

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahleb -Blida- 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master dans le  
domaine SNV Filière Sciences biologiques**

**Spécialité : Biologie et Physiologie de la Reproduction**

**Thème**

**Effet de différents dilueurs dans la cryoconservation de la semence  
des petits ruminants**

**Présenté par :**

**BOUMERZOUG Meriem**

**Soutenu le : 06/07/2021**

**BOUYAKOUB Fawzi**

**Devant le Jury :**

<b>- BESSAAD. M-A</b>	<b>MCA USD-Blida.1</b>	<b>Président du jury</b>
<b>- BENAZOUZ. F</b>	<b>MAA USD-Blida.1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>- Mme A.H.CHEKIKEN</b>	<b>MAA USD-Blida.1</b>	<b>Promotrice</b>

**Année universitaire 2020-2021**

## Remerciements :

En premier lieu, nous tenons à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

- nous tenons à remercier et à adresser notre sincère respect à notre promotrice **Mme CHEKIKEN A.H** notre promotrice pour nous avoir accordé sa confiance pour la réalisation de cette étude et pour nous avoir guidés tout au long de notre travail

- Nos remerciements vont également à **Mr.BESSAAD. A.M** pour l'honneur qu'il nous fait d'accepter de présider notre jury.

A **Mme.BENAZOUZ.F** , nous sommes heureux de vous compter parmi notre jury en tant qu'examinatrice, veuillez accepter nos plus sincères considérations

- **Ma famille**, ma mère pour son regard professionnel à toute épreuve et mon héros mon père pour m'avoir permis de vivre ce rêve qu'était de devenir biologiste. Ma sœur pour ses précieuses heures passées au téléphone pleines de conseils et d'attention.

Sans votre soutien et votre amour rien n'aurait été pareil.

-**A FAWZI**, mon binôme, mon ami... Cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.

Pour finir, je remercie mes collègues de la promo BPR pour leur écoute, leur présence et leurs nombreux encouragements.

## **Dédicace :**

Je dédie ce travail,

-A la personne qui sacrifié sa vie pour moi, et qui a pris le défi pour mes études, et ma éclairé le chemin de ma réussite,

### **A MON HERO PAPA**

-A la prunelle de mes yeux, celle qui ma soutenue et qui a pleurée jour et nuit pour qu'elle me voit toujours sommet et comme une étoile filante

### **A TOI MA MERE**

- Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de t'avoir comme sœur. Je ne pourrais jamais imaginer la vie sans toi, tu comptes énormément pour moi, tu es la sœur qui assure sone rôle comme il faut, je n'oublierais jamais ton encouragement et ton soutien le long de mes études, je t'estime beaucoup et je t'aime beaucoup.

### **A TOI IMY**

**A mon frère**

**A tous mes amis sans exceptions**

**Aux étudiants de la promotion Master 02 reproduction animale**

**A tous ceux que j'aime**

**Bouyakoub ET Boumerzoug**

## Résumé :

L'objectif de ce travail est de regrouper dans un même travail les données sur les protocoles de conservation du sperme chez les petits ruminants, en évidence le rôle que peut jouer les dilueurs naturels à base de jaune d'œuf ,lait et lécithine de soja mais aussi des dilueurs tels que le Triladyl et Andromède dans la préservation de la qualité de la semence après cryoconservation.

Pour ce faire, une analyse comparative de paramètres microscopiques de mobilité et viabilité a été réalisée afin de déterminer les effets des différents dilueurs sur la semence.

, Un problème spécifique dans la conservation de la semence de bouc est l'effet du plasma séminal sur la viabilité des spermatozoïdes après congélation / décongélation, principalement lorsqu'ils sont dilués dans des milieux à base de lait ou de jaune d'œuf. La protéine BUSP60, responsable de cet effet est une Enzyme EYCE des lipases qui possède une double activité lipasique et phospholipasique.

L'utilisation de dilueurs composé de lécithine de soja a eu un effet souhaitable sur la motilité des spermatozoïdes congelés et décongelés et pourrait diminuer les dégâts de stress oxydatif causés par la cryoconservation. Tandis que les dilueurs composés de jaune d'œuf ou de lait ont eu des répercussions négatives sur la qualité du sperme.

La composition en glutathion, catalase, superoxide dismutase, vitamine C et E ont un important effet antioxydant, ils peuvent alors jouer un rôle dans la diminution des effets néfastes du stress oxydatif.

**Mots clé :** Cryoconservation –Petits ruminants -Jaune d'œuf –Lait – Lecithine de soja –Antioxydant

**Abstract :**

The objective of this manuscript is to gather in a single work the data on semen conservation protocols in small ruminants and to highlight the role that can play the diluents based on egg yolk, milk, soy lecithin, triladyl, and andromeda in semen cryopreservation in order to improve the results of cryopreservation of semen

To this end, a comprehensive analysis of microscopic parameters of mobility and viability was performed to determine the effects of the components of diluents on semen. A specific problem in the conservation of goat semen is the effect of seminal plasma on the viability of spermatozoa after freezing/thawing, mainly when diluted in milk or egg yolk-based media. The BUSP60 protein responsible for this effect is an EYCE Enzyme of lipases that has dual lipase and phospholipase activity.

We believe that the results will help to create new diluents that do not contain animal products in order to cryopreserve spermatozoa

the use of the vegetable base soy lecithin had a desirable effect on the motility of frozen and thawed spermatozoa and may decrease the oxidative stress damage caused by cryopreservation. While the 4 different base diluents two egg yolk based (Tris yolk, and Tryladil), one milk based (skim milk (use at 5°C) negatively influenced sperm quality. Skim milk was the most advantageous in semen preservation at 5°C. While egg yolk-based diluents preserved semen quality better.

The composition of glutathione, catalase, superoxide dismutase, vitamin C and E makes the set an important antioxidant effect, so they can play a role in reducing the harmful effects of oxidative stress.

**Key words :**

Cryopreservation -small ruminants -egg yolk -milk -soy lecithin -Antioxidant

## INTRODUCTION

La production caprine est un secteur en croissance à fort potentiel économique (Gingras et Dumoulin, 2008). L'augmentation de la demande de lait de chèvre s'explique notamment par l'engouement des produits de la chèvre par les consommateurs (principalement le fromage). Afin de répondre à cette demande grandissante, l'augmentation de la production laitière du cheptel apparaît une solution envisageable. Il a été démontré que l'amélioration génétique par l'utilisation de l'insémination artificielle (IA) mène à l'augmentation des volumes de production laitière des sujets ainsi qu'à la modification dirigée de la composition du lait (Capgenes, 2004).

Depuis l'apparition des techniques de cryoconservation de la semence, il y a plus de 50 ans, la compréhension des mécanismes d'actions impliqués dans ce processus de conservation des cellules germinales s'est grandement améliorée, notamment peu de recherches ont été menées sur la comparaison des méthodes de congélation de la semence chez le bouc et le bélier. De plus, ce procédé de congélation des gamètes de boucs n'est pas couramment pratiqué en Algérie.

La cryoconservation de la semence permet l'accès à une semence de qualité tout au long de l'année, ce qui facilite la pratique de l'IA en contre-saison et d'amélioration génétique et d'augmentation de la production laitière des troupeaux caprins.

La production de la semence comporte plusieurs étapes. En premier lieu, le sperme est récolté (ou collecté) puis un contrôle de qualité est effectué afin d'éliminer les éjaculats de qualité insuffisante. La conservation du sperme récolté nécessite un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes. Son milieu naturel renferme des glucides qui constituent le substrat énergétique nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes mais aussi des lipides et des protéines.

Ainsi, des cryoprotecteurs composés de jaune d'œuf, de lait ou de lécithine de soja renferment des substances proches de celles retrouvées dans le milieu naturel sont donc utilisés comme milieu de dilution de la semence congelée. Enfin, la semence est conditionnée en petite dose puis conservée et stockée dans l'azote liquide à -196 °C pour être prête à l'insémination artificielle (IA)

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
<b>1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GENITAL MALE .....</b>	<b>6</b>
1.1 LES TESTICULES :.....	6
1.1.1 Les tubes séminifères :.....	7
1.2 LES VOIES SPERMATIQUES :.....	10
1.3 LES VOIES EXTRA-TESTICULAIRES : .....	11
1.3.1 L'épididyme :.....	11
1.3.2 Le conduit déférent :.....	11
1.3.3 Le conduit éjaculateur :.....	11
1.3.4 L'urètre.....	11
1.3.5 La verge (Ou Pénis):.....	12
1.4 PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION : .....	12
1.4.1 La Spermatogenèse.....	12
<b>2 TECHNIQUES DE COLLECTE ET PREPARATION DE LA SEMENCE .....</b>	<b>14</b>
2.1 TECHNIQUES DE COLLECTE DU SPERME :.....	14
2.1.1 Collecte au vagin artificiel : .....	14
2.1.2 Collecte à l'électro-éjaculateur :.....	15
2.1.3 Entraînement des mâles :.....	15
2.2 CONTROLE DE LA QUANTITE ET DE LA QUALITE DE LA SEMENCE :.....	16
2.2.1 Le spermogramme :.....	16
2.2.2 Le spermocytogramme : .....	18
2.3 CONGELATION DE LA SEMENCE :.....	19
2.3.1 Principes de congélation des cellules : .....	19
2.4 COMPOSITIONS DU LIQUIDE SEMINAL : .....	21
2.4.1 Particularité du plasma séminal su bouc :.....	22

<b>3 LES MILIEUX DE CONSERVATION DE LA SEMENCE .....</b>	<b>24</b>
3.1 DEFINITION DES DILUEURS :.....	24
3.2 CARACTERISTIQUES ET ROLES DES DILUEURS : .....	24
3.3 COMPOSITION DU DILUEUR : .....	24
3.3.1 cryoprotecteur non pénétrants : .....	24
3.3.2 Cryoprotecteur pénétrants : .....	26
3.3.3 Sucres :.....	26
3.3.4 Tampon :.....	26
3.3.5 Antibiotiques : .....	27
3.3.6 Les antioxydants :.....	27
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISSCUSION....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>DISSCUSION.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSION :.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES : .....</b>	<b>47</b>
<b>ANNEXE : .....</b>	<b>49</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>FIGURE 1:</b> ANATOMIE DU SYSTEME REPRODUCTEUR MALE, .....	6
<b>FIGURE 2 :</b> SCHEMA REPRESENTATIF DES DIFFERENTES FONCTIONS DES CELLULES .....	8
<b>FIGURE 3 :</b> ANATOMIE DU SPERMATOZOÏDE .....	9
<b>FIGURE 4:</b> EXTREMITE LIBRE DU PENIS DU BOUC .....	12
<b>FIGURE 5:</b> VAGIN ARTIFICIEL .....	14
<b>FIGURE 6:</b> ELECTROEJACULATION .....	15
<b>FIGURE 7:</b> METHODE DE COMPTAGE SUR UNE CELLULE DE THOMA ....	<b>ERREUR ! SIGNET NON</b>
<b>DEFINI.</b>	
<b>FIGURE 8:</b> SCHEMA DES EVENEMENTS SE PRODUISANT PENDANT LA CONGELATION .....	21
<b>FIGURE 9:</b> MECANISME DE PROTECTION DES SPERMATOZOÏDES PAR LE JAUNE D'ŒUF .....	25
<b>FIGURE 10:</b> CLASSEMENT THEMATIQUE DES ARTICLES TRAITES .....	29
<b>FIGURE 11 :</b> MOTILITE SPERMATQIE DE LA SEMANCE DECONGELEE .....	33
<b>FIGURE 12:</b> VIABILITE SPERMATQUE DU BOUC .....	34
<b>FIGURE 13:</b> LES VALEURS MOYENNES GLOBALE DE LA MT DE SPERME CONSERVE A 5 °C	38
<b>FIGURE 14 :</b> LES VALEURS MOYENNES GLOBALE DE LA MP DE SPERME CONSERVE A 5 °C	38
<b>FIGURE 15 :</b> LES VALEURS DE LA MT DE SPERME CONSERVE DANS LES QUATRE DILUEURS	39
<b>FIGURE 16 :</b> LES VALEURS DE LA MP DE SPERME DANS LES QUATRE DILUEURS .....	40
<b>FIGURE 17 :</b> VALEURS DE LA MP DE LA SEMENCE PENDANT L'ETAPE DE L'EQUILIBRATION. .	40
<b>FIGURE 18:</b> VALEURS DE LA MT DE LA SEMENCE PENDANT L'ETAPE DE L'EQUILIBRATION.	40
<b>FIGURE 19 :</b> LES VALEURS DE LA MT DE LA SEMENCE DU DILUE DANS LES 4 DILUEURS ....	41
<b>FIGURE 20 :</b> LES VALEURS MOYENNES GLOBALES DE LA MP DE LA SEMENCE DILUEDANS .	41

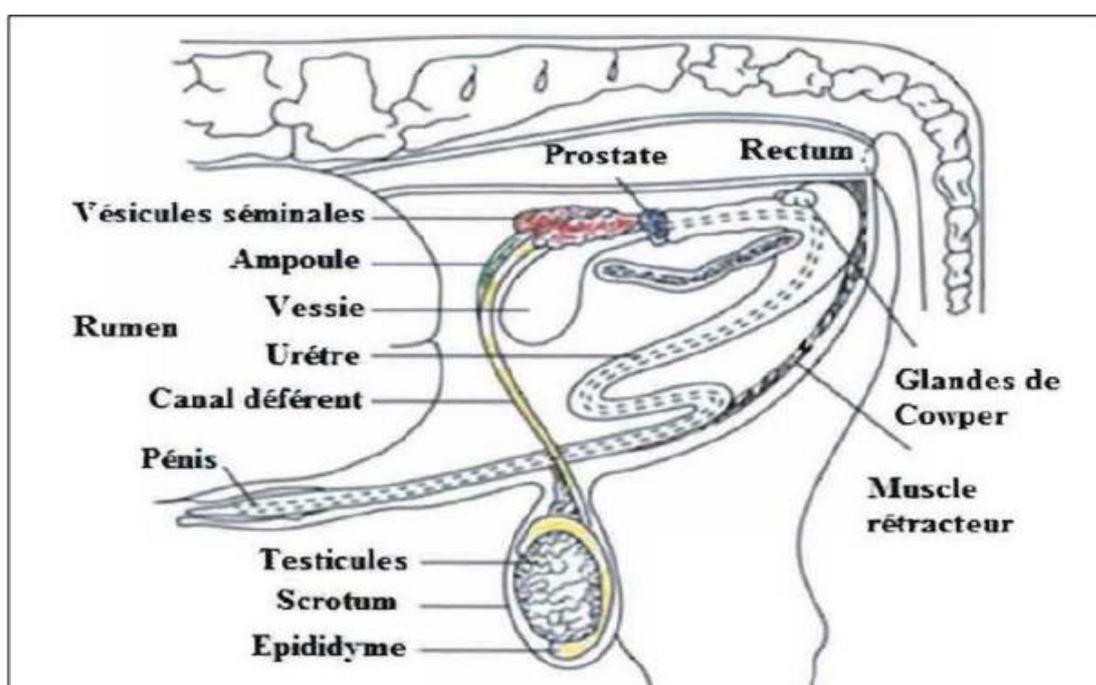
## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU I :</b> POIDS TESTICULAIRES CHEZ DES BELIERS ADULTES .....	7
<b>TABLEAU II:</b> CLASSIFICATION DES ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES	18
<b>TABLEAU III :</b> LES PRINCIPALES COMPOSANTES DU PLASMA SEMINAL DE BEIER .....	23
<b>TABLEAU IV:</b> CONCENTRATIONS D'ANTIBIOTIQUES UTILISEES PAR DIFFERENTS AUTEURS..	27
<b>TABLEAU V :</b> ROLES DES ANTIOXYDANTS .....	27
<b>TABLEAU VI :</b> MOTILITE SPERMATQIE DE LA SEMANCE .....	35
<b>TABLEAU VII:</b> VIABILITE SPERMATQIE DE LA SEMANCE .....	36
<b>TABLEAU VIII:</b> EVALUTATION DES SPERMATOZOIDES VIVANTS ET ET DES ANOMALIES.....	42
<b>TABLEAU IX :</b> TECHNIQUES DE COLLECTE DE SPERME CHEZ LE BELIER ET LE BOUC .....	49
<b>TABLEAU X :</b> PROTOCOLES DE CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE.....	50
<b>TABLEAU XI :</b> POURCENTAGE DES VIVANTS ET DES ANOMALIES .....	52
<b>TABLEAU XII :</b> CONTROL DE QUALITE DE LA SEMENCE.....	53
<b>TABLEAU XIII :</b> RESULTATS D'ANALYSE DU STATUT OXYDATIF SPERMATIQUE .....	55

## CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle

Les organes reproducteurs du bélier et du bouc comprennent les testicules, les épидидymes, les glandes annexes et les organes d'évacuation. Les spermatozoïdes passent du testicule dans l'épididyme où ils acquièrent leur motilité et leur fécondance et où ils sont stockés. Lors de l'éjaculation, ils sont propulsés dans le canal déférent et l'urètre, puis mélangés avec les sécrétions des glandes annexes,



pour  
constituer  
l'éjaculat.

**Figure 1: Anatomie du système reproducteur mâle, indiquant la situation des différents glandes et organes (Baril et al., 1993)**

#### 1.1 Les testicules :

Les testicules sont les gonades mâles qui assurent la production de spermatozoïdes (spermatogenèse) et synthétisent la testostérone, principale hormone sexuelle chez le mâle. La descente testiculaire et la migration à travers le canal inguinal commencent très tôt chez le bélier et le bouc, entre le 100ème et le 105ème jour de vie fœtale. La migration est finie avant le cinquième mois de gestation.

Chez le bélier et le bouc, les testicules sont situés en région inguinale. Ils sont attachés au corps par le cordon spermatique, qui comprend les vaisseaux sanguins,

**Tableau I : Poids testiculaires chez des béliers adultes (Setchell, 1977)**

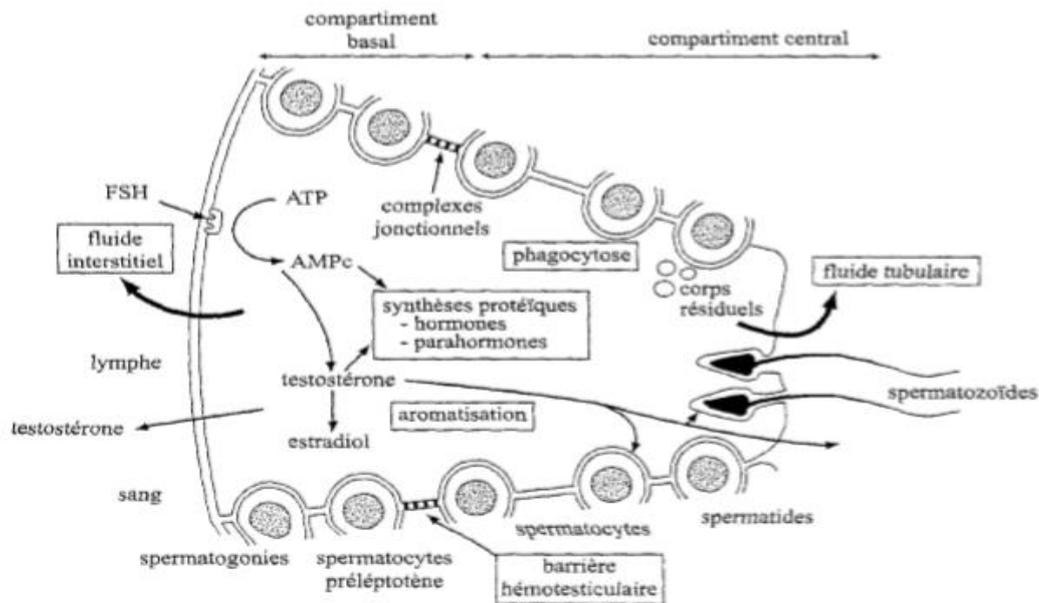
<b>race saisonaire</b>	<b>poids testiculaire ( g )</b>
<b>bélier ile de France</b>	
saison sexuelle	<b>300</b>
saison d'anoestrus	<b>200</b>
<b>bouc alpine adulte</b>	
saison sexuelle	<b>175</b>
saison d'anoestrus	<b>103</b>
<b>race désaisonnier</b>	
bouc créole adulte	<b>101</b>

### **1.1.1 Les tubes séminifères :**

Les tubes séminifères sont au nombre de deux à quatre par lobule. Ils s'entourent d'une lame basale délimitante, contenant parfois des cellules myoïdes contractiles. Leur paroi est constituée d'un épithélium stratifié, dont on cite deux types de cellules : les cellules de la lignée germinale et les cellules de Sertoli. L'espace inter tubulaire est occupé par des cellules endocrines isolées ou regroupées appelées cellules de Leydig (Dadoune et Demoulin, 2001).  
 FIGURE 2 : Structure histologique du tube séminifère (Albert et Jean, 2001)

#### **1.1.1.1 Les cellules de Sertoli :**

Ce sont des cellules somatiques à fonction identique et aux structures semblables à celles de tous les vertébrés (Thibault et al, 1998). Elles ont une forme pyramidale reposant sur la membrane basale. Les cellules de Sertoli s'étendent sur la hauteur du tube séminifère et s'unissent, d'une part, entre elles par des jonctions serrées, et d'autre part, avec les cellules germinales par des jonctions d'ancrages (Dadoune et Demoulin, 2001).



**Figure 2 : Schéma représentatif des différentes fonctions des cellules de Sertoli (Noakes et al.2001)**

#### 1.1.1.1 Rôles des cellules de Sertoli :

Elles ne seront indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse qu'après leurs différenciations. Les cellules de Sertoli assurent les fonctions suivantes :

- Support, protection et nutrition des cellules germinales : les cellules de Sertoli relient les cellules de la lignée germinale et les protègent des réactions immunologiques. Les échanges métaboliques de ces dernières se font à travers le cytoplasme sertolien en raison de non vascularisation de l'épithélium séminal.
- Spermiation : leurs protéases cellulaires participent dans la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère.
- Sécrétion et synthèse : outre les lactates et les pyruvates, sources d'énergie pour les cellules germinales, les cellules de Sertoli produisent aussi plusieurs protéines d'importances variables, entre autres IABP (Androgen-Binding-Protein) et linhibine.
- Stéroïdogénèse : c'est le métabolisme de la testostérone en androstènedione, dihydrotestostérone et l'aromatation de la testostérone en 17¼ oestradiol.
- Phagocytose : c'est la destruction des corps résiduels et des cellules germinales dégénérées (Dadoune, 1998).

### 1.1.1.2 Les cellules de la lignée germinale :

Ce sont les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes dérivant toutes des gonocytes.

### 1.1.1.3 Spermatogonies :

Situées près de la membrane basale, ces cellules ont un noyau arrondi, foncé à chromatine finement dispersée, et désignées par Ad (Dark, type A). Par mitose, elles donnent une spermatogonie Ad et une spermatogonie Ap (pâle, type A) appelée aussi « poussiéreuse » ayant une chromatine plus claire toujours finement dispersée. La division de celle-ci aboutit aux spermatogonies B ou « croûtelleuses ». Les spermatogonies croûtelleuses se divisent une à trois fois pour donner des « spermatocytes du premier ordre » ou « spermatocytes I » (George, 1996).

### 1.1.1.4 Spermatozoïde :

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui assure la transmission du génome haploïde mâle (ADN) à l'œuf de la femelle (Thibault, 1975)

C'est une petite cellule allongée, très mobile, de longueur variable selon les espèces (60 à 65 $\mu$  chez le bouc) (Altman, 1962). Elle se constitue d'une tête et d'un flagelle réunis par un col très bref.

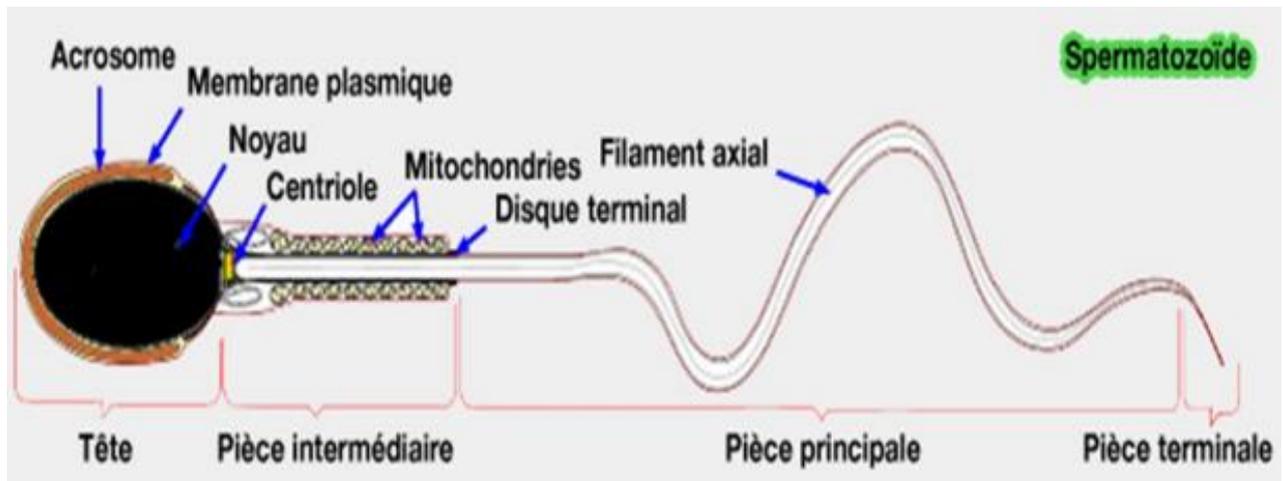


Figure 3 : anatomie du spermatozoïde (YAYE et al.2009)

**La tête** : chez le bouc, elle présente une forme massive d'une longueur de 8 $\mu$  et largeur de 4,5 à 5 $\mu$ . Elle est constituée essentiellement du noyau à chromatine

dense dont les deux tiers antérieurs sont recouverts par l'acrosome (Thibault, 1975). Le segment antérieur de ce dernier contient la « Hyaluronidase » qui digère le matériel unissant les cellules du cumulus oophorus, tandis que le segment postérieur renferme l'acrosine dont le rôle est la perforation de la zone pellucide de l'œuf (Drio et al, 1993).

**Le col** : c'est une courte partie cytoplasmique (2 à 3 $\mu$ ) contenant une plaque basale, le centriole proximal, 9 fibres denses disposées autour d'un complexe filamentueux axial (axonème) qui comprend 9 paires de tubules périphériques et une paire de tubules centraux. Le tout s'entoure d'une gaine mitochondriale, elle-même entourée d'une mince couche cytoplasmique (Vaissaire, 1977).

**Le flagelle** : présente, lui-même, trois parties successives :

- La pièce intermédiaire : débute au niveau du centriole distal et se termine par un épaississement de la membrane cytoplasmique en partie caudale : c'est l'annulus. Elle contient les éléments fibrillaires présents au niveau du col et des mitochondries disposées en gaine spiralée.
- La pièce principale : c'est la partie la plus longue de la queue. A son niveau, la gaine mitochondriale est substituée par une gaine fibreuse.
- La pièce terminale : ne contient que le filament axial avec une mince membrane remplaçant la gaine fibreuse (Barone, 1978).

#### **1.1.1.5 Les cellules du tissu interstitiel :**

Isolées ou groupées en amas, les cellules de Leydig occupent les espaces inter tubulaires en rapport étroit avec les capillaires sanguins et lymphatiques (Poirier et Chevreau, 1970). Elles ont une forme polyédrique avec cytoplasme dense et noyau arrondi. Leur ultrastructure montre une capacité de stéroïdogénèse. Elles secrètent les androgènes sous forme de testostérone et de dihydrotestostérone (Dadoune, 1998).

#### **1.2 Les voies spermatiques :**

Après leur élaboration dans les tubes séminifères, les spermatozoïdes seront évacués grâce à un ensemble de canaux : ce sont les voies excrétrices du sperme.

Ces voies comprennent une partie intra-testiculaire (tubes séminifères droits et rete-testis) et une partie extra-testiculaire (Girod et Czyba, 1977).

### **1.3 Les voies extra-testiculaires :**

#### **1.3.1 L'épididyme :**

C'est un organe allongé, logeant le bord postérieur du testicule et coiffant ses deux extrémités. Il est fait d'un canal étroitement pelotonné et se divise en trois segments :

- Une tête dans laquelle pénètrent les canaux efférents
- Un corps étroit et allongé et
- Une queue de laquelle part le canal déférent (Vaissaire, 1977).

#### **1.3.2 Le conduit déférent :**

Il fait suite à la queue de l'épididyme et s'étend jusqu'à l'urètre. D'une longueur d'environ 40cm, il traverse le canal inguinal et la fosse iliaque, puis il se fléchit vers la face dorsale de la vessie (Girod et Czyba, 1977).

Chez le bouc, le canal déférent se termine par une dilatation de 6 à 8cm de longueur appelée ampoule déférentielle (Nickel et al, 1973).

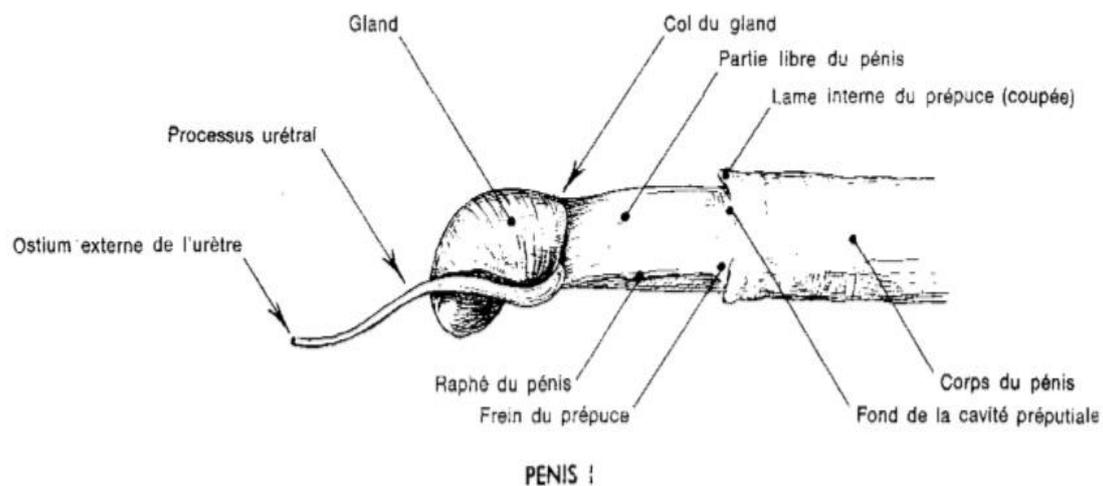
#### **1.3.3 Le conduit éjaculateur :**

C'est un conduit très bref qui résulte de l'union entre le conduit déférent et celui de la vésicule séminale. Il débouche dans la partie initiale de l'urètre (Barone, 1978)

#### **1.3.4 L'urètre**

C'est un long conduit impair qui sert à l'excrétion, à la fois, de l'urine et du sperme. Il se divise en deux portions :

- La portion intra-pelvienne : part de la vessie, reçoit le débouché des canaux déférents et sort du bassin. Elle est dépourvue de formations érectiles ;
- La portion extra-pelvienne ou pénienne : est faite de tige érectile (corps caverneux) accolée à une gaine de tissu érectile (corps spongieux) et dépourvue de glandes (Vaissaire, 1977).



**Figure 4: Extrémité libre du pénis du bouc (YAYE et al 2009)**

### 1.3.5 La verge (Ou Pénis):

Le pénis du bouc mesure 40 à 55cm, il est mince, cylindrique, moins érectile et se termine en pointe à son extrémité libre (Altman, 1962 ; Hafez, 1968).

- Une partie fixe formant une double inflexion en forme d'un S : c'est le S pénien ou inflexion sigmoïde.
- Une partie libre terminée par un renflement recourbé en croché nettement asymétrique : c'est le gland. Le tube urétral se prolonge, sous la face inférieure du gland, d'un appendice vermiforme (Vaissaire, 1977).

## 1.4 Physiologie de la reproduction :

### 1.4.1 La Spermatogenèse

La spermatogenèse est un mécanisme extrêmement complexe et est un phénomène continu débutant à la puberté qui assure deux fonctions essentielles :

- la multiplication perpétuelle : les divisions et les différenciations des spermatogonies souches qui aboutissent à la production des spermatozoïdes qui sont produits dans les tubes séminifères dans le parenchyme testiculaire. Et le renouvellement permanent de ces spermatogonies qui vont constituer le stock de «futurs»

Les tubes séminifères sont le lieu de fabrication des gamètes, où les cellules de la lignée spermatogénique sont associées à des cellules de soutien appelées cellules de Sertoli (Thibault et Levasseur, 2001)

#### **1.4.1.1 Phase de multiplication des spermatogonies :**

La spermatogonie souche constitue, chez le mâle, le stock de renouvellement (estimé à plusieurs millions de cellules), à partir duquel les lignées spermatogénétiques sont initiées tout au long de la future vie reproductive du mâle adulte, ainsi que la différenciation des cellules conduisant aux spermatoocytes primaires. Les spermatogonies sont essentiellement des cellules diploïdes (chez le bouc  $2n = 60$ ), et désignées par Ad (Dark, type A). Par mitose, elles donnent une spermatogonie Ad et une spermatogonie Ap (pâle, type A) appelée aussi « poussièreuse ». La division de celle-ci aboutit aux spermatogonies B ou « croûtelles ». Les spermatogonies croûtelles se divisent une à trois fois pour donner des « spermatoocytes du premier ordre » ou « spermatoocytes I » (George, 1996).

#### **1.4.1.2 Phase de réduction et de maturation :**

Une fois transformée en spermatoocyte primaire (produit final de la dernière division spermatogoniale), le spermatoocyte I devient une grande cellule ovale et réplique son ADN avant de rentrer en méiose. C'est au cours de cette étape que le phénomène de crossing over se produit, permettant l'échange de portions de chromosome homologue parental et maternel cela concourt au brassage des gènes caractéristiques de la reproduction sexuée.

La première division de méiose réduit le nombre de chromosomes et donne des spermatoocytes de deuxième ordre (spermatoocyte II) . Ils subissent rapidement la deuxième division de méiose qui sépare les deux chromatides de chromosome pour donner des cellules haploïdes : les spermatides.

## 2. Techniques de collecte et préparation de la semence

### 2.1. Techniques de collecte du sperme :

Deux techniques peuvent être utilisées pour la collecte de la semence des mâles des petits ruminants. L'une se fait à l'aide d'un vagin artificiel, l'autre à l'aide d'un électro éjaculateur.

#### 2.1.1. Collecte au vagin artificiel :

Le vagin artificiel est plus petit que pour les bovins. Il contient de l'eau chaude (40°C) Les béliers ou boucs sont entraînés à la collecte. Pour ceux qui n'ont jamais été collectés, il faut utiliser une femelle en chaleur.

C'est un appareil simple et pratique, le vagin artificiel comporte deux parties :

- Un cylindre extérieur en matériel rigide le plus souvent en caoutchouc dur et épais ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon.
- La chemise intérieure en latex ou en caoutchouc artificiel est introduite dans le cylindre externe et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique aux extrémités de celui-là. La cavité, ainsi, formée par le cylindre externe et la chemise interne est remplie d'eau en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin de la femelle.

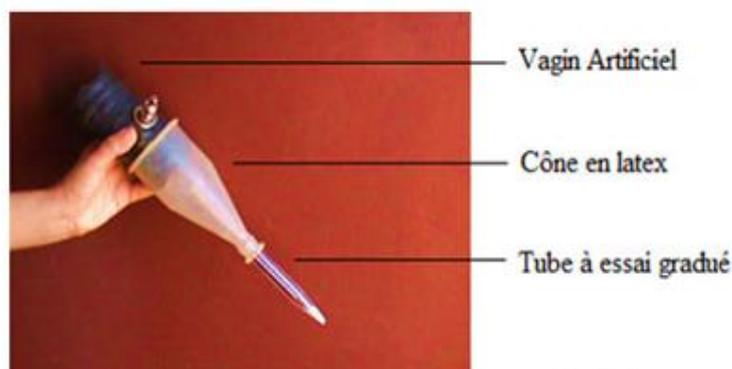


Figure 5: Vagin artificiel (MAHDID et al. 2013)

### **2.1.2. Collecte à l'électro-éjaculateur :**

L'électroéjaculation permet de provoquer l'éjaculation par une stimulation électrique. Un générateur produit de l'électricité qui est transmise par l'intermédiaire d'électrodes à l'animal.

L'interface tissu/électrodes (résistance interne) joue un rôle non négligeable car la stimulation électrique doit parvenir jusqu'aux nerfs pour provoquer l'érection et l'éjaculation. On essaie de stimuler particulièrement les glandes bulbo urétrales, la prostate et les vésicules séminales (Stievenart et al. 1991)



**Figure 6: Electroéjaculation (MAHDID .2013)**

### **2.1.3. Entraînement des mâles :**

Les béliers ou boucs sont entraînés à la collecte. Il est préférable de choisir les jeunes mâles le plus tôt possible (au sevrage, par exemple), afin de leur procurer les conditions d'élevage adéquates (présence de femelles avant la puberté chez le bélier, isolement chez le bouc, bonnes conditions sanitaires et alimentaires et manipulation fréquente par l'homme).

### **2.1.3.1. Mâles dont la semence n'a jamais été collectée :**

Cette technique nécessite un certain nombre d'heures de travail et beaucoup de patience. Il est préférable de la commencer pendant la saison où la motivation sexuelle est à son maximum (fin de l'été et automne chez les races saisonnées).

Il est très important d'avoir des femelles manifestant un comportement d'œstrus au moment de la collecte. Pour cela, des femelles entières peuvent être utilisées, en œstrus naturel ou induit par traitement hormonal classique.

### **2.1.3.2. Mâles dont la semence a déjà été collectée :**

En général, les mâles déjà habitués ne manifestent pas de problèmes comportementaux, même après un repos sexuel de plusieurs mois, si la période de collecte de semence redémarre pendant la période d'activité sexuelle maximale

Toutefois, si ce redémarrage se situe hors saison, une inhibition sexuelle peut se produire sur un faible nombre de mâles. Celle-ci est due à la saison et non à la peur de l'homme.

Le meilleur moyen d'éviter tout problème avec les collectes de semence pendant la contre-saison est d'entraîner régulièrement les mâles à la collecte à des jours et heures fixes.

## **2.2. Contrôle de la quantité et de la qualité de la semence :**

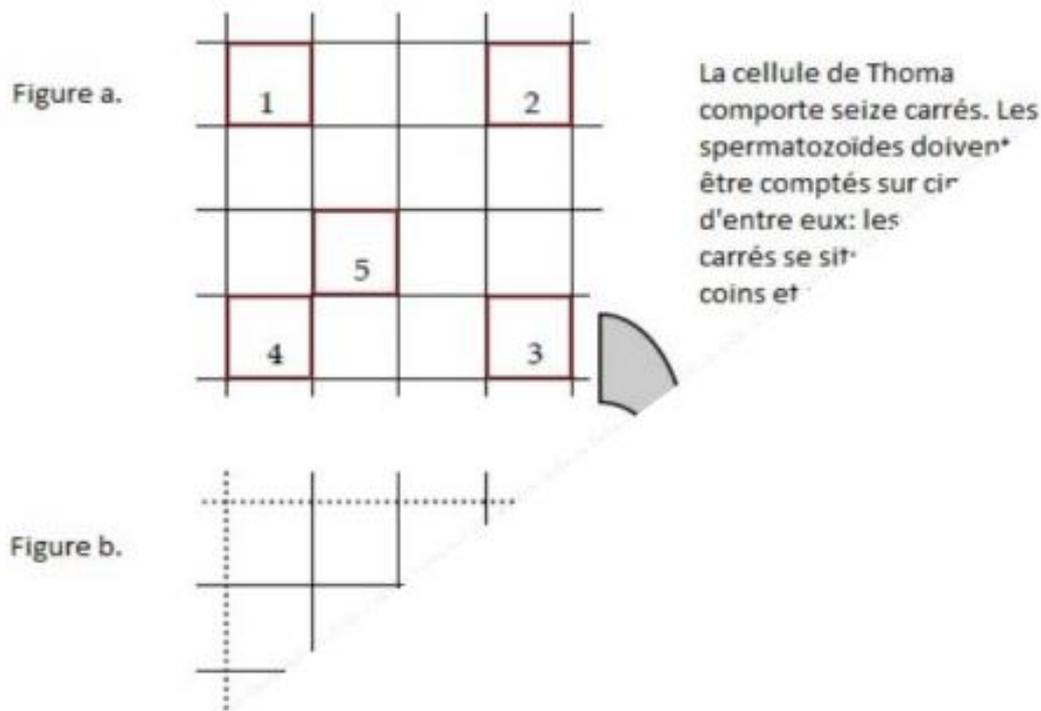
Une fois collectée la semence subit des examens pour évaluer sa qualité.

### **2.2.1. Le spermogramme :**

C'est l'étude du sperme au sens strict. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité sont analysés.(Fontbonne et Dumont, 1992)

#### **2.2.1.1. Volume de l'éjaculat :**

La lecture du volume de l'éjaculat est effectuée directement à l'aide des graduations du tube conique de collecte, le volume moyen de l'éjaculat est de  $0,66 \pm 0,23$  ml chez les jeunes béliers.



**Figure 7: Méthode de comptage sur une cellule de Thoma (Fuertes, 2008)mmj**

#### **2.2.1.2. Numérotation :**

L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure. La concentration spermatique varie généralement de 2 à  $10 \times 10^9$  spermatozoïdes par millilitre de semence éjaculée.

#### **2.2.1.3. Evaluation au microscope :**

En routine, la numération s'effectue à l'aide d'une cellule hématimétrique : cellule de Thoma ou de Malassez. La dilution d'une fraction de la phase spermatique avec une solution hypertonique (chlorure de sodium à 3 %) est une étape préalable qui permet d'immobiliser les spermatozoïdes. En général, une dilution au 1/100ème est réalisée. Une goutte de semence diluée est déposée entre lame et lamelle sur une cellule de Thoma ou de Malassez et les spermatozoïdes sont dénombrés

Le nombre total de spermatozoïdes varie entre 200 millions et plusieurs milliards en fonction de l'âge, de la race et de l'activité sexuelle de l'animal. **(Fuertes, 2008)**

#### **2.2.1.4. Aspect :**

Le sperme est un liquide visqueux, laiteux de couleur blanchâtre ou blanc-jaunâtre.

Souvent, une coloration jaunâtre évoquant une contamination par de l'urine. Par contre une coloration rougeâtre, suggérant un saignement prostatique ou pénien.

**(Freshman, 2002)**

#### **2.2.1.5. Mobilité :**

Une fois collecté, une goutte du sperme pur est directement examinée au microscope à l'objectif 40, du fait qu'au bout de 15 à 20 secondes, la motilité massale du sperme pur diminue. Pour apprécier la motilité massale, une échelle de 0 à 5 (BARIL et al., 1993) est souvent utilisée. Cette échelle est décrite de la manière suivante :

- 0 = Immobilité totale
- 1 = Mouvements individualisés
- 1 = Mouvements très lents
- 3 = Motilité massale générale de faible amplitude
- 4 = Motilité massale rapide, sans tourbillons
- 5 = Motilité massale rapide, avec tourbillons

#### **2.2.2. Le spermocytogramme :**

Le spermocytogramme est l'étude de la morphologie des spermatozoïdes. Elle s'effectue sur un étalement de semence colorée au microscope optique en contraste de phase. Les anomalies morphologiques sont classées par Kruger en fonction de leur localisation sur le spermatozoïde : anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire ou de la queue.

**Tableau II: Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes de Kruger (Rigal, 2008)**

Anomalies du flagelle	Flagelle replié Flagelle rudimentaire ou cassé Flagelle enroulé Gouttelette cytoplasmique distale
Anomalies de la pièce intermédiaire	Pièce intermédiaire dédoublée Déformations de la pièce intermédiaire Gouttelette cytoplasmique proximale
Anomalies de la tête	Tête piriforme Tête repliée Tête décapitée Tête ronde

### 2.3. Congélation de la semence :

#### 2.3.1. Principes de congélation des cellules :

Les techniques de congélation détériorent la qualité de la semence (Batista et al., 2009). Le stress responsable des dommages causés aux cellules et plus précisément aux spermatozoïdes sont principalement provoqués par les chocs de température, la cristallisation et les stress osmotiques (Watson, 2000). Les processus de congélation de la semence visent à minimiser la perte de motilité et de viabilité des spermatozoïdes (Dorado et al., 2010).

##### 2.3.1.1. Chocs thermiques :

On appelle chocs thermiques les changements rapides de température allant essentiellement de 35 à 15°C et de 0 à -80°C (Bakhach et al., 2007)

Ces variations de température créent des changements de l'arrangement des constituants lipidiques membranaires et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du spermatozoïde (Medeiros et al., 2002; Bakhach et al., 2007).

Il s'ensuit une perte de motilité et de perméabilité sélective de la membrane au calcium (Medeiros et al., 2002). Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est très élevée, la motilité et la fertilité sont réduites (Collin et al., 2000). Il en va de même pour la viabilité du spermatozoïde (Simpson et White, 1986). Le degré de

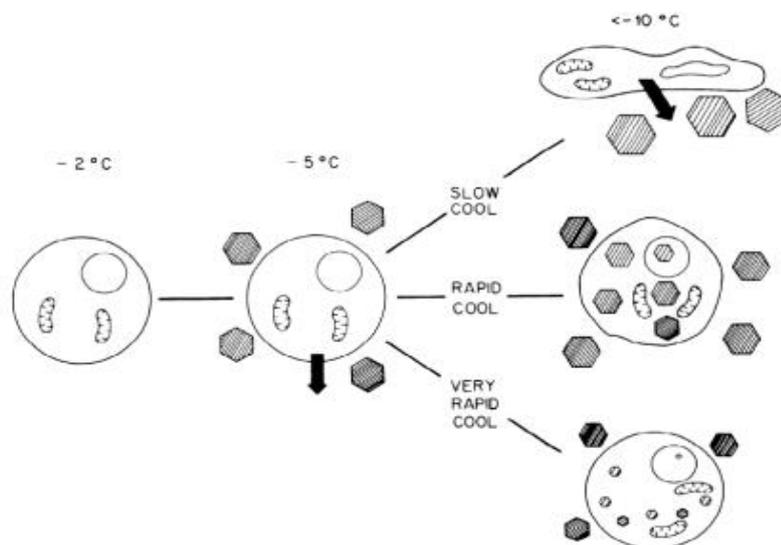
dommage structurel dépend de la température et de la constitution en lipides des membranes (Bailey et al., 2003).

### 2.3.1.2. Cristallisation :

L'eau est essentielle à la structure et au bon fonctionnement des cellules vivantes. Le phénomène de cristallisation se produit lors du passage de l'eau à l'état solide. La formation de glace extracellulaire serait activatrice du processus de cristallisation intracellulaire (Mazur, 1965; Toner, 1993).

La présence de cristaux dans le milieu extracellulaire crée un gradient de concentration qui favorise la sortie d'eau de la cellule au profit de l'entrée des solutés. à basse température, la membrane cellulaire modifie son coefficient de perméabilité et se comporte comme une membrane semi-perméable (Andersen, 1969; Mazur, 1984). De plus, la vitesse de refroidissement de la semence détermine si la formation des cristaux de glace sera intra ou extracellulaire lors de la congélation. La cristallisation extracellulaire modifie l'environnement chimique des cellules et génère des contraintes mécaniques qui vont déformer les cellules (Bakhach et al., 2007).

D'autre part, la cristallisation intracellulaire combinée à la déshydratation de la cellule peut former des lésions aux membranes des organelles intracellulaires (Bakhach et al., 2007).



**Figure 8: Schéma des événements physiques se produisant pendant la congélation d'une cellule (Mazur, 1977)**

**2.3.1.3. Stress osmotique :**

Au cours de la congélation des spermatozoïdes, la formation de cristaux extracellulaires augmente l'osmolarité de l'eau intracellulaire et provoque sa sortie et la déshydratation de la cellule. Les cryoprotectants sont très importants pour empêcher la formation de cristaux extracellulaires (Medeiros et al., 2002).

Le cryoprotectant le plus utilisé pour la semence de mammifère est le glycérol. Durant le processus de congélation, l'ajout de cryoprotectants au dilueur de la semence crée un stress osmotique plus ou moins important selon sa perméabilité. Les dommages cellulaires dépendent alors des éléments constituant de la membrane, tels le ratio cholestérol / phospholipides, le degré de saturation de la chaîne hydrocarbonée et le ratio protéines / phospholipides (Parks, 1997).

La concentration finale de cryoprotectants dans un milieu détermine son effet sur la cellule. Les cellules exposées à des concentrations élevées de cryoprotectants subiront une déshydratation et une perte de volume intense. On appelle limite de tolérance osmotique le degré auquel la cellule peut maintenir sa viabilité malgré les variations de volumes cellulaires causées par les stress osmotiques (Bever-Gilmore, 1998). L'osmolarité optimale des diluants de semence de boucs, c'est-à-dire celle qui occasionne le moins de dommages cellulaires, se situe entre 425 et 525 mOsm selon Bowen (1988).

**2.4. Compositions du liquide séminal :**

Le plasma séminal est composé des sécrétions de l'épididyme ainsi que de celles des glandes annexes, produites lors de l'éjaculation (Thibault et Levasseur, 2001).

Les sécrétions des glandes annexes représentent de 50 à 95 % du plasma séminal (Thibault et Levasseur, 2001). Ce fluide joue un rôle important dans la fertilité de la semence, permettant le transport des spermatozoïdes depuis le tractus génital mâle jusqu'à celui de la femelle.

#### **2.4.1. Particularité du plasma séminal su bouc :**

La composition du plasma séminal chez les mammifères varie d'une espèce à l'autre. Corteel et son équipe (1980) ont démontré que certains composés issus de la fraction non épидидymaire de la semence de boucs ont des effets négatifs sur la survie et la motilité des spermatozoïdes. Les principales composantes particulières du plasma séminal de la semence de boucs sont

##### **2.4.1.1. L'enzyme EYCE :**

Cette enzyme a été identifiée comme une phospholipase A2 (PLA2), sécrétée par les glandes bulbo-urétrales sous influences saisonnières (Iritani et al., 1964; Upreti et al., 1999).

Le jaune d'œuf est fréquemment utilisé comme base de diluant de la semence de boucs lors des procédés de cryoconservation. En contact avec le jaune d'œuf, l'EYCE du plasma séminal hydrolyse des phospholipides de l'œuf et de la membrane phospholipidique des spermatozoïdes et libérant un acide gras insaturé et un lysophospholipide, la lysolécithine. Ce dernier composé a différentes répercussions sur l'intégrité des spermatozoïdes selon sa concentration dans le plasma séminal, mais également selon le pH du plasma séminal, la température et la saison de production de la semence (Leboeuf et al. 2003).

Par conséquent, la concentration en lysolécithine aura différents impacts sur l'intégrité des spermatozoïdes. Une faible concentration en lysolécithine permet l'activation de la motilité (Hartree et Mann, 1961).

À des concentrations plus élevées, la lysolécithine peut provoquer la réaction spontanée de l'acrosome (Fleming et Yanagimachi, 1981), la condensation de la chromatine (Sawyer et Brown, 1995) et peut même être toxique pour la survie des spermatozoïdes à de fortes concentrations (Aamdal et al., 1965; Baril et al., 1993; La Falci et al., 2002) provoquant leur mort instantanée (Aamdal et al., 1965).

##### **2.4.1.2. BUSpg60 :**

La BUSpg60 est une glycoprotéique de 55-60 kilodaltons, issue des sécrétions bulbo-urétrales et présente des activités de lipase triglycéride. Démontrant une grande affinité pour l'héparine (La Falci et al., 2002). Elle est caractérisée comme une lipase pancréatique hypothétiquement membre de la famille PLRP2 (Pancreatic

Lipase Related Proteins 2) (Pellicer et al., 1997). Elle hydrolyse les triglycérides du lait libérant des acides gras, dont l'acide oléique, un composé toxique pour les spermatozoïdes (Leboeuf et al., 2003). cette protéine est responsable des effets délétères sur la semence lorsque celle-ci est diluée dans le lait sur la motilité, la qualité des mouvements, l'intégrité de l'acrosome et la mort cellulaire des spermatozoïdes (Leboeuf et al., 2003).

**Tableau III : Les principales composantes du plasma séminal de bélier (Kaczmarczyk et al., 2012).**

<b>Composantes</b>	<b>Concentrations moyennes</b>
Riboflavine <i>(varie selon la coloration de la semence)</i>	Jaune : 5,38 µl/mL Jaune pâle : 3,09 µl/mL Blanc : 1,72 µl/100 mL
Fructose	857 mg/100 mL
Acide citrique	331 mg/10 mL
Acide lactique	73 mg/100 mL
Glucose	6,7 mg/100 mL
Glycérylphosphorylcholine	191 mg/100 mL
L-α-glycérophosphate	3,3 mL/100 mL
Glycérol	1,76 mg/100 mL

Adapté de Mendoza *et al.*, 1989

### 3. Les milieux de conservation de la semence

#### 3.1. Définition des dilueurs :

Pour protéger et nourrir les spermatozoïdes durant la congélation, un milieu particulier est utilisé : le dilueur. (Fuertes, 2008). Ce milieu de congélation, permet de conserver la semence en gardant les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Il permet également d'ajuster la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes. (Marc, 2015)

#### 3.2. Caractéristiques et rôles des dilueurs :

Un dilueur doit être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques, posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spermatozoïdes, avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation. Il doit avoir un pouvoir anti-oxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres, avoir une activité anti-microbienne et posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes (England, 1993).

#### 3.3. Composition du dilueur :

Les substances d'un dilueur ont pour rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau.

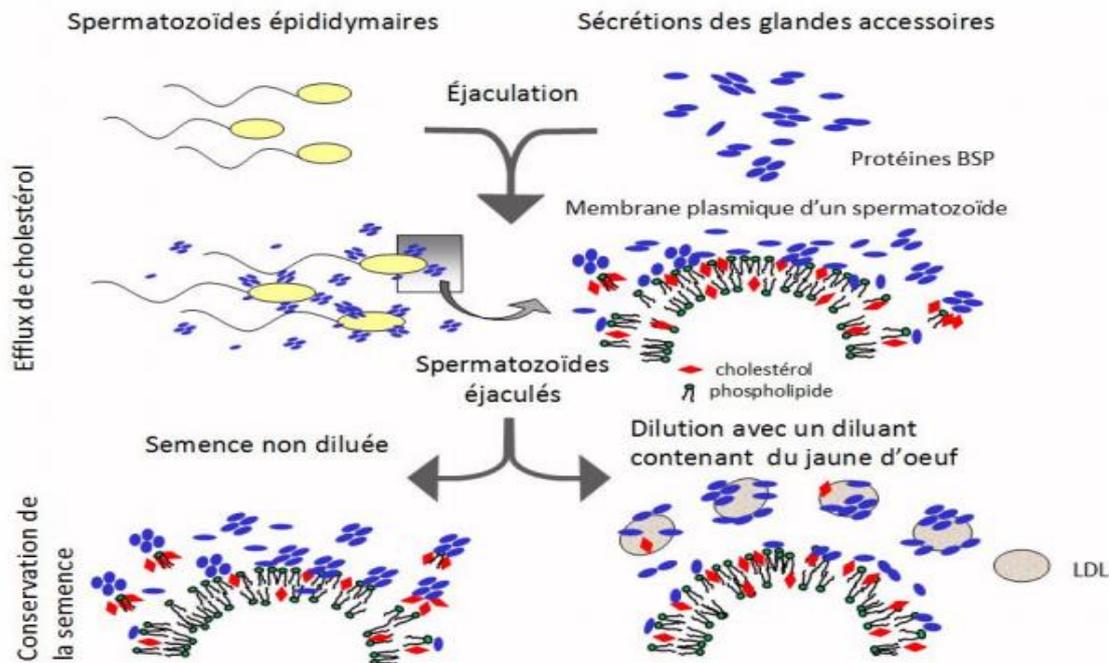
##### 3.3.1. cryoprotecteur non pénétrants :

Les cryoprotectants non pénétrants ne peuvent pas traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Leur action à l'extérieur de la cellule permet d'enrober les cristaux de glace formés par la congélation, protège ainsi les spermatozoïdes des déformations et lésions cellulaires. Il augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde (Purdy, 2006), ce qui retarde la formation de glace intracellulaire. La conservation de la cellule est ainsi favorisée.

Les cryoprotecteurs non pénétrants les plus utilisés chez le bouc sont **le jaune d'œuf** et **le lait**, à des concentrations de 1,5 à 20 % (v/v) et de 10 % p/v respectivement (Salamon et Ritar, 1982). Les concentrations en cryoprotectants varient selon le protocole de congélation utilisé (avec ou sans plasma séminal).

### 3.3.1.1. Jaune d'œuf :

Le jaune d'œuf est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs de cryoconservation. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation (England, 1993). Le plus souvent, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20 %.



**Figure 9: Mécanisme de protection des spermatozoïdes par le jaune d'œuf (Kaczmarczyk et al., 2012).**

### 3.3.1.2. Le lait :

Le lait est dépourvu de lipoprotéines, son mécanisme de protection est basé sur la fixation de la protéine (caséine) à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bergeron et Manjunath, 2006, 2007). Cette fixation de la caséine du lait au spermatozoïde minimise la perte de lipides par la membrane plasmique et permet de maintenir la motilité et la viabilité de la semence pendant la congélation (Bergeron et al., 2007).

### **3.3.2. Cryoprotecteur pénétrants :**

Les cryoprotecteurs pénétrants sont de faible poids moléculaire et sont perméables à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bakhach et al., 2007). Ils agissent à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Purdy, 2006b).

Lorsqu'ils sont à l'extérieur, ces cryoprotecteurs augmentent l'osmolarité du diluant et stimulent la déshydratation de la cellule. La perte d'eau intracellulaire du spermatozoïde le dispose à la congélation (Medeiros et al., 2002). Lorsque ces cryoprotecteurs sont à l'intérieur de la cellule, ils diminuent le stress osmotique de la cellule causé par la déshydratation (Medeiros et al., 2002). Cette sortie d'eau du spermatozoïde diminue son point de congélation et réduit les phénomènes de cristallisation intracellulaire (Purdy, 2006).

#### **3.3.2.1. Le glycérol :**

Le glycérol est le plus utilisé des cryoprotecteurs de part le monde. Il possède une action à la fois intra- et extra-cellulaire. Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes, ce qui diminue le risque de perforation des membranes. Dans le milieu extra-cellulaire, le glycérol diminue le seuil de congélation de l'eau extra-cellulaire. Les dilueurs actuels contiennent une concentration en glycérol allant de 3 à 9 % sans qu'une concentration optimale n'ait été reconnue (Fuertes, 2008).

#### **3.3.3. Sucres :**

Le glucose et le fructose sont des sucres simples, monosaccharides à faible poids moléculaire qui peuvent traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Pour leur part, les disaccharides (lactose, sucrose, raffinose tréhalose) ne peuvent pas traverser la membrane plasmique. Ces derniers agissent comme cryoprotectants extracellulaires en créant une pression osmotique à l'extérieur de la cellule, ce qui diminue la formation de glace intracellulaire (Purdy, 2006).

#### **3.3.4. Tampon :**

L'ajout de composés tamponnés dans les dilueurs a un impact sur la qualité de la semence. Les études montrent que les concentrations du Tris (300, 375 ou 400 mM) ne créent pas de différence sur la motilité de la semence après décongélation, mais influence sa viabilité.

### 3.3.5. Antibiotiques :

Les agents cryoprotecteurs permettent non seulement la conservation des cellules germinales, mais également des bactéries. Il est donc nécessaire d'ajouter des antibiotiques au dilueurs de la semence pour freiner la propagation de bactéries

**Tableau IV: Concentrations d'antibiotiques utilisées par différents auteurs dans la préparation de diluant de congélation pour la semence de boucs(Kaczmarczyk et al., 2012).**

Auteur	Pénicilline	Streptomycine
Chauhan et Anand, 1990	1000 UI/mL	1 mg/mL
Cabrera <i>et al.</i> , 2005	500 UI/mL	0,05 %
Peterson <i>et al.</i> , 2007	0,3 mg/mL	0,5 mg / mL *dihydrostreptomycine
Batista <i>et al.</i> , 2009	500 UI/mL	0,05 %

### 3.3.6. Les antioxydants :

**Vansant (2004) in Mohammedi (2013)** définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS.

**TABLEAU V : Rôles des antioxydants (MAHDID .2013)**

Vitamine E	vitamine liposoluble qui a des propriétés anti oxydantes en conjugaison avec la vitamine C et le glutathion, elle joue son rôle d'antioxydant principalement dans les membranes biologiques
vitamine C	Elles agissent en captant les radicaux libres et les EOR.
Super oxyde dismutase	-Améliore la vitesse de réaction acrosomique et la préservation de la mobilité des spermatozoïdes.
Le glutathion	- réduire le métabolisme des radicaux H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et OH.

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### Matériel :

En raison de la pandémie du coronavirus et les mesures prises afin de diminuer le risque de transmission du covid-19, nous n'avons pas pu faire d'application pratique, Nous avons réalisé une synthèse bibliographique d'articles scientifiques récents (2003-2019) dans le but de comparer les techniques utilisés dans la cryoconservation de la semence des petits ruminants. Cette comparaison a porté principalement sur la méthode de collecte du sperme, des milieux utilisés dans la cryoconservation et des résultats au control de qualité après décongélation de cette dernière.

Au cours de notre documentation, nous avons été amenés à consulter de nombreuses sources, principalement :

Moteurs de recherche	<ul style="list-style-type: none"><li>- Google scholar</li><li>- sciencedirect</li><li>- dspace université</li><li>- HAL</li></ul>
----------------------	--

Afin d'affiner la recherches, nous avons utilisé une liste de mots clés :

Mots clés	Cryoconservation- petits ruminants –semance- dilueur -jaune d'œuf –lait – lecithine de soja - Antioxydant
-----------	---

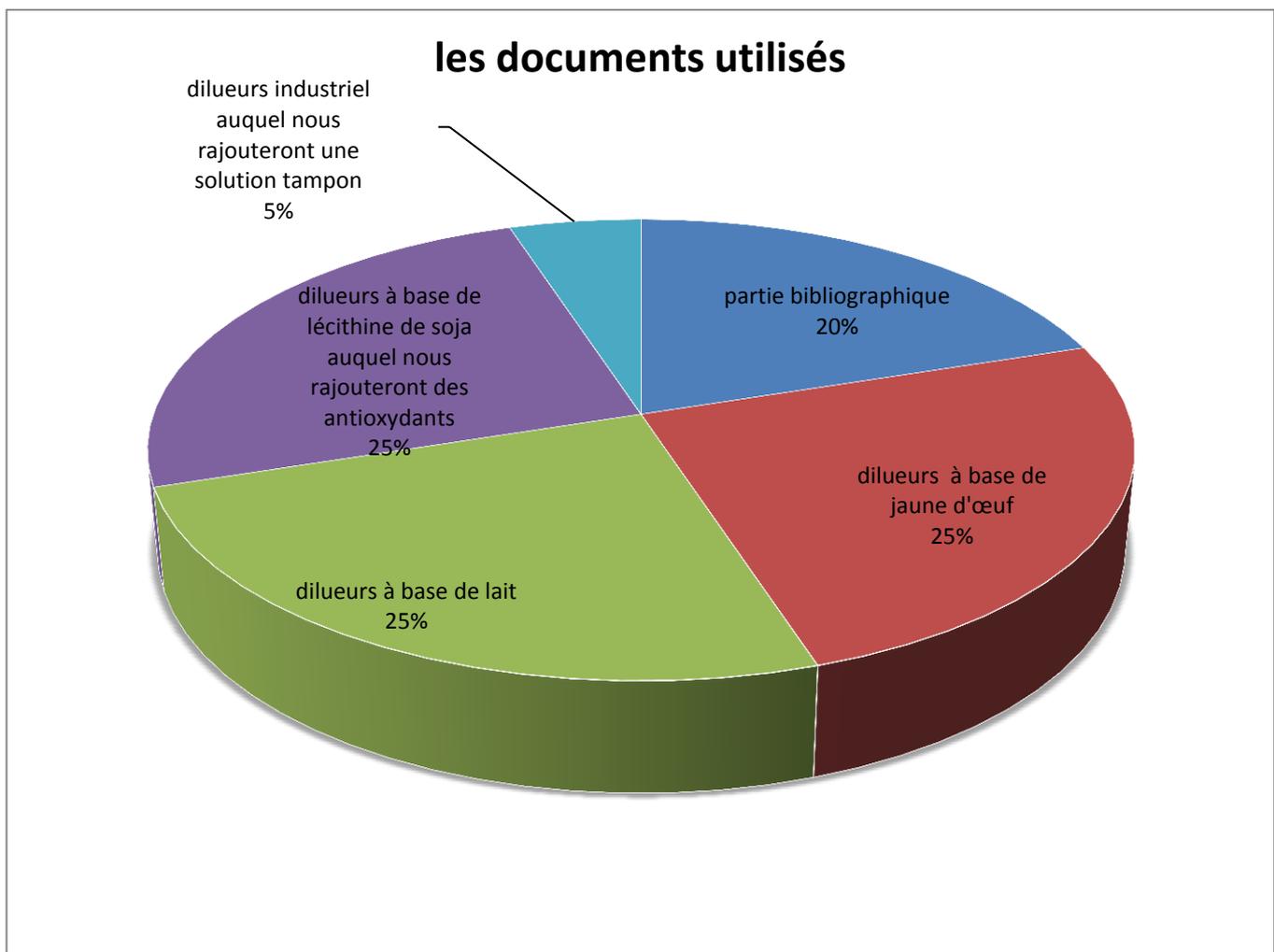
Les critères que nous avons pris en compte afin d'inclure un document ont été qu'ils abordent :

critères de choix	1-La cryoconservation de la semence chez les petits ruminants 2-L'amélioration de la qualité de conservation des semences soit <ul style="list-style-type: none"><li>- en utilisant des produits de conservation tel que les dilueurs, ou</li></ul>
-------------------	---

	- par modification de la composition des dilueurs utilisés
--	--

Afin d'être à jour sur l'état d'avancement des recherches ayant pour sujet l'amélioration des techniques de conservation et cryoconservation de la semence des petits ruminants, nous avons mené nos recherches en langue française et bien évidemment en anglais.

Un autre aspect a été pris en compte, l'année de parution de la documentation, nous avons voulu prendre en considération les publications les plus récentes, de ce fait l'année de publication de la documentation s'étend de 2003 à 2019.



**Figure 10: classement thématique des articles traités**

### **Méthodes de collecte :**

La récolte du sperme constitue la première opération de la cryoconservation, le sperme des taureaux est le plus souvent collecté au vagin artificiel

-Les vagins artificiels sont maintenus dans une étuve à une température de 45°C

-L'intérieur du vagin est lubrifié avec de la vaseline ou un gel gynécologique.

Lorsque le bouc s'approche pour saillir, l'opérateur intercale le vagin dans le prolongement du pénis et dévie légèrement avec l'autre main le pénis du bouc ou bélier.

-Agitation du vagin pour faire descendre l'éjaculat

### **Dilueurs utilisés :**

Au cours de notre recherche, nous avons été amenés à voir différents dilueurs qui seront divisés en 3 groupes distincts :

- 1- Groupe de dilueur à base de jaune d'œuf et dilueur à base de lait utilisés en routine.
- 2- Groupe des dilueurs à base de lécithine de soja (+Antioxydants) pour améliorer la viabilité des spermatozoïdes.
- 3- Groupe des dilueurs industriels (+solution tampon)

### **Préparation de la semence :**

#### **1. Premier groupe de dilueurs à base de jaune d'œuf et de lait**

Comparaison de deux protocoles de cryoconservation chez le bouc, le premier protocole sera le suivant :

#### **Protocole 1 :**

Deux centrifugations pendant 15 minutes pour se débarrasser du liquide séminal

Ajout de Dilueurs à base de lait sans glycérol +lait avec glycérol

Ils seront entreposés dans une chambre froide où la température sera maintenue à 4°C pendant 1h30min pour préserver le choc thermique.

## **Protocole 2 :**

L'ajout de deux tampons le Tris + l'acide citrique, le dilueur à base de jaune d'œuf 18% et le glycérol.

Ils seront entreposés dans une chambre froide où la température sera maintenue à 4°C pendant 1h30min pour préserver du choc thermique.

Les deux semences sont placées dans des paillettes de 0,5mL par aspiration. L'extrémité libre de chaque paillette est obstruée à l'aide d'une poudre de PVC (polychlorure de vinyle) se polymérisant dans l'eau.

Après la fin de la durée de réfrigération, les paillettes seront placées dans des vapeurs d'azote pendant 10 minutes. Au bout de 10 minutes, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C où ils seront conservés jusqu'à leur décongélation.

### **2. Groupe des dilueurs à base de lécithine de soja**

C'est le nouveau protocole de cryoconservation qui consiste à l'ajout des dilueurs à base végétal ( lécithine de soja ) et d'un antioxydants pour améliorer la viabilité des spermatozoïdes.

C'est un protocole simple ou commençant par l'ajout de lécithines de soja combiné au lait et puis, rajouter du glycérol qui a pour rôle de protéger la semence des dégâts tel que la formation des cristaux en glace et le choc osmotique.

Une source d'énergie est administrée sous forme de sucre et l'ajout de Péniciline pour la protection de toutes proliférations bactériennes.

Enfin, l'amélioration des différents paramètres des spermatozoïdes par l'ajout d'antioxydants le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase ( CAT ) et les deux Vitamines A et C.

La semence est maintenue à 4°C lentement refroidi pendant 2hr ensuite Ils seront conditionnés dans des paillettes de 0,5mL.

Après la fin de la durée de réfrigération, les paillettes seront placées dans des vapeurs d'azote pendant 10 minutes. Puis dans l'azote liquide à -196°C jusqu'à leur utilisation.

### **3. Troisième groupe des dilueurs Industriel plus solution tampon :**

Aussi bien pour la conservation à l'état liquide que pour l'état congelé, quatre dilueurs ont été utilisés dont deux conventionnels (lait écrémé et Tris-jaune d'œuf) et deux commerciaux (Andromed et Triladyle). Dans le cas de la semence congelée, le protocole de Colas a été adopté comme conventionnel.

#### **3.1. Conservation à l'état liquide :**

Les dilueurs utilisés sont Tris-jaune d'œuf/ Andromed /Triladyle.

Chaque tube contenant la semence est placé au bain marie à une température de 34-37°C. Après cela la dilution est ajustée pour atteindre une concentration finale de  $0,8 \times 10^9$  spz/ml. Puis maintenus dans une chambre froide à 5°C pendant 1h30min.

#### **3.2. Conservation à l'état congelée :**

similaire à la première conservation, quatre dilueurs ont été utilisés ( Colas/Tris-jaune d'œuf/ Andromed et Triladyl), ensuite,le tube contenant la semence est placé au bain marie à une température de 34-37°C et après cela la dilution est ajustée à une concentration finale de 0,4 milliard de spermatozoïdes par mL. Les tubes sont ensuite placée à 5 °C dans un bécher plein d'eau

Pour le protocole de colas, fractionné en deux, l'un contient du lactose (ajouté avant la mise en équilibration de la semence) et le second à base de lait-glycérole (ajoutée après 45 minutes). La semence est mise en paillettes de 0,25 mL et placées sur un support horizontal 4 cm pendant 9 minutes pour la congélation puis plongés directement dans l'azote liquide (-196°C).

Lors de la décongélation, les paillettes sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant une minute puis placer le contenu de chaque paillette dans un tube contenant 1 ml de dilueur de décongélation.

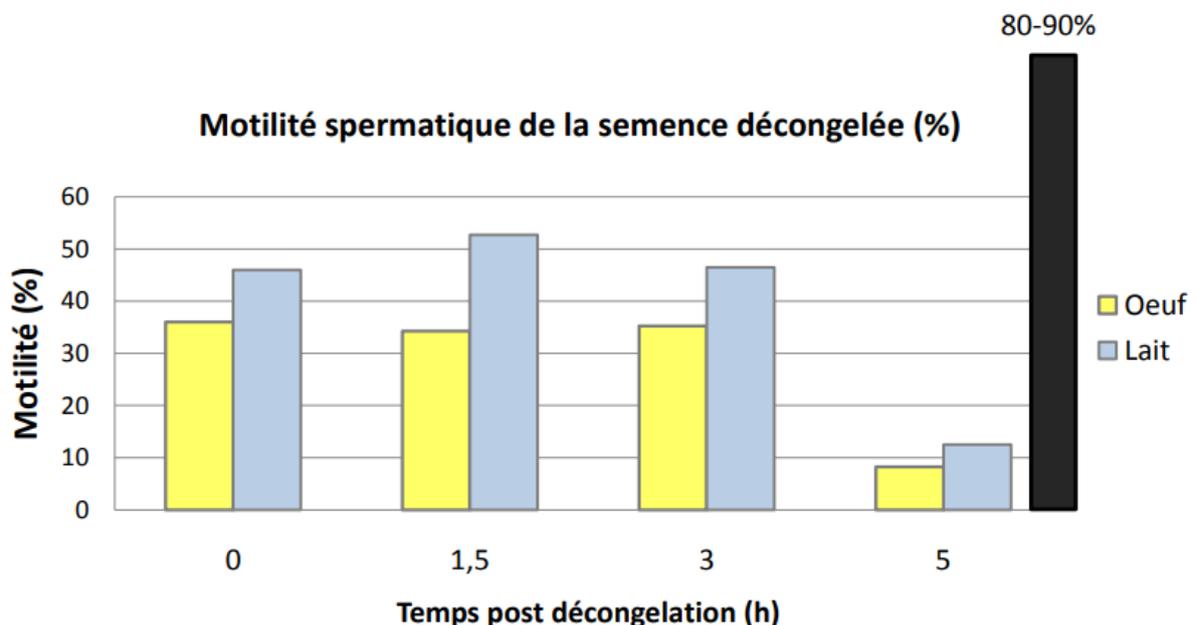
Pour les trois expériences, la mobilité, viabilité et la fertilité des spermatozoïdes à l'aide de l'appariel CASA ont été évalués avant/après décongélation afin de comparer les résultats de cryoconservation.

## Résultat de premier groupe : Dilueurs à base de jaune d'œuf et lait

Les études réalisées par **Lebouef et al (2003)**, **Bailey et al (2011)** **Maher et al (2010)** et **Maher et al (2012)** a eu pour objectif d'évaluer l'effet du jaune d'œuf et le lait sur la semence. Pour bien évaluer la fonction spermatique in vitro selon les essais innovateurs, les résultats ont été les suivants :

### - Motilité :

**Figure 11 : Motilité spermatique de la semence décongelée ( Maher et al en 2010)**



Après calcul, Les résultats ont montré que la cryoconservation a provoqué une chute significative de la motilité, en comparant les résultats avant décongélation (l'état frais) et après et après décongélation

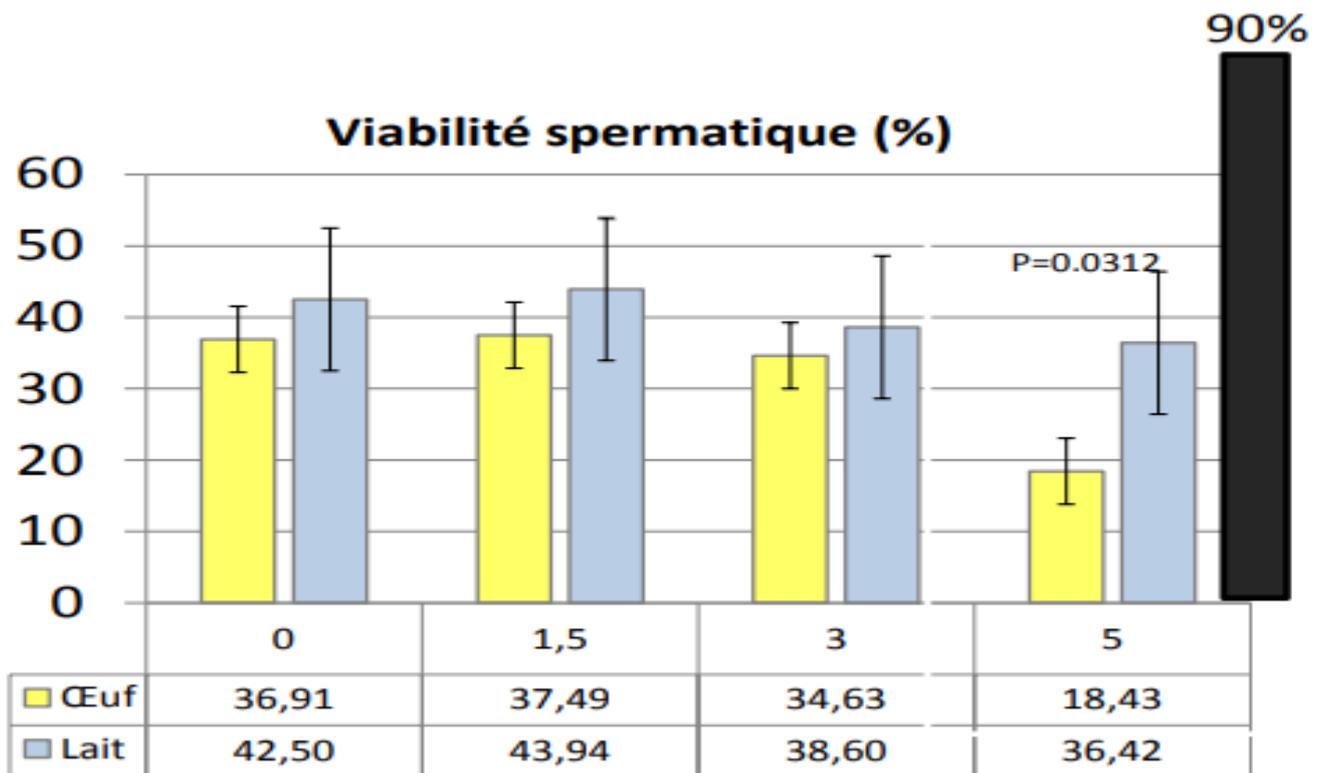
dans les conservateurs à base de jaune d'œuf la Motilité à T0 est de 35%, elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 19%

la même chose concernant de conservateurs à base de lait à T0 la valeur de Motilité obtenue était la plus élevée 45% elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 11%

Par conséquent, les pourcentages de Motilité du lait sont plus élevés que les pourcentages de ces mêmes paramètres chez les autres qui sont à base de jaune d'œuf

- Viabilité :

Figure 12: Viabilité spermatique du bouc ( maher et al en 2010 )



Après calcul, les résultats ont montré que la cryoconservation a provoqué une chute significative de la Viabilité, en comparant les résultats avant décongélation (l'état frais) et après et après décongélation

dans les conservateurs à base de jaune d'œuf la Viabilité à T0 est de 38%, elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 29%

la même chose concernant de conservateurs à base de lait à T0 la valeur de Viabilité obtenue était la plus élevée 42% elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 36%

Ces études sont en accord avec plusieurs autres études qui ont rapporté que le processus de congélation/décongélation est responsable de l'apparition d'un effet défavorable d'une agglutination entre les composants du liquide seminal et le

jaune d'œuf qui joue un rôle important dans L'hydrolyse des phospholipides membranaires et l'altération des spermatozoïdes suite a une liberation de composants toxiques tel que les acides gras insaturés qui peuvent, en effet, modifier la structure membranaire ainsi que celle de l'acide désoxyribonucléique et altérer la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes

### **résultat de deuxième groupe : des dilueurs à base de lécithine de soja**

le jaune d'œuf +lait est le cryoprotecteur le plus couramment utilisé pour les sperme. Cependant, l'exposition à des niveaux élevés est toxique et peut être préjudiciable à la fonction et à la viabilité des spermatozoïdes in utero. Les efforts de recherche se sont donc concentrés sur des cryoprotecteurs alternatifs.

une autre étude faite cette fois ci par **Chunrong et al en 2013 , Tibary et al en 2017 , Mahdid et al en 2013 , benhania et al en 2016 et Bohloolet al en 2014** a portée sur l'analyse du résultat présentée par le nouveau cryoprotecteur a base végétale la lécithine de soja et l'étude aussi du statut oxydatif spermatique chez le bouc et le bélier

les paramètres sont évaluer par l'appariel CASA la mobilité, viabilité pour comparer les résultats de cryoconservation,ainsi avoir une idée d'ensemble sur l'action des nouveaux conservtaeurs a base végétale (lécithine de soja ) et bien que les antioxydants dans la conservation de la semence

#### **- Motilité :**

le tableau suivant va donner les résultats d'analyses par l'appareil casa de Motilité de T0 ( l'état frais ) jusqu'à T100 (après décongélation)

**Tableau VI : Motilité spermatqie de la semance (Naing et al., 2010)**

<b>Temps (T)</b>	<b>Motilité %</b>	<b>Plasma membrane integrity (%)</b>
<b>T0</b>	<b>56.61</b>	<b>41.56</b>
<b>T50</b>	<b>51.61</b>	<b>49.97</b>
<b>T100</b>	<b>49.67</b>	<b>46.86</b>

D'après les résultats, il y avait une interaction entre le liquide séminal et la lécithine de soja sur la motilité des spermatozoïdes ( TABLEAU )

La motilité des spermatozoïdes était plus élevée dans l'état frais T0 que dans T 50 et T 100 une différence significative différence été observée entre T0 et T50 , 51.61 <56.61

En présence de cryoprotecteur , la plus grande motilité des spermatozoïdes a été observée a T50

La motilité des spermatozoïdes est l'un des paramètres les plus importants dans l'évaluation de la qualité du sperme et l'étude de la capacité de fécondation des mâles (**Bravoet al. 2011**).

Par conséquent, la lécithine de soja peut améliorer la cryosurvie des spermatozoïdes béliers en l'absence de jaune d'œuf.

Enfin , Les résultats ont montré que l'utilisation de lécithine de soja a eu un effet souhaitable sur la motilité des spermatozoïdes congelés et décongelés des béliers.

**- Viabilité :**

le tableau suivant va donner les résultats d'analyses par l'appareil casa de Viabilité de T0 ( l'état frais ) jusqu'à T100 (après décongélation

**Tableau VII: viabilité spermatqie de la semance (Naing et al., 2010)**

<b>Temps (T)</b>	<b>Viabilité %</b>	<b>Plasma membrane integrity (%)</b>
T0	54.17	41.56
T50	40.15	49.97
T100	42.55	46.86

D'après les résultats, il y avait une interaction entre le liquide séminal et la lécithine de soja sur la Viabilité des spermatozoïdes ( TABLEAU )

La Viabilité des spermatozoïdes était plus élevée dans l'état frais T0 que dans T 50 et T 100 une différence significative différence été observée entre T0 et T50 , 40.15 <42.55

En présence de cryoprotecteur , la plus grande Viabilité des spermatozoïdes a été observée a T100

La Viabilité des spermatozoïdes est l'un des paramètres les plus importants dans l'évaluation de la qualité du sperme et l'étude de la capacité de fécondation des mâles (Bravoet al. 2011).

Les résultats ont montré que l'utilisation de lécithine de soja a eu un effet souhaitable sur la motilité des spermatozoïdes congelés et décongelés des béliers et boucs

### **l'analyse de statut oxydatif :**

L'objectif d'analyser le statut oxydatif spermatique chez les petits ruminants et une amélioration du sperme de bélier et de bouc grâce à l'ajout de divers antioxydants aux dilueurs.

Les antioxydants tels que le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (Silva et al., 2011; Santiani et al., 2014) ont été utilisées à diverses concentrations pour réduire les dommages acosmiques après décongélation.

quelques résultats sont les suivants :

1- Glutathion ajouter au dilueur à base de lécithine de soja

-aucun avantage n'a été trouvé sur la semence de bouc

-n'a pas eu d'effet bénéfique la semence de bélier

2- Glutathion ajouter en association avec le superoxyde dismutase ou catalase

-a permis d'améliorer la qualité du sperme de bouc

-améliore la qualité des spermatozoïdes et les résultats de la fécondation in vitro chez le bélier

3- vitamines E et C ajoutés ajouter en association avec la Glutathion ,le superoxyde dismutase et la catalase

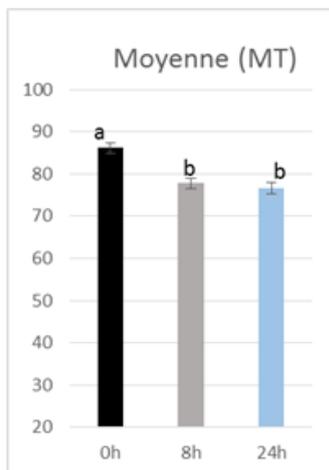
-La qualité du sperme s'est également avérée être améliorée pour les deux boucs et béliers

### 3- résultat le troisième groupe des dilueurs industriel:

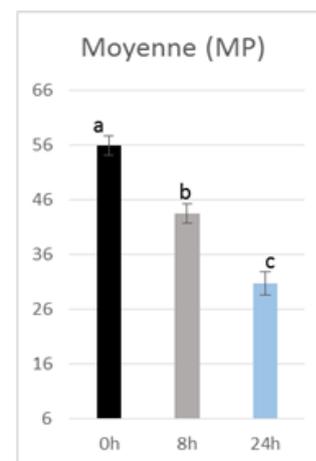
#### I-1 Conservation à l'état frais (5°C) :

##### a)- effet de temps de stockage sur la conservation liquide de sperme

a)- effet de temps de stockage sur la conservation liquide de sperme du bélier INRA 180 Les résultats de la mobilité totale (MT) et progressive (MP) sont représentés sur les figures suivantes :



**Figure 14:** Les valeurs moyennes globale de la MT de sperme conservé à 5 °C après différents temps de stockage (0, 8 et 24h). (EL Amari et al , 2016)

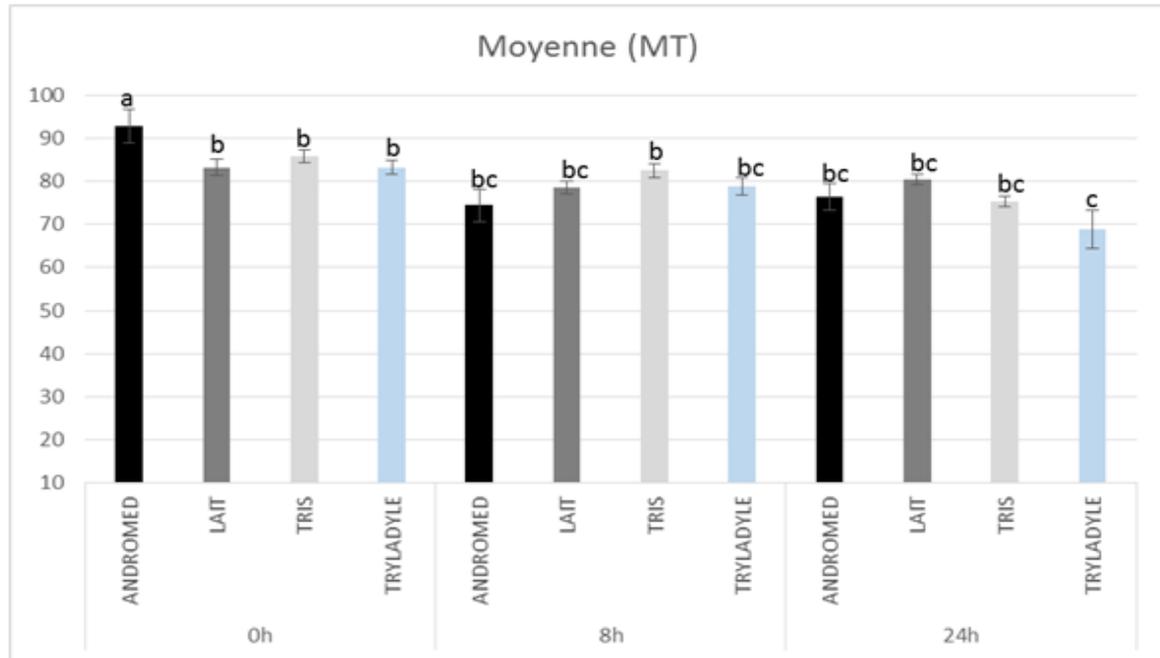


**Figure 13 :** Les valeurs moyennes globale de la MP de sperme conservé à 5 °C après différents temps de stockage (0, 8 et 24h). (EL Amari et al , 2016)

les résultats montrent que tous les paramètres étudiés (MT et MP) diminuent en fonction du temps. La MT montre une diminution significative à partir de 8h mais cette diminution se stabilise entre 8h et à 24h. La MP diminue significativement à partir de 8h et continue à diminuer à 24h.

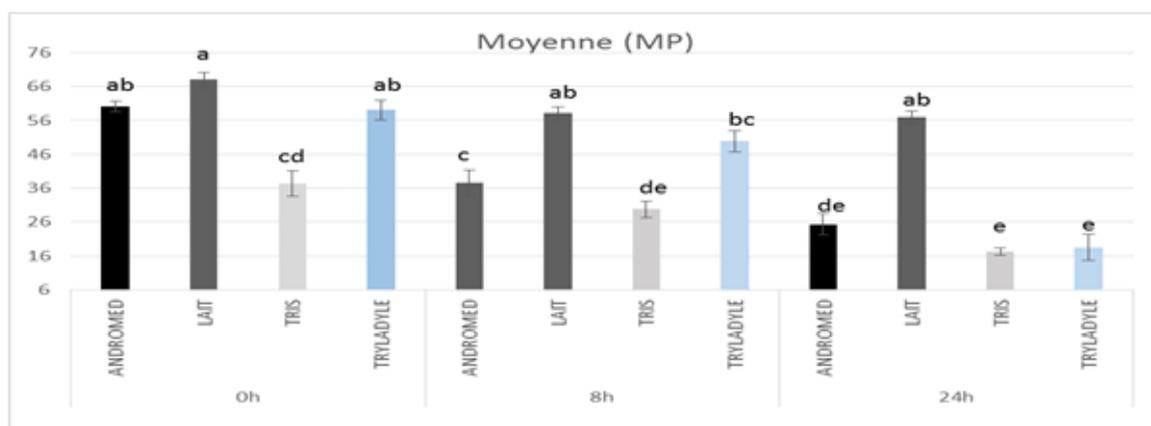
##### b)- effet de temps de stockage et des dilueurs sur la conservation liquide de sperme

L'étude menée par **Amari et al en 2016** , a portée sur l'effet de 5 différents dilueurs , sur la semence de bélier ,Les résultats de la mobilité totale (MT) et progressive (MP) sont représentés sur les figures suivantes :



**Figure 15 : Les valeurs moyennes globales de la MT de sperme conservé et maintenu dans les quatre dilueurs à 5°C après différents temps de stockage (0, 8 et 24h). (EL Amari et al , 2016)**

Les résultats montrent qu' à 0h la MT était maximale pour la semence diluée dans le dilueur commercial andromed avec une valeur de 94% on le compare au lait écrémé, tris jaune d'œuf et au triladyl. Tandis que y'a pas de différences significatives entre les quatre dilueurs après 0h de stockage.



**Figure 16 : Les valeurs moyennes globales de la MP de sperme conservé et maintenu dans les quatre dilueurs à 5 °C après différents temps de stockage (0, 8 et 24h). (EL Amari et al , 2016)**

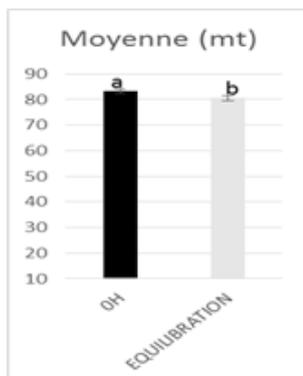
Les résultats montrent que dès le 0h la nature du dilueur affecte significativement la MP. En effet, la motilité progressive la plus élevée a été enregistré en présence du lait écrémé (68%) suivi de Triladyl (60%) et Andromed (60%). Le Tris-jaune d'œuf a montré la MP la plus faible (36%). A 8h de stockage on remarque que la MP la plus élevée a été enregistrée en utilisant le lait écrème et Triladyl. Seul le lait montre des MP convenables après 24h de stockage.

### I-2 Conservation à l'état congelé :

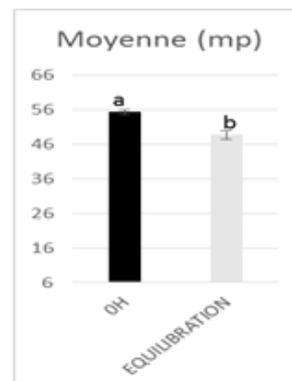
La conservation à l'état congelé comprend deux étapes : équilibration et congélation.

#### Etape d'équilibration

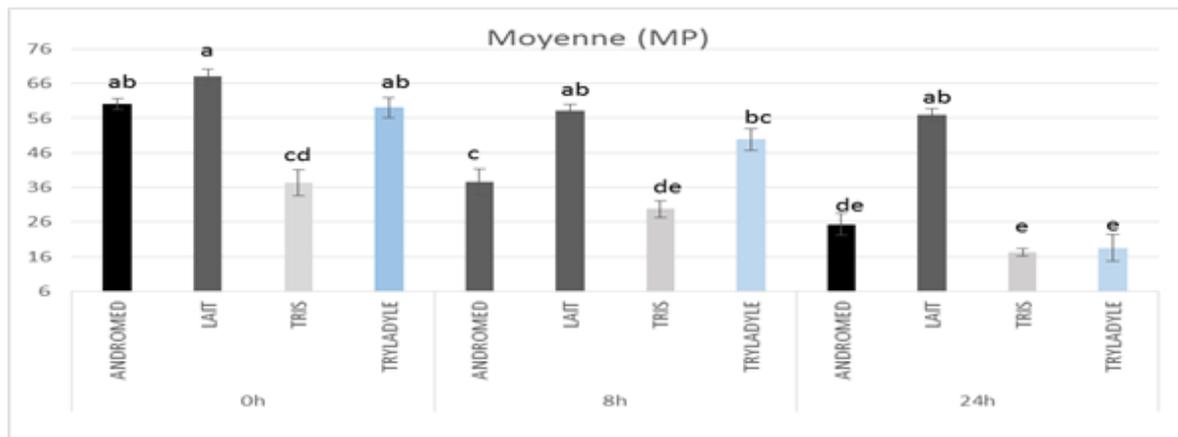
##### a) Effet de temps d'étape sur la conservation liquide de sperme



**Figure 18: Valeurs moyennes globales de la MT de la semence pendant l'étape de l'équilibration. (EL Amari et al , 2016)**



**Figure 17 : Valeurs moyennes globales de la MP de la semence pendant l'étape de l'équilibration. (EL Amari et al , 2016)**

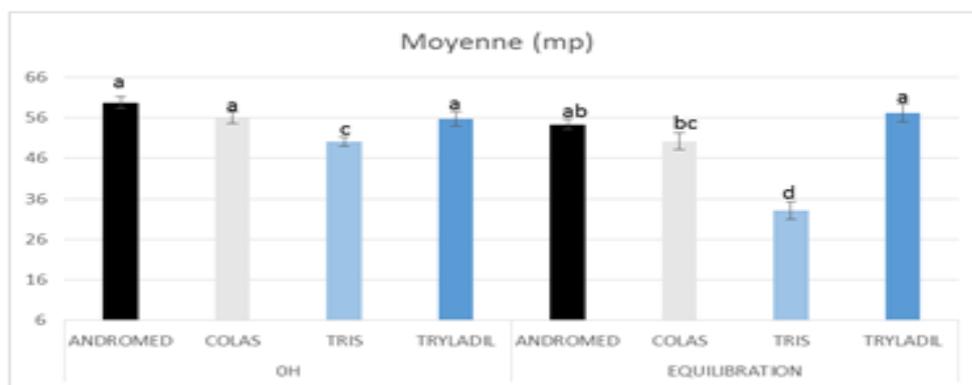


**Figure 19 : Les valeurs moyennes globales de la MT de la semence du dilué dans les 4 dilueurs pendant l'étape de l'équilibration. (EL Amari et al , 2016)**

**b)Effet de temps d'étape et de dilueurs sur la conservation liquide de sperme**

les résultats montrent à 0h que y'a pas de différence de taux de mobilité totale entre les 4 dilueurs, tandis qu'après équilibration la semence diluée dans du Tris jaune d'œuf montre la MT la plus faible (68%)

Pour ce qui est de la MP , nos résultats montre qu'à 0h la dilution de la semence avec du Tris jaune d'œuf montre la valeur la plus faible (48%) en le comparant au Colas (55%), Triladyl (55%) et Andromed (58%). Cependant les trois derniers dilueurs ne montrent aucune différencesignificative. Après équilibration on remarque que le la MP est supérieur pour la semence diluée dans Triladyl en le comparant au Tris jaune d'œuf, Colas et Andromed. Le Tris engendre des valeurs les plus faibles pour la MP.



**Figure 20 : Les valeurs moyennes globales de la MP de la semence diluédans les 4 dilueurs(EL Amari et al , 2016)**

**Tableau VIII: Evaluation des spermatozoides vivants et ceux présentant des anomalies juste après dilution et après équilibration les 4 dilueurs (Colas, Adromed, Triladyl et Tris) (EL Amari et al , 2016)**

TEMPS	0H				EQUILIBRATION			
	ANDROMED	COLAS	TRIS	TRYLADIL	ANDROMED	COLAS	TRIS	TRYLADIL
VIVANT	65,67±1,76a	61,67±1,39b	56,33±2,57e	61,83±2,69b	59±2,16bc	55±2,29d	50,33±1,73e	55,17±2,24d
ANOMALIES	41,83±2,52bc	38,33±1,70d	32,83±2,03e	39,33±2,60cd	46,67±2,18a	43,17±1,50b	37,83±1,68d	44,33±2,60ab

Les résultats montrent qu'à 0h la dilution de la semence avec du Colas et Tryladil ne présente pas de différence pour la viabilité et le taux d'anomalies en les comparant avec Andromed et Tris jaune d'œuf. Après équilibration on remarque que le pourcentage des vivants diminue et des anomalies augmentent pour les 4 dilueurs tandis qu'il n'y a pas de différence entre la semence diluée dans du Colas et Tryladil en les comparant avec Andromed et Tris jaune d'œuf.

## DISSCUSION

L'objectif de cette revue bibliographique de 20 articles scientifiques, été d'étudier la conservation de sperme des petits ruminants à l'état frais et congelé dans des dilueurs d'origine différent à savoir jaune d'œuf ,le lait (lait écrémé ou dilueur Colas), le jaune d'œuf (tris jaunes d'œuf et Triladyl) et l (Andromed), ainsi que le dilueur a base végétale la lécithine de soja Toute en mettant le point sur l'effet de de ses dernier sur la viabilité et la motilité des spermatozoïde

dans un premier temps, les impacts de deux protocoles de congélation de la semence de bouc on utilisant des diluants à base de jaune d'œuf ou de lait sur la qualité de la semence décongelée , La semence a été analysée de 0 à 5 h après sa décongélation. Afin de comparer l'impact du protocole de congélation sur son pouvoir de mobilité et survie

Les résultats ont démontré une tendance favorable au diluant à base de lait. La viabilité et la mobilité de la semence congelée dans le lait est supérieure à la semence congelée dans le jaune d'œuf . La qualité de la semence congelée permet d'expliquer les taux des paramètres obtenus. La semence congelée dans le lait montre une meilleure motilité, viabilité, à différents temps entre 0 et 5 h après décongélation. Ainsi, le protocole de congélation à base de lait permet une meilleure conservation de la qualité de semence des boucs et bélier que le protocole à base de jaune d'œuf. Une grande variabilité de fertilité entre les mâles a également été observée,

contrairement au deuxieme protocole , L'objectif été d'étudier la conservation de sperme de bélier à l'état frais (5°C) et congelé dans quatre dilueurs d'origine différent à savoir le lait (lait écrémé ou dilueur Colas), le jaune d'œuf (tris jaunes d'œuf et Triladyl) et le soja lécithine (Andromed).

il a été prouvé que a l'état liquide le temps de stockage a négativement influencé la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes . Cela pourra être les résultats de plusieurs facteurs à savoir le degré d'oxydation de sperme conservé, dû à la formation des radicaux libre ,des interactions entre la membrane des spermatozoïdes et quelques composantes de plasma séminale, citant une protéine BUSP60 qui joue un rôle diphasique (appeler l'alpha 2 glycoprotéine zinc), qui induit

une diminution de la mobilité après 24h de stockage on a constaté que le pourcentage de la mobilité des spz était plus élevé pour le lait que celui obtenu par les 3 autres dilueurs : Tris jaune d'œuf, Andromed et Tryladil. Même si cela n'a été remarqué qu'à niveau de motilité progressive, vu que ce dernier paramètre est considéré jusqu'à maintenant le paramètre le plus corrélé avec la fertilité des spermatozoïdes. On ce qui concerne le Tris jaune d'œuf il n'a pas affiché de bons résultats en motilité progressive. Chose qui pourrait être dû à sa forte viscosité et qui peut limiter la mobilité libre des spz, alors qu'au niveau de motilité totale le Tris avait la même cadence que celle des autre dilueurs. Chose qui peut expliquer que le jaune d'œuf n'avait pas un effet néfaste sur la viabilité des spermatozoïdes. Or les deux dilueurs TRYLADIL et ANDROMED présente des inefficiences qui peuvent être à la présence du glycérol, qui est un cryoprotecteur et agent toxique pour les spz s'il est dans le milieu une durée plus longue que celle de l'équilibration (2h-4h)

Le temps d'équilibration permet aux cellules spermatiques d'échanger avec le milieu externe. La sortie de l'eau vers le milieu externe et l'entrée du glycérol qui protégera la membrane plasmique des cristaux formés lors de la congélation (Batista et al., 2009). Après cette dernière étape, les 3 dilueurs Colas, Tryladil et Andromed semblent donner des meilleurs résultats en ce qui concerne la mobilité totale et progressive et viabilité.

En ce qui concerne le troisième protocole de nouveau dilueur a base végétale (lécithine de soja) , il a été démontré que Le choc froid détruit également la pénétrabilité sélective de la membrane des spermatozoïdes au calcium, ce qui conduit à la nécrose ,l'ajout de cryoconservateur aux spermatozoïdes congelés diminue les niveaux de calcium intracellulaire dans les spermatozoïdes congelés par rapport aux spermatozoïdes fraîchement éjaculés Cela montre que la lécithine de soja n'a pas seulement amélioré les caractéristiques physiologiques des spermatozoïdes lors du processus de processus de congélation mais a également eu un effet significatif sur la modulant les molécules de signalisation intracellulaire

Une autre raison importante de l'augmentation de la motilité des spermatozoïdes des bélier est le fait qu'il provoque une réduction du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène. qu'il entraîne une réduction du peroxyde d'hydrogène et de la peroxydation lipidique

Cette revue a montré l'efficacité de constituants d'origine végétale ( lécithine de soja ) testée durant la conservation des spermatozoïdes. aussi l'ajout des antioxydants tels que le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) , vitamine E , vitamine C qui ont été utilisées à diverses concentrations pour réduire les dommages acosmiques après décongélation, et améliore la motilité et la viabilité des spermatozoïdes de bouc et bélier , Les résultats présentés dans ce travail révèlent l'importance de glutathion , la superoxyde dismutase , catalase, vitamine E et C et le rôle qu'elle joue dans la lutte contre le stress oxydatif, cependant les activités de recherche à envisager dans le futur seraient d'explorer l'intérêt d'associer la vitamine E à d'autre molécule connues pour leur action antioxydante.

Enfin, la lécithine de soja peut remplacer les conservateurs traditionnels tel que le jaune d'œuf et le lait, et les conservateurs commerciaux tel que le Triladyl, Andromed , et le golas lors de la conservation de spermatozoïdes de petits ruminants .

Ce travail a permis d'avoir une idée sur les dilueurs efficaces soit en frais ou en congelé sur la qualité des semences des boucs et béliers ainsi que leur conservation. Néanmoins il est nécessaire d'approfondir les recherches sur le comportement de la semence dans chaque dilueurs à chaque état de conservation. De plus il faudrait utiliser d'autres dilueurs de différente origine, ainsi que d'autres tests de qualité de sperme

Les résultats ne représentent qu'un début d'un large programme de conservation, et d'autre ajustement doivent être apporté, que ce soit au niveau technique (conservation de la semence et amélioration par d'autre substance) ou au niveau schéma expérimentale (augmenter le nombre d'échantillon et le nombre d'interaction), afin de mieux valoriser ce travail et sortir avec des recommandations concernant l'utilisation de meilleur dilueur

## CONCLUSION :

La cryoconservation est une technique de conservation de la semence de plus en plus utilisée de nos jours chez les petits ruminants .Néanmoins, c'est aussi un processus entraînant de nombreux effets néfastes sur les spermatozoïdes notamment des dégâts au niveau de la membrane plasmique, des protéines et de l'ADN dû au stress oxydatif et qui peuvent nuire à la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes. De nombreux protocoles de cryoconservation sont proposés dans la littérature afin de diminuer les effets négatifs.

Notre travail a eu pour but d'étudier l'effet supposé de différent dilueur a savoir jaune d'œuf ,le lait (lait écrémé ou dilueur Colas), le jaune d'œuf (tris jaunes d'œuf et Triladyl) et I (Andromed), ainsi que le dilueur a base végétale la lécithine de soja sur les caractéristiques des spermatozoïdes après avoir subi une formation de cristaux en glace, un choc thermique et un stress oxydatif provoqué par la cryoconservation. D'autres parts, nous avons étudié l'impact que peut avoir les antioxydants composant le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) , vitamine E , vitamine C sur les paramètres des spermatozoïdes.

Les résultats auxquels nous sommes arrivés après revu des documentations scientifiques traitant de ce sujet ont été encourageants. En effet, nous avons pu constater que la cryoconservation a un effet délétère sur les spermatozoïdes comme l'ont démontré par le passé de nombreuses études

Les résultats de ce travail nécessitent d'être confirmés par d'autres travaux portant à la mise en pratique ,Si de telles études confirmaient que la lécithine de soja avait un effet bénéfique sur les spermatozoïdes, il serait alors nécessaire, avant de mettre en application cette technique, de réaliser des inséminations artificielles pour déterminer si les taux de gestation obtenus seraient satisfaisants

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Abed taoues en (2019)** , evaluation de la qualité spermatique chez l'espèce caprin dans la région de Béjaia
- Andersen, K. (1969)**.Insemination with frozen semen in goats. Eur. Ass. Anim. Prod. Meeting 2: 23-26
- A.Tibary et Manar en (2017)**. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants
- Benzeghiba Zakari et Benyaya Khadidja en (2020)**, Effet du pollen de Phoenix Dactylifera L dans la cryoconservation de la semence canine
- B.leboeuf et B. Restall et S. salamon en (2008)** , Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle
- B.leboeuf et B. Restall et S. salamon INRA Prod. Anim., (2003)**, 16 (2), 91-99  
Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle
- B.leboeuf et B. Restall et S. salamon en (2008)**, Production and storage of goat semen for artificial insemination
- Chunrong et Guoquan et Qionghua Hong et Guobo Quan en (2018)** ,  
Spermatozoa Cryopreservation State of Art and Future in Small Ruminants
- Dr. B. EL Amiri et Pr. K. Essamadi , en (2016)**, INVESTIGATION SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE EN LIQUIDE ET EN CONGEELEE CHEZ LE BELIER DE LA RACE INRA180
- Meyer Christian ©Cirad. Citer : Meyer C.,( 2008)**, La reproduction des ovins, des caprins. support de cours pour le Master 2 PARC (Productions Animales en Régions chaudes). 8e édition, 42 p.
- Fabrice et Benoît et Guillaume Rigal en(2008)** , COMPARAISON DE LA QUALITDE LA SEMENCE DE TAUREAUX COLLECTES A L'ELECTRO-EJACULATEUR OU AU VAGIN ARTIFICIEL
- Geneviève Maher ( 2010)**, CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE DE BOUC

- Geneviève Maher (2012)**, Comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insémination artificielle chez la chèvre
  
- Janice Bailey, Professeur, Université Laval (Chargé de projet) en (2011)** , Développer une expertise en cryoconservation de la semence adaptée aux besoins de l'industrie caprine québécoise
  
- Karim Benhenia Ali Lamara Sofiane Fatmi Mokranelguer-Ouada en (2016)**, Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen
  
- Laure Gauliard en (2008)** , la congélation de la semence de chat domestique : étude bibliographique et expérimentale
  
- Marie-France Lusignan, (2011)** , Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait
  
- Meskini Zakaria ( 2017 )** l'insemination artificielle chez les caprins de la race arbia dans la région de Tiart
  
- R. Boukhlik et K. EL allalil et A. Tibay en (2017)** , Anatomie et examen échographique des organes génitaux chez le bélier et le bouc
  
- Zemmouchi . R et Tebaili .I en 2016**, essai de conservation optimale de la semence bovin utilisation de certains des lions à base d'un produit biologique très bien
  
- Zh. BohloolA, M. MohammadiA, M. Roostaei-Ali MehrA and N. Ghavi Hossein-Zadeh en ( 2014 )** , Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents

## ANNEXE :

**TABLEAU IX : Techniques de collecte de sperme chez le bélier et le bouc**

<i>Auteur</i>	<i>Matériel</i>	<i>Le principe de la technique de collecte de sperme</i>
<i>Fabrice Et Benois , (2008)</i>	Vagin artificiel	-Les vagins artificiels sont maintenus dans une étuve à une température de 45°C
<i>MEYER et al.(2008)</i>		-L'intérieur du vagin est lubrifié avec de la vaseline ou un gel gynécologique.
<i>ABAD et al.(2019)</i>		Lorsque le bouc s'approche pour saillir, l'opérateur intercale le vagin dans le prolongement du pénis et dévie légèrement avec l'autre main le pénis du bouc ou bélier.
<i>EL AMIRI et al.(2016)</i>		-Agitation du vagin pour faire descendre l'éjaculat
<i>HAYE et al.(2004)</i>		
<i>DJOUABi. (2016)</i>		

**TABLEAU X : Protocoles de cryoconservation de la semence chez le bouc et le bélier**

<i>Nom d'auteur</i>	<i>La technique utilisée</i>	<i>Les résultats</i>
<p><i>Mahar Et al.2012</i></p> <p><i>Leboeuf et al.2003</i></p>	<p>Comparaison de deux protocoles de cryoconservation chez le bouc</p> <p><b>Protocole 1 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1<sup>ère</sup> centrifugation 15min</li> <li>- 2<sup>ème</sup> centrifugation 15min</li> <li>-Dilueurs lait sans glycérol +lait avec glycérol</li> <li>- Conservation 1h30 à 4°C</li> <li>- Congélation dans l'azote liquide -198°C</li> <li>- décongelaion</li> </ul> <p><b>Protocole 2 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ajout de tompn : tris + l'acide citrique</li> <li>-Ajout de diluant a base de jaune d'œuf 18%</li> <li>ajout du glycérol</li> <li>- Conservation à 4°C</li> <li>- congélation dans l'azote liquide -198°C</li> </ul>	<p>Après la décongélation de la semence dans un bain-marie à 37°C pendant 30 sec</p> <p>Les paramètres de la semence sont analysés par le Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)</p> <p><b>Mobilité :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>conservateur a base de jaune d'œuf</b> : a T0 est de 35%, elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 19%</li> <li>-<b>conservateurs à base de lait</b> : a T0 la valeur de Motilité obtenu était la plus élevée 45% elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 11%</li> </ul> <p><b>Viabilité :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>conservateur a base de jaune d'œuf I</b> : a T0 est de 38%, elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 29%</li> <li>- <b>conservateurs à base de lait</b> : a T0 la valeur de Viabilité obtenu était la plus élevée 42% elle commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre T5 avec 36%</li> </ul>
<p><i>Tibary et al.2017</i></p>	<p>-Ajout du dilueur qui contient Un Cryoprotecteur non pénétrant à base des</p>	<p>Après la décongélation de la semence, l'analyse est réalisé au CASA</p> <p><b>Mobilité :</b></p>

<i>Lusignan et al.2011</i>	<p>lécithines de soja combiné au lait</p> <p>Un Cryoprotecteur pénétrant le glycérol</p>	<p>D'après les résultats, il y avait une interaction entre le liquide séminal et la lécithine de soja sur la motilité des spermatozoïdes</p>
<i>Chunrong et al.2018</i>	<p>-Ajout des tampons: l'acide citrique et le Tris.</p>	<p>La motilité des spermatozoïdes était plus élevée dans l'état frais T0 que dans T 50 et T 100 une différence significative différence été observée</p>
<i>Mahdid et al.2013</i>	<p>-Ajout de glucose</p> <p>-ajout d'antibiotique : La péniciline</p>	<p>entre T0 et T50 , 51.61 &lt;56.61</p> <p>En présence de cryoprotecteur , la plus grande motilité des spermatozoïdes a été observée a T50</p>
<i>Leboeuf et al.2003</i>	<p>-Ajout des anti-oxydants qui sont les suivants :</p> <p>Le glutathion</p> <p>Super oxyde dismutas</p> <p>La catalase</p> <p>Vitamine C et E</p> <p>-maintenue à 4°C lentement refroidi pendant 2hr</p> <p>- Conditionnement dans des paillettes de 0,5mL</p> <p>- congélation placées dans des vapeurs d'azote pendant 10 minutes. Puis dans l'azote liquide à -196°C</p> <p>8- Décongélation : dans un bain-marie à 37°C pendant une minute</p>	<p>La motilité des spermatozoïdes est l'un des paramètres les plus importants dans l'évaluation de la qualité du sperme et l'étude de la capacité de fécondation des mâles</p> <p><b>Viabilité :</b></p> <p>des spermatozoïdes était plus élevée dans l'état frais T0 que dans T 50 et T 100 une différence significative différence été observée entre T0 et T50 , 40.15 &lt;42.55</p> <p>En présence de cryoprotecteur , la plus grande Viabilité des spermatozoïdes a été observée a T100</p> <p>La Viabilité des spermatozoïdes est l'un des paramètres les plus importants dans l'évaluation de la qualité du sperme et l'étude de la capacité de fécondation des mâles</p>
<i>Elbarra et al.2016</i>	<p><b>1-conservation à l'état liquide :</b></p> <p>-quatre dilueurs ont été utilisés (lait écrémé /Tris-jaune d'œuf) (Andromed /Triladyle)</p>	<p><b>1. Résultats de l'état liquide :</b></p> <p>Les résultats montrent que tous les paramètres étudiés (MT et MP) diminuent en fonction du temps : l'évaluation est réalisée à 0h, 8h, 24h</p>
<i>Akhter et al.2010</i>		

- le tube contenant la semence est placé au bain-marie à une température de 34-37°C

- la dilution est ajustée pour atteindre une concentration finale de  $0,8 \times 10^9$  spz/ml

-conserver a 5°C dans un incubateur à température réglable et 15°C dans un réfrigérateur

## 2- Conservation à l'état congelée :

Les dilueurs utilisés : Colas, Tris-jaune d'œuf, Andromed et Triladyl.

- diluée à une concentration finale de 0,4 milliard de spermatozoïdes par mL

- le tube contenant la semence est placé au bain-marie à une température de 34-37°C

- placée à 5 °C dans un bécher plein d'eau)

- Pour le protocole de colas, fractionné en deux dilueurs :

**a- le premier à base de lactose** (ajouté avant la mise en équilibration de la semence)

**b- le second à base de lait-glycérole** (ajoutée après 45 minutes.)

Les résultats montrent qu' à 0h la MT était maximale pour la semence diluée dans le dilueur comercial andormed avec une valeur de 94% on le comparant au lait écrémé, Tris jaune d'œuf et au triladyl.

Tandis qu'il n'y a pas de différences significative entre les quatre dilieurs après 0h de stockage

Les résultats montrent que dès le 0h la nature du dilueur affecte significativement la MP.

En effet, la motilité progressive la plus élevée a été enregistré en présence du lait écrémé (68%) suivi de Triladyl (60%) et Andromed (60%). Le Tris-jaune d'œuf a montré la MP la plus faible (36%).

A 8h de stockage on remarque que la MP la plus élevée a été enregistrée en utilisant le lait écrème et Triladyl. Seul le lait montre des MP convenables après 24h de stockage.

**Tableau XI : Pourcentage des vivants et des anomalies pendant l'étape de l'équilibration**

## 2- résultats de l'état congelé :

Les résultats montrent qu'il n' y a pas de différence

TEMPS	0H	EQUILIBRATION
VIVANT %	61,38±1,22 <sup>a</sup>	54,88±1,18 <sup>b</sup>
ANOMALIES%	38,08±1,25 <sup>a</sup>	43±1,17 <sup>b</sup>

entre les 4 dilueurs à **0H**.

-Après congélation le pourcentage de la mobilité progressive de la semence dilué dans Andromed et Colas a été affecté avec un taux très faible (18%) et

- la semence est mise en (20%) en le comparant avec Triladyl (27%) Tris paillettes de 0,25 mL jaune d'œuf était maximale (34%).
- les paillettes sont placées Concernant la viabilité et les anomalies : sur un support horizontal à **0h** il n'y a aucune différence entre les 4 dilueurs, pour la congélation. - pour l'intégrité de la membrane y'a de différence
- sont placées à un niveau entre la semence dilué dans Tryladil et Tris jaune de 4 cm pendant 9 minutes d'œuf en le comparant avec Colas et Andromed.
- les plonger directement **Après décongélation** dans l'azote liquide (-196). - le taux de viabilité a diminué significativement mais ne présente pas de différence entre les 4 dilueurs, - les anomalies ont diminué significativement mais la semence dilué dans Tryladil et Andromed ne présente pas de différence en la comparant avec Colas et Tris jaune d'œuf.

### **Control de la qualité de la semence : (post-décongélation)**

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de différentes semences. Le tableau 13 montre les résultats de contrôle de la qualité de la semence après décongélation par analyse des paramètres classiques.

**Tableau XII : Control de qualité de la semence**

<i>AUTEURS</i>	<i>RESULTATS</i>	<i>CONTROL DE QUALITE</i>
Mahar Et al.2010	- Les processus de congélation et de décongélation du sperme étaient les mêmes pour les protocoles de cryoconservation à base de jaune d'œuf et de lait. La décongélation a été effectuée en immergeant les pailles congelées dans de l'eau chaude (37°C) pendant 30 secondes.	-Les dommages causés par les "choc froid" le stress osmotique et la cristallisation intracellulaire. - L'enzyme de coagulation du jaune d'œuf (EYCE), présent dans le plasma séminal de bouc donne une mauvaise qualité du sperme
Leboeuf Et al.2003	- Les taux de gestation ont révélé une	

	<p>tendance du protocole à base de lait, avec un meilleur taux de viabilité</p> <p>- En conclusion, la qualité des spermatozoïdes (motilité, viabilité) est optimale en utilisant un protocole à base de lait par rapport à un protocole à base de jaune d'œuf.</p>	<p>Qui est due non seulement aux lésions, mais aussi à la grande quantité de lysolécithine présente.</p>
Tibary Et al. 2017	<p>Cette nouvelle technique a été utilisée avec succès</p> <p>Les résultats obtenus ont été satisfaisants</p>	<p>-l'analyse des spermatozoïdes assistée par (CASA) a donné une meilleur qualité de sperme.</p>
Lusignan et al.2011	<p>- grâce à de meilleurs dilueurs à base végétale la réduction du stress oxydatif par l'ajout de quatre antioxydants ont été utilisés avec succès.</p>	<p>- Amélioration de la viabilité post-décongélation</p> <p>-Effet positif sur la mortalité du sperme</p> <p>-Taux de viabilité &gt; 80%</p> <p>- Effet positif sur la mobilité du sperme : mobilité &gt;80% qui signifie une excellente mobilité</p>
Chunrong et al.2018		
Mahdid Et al.2013		
Leboeuf et al.2003		
Elbarrak et al.2016	<p>-Des interactions entre la membrane des spermatozoïdes et l'enzyme EYCE et la protéine BUSpg60, affectent négativement les résultats obtenus.</p>	<p>En ce qui concerne l'équilibration tous les paramètres de qualité de sperme testé à ce niveau ont été affectés négativement à savoir la</p>
Akhter et al .2010	<p>-Une centrifugation préalable de la semence permet de réduire l'impact de ces interférences.</p>	<p>motilité, la viabilité et la morphologie. Même chose a été constatée après décongélation.</p>
Soleilhavo et al .2014	<p>-La qualité du sperme est réduite en raison d'un choc à froid et le stress osmotique au cours du processus d'équilibration-congélation-décongélation.</p>	<p>-Le pourcentage de la mobilité était plus élevé pour le lait que celui obtenu par les 3 autres dilueurs.</p>

**Tableau XIII : Résultats d'analyse du statut oxydatif spermatique**

<i>Auteurs</i>	<i>Antioxydant utilisé</i>	<i>Résultat</i>
<i>Cirit et al.2013</i>	Glutathion ajouté au dilueur à base de lécithine de soja	aucun avantage n'a été trouvé sur la semence de bouc
<i>Salmani et al, 2013</i>		n'a pas eu d'effet bénéfique la semence de bélier
<i>Camara et al.2011</i>	Glutathion, superoxyde dismutase ou catalase	a permis d'améliorer la qualité du sperme de bouc
<i>Mata-Campuzano et al. 2015</i>		améliore la qualité des spermatozoïdes et les résultats de la fécondation in vitro chez le bélier
<i>Gangwar et al.2015</i>	vitamines E et C	La qualité du sperme s'est également avérée être améliorée