

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - 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

Option : Biologie et physiologie de la reproduction

Thème :

**Effet de la méthode de dégellement sur la mobilité et la
viabilité du sperme congelé dans les paillettes
d'insémination artificielle caprine**

Présenté par :

Soutenu le : 18/07/2022

BELHENNICHE IBRAHIM

BOUGUELMANI AMINA

Devant le jury :

BESSAD M

MCA/SNV-U.BLIDA1

Président

LARBI DOUKARA K

MCA/SNV-U.BLIDA1

Examineur

BESBACI M

MCA/ISV -U.BLIDA1

Promoteur

Abdelli A

MCA/SNV-U.BOUIRA

Co-promoteur

Promotion : 2021-2022



Dédicaces

Je dédie ce travail à tous les membres de ma famille

A tous mes professeurs à toutes les étapes de mes études

A tous mes amis

A tous les chercheurs et les penseurs

À tous ceux qui m'ont soutenu ou ont prié pour moi

Je demande au Allah de nous aider et de vous guider vers ce qu'il aime et ce dont il est satisfait en termes de paroles et d'actes.

BELENNICHE IBRAHIM



Dédicaces

Je dédie ce simple travail

A MES TRÈS CHERS PARENTS,

Pour leur soutien que vous m'apportez depuis mon enfance,
Pour leur tendresse, encouragement, et confiance qu'ils m'ont toujours accordée,
Je me suis arrivé à ce niveau grâce à vous, je vous aime de tout mon cœur,
Que dieu vous accorde la santé et la longue vie.

A MES CHERS SCEURS ET FRÈRES,

LAMIA, Med AMINE, LOUBNA, MAROUANE et ANISS AYMEN,

Pour leurs soutiens dans les moments difficiles,
Pour tout le temps qu'on a passé ensemble,

A MES MEILLEURS AMIS PROCHES,

Pour les beaux souvenirs inoubliables, et les meilleurs instants qu'on a passés
ensemble pendant 5 ans d'études, qui m'ont permis d'aimer ces derniers,
Je vous souhaite une très bonne continuation dans ce chemin et qu'il soit lié quoi
qu'il arrive.

B. AMINA

Remerciements

On remercie en premier lieu Dieu de nous avoir aidés à réaliser ce travail.

*On tient à remercier grandement M. **Besbaci M**, notre promoteur pour sa grande disponibilité, sa gentillesse et ses précieux conseils, ainsi que pour le temps consacré au suivi tout au long de la réalisation de cette étude.*

*On remercie aussi M. **Abdeli A**, notre co-promoteur, qui a accepté de faire partie de notre travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi, M. **Larbi Doukara K** qui a aimablement accepté de faire partir de ce jury.*

*Nos remerciements à M. **Bessad M** qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de nos jurys de PFE. En effet, ce fut un honneur pour nous d'étudier avec le professeur dont la présence était comme un champ magnétique B0 dirigeant nos cerveaux vers le chemin par lequel les spins de nos pensées acquièrent des valeurs qui peuvent être exploitées pour clarifier l'image du chemin vers le futur.*

Nos remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.

On remercie aussi les membres du laboratoire de biotechnologie de reproduction animale (LBRA) de l'INSVB pour les équipements mis à notre disposition.

Enfin nous remercions toute personne qui nous a aidés de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'insémination artificielle, se base généralement sur l'utilisation du sperme congelé dans des paillettes cryoconservées dans l'azote liquide. Le dégivrage de ces paillettes nécessite des méthodes appropriées. Le but de l'étude était d'évaluer l'effet des différentes méthodes de dégeléement sur la motilité et la viabilité de la semence caprine, afin d'adopter la méthode la plus pratique pour conserver les qualités spermatiques. Nous avons décongelé des paillettes du sperme caprin par quatre (04) méthodes différentes : à 37°C, à 50°C, à 70°C et à l'air chaud. La semence a été analysée par le système CASA. Nos principaux résultats sont la détermination de l'existence d'un effet significatif de la méthode de décongélation sur la mobilité et la vitalité de la semence, et juger la méthode la plus fiable. D'une part, La méthode de décongélation à 50°C a donné des meilleurs résultats concernant la mobilité massale et la vitalité du sperme caprine. D'autre part, La méthode de décongélation à 70°C était plus performante en ce qui concerne la mobilité progressive et les paramètres dynamiques. A la fin de cette étude, la méthode qui semble la plus pratique c'est la décongélation à 70°C pendant 5s.

Mots clés : sperme, paillettes d'I.A, dégeléement, casa, mobilité massale, vitalité du sperme, mobilité progressive.

ملخص

يعتمد التلقيح الاصطناعي بشكل عام على استخدام الحيوانات المنوية المجمدة في القش المبردة المحفوظة في النيتروجين السائل. يتطلب إزالة الجليد عن هذه الرقائق طرقاً مناسبة. كان الهدف من الدراسة هو تقييم تأثير طرق التذويب المختلفة على حركة وحيوية السائل المنوي للماعز ، من أجل تبني الطريقة الأكثر عملية للحفاظ على صفات الحيوانات المنوية. قمنا بإذابة تجميد الحيوانات المنوية من الماعز بأربع (04) طرق مختلفة : عند 37 درجة مئوية و 50 درجة مئوية و 70 درجة مئوية والهواء الساخن. تم تحليل السائل المنوي بواسطة نظام CASA. نتائجا الرئيسية هي تحديد وجود تأثير كبير لطريقة التذويب على حركية السائل المنوي وحيويته، والحكم على الطريقة الأكثر موثوقية. من ناحية، أعطت طريقة التذويب عند 50 درجة مئوية نتائج أفضل فيما يتعلق بالحركة الكلية وصلاحية الحيوانات المنوية للماعز. من ناحية أخرى، كان أداء طريقة الذوبان عند 70 درجة مئوية أفضل فيما يتعلق بالتنقل التدريجي والخصائص الديناميكية. في نهاية هذه الدراسة ، يبدو أن الطريقة الأكثر عملية هي إذابة الثلج عند 70 درجة مئوية لمدة 5 ثوان.

الكلمات المفتاحية : الحيوانات المنوية ، التلقيح الاصطناعي ، رقائق السائل المنوي ، تذويب السائل المنوي، CASA، حركية السائل المنوي، حيوية السائل المنوي، التنقل التدريجي.

Abstract

Artificial insemination is generally based on the use of sperm frozen in straws cryopreserved in liquid nitrogen. De-icing these straws requires appropriate methods. The aim of the study was to evaluate the effect of different thawing methods on the motility and vitality of goat semen, in order to adopt the most practical method to preserve sperm qualities. We thawed goat sperm straws by four (04) different methods: at 37°C, 50°C, 70°C and hot air. The semen was analyzed by the CASA system. Our main results are the determination of the existence of a significant effect of the thawing method on the mobility and vitality of the semen, and judge the most reliable method. On the one hand, the method of thawing at 50°C gave better results concerning the total motility and the viability of goat sperm. On the other hand, the 70°C thawing method performed better with respect to progressive mobility and dynamic parameters. At the end of this study, the method that seems the most practical is thawing at 70°C for 5s.

Keywords: sperm, A.I straws, thawing, casa, total mobility, sperm vitality, progressive mobility.

Liste des figures

Figure 1: structure du spermatozoïde (CRDC, 2009).....	17
Figure 2 : Variations saisonnières du volume de l'éjaculat et de sa concentration en spermatozoïdes chez cinq boucs alpin, m ± sem (Corteel, 1977).	21
Figure 3: Hématimètre : cellule de Malassez (Hanzen, 2016).	22
Figure 4: Variation mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Corteel, 1977).	27
Figure 5: Classification des différentes anomalies spermatiques (Dumont, 1997).	29
Figure 6: Variations mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après dilution, refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Leboeuf et al, 2003) (adapté de Corteel, 1977).	39
Figure 7: Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (A), position probable sur la prochaine image (B), complications possibles lorsque plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone de probabilité (Mortimer, 2000).	42
Figure 8: Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde. Les points sont alors reliés pour obtenir la reconstruction de la trajectoire (Mortimer, 2000).	42
Figure 9: Numérisation par le CASA et reconstructions des trajectoires des spermatozoïdes. Différences entre les trajectoires en lien avec les différences dans le battement flagellaire (Mortimer, 2000).	43
Figure 10: Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (manuel de l'OMS, 2010).	44
Figure 11: Trajectoires d'un même spz à deux fréquences d'acquisition différentes (30 Hz et 60 Hz) (Mortimer et al, 1988).	45
Figure 12: Cuve d'azote contenant les paillettes de semence caprine.....	49
Figure 13: Paillette de semence caprine (couleur blanc jaunâtre avec un aspect laiteux).....	50
Figure 14: Méthode d'évaluation de la mobilité spermatique.....	51
Figure 15: Visualisation des résultats de la mobilité spermatique par le CASA.....	51
Figure 16: Méthode d'évaluation de la viabilité spermatique (N= nirgosine / E= eosine)	52
Figure 17: Une image au microscope qui représente un spermatozoïde coloré en rose (mort) et des spz non colorés (vivants) : v= vivant / m= mort.....	53
Figure 18: codes de signification ANOVA	54
Figure 19: Représentation schématique des VAP, VCL et VSL (Source de select breeders services) (Post , 2019).....	55
Figure 20: configuration du système CASA utilisé dans cette expérience.....	56
Figure 21: Effet de la température de décongélation sur la motilité des spermatozoïdes à T0 et après 2h d'incubation.....	60
Figure 22: la progression motile en %.....	61
Figure 23: effet de la température de décongélation sur la vitalité des spz.....	62
Figure 24: le système CASA utilisé dans cette expérience.	78
Figure 25: LBRA de l'institut des sciences vétérinaires Blida 1.....	78
Figure 26: le bain-marie utilisé pour décongeler les paillettes de semence caprine.....	79
Figure 27: le vortex	79
Figure 28: le matériel laboratoire utilisé.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1: La description de la motilité massale des spermatozoïdes (Salamon, 1976).....	25
Tableau 2 : Les paramètres cinétiques et leurs fonctions (Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020).	46
Tableau 3: résultat de la motilité totale, la progression motile et la vitalité.....	58
Tableau 4: : La moyenne de VCL, VSL, VAP et STR en (um/s), ALH en (um), BCF (Hz) et LIN en(%)	63

Liste des abréviations

- **A.C : Air-Chaud.**
- **ALH : Amplitude of lateral head displacement.**
- **ANOVA : Analysis of Variance.**
- **BCF : Beat Cross Frequency.**
- **CASA : Computer Assisted Sperm Analysis.**
- **CNIAAG : Centre National d'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique.**
- **FDA : Fluorescéine Diacétate.**
- **Hz : Hertz.**
- **I.A : Insémination artificielle.**
- **LBRA : Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction.**
- **LIN : linearity.**
- **MST : Maladies Sexuellement Transmissibles.**
- **NAT : Naturelle.**
- **OMS : Organisation Mondiale de la Santé.**
- **SCA : Sperm Class Analyser.**
- **Spz : Spermatozoïde.**
- **STR : Straightness.**
- **VAP : Average path velocity.**
- **VCL : Curvilinear velocity.**
- **VSL : Straight line velocity.**
- **WOB : Wobble.**

Table des matières

Dédicaces.....	2
Dédicaces.....	3
Remerciements	4
Résumé	5
ملخص	6
Abstract.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Table des matières	11
Introduction	14
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. Structure anatomique et production de la semence chez le bouc	16
1.1. Structure de spermatozoïde	16
1.2. Le sperme	17
2. Contrôle de la semence.....	18
2.1. Examen macroscopique.....	18
2.1.1. Volume	18
2.1.2. Couleur	19
2.1.3. Consistance et aspect.....	19
2.1.4. PH.....	20
2.2. Examen microscopique.....	20
2.2.1. Concentration	20
2.2.1.1. Evaluation par appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat.....	21
2.2.1.2. Le comptage direct par hématimètre	21
2.2.1.3. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre	23
2.2.2. Motilité	23
2.2.2.1. Motilité massale.....	24
2.2.2.2. Motilité individuelle	25
2.2.3. Morphologie	27
2.2.3.1. Coloration totale	28
2.2.3.2. Coloration vitale	28
2.3. Relation entre la qualité de la semence et sa fertilité	29
3. L'insémination artificielle chez les caprins	30

3.1.	Définition et introduction de l'IA en Algérie	30
3.2.	Utilisation de la semence de boucs en IA (Avantages et inconvénients)	31
3.2.1.	Intérêts sanitaires	31
3.2.2.	Intérêts génétiques	31
3.2.3.	Intérêts économiques	32
3.2.4.	Intérêts techniques	32
3.2.5.	Intérêts zootechniques	32
3.3.	Contraintes et limites d'insémination artificielles caprine	33
3.4.	Facteurs d'échecs de l'insémination artificielle caprine.....	33
4.	Congélation de la semence à long terme (Cryoconservation)	34
4.1.	Définition.....	34
4.2.	Principes de congélation des cellules	35
4.2.1.	Chocs thermiques	35
4.2.2.	Cristallisation.....	36
4.2.3.	Stress osmotique	36
4.3.	Qualité de la semence congelée.....	37
5.	Décongélation de la semence en paillette chez le bouc.....	37
5.1.	Qualité de la semence décongelée	38
6.	Analyse informatique de sperme à l'aide de CASA	39
6.1.	Le système « CASA »	39
6.2.	Principe de fonctionnement.....	40
	MATERIEL ET METHODES	47
1.	Objectif.....	48
2.	Lieu de l'expérimentation.....	48
3.	Matériels et méthodes	48
3.1.	Matériels	48
3.1.1.	Matériel biologique	48
3.1.2.	Matériel de laboratoire.....	48
3.2.	Méthodes décongélation de la semence.....	49
3.3.	Examen macroscopique de la semence	50
3.4.	Examen microscopique de la semence	50
3.4.1.	Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes.....	50
3.4.2.	Evaluation de la vitalité des spermatozoïdes.....	52
4.	Analyses des résultats.....	53
4.1.	Analyse statistique des résultats	53
	RESULTATS ET DISCUSSION	57
1.	Motilité	58

1.1. Motilité massale (totale).....	58
1.2. Motilité individuelle (progressive).....	60
2. Vitalité	61
3. Les paramètres dynamiques (cinétiques) de la mobilité.....	62
CONCLUSION	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68
ANNEX	77

Introduction

L'insémination artificielle apparait comme solution pouvant aider à une meilleure maîtrise de la reproduction caprine en Algérie. Elle se base généralement sur l'utilisation du sperme congelé dans des paillettes cryoconservées dans l'azote liquide.

De nombreuses méthodes différentes pour décongeler les paillettes de semence ont été recommandées, y compris une variété de bain-marie à des températures et des périodes de décongélation différentes, la décongélation dans les poches de chemise, la décongélation à l'air dans la paume des mains (**Barth et Bowman, 1988**). Cela a conduit à une confusion quant à la méthode de décongélation correcte et, par conséquent, des procédures de décongélation imprudentes sont fréquemment adoptées par les producteurs.

Est-ce que la méthode de dégellement peut affecter la viabilité et la motilité de la semence?! Ça ce qu'on va étudier dans ce présent travail.

Par le biais d'une analyse du sperme avec le système CASA, on va tester quatre méthodes de décongélation ; trois essais pour chaque méthode en deux temps différents (T0) et (T2). A chaque fois on fait des examens de la mobilité et la viabilité du sperme décongelé. A la fin de cette expérimentation on va juger la méthode qui semble la plus pratique.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Structure anatomique et production de la semence chez le bouc

1.1. Structure de 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 μ chez le bouc) (**Altman, 1962**). Elle se constitue d'une tête et d'un flagelle réunis par un col très bref (**figure 1**).

- a. **La tête** : chez le bouc, elle présente une forme massive, longue de 8 μ m et large de 4,5 à 5 μ m. 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 (**Drion et al, 1993**).
- b. **Le col** : C'est une courte partie cytoplasmique (2 à 3 μ) 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**).
- c. **Le flagelle** : Présente, lui-même, trois parties successives :
 - **La pièce intermédiaire** : débute au niveau du centriole distal et se termine par un épaissement 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 (**Barone, 1978**).
 - **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**).

NB : Le flagelle est l'élément moteur du spermatozoïde car les mitochondries assurent les phosphorylations oxydatives du fructose présent dans le liquide séminal fournissant l'énergie

nécessaire aux mouvements de la queue, tandis que les structures de l'axonème ont des propriétés contractiles. Ainsi, les microtubules périphériques sont riches en ATPase (Mc Donald, 1980 ; Albert et Jean, 2001).

1.2. Le sperme

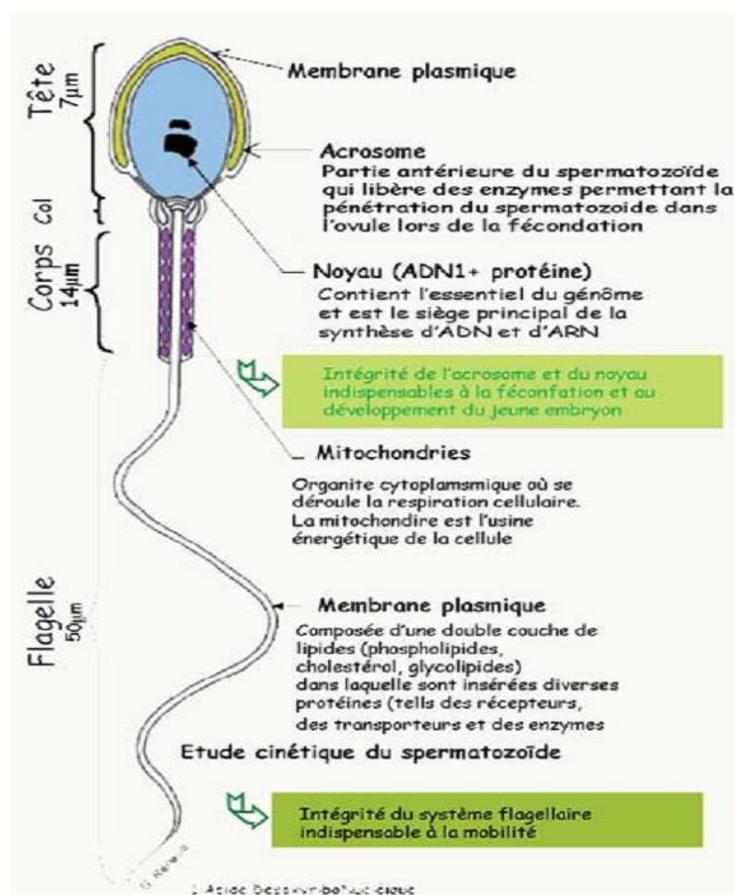


Figure 1: structure du spermatozoïde (CRDC, 2009)

Le produit de l'éjaculation est appelé sperme, il est constitué de deux fractions :

- ♦ Une fraction cellulaire constituée par les spermatozoïdes produits par les testicules ;
- ♦ Une fraction liquide appelée plasma séminale, faite de sécrétions testiculaires et des sécrétions des glandes annexes (Vaissaire, 1977 ; Soltner, 1993).

Chez le bouc, le sperme apparaît comme un liquide épais, crémeux et inodore avec une viscosité plus élevée que celle du taureau (Vaissaire, 1977).

Le volume spermatique varie selon les espèces, et même dans l'espèce. Dans ce dernier cas, il sera en rapport avec l'état physiologique du mâle, l'individu, la race, le développement corporel, le nombre de saillies ou de récolte et la méthode de récolte.

Le bouc a un sperme très concentré mais peu abondant dont le volume est de 1 ml et la concentration est de $3,5 \times 10^9$ spz/éjaculat (**Dérivaux, 1971 ; Hafez, 1974**). Chez le jeune de 7 à 10 mois, le volume peut osciller entre 0,2 et 0,5 ml et de 0,6 à 2 ml chez le bouc adulte (**Setchell, 1977 ; Corteel, 1988**).

2. Contrôle de la semence

L'évaluation de la semence après la récolte a pour but le contrôle et l'évaluation de fonctionnement testiculaire et épидидymaire, tandis que le contrôle réalisé après congélation, permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours de ce processus, et d'estimer leurs capacités fécondantes pour évaluer la qualité de la semence.

2.1. Examen macroscopique

2.1.1. Volume

Après la récolte, la mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par la lecture directe à l'aide de graduations du tube de collecte sans tenir compte de sa partie mousseuse (**Baril et al, 1993**).

Selon **Setchell, (1977) et Taure, (1988)**, le volume de l'éjaculat varie entre 0,2 et 0,5ml chez les jeunes boucs de 7 à 10mois, et entre 0,6 et 2ml chez les adultes.

La production spermatique chez le bouc de race ARBIA augmente pendant la saison d'été et d'automne, puis elle commence à régressée en hiver et essentiellement au printemps. Et s'annule au mois de mai (**Belhamiti, 2006**).

Le volume de l'éjaculat dépendra de divers facteurs, à savoir, l'âge, la saison et la fréquence de récolte (**Hafez, 1987 ; Maxwell et Evans, 1987**). Cependant, quand le volume de l'éjaculat augmente ou diminue, ces changements sont, en grande partie, dues aux changements de la quantité des sécrétions épидидymaire et des glandes annexes (**Corteel, 1977**).

Chez les boucs des races saisonnées, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la production spermatique sont influencés par les changements photopériodiques (**Ortavant, 1977 ; Laubser et al, 1982 ; Branca et Cappai, 1989**).

Les boucs de race Alpine et Poitevine ont un volume d'éjaculat élevé en automne et en hiver, c'est-à-dire pendant la saison sexuelle. Ensuite, le volume diminue pour atteindre des valeurs minimales au printemps et en été, c'est-à-dire en période de repos sexuel (**Leboeuf et al, 2003**).

2.1.2. Couleur

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

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

- ❖ Un sperme de couleur jaunâtre imputable à la présence d'un lipochrome provenant des vésicules séminales et dont la présence est sans rapport avec l'alimentation. Cette couleur jaune peut également résulter de la présence de pus ou d'urine ce qui compromet le pouvoir fécondant du sperme.
- ❖ La coloration rosée ou rougeâtre résulte de la présence de sang ou peut faire suite à l'administration prolongée de phénothiazine.

Remarque : quelques gouttes ou ml de sang peuvent parfois apparaître à la fin de l'éjaculation. Elles disparaissent le plus souvent spontanément et n'interfèrent pas avec la fécondation. Leur présence résulte vraisemblablement de ruptures de micro vaisseaux. Le plus souvent la présence d'éléments figurés du sang n'interfère pas avec la fertilité étant donné la présence dans le plasma séminal d'hémagglutinines qui éliminent ces corps étrangers par agglutination (**Hanzen, 2016**).

- ❖ La coloration brunâtre témoigne de la présence d'éléments sanguins dégénérés.
- ❖ La coloration bleuâtre résulte d'une faible concentration ou de l'administration de bleu de méthylène.
- ❖ Une coloration brunâtre ou grise indique une contamination du tractus génital du mâle (**Hafez, 1987 ; Maxwell et Evans, 1987**).

2.1.3. Consistance et aspect

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

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

2.1.4. PH

Le PH séminal est mesuré, juste après la récolte, à l'aide d'un PH mètre. Le sperme du bouc est légèrement acide, son PH varie de 6 à 6,8 avec une moyenne de 6,4 (**Vaissaire, 1977**). Cette valeur évolue inversement à celle de la concentration, quand celle-ci augmente, le PH diminue.

Après la collecte, le rythme de diminution du PH permet l'évaluation de la qualité du sperme (**Derivaux Ectors, 1986**). D'une manière générale, les spermatozoïdes forts concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du PH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycolyse plus intense ce qui, indirectement, témoigne leur meilleure qualité.

2.2. Examen microscopique

2.2.1. Concentration

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence. L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure en utilisant le minimum de semence possible Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, par comptage électronique ou encore par néphélométrie (ou néphélémétrie) (**Baril et al, 1993**).

Chez les races saisonnées, la concentration spermatique suit une évolution inverse de celle du volume, elle est élevée en dehors de la saison de reproduction et faible en saison sexuelle (**figure 2**). Ces variations sont le reflet de la synthèse et de la sécrétion des glandes annexes. Celles-ci sont stimulées par la testostérone qui est élevée en saison sexuelle et basse en contre saison (**Baril et al, 1993**).

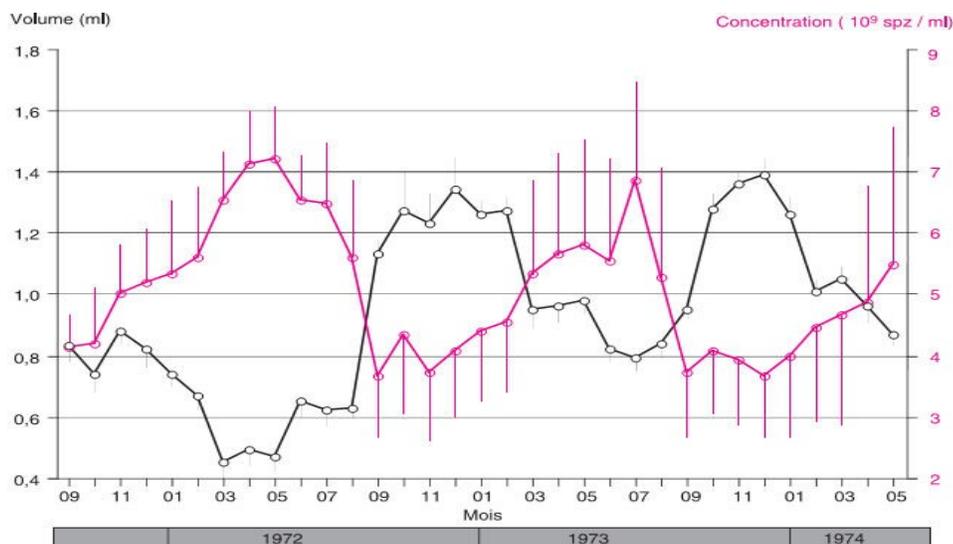


Figure 2 : Variations saisonnières du volume de l'éjaculat et de sa concentration en spermatozoïdes chez cinq boucs alpin, $m \pm sem$ (Corteel, 1977).

2.2.1.1. Evaluation par appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat

L'appréciation de la couleur peut être une méthode empirique pour l'évaluation de la concentration. Ainsi, une couleur jaune très claire signifie une concentration inférieure à 1 milliard de spz/ml.

En revanche, un sperme blanc ivoire peut exprimer une concentration supérieure ou égale à 3 – 4 milliards de spz/ml (Marquis, 1990).

Cette pratique n'est toutefois pas recommandée en raison de son assez grande imprécision due à l'appréciation subjective et parce que d'autres techniques précises et d'emploi facile peuvent être utilisées.

2.2.1.2. Le comptage direct par hématimètre

La numération directe se fait au moyen d'un hématimètre. Ce dernier est constitué d'une lame de verre, creusée d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage (figure 3). La totalité de

La cellule de Malassez est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont : Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm , Le volume total de la cellule est de 1 mm³ (100x2,5 x 0,2 x 0,20), Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage, chaque

rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit 0.01 mm^3 . Ce type de numération suppose la dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3% ou de formaldéhyde à 1 % (solution de Hancock). Le taux de dilution dépend de la concentration apparente du sperme.

On conseille une dilution de 1 % pour les spermés de taureau, de béliet et de bouc. **(Hanzen 2016)**. Il existe différents types d'hématimètres qui se caractérisent notamment par leur surface (S) et la profondeur de leur chambre de numération (P) : Malassez (S : 5 mm^2 , P : 0.2 mm), Thoma (S : 1 mm^2 , P : 0.1 mm), Neubauer (S : 9 mm^2 , P : 0.1 mm) et Türk (S : 9 mm^2 , P : 0.1 mm).

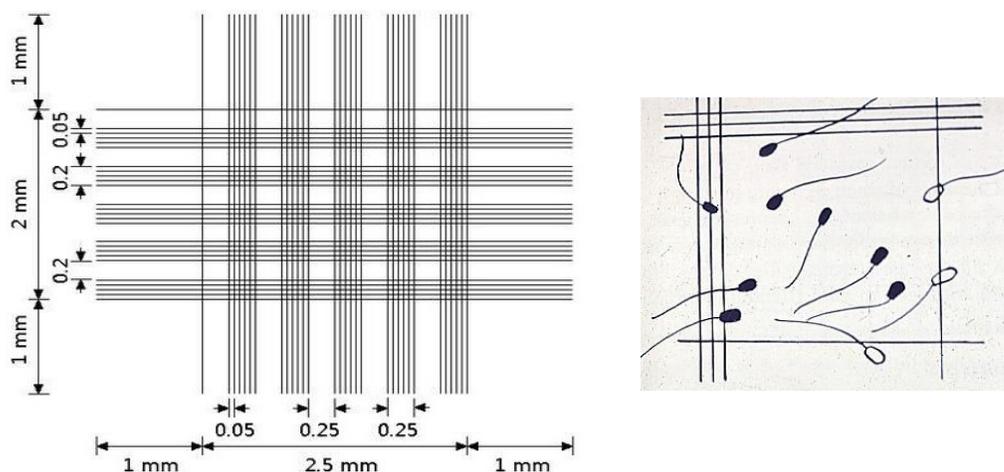


Figure 3: Hématimètre : cellule de Malassez (Hanzen, 2016).

Les différentes étapes à suivre pour un comptage à l'hématimètre sont les suivantes :

- Prélever (précisément) 0,01 ml de semence pure et le diluer dans 4 ml (précisément) de sérum physiologique formolé puis homogénéiser la solution.
- Préparer l'hématimètre en pressant fortement la lamelle sur les côtés de la grille, après avoir nettoyé et séché soigneusement les surfaces concernées. Cette manipulation permet de faire adhérer la lamelle à l'hématimètre.
- Avec une pipette Pasteur, rincée au préalable, avec la solution contenant les spermatozoïdes, déposer une petite goutte de solution sans bulle d'air, en bordure de la lamelle. La gouttelette, par capillarité, se répartit, alors, entre l'hématimètre et lamelle.
- Laisser reposer quelques minutes afin que les spermatozoïdes se déposent sur le fond de

l'hématimètre.

- Placer avec l'hématimètre sur la platine du microscope, sous contraste de phase avec un grossissement de 200. Le champ du microscope couvre généralement la surface d'un grand carreau.

Après dépôt d'une goutte de sperme et son recouvrement par une lamelle, le nombre de spermatozoïdes est déterminé au grossissement 10 X 40 sur une surface correspond à 4 grands carrés. Par convention, on ne prend en compte que les têtes des spermatozoïdes situés à l'intérieur des deux lignes parallèles délimitant chaque grand carré ou dont la tête se trouve sur les lignes gauches et supérieures délimitant un grand carré.

Le calcul de la concentration se fait de la manière suivante : Pour calculer le nombre de spermatozoïdes par ml de l'échantillon initial : Calculer le nombre moyen de spermatozoïdes comptés dans les 4 grands carrés, multiplier la moyenne obtenue par 100 000 pour obtenir le nombre de cellules par ml d'échantillon dilué. Multiplier le nombre obtenu en par le facteur de dilution.

2.2.1.3. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

C'est la technique la plus efficace, car elle allie rapidité et précision. Le principe général est de mesurer la densité optique (à une longueur d'ondes de 550 nanomètres) de la solution saline formolée précédente, contenant les spermatozoïdes, et de la comparer à un blanc (ne contenant pas de spermatozoïdes) (**Baril et al, 1993**).

Cette méthode est universellement utilisée dans les centres d'IA. Elle consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Cette opacité peut cependant, être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. Cette méthode est moins exacte chez les espèces dont le plasma séminal présent de grandes variations d'opacité (Verrat, étalon). La cellule de Thomas (hémocytomètre) offre le double avantage être bon marché et de voir les spermatozoïdes (**Hanzen, 2009**).

2.2.2. Motilité

L'examen de la motilité doit se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38° C. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont

immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de PH et de température normale, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales **(Hanzen, 2009)**.

2.2.2.1. Motilité massale

C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès que celle-ci est collectée. Une goutte de sperme pur est déposée sur une lame et placée sur la platine chauffante du microscope (37-38°C) sous un grossissement de 80. L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur, à cette température, diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes.

La mesure est faite en utilisant une échelle qui va de zéro à cinq **(tableau 1)**, Cette technique est suffisamment efficace pour détecter les éjaculats où les spermatozoïdes sont morts ou sont très peu mobiles ; elle est toutefois trop imprécise pour différencier les éjaculats avec différents pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou différentes motilités individuelles **(Maxwell et Evans, 1987 ; Baril et al, 1993)**.

Elle dépend essentiellement de trois facteurs : La concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale **(Hanzen, 2016)**.

Tableau 1: La description de la motilité massale des spermatozoïdes (Salamon, 1976).

Note	Motilité massale	Description
5	Très bonne	Vagues et tourbillons, mouvements très rapides ; les spermatozoïdes ne peuvent pas être visionnés individuellement.
4	Bonne	Mouvements rigoureux, vagues et tourbillons ne sont pas aussi évidents qu'en score 5.
3	Faible	Il n'y a pas ou il y a peu de vagues lentes ; les spermatozoïdes peuvent être individualisés. 45-65% des spermatozoïdes sont actifs.
2	Assez faible	20 à 40% des spermatozoïdes sont actifs ou vivants, leur motilité est très faible. Absence de vagues.
1	Très faible	Très peu de spermatozoïdes montrent des signes de vie sans mouvement progressifs
0	Absence	Tous les spermatozoïdes sont morts.

2.2.2.2. Motilité individuelle

Cette évaluation est réalisable en même temps que l'estimation du pourcentage des spermatozoïdes mobiles, d'ailleurs, elles sont effectuées dans les mêmes conditions de grossissement et de température (**Hafez, 1987 ; Baril et al, 1993**).

L'examen de la motilité individuelle "progressive motility" sera, préférentiellement, réalisé une fois après dilution (10 à 40 fois) du sperme dans un dilueur ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Ces milieux seront idéalement préparés avant l'examen pour éviter toute modification de PH, préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme diluée entre lame et lamelle. Trois à cinq champs proches du centre de la goutte, seront ainsi examinés au grossissement 200 à 500 et la moyenne calculée.

La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse le champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchant ou traceurs). Certains spermatozoïdes présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue. D'autres se déplacent de manière curviligne ou plus lentement. Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements. Un sperme de très bonne qualité (4) doit posséder au moins 80 à 100 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de bonne qualité (3) aura 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de qualité correcte (2) aura 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles et enfin un sperme de faible qualité (1) aura moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles (**Hanzen, 2009**).

L'examen de la motilité individuelle est intéressant car, il fournit indirectement des informations intéressantes sur l'intégrité de la membrane du spermatozoïde et son intégrité morphologique. Ainsi, un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles joint à un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts donnera à penser à une mauvaise manipulation du sperme plus qu'à un sperme anormal. De même une faible motilité est souvent corrélée avec un pourcentage élevé de formes anormales ou de spermatozoïdes morts (**Hanzen, 2016**).

Chez les races à activité sexuelle saisonnière, le taux de spermatozoïdes mobiles est élevé pendant la saison sexuelle et faible en dehors de celle-ci (**Delgadillo, 1990**). Pendant la saison de reproduction, la motilité spermatique est élevée ; ainsi, un éjaculat moyen contient 85 à 95 % de spermatozoïdes normaux dont leur mobilité individuelle est la plus élevée de l'année (**Figure 4**). En général, les variations saisonnières de la motilité, évaluées en conditions définies, sont associées aux variations saisonnières correspondantes de la fertilité (**Corteel, 1976a**).

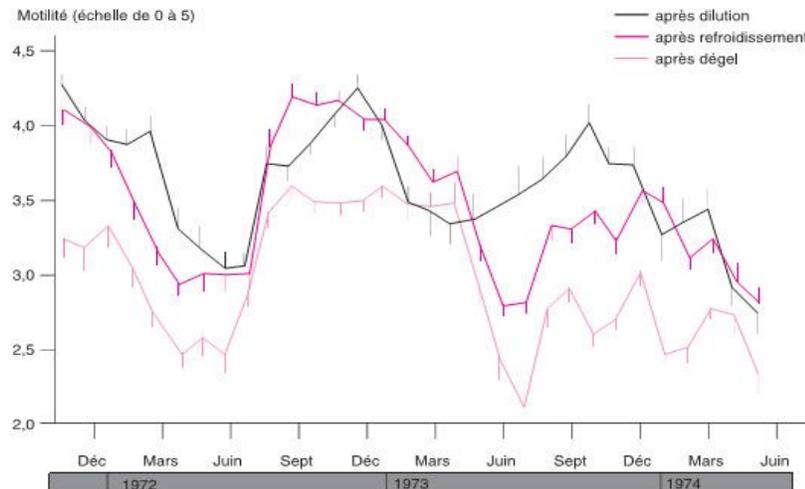


Figure 4: Variation mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Corteel, 1977).

Les deux tests précédents sont suffisamment précis pour juger ou non si les éjaculats doivent être écartés sur la base de faibles pourcentages de spermatozoïdes mobile ou de faible motilité. Ils sont généralement utilisés pour apprécier la qualité de la semence après congélation et dégel. Toutefois, même s'ils sont liés à la fertilité de la semence, ils sont incapables de la prédire avec précision ; d'autres tests sont donc nécessaires (Baril et al, 1993).

2.2.3. Morphologie

C'est le second test qualitatif après la motilité. Il apprécie la qualité du sperme au travers du nombre de spermatozoïdes atypiques, qui indique une baisse de sa viabilité. Ce test est réalisé en recourant aux différentes préparations colorées.

L'examen morphologique nécessite la coloration du sperme. Pour ce faire, une goutte de sperme est mélangée à une goutte de colorant, et déposée à l'extrémité d'une lame et étendue en couche mince au moyen d'une autre lame inclinée à 45°. La préparation est séchée à l'air libre en quelques minutes. Le frottis est ensuite fixé par immersion dans une solution d'alcool méthylique ou dans une solution de Formaline à 5%. La fixation à l'air libre est également possible comme celle consistant à passer rapidement le frottis au-dessus d'une lampe à alcool. Tout choc thermique sera néanmoins évité pendant ces préparations. Certaines colorations ont pour objet de mieux faire apparaître la morphologie du spermatozoïde (coloration totale), les autres dites vitales permettent de différencier les spermatozoïdes morts et vivants.

2.2.3.1. Coloration totale

La coloration totale peut être simple fournissant une coloration uniforme des spermatozoïdes. Dans ce cas, les colorants suivants peuvent être utilisés : bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane et la Fuschine.

La coloration totale est dite double en utilisant les colorations Giemsa et Williams. Ces dernières font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire.

La coloration à l'encre de Chine est dite négative car les spermatozoïdes apparaissent en clair sur le fond noir de l'encre de Chine. Cette coloration identifie bien la forme de la tête ainsi que la présence éventuelle d'une gouttelette protoplasmique (**Derivaux et Ectors, 1986 ; Hafez, 1987**).

2.2.3.2. Coloration vitale

Cette coloration a pour principe d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (éosine, rose Bengale, vert de Crésyl) et un colorant de fond qui facilite la lecture (bleu de méthylène, la nigrosine). La coloration éosine-nigrosine est classiquement la plus utilisée. Tout en évitant la formation d'artefacts (**Hanzen, 2016**), cette technique permet la détermination du pourcentage des spermatozoïdes morts par rapport aux vivants.

Les frottis sont réalisés en mélangeant une goutte de colorant avec une goutte de sperme. Cependant, l'acrosome ne peut pas être évalué sur ce type de préparation, et seule une lecture, en milieu humide de préparation des gamètes fixés au formol en contraste de phase, le permet (**Chavette, 1992**).

Pour déterminer le taux de cellules mortes et celles avec anomalies structurales, la lame est placée sur la platine chauffante du microscope à 37–38°C et examinée à la lumière directe, pour au moins 150 spz dans différents champs de la même préparation (**Baril et al, 1993**).

Tous les spermatozoïdes colorés en totalité ou en partie sont considérés comme morts au moment de la coloration.

D'après Corteel, 1981, l'incidence des anomalies morphologiques des spermatozoïdes augmente en dehors de la saison sexuelle ou après exposition des mâles à des températures ambiantes élevées. Cependant, la fertilité du bouc sera affectée, surtout si leur proportion dépasse 20% (**Marquis, 1990**).

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes peuvent être dites primaires si elles trouvent leur origine pendant la phase de spermatogenèse ou secondaires si elles surviennent

pendant leur phase de maturation épидидymaire. La majorité des lésions du spermatozoïde sont dites primaires. Certains peuvent être à la fois primaires et secondaires comme la présence de gouttelettes, les têtes sans queue. Les lésions du spermatozoïde peuvent également être qualifiées de majeures ou de mineures selon qu'elles exercent ou non un effet négatif sur la fertilité.

Enfin, elles peuvent concerner isolément ou simultanément les diverses parties du spermatozoïde. La tête peut présenter des anomalies de forme, de dimensions, de duplication, de position ou de structure de l'acrosome. Les anomalies du col intéressent l'implantation de la queue, les têtes sans queue ou la persistance de la gouttelette protoplasmique (**figure 5**).

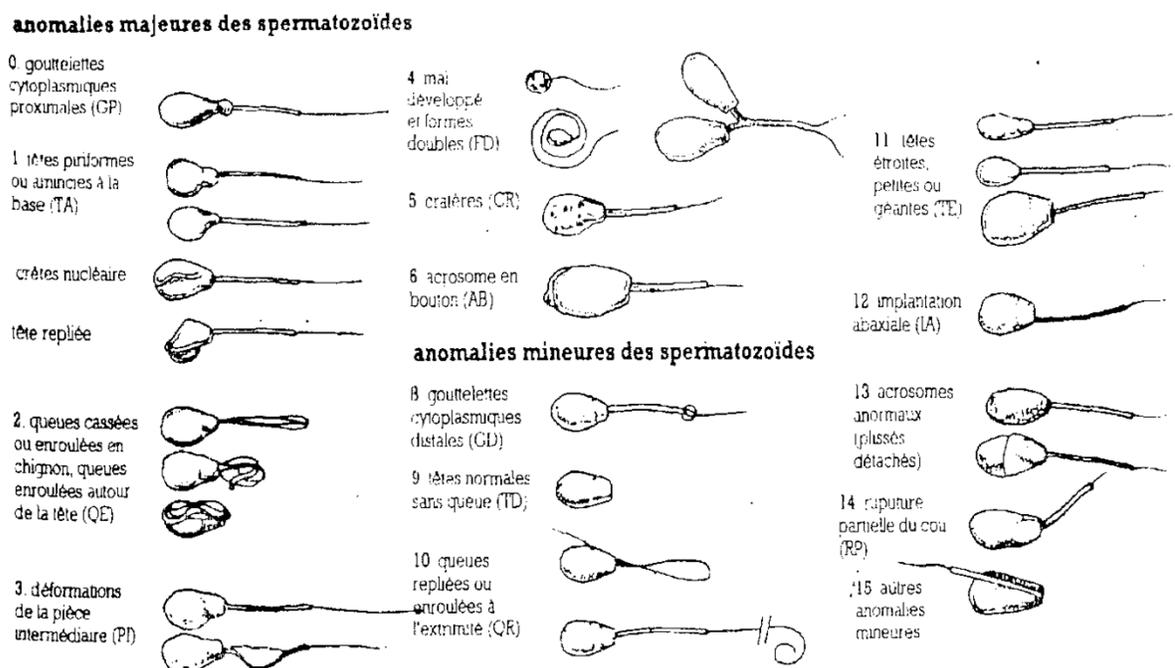


Figure 5: Classification des différentes anomalies spermatisques (Dumont, 1997).

2.3. Relation entre la qualité de la semence et sa fertilité

Beaucoup d'essais ont été réalisés pour corréliser les résultats des tests *in vitro* décrits ci-dessus avec la fertilité des femelles inséminées avec la même semence. Malheureusement, la fécondance ne dépend pas d'un seul paramètre de la semence. Elle dépend aussi du type d'œstrus de la femelle (naturel ou induit par voie hormonale) et du lieu de dépôt de la semence.

Les tests précédents sont essentiellement utilisables pour identifier les éjaculats de mauvaise qualité au moment de la récolte ou ceux qui n'ont pas résisté correctement aux processus de congélation/décongélation. Avec les éjaculats « utilisable », la corrélation entre tests *in vitro*

et fertilité n'est pas très élevée. Dans l'espèce caprine, seule la motilité individuelle des spermatozoïdes 120 minutes après dégel et incubation à 37°C, est reliée à la fertilité (**Baril et al, 1993**). L'intensité de la relation dépend du traitement progestagène utilisé et du lieu de dépôt de la semence (intra-utérine ou intra-cervicale).

3. L'insémination artificielle chez les caprins

3.1. Définition et introduction de l'IA en Algérie

L'insémination artificielle (I.A.) est le dépôt des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles par des techniques appropriées sans qu'il y ait accouplement. Elle permet une utilisation rationnelle dans l'espace et dans le temps des hautes capacités génétiques d'un mâle par le biais de la récolte et de la conservation de son sperme.

L'IA qui est la « biotechnologie » de reproduction la plus largement utilisée dans le monde, est considérée comme l'un des outils de la diffusion du matériel génétique performant (**Haskouri, 2001**) ; elle consiste à ce titre un outil de base du développement de l'élevage (**Derivaux et Ectors, 1989**).

C'est cependant avec la mise au point par Poldge et Rowson en 1952 de la congélation du sperme que l'insémination artificielle pris réellement son essor. Elle s'est à l'heure actuelle généralisée et concerne non seulement l'espèce bovine mais les espèces équine, ovine, caprine, porcine, les volailles et les abeilles (**Hanzen, 2016**).

L'intérêt grandissant manifesté par tous les pays du monde à l'IA est lié à ses avantages nombreux surtout génétiques et qui militent pour sa généralisation dans les élevages ayant les conditions maîtrisées.

En Algérie l'IA a été introduite à l'époque coloniale. Bien que très ancienne, son utilisation dans nos élevages est très limitée malgré les efforts du centre national de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique (CNIAAG). Son application très timide est souvent attribuée aux échecs répétés de la conception (**Belkasmi F, 2011**).

3.2. Utilisation de la semence de boucs en IA (Avantages et inconvénients)

L'IA a plusieurs avantages et ne peut être appliquée sans discernement, car son efficacité suppose un plan de génétique appliquée (**Derivaux et Ectors, 1989**).

3.2.1. Intérêts sanitaires

Les reproducteurs utilisés pour la production de semence sont sous contrôle sanitaire et leurs semences également passent par des contrôles rigoureux avant sa mise en paillettes. La semence contient également des antibiotiques capables de détruire quelques bactéries dans le tractus génital femelle. L'IA évite donc, sans nul doute, les maladies sexuellement transmissibles (MST) par les mâles.

Cependant, il existe certains agents infectieux qui peuvent être présents dans la semence et transmis notamment le virus aphteux ; le virus bovi-pestique ; le virus de la fièvre catarrhale du mouton ; le virus de l'IBR ; Brucella abortus et Campylobacter... Toutefois le contrôle de maladies grâce aux normes sanitaires strictes exigées au niveau des centres producteurs de semences permet de réduire considérablement le risque de transmission de ces agents par voie "mâle" (**Haskouri, 2001**).

3.2.2. Intérêts génétiques

L'IA permet à l'éleveur d'accéder à des géniteurs de haut niveau, de diversifier ses géniteurs mâles, et d'adapter leurs caractéristiques (race, nature et niveau des performances...) à celles des femelles de son troupeau et à ses objectifs de production. Par les « connexions » qu'elle instaure entre les troupeaux (**Thibault et Levasseur, 2001**), l'IA permet une gestion collective du patrimoine génétique. Elle rend possible sa diffusion rapide, et contribue également à son obtention.

Cette technique permet également la diffusion très rapide dans le temps et dans l'espace du progrès génétique (**Barbat et al, 2005**).

3.2.3. Intérêts économiques

L'IA a un double avantage économique pour l'éleveur. Elle le dispense de l'entretien des mâles adultes et de renouvellement ; et lui permet d'obtenir une semence provenant de mâles sélectionnés pour leurs valeurs génétiques sans avoir à les acquérir à prix élevé.

Le progrès génétique dans un troupeau améliore les résultats technico-économiques d'un élevage. Plus le pourcentage de femelles inséminées est élevé, plus le gain économique est important. En effet, les chèvres ont un meilleur rendement laitier ; le taux protéique est amélioré, les réformes pour mauvaise production et mauvaise conformation de la mamelle diminuent progressivement et le nombre de boucs reproducteurs nécessaires est diminué **(Gahery, 2012)**. L'insémination associée à une méthode de contrôle de la reproduction vous permet de produire du lait sur les périodes où les reproducteurs nés d'insémination se vendent plus facilement et plus chers que les animaux nés de monte naturelle. Le marché est plus favorable c'est-à-dire au moment où le lait et les fromages bénéficient de prix de vente plus élevé **(Unceia et capri-ia, 2004)**.

3.2.4. Intérêts techniques

L'IA nécessite, pour son développement, de nombreuses connaissances scientifiques et techniques dans des domaines variés : manipulations du sperme et insémination proprement dite, mais aussi, plus globalement, maîtrise de la reproduction.

L'insémination permet une gestion plus rigoureuse des lots d'animaux ce qui permet de : Planifier la reproduction, grouper les mises-bas, optimiser la production de lait et de viande, optimiser les apports alimentaires en fonction des besoins, faciliter l'élevage des chevrettes par la constitution de lots plus homogènes. **(Meskini Z, 2017)**

3.2.5. Intérêts zootechniques

L'IA assure l'amélioration de la gestion intra troupeaux avec l'assurance d'un contrôle de paternité, le choix des dates de mises bas et la possibilité de reproduction à contre saison en tirant plein les avantages des techniques de synchronisation de l'œstrus. L'IA permet l'amélioration des fécondations chez certaines espèces. Chez les mammifères, les taux de fécondation enregistrés après IA sont égaux ou légèrement inférieurs à ceux obtenus par accouplement nature **(Thibault et Levasseur, 2001)**. Par contre, chez les espèces avicoles, l'IA

permet d'accroître le taux de réussite de la reproduction. L'IA est utilisée à 100% pour l'élevage de dinde, où l'accouplement est difficile vu la différence de taille entre mâle et femelle ce qui rend l'insémination pratiquement obligatoire (Foote, 2002). Elle permet d'atteindre 95% de fécondations contre 0 à 25% pour la reproduction naturelle difficiles (Thibault et Levasseur, 2001).

Les mêmes auteurs indiquent aussi que l'IA améliore également les performances obtenues lors des hybridations entre espèces différentes. Chez les canards, le croisement entre mâle Barbarie et femelle commune donne ainsi 2 à 3 fois plus d'œufs fécondés.

3.3. Contraintes et limites d'insémination artificielles caprine

Bien que cette technique soit, sans aucun doute, un outil puissant pour la gestion du patrimoine génétique, son efficacité est contrebalancée par les contraintes suivantes :

- ❖ Une diminution de la variabilité génétique, qui est le risque le plus fréquent, et qui doit être gardé présent à l'esprit lorsqu'un programme de sélection est mis en route, et les reproducteurs de la première génération doivent venir d'origines les plus divers possibles ;
- ❖ Une diffusion de défauts héréditaires ou d'une maladie non contrôlée (ou inconnue) est toujours possible. En effet, une anomalie chromosomique peut être rapidement et largement diffusée dans une population par le biais de l'IA ;
- ❖ Un accroissement du taux de consanguinité. (Jean Pierre M, 2009).

3.4. Facteurs d'échecs de l'insémination artificielle caprine

Autour d'une fertilité moyenne d'environ 62 %, on observe une variabilité importante selon les lots et les élevages (25 à 85 %). Celle-ci subsiste malgré les précautions prises au niveau du choix des femelles et dans l'application du traitement hormonal. Cette variabilité peut être imputable à de nombreux facteurs : (Nadjemi H et Bourada A, 2016)

➤ Facteurs liés à l'élevage et aux conditions d'application du traitement hormonal :

- ❖ La race : actuellement, chez les chèvres de race Saanen, le taux de réussite de l'IA. Après traitement hormonal est inférieur de 5 à 10 points à celui observé chez les chèvres de race Alpine ;
- ❖ La réponse au traitement ;

- ❖ L'heure du retrait de l'éponge ;
- ❖ L'utilisation répétée du traitement ;
- ❖ Le stress : vaccination, traitement antiparasitaire, enlèvement du fumier, taille des onglons, changement de lot ou de local, modification importante de l'alimentation.
- **Facteurs liés à l'insémination :**
- ❖ Méthode du dégel de la semence : une mauvaise méthode peut entraîner un choc thermique ce qui contribue à la déformation des spermatozoïdes.
- ❖ Le lieu de dépôt des spermatozoïdes : le dépôt de la semence dans l'utérus (quand l'ouverture du cervix le permet) conduit à un niveau de fertilité plus élevé que lorsqu'il est réalisé au niveau du col de l'utérus. Cependant, ce mode opératoire doit être utilisé en traumatisant le moins possible l'appareil génital et la muqueuse utérine en particulier.
- ❖ L'insémineur : une mauvaise manipulation peut être la cause d'un échec d'IA par ignorance de l'anatomie ou la méthodologie de cette opération.

4. Congélation de la semence à long terme (Cryoconservation)

4.1. Définition

La cryoconservation correspond à la préparation de cellules ou de tissus en vue de leur stockage à une température inférieure à -80°C. Le vétérinaire russe **Ivanov** a été le premier à mettre en évidence son action dans la conservation du sperme (**Mies Filho, 1982**).

Cependant, les recherches sur la congélation de sperme, de différentes espèces, ne se sont intensifiées qu'après la découverte du glycérol comme agent cryoprotecteur (**Pesch et Bergmann, 2006 ; Hezavehei et al, 2018**). Grâce à cette avancée, il est devenu possible de stocker indéfiniment la semence et son utilisation réussie pour l'IA (**Holt, 2000a**), puisque le glycérol préserve mieux la fertilité des gamètes (**Hezavehei et al, 2018**).

Cette procédure permet la conservation de ces cellules ou tissus pendant de nombreuses années et leur utilisation après réchauffement à la température ambiante. Les spermatozoïdes de mammifères furent les premières cellules à être congelées avec succès dans les années cinquante

par Polge, Smith et Parkes, et depuis, la cryoconservation de la semence n'a cessé de se développer, notamment en ce qui concerne la reproduction dans les filières d'élevage (**Day et Stacey, 2007**).

Il s'agit d'une biotechnologie importante permettant la conservation des espèces menacées ou, incapable de se reproduire. D'éviter la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, d'éliminer les barrières géographiques et de préserver le matériel génétique d'un animal pendant une période de temps théoriquement illimitée (**Neto et al, 2014 ; Day et Stacey 2007**).

4.2. Principes de congélation des cellules

La cryoconservation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures, souvent dans l'azote liquide à -196°C . À cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (**Bakhach et al, 2007**). Cette méthode de conservation des gamètes mâles facilite la dispersion du bagage génétique d'animaux supérieurs, notamment par l'insémination artificielle. Elle permet également la création de réserves de semences chez les espèces en voie de disparition ou encore la conservation des gènes d'un sujet de valeur.

Les techniques de congélation détériorent la qualité de la semence (**Batista et al, 2009**). Les stress responsables 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**).

4.2.1. 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**).

4.2.2. 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**).

4.2.3. 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 diluant de la semence crée un stress osmotique plus ou moins important selon sa perméabilité. Les dommages cellulaires dépendent alors des éléments constitutifs 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 médium 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)**.

4.3. Qualité de la semence congelée

Pour la congélation de la semence, il est indispensable d'avoir un cryoprotecteur pénétrant dans le dilueur, et le glycérol est utilisé universellement à cette fin (**Hafez et Hafez, 2004 ; Sieme et al, 2015**). Les cryoprotecteurs pénétrants se caractérisent par leur faible poids moléculaire et leur perméabilité conséquente aux membranes cellulaires, agissant de manière intra et extracellulaire pour préserver la survie et la fertilité des spermatozoïdes pendant la congélation (**Pudry, 2006 ; Prien et Iacovides, 2016**). L'effet protecteur de ces agents est le résultat des propriétés colligatives, qui déterminent la réduction du point eutectique, la déshydratation cellulaire et la formation réduite subséquente de glace intracellulaire (**Ávila-Portillo et al, 2006**). Cependant, ils peuvent avoir un effet toxique sur les gamètes et doivent être utilisés avec prudence (**Salamon et Maxwell, 2000 ; Silva et al, 2012**).

Les spermatozoïdes correctement traités et dilués sont soumis à des courbes de réfrigération et de congélation, qui doivent être effectuées progressivement pour éviter les dommages cellulaires (**Mies Filho, 1982 ; Doležalová et al, 2016**). Les courbes rapides sont responsables de lésions, issues de modifications des propriétés physiques des membranes cellulaires (**Oliveira et al, 2013**), dues au choc froid, à la formation de cristaux de glace (**Pesch et Bergmann, 2006**) et au déséquilibre osmotique mis en évidence lors de la décongélation (**Morris et al, 2012**). D'autre part, les courbes très lentes sont également néfastes, car elles soumettent les spermatozoïdes à l'effet de solution, caractérisé par une déshydratation cellulaire excessive et une augmentation conséquente des concentrations de soluté dans le milieu intracellulaire (**Pesch et Bergmann, 2006; Oliveira, 2013**). Ainsi, un taux de refroidissement idéal devrait éviter les effets néfastes de ces deux extrêmes (**Holt, 2000b**).

5. Décongélation de la semence en paillette chez le bouc

La décongélation de la cellule crée une recristallisation, c'est-à-dire l'amplification des cristaux de glace intracellulaire qui étaient présents après la congélation (**Watson, 1990**). Le réchauffement de la cellule favorise le réarrangement des lipides et protéines membranaires. **Holt et son équipe (1992)** ont expérimenté l'impact des processus de congélation et de décongélation sur la qualité de la semence de bélier en présence d'une sonde d'intégrité

membranaire, la fluorescéine diacétate (FDA). Les résultats ont démontré que les bris de la membrane se produisaient pendant la décongélation.

Le processus de décongélation de la semence en paillettes s'effectue dans l'eau. Cependant, la température et la durée de décongélation diffèrent selon les chercheurs. Ainsi, la décongélation de la semence en paillettes à 37°C pendant 12 à 30 secondes permettrait une meilleure motilité qu'une décongélation à 5°C pendant 2 minutes. Dans le même ordre d'idées, une décongélation à 70°C pendant 7 secondes donnerait de meilleurs résultats de motilité et d'intégrité membranaire qu'une décongélation à 37°C pendant 2 minutes, ou 40°C pendant 20 secondes (**Tuli et al, 1991**). De son côté, **Anderson (1969)** a démontré qu'une décongélation à 75°C pendant 10 secondes est plus efficace que 35°C pendant 30 secondes.

Plusieurs vitesses de décongélation ont été préconisées selon les espèces. La semence de bouc conservée en paillettes ou en pellets et décongelée à 37 °C (**Corteel 1974, Salamon et Ritar 1982**) a donné des résultats de fertilité satisfaisants et cette température est facilement applicable à la pratique de l'insémination artificielle dans les élevages. **Deka et Rao (1987)** ont observé que la décongélation à 37 °C comparés à 5 °C améliorerait la motilité et le taux d'acrosomes normaux. D'autres études ont montré que la décongélation de la semence de bouc à des températures élevées (70 à 75 °C) pendant une très courte durée (7 à 10 secondes) permettait d'obtenir un taux de survie des spermatozoïdes supérieur à celui observé après décongélation à 35-40 °C durant 20 à 30 secondes (**Andersen 1969, Tuli et al 1991**). La décongélation à température très élevée pendant un temps court n'est cependant pas utilisée en pratique car il est difficile dans ces conditions de respecter de façon rigoureuse les conditions de décongélation.

5.1. Qualité de la semence décongelée

La congélation de la semence est un stress pour les spermatozoïdes. Pour optimiser la conservation d'un maximum de spermatozoïdes de qualité, plusieurs paramètres doivent être respectés. La saison de reproduction a un impact sur la qualité de la semence éjaculée. Il en va de même pour le potentiel de congélation. Ainsi, les chercheurs ont démontré qu'une semence congelée en saison de reproduction se conserve mieux qu'une autre congelée en contre-saison (**Delgadillo et al, 1992; Tuli et Holtz, 1995; Leboeuf et al, 2003**).

La figure (6) présente la motilité spermatique après dilution, après refroidissement et après dégel à différents moments de l'année chez des boucs en conditions NAT (**Leboeuf et al, 2003**).

On observe que les taux de motilité spermatique les plus faibles concordent avec la période de repos sexuel. En période de reproduction, la motilité de la semence fraîche et décongelée est plus élevée.

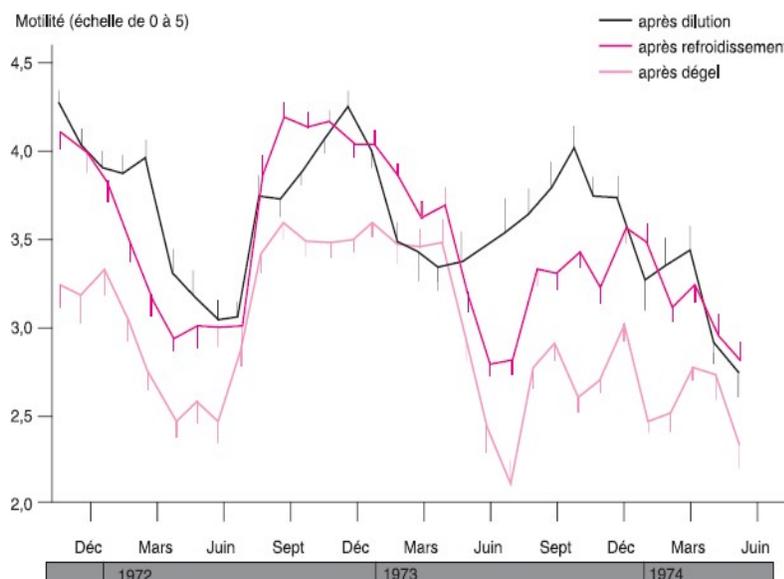


Figure 6: Variations mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après dilution, refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Leboeuf et al, 2003) (adapté de Corteel, 1977).

6. Analyse informatique de sperme à l'aide de CASA

6.1. Le système « CASA »

Le premier système d'analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA : Computer Assisted Semen Analysis) a vu le jour en 1985 (Liu et al, 2014). Ces systèmes utilisent des ordinateurs pour capturer numériquement une séquence d'images vidéo à partir d'un microscope et appliquent des algorithmes de traitement d'images numériques pour détecter et compter automatiquement les spermatozoïdes. En outre, les systèmes CASA peuvent reconstruire les trajectoires de nage des spermatozoïdes sur plusieurs images de vidéo et permettent ainsi de mesurer ces paramètres qui sont impossibles pour un observateur humain de les discerner visuellement.

Malheureusement, les systèmes CASA actuels restent d'un coût prohibitif et nécessitent une intervention importante de l'utilisateur pour fonctionner (**Rothmann et al, 2007**).

6.2. Principe de fonctionnement

L'acronyme CASA signifie Computer-Aided Sperm Analysis. Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode semi-automatisée permettant l'analyse à partir d'un échantillon de sperme de paramètres spermatiques tels que la concentration, la mobilité, la vitalité ou encore la morphologie des spermatozoïdes mais aussi les paramètres cinétiques à travers une analyse fine du mouvement flagellaire non observable par l'œil humain. Le système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif relié à un logiciel informatique par l'intermédiaire d'une caméra permettant la digitalisation des images, c-à-d la transformation des images capturées par la caméra en images numériques (**Mortimer, 2000 ; OMS, 2010**).

Il s'agit en effet d'une méthode semi-automatisée puisque l'opérateur doit se déplacer sur la chambre de comptage pour permettre l'acquisition des différents champs. Il est important que les champs analysés soient à différentes distances du site de dépôt de l'échantillon dans la chambre, principalement le long de l'axe central formé par les points d'entrée et point de sortie de la lame (**Amann et Waberski, 2014**), car la distribution des spermatozoïdes dans la chambre n'est pas homogène (**Douglas-Hamilton et al, 2005**). La validation de méthode doit notamment montrer que cette distribution non homogène n'a pas d'impact sur la qualité des résultats (si l'acquisition des champs est correctement réalisée) grâce à une comparaison par rapport à une méthode de référence qu'est l'hémocytomètre (cellule de Malassez). Tout comme cela est réalisé pour la méthode manuelle, plusieurs champs doivent être analysés pour obtenir un nombre suffisant de spermatozoïdes. Le manuel de l'OMS 2010 recommande l'analyse de 2 chambres par patient avec d'une part un minimum de 200 spermatozoïdes analysés par chambre et d'autre part 6 champs minimum par chambre. Chaque champ correspond à l'acquisition d'une série d'images à une fréquence de 60 Hz (= Hertz = 60 images par seconde) (**Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020 ; OMS, 2010**) sur une durée de 0,5 seconde, soit 30 images par champ. Les recommandations de l'ESHRE de 1998 préconisent en effet une fréquence d'acquisition minimale de 50 Hz (**Mortimer et al, 1988**) ainsi qu'une durée minimale d'acquisition de 0,5 seconde pour obtenir des valeurs cinétiques fiables d'une trajectoire et ainsi étudier l'hyperactivité du mouvement.

Lors d'une acquisition, chaque image d'un champ au microscope est transmise par la caméra au logiciel pour ensuite être convertie en une image numérique (**Mortimer, 2000**) : la digitalisation. Avant la capture de chaque champ, la luminosité doit être adaptée manuellement sur le microscope après avoir fait la mise au point (netteté à adapter sur l'image à l'écran) : le logiciel prévoit pour cela un indicateur de luminosité qui doit se trouver entre 55 et 65 pour être acceptable. Puis, chaque spermatozoïde et sa trajectoire correspondante sont analysés individuellement. Le microscope optique à contraste de phase négatif permet une identification du spermatozoïde optimisée : on observe les spermatozoïdes blancs grâce à leur réfringence sur un fond noir (**Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020 ; Mortimer, 2000**). Cette réfringence reste constante même si le spermatozoïde est mobile car la rotation de la tête spermatique lors du mouvement ne modifie pas l'intensité de la réfringence (**Mortimer, 2000**).

Lors de la digitalisation de l'image, le logiciel détermine le nombre de pixels pour chaque tête spermatique grâce au contraste entre la tête blanche et le fond noir. Il existe alors un nombre de pixels acceptable pour que la surface puisse être identifiée comme une tête de spermatozoïde : cela correspond aux valeurs minimum et maximum de taille de la tête nécessaires à l'identification par le logiciel de chaque spermatozoïde (**Mortimer, 2000**).

L'identification du spermatozoïde est réalisée selon trois critères :

- ❖ La taille de la tête spermatique : minimum $5 \mu\text{m}^2$ – maximum $50 \mu\text{m}^2$
- ❖ La réfringence de la tête spermatique et du flagelle : luminosité minimum de la tête 170 – luminosité minimum du flagelle 70
- ❖ L'élongation correspondant au rapport de la longueur et de la largeur de la tête : minimum 1% - maximum 100%

La position d'un spz est définie par le centre de la tête spermatique et ses coordonnées (x,y) sont alors déterminées. Pour chaque position de la tête d'un spz, le logiciel calcule la probabilité de la nouvelle position sur l'image suivante grâce une zone de probabilité au rayon prédéterminé (**Figure 7**). Ce rayon est la distance maximum qu'un spz est censé parcourir sur la période de temps séparant 2 images (distance définie par le fournisseur : $10\mu\text{m}$).

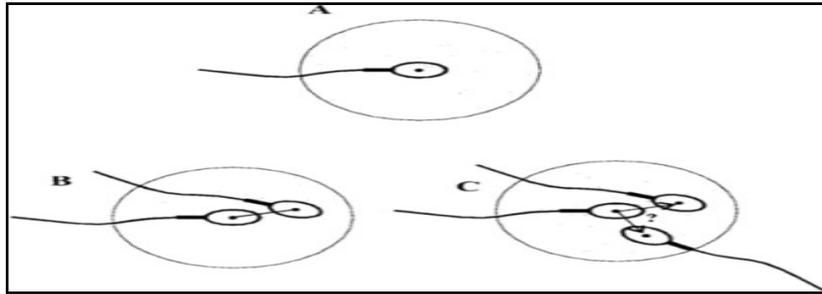


Figure 7: Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (A), position probable sur la prochaine image (B), complications possibles lorsque plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone de probabilité (Mortimer, 2000).

La trajectoire d'un spermatozoïde est alors reconstruite à partir de la succession des différentes positions de la tête sur les 30 différentes images constituant un champ (**Figure 8**).

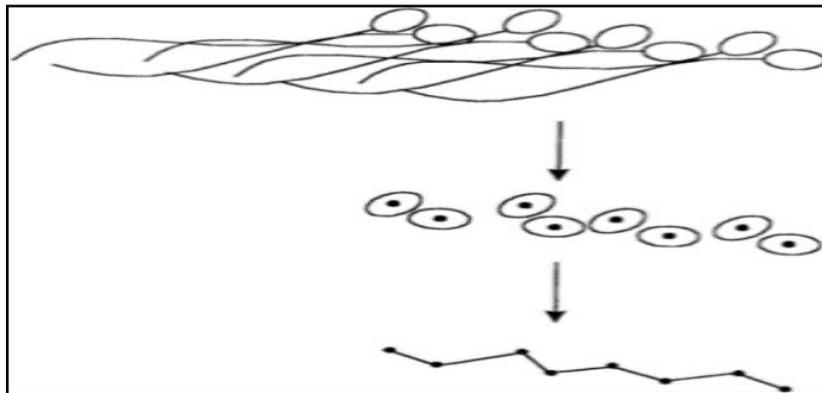


Figure 8: Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde. Les points sont alors reliés pour obtenir la reconstruction de la trajectoire (Mortimer, 2000).

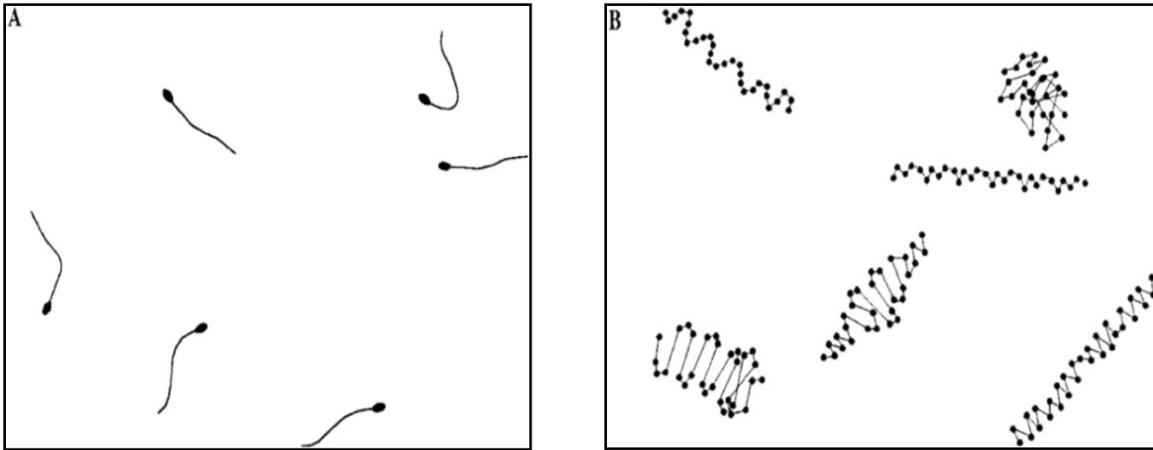


Figure 9: Numérisation par le CASA et reconstructions des trajectoires des spermatozoïdes. Différences entre les trajectoires en lien avec les différences dans le battement flagellaire (Mortimer, 2000).

Des erreurs de trajectoires peuvent résulter de la présence de plusieurs spermatozoïdes dans une même zone de probabilité voire même leur collision. Ces erreurs sont minimales pour une concentration spermatique inférieure à 30 millions/mL (**Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020**) mais deviennent de plus en plus significatives avec l'augmentation de la concentration. Sachant que la probabilité de collision augmente avec la concentration, la mobilité et le nombre d'images par trajectoire, les collisions sont minimisées grâce à l'analyse uniquement des 10 premières images pour la détermination de la concentration de spermatozoïdes mobiles, la concentration de spermatozoïdes immobiles et la fraction de spermatozoïdes mobiles. Les paramètres cinétiques sont quant à eux déterminés à partir de la totalité des images (**Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020**).

Grâce à la reconstruction de la trajectoire du spermatozoïde, le logiciel peut fournir des paramètres « annexes » que sont les paramètres cinétiques (**Figure 10**) dont le manuel de l'OMS 2010 donne les définitions pour les principaux suivants :

- ❖ **VSL** (Straight line velocity) : la vitesse en ligne droite ($\mu\text{m/s}$) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- ❖ **VCL** (Curvilinear velocity) : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).
- ❖ **VAP** (Average path velocity) : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) selon la trajectoire moyenne.
- ❖ **ALH** (Amplitude of lateral head displacement) : l'amplitude de déplacement latéral de la tête

(μm) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne (selon la trajectoire moyenne).

- ❖ **LIN** (linearity) : la linéarité correspond au ratio VSL/VCL en pourcentage et illustre la direction de la trajectoire
- ❖ **STR** (Straightness) : la rectitude de trajectoire correspond au ratio VSL/VAP et représente la linéarité de la trajectoire moyenne

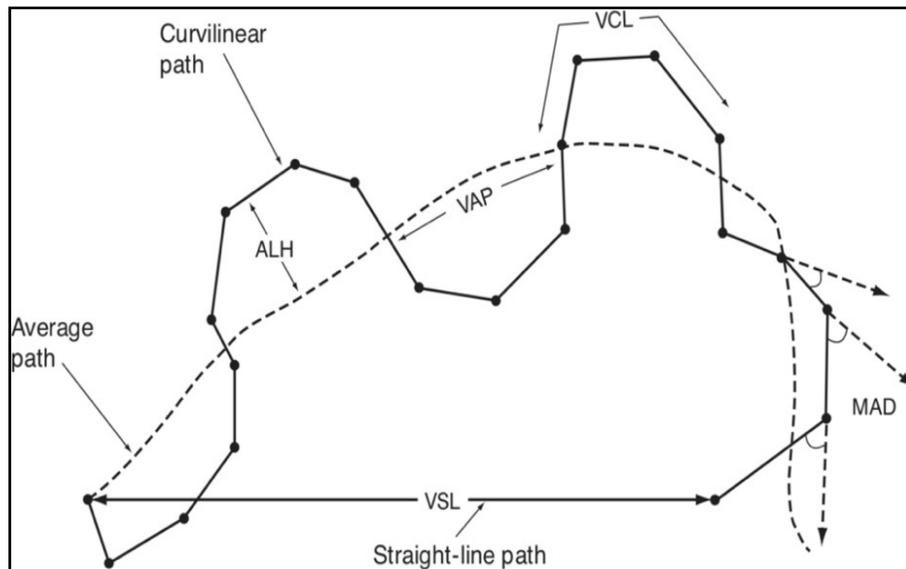


Figure 10: Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (manuel de l'OMS, 2010).

Cependant, le manuel de l'OMS 2010 ne fournit pas de valeurs de référence pour ces paramètres. En effet, les différents systèmes CASA n'utilisent pas les mêmes algorithmes pour obtenir ces paramètres cinétiques ce qui rend difficile à ce jour la comparabilité de ces mesures entre les systèmes (OMS, 2010).

Un inconvénient du système CASA est que la forme de la trajectoire du spermatozoïde peut être modifiée selon le nombre d'images acquises par seconde. En effet, un même spermatozoïde analysé à deux fréquences différentes (respectivement 30 et 60 images par seconde) possèdera une trajectoire reconstruite et donc des valeurs cinétiques différentes (Figure 11) (Mortimer et al, 1988).

A noter, une fréquence d'acquisition d'images augmentée permet d'obtenir plus d'informations disponibles sur la trajectoire. Cela souligne l'importance du réglage des paramètres CASA et l'impact potentiel sur les résultats, l'OMS recommande ainsi une fréquence d'acquisition de 60 images par seconde (soit 60 Hz).

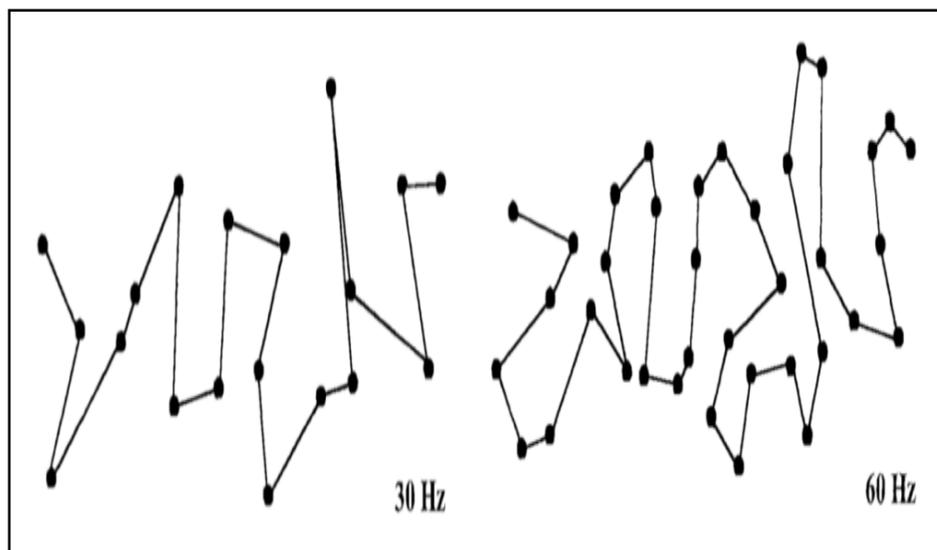


Figure 11: Trajectoires d'un même spz à deux fréquences d'acquisition différentes (30 Hz et 60 Hz) (Mortimer et al, 1988).

Par conséquent, plusieurs paramètres cinétiques des spermatozoïdes sont dépendants de la fréquence d'acquisition dont par exemples les valeurs VCL et ALH qui seront plus élevées lors d'une augmentation de la fréquence (**Mortimer et al, 1988**).

Des cut-offs (valeur maximale ou minimale) de certains de ces paramètres cinétiques (**Tableau 2**) sont définis afin de pouvoir classer chaque spermatozoïde dans la catégorie de mobilité correspondante selon les recommandations de l'OMS 2010 : mobilité progressive (anciennement « a+b »), mobilité non progressive (anciennement « c ») et immobiles (anciennement « d »).

Tableau 2 : Les paramètres cinétiques et leurs fonctions (Manuel fournisseur Hamilton Thorne, 2020).

Paramètres cinétiques	Fonction
STR progressive (STRP)	Valeur minimale de STR en % requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive.
VAP progressive (VAPP)	Valeur minimale de VAP requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive.
VAP lente (VAPS)	Valeur maximale de VAP en $\mu\text{m/s}$ pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente.
VSL lente (VSLS)	Valeur maximale de VSL en $\mu\text{m/s}$ pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente.
Algorithme statique	Détermine quel algorithme est utilisé pour définir les spermatozoïdes statiques. L'algorithme utilisé dans notre cas est le multiplicateur de largeur statique.
VAP statique (VAPSTATIC)	Valeur maximale de VAP pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique.
VSL statique (VSLSTATIC)	Valeur maximale de VSL pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique.
Multiplicateur de largeur statique	Basé sur la largeur de la tête spermatique et définit le mouvement maximum qu'une tête spermatique peut faire tant en étant toujours classifié comme statique.

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. Objectif

Dans le cadre d'amélioration des taux de réussite de l'insémination artificielle, cette présente étude vise à étudier l'effet de la méthode de décongélation sur la mobilité et la viabilité du sperme congelé dans les paillettes d'insémination artificielle caprine par le biais d'une analyse du sperme avec le système CASA, afin de déterminer la méthode la plus fiable pour décongeler la semence caprine

2. Lieu de l'expérimentation

Notre étude a été déroulée au niveau du Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction (LBRA), Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1.

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Matériel biologique

Les paillettes de semence utilisées dans cette expérimentation étaient issues de deux races : Saanen et Alpine, produites par CNIAAG.

La somme des paillettes utilisées dans cette étude était 24 paillettes de semence caprine cryo-conservée dans de l'azote liquide, réparties en 4 lots de 6 paillettes pour chaque méthode de dégellement, dans chaque répétition on utilise 2 paillettes issues de deux boucs à la fois pour obtenir le volume nécessaire et éviter l'effet de race.

3.1.2. Matériel de laboratoire

- Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), constitué d'un microscope biologique, une caméra et un ordinateur avec le logiciel d'analyses SCA.
- Un bain -marie pour la décongélation des paillettes.
- Un vortex pour l'agitation des dilutions.
- Les micropipettes, les embouts et les seringues.
- Les tubes secs et les Ependorffs, le ciseau, les gants, le papier absorbant.
- Les lames et les lamelles.
- L'eau distillée et Les colorants (l'éosine et la nigrosine).

- L'air chaud en utilisant un séchoir.
- Thermomètre.

3.2. Méthodes décongélation de la semence

La décongélation de la semence a été faite par l'immersion des paillettes de semence dans un bain-marie à des températures différentes, pendant des périodes différentes.

Dans cette expérience nous avons étudié 4 méthodes de décongélation des paillettes :

- 1ère méthode : à 37°C pendant 30s.
- 2ème méthode : à 50°C pendant 10s.
- 3ème méthode : à 70°C pendant 5s.
- 4ème méthode : à l'air chaud pendant 15-20s.

Remarque : La démarche à suivre est la même dans chaque méthode.

On fait sortir les paillettes de la cuve d'azote et l'essuyer avant de les mettre dans un bain marie pour effectuer la décongélation à la température préalablement réglée et le temps nécessaire à chaque expérience, quand le temps est écoulé on dessèche avec du papier absorbant ; Ensuite, à l'aide d'un ciseau on coupe le bout de la paillette pour pouvoir récupérer la semence dans un tube sec ou un Eppendorf.

On dilue la semence par l'eau distillée à titre de (1/9) ; Ensuite on agite par le vortex.



Figure 12: Cuve d'azote contenant les paillettes de semence caprine.

3.3. Examen macroscopique de la semence

Le volume de la semence contenu dans les paillettes était de 0.25 ml. Le sperme était de couleur blanc jaunâtre et d'aspect laiteux.



Figure 13: Paillette de semence caprine (couleur blanc jaunâtre avec un aspect laiteux).

3.4. Examen microscopique de la semence

3.4.1. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes

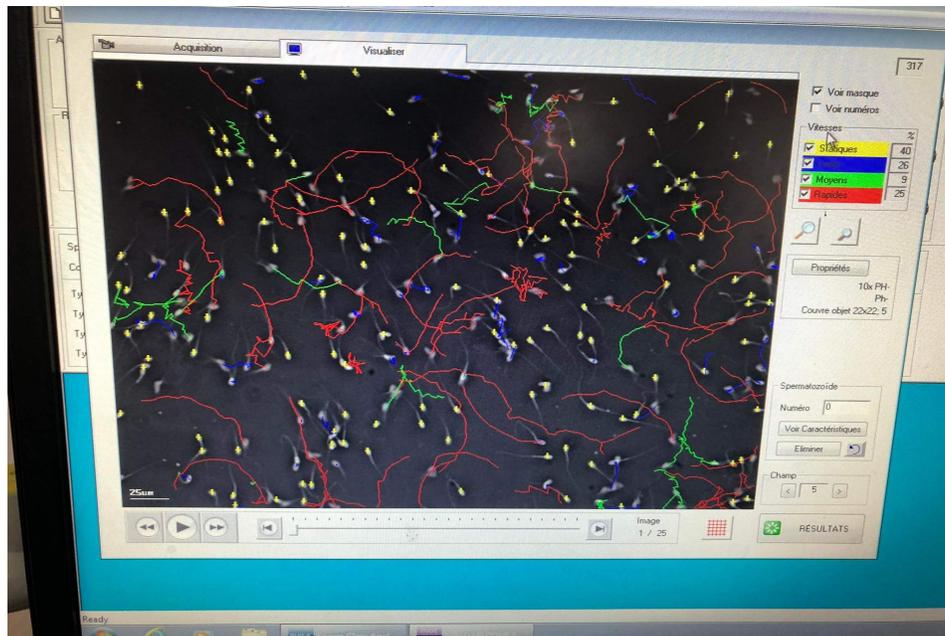
Après dilution de la semence décongelée à titre de 1/9 pour avoir environ 200 spermatozoïdes par champs d'observation. On prélève 0,1 ml de la semence diluée à l'aide d'une micropipette et on dépose une goutte sur une lame puis appliquer une lamelle. Ensuite la lame est posée sur le microscope SCA qui est menée d'une platine chauffante réglée à 37°C.

La visualisation de la mobilité a été effectuée par le microscope SCA au grossissement $\times 10$, à contraste de phase PH 1 négatif.

Remarque : Au minimum, 600 spz provenant des champs sélectionnés aléatoirement ont été étudié. Il faut éviter les champs trop encombrés.



Figure 14: Méthode d'évaluation de la mobilité spermatique



- Statique
- Lent
- Moyen
- Rapide

Figure 15: Visualisation des résultats de la mobilité spermatique par le CASA

3.4.2. Evaluation de la vitalité des spermatozoïdes

L'examen de la vitalité est réalisé par la coloration à l'éosine-nigrosine (Figure 21), qui permet de mettre en évidence de l'intégralité de la membrane cytoplasmique des spermatozoïdes.

A l'aide d'une micropipette, on prélève 10 µl de la semence diluée à 1/9 par la suite on la dépose sur une lame, puis on rajoute 10 µl de l'éosine et 10 µl de nigrosine, on mélange on laisse agir puis on étale à l'aide d'une lame inclinée à 45° ; Ensuite on laisse le frottis sécher à l'air libre quelques minutes. La lecture se fait au microscope SCA au grossissement x60.

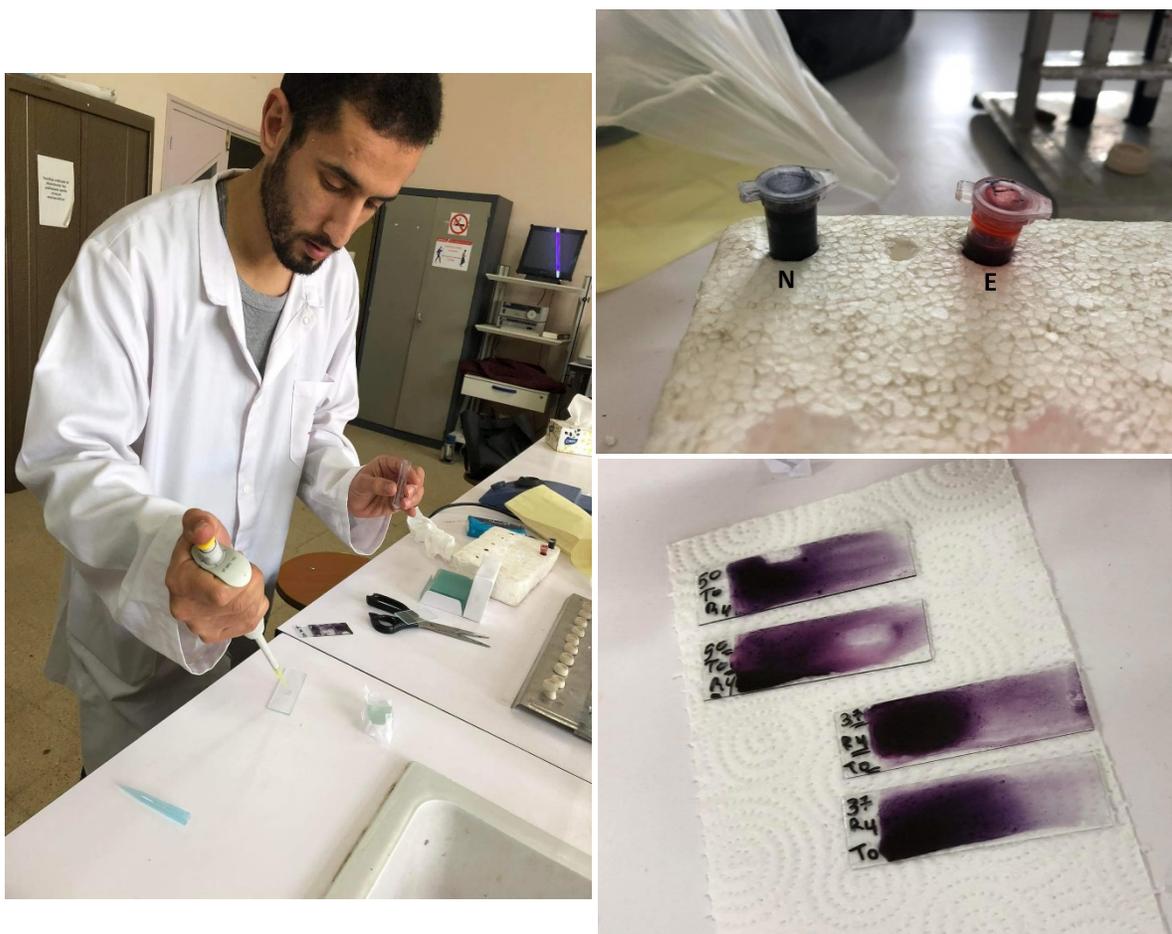


Figure 16: Méthode d'évaluation de la viabilité spermatique (N= nigrosine / E= eosine)

Remarque : Au microscope, les spermatozoïdes vivants se colorent en blanc et les morts se colorent en rose (Figure 22).

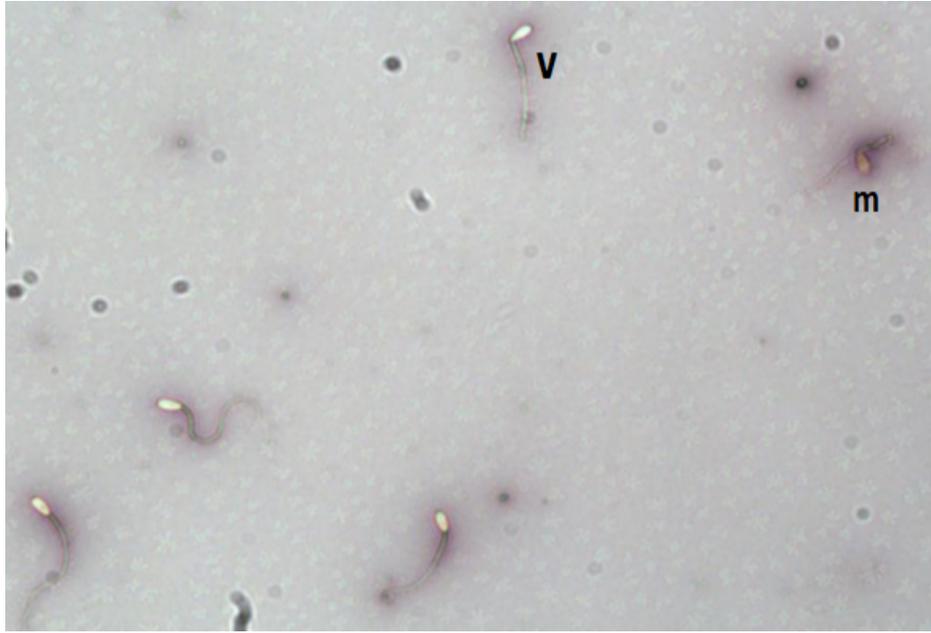


Figure 17: Une image au microscope qui représente un spermatozoïde coloré en rose (mort) et des spz non colorés (vivants) : v= vivant / m= mort

4. Analyses des résultats

Les résultats obtenus ont été traité par le logiciel CASA. L'analyse des résultats a été faite en deux temps : T0 et T2 (après 2 H d'incubation à 37°C) pour chaque protocole de décongélation.

Les paramètres à analyser sont : la mobilité totale, Les paramètres dynamiques de la mobilité , la progression motile et la vitalité.

4.1. Analyse statistique des résultats

L'analyse des principaux facteurs de variations des paramètres relatifs à la mobilité a été réalisée par la technique ANOVA. On ne retient que les paramètres présentant des variations significatives.

- Comment interpréter les codes de signification dans R ?

Lorsque on effectue une analyse de régression ou une ANOVA dans R, les tables de sortie contiendront les valeurs de p pour les variables utilisées dans l'analyse ainsi que les codes de signification correspondants. Ces codes de signification sont affichés sous la forme d'une série d'étoiles ou d'un point décimal si les variables sont statistiquement significatives.

(<https://www.statology.org/significance-codes-in-r/>).

significance code	p-value
***	[0, 0.001]
**	(0.001, 0.01]
*	(0.01, 0.05]
.	(0.05, 0.1]
	(0.1, 1]

Figure 18: codes de signification ANOVA

Les paramètres dynamiques de la mobilité sont : VLC, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF :

- ❖ **VSL** (Straight line velocity) : La vitesse en ligne droite ($\mu\text{m/s}$) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- ❖ **VCL** (Curvilinear velocity) : La vitesse ($\mu\text{m/s}$) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).
- ❖ **VAP** (Average path velocity) : La vitesse ($\mu\text{m/s}$) selon la trajectoire moyenne.
- ❖ **ALH** (Amplitude of lateral head displacement) : L'amplitude de déplacement latéral de la tête (μm) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne (selon la trajectoire moyenne).
- ❖ **LIN** (linearity) : La linéarité correspond au ratio VSL/VCL en pourcentage et illustre la direction de la trajectoire
- ❖ **STR** (Straightness) : La rectitude de trajectoire correspond au ratio VSL/VAP et représente la linéarité de la trajectoire moyenne (**Post , 2019**).

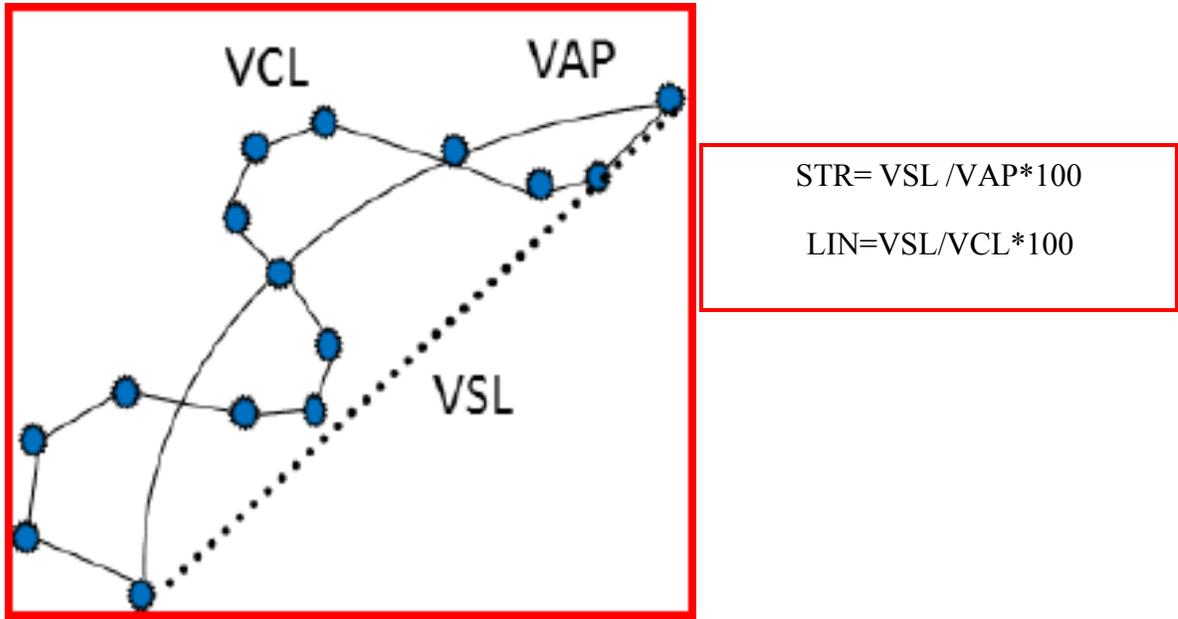


Figure 19: Représentation schématique des VAP, VCL et VSL (Source de select breeders services) (Post , 2019)

L'évaluation de la mobilité par SCA se base sur les paramètres suivants :

- Aire de particules est comprise entre 3 à 70 μm .
- Classification des spermatozoïdes par type selon que :
 - ❖ VCL et $VAP \leq 10 \mu\text{m/s}$: spermatozoïdes lents
 - ❖ $45 \leq VAP \leq 45 \mu\text{m/s}$: spermatozoïdes moyens
 - ❖ $45 \leq VLC$ et $VAP \leq 75 \mu\text{m/s}$: spermatozoïdes rapides
- STR supérieur ou égale à 80 % indique une bonne semence.

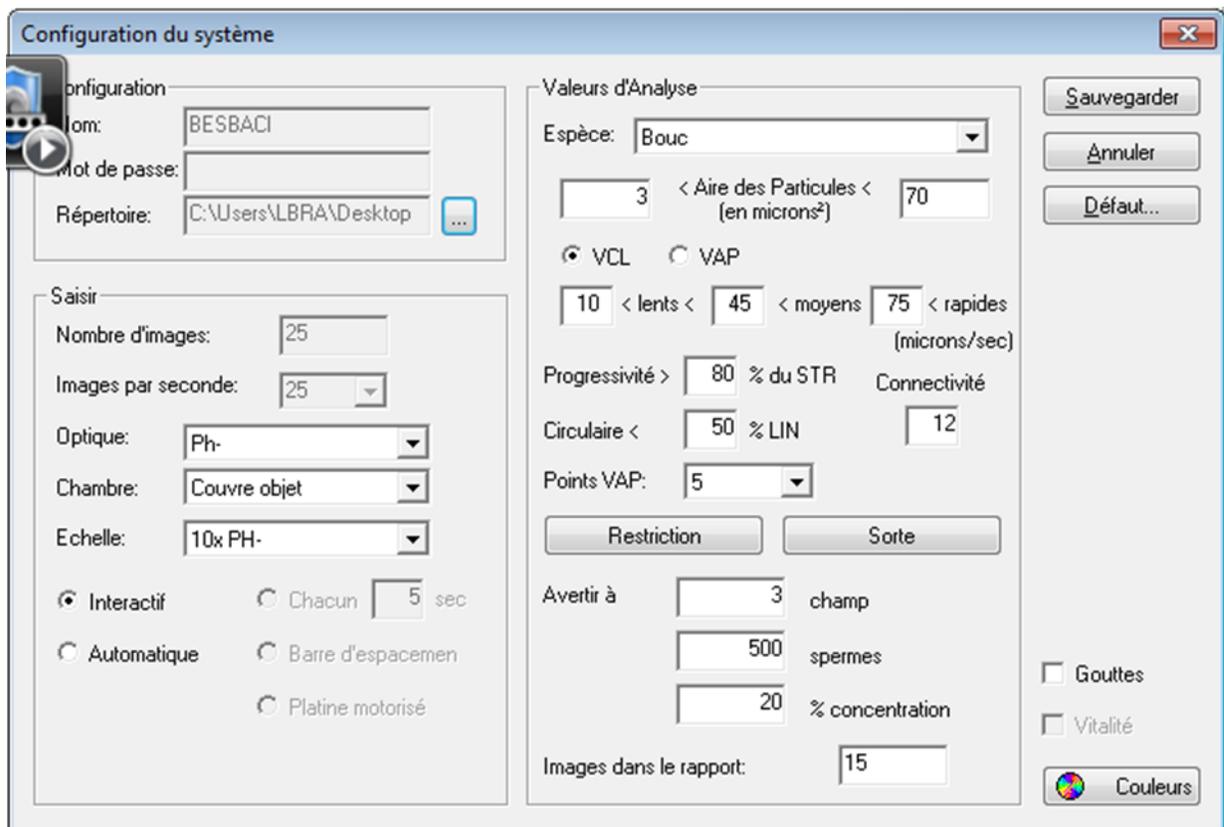


Figure 20: configuration du système CASA utilisé dans cette expérience

L'évaluation de **la vitalité** par le CASA est basée sur l'apport de la coloration rosâtre ou non par les spz ce qui indique l'intégralité ou non des membranes cytoplasmiques (c.-à-d. : les spermatozoïdes vivants se colorent en blanc et les morts se colorent en rose).

RESULTATS ET DISCUSSION

De nombreuses recherches sont effectuées pour déterminer la température optimale de décongélation, et la durée adéquate qui peuvent donner le pourcentage le plus élevé des spermatozoïdes viables après la décongélation.

Il a été montré qu'une augmentation de la viabilité post-dégel entraînera une augmentation de la fertilité du sperme (**Lyashenko A, 2015**).

Les résultats sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 3: résultat de la motilité totale, la progression motile et la vitalité

	Média	Temps		SE	P-value		
		T0	T2		Technique	Temps	Interaction tech&temps
% Motilité	37°C	56.1	15.1	4.75	<0.001	<0.001	0.015
	50°C	65.0	59.3				
	70°C	52.5	33.3				
	AC	39.6	16.3				
% Prog Mot	37°C	26.91	5.71	4.24	0.13	0.001	0.15
	50°C	16.42	14.79				
	70°C	32.84	16.83				
	AC	20.73	11.69				
Vitalité	37°C	56.5	34.2	5.56	0.004	0.002	0.32
	50°C	64.3	61.5				
	70°C	64.2	53.0				
	AC	52.2	32.7				

1. Motilité

1.1. Motilité massale (totale)

La technique de décongélation a affecté significativement la motilité totale ($p < 0.001$). Des effets de temps ($P < 0.001$) et des interactions technique x temps ($p = 0.015$) ont été enregistrés pour la motilité totale.

Les mouvements des spermatozoïdes peuvent être évalués au microscope entre lame et lamelle sur une platine de microscope chauffante. On distingue la mobilité totale et la mobilité

progressive. La mobilité totale correspond au pourcentage de spermatozoïdes qui se déplacent quelle que soit leur trajectoire.

La mobilité progressive reflète, quant à elle, la proportion de spermatozoïdes se déplaçant en ligne droite. L'évaluation de ces paramètres est fortement liée à l'opérateur et subjective, ce qui limite les comparaisons entre examens **(Ponthier et al, 2014)**.

Classiquement, la température et la durée référentielles pour les processus de décongélation est à 37°C pendant environ 30s. **(Hanzen, 2016)**

Dans cette étude, l'évaluation de la motilité a été effectuée en deux temps : immédiatement après dégelèment des paillettes de la semence (T0) et après 02 heures d'incubation post-dégel à 37°C dans le bain marie (T2).

On a observé en (T0) que le % de la motilité est maximal à 65% dans le cas de décongélation à 50°C pendant 10s. En deuxième place vient le protocole de décongélation à 37°C pendant 30s par 56.1%, suivi par 52.5% pour la décongélation en 70°C pendant 5s et en dernier lieu la décongélation à l'air chaud par 39.6%.

Après deux heures d'incubation (T2), la motilité est maximale à 59.3% pour la méthode de dégelèment à 50°C pendant 10s, puis à 33.3% pour la décongélation à 70°C en 5s; en troisième place la décongélation à l'air-chaud par 16.3% et en dernier par 15.1% vient la méthode de décongélation à 37° pendant 30s.

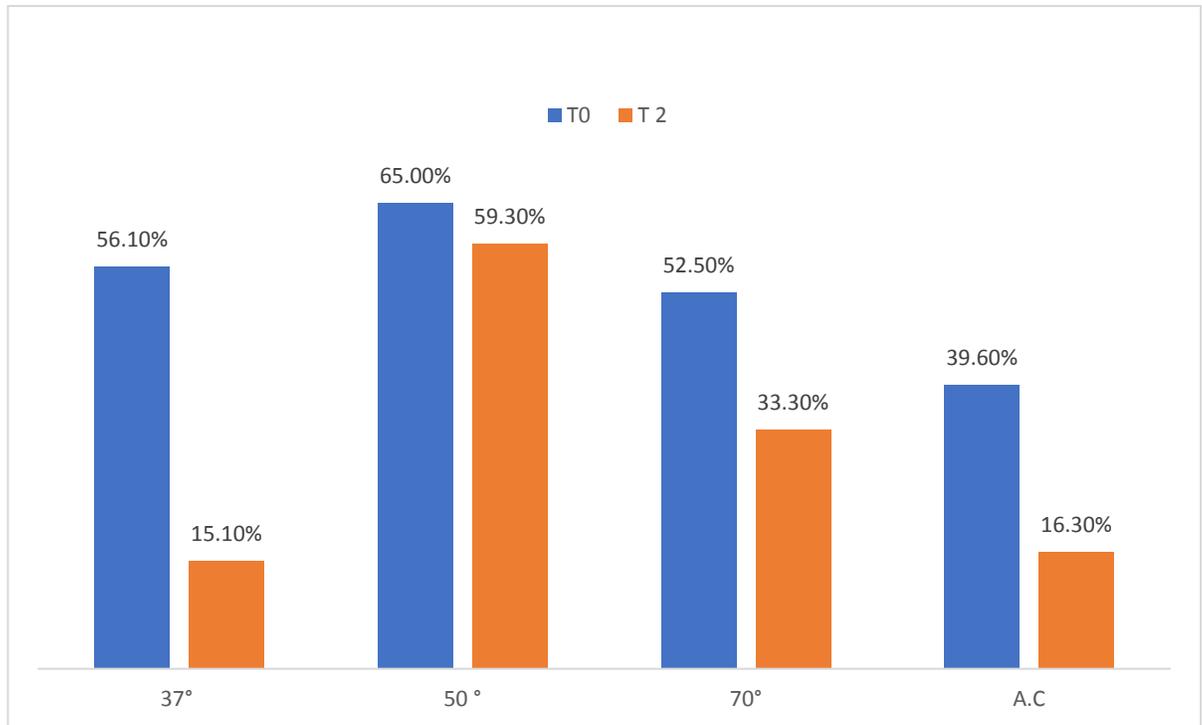


Figure 21: Effet de la température de décongélation sur la motilité des spermatozoïdes à T0 et après 2h d'incubation

1.2. Motilité individuelle (progressive)

La progression motile ne semble pas affectée par la technique de décongélation ($p=0.13$), des effets de temps ($p=0.001$) ont été enregistrés, mais pas d'interactions technique x temps ($p=0.15$).

La mobilité progressive est définie comme étant une VAP supérieure à $30 \mu\text{m/s}$ et une rectitude (STR) supérieure à 50 % (Ponthier et al, 2014). Vidament a défini la mobilité progressive comme étant une vitesse supérieure à $40 \mu\text{m/s}$ et une linéarité supérieure à 80% (Vidament M, 2005).

On peut représenter les valeurs de la motilité progressive calculées dans cette étude par le diagramme suivant :

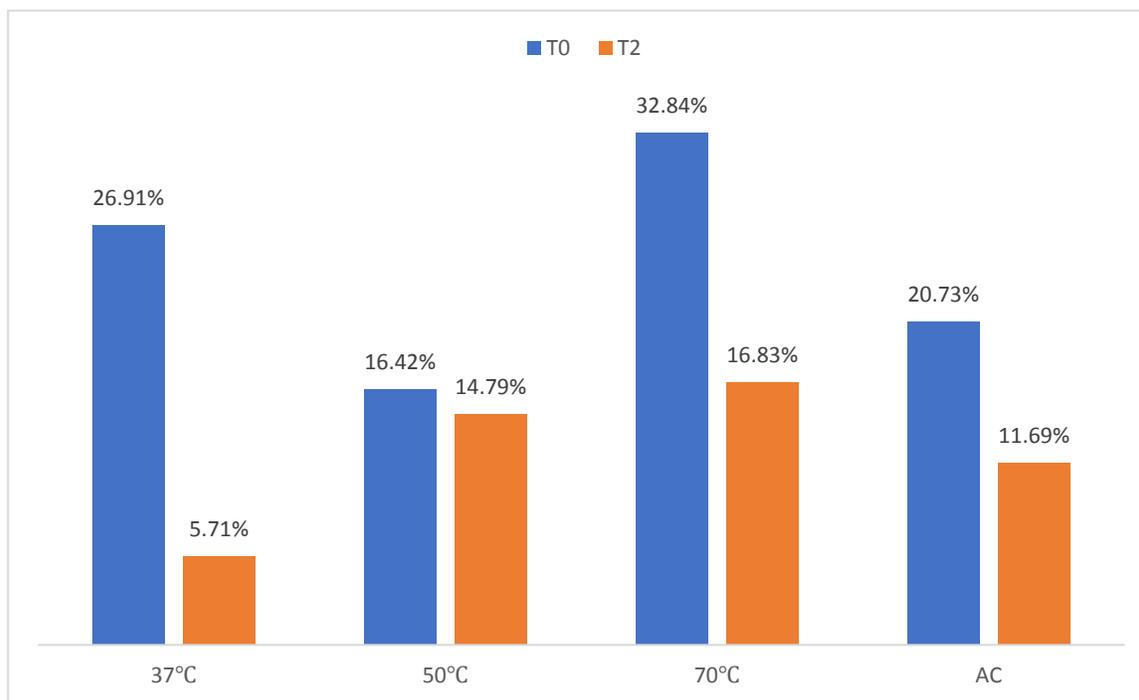


Figure 22: la progression motile en %

Comme nous voyons, la décongélation de la semence caprine à 70°C pendant 5s a donné le pourcentage le plus élevé des spermatozoïdes progressifs : 32.84% en T0 et 16.83% en T2.

2. Vitalité

La technique de décongélation a affecté significativement la vitalité ($p=0.004$). Des effets de temps ($P=0.002$) ont été enregistrés, mais pas d'interactions technique x temps ($p=0.32$).

La vitalité de la semence après différentes méthodes de décongélation a été appréciée en deux temps aussi, (T0) : immédiatement après décongélation et coloration par éosine-nigrosine; et après 2h d'incubation à 37° post-dégel et coloration par éosine-nirgosine (T2).

On a noté que, l'augmentation de la température de décongélation a augmenté le % des spz vivants après le processus.

En T0, le nombre des spz vivants est maximal à la température de décongélation de 50°C par 64.3% et à 70°C par 64.2%. Ensuite à 37°C le pourcentage est de 56.5% suivi par 52.2% à la décongélation par l'air-chaud.

Après 2h d'incubation, les résultats sont les suivant : 61.5% pour la décongélation à 50°C, 53% pour la décongélation à 70°C, 34.2% pour le protocole de 37°C et finalement 32.7% pour le dégelément à l'air-chaud.

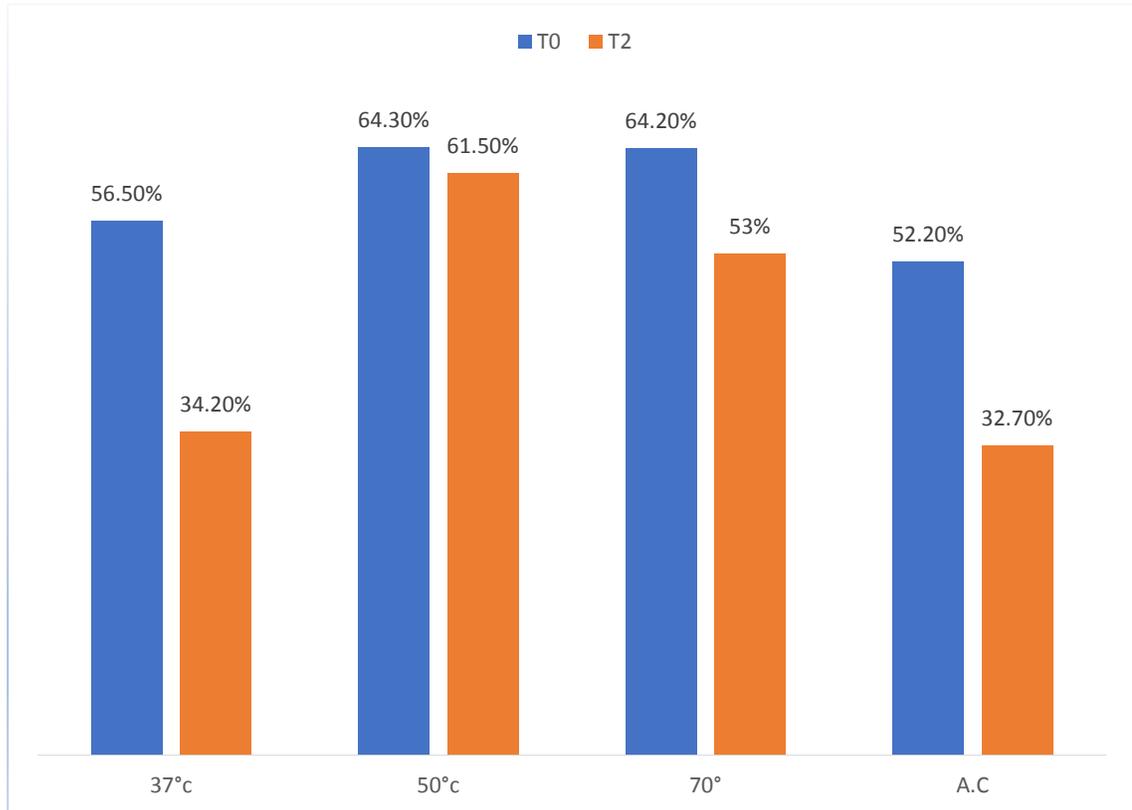


Figure 23: effet de la température de décongélation sur la vitalité des spz

3. Les paramètres dynamiques (cinétiques) de la mobilité

le tableau ci-dessous résume tous les paramètres analysés à l'aide du logiciel SCA en deux temps : immédiatement après décongélation et après 2h d'incubation à 37°C :

Tableau 4 : La moyenne de VCL, VSL, VAP et STR en (um/s), ALH en (um), BCF (Hz) et LIN en(%)

Sperm motility descriptors	Média	Temps		SE	P-value		
		T0	T2		Technique	Temps	Interaction tech&temps
VCL	37°C	53.8a	26.2a	0.795	<0.001	<0.001	<0.001
	50°C	43.2b	45.0b	0.696			
	70°C	52.8a	50.9c	0.827			
	AC	48.0c	41.1b	0.763			
VAP	37°C	37.3	13.5	0.681	<0.001	<0.001	<0.001
	50°C	27.8	27.6	0.596			
	70°C	39.6	30.3	0.709			
	AC	32.8	22.1	0.654			
VSL	37°C	27.86	8.16	0.612	<0.001	<0.001	<0.001
	50°C	18.91	18.95	0.536			
	70°C	30.34	19.77	0.637			
	AC	23.36	14.09	0.588			
STR	37°C	0.578	0.470	0.008	0.07	<0.001	<0.001
	50°C	0.566	0.563	0.007			
	70°C	0.625	0.511	0.008			
	AC	0.571	0.491	0.007			
WOB	37°C	0.608	0.497	0.005	<0.001	<0.001	<0.001
	50°C	0.606	0.547	0.005			
	70°C	0.670	0.544	0.006			
	AC	0.610	0.500	0.005			
LIN	37°C	0.413	0.265	0.007	<0.001	<0.001	<0.001
	50°C	0.390	0.350	0.006			
	70°C	0.476	0.331	0.007			
	AC	0.408	0.300	0.007			
BCF	37°C	5.98	4.00	0.102	<0.001	0.7	<0.001
	50°C	5.01	5.76	0.089			
	70°C	6.19	5.51	0.106			
	AC	4.66	5.10	0.098			
ALH	37°C	1.97	1.42	0.027	0.03	0.11	<0.001
	50°C	1.89	1.94	0.023			
	70°C	1.85	2.16	0.028			
	AC	1.95	1.93	0.026			

Parmi ces paramètres, les plus utilisés sont : VCL, VSL, VAP, LIN et STR.

La technique de décongélation a significativement affecté la VCL ($P < 0.001$). Ce paramètre a été significativement évolué dans le temps ($P < 0.001$). De même, nous avons constaté une interaction technique x temps significative pour ce paramètre ($P < 0.001$).

La VSL a été aussi significativement affectée par la technique de décongélation. Ce paramètre a été significativement évolué dans le temps ($P < 0.001$) et une interaction technique x temps significative pour ce paramètre ($P < 0.001$) a été enregistrée.

De la même manière, la vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP) a été significativement affectée par la technique de décongélation. Elle a été significativement évoluée dans le temps ($P < 0.001$) et nous avons constaté une interaction technique x temps significative pour ce paramètre ($P < 0.001$).

La linéarité (LIN), Ce paramètre aussi a été significativement affecté par La technique de décongélation. IL a été significativement évolué dans le temps ($P < 0.001$). De même, nous avons constaté une interaction technique x temps significative pour ce paramètre ($P < 0.001$).

La rectitude de la trajectoire (STR) a été significativement affectée par la technique de décongélation ($p = 0.07$), une évolution dans le temps ($P < 0.001$) et une interaction technique x temps ($P < 0.001$) ont été significativement enregistrées.

On peut résumer les valeurs de ces paramètres dans le tableau suivant :

	VCL (um/s)		VAP (um/s)		VSL (um/s)		LIN %		STR %	
	T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2
37°C	53.8	26.2	37.3	13.5	27.86	8.16	41.3	26.5	57.8	47.0
50°C	43.2	45.0	27.8	27.6	18.91	18.95	39.0	35.0	56.6	56.3
70°C	52.8	50.9	39.6	30.3	30.34	19.77	47.6	33.1	62.5	51.1
A.C	48.0	41.1	32.8	22.1	23.36	14.09	40.8	30.0	57.1	49.1

D'après le tableau, On peut constater que la méthode de décongélation à 70°C a donné des résultats plus élevés par rapport les autres méthodes qui sont respectivement en T0 et T2 :
VCL = 52.8 / 50.9 ; VAP = 39.6/30.3 ; VSL = 30.34/19.77 ; LIN= 47.6% / 33.1% ; STR = 62.5% / 51.1%.

Selon le manuel OMS 2010, La VCL et la VAP doivent être comprises entre 45 $\mu\text{m/s}$ et 75 $\mu\text{m/s}$ pour classer les spermatozoïdes comme spz rapides (**POST , 2019**).

La LIN représente le % de linéarité de la trajectoire curviligne ; c'est l'un des plus importants paramètres de mobilité du spermatozoïde. Ce dernier doit consommer moins d'énergie pendant son chemin vers l'oviducte et plus précisément l'ampoule pour pouvoir féconder l'ovocyte (**OMS, 2010**).

CONCLUSION



Au terme de cette expérience, et en basant sur les résultats actuels obtenus à l'aide du système CASA et leur analyse statistique via la technique ANOVA. On a constaté que la méthode de décongélation a **un effet remarquable sur les paramètres de la mobilité et la viabilité** de la semence caprine congelée dans les paillettes d'insémination artificielle.

D'une part, La méthode de décongélation à 50°C a donné des meilleurs résultats concernant la mobilité totale et la viabilité du sperme caprine.

D'autre part, La méthode de décongélation à 70°C était plus performante en ce qui concerne la mobilité progressive et les paramètres dynamique de la motilité individuelle (VCL, VSL, VAP, LIN et STR) mais aussi des résultats similaires à ceux obtenus par le dégivrage à 50°C concernant la viabilité.

Finalement, l'évaluation de ces paramètres est fortement subjective et liée à l'opérateur, ce qui limite les comparaisons entre examens. Mais d'après cette étude, la méthode qui semble la plus efficace qu'on peut adopter pour le dégivrage des paillettes de la semence caprine **c'est la méthode de décongélation à 70°C pendant 5s.**

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albert et Jean, 2001. « Biologie du développement » .5ème édition de l'abrégé
2. Altman P.L, et coll, 1962. « Growth » Biol. Handbooks, 1 vol, Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Washington, 608p.
3. Amann RP; Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*.2014 Jan; 81(1):5–17.e1–3.
4. Andersen K, 1969. Insemination with frozen semen in goats. *Eur. Ass. Anim. Prod. Meeting 2*: 23-26.
5. Ávila–Portillo, L.M.; Madero, J.I.; López, C.; León, M.F.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.G.; Gómez, C.; Lozano, J.M.; Reguero, M.T. Fundamentos da criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetrícia y Ginecología*, v.57, n.4, p.291-300, 2006.
6. Bailey J.L; Morrier A; Cormier N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 393-401.
7. Bakhach, J, V. Casoli et J.C. Guimberteau. 2007. La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547.
8. Barbat A ; Druet T ; Bonaiti B ; Guillaume F et Colleau J. 2005. Overview of phenotypic fertility results after artificial insemination in the three main french dairycattle breeds. *Rencontres Recherches Ruminants*, 12: 137-140.
9. Baril G ; Chemineau O ; Cognié Y, 1993. « Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins ».
10. Barone R, 1978. « Anatomie comparée des mammifères domestiques». Tome 3, splanchnologie, Fascicule 2, appareil urogénital, 951p.p89-447.
11. Barth; Albert D; Pamela A; Bowman. 1988. “Method of Thawing Bovine Semen.” *Canadian Veterinary Journal* 29(April): 366–69.
12. Batista, M., T. Niño, D. Alamo, N. Castro, M. Santana, F. González, F. Cabrera et A. Gracia. 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* 71: 1307-1315.
13. Belhamiti T, 2006. Thèse magister : Variation de la production spermatique, insémination artificielle et diagnostique de la gestation par échographie chez les caprins

de la race locale dans la région de Tiaret.

14. Belkasmi Farida, 2011-2012. Effet de la synchronisation et de l'insémination artificielle sur les performances de reproduction et la productivité de l'élevage ovin dans la région semi aride Algérienne. Univ Farhat Abbas Sétif, P19.
15. Bever-Gilmore, J.A. 1998. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa, Purdue University, Indiana.
16. Bowen, J.A., E.S. Fonda et D.L. Kooyman. 1988. Ultrastructural study of goat spermatozoa frozen at different diluent osmolarities. J. Anim. Sci. 39: 312-315.
17. Branca A, Cappai P, 1989. « Osservazioni sul controllo della riproduzione nelle specie caprina : esperienze effectuate in Sardegna ». Symp Intl. La riproduzione nei piccolo ruminante : Basi fisiologiche e aspetti applicative, Varese, 115-129.
18. Chavette P, 1992. « Examen de la fonction génitale de l'étalon » Rec. Med.Vet., 168(6/7), 395-410.
19. Collin, S., M.A. Sirard, M. Dufour et J.L. Bailey. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. J Androl 21: 938-943.
20. Corteel J.M., 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal : effet du glucose. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 14, 741-745.
21. Corteel J.M, 1976. Ann. Zootech. 25, 567-571.
22. Corteel, J.M. 1977. Production, storage and artificial insemination of goat semen. Dans. Management of reproduction in sheep and goat symposium. p. 41-57, Madison.
23. Corteel JM, 1988. « Collection processing and artificial insemination of goat semen». Extrait de goat production, Gall C, 223-241.
24. CRDC, 2009. Centre de Ressources et Documentation Caprine: Traitement de la semence de bouc pour conservation de longue durée dans l'azote liquide avant insémination artificielle. L'égide n°57. Déc 2009.
25. Day John G; Stacey Glyn N, 2007. Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.
26. Deka B.C., Rao A.R., 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. Indian Vet. J., 64, 591-594.

27. Delgadillo, J.A., B. Lebœuf et P. Chemineau. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Res.* 9: 47-59.
28. Delgadillo J.A, 1990. Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques. Thèse, Montpellier, France, 119 p.
29. Derivaux J. et Ectors F, 1986. Reproduction chez les animaux domestiques.- Louvain-la neuve: Cabay.- 1141 p.
30. Derivaux J. et Ectors F, 1989. Reproduction chez les animaux domestiques. Vol.1 : Paris : Académia.-155p
31. Dérivaux J, 1971. « Reproduction chez les animaux domestiques ». Tome 1 et 2. Edition Déronaux. Liège.
32. Doležalová, M.; Stádník, L.; Biniová, Z.; Ducháček, J.; Stupka, R. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, v.61, n.11, p.515-525, 2016.
33. Dorado, J., A. Muñoz-Serrano et M. Hidalgo. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 115-123.
34. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. Capillary-Loaded Particle Fluid Dynamics: Effect on Estimation of Sperm Concentration. *J Androl.* 2005 Jan-Feb; 26(1):115–22.
35. Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993. « Physiologie de la reproduction ». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire Dumont P., 1997. « Point Vétérinaire ». Vol 28.n°185, Août –Septembre.
36. Dumont P. (1997). Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. Le point vétérinaire, Vol. 28, n° 185, pp. 19-32.
37. Ezekwe A, 1988. « Ejaculate characteristic of two breeds of tropical bulls N'dama and Muturu » Joint seminar on animal of African countries, Addis-Ababa
38. Foote R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. (2002) American Society of Animal Science, 1-10
39. Gahery, 2012. La reproduction des caprins : Maîtrise et mise en œuvre dans les élevages – Réalisation d'un recueil sur support DVD. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de

médecine, Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique, 246 p.

40. Hafez, E.S.E.; Hafez, B. *Reprodução Animal*. 7^a ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
41. Hafez E.S.E, 1974. « *Reproduction in farm animals* ». 1vol., Lea-Febiger, 3^e édition., 480p.
42. Hafez E.S.E, 1987. « *Reproduction in farm animals* » 1vol. Leo-Febiger, 5^{ème} éd., 633p.
43. Hanzen, CH 2009-2010 : *L'insémination artificielle chez les ruminants*. www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/.../R29_Insemination_2010.pdf 2009- 2010.
44. Hanzen, 2016. *L'insémination artificielle chez les ruminants*. Université de liège Faculté de Médecine Vétérinaire. Service de Thériogenologie des animaux de production.
45. Haskouri, 2001. *Insémination artificielle et détection des chaleurs chez la vache*, 11p.
46. Hezavehei, M.; Sharafi, M.; Kouchesfahani, H.M.; Henkel, R.; Agarwal, A.; Esmaeili, V.; Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, v.37, n.3, p.327-339, 2018.
47. Holt, W.V., M.F. Head et R.D. North. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing - observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 46: 1086-1094.
48. Holt, W.V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
49. Holt, W.V. 2000b Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, n.1, p.47-58, 2000.
50. Jean Pierre M. *Suivie et évaluation de la qualité des services d'insémination artificielle caprine en milieux villageois dans la région de Fatick au Sénégal*, 2009, p 22.
51. Laubser P.P, Van Niekerk C.H, Both L.J.J, 1982. "Seasonal changes in sexual activity and sperm quality in the Angora ram. 1. Libido and male hormone concentration". *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 13, 131-133.
52. Leboeuf B, Restall B, Salamon S, 2003. « *Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle* ». *INRA Prod. Anim*, 16 (2), 91-99.

53. Lu, J. C., Huang, Y. F., et Lü, N. Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*, 2014, vol. 46, no 4, p. 329-338.
54. Lyashenko, A. 2015. Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. *Asian Pac. J. Reprod.*, 4: 17-21.
55. Manuel fournisseur Hamilton Thorne du CASA Hamilton Thorne CEROS II, 2020.
56. Marquis P-H, 1990. « Synchronisation de l'œstrus et insémination artificielle dans l'espèce caprine ». Ecole National Vétérinaire de Toulouse. Thèse pour le doctorat vétérinaire, diplôme d'état. 156p.
57. Maxwell W.M.C, Evans G, 1987. "Salamon's artificial insemination of sheep and goats". Butterworths, Sydney, Australia, 102p.
58. Mazur, P. 1965. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 125: 76.
59. Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell. Ph.* 247: C125-C142.
60. Mc. Donald Me, 1980. «Veterinary endocrinology and reproduction». Lea et Febiger edition 3rd 560 p.
61. Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira et J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
62. Meskini Zakaria: L'insémination artificielle chez les caprins de la race Arbia dans la region de Tiaret. Univ Ibn Badis Mostaganem, 2017, p 50.
63. Mies Filho, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5ªed., Porto Alegre: Livraria Sulina, 1982. 783p.
64. Morris, G.J.; Acton, E.; Murray, B.J.; Fonseca, F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, v.64, n.2, p.71-80, 2012.
65. Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Hum Reprod.* 1988 Jul;3(5):621-5.
66. Mortimer ST. CASA – Practical Aspects. *J Androl.* 2000 Jul-Aug; 21(4):515-24.
67. Nedjemi Hamza, 2016. Bourada Afaf: Insémination artificielle chez la chèvre locale. Univ Blida 1, 2016, p 20-21.
68. Neto C.R., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa F.O., Dellaqua JR. J.A. et Alvarenga M.A. 2014. Comparison of different freezing

- extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.
69. Oliveira, M.E.F.; Teixeira, P.P.M.; Vicente, W.R.R. *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*. 1^aed., São Paulo: Med Vet, 2013. 305p.
70. OMS, 2010. WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
71. Ortavant R, 1977. "Photoperiodic regulation of reproduction in the sheep". In: *Management of reproduction in sheep and goats symposium*». Madison, 25-25, July, 58-71.
72. Parks, J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: M.K. Armand and K.C. John (éds.). *Reprod. Tiss. Bank*. p. 229-261. Academic Press, San Diego.
73. Pesch, S.; Bergmann, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. *Micron*, v.37, n.7, p.597-612, 2006.
74. Ponthier, J ; Van Den Berghe F ; Parrilla Hernandez S ; Hanzen C ; Deleuze S. 2014. Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives. *Annales de Medecine Veterinaire* 158(1): 57-72.
75. Post Lucie, 2019. Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermologie.
76. Prien, S.; Iacovides, S. Cryoprotectants and cryopreservation of equine semen: a review of industry cryoprotectants and the effects of cryopreservation on equine semen membranes. *Journal of Dairy, Veterinary and Animal Research*, v.3, n.1, p.1-7, 2016.
77. Purdy, P.H. 2006b. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.
78. Rothmann, Susan A. et Reese, Angela A. Semen analysis: the test techs love to hate. *Medical Laboratory Observer*, 2007, vol. 39, no 4, p. 18.
79. Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1-3, p.77-111, 2000.
80. Salamon S., Ritar A.J., 1982. Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35, 295-303.

81. Salamon S, 1976. « Artificial insemination in sheep » Animal husbandary department university of Sydney, 139p.
82. Setchell B.P, 1977. "Male reproductive organs and semen". Extrait de Cole H.H. « reproduction in domestic animals» third edition, 230-255.
83. Sieme, H.; Oldenhof , H.; Wolkers , W.F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.3, p.20-26, 2015.
84. Silva , E.C.; Cajueiro, J.F.; Silva, S.V.; Vidal, A.H.; Soares , P.C.; Guerra, M.M. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Animal Reproduction Science*, v.132, n.3-4, p.155-158, 2012.
85. Simpson, A.M. et I.G. White. 1986. Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 131-143.
86. Soltner D, 1993. « Zootechnie générale, tome 1, la reproduction des animaux d'élevage ». Edition INRA, science et technique agricole.
87. Taure O, 1988. « Insémination: Capri I.A, récolte et sème ». *La chèvre*, 167, 36-39.
88. Thibault, C. et M.C. Levasseur. 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses éd, Pari, 928 pp.
89. Thibault C, 1975. « La fécondation». 1 vol. Masson (1995). 20.
90. Toner, M. 1993. Nucleation of ice crystals inside biological cells. In: P. Steponkus (ed.). *Advances in low temperature biology*. p. 51. JAI Press, London.
91. Tuli R.K., Schmidt-Baulain R., Holtz W., 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 25, 125-131.
92. Tuli, R.K. et W. Holtz. 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43: 1359-1363.
93. Guide des bonnes pratiques de l'insémination caprine. Disponible sur Internet URL : <http://www.capgenes.com/IMG/pdf/guide-bonne-pratique-ia-fr.pdf>. Vaissaire J-P., 1977. *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires*. Maloine S.A. Éditeur. 457p.p81-155
94. Vaissaire J-P, 1977. " Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires". Maloine S.A. Éditeur. 457p.p81-155.
95. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen.

Anim. Reprod. Sci., 2005, 89, 115- 136.

96. Watson, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: L. G.E. (ed.). Marshall's Reproduction. Churchill Livingstone, Edinburg.
97. Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. J. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-492.

ANNEX





Figure 25: LBRA de l'institut des sciences vétérinaires Blida 1.

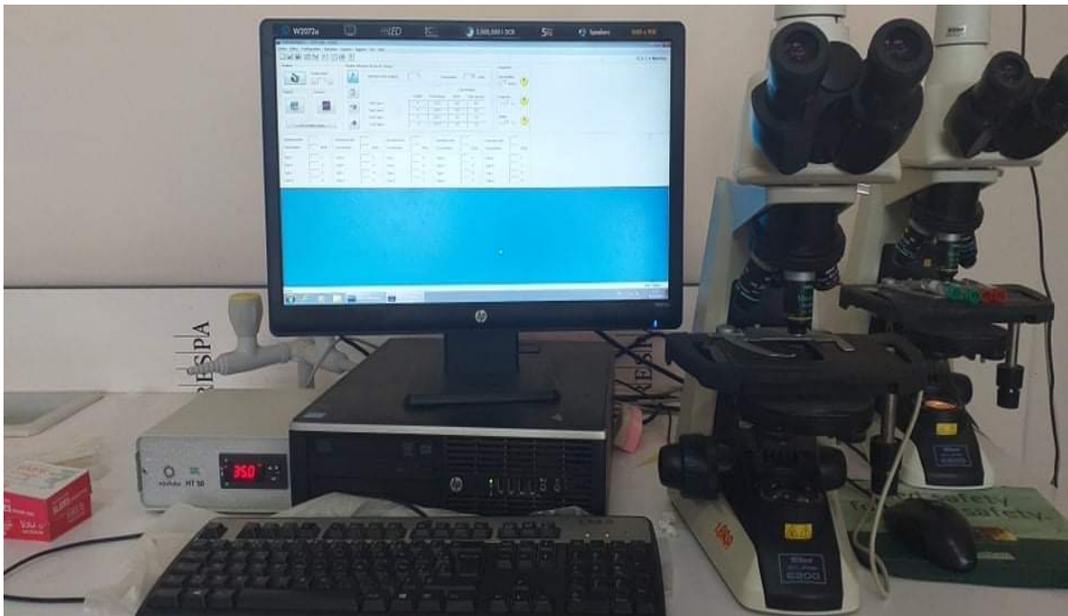


Figure 24: le système CASA utilisé dans cette expérience.



Figure 26: le bain-marie utilisé pour décongeler les paillettes de semence caprine

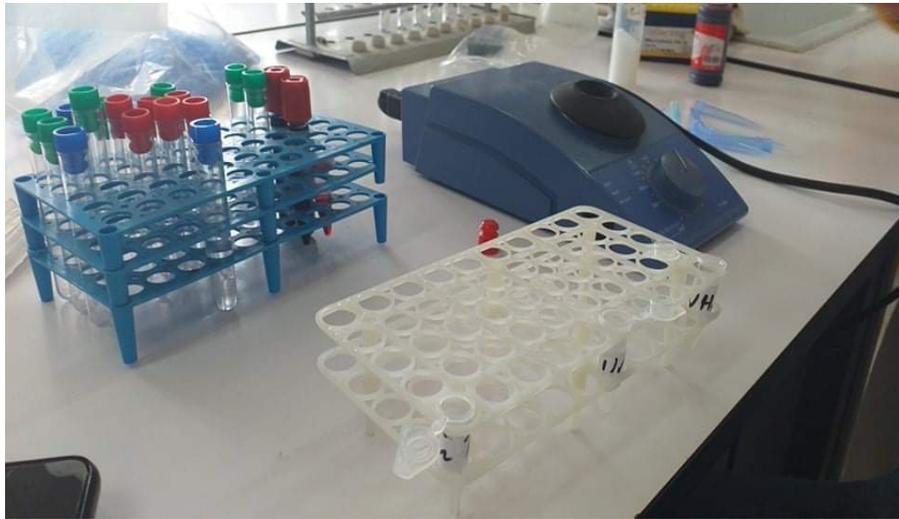


Figure 27: le vortex



Figure 28: le matériel laboratoire utilisé