaire de la tête vers la queue. L'épithélium de toutes les régions contient 4 types cellulaires: les cellules principales, les cellules claires, les cellules basales et, les cellules halo ou lymphocytes intraépithéliaux (Goyal, 1985; Robaire et Hermo, 1987).

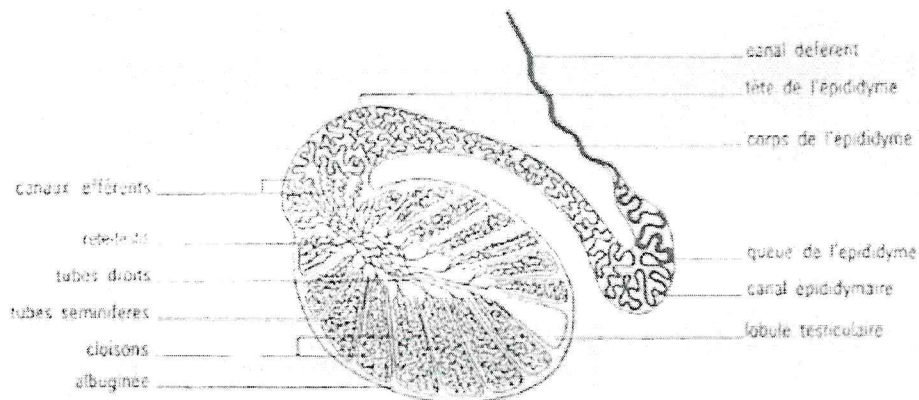


Figure n°1 : Structure interne du testicule (source INRAP)

1.1.2 Histologie de l'épididyme :

La paroi du canal épидидymaire est tapissée par un épithélium cylindrique pseudostratifié. Il est principalement composé de six types de cellules: les cellules principales, qui sont les plus abondantes, les cellules apicales, les cellules étroites, les cellules basales, les cellules claires et les cellules en halo (Adamali HI, Hermo L, 1996 et Serre V, Robaire B 1999 .)

a. Les cellules principales :

Sont des hautes cellules de forme cylindrique partant de la membrane basale jusqu'à la lumière du canal. Ces cellules deviennent progressivement plus petites vers la région distale de l'épididyme (Hermo L, Robaire, B.2002). Le pôle apical de ces cellules porte de nombreuses microvillosités, irrégulières et immobiles souvent appelées stéréocils. La grande capacité de synthèse protéique des cellules principales résulte de la présence d'organites hautement développés. Notamment, le réticulum endoplasmique, à la fois lisse et granulaire, est abondant au pôle basal (Hermo L, Oko R, Morales CR, 1994). Un deuxième type de réticulum endoplasmique est aussi retrouvé dans la région apicale et supra-nucléaire des cellules principales. De plus, ces cellules présentent aussi des aspects associés aux fonctions de sécrétion, d'échange et de phagocytose. Ces fonctions sont mises en évidence par la présence des vacuoles claires au pôle apical et les nombreuses vésicules de pinocytose, les vésicules mantelées d'endocytose, les lysosomes et les inclusions hétérogènes dérivées de lysosomes. Les cellules principales sécrètent à la fois sels ioniques, de petites molécules organiques, des protéines et des glycoprotéines dans la lumière de l'épididyme. Ces molécules sécrétées sont essentielles à la maturation des spermatozoïdes (Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC, 1995).

b. Les cellules basales :

Sont des petites cellules à la fois rondes et allongées. Elles ont, par conséquent, une apparence dite hémisphérique. De plus, ces cellules comportent de longues et minces projections qui enveloppent une grande proportion de la base de l'épithélium. Ces cellules sont distribuées tout le long de l'épididyme et sont situées du côté basal de l'épithélium (Hermo L, Robaire, B, 2002). Bien que la fonction exacte de ces cellules ne soit pas encore bien établie, il est proposé que ces cellules, jouent un rôle de détoxification et de protection de l'épithélium en éliminant les radicaux libres par un des membres de la famille des glutathion-S-transférases (Veri JP, Hermo L, Robaire B, 1993). Ces cellules sont aussi impliquées dans la sécrétion de facteurs servant comme régulateurs paracrines de certaines fonctions des cellules principales et des autres cellules environnantes (Hermo L, Robaire, B, 2002). Entre autres, les cellules basales sont importantes dans la formation du fluide épидидymaire en régulant le transport des électrolytes et de l'eau par les cellules principales (Leung GP, Cheung KR, Leung CT, Tsang MW, Wong PY, 2004).

c. Les cellules apicales et étroites :

Elles sont retrouvées principalement dans la tête épидидymaire. Ces cellules ont un noyau sphérique en position apicale, et n'entrent pas en contact avec la membrane basale. Leur cytoplasme est très riche en mitochondries (Martinez-Garcia et al., 1995). Elles sont capables d'endocytose (Hermo and Robaire, 2002), et interviendraient dans l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia et al. 1995).

d. Les cellules claires :

Les cellules claires sont des cellules larges. Elles contiennent des vésicules de tailles diverses dans leur région apicale (dont des puits recouverts), des lysosomes dans leur région moyenne, et des gouttelettes lipidiques dans leur partie basale (Robaire and Viger, 1995). Cette distribution d'organites est cohérente avec une fonction d'élimination active de matériel depuis la lumière épидидymaire. En effet, elles présentent une forte capacité d'endocytose (Robaire and Viger, 1995). De plus à l'instar des cellules apicales, un rôle dans l'acidification du fluide épидидymaire a été proposé pour les cellules claires (Beaulieu et al. 2004; Hermo eal, 2000).

e. Les cellules en halo :

Les cellules en halo sont de petites cellules présentes sur toute la longueur de l'épididyme généralement situées à la base de l'épithélium (Hermo and Robaire, 2002). Chez un rat adulte jeune, les cellules en halo comprennent des lymphocytes T auxilliaires, des lymphocytes T cytotoxiques, et des monocytes/macrophages, mais pas de lymphocytes B. Avec l'âge il y a une augmentation, spécifique de la région épидидymaire, du nombre de chacun de ces types cellulaires, ainsi que l'apparition occasionnelle d'éosinophiles et de lymphocytes B (Hermo and Robaire, 2002). Ces cellules pourraient intervenir dans la réponse immune innée de ce tissu qui échappe à la réponse immune adaptative à cause de la barrière hémato-épидидymaire.

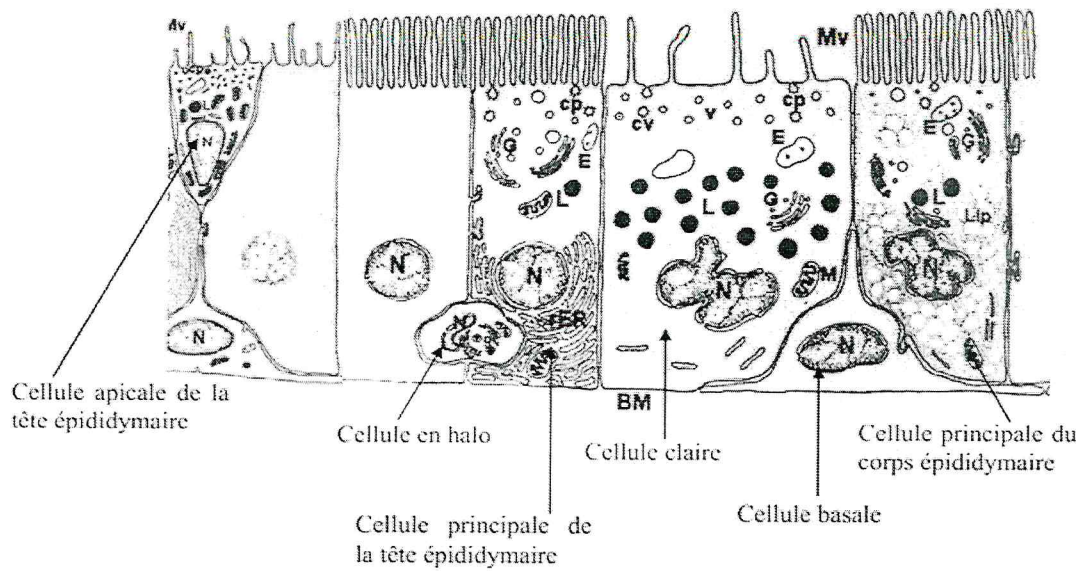


Figure n°2 : Représentation schématique de différents types cellulaires épидидymaires des mammifères cp : puits recouverts, E : endosomes, L : lysosomes, G : appareil de Golgi, rER : reticulum endoplasmique rugueux, lip : gouttelettes lipidiques, Mv : microvillosités, BM : membrane basale, N : noyau, v : petites vésicules apicales (Modifié d'après Hermo et Robaire, 2002).

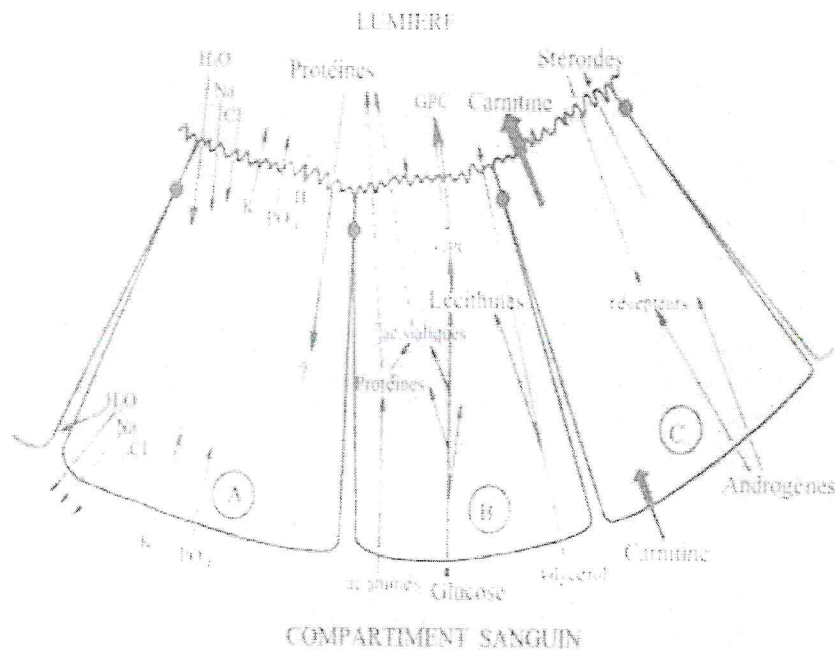


Figure n°3 : Fonctions de sécrétion et de réabsorption de l'épithélium épидидymaire (Wrobel, 1990)

1.2. Fonction de l'épididyme :

1.2.1. Fonctions et régulation de l'épithélium épидидymaire :

Les spermatozoïdes immatures et immobiles quittant le testicule séjournent un certain temps dans l'épididyme. Au cours de leur transport (laps de temps qui varie selon les espèces), les spermatozoïdes deviennent mobiles et féconds (Bedford, 1966; Bedford, 1975; Cooper, 1991; Orgebin-Gist et al., 1975). Les modifications fonctionnelles des spermatozoïdes dans l'épididyme incluent une altération du métabolisme, des changements dans le profil et l'efficacité de l'activité flagellaire (Acott et al., 1983; Cooper, 1986), et l'acquisition de la capacité de liaison à la zone pellucide (Orgebin-Crist et Fournier-Delpech, 1982; Saling, 1982). Ces étapes de la maturation épидидymaire sont accomplies grâce aux différentes fonctions de l'épithélium épидидymaire. En effet, ses fonctions majeures sont de maintenir un microenvironnement approprié pour la maturation dans la tête et le corps, et le maintien de spermatozoïdes fertiles dans la queue de l'épididyme (Amann, 1987; Jones et Glover, 1975). Le microenvironnement présent à l'intérieur de la lumière de l'épididyme, est entre autres, le résultat de l'entrée de fluide testiculaire et des activités très développées d'absorption et de sécrétion de l'épithélium épидидymaire (Eddy, 1988; Syntin et al., 1996; Yanagimachi, 1994).

1.2.2 La résorption de l'épithélium épидидymaire :

La nature absorbante de l'épithélium épидидymaire est mise en évidence par l'augmentation de la concentration cellulaire, ou spermique, lors de la progression dans Le tractus. La composition changeante du fluide intraluminal de la tête à la queue de l'épididyme reflète non seulement l'activité de résorption de l'épithélium épидидymaire qui diffère d'un segment à l'autre, mais l'élaboration de substances spécifiques y étant produites ou sécrétées (Amann, 1987; Goyal, 1985). L'épithélium épидидymaire semble perméable aux petites molécules, et transporte ces composés contre un gradient de concentration dans le lumen. Des études biochimiques ont établies que la composition changeante du fluide épидидymaire comprend stéroïdes, ions, glycérylphosphocholine, carnitine, acide sialique, myo-inositol et protéines (Amann, 1987; Brooks, 1979; Cooper, 1986, Jones et Glover, 1975; Yanagimadu, 1994). Le transport régional de molécules à l'intérieure du lumen au niveau de la tête de l'épididyme est plus grand qu'au niveau du corps et de la queue pour l'inositol, et la carnitine (Yeung et al., 1980).

1.2.3. La régulation androgénique de la structure et des fonctions de l'épididyme :

La dépendance androgénique de la structure et des fonctions de l'épididyme est reconnue depuis des années (Cuasnicu et al., 1984b; Orgebin-Crist et al., 1975). Les androgènes maintiennent la morphologie et l'intégrité fonctionnelle de l'épididyme, assurant ainsi la maturation des spermatozoïdes (Blaquier et al., 1972). Les androgènes synthétisés par les cellules de Leydig du testicule, parviennent dans l'épididyme surtout via le liquide intra-luminal. La testostérone liée à "l'androgen-binding protéine" (ABP) (Orgebin-Crist, 1967), sécrétée par les cellules de Sertoli, atteint la partie proximale de l'épididyme. Là, elle est captée et transformée en son métabolite le plus actif, la dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 α -réductase (Robert et Robaire, 1994). Chez les espèces les plus étudiées, on remarque un gradient de concentration d'androgènes intra-luminaux qui diminue le long de l'épididyme. Les androgènes régissent le métabolisme intermédiaire, le transport d'ions, des glucides et de la carnitine à travers la membrane épithéliale, la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (Bérubé et al., 1996; Blaquier et al., 1972; Cuasnicu et al., 1984-; Jones et Glover, 1975). De plus, Carballada et Saling (1997) ont récemment démontré l'importance de l'interaction cellule-cellule et de la température pour l'accomplissement des fonctions de l'épididyme. En effet, des cellules épithéliales de l'épididyme mises en co-culture avec des fibroblastes épидидymaires sont capables de sécréter des protéines spécifiques à l'épididyme sous stimulation androgénique. Par contre, les androgènes seuls ne sont pas capables d'induire cette fonction des cellules épithéliales de l'épididyme (Carballada et Saling, 1997).

1.2.4 Maturation épидидymaire des spermatozoïdes :

Le concept de la maturation réfère à l'acquisition par les spermatozoïdes de la capacité de se mouvoir ainsi que de pouvoir lier et féconder l'ovule. Il est de plus en plus reconnu que la maturation épидидymaire se fait de façon progressive le long de l'épididyme, et que la composition changeante du fluide luminal y est pour beaucoup dans le processus de maturation. En effet, des études ont démontrées, que l'exposition de spermatozoïdes immatures au fluide d'un segment restreint de l'épididyme ne permet pas une maturation adéquate de ceux-ci (Bedford, 1975; Orgebin-Crist et al., 1975). Le site où les spermatozoïdes commencent à acquérir leur habilité à féconder varie d'une espèce à l'autre. Chez certaines espèces, comme par exemple le porc, c'est le segment distal de la tête de l'épididyme, alors que chez d'autres comme le rat, c'est la partie distale du corps de l'épididyme (Yanagimachi, 1988). De façon générale, comme chez le taureau (Amann, 1987), ce n'est qu'à leur entrée dans la queue de l'épididyme que la grande majorité des spermatozoïdes atteignent leur potentiel fécondant

complet. D'où l'évidence, qu'une série de changements complexes interviennent lors de la maturation des spermatozoïdes, et résultent d'une séquence d'événements impliqués à différents points dans la tête et le corps de l'épididyme (Hammerstedt et Parks, 1987; Soler et al., 1994).

2. Intérêt du sperme épидидymaire et les différents techniques de récolte :

2.1. Intérêt du sperme épидидymaire :

Les modifications morphologiques et biochimiques apportées aux spermatozoïdes durant leur cheminement dans le tubule tortueux de l'épididyme furent et sont toujours le sujet de nombreuses recherches (Bedford, 1975; Brooks, 1979; Orgebin-Crist, 1967; Turner, 1979; Vogimayr et al., 1980; Eddy, 1988). C'est principalement la membrane plasmique des spermatozoïdes qui subit les changements structuraux et biochimiques extensifs lors du transit dans l'environnement intra-luminal de l'épididyme (Cooper, 1991; Dacheux et al., 1989). où une accumulation des protéines à la surface des spermatozoïdes fut remarquée (Saxena et al., 1986). Or, il a clairement été démontré chez une variété d'espèces que des protéines sécrétées par l'épididyme, plus spécialement les glycoprotéines, lient et modifient la membrane plasmique des spermatozoïdes; chez le rat (Brooks et Tiver, 1984) l'humain (Boué et al., 1996; Ross et al., 1990), et chez le taureau (Acott et Hoskins, 1983; Barker et Amann, 1971).

Les glycoprotéines ne sont pas les seules molécules membranaires du spermatozoïde qui changent durant la maturation épидидymaire. Des changements au niveau des lipides qui composent la membrane plasmique sont aussi le résultat de la maturation épидидymaire (Lavon et al., 1970; Parks et Hammerstedt, 1985; Vierula et Rajaniemi, 1982). À mesure que le spermatozoïde chemine dans l'épididyme son contenu en lipides se modifie et diminue (Eddy, 1988; Nikolopoulou et al., 1985), modifiant ainsi la fluidité de sa membrane plasmique. Cela correspond avec le fait que la dilution dans la synthèse des lipides se fait principalement dans la queue de l'épididyme (Dacheux et Paquignon, 1989). Les principaux lipides de la surface des spermatozoïdes qui varient lors de la maturation incluent une diminution en phosphatidyléthanolamine et en phosphatidylinositol, de même qu'une augmentation en desmostérol, cholestérol sulfate, phosphatidylcholine et polyphosphoinositides. De plus, il y a une diminution en acide gras et une augmentation en diacylglycérol (Eddy, 1988). Les changements dans la quantité et la composition en lipides de la membrane plasmique durant la maturation pourraient expliquer pourquoi les spermatozoïdes éjaculés sont plus sensibles aux changements extérieurs que le sont les spermatozoïdes testiculaires (Hammerstedt et al., 1979).

L'acquisition et les changements de la motilité des spermatozoïdes durant le transit épидидymaire sont amplement décrits depuis plusieurs années (Acott et Carr, 1984; Acott et Hoskins, 1983; Bardin et Gagnon, 1982; Brandt et al., 1978; Carr et Acott, 1984; Dachev et Paquignon, 1980; Eddy, 1988; Gaddum, 1968; Morton et al., 1974; Soler et al., 1994). L'épididyme a une action à la fois de maturation (Chevrier et Dacheux, 1992) et de résorption sur la motilité. L'habilité des gamètes mâles à se mouvoir de façon progressive n'apparaît qu'après le transit au travers du corps de l'épididyme (Bedford, 1975; Dachev et Voglmayr, 1983). Le développement de la motilité associé à la maturation épидидymaire a été démontré chez le bovin par l'association d'une protéine produite par l'épithélium épидидymaire, la "sperm forward motility" (Acott et Hoskins, 1981). L'influence inhibitrice qui agit pour garder les spermatozoïdes quiescents, mais fertiles, dans la queue de l'épididyme avant l'éjaculation induit la dépression de la motilité par la sécrétion de protéines visqueuses, qui préviennent physiquement le mouvement flagellaire (Acott et Carr, 1984). La capacitation prématurée des spermatozoïdes à l'intérieur de l'épididyme est prévenue par la sécrétion de facteurs décapacitants par l'épithélium épидидymaire. Ces facteurs induisent une stérol sulfatase et des protéines, de même que des ions Mg^{++} et K^+ qui inhibent la réaction de l'acrosome in vitro (Cooper, 1991; Robaire et Hermo, 1987). Chez certaines espèces (souris, rat, singe et humain), la dilution de spermatozoïdes épидидymaires dans un milieu osmotique approprié permet de retrouver la motilité (Morton et al., 1978).

la maturation épидидymaire résulte des interactions entre l'épithélium épидидymaire, le fluide intraliminaire et la membrane plasmique du spermatozoïde qui provoquent 1) la perte ou transformation des molécules de la surface spermique par l'action de protéases, glucosidases, glucoaminidases, glycosyltransférase et stérol sulfatase, 2) le retrait de composantes qui masqueraient des molécules ou certains épitopes déjà en place, 3) l'absorption et l'incorporation de polypeptides du fluide épидидymaire afin que les spermatozoïdes soient fonctionnellement matures et aptes à se lier et se fusionner avec l'ovocyte (Cooper, 1991; Eddy et al., 1985; Roberts, 1987; Voglmayr et al., 1980; Yanagimachi, 1994).

l'importance de la maturation épидидymaire se traduit en deux rôles:

promouvoir l'habilité du spermatozoïde à répondre de façon appropriée aux conditions retrouvées dans le tractus femelle afin de réussir la fécondation, et prévenir l'expression de cette capacité dans le tractus génital mâle (Cooper, 1986).

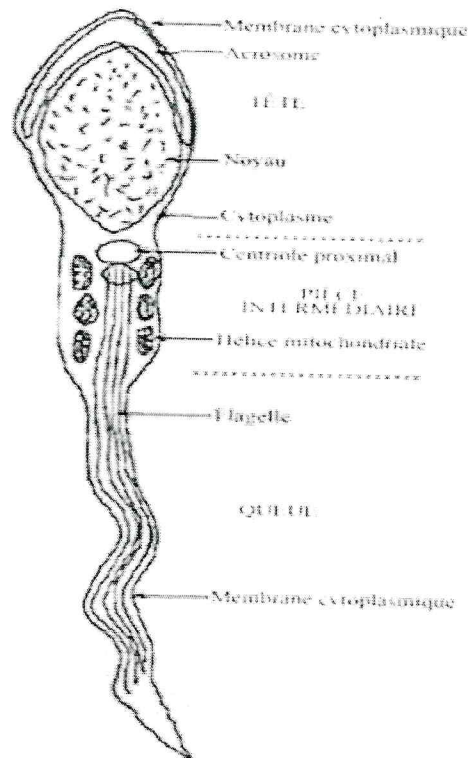


Figure n°4 : Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde mûr

(Source: <http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/images/Pagee12a.jp>)

2.2. Techniques de récoltes du sperme épидидymaire :

a. Méthode de float-up :

La méthode de float-up a été décrite par (Cary et al. 2004) avec des modifications mineures, la queue et la partie proximale de l'épididyme sont incisées dans une boîte de pétrie lavée avec environ 2,5 ml d'extension chauffée (37°C) et ensuite transférés dans une seconde boîte de Pétri et a été lavé nouveau avec environ 2,5 ml de la même extension. Suspension de sperme obtenu à partir des deux étapes de lavage ont été filtrée à travers un tamis de 200µm inoxydable et recueilli dans un tube de verre.

b. méthode de rétrograde flushing :

La méthode de rétrograde flushing a été décrite par (Martinez-Pastor et al. 2006). La queue de l'épididyme et le canal déférent sont isolées du reste de l'épididyme en effectuant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corpus et la queue proximale. Après cela, la lumière du canal

déférent a été pourvue d'une canule avec une aiguille de 22G émoussée. Les spermatozoïdes ont ensuite été rincés dans une direction rétrograde des canaux déférents à travers la queue de l'épididyme avec une seringue chargée avec environ 4 ml de TRIS A réchauffé (37 ° C).

3. Méthodes d'évaluation de la qualité du sperme :

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques, physico-chimiques et biochimiques.

3.1. Évaluation macroscopique :

Immédiatement après la récolte, on procède à un examen visuel du sperme dans le tube de récolte qui permet d'apprécier le volume, la couleur et la consistance de l'éjaculat.

3.1.1. Volume :

Le volume de semence recueilli par vagin artificiel varie en fonction de l'âge, de la race, de la préparation du taureau, de l'alimentation et pour un même taureau, des facteurs psychiques et environnementaux. Le volume varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987). Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte.

Le volume récolté de l'épididyme varie entre 0.5ml et 3ml selon (A. Darin-Bennett, I.G.1977).

3.1.2. Couleur :

Chez le taureau, la couleur normale du sperme est dans la plupart des cas ivoire-crème ou blanc-laiteux, blanc-jaunâtre (en fonction de la concentration de spermatozoïdes). La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant (Ezekwe, 1988). L'aspect est généralement homogène et crémeux (Djabakou et al. 1984).

3.1.3. Viscosité :

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet l'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse ». La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signe une pathologie (Parez et Duplan, 1987).

3.1.4. Etude physico-chimique et biochimique du sperme :

L'activité métabolique des spermatozoïdes est un important indicateur de la qualité du sperme. L'évaluation peut se faire par plusieurs moyens tels que la mesure du pH (Derivaux, 1971), l'indice de fructolyse, la réduction du bleu de méthylène, le test de résistance au NaCl, l'oxydation du pyruvate (Melrose et Turner, 1952), la réduction de la résazurine, etc. Le pH normal du sperme est proche de la neutralité (pH=7) avec de faibles variations (6,8 à 7,2). Mais plusieurs auteurs cités par (Traore 1996) préconisent qu'il est légèrement acide car le pH peut descendre à 6,5.

Tableau I : classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : recommandation de la société de Theriogenology (Elmore ,1985).

couleur	turbidité	Consistance et viscosité	Concentration prévue en spermatozoïdes par ml	Qualité attribué au sperme
blanc	opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
blanc	opaque	Faiblement visqueuse	400 à 750millions	Bonne
blanc sale	Légèrement translucide	laiteuse	250 à 400 millions	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	translucide	aqueuse	Inférieur à 200 millions	Mauvaise

3.2. Evaluation microscopiques :

3.2.1. Evaluation avec méthode classique :

3.2.1.1. Motilité massale :

La motilité massale est évaluée immédiatement après la collecte du sperme. L'éjaculat est maintenu à une température de 37°C et l'examen est réalisé sur une platine chauffée à 37°C. Le matériel en contact avec le sperme et la platine du microscope sont également conservés à 37°C pour éviter tout choc thermique. La motilité massale est estimée au microscope à contraste de phase au grossissement x100 : une microgoutte de sperme est déposée sur une lame et le mouvement global des spermatozoïdes est apprécié en fonction de l'intensité des vagues observables. Une note de 0 (aucun mouvement de vague décelable) à 5 (tourbillons rapides) est attribuée à l'échantillon observé; il est possible de convertir cette note en un pourcentage

approximatif de spermatozoïdes mobiles (la note 3 correspondant approximativement à 70% de spermatozoïdes mobiles). Lors de cet examen, on ne note pas la motilité individuelle des spermatozoïdes mais les turbulences engendrées par la conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence observée. La classification classiquement adoptée dans les laboratoires d'examen de la des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence observée. La classification classiquement adoptée dans les laboratoires d'examen de la semence, est détaillée dans le Tableau suivant.

Tableau II: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale

Note	0	1	2	3	4	5
%de spermatozoïdes Mobiles	0%	Environ 20%	Environ 40%	Environ 60%	Environ 80%	Près de 100%

Source : Présentation de la coopérative de l'AIGLE.

3.2.1.2. Motilité individuelle :

L'évaluation de la motilité individuelle des spermatozoïdes est complémentaire de la note de motilité massale. Cet examen vise à évaluer le pourcentage de spermatozoïdes motiles, c'est-à-dire ayant une mobilité propre et non pas se mouvant de façon passive .Pour cet examen, le sperme est dilué 10 à 40 fois dans un tampon isotonique tiède et on observe à fort grossissement (x 200) une goutte de cette solution placée entre lame et lamelle, en éclairage contrasté (ou mieux encore, au microscope à contraste de phase). On note le pourcentage de spermatozoïdes dotés d'une motilité dite « fléchante », c'est-à-dire les spermatozoïdes présentant une trajectoire quasi rectiligne et capables de traverser le champ en 2 à 3 secondes. Certains spermatozoïdes présentent des mouvements rotatoires circulaires ou des mouvements d'amplitude très réduite, ils ne sont donc pas comptabilisés dans les spermatozoïdes mobiles. (Dumont, 1997).

Tableau III: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

Critères	Notes
Absence de spermatozoïdes : azoospermie	0
Absence de spermatozoïdes vivants: spermatozoïdes morts (absence de mobilité)	1
25% de spermatozoïdes vivants	2
60% de spermatozoïdes vivants	3
80% de spermatozoïdes vivants	4
100% de spermatozoïdes vivants	5

3.2.1.3. La numération :

La concentration de la semence est déterminée par comptage cellulaire à l'aide d'un hématimètre (semence diluée au 100ième dans du sérum physiologique formolé à 2%), par opacimétrie, par la cellule de thomas, et par densimétrie. La concentration moyenne de l'éjaculat d'un taureau est de 1 milliard de spermatozoïdes par millilitre. (Parez et Duplan, 1987).

La numération peut être déterminée par :

comptage direct des spermatozoïdes en utilisant la cellule de THOMA sur du sperme dilué à 3% de Na Cl ou par utilisation de la densité optique, ou l'utilisation de compteur électronique, et il y a la détermination du volume cellulaire par centrifugation.

Après comptage des spermatozoïdes, en utilisant la cellule de THOMA, le nombre de spermatozoïdes est déterminé par la formule suivante : $C=N \times 4 \times 10 \times d$, avec :

C : la concentration en spermatozoïdes du sperme.

N : le nombre de spermatozoïdes (spz) dans quatre grandes carrées de la cellule de THOMA.

x4 : puisque la cellule contient 16 carrées.x10 : profondeur de la chambre.

d : taux de dilution.

Le bon sperme a une concentration supérieure à $0,5 \times 10^9$ spermatozoïdes/ml.

Avant le comptage, il faut bien vérifier à faible grossissement, que la répartition des éléments soit homogène, au moindre doute, le mélange sera homogénéisé de nouveau et le montage

recommencé. Après repérage des limites de la cellule (grossissement x100), les éléments sont comptés au microscope au grossissement x400. La lame est balayée de façon méthodique, de gauche à droite et du haut vers le bas. En général les spermatozoïdes sont comptés sur 5 grands carrés. Afin d'éviter de surévaluer le nombre de spermatozoïdes, pour les éléments situés entre deux carrés, ne sont comptés que ceux qui sont à cheval sur les graduations, en général celles formant la lettre L.

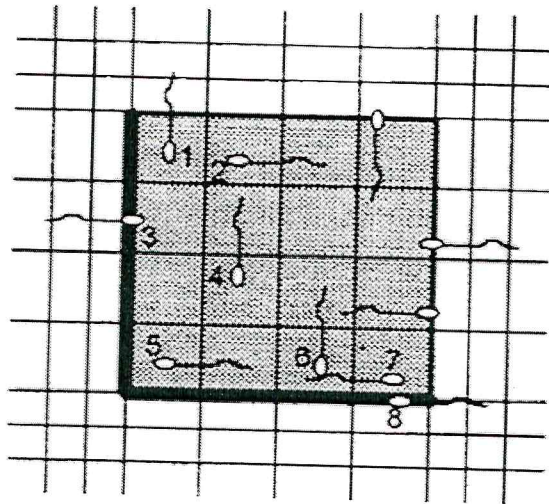


Figure n°5 : Comptage des spermatozoïdes à la cellule de Thoma; prise en compte des éléments « à cheval » sur les graduations.

3.2.1.4. La vitalité.

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est apprécié de façon approximative, au microscope optique, cette valeur est fortement corrélée à la qualité du mouvement. Cette estimation est subjective et dépend fortement de l'expérience de l'opérateur. L'examen s'effectue de manière plus aisée sur frottis coloré à l'éosine-nigrosine, en effet, les spermatozoïdes dont la membrane est endommagée laissent pénétrer le colorant et apparaissent donc roses (éosine) sur fond bleu (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane intacte et apparaissent donc incolores. Pour effectuer cette coloration, une goutte de sperme puis deux gouttes d'une solution d'éosine-nigrosine sont déposées sur une lame de microscope, puis mélangées délicatement au moyen d'un mélangeur en verre rodé. Ensuite, l'étalement est effectué, puis le frottis est séché par agitation. Si le taux de spermatozoïdes vivants est inférieur à 60%, la semence n'est pas conservée. (Dumont, 1997).

3.2.1.5. La morphologie des spermatozoïdes bovins :

Le spermatozoïde normal mesure environ 70 μm chez le taureau. La tête du spermatozoïde est de forme ovoïde et aplatie, elle mesure 8 à 9 μm de longueur, 4 à 4,5 μm de largeur et 0,5 à 1 μm d'épaisseur. L'acrosome couvre environ 60% de la tête et forme sur le bord antérieur une crête apicale, sorte de bourrelet. La pièce intermédiaire fixée à la tête, forme un cylindre d'environ 10 à 12 μm de long et d'un diamètre de 1 μm . Le flagelle mesure de 52 à 55 μm de longueur pour un diamètre de 0,5 μm et se termine par une section filamenteuse de 0,2 μm de diamètre (Bahr et Zeitler, 1964).

3.2.1.6. Les anomalies morphologiques :

On distingue trois types de classifications de la morphologie des spermatozoïdes. La première dépend du site de dysfonctionnement et sépare les anomalies en anomalies primaires et secondaires. La désignation d'anomalie primaire est réservée à des anomalies se produisant lors de la spermatogénèse (à l'intérieur des tubes séminifères) contrairement aux anomalies dites secondaires qui surviennent après la spermatogénèse durant la maturation épидидymaire voire lors de l'éjaculation. Cette classification est toutefois contestable car certaines anomalies comme les gouttelettes proximales classées initialement en anomalies secondaires résultent finalement d'une malformation de la cellule lors de la spermatogénèse et non pas d'un dysfonctionnement épидидymaire comme cela était évoqué auparavant (Morrow, 1986).

La seconde classification est fonction de la répercussion des anomalies des spermatozoïdes sur la fertilité des taureaux. Elle a été proposée par Blom en 1973 et distingue les anomalies mineures des anomalies majeures. Cependant les données actuelles sur la relation entre ces anomalies morphologiques et la fertilité sont limitées, c'est pourquoi cette classification, bien qu'universellement reconnue et utilisée, reste contestable. (Morrow, 1986).

Enfin le troisième type de classification est basé sur la localisation de l'anomalie sur le spermatozoïde (anomalie de tête, de pièce intermédiaire, de flagelle). C'est la classification adoptée par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (Morrow, 1986).

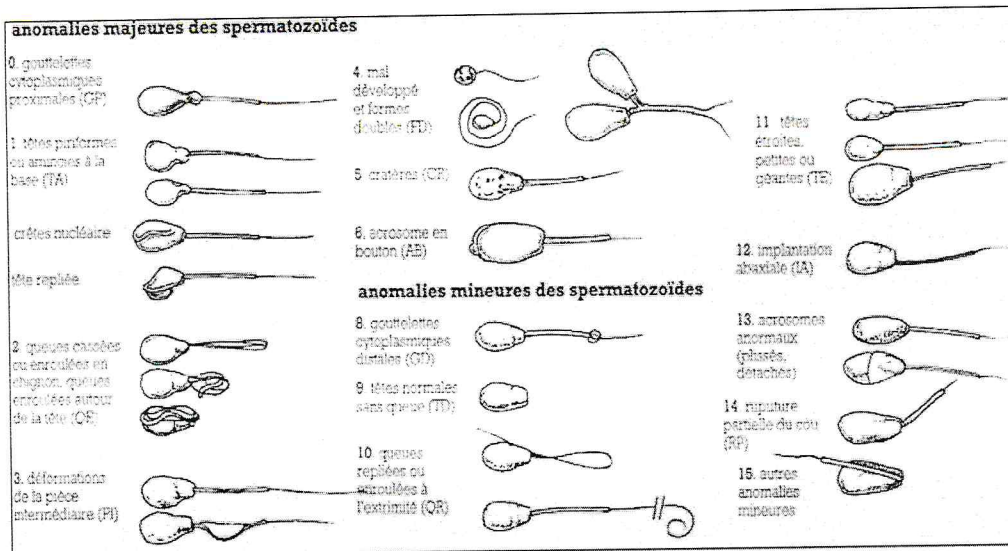


Figure n°6 : Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine (Dumont, 1997).

3.2.2. Evaluation avec analyseur :

Un programme d'analyse de la motilité des spermatozoïdes assistée par ordinateur (CASA; IVOS version 12; Hamilton-Thorne Biosciences, MA, USA) est utilisé pour analyser les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes.



Figure n°7 : photo de l'analyseur « CASA. »

4. Analyse du spermogramme.

La décision de garder ou détruire le sperme récolté est fonction des résultats que fournit l'examen de sa qualité. Les normes communément admises pour l'évaluation de la qualité d'un éjaculat dans le cadre de son utilisation pour l'insémination artificielle sont (Parez et Thibier, 1983) :

- volume > 1 ml.
- concentration supérieure à $0,5 \times 10^9$ par ml.
- motilité supérieure ou égale à 3.
- pourcentage de spermatozoïdes vivants > 60%.
- taux de spermatozoïdes sans anomalies majeures > 80%.
- pH compris entre 6,5 et 7,2.

Divers facteurs tels que le mode de collecte, l'hygrométrie, la température, la pluviométrie, la saison et l'alimentation peuvent influencer la variation du spermogramme.

La motilité, la proportion des spermatozoïdes anormaux et la viabilité (taux de spermatozoïdes vivants/spermatozoïdes morts) de la semence sont les trois paramètres principaux utilisés afin d'évaluer sa qualité au laboratoire, avant son utilisation. Ces critères n'apportent une indication très valable que lorsqu'ils sont pris en compte simultanément. Toutefois, il est souvent difficile d'expliquer les variations de fertilité observées sur les vaches inséminées avec l'observation seulement au microscope. La cytométrie de flux est une méthode d'avenir qui permettra sans doute de préciser la fertilité et la qualité de la semence. En effet, cette méthode basée sur le marquage des spermatozoïdes par des fluorochromes permet d'analyser non seulement les paramètres décrits plus haut, mais aussi plusieurs paramètres cellulaires (intégrité du matériel génétique : ADN, intégrité des mitochondries : source principale d'énergie pour le sperme, l'état de capacitation et l'intégrité des membranes) qui affectent la fertilité des spermatozoïdes (Rodriguez-Martinez, 2003).

4.1. Préparation et conservation de la semence en vue de l'insémination artificielle :

L'insémination artificielle est une technique de reproduction qui consiste à prélever la semence d'un mâle sain pour la déposer à l'aide d'instruments appropriés dans les voies génitales d'une femelle au moment le plus opportun. Cette méthode de reproduction qui supprime le rapprochement sexuel non seulement permet d'éviter la transmission des maladies sexuellement transmissibles mais aussi de multiplier considérablement la capacité de reproduction

des géniteurs ayant reçu préalablement un agrément zootechnique et sanitaire (Bizimungu, 1991).

L'IA est un outil indispensable pour le progrès génétique, et elle est considérée comme la première génération des biotechnologies animales (Diop, 1993).

4.1.1. Critères de décision pour la conservation du sperme :

Les changements de température imposés lors de la congélation et de la décongélation endommagent les membranes cytoplasmiques, le cytosquelette, les organites impliqués dans la mobilité ainsi que l'acrosome. Les capacités fonctionnelles du spermatozoïde sont donc altérées. C'est pourquoi il est important, dans le cadre de l'insémination artificielle, d'évaluer la qualité de la semence après congélation. Ainsi, pour chaque éjaculat conservé à -196°C dans l'azote liquide, la motilité massale (et/ou individuelle) est évaluée après décongélation de deux à trois paillettes de même que le pourcentage de spermatozoïdes morts et vivants, avec les mêmes méthodes que celles employées pour l'examen de la semence fraîche. D'une façon générale, la corrélation entre l'aptitude à la congélation et la qualité du sperme frais est relativement élevée (Dumont, 1997).

Pour les taureaux utilisés en insémination artificielle, la motilité doit être supérieure à 60%, soit une note supérieure à 3 attribuée en motilité massale. La concentration de l'éjaculat doit être supérieure à 0,5 milliard par ml. Le seuil d'anomalies morphologiques se situe à moins de 30% de spermatozoïdes anormaux, moins de 20% d'anomalies majeures et moins de 10% pour chaque rubrique d'anomalies majeures (Dumont, 1997).

4.1.2. Principe de Préparation et conservation de la semence :

La semence est le sperme préparé (dilué-conditionné - conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. En effet, un éjaculat contient un nombre de spermatozoïdes supérieur à ce qui est requis pour une insémination. Selon plusieurs auteurs rapportés par (Traore 1996), au moment de l'insémination, une paillette doit contenir au minimum 8-10 millions de spermatozoïdes mobiles après dégel. Selon le même auteur, il a été admis qu'une paillette de semence bovine doit contenir au moins $15 \text{ à } 20 \cdot 10^6$ spermatozoïdes avant congélation. Prenant en compte les pertes liées à la congélation et à la décongélation, certains auteurs préconisent la concentration de 30 à $40 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par dose au conditionnement.

Les critères de décision pour la conservation de l'éjaculat sont résumés dans le Tableau suivant :

Tableau IV : Critères de décision pour la conservation de l'éjaculat (d'après Dumont, 1997).

Critères	Seuil pour l'utilisation en Insémination Artificielle	Seuil pour l'utilisation en monte naturelle
Aspect macroscopique	Aspect « crémeux » à « laiteux »	Aspect « crémeux » à « laiteux »
Volume	0,5 à 14 ml	1 à 10 ml
Motilité massale	Note ≥ 3	Note ≥ 2
Motilité individuelle	$\geq 60\%$	$\geq 30\%$
Pourcentage de spermatozoïdes anormaux totaux	$\leq 30\%$	$\leq 40\%$
Pourcentage de spermatozoïdes ayant des anomalies majeures	$\leq 20\%$	$\leq 30\%$
Pourcentage de spermatozoïdes dans chaque rubrique d'anomalies majeures	$\leq 10\%$	$\leq 20\%$
Concentration	$\geq 0,5.10^9$ spermatozoïdes/ ml	$\geq 0,3. 10^9$ spermatozoïdes/ ml

Ainsi, la préparation de la semence a pour objectifs :

- d'accroître le volume (dilution) de telle façon qu'un plus grand nombre de femelles puissent être inséminées.
- de protéger les spermatozoïdes pour qu'ils puissent supporter sans dégradation la succession des opérations de refroidissement, congélation et décongélation.
- de conditionner et conserver une dose individuelle qui servira à l'insémination de la vache.

4.1.3. La Conservation de la semence :

Le type de conservation de la semence est conditionné par son utilisation ultérieure. Ainsi, après refroidissement, les semences peuvent être maintenues réfrigérées (IA avec les semences fraîches) ou congelées, pour les semences destinées à une longue conservation.

Types de semence : on a deux types de semences :

a. Semence fraîche : elle ne peut être utilisée que dans un délai maximum de 3 jours et elle est conservée à 5°C .Il faut éviter le choc thermique en faisant baisser la température de 5°C toutes les 10 mn, entre 37°C, 22°C et 5°C toutes les 5 mn jusqu'à 5°C. (Fall, 1995).

b. Semence congelée : La congélation est une méthode de conservation qui a révolutionné l'IA. En effet, la congélation a permis une diffusion large et facile de la semence aussi bien dans le temps que dans l'espace. La méthode utilise l'azote liquide dans laquelle la semence est conservée à -196°C. Cette conservation est rendue possible grâce à l'action cryoprotectrice de certains produits tel que le glycérol. Cette méthode permet de conserver les semences pendant plusieurs années si le niveau d'azote est régulièrement respecté (Adoue, 1991).

4.1.4. Techniques de préparation et conservation de la semence :

L'éjaculat accepté, en fonction des résultats de son évaluation, doit passer par plusieurs étapes avant d'être mis en paillettes et conservé dans l'azote liquide.

L'un des premiers temps de la préparation de la semence consiste à abaisser graduellement la température de + 32° C à + 5° C pendant une durée variable de 30 à 120 minutes .Lorsque le sperme est dilué à + 32° C et refroidi jusqu'à + 5°C, la vitalité des spermatozoïdes se maintient plus longtemps. Un maintien de la semence à + 5° C en présence de glycérol est nécessaire avant d'amorcer la descente vers les températures de congélation (- 79° C ou -196°C). (Adamou-N'Diaye, 1994).

4.1.5. Dilution de la semence :

La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles. (Hanzen, 1999).

Après mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, la quantité de dilueur à apporter à l'éjaculat et le nombre de doses qui peuvent être produites sont alors calculées. Le nombre de

spermatozoïdes par paillette est de 20 millions pour un volume de 0.225 ml. Le dilueur doit être porté à une température de 35°C avant d'être ajouté à la semence.

Il permet d'apporter aux spermatozoïdes les éléments nutritifs et protecteurs permettant leur survie après congélation. Il contient un substrat énergétique nécessaire au maintien du métabolisme des spermatozoïdes (fructose, glucose ou lactose), et doit maintenir une pression osmotique et un équilibre électrolytique physiologiques. Le dilueur doit aussi avoir un bon pouvoir tampon afin de limiter les variations de pH néfastes à la survie des spermatozoïdes. La cryopréservation et la congélation des spermatozoïdes sont assurées par la présence de lécithines, protéines et lipoprotéines du jaune d'œuf ou du lait, l'ajout de glycérol permet d'éviter la formation de cristaux de glace qui lèsent les membranes cellulaires. La législation européenne impose l'ajout de substances antibiotiques au dilueur pour garantir la qualité bactériologique de la semence. En pratique, les dilueurs sont aujourd'hui des produits prêts à l'emploi. L'ensemble dilueur/spermatozoïdes est maintenu à 4°C pendant une heure après mélange pour réfrigérer la semence. 3 heures d'équilibration supplémentaires sont ensuite nécessaires pour permettre les échanges entre le dilueur et les cellules. (Gérard et Khirredine, 2002).

Tableau V : Composition des dilueurs les plus utilisés.

Milieu à base de jaune d'œuf et de citrate de sodium	Milieu IVT (Illinois, Variable, Température)	Milieu à base de lait de vache
Citrate de sodium 2,9 % Jaune d'œuf 25 % Glycérol 7,5 % Antibiotiques	Bicarbonate de soude 0,2 g Citrate trisodique (2H ₂ O) 2 g Chlorure de potasse 0,04 g Glucose 0,3 g Jaune d'œuf 10 % Antibiotiques	Lait 54% Jaune d'œuf 10% Glycérol 6% Antibiotiques

Source : NAGASE et NIWA cités par LAMINOU, 1999.

4.1.6. Refroidissement de la semence :

La température est le premier facteur influençant le métabolisme des cellules. En effet, un spermatozoïde peut être maintenu en vie à l'intérieur d'une gamme de température qui varie de

+45°C environ à -269°C (température d'hélium liquide). Dans ces limites, plus la température est élevée ($\geq +7^\circ\text{C}$), plus le métabolisme de la cellule est intense. Par ailleurs, Salisbury et Vandemark (1961) soulignent une meilleure motilité, mais un temps de survie assez court à ces températures positives. Ainsi, la motilité des spermatozoïdes décroît avec la température de conservation et n'existe plus à des températures de +4 et +5°C. Le métabolisme à ces températures, est considérablement réduit (Adamou-N'Diaye, 1994).

Cependant, le refroidissement brusque de la semence peut entraîner un choc thermique conduisant à l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire (pertes des éléments essentiels : protéines, ATP, potassium, phosphore, lipides, etc.) des spermatozoïdes et aux altérations de l'acrosome. Ces phénomènes sont à l'origine d'une perte de motilité et du pouvoir fécondant. Ainsi, en plus des protecteurs de la membrane cellulaire contenus dans le dilueur, le refroidissement régulier et lent permet d'éviter ce problème. En effet, selon plusieurs auteurs (Blackshw et Salisbury, MAN, N Pickett et Komarek) cités par (Adamou-N'Diaye 1994), lorsqu'on soumet du sperme pur à un refroidissement brusque, en portant sa température de +32 à +4°C, la vitalité des spermatozoïdes est annihilée.

Il importe donc de diluer le sperme avant le refroidissement et de refroidir le sperme dilué (la semence) de façon progressive, pour prévenir les effets néfastes du choc thermique. Plusieurs auteurs dont (Salisbury et Vande mark, 1961) ont montré que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est accru de 6 à 9% lorsque l'éjaculat est dilué avant que la température ne soit abaissée.

4.1.7. Le conditionnement de la semence :

Après la dilution, le sperme est alors reparti en dose individuelles soit en ampoules de verre scellé en ampoule plastiques, soit les paillettes de chlorure de polyvinyle. (Johnson L, 1995).

Le conditionnement en paillettes, ces dernières d'emploi facile, économique et permet le stockage d'un maximum de dose en minimum de place, soit en deux types :

- Paillette moyenne d'un diamètre de 2.8mm et d'un volume utile de 0.54ml.
- Paillette fine d'un diamètre de 2mm et d'un volume utile de 0.23ml.

La mise en paillettes est automatisée et réalisée dans les 4 heures qui suivent le mélange dilueur/semence dans une vitrine réfrigérée.

Sur chaque paillette, la législation impose de faire figurer :

-le nom du taureau

-son numéro national

-son statut IBR

-le numéro d'enregistrement du centre de collecte

-la date de collecte

-le code du taureau (constitué du code du centre d'insémination, du code race et du numéro d'identification). (Gérard et Khirredine, 2002).

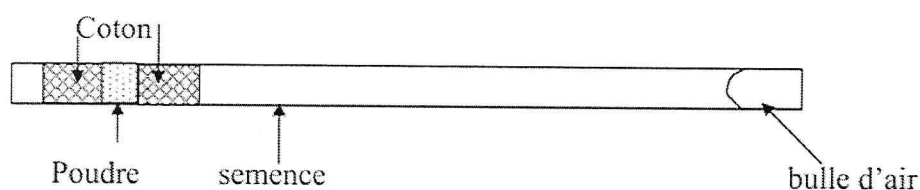


Figure n°8 : Schéma d'une paillette « CASSOU ».

4.1.8 La congélation :

Les phases de refroidissement et d'équilibration sont fondamentales, pour les semences destinées à la congélation. En effet, pour la congélation de la semence, l'abaissement de la température à +4°C constitue une des premières opérations à réaliser. En effet, un séjour préalable de la semence à +4°C est nécessaire avant d'amorcer la descente vers les basses températures [-79 (glace carbonique) ou - 196°C (azote liquide)] (Polge et Rowson rapporté par Adamou-N'Diaye, 1994).

4.2. Protection antioxydante et conservation du sperme :

Ces dernières années, la cryoconservation du sperme s'est beaucoup développée, et ceci avec différents objectifs. En effet, cette technique est utilisée aussi bien en reproduction humaine, que dans la préservation des espèces en danger, et chez les animaux d'intérêt agronomique pour l'amélioration des espèces. Durant les différentes étapes du processus de cryoconservation, le spermatozoïde est soumis à divers stress dont un stress oxydant.

4.2.1. Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés :

La cryoconservation du sperme induit un stress oxydant à la fois par une production accrue d'EOR, mais aussi par dégradation des antioxydants (notamment les enzymes) (Baumber et al.

2003; Mazzilli et al. 1995). Par exemple, chez le taureau, la congélation réduit le taux de deux antioxydants spermatiques que sont le superoxyde dismutase et le glutathion (Bilodeau et al. 2000).

Ce stress entraîne une altération de la membrane plasmique par lipoperoxydation, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN augmente avec le nombre de cycles de congélation/décongélation (Linfor and Meyers, 2002). C'est l'H₂O₂, plus que l'anion superoxyde, qui est responsable de cette fragmentation. Par ailleurs, la catalase et le glutathion réduit permettent de limiter ces effets (Baumber et al. 2003).

L'élimination du plasma séminal préalable à la congélation diminue la capacité du sperme à éliminer les EOR (Ball et al. 2001). C'est pourquoi une grande variété d'antioxydants a été utilisée de façon empirique dans les milieux de congélation des gamètes pour tenter de limiter les dommages du stress oxydant lié à la congélation du sperme.

4.3. Traitement de la semence épидидymaire en vue de l'amélioration de sa conservation :

4.3.1. Rôle du cholestérol (CHL) :

Le cholestérol a des effets multiples sur les membranes, y compris la stabilisation de la membrane, ce qui réduit la perméabilité de la membrane, ce qui protège les caractéristiques morphologiques de la membrane et permettant les interactions cellule-cellule, influençant la phase de transition de de la membrane, en fournissant des micro-environnements appropriés (chimiques et / ou physiques) pour que les protéines de la membrane associés et servir comme un antioxydant de la membrane (examiné par Crockett 1998).

Par conséquence, le traitement des spermatozoïdes par le cholestérol avant cryoconservation pourrait réduire la sensibilité des membranes des spermatozoïdes à des dommages de refroidissement, en éliminant ou tout au moins réduire au minimum la séparation de phase latérale des lipides (Watson, 1981).

4.3.2. Rôle de la cyclodextrine(CLD) :

Le traitement du sperme avec la CLD augmente sa teneur en cholestérol 2 à 3 fois chez le taureau, la truite, le bélier et étalon (Purdy et Graham 2004a, Muller et al 2008. Mocé et al 2010), ce taux élevé en cholestérol indique le bon taux en phospholipides qui est similaire pour des spermes qui ne sont pas sensibles aux chocs thermique .

Par conséquent, le traitement de la semence par la cyclodextrine devrait réduire les dommages aux spermatozoïdes induits par les changements de température au cours de la congélation. En effet, le

traitement de ram et sanglier sperme avec la CLD protège les spermatozoïdes de choc froid (Morrier 2004; Galantino-Homer et al 2006).

4.3.3. Rôle de la vitamine E :

Les spermatozoïdes possèdent de fortes concentrations de groupements thiols libres, et de petites quantités d'acides urique et ascorbique, de glutathion réduit et de vitamine E, qui sont toutes des molécules antioxydantes. La vitamine E est retrouvée en plus grande quantité sur les spermatozoïdes de la tête que sur ceux de la queue épидидymaire, indiquant une disparition de cette molécule au fur et à mesure de la maturation spermatique chez le rat (Tramer et al. 1998).

La vitamine E ajoutée au moment du refroidissement du sperme permet d'augmenter le pourcentage de spermatozoïdes motiles après congélation, chez le verrat (Pena et al. 2003).

4.3.4. Le TRIS : utilisé comme dilueur récent Il permet d'apporter aux spermatozoïdes les éléments nutritifs et protecteurs permettant leur survie après congélation. Il contient un substrat énergétique nécessaire au maintien du métabolisme des spermatozoïdes. sa composition est décrite par (pudry et Graham 2004a) :

- TRIS : 3,03g
- Acide citrique : 1,7g
- Glucose : 1,25g
- Pénil G : 0,1g
- DHS : 0,1g
- Eau distillée : jusqu'à 100ml

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Objectif

L'objectif de ce travail vise à collecter la semence épидидymaire bovine après abatage afin de vérifier si elle peut être conservée, et d'étudier l'effet des milieux de conservation contenant du cholestérol, la vit E et de la cyclodextrine avec différentes combinaisons sur la motilité des spermatozoïdes.

2. Période et lieu de stage :

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale de l'Université Saad Dahleb de Blida, durant le mois d'avril 2014.

3. La récolte des semences :

Chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît au niveau de l'épididyme (Guerin, y et al, 2003).

Donc le sperme collecté à ce niveau est tout à fait exploitable en insémination artificielle soit juste après collecte ou après conservation.

Des testicules sont prélevés au niveau des abattoirs de Boufarik et oued el eulaegue, la récolte de la semence a été faite après l'isolement de l'épididyme, et après elle est acheminée vers le laboratoire.

4. Matériels et méthodes :

4.1. Matériels biologiques :

4.1.1. Les testicules.

4.2.2. Matériels utilisés :

Pour la réalisation de ce travail, nous avons disposé du matériel suivant :

- Ciseau
- Bistouri
- Seringue
- Gants
- Les tubes à essais stériles
- Portes tubes
- Pipettes graduées
- Microscope optique à platine chauffante
- Lames et lamelles
- Na cl à 3%
- Œufs
- Vitrine réfrigérative
- Paillettes
- Biostat d'azote liquide
- Bain-marie
- Analyseur CASA

4.3. Méthodes :

4.3.1. Récolte du sperme :

Après avoir isolé et disséqué l'épididyme du testicule prélevé le matin de l'abattoir, une quantité de semence a été prélevée par la méthode de rétrograde flushing ; La queue de l'épididyme et le canal déférent ont été isolés du reste de l'épididyme en faisant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corpus et la queue proximale. Après cela, la lumière du canal déférent a été pourvue d'une canule avec une aiguille de 22G émoussée. Les spermatozoïdes ont ensuite été rincés dans une direction rétrograde des canaux déférents à travers la queue de l'épididyme avec une seringue chargée avec approximativement 4 ml de TRIS A réchauffé (37°C), le tube de sperme est acheminé et placé au bain-marie (+37°C).

Composition du TRIS A :

- TRIS : 3,03g
- Acide citrique : 1,7g
- Glucose : 1,25g
- Pénil G : 0,1g
- DHS : 0,1g
- Eau distillée : jusqu'à 100ml

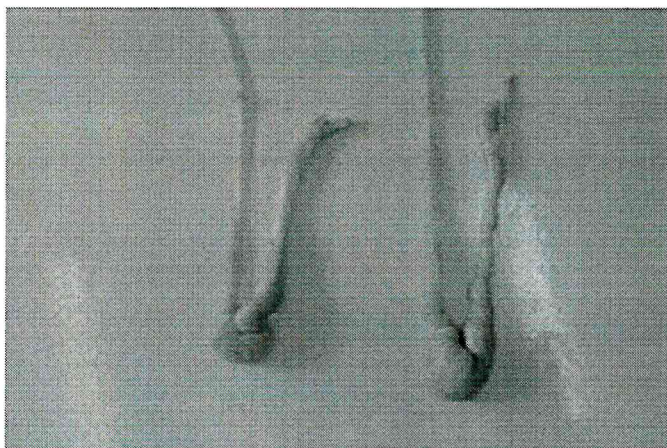


Photo :dissection de l'epididyme.

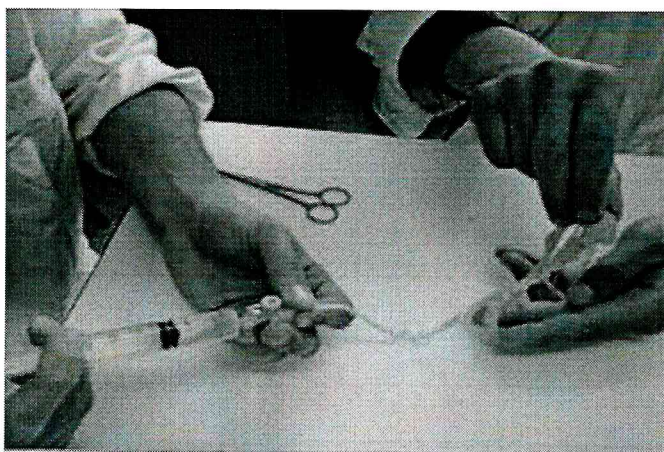


Photo : injection du TRIS A.

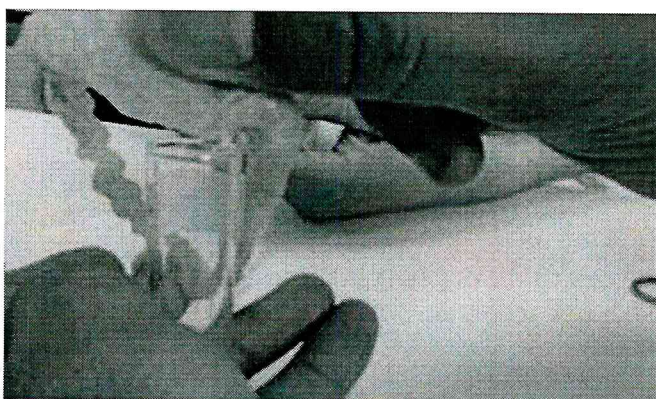


Photo : récolte du sperme épидидymaire.

Nous avons commencé notre travail par l'analyse de la semence pour les trois récoltes à l'état frais juste après la récolte, cette étape nous permettra d'évaluer le degré de changement apporté par la congélation en ce qui concerne les paramètres de mobilité, nous nous sommes intéressés aux : volume, la couleur, la mobilité et la concentration de la semence épидидymaire récoltée.

5. Caractéristiques du sperme après récolte :

5.1. Evaluation visuelle :

Le sperme récolté a été aussitôt examiné à l'œil nu puis, au microscope et ses caractéristiques (volume, couleur, motilité massale, motilité individuelle, concentration) ont été enregistrées. Le volume et la couleur ont été appréciés visuellement. Le volume a été lu sur le tube de collecte gradué.

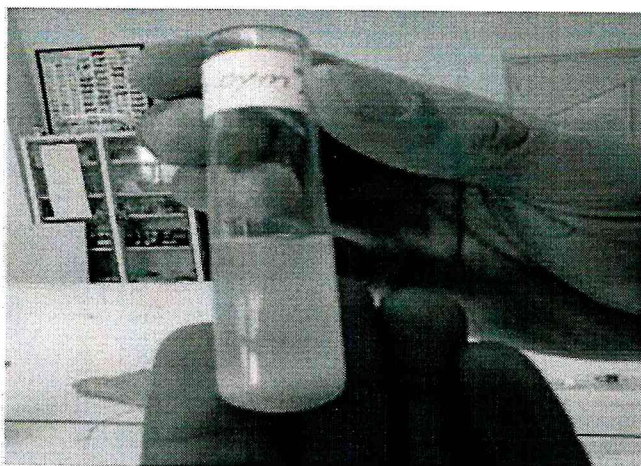


Photo : sperme épидидymaire dans le tube à essai.

5.2. Evaluation microscopique :

5.2.1. La motilité massale :

La motilité est appréciée par un microscope optique. Une goutte déposée directement sur la lame est observée au grossissement $\times 10$ pour évaluer la motilité massale.

5.2.2. La motilité individuelle :

Une autre goutte plus fine déposée entre lame et lamelle est visualisée au grossissement $\times 40$ pour l'évaluation de la motilité individuelle.

Une note est donnée sur une échelle allant de 0 à 5, pour la motilité massale et en pourcentage pour la motilité individuelle.

5.2.3. La concentration :

La concentration en spermatozoïdes, exprimée en milliards de spermatozoïdes (10^9 spz/ml), est déterminée par l'utilisation des cellules de THOMA.

Examen pratique : elle est déterminée par comptage direct des spermatozoïdes en utilisant la cellule de THOMA sur du sperme dilué à 3% de Na Cl, Après comptage des spermatozoïdes, en utilisant la cellule de THOMA, le nombre de spermatozoïdes est déterminé par la formule suivante : $C = N \times 4 \times 10^4$.

Le bon sperme a une concentration supérieure à $0,5 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ml.

Après avoir déterminé la concentration du sperme, on dilue la semence pour avoir une concentration de 500×10^6 , qui serait conservée et analysée après.

6. Préparation, conservation et traitement du sperme épидидymaire :

6.1. La dilution du sperme :

La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles. (Hanzen, 1999).

Le dilueur utilisé est le TRIS A préparé au niveau de notre laboratoire avec ses composants.

Après mesure de la concentration du spermatozoïde récolté, la quantité de dilueur à apporter et le nombre de doses qui peuvent être produites sont alors calculées en fonction du volume de la semence. Le nombre de spermatozoïdes résulté est de 500×10^6 . Le dilueur doit être porté à une température de 35°C avant d'être ajouté à la semence.

6.2. Traitement du sperme dilué dans les tubes :

Nous avons réalisé les traitements des trois semences par différents traitements. Sauf que la molécule Vit E seul n'était pas disponible.

Les 6 tubes à essais sont préparés dans le Porte tube, ils sont identifiés par numéro, chaque tube contient 0.5ml de traitement.

Tube n°1 : témoin (pas de traitement)

Tube n°2 : contient du cyclodextrine (CLD)

Tube n°3 : contient du cholestérol (CHL)

Tube n°5 : contient du cyclodextrine associé au cholestérol

Tube n°6 : contient du cyclodextrine associé à la vitamine E

Tube n°7 : contient de l'association des trois molécules ; cyclodextrine, vitamine E, cholestérol.

Le traitement se fait par l'ajout dans chaque tube une quantité de 0.5ml de la semence diluée en 500×10^6 . donc le volume total dans le tube à essais est de 1ml, avec une concentration de 250×10^6 de spermatozoïdes.

6.3. La réfrigération :

Avant la mise en réfrigération des tubes on ajoute aux complexes le dilueur TRIS B préparé au laboratoire (qui contient du jaune d'œuf) un volume de 1ml pour chaque tube, le volume total obtenu alors est de 2ml, avec une concentration de 125×10^6 de spermatozoïdes.

Compositions du TRIS B :

- TRIS : 3,03g
- Acide citrique : 1,7g
- Glucose : 1,25g
- Pénil G : 0,1g
- DHS : 0,1g
- Jaune d'œuf : 20ml
- Eau distillée : jusqu'à 100ml

Pour abaisser la température de façon progressive, les tubes du sperme dilué et traité ont été placés dans la vitrine réfrigérée (+4°C). La température de (+4°C) est obtenue après un refroidissement progressif en 2 heures.

Après refroidissement à +4°C, on ajoute le TRIS C préparé au niveau de notre laboratoire avec un volume de 2ml pour chaque tube. On laisse le contenu pendant 15 minutes.

Compositions du TRIS C :

- TRIS : 3,03g
- Acide citrique : 1,7g
- Glucose : 1,25g
- Pénil G : 0,1g
- DHS : 0,1g
- Jaune d'œuf : 20ml
- Glycérol : 14ml
- Eau distillée : jusqu'à 100ml

6.4. La mise en paillettes :

Les paillettes vides de 0,25 ml ont été identifiées et refroidies à la température de la semence (+4°C). Le fait de garder les paillettes et la semence à la même température permet d'éviter les

chocs thermiques préjudiciables aux spermatozoïdes. L'identification se fait à l'aide d'un marqueur ; la paillette est marquée en nombre de trait correspond au numéro du tube. On prépare 3 paillettes pour chaque tube.

Enfin, la semence a été conditionnée en paillette par remplissage manuelle.

6.5. L'analyse des échantillons par le CASA :

Après avoir réfrigéré les échantillons, on passe à l'étape de l'analyse des semences par le CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

On dispose une goutte de sperme sur la lame équipée avec l'analyseur, Les données ont été saisies et organisées dans l'ordinateur, les résultats sont enregistrés par : post-child

6.6. La congélation :

6.6.1. Préparation de la vapeur d'azote et de l'azote liquide :

Les paillettes remplies de la semence traitée vont être mise dans l'azote liquide.

Préparer premièrement la boîte en polyester contient de l'azote liquide et pour que les paillettes doivent être mise à la vapeur à une hauteur de 5 cm.

6.6.2. Mise en vapeur des paillettes :

Mettre les paillettes à la vapeur à la hauteur indiquée, à une durée de 15 minutes, c'est l'étape de la préparation à la conservation (précongélation).

6.6.3. La congélation des paillettes :

a. Après la mise en vapeur des paillettes, on passe à la congélation des semences, on plonge directement les paillettes mise en vapeur dans l'azote liquide.

b. on peut garder les paillettes dans le Biostat d'azote liquide.

6.7. La décongélation :

La décongélation des paillettes se fait pour l'appréciation de l'effet des milieux de conservation contenant du cholestérol, la vit E et de la cyclodextrine avec différentes combinaisons sur la motilité des spermatozoïdes après congélation.

On plonge les paillettes congelées et identifiées dans un bain-marie à 37°C pour une durée de 30 secondes, on coupe après les paillettes pour avoir la semence de chacune dans le tube correspondant au numéro de la paillette, les tubes sont mis en bain-marie pour arriver à la dernière étape de l'analyse sur le CASA.

On dispose une goutte de sperme sur la lame équipée avec l'analyseur, Les données ont été saisies et organisées dans l'ordinateur, les résultats sont enregistrés par : post –thow.

7. Résultats et discussion :

Nous avons commencé notre travail par l'analyse de la semence des trois récoltes à l'état frais juste après la récolte, cette étape nous permettra d'évaluer le degré de changement apporté par la congélation en ce qui concerne les paramètres.

7.1. La couleur :

La couleur pour les trois récoltes a été appréciée directement après la récolte les résultats sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau VI : la couleur des trois récoltes.

La récolte	La couleur
1 ^{ère} récolte	blanche crémeuse
2 ^{ème} récolte	blanche crémeuse
3 ^{ème} récoltée	blanche laiteuse

Discussion :

Il a été constaté que la couleur n'est pas constante dans les trois récoltes. Pour les semences récoltées, les couleurs enregistrées (blanc laiteux, blanc crémeux) sont satisfaisantes. En effet, selon EZEKWE (1988), la couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant. Cette

variation normale de la couleur du sperme peut être liée à la teneur de l'éjaculat en spermatozoïdes ou à la présence des pigments lipochromes sans rapport avec l'alimentation.

7.2. Le volume :

Le volume a été lu sur le tube de collecte gradué. Les résultats sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau VII : le volume des trois récoltes.

La récolte	Le volume (ml)
1 ^{ere} récolte	2
2 ^{eme} récolte	1.5
3 ^{eme} récolte	1

Discussion :

Les volumes des éjaculats récoltés varient de 1 ml à 2 ml avec une moyenne de 1.5ml. Ce volume est supérieur à celui 0.5ml rapporté par (A. Darin-Bennett I.G.1977).

7.3. La concentration :

Après avoir déterminé la concentration de chaque semence. Les résultats sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : la concentration des trois récoltes.

La récolte	La concentration (10^9 spz/ml)
1 ^{ere} récolte	1.53
2 ^{eme} récolte	2.62
3 ^{eme} récolte	1.93

Discussion :

La concentration moyenne de 2.02×10^9 , la concentration est acceptable pour les trois semences par ce qu'elle ne dépasse pas les limites inférieures cités par Dumont, 1997 ; qui est de ($\geq 0,5 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ ml). Après appréciation des autres paramètres et vu sa valeur très proche de la limite minimale, les trois récoltes ont été retenue pour dilution.

7.4. La motilité massale et la motilité individuelle :

On a apprécié les motilités massales et individuelles pour chaque semence les résultats sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau IX : La motilité massale et la motilité individuelle des trois récoltes.

La récolte	La MM (0-5)	La M indiv (%)
1 ^{ère} récolte	4	75
2 ^{ème} récolte	4.5	80
3 ^{ème} récolte	3	70

Discussion :

La méthode utilisée pour apprécier la motilité permet d'avoir une idée sur la présence ou non d'anomalies et de cellules étrangères. La limite minimale d'acceptabilité par le CNAG est fixée à 60%, pour la motilité individuelle est à 3, pour la motilité massale. Ces limites s'accordent avec celles fixées par (Dumont, 1997). Donc ce sont des semences acceptées pour la mise en paillette et pour objet de l'insémination artificielle.

7.5. Traitement du sperme dilué dans les tubes :

Les résultats des motilités massale et individuelle après décongélation de la semence traitée sont enregistrés dans le tableau suivant :

7.5.1. La 1^{ère} récolte :

Tableau X : traitement des tubes de la première récolte.

Numéro du tube	TRT porté à la semence	La MM (0-5)	La M indiv (%)
1	aucun	2.5	60
2	cyclodextrine (CLD)	3	70
3	cholestérol (CHL)	3	70
5	CLD+CHL	3.5	70
6	CLD+vit E	3	70
7	CLD+CHL+vit E	4	75

Discussion :

On note que la mobilité est variable d'un tube à un autre.

La mobilité est diminuée pour le premier tube témoin, ça peut être due au choc osmotique ou au stress oxydatif, cité par (Baumber et al 2003; Mazzilli et al. 1995).

Pour les tubes : 2,3 et 6 ; on note une légère modification pour les motilités massale et individuelle, la motilité massale diminue de 4 à 3 dans les tubes traités avec de la cyclodextrine, du cholestérol et celles traités par le complexe cyclodextrine avec la vit E. ce qui explique l'effet cryoprotecteur des molécules : cyclodextrine, le cholestérol et la vit E. cité par (Purdy et Graham 2004) et (Tramer et al. 1998).

Pour le tube n°5 qui contient de la semence traitée à base du complexe cyclodextrine associée avec le cholestérol. On remarque une petite diminution de la motilité massale et de la motilité individuelle ce qui démontre l'effet cryoprotecteur puissant de ce complexe. rapporté par (Purdy et Graham 2004).

Le cas du dernier tube porté par le complexe des trois molécules on obtient la même motilité du sperme juste après la récolte ce qui signifie l'effet très puissant de la cryoprotection lors de l'association des trois molécules. cité par (Purdy et Graham 2004) et (Tramer et al. 1998).

7.5.2. La 2^{ème} récolte :

Tableau XI : traitement des tubes de la deuxième récolte.

Numéro du tube	TRT porté à la semence	La MM (0-5)	La M indv (%)
1	aucun	3	70
2	cyclodextrine (CLD)	3.5	70
3	cholestérol (CHL)	3.5	70
5	CLD+CHL	4	75
6	CLD+vit E	3.5	70
7	CLD+CHL+vit E	4.5	80

Discussion :

D'après les résultats, on note que la mobilité est variable d'un tube à un autre.

La mobilité est diminuée pour le premier tube témoin, ça peut être due au choc osmotique ou au stress oxydatif, rapporté par (Baumber et al 2003; Mazzilli et al. 1995).

Pour les tubes : 2,3 et 6 ; on note une légère modification pour les motilités massale et individuelle, la motilité massale diminue de 4,5 à 3,5 dans les tubes traités avec de la cyclodextrine, du cholestérol et celles traités par le complexe cyclodextrine avec la vit E. ce qui explique l'effet cryoprotecteur des molécules : cyclodextrine, le cholestérol et la vit E.

Pour le tube n°5 qui contient de la semence traitée à base du complexe cyclodextrine associée avec le cholestérol. On remarque une petite diminution de la motilité massale et de la motilité individuelle ce qui démontre l'effet cyoprotecteur puissant de ce complexe cité par (Purdy et Graham 2004).

Le cas du dernier tube porté par le complexe des trois molécules on obtient la même motilité du sperme juste après la récolte ce qui signifie l'effet très puissant de la cryoprotection lors de l'association des trois molécules, cité par (Purdy et Graham 2004) et (Tramer et al. 1998).

7.5.3. La 3^{eme} récolte :

Tableau XII : traitement des tubes de la troisième récolte.

Numéro du tube	TRT porté à la semence	La MM (0-5)	La M indv (%)
1	aucun	3	70
2	cyclodextrine (CLD)	2	50
3	cholestérol (CHL)	2.5	60
5	CLD+CHL	2.5	60
6	CLD+vit E	3	70
7	CLD+CHL+vit E	3	70

Discussion :

D'après les résultats, la motilité est variable pour le tube témoin et les tubes traités.

Les mobilités massale et individuelle dans le premier tube sont les mêmes à celles mentionnées juste après la récolte de la semence épидидymaire.

La mobilité est diminuée pour le deuxième tube, ça peut être due au choc osmotique ou au stress oxydatif, cité par (Baumber et al 2003; Mazzilli et al. 1995).

Pour les tubes : 3 et 5 ; on note une légère modification pour les motilités massale et individuelle, la motilité massale diminue de 3 à 2,5 dans les tubes traités avec le cholestérol et celles traités par le complexe cyclodextrine avec le cholestérol. ce qui explique l'effet cryoprotecteur des molécules : cyclodextrine, le cholestérol, cité par (Purdy et Graham 2004).

Le cas des deux derniers tubes porté par le complexe des trois molécules on obtient la même motilité du sperme juste après la récolte ce qui signifie l'effet très puissant de la cryoprotection lors de l'association des trois molécules, rapporté par (Purdy et Graham 2004) et (Tramer et al. 1998).

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS

Les différentes méthodes d'analyse de la semence tentent de caractériser des marqueurs de fertilité, c'est-à-dire des particularités des spermatozoïdes liées à leur pouvoir fécondant. Ces marqueurs doivent être corrélés à la fertilité mais également se rapprocher autant que possible des résultats d'estimation de la fertilité par le taux de gestation. Les paramètres sémiologiques évalués en routine sont principalement fondés sur l'analyse macroscopique de la semence c'est-à-dire l'évaluation du volume et de l'aspect de l'échantillon (couleur, consistance...) mais aussi sur l'analyse microscopique comprenant l'étude de la motilité, de la concentration et de la morphologie des spermatozoïdes. Ces examens sont réalisés en routine depuis plus de 50 ans et permettent de déterminer la qualité de la semence .

La présente étude a porté sur l'amélioration de la conservation du sperme épидидymaire bovin avec l'utilisation de différentes molécules (cyclodextrine, cholestérol et la vitamine E).

Les résultats obtenus ont montré que la qualité du sperme épидидymaire est dans les standards rapportés dans la littérature pour tous les paramètres spermatique à savoir le volume, la concentration, la mobilité, la morphologie et la viabilité.

Ils ont permis de mettre en évidence le rôle potentiel de la cyclodextrine qui permet une meilleure potentialisation de l'effet du cholestérol et la vitamine E en augmentant leur solubilité et du cholestérol qui agit sur la membrane cytoplasmique pour augmenter sa solidité et la vitamine E pour lutter contre le stress oxydatif et par conséquent l'amélioration de la conservation de la mobilité spermatique.

A partir de cette étude on recommande le traitement de la semence bovine par la cyclodextrine associée avec le cholestérol et la vitamine E pour le but de l'amélioration de sa conservation .

Nous recommandons une étude sur l'insémination artificielle par la semence épидидymaire bovine, pour certaines race à faible libido, comme exemple la race charolaise.

Nous recommandons la pratique des analyses des spermes par l'utilisation du CASA qui est nouvelle technologie et qui donne la facilité, la précision des paramètres spermatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. **A. Darin-Bennett, I.G. (1977)** : White, Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock, *Cryobiology* 14 (1977) 466–470.
2. **Acott TS, Carr DW (1984)**: inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Bi01 Reprod* 30.926-935.
3. **Acott TS, Katz DF, Hoskins DD (1983)**: Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation *Bi01 Reprod* 29289399.
4. **Acott TS, Hoskins DD (1981)**: Bovine sperm forward motility protein : binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 24234-240.
5. **Adamali HI, Hermo L(1996)** : Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 1996; 17: 208-222.
6. **Adamou-N'Diaye M. (1994)** : Technologie du sperme de taureau de race Borgou. Thèse : Reproduction Animale : Tours (Faculté des Sciences et Techniques. Université François Rabelais), 94 TOUR 4015.
7. **Aoue C. (1991)** : Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin : influence de la durée d'équilibration et de la température de décongélation. Thèse : Méd. Vét. : Alfort ; 16.
8. **Amann RP (1987)**: Function of the epididymis in bulls and rams. *J Reprod Fertil Suppl*34:115-131.
9. **Bahr, GF; Zeitler, E. (1964)** : Study of bull spermatozoa: Quantitative electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 1964, 21, 175-189.
10. **Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., and Baumbe, J. (2001)** : Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 56, 577-589.

11. **Barker LD, Amann RF (1971):** Epididymal physiology. II. Immunofluorescent analyses of epithelial secretion and absorption, and of bovine sperm maturation *J Reprod Fertil* 26:319-332
12. **Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2003) :** Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24, 621-628.
13. **Beaulieu, V., Da Silva, N., Brown, C. R., Smith, P. J., Brown, D., and Breton, S. (2004) :** Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem*.
14. **Bedford Jhf (1966):** Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit *J Exp Zool* 163:319-329.
15. **Bedford JM (1975):** Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. Dans E. D.W. Hamilton & R.O. Greep (Eds): "Handbook of Physiology, Sect. 7." Washington, D.C. American Physiological Society, pp. 303-318.
16. **Bérubé B, Lefièvre L, Coutu L, Sullivan R (1996):** Regulation of the epididymal synthesis of P26h a hamster sperm protein. *J Androl* 17:104-110.
17. **Bizimungu J. (1991) :** Insémination artificielle au Rwanda : Bilan et perspective Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 15.
18. **Blaquier JA, Cames MS, Burgos MH (1972):** The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea-pig. *Endocrinology* 90:839-842.
19. **Boué F, Blais J, Sullivan R (1996):** Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 54:1009-1017.
20. **Brooks DE (1979):** Biochemical environment of sperm maturation. Dans E. D.W. Fawcett & J.M. Bedford (eds): "The Spermatozoon" Baltimore: Urban and Schwarzenberg inc, pp. 23-30.
21. **Brooks DE, Tiver K (1984):** Analysis of surface proteins of rat spermatozoa during epididymal transit and identification of antigens common to spermatozoa, rete testis fluid and cauda epididymal plasma. *J Reprod Fert* 71:249-257.

22. **Carbaliada R, Saling PM (1997):** Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. *J Reprod Fert* 110:171-151.
23. **Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML, (2004):** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J* 45, 35–41.
24. **Charrois R (1973):** Mechanisms: Men. Dans J. Collins & J.E. Rioux (eds): *The Canadian Fertility Swety; A practical manual on reproduction.* Québec: Les Presses de Yuniversité Laval, pp. 12-37.
25. **Chevrier C, Dacheux JL (1992):** Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. *Cell Motil Cytosk* 23818.
26. **Cooper TG (1986):** *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization* New York Springle-Verlag, pp. 1-281.
27. **Cooper TG (1991):** Function of the epididymis and its secretory productç. Dans Springler-Verlag (ed): *'The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilition.'* New York, 281pp.
28. **Crockett EL, (1998):** Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool* 38, 291–304.
29. **Cuasnicu PS, Godez-J2chev- F, Ph A, Blaquier JA (1984b):** Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa, *J Reprod Fert* 70541-547.
30. **Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M (1989):** Changes in sperrn surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod* 40:635-651.
31. **Dacheux JL, Voglmayr JK (1983):** Sequence of sperm cell surface differenciation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol Reprod W*:1033-1046.
32. **Derivaux J., (1971) :** *Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège.-Edition Derouaux.-175p.*

33. **Diop P.E.H. (1993)** : Biotechnologie et élevage africain (145-150). In: Maîtrise de la reproduction et amélioration génétique des ruminants.- Dakar : Les Nouvelles éditions africaines du Sénégal.- 290p.
34. **Dumont, P. (1997)** : Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. Le Point Vétérinaire, 1997, 28, 185, 19-32.
35. **Eddy EM (1988)**: The Spermatozoon. Dans E. Knobil et al. (eds): The Physiology of Reproduction." New York: Raven Press, pp. 27-68.
36. **Elmore; RG. (1985)** : Evaluating bulls for breeding soundness: concentration and motility of semen, Veterinary Medicine, 1985, 80, 80-84.
37. **Ezeke A.G.,(1988)** :Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls - N'dama and Muturu.-Joint seminar on animal reproduction for african countries.-Addis-Abeba:CIPEA.
38. **Fall O. (1995)** : Amélioration de la production laitière par l'utilisation de l'insémination artificielle dans la région de Fatick. Thèse : Méd.Vét. : Dakar. 17.
39. **Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I, (2006)**: Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. Mol Reprod Dev 73, 638–650.
40. **Gerard, O., Khirredine., B. (2002)** : Production de semence bovine - Didacticiel de Maîtrise de la reproduction des bovins. 2002, 73 p.
41. **Goyal HO (1985)**: Morphologie of the bovine epididymis. Am J Anat 121:55-172 .
42. **Hammeatedt RH, Park JE (1987)**: Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit J Reprod Fertil Suppl 34:13-149.
43. **Hammerstedt RH, Keith AD, Hay S, Deluca N, Amann RP (1979)**: Changes in ram sperm membranes during epididymal transit Arch Biochem Biophys 196:7-12.
44. **Henzen CH, (1999)** : cours physiopathologie masculine chez les ruminants ,équidés et porc.
45. **Herms L, Jacks D(2002)** : Nature 's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Mol Reprod Dev 2002;63:394–410.

46. Hermo L, Oko R, Morales CR(1994) : Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol* 1994; 154: 106-189.
47. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC(1995) : The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 731-745.
48. Johnson L(1995) : Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 1995; 32: 385-422.
49. Jones R, Glover TD (1975): Interrelationships between spermatozoa, the epididymis and epididymal plasma. Dans J.G. Duckett & P.M. Racey (eds): "The Biology of the male gamete." London: Academic Press, pp. 367-384.
50. Laminou M. I. (1999) :L'Amélioration génétique par la biotechnologie de l'insémination artificielle bovine : bilan et perspectives. Thèse : Méd.Vét. : Dakar ; 9.
51. Lavon U, Volcani R, Danon D (1970): The lipid content of bovine spermatozoa during maturation and ageing. *J Reprod Fertil* 23215-222
52. Leung GP, Cheung KR, Leung CT, Tsang MW, Wong PY(2004) : Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol*2004; 216: 5- 13.
53. Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2002) : Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 23, 107-113.
54. Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M(1995) : The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 1995;27:195 – 206.
55. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraiz P, de Paz P, Anel L, (2006): Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471–485.
56. Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F. M., Rapone, S., Dondero, F., and Gazzaniga, P. P. (1995) : Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 26, 145-148.

57. Melrose DR et Turner C., (1952) : Pyruvate metabolism and assessment of semen quality. Proc Soc Exp Biol Med. Jun; 80(2):298–300.
58. Mocé E, Purdy PH, Graham JK, (2010): Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Anim Reprod Sci 118, 236–247.
59. Morrier A, Theriault M, Castonguay F, Bailey J, (2004) : Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, 239 pp. (Abstract 636).
60. Morrow, D. (1986) : Current therapy in theriogenology. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia:W.B Saunders Company, 1986, Volume 2, 1143 p.
61. Morton BE, Sagadraca R, Fraser C (1978): Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. Fert Steril 29:695-698.
62. Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C, (2008): Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. Biol Reprod 78, 390–399.
63. Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC (1985): Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. Biochem Biophys Acta 185:486-498.
64. Orgebin Crist MC, Fournier-Delpech S (1982): Sperm-egg interaction Evidence for maturational changes during epididymal transit. J Androl 3:429-433.
65. Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Davies J (1975): Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. Dans RO. Greep & D.W. Hamilton (eds): "Handbook in Physiology, Section VII Endocrinology." Washington, DC: Am Physiol Soc, pp. 319-338.
66. Orgebin-Crist MC (1967): Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: Delayed fertilization in does inseminated with epididymal spermatozoa. J Reprod Fert 16:29-33.

67. **Parez, M ; Duplan, J.M(1987)** : L'insémination artificielle bovine : Reproduction, Amélioration génétique. Paris : ITEB-UNCEIA, 1987, 256 p.

68. **Park JE, Hammerstedt RH (1985)**: Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Bio Reprod* 32:653- 668.

69. **Pena, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., and Rodriguez Martinez, H. (2003)** : supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78, 85-98.

70. **Purdy PH, Graham JK, (2004a)** : Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36-45.

Reproduction des Mammifères d'élevage. 1986. Coll. INRAP. Ed Fourcher.

71. **Robaire B, Henno L (1987)**: Efficient duct, epididymis and vas deferens: structure, function and their regulation Dans E. Knobil & J.D. Neil (eds): "The Physiology of Reproduction" New York: Raven Press, pp. 999-1080.

72. **Robaire, B., and Viger, R. S. (1995)** : Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52, 226-236.

73. **Robert S. Robaire B (1994)**: immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 α -reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 134:2298-207.

74. **Roberts KD (1987)**: Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process. *J Steroid Biochem* 22:337-341.

75. **Rodriguez-Matinez H. (2003)** : Laboratory semen assessment and prediction of fertility : still utopia ? *Reprod. Domest. Anim.* 38: 312-318.

76. **Ross P, Kan FWK, Antaki P, Vigneault N, Chapdelaine A, Roberts KD (1990)**: Protein synthesis and secretion in the human epididymis and immunoreactivity with sperm antibodies. *Mol Reprod Dev* 26:12-23.

77. **Salisbury G.W. et Vandemark N.L. (1961)** : Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.- San Francisco : Freeman & co.-639p.

78. Saxena NK, Swena N, Hunt W, Peterson RN, Henry L, Russel LD (1986): increase in the concentration of major boar sperm surface proteins during maturation in the epididymis. *J CeU Sci* 82295-308.
79. Soler C, Yeung CH, Cooper TG (1994): Development of sperm motility in the murine epididymis. *int J Androl* 17271-278.
80. Syntin P, Dachew F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL (1996): Characterthion and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Bi01 Reprod* 55:9,%974.
81. Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., and Panfili, E. (1998) : Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 753-758.
82. Traore P., (1996) : Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insémination artificielle. Thèse : Méd. Vét. : Rabat (IAV Hassan II).
83. Turner TT (1979): On the epididymis and its function *Invest Urol*16811-321.
84. Veri JP, Hermo L, Robaire B(1993) : Immunocytochemicallocalization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl* 1993; 14: 23-44.
85. Vierula M. Rajaniemi H (1982): Epididymal maturation of the surface protein structure of mammalian sperrnatozoa. *Med Bi01* 603323-327.
86. Voglmayr JK. Fairbanks G, Jackowitz M, Colella JR (1980): Post-testicular developmental changes in the ram sperm cd surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract *Bi01 Reprod* 22655-665.
87. Watson PF, (1981): The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London, pp. 189-218.
88. Wrobel K.H. : **Male Reproductive System In : Dellman, Wrobel K.H(1990) :** *Textbook of Veterinary Histology, 2ème édition, 1990, 226-243.*

89. **Yanagimachi R (1988):** Mammalian Fertilization Dans E Knobil & J.D. Neil (eds):
The Physiology of Reproduction, Vol.1" New York Raven Press, pp. 135-186.

90. **Yanagimachi R (1994):** Mammalian Fertiization Dans E. Knobil & J.D. NeU (eds):
The Physiology of Reproduction, Vo1.2" New York Raven Press, pp. 189-317.

91. **Yeung CH, Cooper TG, Waites GMH (1980):** Carnitine transport into the perfused
epididymis of the rat: regional differences, stereospecificity, stimulation by choline and
effects of other luminal compomids. Bi01 Reprod 23294-304.