

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie des Populations et des Organismes**



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

**Diplôme de Master**

Option : **Reproduction animale**

**Effet de l'âge sur les paramètres biométriques et  
spermatiques de l'épididyme chez le bélier de  
race Ouled Djellal croisée**

Présenté par

**Brahiti Latifa et Chebboubi Fazila**

Soutenu septembre 2016

Devant le jury :

Président :	<b>Kaidi R.</b>	Professeur	ISV, USDBlida 1
Examinatrice :	<b>Djazouli Alim Z.</b>	MCA	FSNV, USDBlida 1
Promotrice :	<b>Boukenaoui-Ferrouk N.</b>	MCB	ISV, USDBlida 1
Co-promoteur :	<b>Ferrouk M.</b>	MCB	ISV, USDBlida 1
Invité d'honneur :	<b>Ould Rouis H.</b>	Docteur biologiste	Laboratoire privé, Blida

Année universitaire: **2015 - 2016**

## Remerciements

A notre promotrice

Madame **Boukenaoui-Ferrouk N.**, maître de conférences B, ISV, USD Blida 1

Pour l'aide qu'elle nous a apportée, pour sa patience, sa disponibilité, sa confiance, son encouragement et son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail.

Sincères remerciements

A notre co-promoteur

Monsieur **Ferrouk M.**, maître de conférences B, ISV, USD BUDA 1

Pour son encouragement, son conseil bienveillant, sa rigueur scientifique et sa grande disponibilité.

Nous le remercions vivement.

A notre président de jury

Monsieur **Kaidi R.**, professeur, ISV, USD BLIDA 1

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre travail.

Hommages respectueux

A notre examinatrice

Madame **Djazouli Alim Z.**, maître de conférences A, FSNV, USD BLIDA 1

Qui nous a fait l'honneur d'examiner notre travail et pour son aide matériel afin de réaliser notre travail.

Sincères remerciements

A Monsieur **Ould RouisH.**, Docteur biologiste, Laboratoire d'analyses biologiques, privé

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre soutenance et pour son aide matériel afin de réaliser notre travail.

Sincères remerciements

Aux docteurs vétérinaires **Reguieg A.** et **Mansouri**, responsables de l'inspection au niveau des abattoirs de Chiffa et de Mouzaia pour nous avoir facilité et aider à récupérer les prélèvements biologiques.

Aux **responsables et chercheurs** du laboratoire de biotechnologie lié à la reproduction animale de l'institut des sciences vétérinaires de Blida pour nous avoir mis à notre disposition tout le matériel disponible pour réaliser ce travail.

## Dédicace

### Dédicace

**A la mémoire de mon père Abdellah** tu es toujours présent dans nos cœurs, **j'espère que tu es fière de ta petite fille, qu'ALLAH t'ouvre grandement les portes du paradis. Je t'aime**

**A ma très chère maman aichata** prière et tes encouragements m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse ALLAH, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé et longue vie.....je t'aime

**A mon très cher mari riadh** mon âme sœur et la lumière de mon chemin, sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

**A mes frères** Mohamed, Yousef et Abdelaziz ...je vous aime.

**A ma sœur** Fatima, son mari Nassim et ses petits Lina et abderrakib ma source de Bonheur.

A la mémoire de mes grands-parents paternel.

A mes grands-parents maternel, mes oncles mes tantes, toutes ma famille et ma belle-famille.

A mon cher binôme Fazila merci pour ta patience.

A tous mes cousins(es), collègues et amies : Aicha, Asma, hizia, Khaoula, Nesrine, Sonia, Soumia et Zineb, merci pour votre soutien et aide je vous aime.

A toute la promotion Master II Reproduction animale 2015 Blida.

A tous qui m'ont apporté du soutien toute ma vie.

**Latifa**

## Dédicace

### **A ma très chère mère Zineb**

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

### **A mon Père Mohamed**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

### **A mon très cher frère Mohamed Amine**

Mon cher petit frère présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

### **A la mémoire de mon grand-père chebboub**

Tu es toujours présent dans nos cœurs, j'espère que tu es fière de ta petite fille, qu'ALLAH t'ouvre grandement les portes du paradis. Je t'aime

A mon cher binôme Latifa merci pour ta patience.

**A tous mes chères amies** : Khaoula, Aicha, Asma, Nesrine, merci pour votre soutien et aide je vous aime

**Fazila**

## Résumé

Les objectifs de notre travail, réalisé chez les ovins de race Ouled Djellal croisée, sont d'étudier l'effet de l'âge sur les paramètres biométriques et spermatiques de l'épididyme, et l'effet de la conservation de l'épididyme à 4° C sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes.

Les testicules récupérés des abattoirs sont répartis en deux groupes d'âge : G1 (8 à 12 mois d'âge ; n=7) et G2 (15 à 24 mois d'âge ; n=9). Après détermination des paramètres biométriques des testicules et de l'épididyme, la semence de la queue de l'épididyme est analysée en moyenne 3h après prélèvement de l'épididyme ensuite à 24 et 48h de conservation. La concentration en spz est évaluée par l'hémocytomètre. La mobilité des spermatozoïdes et les variables des mouvements des spermatozoïdes notamment la vitesse curviligne (VCL), la vitesse linéaire (VSL) sont analysés à l'aide d'un analyseur de semence (CASA : Computer-assisted sperm analysis).

Les résultats de l'effet de l'âge sur les paramètres biométriques montrent une différence d'augmentation du poids testiculaire de 36,4% ( $p < 0,05$ ), du poids épидидymaire de 41,7%, ( $p < 0,01$ ) et de la circonférence scrotale de 11,9% ( $p < 0,05$ ) en faveur de G2. L'analyse de la semence révèle une différence d'augmentation de 10,7% du taux de vitalité des spz, de 2,4% de spz mobiles, de 0,1% de spz immobiles, de 55,7% de la concentration en spz, et de 8,4% et de 2,9% respectivement pour VCL, VAP en faveur de G2. Par contre une différence de diminution de VSL de 1,4% est observée en faveur de G2.

En conclusion, l'âge et la durée de conservation de la semence épидидymaire des béliers de race Ouled Djellal croisée affectent les paramètres biométriques et spermatiques.

**Mot clés :** Age, épидидyme, sperme, bélier de race Ouled Djellal croisée, paramètres spermatiques

## ملخص

أهداف عملنا ، التي جرت على سلالة الأغنام أولاد جلال هي دراسة تأثير العمر على المعلمات البيولوجية والحيوانات المنوية من البربخ ، وتأثير الحفاظ على البربخ 4 درجات مئوية على التنقل وحيوية الحيوانات المنوية .

وتنقسم الخصيتين المأخوذة من المسالخ إلى فئتين عمريتين : G1 (8-12) شهر من العمر (ع = 7) و G2 (من 15 إلى 24 شهر من العمر؛ (ع = 9) . بعد تحديد المعايير البيولوجية من الخصيتين والبربخ ، ويتم تحليل اللسان من ذي البربخ في المتوسط 3 ساعات بعد إزالة البربخ في 24 و 48 ساعة من الحفظ . حساب تركيز الحيوانات المنوية من قبل عدد الكريات .

ويتم تحليل متغير الحركة الحيوانات المنوية بما في ذلك سرعة انحنائي (VCL) ، سرعة خطية (VSL) باستخدام CASA . أظهرت نتائج تأثير العمر على المعلمات البيومترية فرقا في دوزنا الخصية (36.4 %؛ ف > 0.05) ، وزن برنجي (41.7 %؛ ف > 0.01) ومحيط الصفن (11.9 %؛ ف > 0.05) لصالح G2 . كشفت تحليل اللسان المنوي وجود اختلاف في الزيادة 10.7 % من معدل حيوية الحيوانات المنوية 55.7 % في التركيز ، و 2.4 % في الحركة . 0.1 % عدم الحركة و VCL 8.4 % ، 2.9 % VAP و G2 . وعكس ذلك هناك انخفاض في قدره 1.4 % الفرق بين G1 و G2 .

وأظهرت نتائج تأثير المواد الحافظة من البربخ بعد 48 ساعة عند 4 درجات مئوية انخفاض معدل حركة الحيوانات المنوية 33.3 % لـ G1 و G2 و 6.2 % ومعدل حيوية الحيوانات المنوية ، 24.8 % (0.05) و PG1 36.7 % (P > 0.001) لـ G2 .

وفي الختام ، العمر ، ومدة الحفظ للسائل المنوي برنجي لكباش أولاد جلال هجينة تؤثر على المعايير البيومترية ومعلمات الحيوانات المنوية

الكلمات الرئيسية : العمر ، البربخ ، الحيوانات المنوية ، كباش من سلالة أولاد جلال هجينة ، المعلمات الحيوانية المنوية .

## Abstract

The aims of our work, carried out in Ouled Djellal cross breed sheep are to study the effect of age on biometric parameters and spermatic of the epididymis, and the effect of conservation of the epididymis at 4 °C on the sperm vitality and mobility.

Testes recovered from slaughterhouses are divided into two age groups: G1 (8-12 months of age; n = 7) and G2 (15-24 months of age; n = 9). After evaluation of biometric parameters of the testes and epididymis, the sperm of the tail epididymis is analyzed on average 3 hours after retrieval of the epididymis then at 24 and 48h of conservation. Spz concentration is evaluated by hemocytometer. Sperm motility and sperm motion parameters including curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL) are analyzed using CASA.

The results of the age effect on the biometric parameters show an increase difference of 36.4% ( $p < 0.05$ ) for the testicular weight, 41.7% ( $p < 0, 01$ ) for the epididymis weight and of 11.9% ( $p < 0.05$ ) for the scrotal circumference in favor of G2. The semen analysis revealed an increase difference of 10.7% of the spz vitality rate and 55.7% of the spz concentration, 2.4% of the mobile spz; 0.1% of the immobile spz; 8.4% of the VCL, 2.9% of the VAP in favor of G2. However, the decrease difference of VSL observed is 1.4% in favor of G2.

After 48 h of the epididymis storage at 4 °C, the sperm showed a decrease of the mobile spz rate of 33.3% for G1 and of 6.2% for G2 and of the spz vitality rate of 24.8% ( $p > 0.05$ ) for G1 and 36.7% ( $p < 0.001$ ) for G2.

In conclusion, age and the conservation duration of the sperm epididymis of Ouled Djellal cross breed rams affect biometric and sperm parameters.

**Key words:** Age, epididymis, sperm, Ouled Djellal cross breed ram, sperm parameters

## Sommaire

Résumé

Sommaire	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Partie bibliographique.....	1
Chapitre 1 : Epididyme : Organe de maturation, de stockage et de transport des spz .....	2
I. Anatomie et histologie de l'épididyme.....	2
II. Fonctions de l'épididyme.....	3
II.1. Transport des spermatozoïdes .....	3
II.2. Maturation des spermatozoïdes .....	4
III. Régulation de l'épididyme.....	5
IV. Facteurs influençant la qualité du sperme.....	5
IV.1. Facteurs intrinsèques.....	6
IV.2. Facteurs extrinsèques.....	6
Chapitre 2 : Conservation du sperme.....	9
1. Caractéristiques et rôles des dilueurs.....	9
2. Composition des dilueurs.....	9
2.1. Cryoprotecteurs.....	10
2.2. Protecteurs membranaires .....	11
2.3. Substances tampons .....	11
2.4. Substances nutritives.....	12
2.5. Antibiotiques.....	12
Chapitre 3 : Analyse de sperme.....	13
I.Spermogramme .....	13
I.1. Examens macroscopiques .....	13
I.1.1. Volume.....	13
I.1.2. Couleur .....	13
I.1.3. Viscosité.....	13
I.1.4. pH.....	14
I.2. Examens microscopiques .....	14
I.2.1. Evaluation de la vitalité .....	14
I.2.2. Evaluation de l'intégrité membranaire .....	14
I.2.3. Mobilité .....	15
I.2.4. Concentration des spermatozoïdes.....	17
II. Spermocytogramme.....	17
Partie expérimentale .....	20
Matériel et méthodes.....	21
I. Lieu et période .....	19
II. Matériel et méthodes .....	19
II.1. Animaux.....	19
II.2. Protocole expérimental.....	19
II.2.1. Préparation du dilueur .....	20
II.2.2. Récolte et transport des testicules.....	20
II.2.3. Prélèvement de l'épididyme et mesures biométriques.....	20
II.2.4. Récolte du sperme épididymaire.....	21
II.2.5. Evaluation de la viscosité .....	22
II.2.6. Mesure du pH.....	22

II.2.7. Évaluation de la mobilité.....	23
II.2.8. Evaluation de la concentration.....	25
II.2.9. Evaluation de la vitalité .....	26
II.2.10. Evaluation des anomalies morphologiques .....	27
III. Analyse statistique des résultats .....	28
Résultats et discussion .....	19
Première partie : Effet de l'âge sur les paramètres biométriques et spermatiques de l'épididyme .....	29
I. Effet de l'âge sur les paramètres biométriques .....	29
I.1. Poids testiculaire .....	29
I.2. Poids de l'épididyme .....	30
I.3. Circonférence scrotale .....	31
II. Effet de l'âge sur les paramètres spermatiques .....	32
II.1. Couleur et viscosité de la semence épидидymaire .....	32
II.2. pH .....	33
II.3. Mobilité .....	33
II.4. Cinétique des spermatozoïdes .....	35
II.5. Vitalité.....	36
II.6. Concentration en spermatozoïdes.....	37
II.7. Anomalies morphologiques.....	39
Deuxième partie : Effet de la durée de conservation sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes .....	41
1. Mobilité.....	41
2. Vitalité.....	44
Conclusion et perspectives.....	46
Références bibliographiques .....	47

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition des dilueurs utilisés pour la conservation de la semence du bélier .....	10
<b>Tableau 2</b> : Détermination de la note de la motilité massale de la semence .....	16
<b>Tableau 3</b> : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes .....	17
<b>Tableau 4</b> : Résumé des différentes étapes du protocole expérimental .....	19
<b>Tableau 5</b> : Définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (Computer assisted semen analyser, CASA) .....	24
<b>Tableau 6</b> : Poids testiculaires (g), poids de l'épididyme (g) et circonférence scrotale (cm) chez les races ovines.....	30
<b>Tableau 7</b> : Mobilité (%) et mobilité progressive (%) chez quelques races ovines .....	34
<b>Tableau 8</b> : Vitalité (%) chez quelques races ovines.....	37
<b>Tableau 9</b> : Quelques données bibliographiques de la concentration en spz chez quelques races ovines .....	38
<b>Tableau 10</b> : Quelques données bibliographiques des anomalies des spz chez les races ovines.	40
<b>Tableau 11</b> : Quelques données bibliographiques de la mobilité et de la mobilité progressive chez les races ovines .....	43
<b>Tableau 12</b> : Quelques données bibliographiques de la vitalité chez les races ovines.....	45

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> :Représentation schématique de l'organisation du testicule et de l'épididyme .....	2
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des principaux types et fonctions des cellules de l'épididyme (Robaire et <i>al.</i> , 2006) .....	3
<b>Figure 3</b> : Photomicrographie du corps de l'épididyme d'un bélier âgé de 8 mois .....	3
<b>Figure 4</b> : Représentation schématiques des différents résultats d'évaluation de l'intégrité flagellaire par le test hypo-osmotique .....	15
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique des différentes anomalies retrouvées dans le sperme .....	19
<b>Figure 6</b> : Etapes de prélèvement de l'épididyme .....	21
<b>Figure 7</b> : Etapes de récolte du sperme épидидymaire.....	22
<b>Figure 8</b> : Bandelette de papier pH .....	22
<b>Figure 9</b> : Etapes d'évaluation de la mobilité .....	23
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (CASA) .....	24
<b>Figure 11</b> : Affichage des résultats d'analyse de la mobilité par le CASA.....	24
<b>Figure 12</b> : Etapes d'évaluation de la concentration .....	25
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de la méthode de comptage des cellules à l'aide de la cellule de Malassez .....	25
<b>Figure 14</b> : Etapes de confection d'un frottis spermatique coloré avec éosine -nigrosine et de comptage .....	26
<b>Figure 15</b> : Zone de comptage du frottis spermatique coloré à l'éosine-nigrosine.....	27
<b>Figure 16</b> :Spermatozoïde vivant (a) et spermatozoïde mort (b) après coloration vitale à l'éosine-nigrosine .....	27
<b>Figure 17</b> : Poids testiculaires (g) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée.....	29
<b>Figure 18</b> : Poids épидидymaire (g) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée.....	31
<b>Figure 19</b> : Circonférence scrotale (cm) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée .....	32
<b>Figure 20</b> : Résultat du pH par les bandellettes pH.....	33
<b>Figure 21</b> : Pourcentage de la mobilité des spz épидидymaire de G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée .....	34
<b>Figure 22</b> : Paramètres cinétiques analysés par CASA de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée .....	35
<b>Figure 23</b> : Pourcentage de la vitalité des spz épидидymaire de G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée .....	36
<b>Figure 24</b> : Concentration en spz ( $\times 10^6$ spz/ml) de G1 et G2 chez les béliers de race Ouled Djellal croisée .....	37
<b>Figure 25</b> : Anomalies morphologiques des spz observés au microscope à contraste de phase.....	39
<b>Figure 26</b> : Pourcentage des anomalies morphologiques des spz épидидymaire pour G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée.....	40
<b>Figure 27</b> : Mobilité en pourcentage de G1 et G2 en fonction de la durée de conservation chez les béliers de race Ouled Djellal croisée .....	41
<b>Figure 28</b> : Vitalité en pourcentage de G1 et G2 en fonction de la durée de conservation chez les béliers de race Ouled Djellal croisée .....	44

## Liste des abréviations

CASA : Computer-assisted sperm analysis

ESM : erreur standard à la moyenne

G1 : groupe d'animaux âgés de 8-12 mois

G2 : groupe d'animaux âgés de 12-24 mois

spz : spermatozoïde

## Introduction

L'évaluation du sperme est un aspect important qui doit être fait avec précision pour s'assurer de l'utilisation de béliers ayant une bonne fertilité pour la reproduction. Par conséquent, l'analyse *in vitro* du sperme a une importance dans le diagnostic d'évaluation de la fonction testiculaire et épидидymaire chez le mâle (Rodriguez-Martinez, 2003 ; Moce et Graham, 2008). Toutefois, l'évaluation conventionnelle de la semence est encore souvent limitée à la détermination du nombre, de la motilité et parfois la morphologie des spz. La principale raison de cette évaluation fondamentale est qu'un éjaculat doit contenir un certain nombre de spermatozoïdes (spz) mobiles et morphologiquement normaux pour obtenir un nombre minimum de spz qui vont atteindre les oviductes et intervenir éventuellement dans le processus complexe de la fécondation (Holt, 2011). Chez les mammifères, le pouvoir fécondant des spz apparaît dans l'épididyme (Axner, 2006), organe responsable du transport, de concentration, de stockage et de maturation des spz. Cette dernière implique l'acquisition de la mobilité et le pouvoir de fertilisation des spz (Cooper et Yeung, 2006). Par ailleurs, l'établissement d'un spermogramme est actuellement considéré comme une approche la plus souhaitable pour l'évaluation de la capacité de reproduction chez les mammifères (Hafez et Hafez, 2000). L'évaluation de la motilité des spz et leur morphologie est un paramètre essentiel dans l'examen de la qualité du sperme et à l'établissement de corrélations entre la qualité du sperme et la fertilité (Verstegen et *al.*, 2002). Actuellement, l'évaluation par CASA a pour objectif de déterminer les différentes caractéristiques des cellules du liquide séminale comme le mouvement, la vitesse et la morphologie (Verstegen et *al.*, 2002).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet de l'âge et de la durée de conservation des spz épидидymaires sur les paramètres biométriques et spermatiques chez le bélier de race Ouled Djellal croisée.

Avant de présenter l'étude expérimentale, nous présenterons une analyse bibliographique portant sur l'anatomie, l'histologie et la physiologie de l'épididyme du bélier ainsi que sur la conservation et les techniques d'analyse de la semence. La partie expérimentale est présentée comme suit : matériel et méthodes sont décrits et les résultats sont discutés parallèlement en fonction de quelques données bibliographiques existantes chez les autres races ovines ; et enfin on termine par une conclusion et des perspectives.

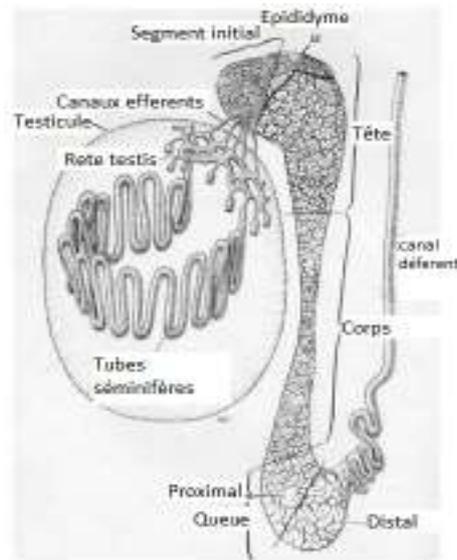
## **Partie bibliographique**

## Chapitre 1

### Epididyme : Organe de maturation, de stockage et de transport des spz

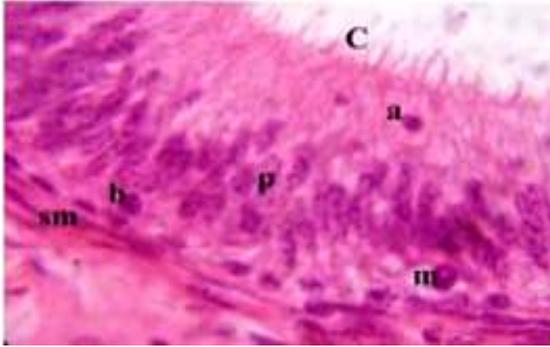
#### I. Anatomie et histologie de l'épididyme

Le canal épидидymaire est un tubule contourné étroitement enroulé sur la surface des testicules qui relie les canaux efférents aux canaux déférents (Joseph et *al.*, 2009). Trois régions différentes sont anatomiquement distinguées: la tête, le corps et la queue (Frenette et *al.*, 2004) (Figure 1).



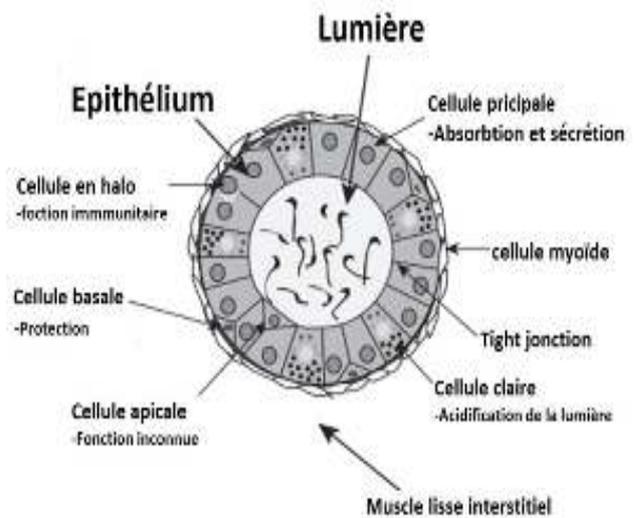
**Figure 1** : Représentation schématique de l'organisation du testicule et de l'épididyme (Robaire et *al.*, 2006)

Chez le bélier, ses trois régions, sont composées de six segments histologiques qui montrent des variations régionales (Bielli et *al.*, 2007 ; Kishore et *al.*, 2012). Tout au long du tubule épидидymaire, la lumière est bordée par un épithélium responsable de la synthèse et la sécrétion des protéines (Hermo et *al.*, 1991) sous la stimulation androgénique (Cuasnicu et *al.*, 1984 ; Robaire et Viger, 1995). Cet épithélium pseudostratifié est composé principalement de cellules principales et basales, accompagné par d'autres cellules spécialisées réparties d'une manière spécifique au niveau des différents segments comprenant des cellules apicales, étroites, claires et en halo (Figures 2 et 3) (Bielli et *al.*, 2007 ; Kishore et *al.*, 2012 ; Elzoghby et *al.*, 2014). Ces cellules assurent les fonctions de sécrétion, d'absorption, d'endocytose, d'acidification du fluide luminal, de défense immunitaire, de phagocytose et de production d'antioxydant (Hermo et Robaire, 2002).



C : stéréocil, P : cellule principale, a : cellule apicale, m : macrophage intraépithéliale, sm : fibres musculaires lisses (H.E. : x40)

**Figure 3** : Photomicrographie du corps de l'épididyme d'un bélier âgé de 8 mois (Elzoghby et *al.*, 2014)



**Figure 2** : Représentation schématique des principaux types et fonctions des cellules de l'épididyme (Robaire et *al.*, 2006)

## II. Fonctions de l'épididyme

Les quatre principales fonctions de l'épididyme sont le transport, le développement de la mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes ainsi que la création d'un environnement luminal spécialisé favorable au processus de maturation à travers l'absorption et les activités sécrétoires des cellules épithéliales épидидymaires (Robaire et *al.*, 2006).

### II.1. Transport des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes immatures et immobiles quittant le testicule séjournent pendant un certain temps dans l'épididyme (Robaire et *al.*, 2006). Au cours de leur transport dans les tubules épидидymaires, dont la durée varie selon les espèces, les spermatozoïdes deviennent matures et féconds (Ogebin-Gist et *al.*, 1975 ; Cooper, 1991).

Les spermatozoïdes entrent dans l'épididyme propulsés par le fluide testiculaire et éventuellement par le rythme des cellules ciliées des canaux efférents. Cependant, dans l'épididyme, l'épithélium est bordé par des stéréocils immobiles et l'absorption massive de fluide aura lieu dans les canaux efférents et le segment initial de l'épididyme se qui réduit considérablement le débit de fluide (Crabo, 1965). Le transport a lieu contre un gradient croissant de pression hydrostatique du testicule à la queue de l'épididyme (Johnson et *al.*, 1975). En effet, le mécanisme responsable de la conduite du contenu luminal de l'épididyme est attribuée principalement aux contractions rythmiques du muscle lisse tapissant le tubule épидидymaire (Jaakkola, 1983). Par conséquent, la

progression du liquide luminal épидидymaire est un processus dynamique, contribuant au mélange du contenu luminal, contrôlé par l'activité électrique et contractile de l'innervation de l'épididyme. Les contractions du muscle lisse du tubule épидидymaire et le transport des spz sont influencés par plusieurs facteurs, à la fois hormonaux et neuronaux (ocytocine, les prostaglandines comme  $PGF_2\alpha$  et  $PGE_2$ ) (Cosentino et *al.*, 1984).

## II.2. Maturation des spermatozoïdes

- **Capacité de fertilisation**

Le concept de la maturation est lié à l'acquisition par les spz de la capacité de se mouvoir ainsi que de pouvoir féconder l'ovule. Il est de plus en plus reconnu que la maturation des spz se fait de façon progressive le long de l'épididyme et que la composition du fluide luminal change beaucoup dans le processus de maturation. Le site où les spz commencent à acquérir leur habilité à féconder varie d'une espèce à l'autre. Chez le bélier, c'est la partie distale du corps de l'épididyme (Fournier-Delpech et *al.*, 1977).

Les différentes étapes de maturation des spz, comme les changements dans le profil et l'efficacité de maturité flagellaire (Cooper, 1986) et l'acquisition de la capacité de liaison à la zone pellucide (Ogebin-Gist et Fournier-Delpech, 1982) sont accomplies grâce aux différentes fonctions des cellules de l'épithélium épидидymaire. Le microenvironnement présent à l'intérieur de la lumière de l'épididyme est le résultat de l'entrée de fluide testiculaire et des activités très développées d'absorption et de sécrétion des cellules de l'épithélium épидидymaire (Syntin et *al.*, 1996).

- **Mobilités spermatozoïdes**

Parallèlement à l'acquisition de pouvoir fécondant, un certain nombre de caractéristiques du sperme subissent des changements de maturation (Robaire et *al.*, 2006). La maturation du potentiel de mobilité du sperme implique à la fois une augmentation quantitative du pourcentage de spz mobiles et une différence qualitative dans le modèle de mobilité. Les spz testiculaires sont soit immobiles ou montrent seulement une légère contraction du flagelle. Les spz libérés par la tête de l'épididyme se déplacent de façon circulaire, alors que les spz libérés par la queue se déplacent progressivement et avancent énergiquement (Gaddum, 1968 ; Robaire et *al.*, 2006).

- **Autres changements**

En plus de la capacité de la motilité progressive, les spz de l'épididyme développent la capacité de subir la réaction acrosomique. En parallèle avec ces changements fonctionnels, les spz subissent des changements structurels au cours du transit épидидymaire à savoir la migration de la gouttelette cytoplasmique le long du flagelle des spz, la modification morphologique de l'acrosome, les changements dans la chromatine nucléaire des spz et des organites de la queue et les changements dans la composition du plasma séminal (Bedford, 2004).

### **III. Régulation de l'épididyme**

- **Régulation hormonale**

Les androgènes maintiennent la morphologie et l'intégrité fonctionnelle de l'épididyme, assurant ainsi la maturation des spz (Blaquier *et al.*, 1972). Ils sont synthétisés par les cellules de Leydig et parviennent dans l'épididyme surtout via le liquide intraluminal. Ils agissent sur le métabolisme intermédiaire, le transport d'ions, des glucides et de la carnitine à travers la membrane épithéliale, la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (Cuasnicu *et al.*, 1984 ; Blanchard et Robaire, 1997).

- **Régulation nerveuse**

La régulation nerveuse se fait par l'action du système nerveux végétatif sympathique et parasympathique. Elle est responsable du péristaltisme spontané du transport du contenu luminal dans l'épididyme et intervient dans les sécrétions épидидymaires (Brooks, 1983).

### **IV. Facteurs influençant la qualité du sperme**

Les facteurs influençant la qualité du sperme sont de deux types : facteurs intrinsèques (ou génétiques) et facteurs extrinsèques. Le facteur majeur de variation est l'environnement. Les effets environnementaux peuvent être temporaires ou permanents. Les effets permanents apparaissent pendant les périodes prénatales et prépubères et les effets temporaires ou permanents agissant après la spermatogenèse pouvant altérer la qualité du sperme (Foote, 1978).

## **IV.1. Facteurs intrinsèques**

- **Taille des testicules**

La taille testiculaire est en corrélation non seulement avec la production quotidienne de spz, mais aussi avec les taux de testostérone (Ford *et al.*, 2001). Elle affecte aussi directement le potentiel de production de sperme (Foote, 1978).

Le poids des testicules à un âge constant peut être un indicateur caractéristique utile pour augmenter le rendement de la reproduction (Rathje *et al.*, 1995). Le poids testiculaire est généralement plus élevé chez les races de grande taille que chez celles de petite taille et au début de la saison sexuelle qu'en contre saison pour les animaux saisonnés (Baril *et al.*, 1993).

- **Race**

La race est un autre facteur intrinsèque de variation de la qualité du sperme. Des différences dans la plupart des paramètres spermatiques existent entre les races. En effet, Al-Samarrae (2015) a rapporté des valeurs plus élevées de viabilité des spz et de concentration en spz chez la race ovine Karradi que chez la race Arrabi.

- **Age**

De nombreux auteurs ont rapporté un effet âge sur quelques paramètres spermatiques, se traduisant par une amélioration de la qualité du sperme avec l'augmentation de l'âge jusqu'à l'âge de 3 ans (Hassan *et al.*, 2009) puis diminue chez les animaux âgés (Foote, 1978). Chez la race Ouled Djellal, Saadi *et al.* (2016) ont montré que la concentration en spz et la mobilité massale est plus élevée chez les adultes que chez les jeunes.

- **Production journalière du sperme**

La production de spz par jour n'est pas constante. Elle est différente et n'est pas stable (Baril *et al.*, 1993) variant en fonction de l'alimentation et l'état physiologique de l'animal.

## **IV.2. Facteurs extrinsèques**

Les principaux facteurs environnementaux rapportés dans la littérature sont la saison ou le traitement photopériodique, la nutrition, le rythme et méthode de collecte (Jennings *et al.*, 1976 ; Boland *et al.*, 1985 ; Colas *et al.*, 1985 ; Salhab *et al.*, 2003 ; Moghaddam *et al.*, 2012).

- **Facteur alimentaire**

Le facteur alimentaire peut avoir un effet sur la taille des testicules et de la production spermatique (Brown, 1994). Il a également été décrit que les composants spécifiques de l'alimentation, tels que la vitamine E, peuvent avoir un effet favorable en augmentant la qualité et la quantité du sperme (Yue et *al.*, 2010). Pinart et Puigmulé (2013), ont décrit qu'il existe une corrélation positive entre la nutrition et la qualité du sperme. En effet, une sous-alimentation sévère entraîne une diminution constante du poids testiculaire, de la concentration et du nombre total de spz de la semence éjaculée (Barilet *al.*, 1993).

- **Saison et photopériode**

Contrairement à la plupart des espèces d'animaux domestiques, l'effet saison est largement connu chez les races ovines à activité sexuelle marquée par une saisonnalité (Rosa et Bryant, 2003). Les variations saisonnières caractérisés par une diminution de la longueur de la durée du jour (été et automne = saison de reproduction) et une augmentation de la durée de la lumière du jour (hiver et printemps = non saison de reproduction) influencent les caractéristiques séminales (Almeida et *al.*, 2006) et les causes des fluctuations saisonnières de la qualité du sperme ne sont pas entièrement connues, mais peuvent être médiés par des mécanismes hormonaux contrôlés par la photopériode selon Ibrahim (1997). Sous les latitudes moyennes et élevées, la spermatogénèse ne s'arrête pas, mais le nombre de spz produits par le testicule diminue à certaines saisons de l'année chez les races saisonnières (Folch, 1984). L'effet saison représente les variations dues à la photopériode selon Chemineau et *al.* (1996) et Colas et *al.* (1985) chez les béliers adultes.

- **Température**

La température ambiante est considérée comme le paramètre environnemental le plus important affectant la qualité du sperme. Une faible température ambiante ne semble pas influencer la qualité du sperme alors qu'une température élevée (jusqu'à 29 °C) a un effet défavorable sur la fonction testiculaire se traduisant par une baisse de la concentration de spz jusqu'à 35% d'une part, et par des perturbations dans le processus de la spermatogénèse d'autres part (Wolf et Smital, 2009) consistant par une altération de la motilité des spz avec une augmentation du pourcentage des spz anormaux dans l'éjaculat (Joseph et *al.*, 2005).

- **Facteurs sociaux**

La stimulation sexuelle, comme l'observation d'accouplement des autres animaux, peut augmenter les niveaux à court terme du comportement sexuel chez les mâles. Par conséquent, la présence de mâles dominants, même lorsqu'ils sont séparés physiquement, peut inhiber le comportement sexuel chez les autres béliers (Price, 1987).

## Chapitre 2

### Conservation du sperme

Les spz éjaculés ou prélevés à partir de l'épididyme peuvent être collectés et utilisés dans les techniques de reproduction assistée. Le sperme éjaculé peut être recueilli par le vagin artificiel ou par électroéjaculation et les spz de l'épididyme sont le plus souvent récupérés par rinçage, incision ou par canulation de l'épididyme.

Pour protéger et nourrir *in vitro* les spz, un milieu particulier est utilisé appelé dilueur ou milieu de conservation. Pour cela deux principaux dilueurs de semence fraîche sont utilisés : le dilueur lacté composé d'eau, de poudre de lait et d'antibiotiques et le dilueur à base de lactose et de jaune d'œuf (Baril et *al.*, 1993).

Il n'existe pas de dilueur universel mais il existe de nombreux dilueurs commercialisés prêts à l'emploi ou préparé par le centre de reproduction. Les dilueurs peuvent être conservés dans un congélateur ordinaire. Si du jaune d'œuf est nécessaire, il est, le plus souvent, ajouté au moment de l'utilisation ; mais, si le jaune d'œuf est déjà présent, le dilueur ne pourra être conservé congelé que pendant deux ou trois mois (Linde-Forsberg, 2001).

#### 1. Caractéristiques et rôles des dilueurs

D'après England (1993), un dilueur doit :

- être isotonique à la semence, pour éviter les chocs osmotiques,
- posséder un pouvoir nutritif, pour conserver le métabolisme et la vitalité des spz,
- avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation ;
- avoir un pouvoir antioxydant, pour inhiber les actions des radicaux libres ;
- avoir une activité antimicrobienne,
- posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes.

#### 2. Composition des dilueurs

La composition des dilueurs varie selon les espèces et selon le fabricant. La composition de quelques dilueurs utilisés pour la conservation de la semence du bélier est présentée dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Composition des dilueurs utilisés pour la conservation de la semence du bélier

Composition des dilueurs	Références
Tes tris Fructose 10% jaune d'œuf 4% glycérol	Shakeri, 2008
Tampon tris : 6,052g Acide citrique mono-OH : 3,4g Fructose : 2,5g Pénicilline : 200 000 UI Dihydrostreptomycine : 0,2g Glycérol : 12ml Eau distillée : qsp 200ml Dilueur finale : glycérol (8/10) + jaune d'œuf (2/10)	Baril <i>et al.</i> , 1993
Eau bidistillée, stérilisée : 100 ml Sulfamides : 0,33 g Poudre de lait de vache écrémé : 11,1 g Streptomycine : 0,11 g Pénicilline : 100 000 UI	
Lactose-jaune d'œuf : 10,3 g de lactose Eau bidistillée stérilisée : 100 ml	
Jaune d'œuf : 20% Lactose : 1% Glycérine dans de l'eau déionisée : 4% Streptomycine sulfate : 1000µg/ml Pénicilline G sodium : 1000UI/ml	Platz, 1978

## 2.1. Cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs ont pour rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets de la cristallisation de l'eau lors de la congélation de semence. Les différents types de cryoprotecteurs utilisés sont :

- **Glycérol** est le plus utilisé des cryoprotecteurs. Il possède une action à la fois intra et extracellulaire. Il pénètre à l'intérieur des spz et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes.

Dans le milieu extracellulaire, le glycérol, dont la température de congélation est plus basse que celle de l'eau, se fixe aux molécules d'eau. Il diminue ainsi le seuil de congélation de l'eau extracellulaire et permet de limiter le gradient osmotique et de ralentir la vitesse de déshydratation des spz.

Cependant, le glycérol possède également des effets néfastes. Hay et *al.* (1997) ont montré que le glycérol diminue la capacité de fixation des spermatozoaires. Il semblerait que le glycérol provoque une altération de l'organisation du cytoplasme, de la viscosité et de la perméabilité et de la stabilité membranaire.

- **Ethylène glycol** est une substance proche du glycérol, mais dont le poids moléculaire est plus faible ce qui lui confère une plus grande perméabilité cellulaire (Rota et *al.*, 2006).
- **Diméthyl-sulfoxyde (DMSO)** est un cryoprotecteur intracellulaire qui s'est révélé moins efficace que le glycérol et qui n'est donc pas utilisé (Olar et *al.*, 1989).

## 2.2. Protecteurs membranaires

Les protecteurs membranaires sont principalement le jaune d'œuf et le lait qui sont ajoutés au dilueur car ils possèdent plusieurs propriétés, notamment celle de protéger les membranes des spermatozoaires.

- Le **jaune d'œuf** est l'un des composants le plus employé dans les dilueurs. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoaires lors de la congélation (England, 1993). Néanmoins, le mécanisme de cette protection n'est pas encore totalement élucidé. Le plus souvent, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20 %.
- Le **lait** contient des protéines qui protègent les membranes des spermatozoaires contre le choc thermique. Rota et *al.* (2001) ont comparé la mobilité, la vitalité et la morphologie de l'acrosome des spermatozoaires après décongélation en utilisant un dilueur classique et un dilueur à base de lait. Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre les deux dilueurs ce qui suggère que le lait pourrait être utilisé dans les dilueurs de congélation.

## 2.3. Substances tampons

Le métabolisme des spermatozoaires engendre une acidification du milieu extracellulaire ce qui est toxique pour les spermatozoaires (England, 1993). Des substances tampons doivent donc être utilisées afin de maintenir le pH autour de la neutralité.

Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane (TRIS) est le plus communément employé en association avec l'acide citrique monohydraté. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau se comportant comme une base faible.

## **2.4. Substances nutritives**

Le jaune d'œuf et/ou le lait constituent une partie des substances nutritives utilisées dans les dilueurs. Cependant, afin de fournir suffisamment d'énergie aux spz, des sucres sont rajoutés, soit du glucose soit du fructose. De plus, ces derniers permettent de maintenir la pression osmotique du milieu et possèdent une action cryoprotéctrice. Il a été démontré que les spz peuvent métaboliser le glucose et le fructose, deux composés présents dans le liquide séminal (Rigau et *al.*, 2001).

## **2.5. Antibiotiques**

Après récolte, le sperme n'étant pas stérile et le dilueur pouvant être un bon milieu de culture. A cet effet, des antibiotiques sont utilisés pour lutter contre la prolifération bactérienne. En général, la dihydro-streptomycine et la benzyl-pénicilline sont utilisées car elles sont bien tolérées par les spz (Leblanc, 2004).

## **Chapitre 3**

### **Analyse de sperme**

#### **I. Spermogramme**

Le spermogramme consiste principalement à déterminer le nombre de spz par unité de volume (concentration) et leur mobilité (Christensen et *al.*, 2011). Il permet, en effet, l'évaluation conventionnelle du sperme et de la fertilité. Par ailleurs, la semence épидидymaire peu être utilisé pour établir un spermogramme car l'épididyme a un rôle essentiel dans le développement de la motilité et la capacité de fertilisation des spz épидидymaires (Fournier-Delpech et *al.*, 1977).

#### **I.1.Examens macroscopiques**

##### **I.1.1. Volume**

Le volume d'éjaculation moyen d'un bélier varie entre 0,7 et 2 ml. La valeur la plus fréquente est de l'ordre de 1 ml selon Lacroix (1976).

##### **I.1.2. Couleur**

La couleur du sperme est un paramètre physique important du sperme. Elle varie en fonction du nombre de récolte. L'augmentation du nombre de récolte entraine un éclaircissement du liquide spermatique due à la diminution de la concentration en spz (Frunza et *al.*, 2008).

La couleur normale du sperme peut présenter des variations de nuances qui peuvent être influencer par de nombreux facteurs (Agarwal et *al.*, 2003 ; Vasan, 2011) notamment les facteurs alimentaires et les lésions pathologiques à différents niveaux de l'appareil génital mâle.

##### **I.1.3. Viscosité**

La viscosité s'évalue selon 4 niveaux à l'aide d'une pipette (Dussault, 2009):

Viscosité normale : si l'échantillon se sépare bien goutte à goutte ;

Viscosité 1 : si l'échantillon forme un filet liquide entre chaque goutte ;

Viscosité 2 : si l'échantillon est suffisamment visqueux pour que le filet soit continu ;

Viscosité 3 : si l'échantillon est tellement visqueux qu'il ne peut s'écouler par la pipette.

#### **I.1.4. pH**

Le pH est un paramètre physique de l'évaluation de la semence. Il peut varier d'un éjaculat à un autre pour un même mâle de la même espèce. En effet, le pH moyen de la semence épидидymaire est de 6,10 et peut osciller entre 5,57 et 6,9. Car en milieu acide, les spz de l'épididyme en anaérobiose deviennent immobiles (Frunza et *al.*, 2008). Par ailleurs, la contribution des glandes sexuelles accessoires par leurs niveaux de sécrétion (faible ou élevé) dans l'éjaculat détermine la valeur alcaline ou plus acide du pH spermatique. En conséquence, le changement du pH influence négativement la vitalité et la mobilité des spz (Kamp et *al.*, 2003 ; King et Macpherson, 2005).

### **I.2. Examens microscopiques**

#### **I.2.1. Evaluation de la vitalité**

L'évaluation de la vitalité des spz est effectuée en déterminant le pourcentage de spz vivants dans la semence. Pour cela, la coloration éosine-nigrosine est la plus utilisée et permet de distinguer les spz vivants des spz morts (Dooley et Pineda, 1986). Les spz morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée par contre les spz vivants ont une membrane imperméable et apparaissent donc incolores (Campbell *et al.*, 1956).

A l'observation microscopique, un dénombrement de spz vivants ou morts est réalisé sur un total de 100 à 200 pour calculer la vitalité exprimé en pourcentage de spz vivants.

#### **I.2.2. Evaluation de l'intégrité membranaire**

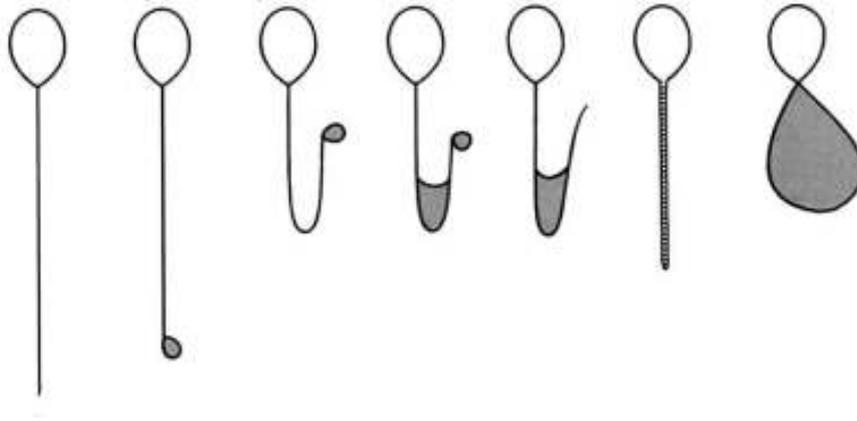
Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'intégrité membranaire des spz. Les principales sont l'évaluation de l'intégrité flagellaire par le test hypo-osmotique et l'évaluation de l'intégrité acrosomiale par la coloration à l'éosine-nigrosine.

- **Evaluation de l'intégrité flagellaire : Test hypo-osmotique**

Le test hypo-osmotique permet de vérifier la fonctionnalité de la membrane plasmique des spz (England, 1993). Dans un milieu hypo-osmotique (Figure 4), les spz, dont la membrane plasmique est fonctionnelle, vont se gorger d'eau et montrer une incurvation de leur flagelle

ou un gonflement de celui-ci. Si la membrane plasmique est endommagée, elle ne permettra pas la pénétration et la rétention d'eau dans les spz et ces derniers vont conserver leur morphologie.

Après dilution dans une solution hypo-osmotique et incubation, une goutte de semence est placée entre lame et lamelle et 100 à 200 spz sont observés au microscope au grossissement x40. Le pourcentage de spz incurvés ou gonflés est calculé. Ce pourcentage est inversement proportionnel au pourcentage de spz ayant une membrane plasmique endommagée.



La cellule la plus à gauche : pas de changement. Autres cellules : différents types de changements de la queue dus à des gonflements

**Figure 4** : Représentation schématisques des différents résultats d'évaluation de l'intégrité flagellaire par le test hypo-osmotique (Cooper et *al.*, 2010)

- **Evaluation de l'intégrité acrosomiale : Coloration à l'éosine-nigrosine**

L'intégrité acrosomiale peut être évaluée par la coloration à l'éosine-nigrosine. Les spz dont l'acrosome est intact apparaissent blancs avec un bord apical bien défini. Ceux qui ont subi la réaction acrosomiale ou qui ont perdu leur acrosome sont colorés en noir et ont un bord apical irrégulier. Cette technique est toutefois loin d'être une technique de choix car elle est grossière et subjective même si elle reste simple, rapide et peu onéreuse (Cooper et *al.*, 2010).

### **I.2.3. Mobilité**

La détermination de la mobilité des spz est considérée comme l'une des plus importantes étapes d'évaluation du sperme. La mobilité et la vitalité des spz dépendent de la proportion optimale entre les sécrétions de la prostate et des vésicules séminales. Les sécrétions des vésicules séminales contiennent un ou plusieurs facteurs qui ont un effet négatif sur la mobilité et la vitalité des spz. Par contre, les sécrétions de la prostate protègent les spz

contre l'effet négatif des sécrétions des vésicules séminales et stimulent leur mobilité (Hafez, 1993).

Deux types de mobilité peuvent être déterminés :

- **Motilité massale**

Elle est analysée au microscope photonique à faible grossissement (x10). L'opération doit être effectuée très rapidement ; du fait de la sensibilité du sperme à l'action toxique de la baisse du pH du plasma séminal, à la lumière, aux chocs thermiques.

Une goutte de semence pure est posée sur une lame chauffée à 37°C. On observe le mouvement de l'ensemble des spz qui forment des tourbillons plus ou moins rapides. Ceux-ci sont notés subjectivement sur une échelle de 0 à 5 (Tableau 2).

**Tableau 2** : Détermination de la note de la motilité massale de la semence (Douet, 2000)

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

- **Motilité individuelle**

Une goutte de sperme est placée entre lame et lamelle sur la platine à 37°C du microscope. On observe, au fort grossissement (x40), individuellement les spz, l'intensité, la rapidité et la trajectoire de leurs mouvements. On peut ainsi apprécier d'une manière subjective, le pourcentage de spz vivants ou morts, fléchant ou tournant en rond. Cet examen peut se faire également après dilution et refroidissement pour juger dans le temps, le comportement et la résistance des spz (Lacroix, 1976 ; Douet, 2000).

Les taux de spz morts ou anormaux acceptables dans le sperme devraient se situer entre 20 et 26% (Fantodji et *al.*, 2009).

Il est aussi possible de réaliser une estimation objective de la motilité par ordinateur (C.A.S.A. : Computer Aided Sperm Analysis) (Kumar et Naqvi, 2010).

**Tableau 3** : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes  
(Stachecki et *al.*, 1993)

Note	Motilité individuelle
0	Pas de déplacement des spz
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblements du spermatozoïde, oscillations de la queue
2	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spz se déplacent plus rapidement
3	Les spz effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement
4	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe
5	Déplacement rectiligne et rapide des spz

#### **I.2.4. Concentration des spermatozoïdes**

La concentration en spz est un indicateur important de la qualité du sperme pour la détermination du taux de dilution du sperme lors de sa conservation. En pratique, plusieurs méthodes de détermination du nombre de spz peuvent être utilisées : méthodes utilisant un hémocytomètre de type Neubaueur modifié, Malassez ou Thoma ; méthode utilisant un spectrophotomètre et méthodes utilisant un logiciel CASA (Mortimer, 2000 ; Cooper et *al.*, 2010).

## **II. Spermocytogramme**

### **• Morphologie des spermatozoïdes**

Le spermatozoïde est constitué de trois parties distinctes d'un point de vue morphologique et peut être fonctionnel s'il présente :

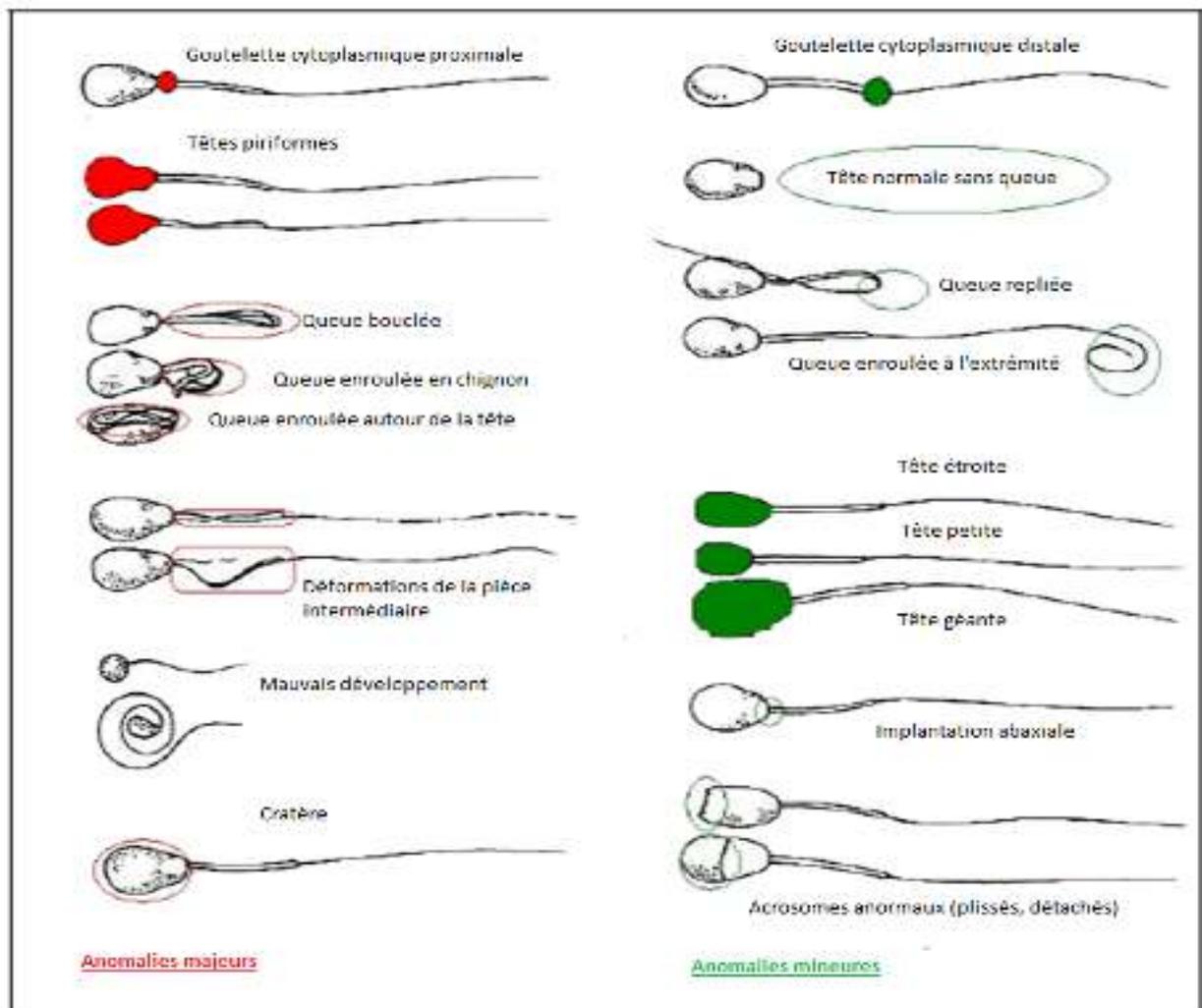
- Une tête, allongée et ovale contenant un acrosome et une chromatine condensée. Cette condensation lui confère sa résistance aux altérations.
- Une partie intermédiaire contenant des microtubules et des mitochondries qui assurent la synthèse d'énergie sous forme d'ATP nécessaire à la survie, au déplacement et à la fonction de fécondation du spermatozoïde.

- Un flagelle composé de microtubules permettant son ondulation, son déplacement et accomplissement de la fécondation (Schmehl et Graham, 1989).

- **Anomalies morphologiques**

Les anomalies morphologiques des spz mis en évidence par de nombreux types de colorants (comme par exemple l'hématoxyline, le bleu d'aniline, l'éosine-nigrosine) classer selon les catégories (Figure 5) suivantes:

- Anomalies de la tête : malposition, tête piriforme ou ronde, allongée ou étroite, microcéphalique ou macrocéphalique, tête double, acrosome anormal
- Décapités
- Anomalies de la pièce intermédiaire : coudée, double, inexistante
- Anomalies du flagelle : enroulé, double, inexistant
- Gouttelettes protoplasmiques : proximales, distales
- Autres cellules : cristaux de spermine, cellules épithéliales, leucocytes, érythrocytes, cellules spermiogéniques (Ott et *al.*, 1987).



**Figure 5 :** Représentation schématique des différentes anomalies retrouvées dans le sperme (Ott et al., 1987)

## **Partie expérimentale**

## **Matériel et méthodes**

## I. Lieu et période

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au niveau de Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, durant le mois de mai 2016.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Animaux

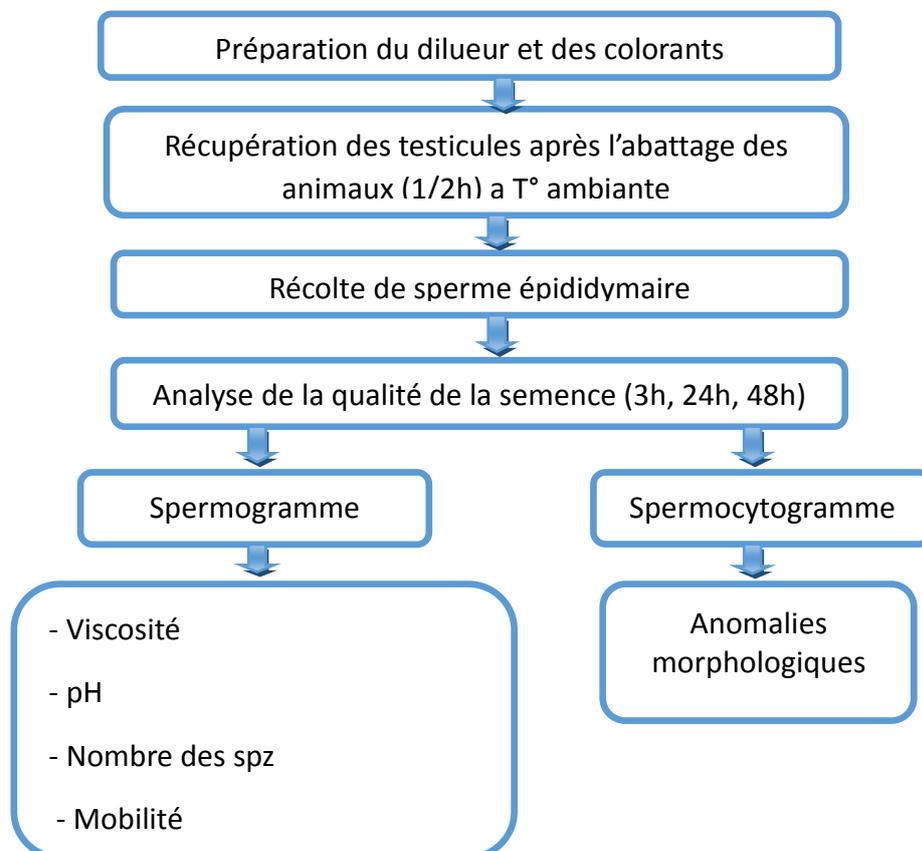
Des béliers de race Ouled Djellal croisée âgés de 8 à 24 mois utilisés dans notre expérimentation, sont répartis en deux groupes d'âge G1 et G2:

- **G 1** : animaux âgés de 8 à 12 mois (n=7)
- **G 2** : animaux âgés de 15 à 24 mois (n= 9)

### II.2. Protocole expérimental

Les étapes du protocole expérimental utilisé dans notre travail sont présentées dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Résumé des différentes étapes du protocole expérimental



### **II.2.1. Préparation du dilueur**

Le dilueur utilisé dans notre travail est à base de jaune d'œuf et de glycérol dont la composition initial est la suivante (Hay et *al.*, 1993):

- 2,42gde Tris (hydroxymethyl) aminomethane ( $C_4H_{11}NO_3$ ;p.a.; Biochem Chemopharme)
- 1,26 g d'acide citrique (tri-Soduim Citrate 2-hydrate PA-ACS ; Panreac,  $C_6H_6Na_3O_7, 2H_2O$ )
- 1g de glucose
- 0,1 g de pénicilline G 500.000 U.I. (Gectapen ; Sidal)
- 100 ml d'eau distillée (SABI Pharm)

Le dilueur final est obtenu en mélangeant 8 dixièmes du dilueur initial contenant du glycérol avec 2 dixièmes de jaune d'œuf et puis conservé à 4°C.

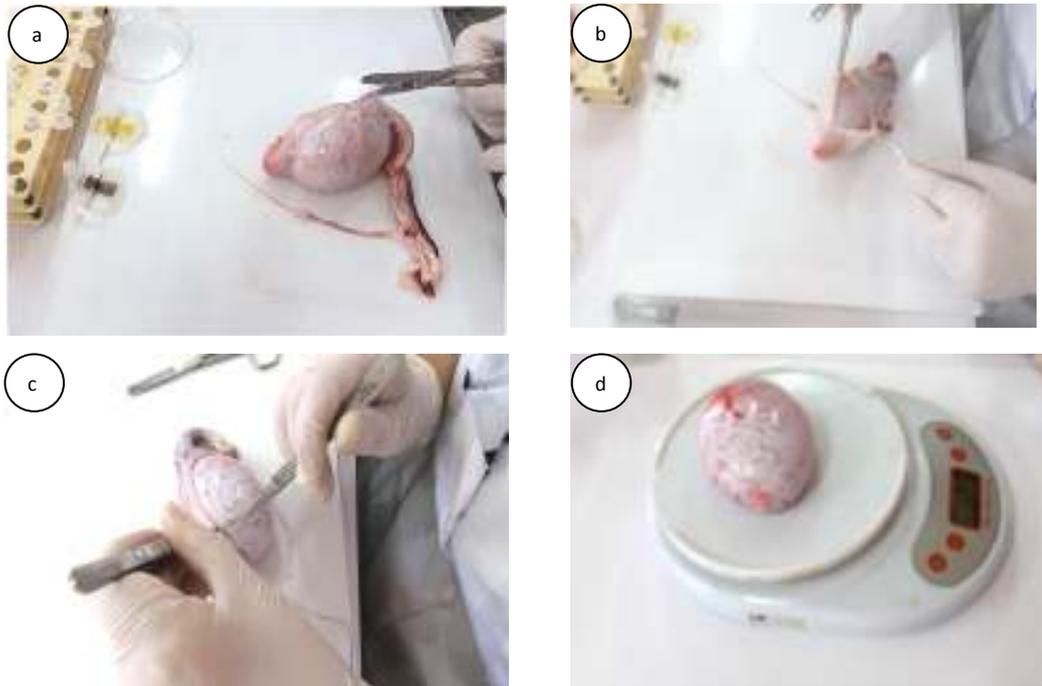
Environ 30 minutes avant son utilisation, le dilueur est placé dans un bain marie à 37°C dans un tube eppendorf.

### **II.2.2. Récolte et transport des testicules**

Les testicules utilisés proviennent des animaux abattus à l'abattoir de Mouzaia et de la Chiffa de la wilaya de Blida. Immédiatement après abattage, chaque testicule récolté est placé dans un sac en plastique portant l'identification de l'animal à savoir l'âge et l'heure de prélèvement. Ensuite, l'ensemble des testicules récoltés le même jour sont transportés, à température ambiante (25°C en moyenne), au laboratoire dans un récipient isotherme. La durée entre la récolte et le début des manipulations est de 3 heures.

### **II.2.3. Prélèvement de l'épididyme et mesures biométriques**

A l'aide d'un scalpel, on a enlevé le sac scrotal (Figures6a et6b) et séparé l'épididyme du testicule (Figures6c et6d). Le testicule et l'épididyme sont ensuite pesés séparément à l'aide d'une balance digitale. La circonférence scrotale est mesurée au niveau du grand diamètre du testicule, à l'aide d'un mètre ruban couturier.

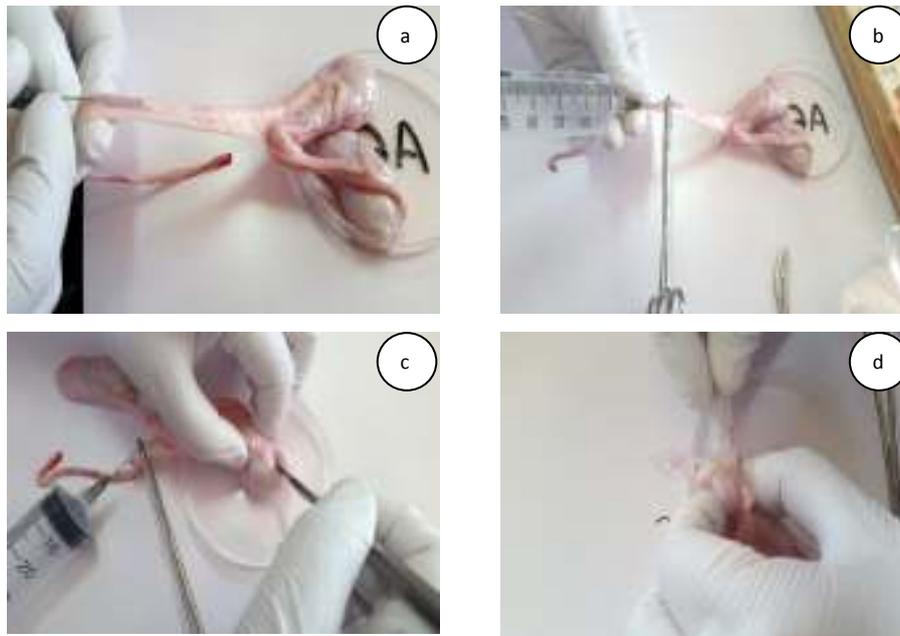


**Figure 6:** Etapes de prélèvement de l'épididyme

#### **II.2.4. Récolte du sperme épидидymaire**

Les étapes de la récolte du sperme de l'épididyme (Guérin et *al.*, 2003) sont :

- L'épididyme est placé dans une boîte de pétri.
- La technique de récolte consiste à introduire une aiguille 18G dans la lumière du canal déférent (Figure 7a).
- Une pression d'air exercé à l'aide d'une seringue de 20 ml dans le canal déférent (Figure 7b) facilite la récupération du sperme après une incision profonde au niveau de la queue de l'épididyme avec une lame de bistouri (Figure 7c).
- Par la suite, le sperme est collecté dans un tube eppendorf (Figure 7d) et mis dans un bain marie à 37°C pour être analysé.
- Enfin, chaque épидидyme placé dans une boîte de pétri est mis dans un sac en plastique et conservé à 4°C pour les prochaines analyses spermatiques à 24 et 48h.



**Figure 7 :**Etapes de récolte du sperme épидидymaire

### II.2.5.Evaluation de la viscosité

L'évaluation de la viscosité est réalisée de la façon suivante :

On prélève une quantité du sperme avec une pipette de 1000 $\mu$ l. On laisse couler le sperme à l'extrémité de la pipette dans une boîte pétri. On évalue à l'aide d'une grille la manière dont le sperme s'écoule d'après Dussault (2009).

### II.2.6. Mesure du pH

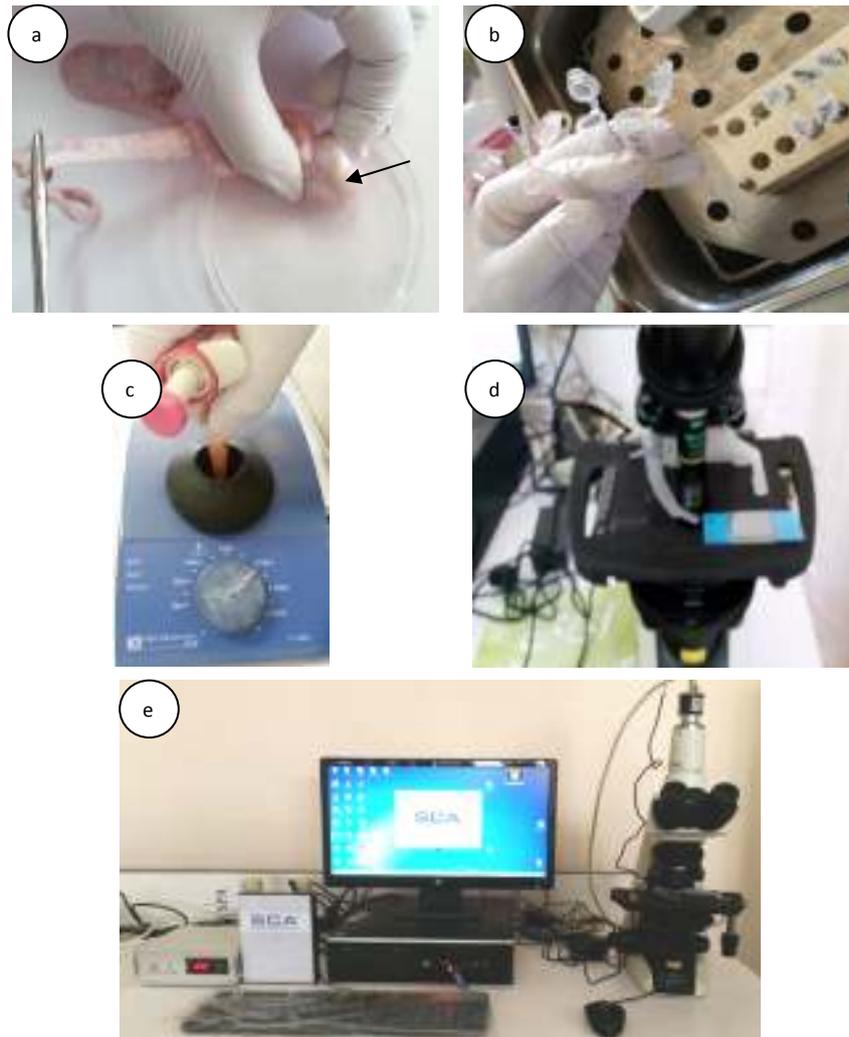
La mesure du pH est réalisée à l'aide de bandelette de papier pH (Urine Analysis strips) (Figure 8a). On a déposé une goutte de sperme bien homogénéisé sur la bandelette de papier pH. Après 20 à 30 secondes, la valeur du pH mesuré est évaluée en comparant la couleur obtenue avec la gamme étalon lue sur le papier de résultats de la boîte contenant les bandelettes de papier pH (Figure 8b).



**Figure 8:** Bandelette de papier pH (Urine Analysis Strips, 5 parameters, AraGen)

## II.2.7. Évaluation de la mobilité

A l'aide d'une micropipette, 10 $\mu$ l de la semence pure sont prélevé (Figure 9a) et dilués dans le dilueur à base de jaune d'œuf et glycérol (Figure 9b). Le mélange est bien homogénéisé au vortex (MS2 MiniShaker) (Figure 9c) et gardé dans un bain marie (Precistern) à 37°C. Par la suite, 3 $\mu$ l sont déposés dans la chambre réservée dans la lame Léja 20 et placé sur la platine chauffante du microscope à contraste de phase (Figure 9d). La mobilité est analysé à l'aide d'un logiciel CASA (Computer Asisted Semen Analysis) (Figure 9e).

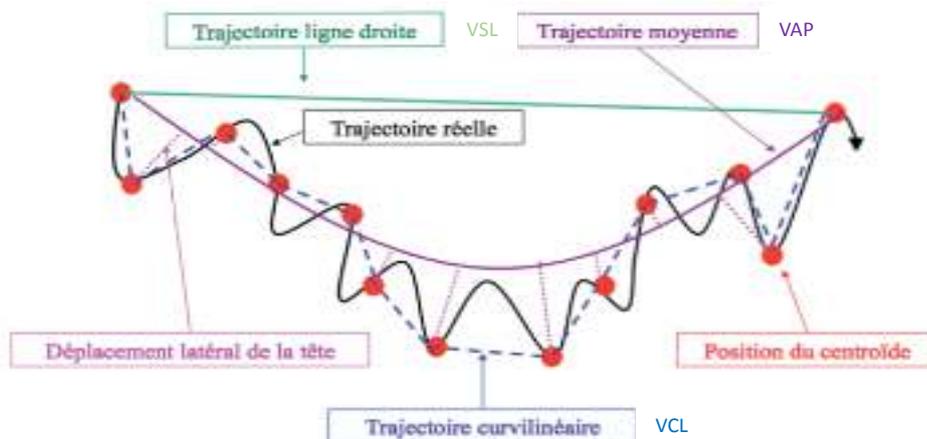


**Figure 9** : Etapes d'évaluation de la mobilité

Les paramètres de la motilité des spz enregistrés et évalués par le CASA sont : la vitesse de trajet moyenne (average path velocity = VAP ;  $\mu$ m/s), la vitesse rectiligne ou linéaire (straight line velocity = VSL ;  $\mu$ m/s), la vitesse curviligne (curvilinear velocity = VCL ;  $\mu$ m/s), fréquence de battement transversale (beat cross frequency = FBC ; Hz) et indice de linéarité (linearity = LIN ; %). (Tableau 5 ; Figure 10).

**Tableau 5** :Définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (Computer assisted semen analyser, CASA) (Ponthier et al., 2014)

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL ( <i>velocity curvilinear path</i> )	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP ( <i>velocity average path</i> )	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL ( <i>velocity straightline path</i> )	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïde pris entre n intervalle de temps
Linéarité	LN ( <i>linearity</i> )	VSL/VCL

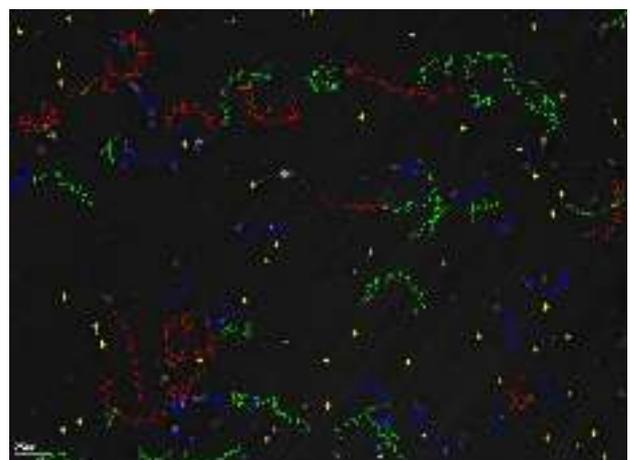


**Figure 10** : Représentation schématique des trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (CASA) (Ponthier et al., 2014)

Le système d'analyse CASA (Figure 12), permet d'établir la classification de la vitesse de déplacement des spz comme suit :

- **Rapide** : Affichage en rouge sur l'image tous les spz qui ont une vitesse rapide.
- **Moyen** : Affichage en vert sur l'image tous les spz qui ont une vitesse moyenne.
- **Lent** : Affichage en bleu sur l'image tous les spz qui ont une vitesse lente.
- **Statique** : Affichage en jaune sur l'image tous les spz qui sont statiques.

BN ?



**Figure 11** : Affichage des résultats d'analyse de la mobilité par le CASA

## II.2.8. Evaluation de la concentration

Pour déterminer la concentration du sperme épидидymaire, on a utilisé un hémocytomètre de type « Malassez » (Figure 12a).

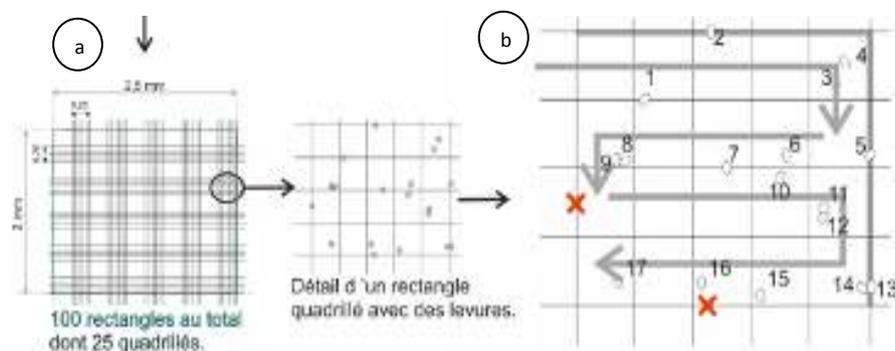
Après avoir nettoyé la cellule de Malassez et la lamelle à l'éthanol 70%, la méthode consiste à :

- Déposer 15  $\mu\text{l}$  du sperme dilué entre lame et lamelle de l'hémocytomètre (Figure 12b).
- Déposer l'ensemble délicatement dans une chambre humide préparé en tapissant le fond avec un papier absorbant mouillé afin d'éviter l'évaporation du mélange (Figure 12c).
- Laisser le mélange se décanter pendant 5 minutes environ avant la lecture.
- Au microscope photonique (Optica Axiom 2000), identifier les 20 carrés d'un grand rectangle de la cellule de comptage en utilisant l'objectif 40x (Figure 12d).



**Figure 12** : Etapes d'évaluation de la concentration

On a compté les spz entiers dans les 5 grands rectangles de la cellule de Malassez (Figure 13a) et selon un sens systématique comme indiqué par la figure 13b.



**Figure 13** : Représentation schématique de la méthode de comptage des cellules à l'aide de la cellule de Malassez (Moreda, 2013)

La formule utilisée (Moreda, 2013) pour déterminer le nombre de spermatozoïde est :

$$\text{Concentration (spz / ml)} = \frac{n \cdot Fd}{a \cdot v \cdot 10^{-3}}$$

Avec :

n = Nombre de cellule compté par rectangle

Fd = Facteur de dilution

a = Nombre de rectangle

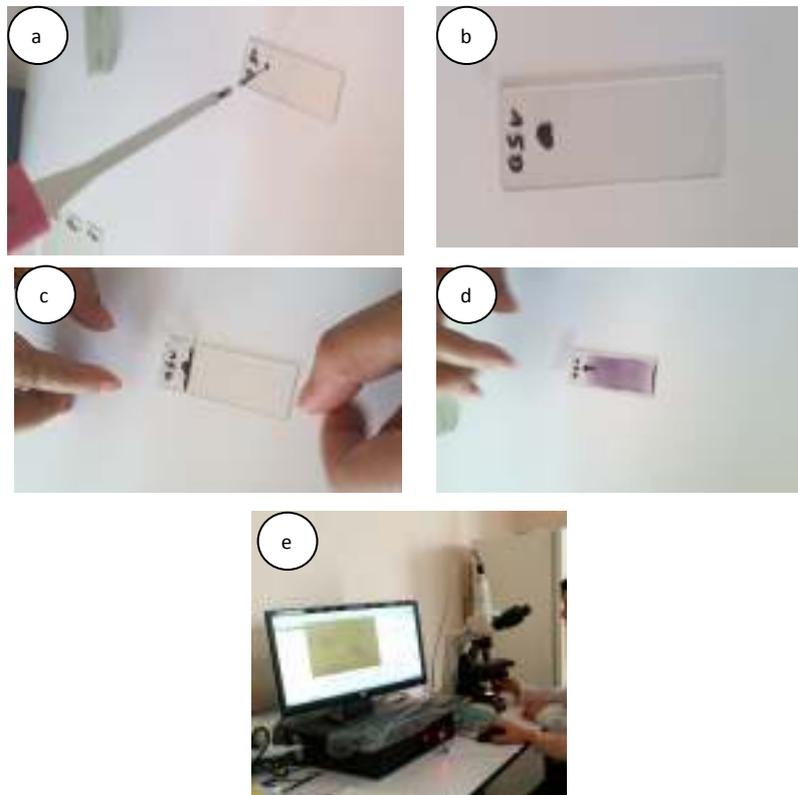
v = volume d'un rectangle d'une cellule de Malassez (exemple : 0,01 mm<sup>3</sup>)

### II.2.9. Evaluation de la vitalité

Pour évaluer la vitalité des spz, on a réalisé un frottis coloré à l'éosine-nigrosine.

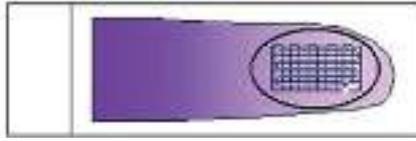
Les étapes de confection et de coloration d'un frottis consiste à :

- Homogénéiser le sperme au vortex,
- Mélanger 10 µl de sperme avec 20 µl d'éosine dans un tube Eppendorf
- Ajouter, 30 secondes après, 30 µl de nigrosine
- Bien homogénéiser le sperme coloré à l'éosine et nigrosine
- Réaliser un frottis en utilisant 5 µl du mélange sur une lame porte objet (Figure 14).



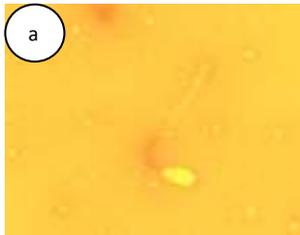
**Figure 14** :Etapes de confection d'un frottis spermatique coloré avec éosine -nigrosine et de comptage

Après séchage des lames colorées, le frottis est observé au microscope à contraste de phase. Ensuite, la lecture est effectuée selon un sens systématique et la zone de comptage est représentée dans la figure 15.

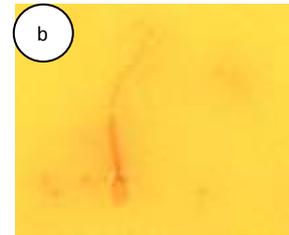


**Figure 15** :Zone de comptage du frottis spermatique coloré à l'éosine-nigrosine  
(Albert et *al.*, 2009)

A l'observation microscopique à l'objectif x20, les spz vivants présentent une tête non colorée (Figure 16a) et les spz morts ont la tête colorée en rouge violacé (Figure 16b). En remarque, les têtes isolées ne sont pas comptées.



Spermatozoïde vivant (x200)



Spermatozoïde mort (x200)

**Figure 16** :Spermatozoïde vivant (a) et spermatozoïde mort (b)après coloration vitale à l'éosine-nigrosine

Le pourcentage de spz vivants est déterminé sur un nombre total de 200 spz en utilisant le logiciel CASA.

### II.2.10. Evaluation des anomalies morphologiques

Les frottis du sperme épидидymaire colorés à l'éosine-nigrosine sont utilisés pour l'évaluation des anomalies des spz. On a compté au microscope à contraste de phase les spz ayant des anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. Sur un total de 100 spz, on a déterminé le pourcentage des anomalies des spz.

### III. Analyse statistique des résultats

- Les résultats numériques sont représentés sous forme de moyenne arithmétique accompagnée de l'erreur standard à la moyenne (ESM)

- **Moyenne arithmétique** :  $X = \frac{\sum x_i}{n}$

- **Erreur standard à la moyenne** :  $ESM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  avec  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Où :  $x_i$  : valeurs individuelles

$n$  : nombre de valeurs

$\sigma$  : écart-type

- La validité statistique des différences entre les moyennes de deux séries expérimentales, est calculée par le **test " t " de Fisher-Student**

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ avec } S^2 = \sqrt{\frac{\sum (x_{1i} - \bar{x}_{1i})^2 + \sum (x_{2i} - \bar{x}_{2i})^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Où :  $X_1$  et  $X_2$  : valeurs moyennes arithmétiques de chaque série

$x_1$  : valeurs individuelles de la première série

$x_2$  : valeurs individuelles de la deuxième série

$n_1$  et  $n_2$  : nombre de valeurs de chaque série

- La probabilité « p » est déterminée sur la table de distribution des « t » en fonction du degré de liberté ( $n_1 + n_2 - 2$ ) ; si :

-  $p > 0,05$  : résultat non significatif

-  $p < 0,05$  : résultat significatif (\*)

-  $p < 0,01$  : résultat très significatif (\*\*)

-  $p < 0,001$  : résultat hautement significatif (\*\*\*)

## **Résultats et discussion**

Nos résultats seront présentés en deux parties :

- La première partie concerne l'effet de l'âge sur les paramètres biométriques et spermatiques de l'épididyme
- La seconde partie porte sur l'effet de la durée de conservation du sperme épидидymaire sur la mobilité et la vitalité des spz.

L'ensemble des résultats seront discutés selon des données bibliographiques de quelques races ovines.

## Première partie

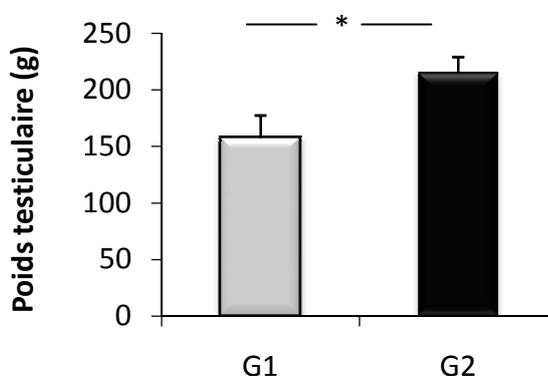
### Effet de l'âge sur les paramètres biométriques et spermatiques de l'épididyme

#### I. Effet de l'âge sur les paramètres biométriques

##### I.1. Poids testiculaire

Le poids testiculaire moyen de G1 et G2 chez les béliers de race Ouled Djellal croisée est rapporté dans le tableau 6 et la figure 17.

Le poids testiculaire moyen de G1 et G2 est de  $157,6 \pm 19,9$  g et  $215,0 \pm 14,1$  g respectivement avec une différence statistiquement significative (36,4% ;  $p < 0,05$ ).



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 17:** Poids testiculaires (g) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée

Le poids testiculaire de G1 et G2 obtenu dans notre travail est comparable avec les résultats rapportés chez la race Ouled Djellal par Belkadi et *al.* (2015) (Tableau 6); par contre, il est inférieur à celui rapporté chez la race Mehraben (Shakeri et *al.*, 2008) et la Yankasa (Iliyasu et *al.*, 2014). Cette différence raciale est expliquée par le fait que le poids et la taille testiculaire varient avec la race, l'âge, les conditions climatiques et l'alimentation (Etim, 2015). Avec l'âge,

l'augmentation du poids testiculaire pourrait être due à l'augmentation de la taille des tubules séminifères et la prolifération des cellules germinales caractérisant l'activité supérieure de la spermatogenèse (Melo *et al.*, 2010).

**Tableau 6** : Poids testiculaires (g), poids de l'épididyme (g) et circonférence scrotale (cm) chez les races ovines

Races	Age (mois)	Poids testiculaire (g)	Poids épидидymaires (g)	Circonférence scrotale(cm)	Références bibliographiques
Ouled Djellal croisée	G1 :8-12	<b>158±19,9</b>	<b>26,8±2,2</b>	<b>35,2±0,6</b>	<b>Résultats personnels</b>
	G2 :15-24	<b>215±14,1</b>	<b>38,0±2,7</b>	<b>39,4±1,1</b>	
Ouled Djellal	6-12	131±7,2	-	-	Belkadi <i>et al.</i> (2015)
	12-24	208±11,6	-	-	
	10 16	-	-	28,37 ± 0,62 33,72± 0,38	Boussena <i>et al.</i> (2014)
Mehraben	24-48	191,1±4,9	34,3±0,1	-	Shakeri <i>et al.</i> (2008)
Ruakura	19	428±26,9 (RHF)	57,8±2,7 (RHF)	-	Knight (1984)
		358±26,9 (RLF)	49,5±2,7 (RLF)	-	
Suffok	6-7	-	-	31,1±0,6	Yarney <i>et al.</i> (1990)
	13-14	-	-	30,9±0,5	
Yankasa	18-24	210±0,1	43,1±0,01	-	Ilyasu <i>et al.</i> (2014)
Balami	Adulte	318±43,2	36,8±0,5	31,2±3,2	Ibrahim <i>et al.</i> (2012)
Uda		362±32,1	51,3±0,6	38,0±0,0	
Yankasa		262±33,3	30,9±7,1	35,2±1,8	
Turkana alba	18	-	-	32,3±0,1	Focsaneanu(2014)
	30	-	-	34,1±0,1	
Bélier de Bangladech	12-24	-	-	21,8±1,73- 22,1±1,85	Hassan <i>et al.</i> (2009)
Santa Ines	8	-	-	26,5±0,9- 27,4±1,6	Teodoro <i>et al.</i> (2013)

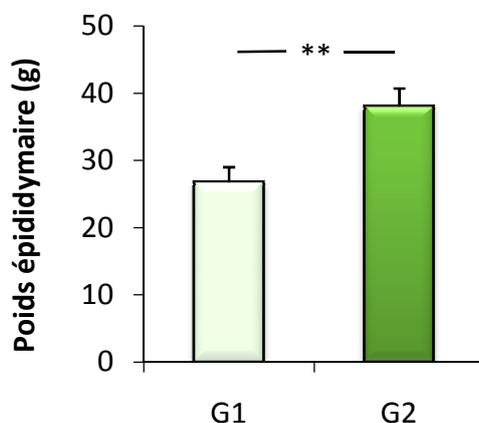
RHF : Ruakura à fertilité élevée ; RLF : Ruakura à faible fécondité

## I.2.Poids de l'épididyme

Le poids de l'épididyme moyen de G1 et G2 chez les béliers est rapporté dans le tableau 6 et la figure 18.

Le poids de l'épididyme de G1 et de G2 est de 26,8±2,2g et de 38,0±2,7g respectivement (Tableau 6). La différence entre les groupes d'âge est statistiquement très significative (41,7% ; p<0,01).

Le groupe G2 présente un poids moyen de l'épididyme supérieur à celui rapporté chez la race Mehraben (Tableau 6) (Shakeri et *al.*, 2008). Par contre, il est inférieur à celui rapporté par Knight (1984) chez la race Ruakura et par Iliyasu et *al.* (2014) chez la race Yankasa. Walker et *al.* (2004) ont rapporté qu'un poids élevé de l'épididyme se traduit par une capacité importante de stockage de sperme et peut améliorer la fertilité.



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 18:** Poids épидидymaire (g) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée

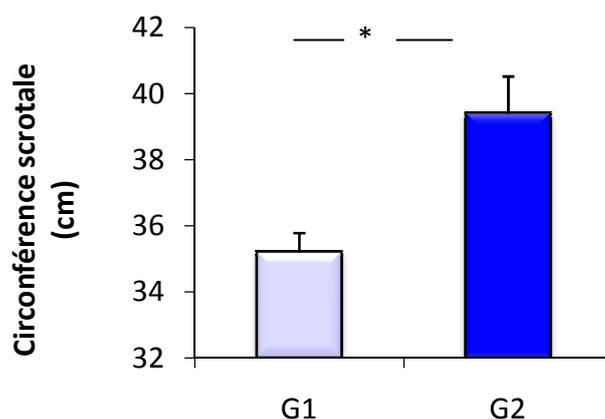
### I.3. Circonférence scrotale

La circonférence scrotale moyenne de G1 et G2 chez les béliers de race Ouled Djellal croisée est rapportée dans le tableau 6 et la figure 19.

La circonférence scrotale de G1 et de G2 est de  $35,2 \pm 0,6$  cm et de  $39,4 \pm 1,1$  cm respectivement (Tableau 6). La différence entre G1 et G2 est statistiquement significative (11,9% ;  $p < 0,05$ ).

Par comparaison à d'autres races ovines, les résultats de G1 sont comparables à celle rapportée chez la race Yankasa (Ibrahim et *al.*, 2012) et la race Turkana alba adulte (Focsaneanu, 2014). Par contre les résultats de G2 sont similaires à la race Uda à l'âge adulte (Ibrahim et *al.*, 2012). Des valeurs inférieures à G1 et G2 sont rapportées par Hassan et *al.* (2009) chez la race de Bangladesh, par Teodoro et *al.* (2013) chez la race Santa Ines Ouled Djellal et par Yarney et *al.* (1990) chez la race Suffok (Tableau 6).

Les résultats de la circonférence scrotale montrent une augmentation significative avec l'âge ( $p < 0,05$ ), ceci est rapporté par plusieurs auteurs (Tableau 6) (Rege et *al.*, 2000 ; Toe et *al.*, 2000 ; Soderquist et *al.*, 2006 ; Tabbaa et *al.*, 2006).



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 19:** Circonférence scrotale (cm) de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée

Plusieurs études ont montré une forte corrélation entre la circonférence du scrotale et du poids des testicules, qui est en corrélation avec la production quotidienne de spz et de la qualité du sperme, rendant ainsi la circonférence scrotale une mesure indirecte de la capacité de productions des spz par les testicules (Coe, 1999; Menon *et al.*, 2011 ; Esmailizadeh, 2014). Ce paramètre, circonférence scrotale, est considérée comme le meilleur indicateur du développement sexuel chez le mâle (Notter *et al.*, 1981) et diffère selon la race (Belibasaki *et al.*, 2000).

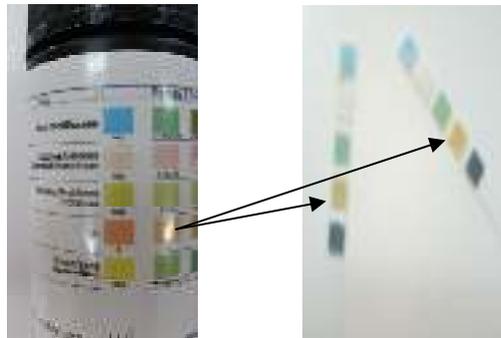
## II. Effet de l'âge sur les paramètres spermatiques

### II.1. Couleur et viscosité de la semence épидидymaire

L'observation macroscopique de la semence épидидymaire récolté montre que cette dernière présente une couleur variant entre le crème et blanc selon le groupe d'âge (G1 et G2) des animaux. De l'ensemble des observations, les animaux du groupe G1 ont une semence de couleur blanchâtre plus ou moins transparente par contre les animaux du groupe G2 leur semence est de couleur crème avec un aspect plus au moins visqueux pour les deux groupes qui peut être lié à la concentration de la semence épидидymaire en spz (Hanzen, 2009). Ces variations de la couleur sont similaires à celles observées des races Djallonké du Cameroun (Nielsen *et al.*, 1985), Peul blanc (Hamani *et al.*, 1987), Peul bicolore (Harouna, 1987) et Peul du Cameroun (Nielsen *et al.*, 1985).

## II.2. pH

Le pH mesuré à l'aide des bandelettes pH est de 6 pour les deux groupes G1 et G2 (Figure20).



**Figure 20** : Résultat du pH par les bandelettes pH

Ce résultat est comparable à celui rapporté par Hulet et *al.* (1965) et Derivaux et Ectors (1989) chez la même espèce où le pH normal est légèrement acide 6,85.

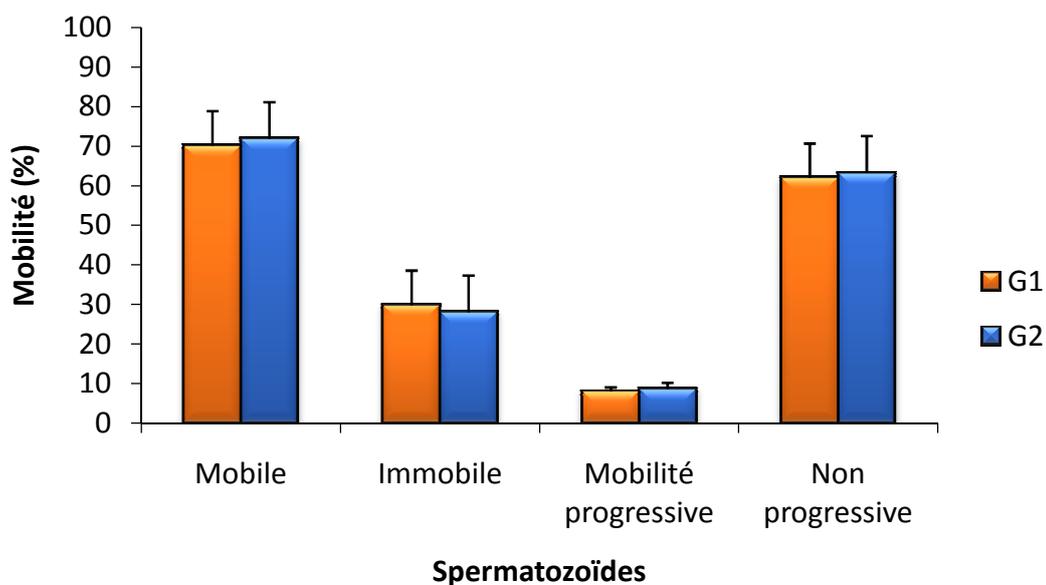
## II.3. Mobilité

Les résultats de la mobilité sont présentés dans le tableau 7 et la figure 21.

L'analyse statistique des spz mobiles révèle des différences significatives ( $p > 0,05$ ) entre G1 et G2. Les différences en pourcentage sont très faibles entre G1 et G2 pour les spz mobiles, immobiles et non progressives avec des valeurs respectives de 2,4 ; 0,1 et 1,8. Par contre, pour les spz avec une mobilité progressive, la différence est de 7,4% après 3h de récolte.

Par comparaison aux autres races ovines, le pourcentage des spz mobiles est comparable à ceux retrouvés chez la race Karakachan de Bulgarie (Sabev et *al.*, 2006), la race Mehrabane (Shakeri et *al.*, 2008), la race Boujaad (Allai et *al.*, 2015) et chez la race Yunnan (Quan et *al.*, 2016) (Tableau 7).

Nos résultats de spz ayant une mobilité progressive sont nettement inférieurs à ceux retrouvés chez les autres races ovines à l'âge adulte (Shakeri et *al.*, 2008 ; Alvarez et *al.*, 2012). Ceci est peut-être expliqué par la durée du temps post mortem qui pourrait avoir un effet néfaste sur la motilité progressive des spz selon Aguado et *al.* (1994). Une explication probable de l'effet néfaste du temps post-mortem sur la motilité des spz épидидymaires sont des changements biochimiques qui se produisent au sein de l'épididyme de l'animal mort (Aguado et *al.*, 1994).



**Figure 21:** Pourcentage de la mobilité des spz épидидymaire de G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée

Les différences dans le temps post-mortem au cours de laquelle une baisse significative de la motilité des spz se produit pourrait être liée à l'espèce, à la température de l'environnement et aux conditions de manipulation (Christian et *al.*, 1993).

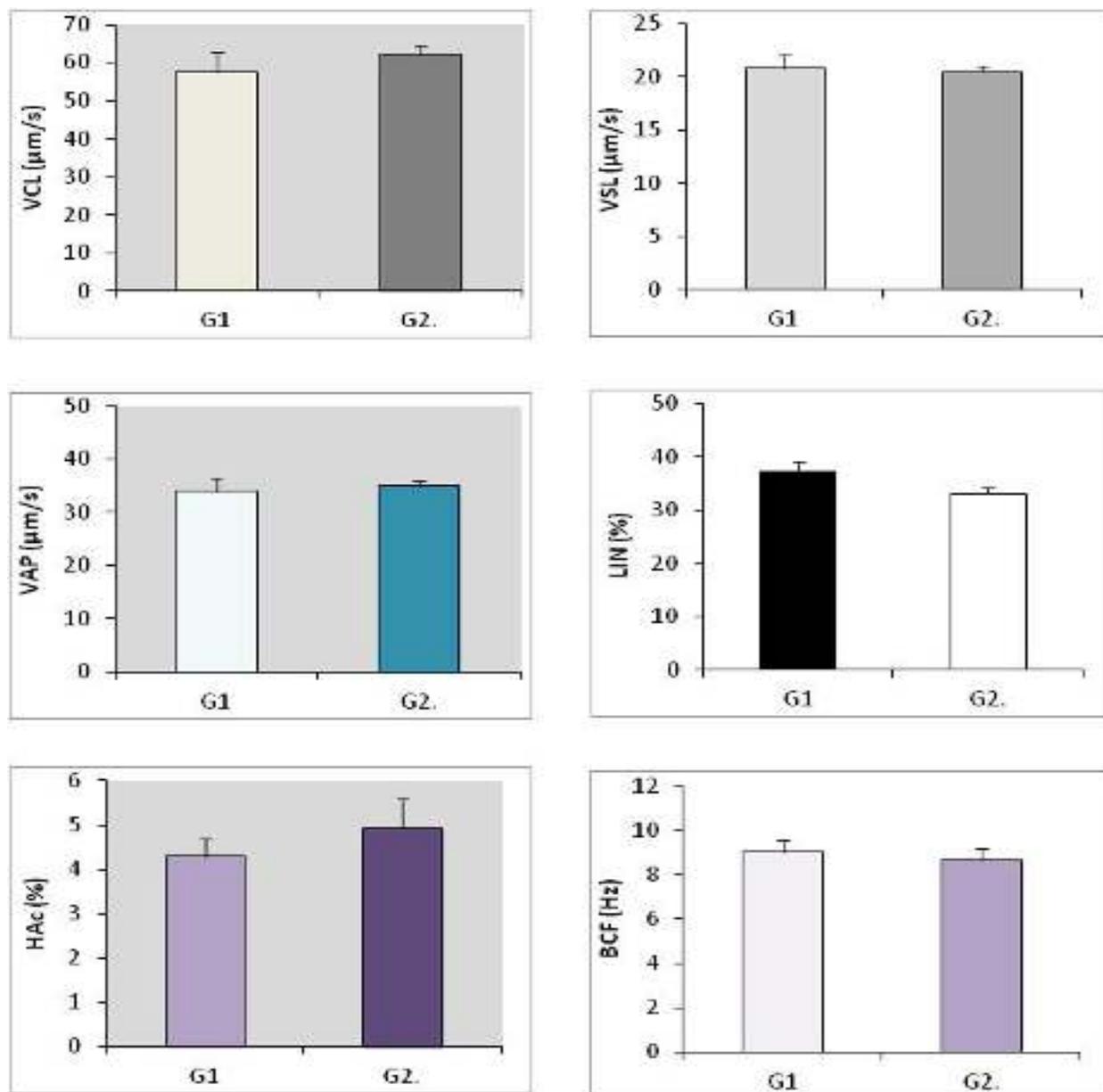
**Tableau 7 :** Mobilité (%) et mobilité progressive (%) chez quelques races ovines

Races	Age (Mois)	Type de récolte	Mobilité (%)	Mobilité progressive (%)	Références bibliographiques
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12 G2 : 15-24	Epididyme	<b>70,2±8,8</b> <b>71,9±9,3</b>	<b>8,1±1,0</b> <b>8,7±1,6</b>	<b>Résultats personnels</b>
Mehrabane	Adulte		69,8±1,0	55,8±1,0	Shakeri et <i>al.</i> (2008)
Boujaad	Adulte	Ejaculat	87,5±0,7	66,71±1,0	Allai et <i>al.</i> (2015)
Karakachan	Adulte		83,5±3,7	-	Sabev et <i>al.</i> (2006)
Ghezel Merinose	36		-	61,2	Soltanpour et <i>al.</i> (2013)
Assaf	Adulte		79,9±11,8	57,6 ± 11,0	Alvarez et <i>al.</i> (2012)
Yunnan	Adulte		75,2±9,8	-	Quan et <i>al.</i> (2016)

## II.4. Cinétique des spermatozoïdes

Les résultats de la cinétique des spz analysés par le CASA sont présentés dans la figure 22.

Les paramètres de dynamisme des spz comme VCL augmentent tandis que BCF diminue avec l'âge. Par contre, pour les paramètres de progression, VAP augmente et VSL et LIN diminue légèrement avec l'âge (Figure 22). Le pourcentage des spz hyperactif (HAc) est plus élevé pour G2 par rapport à G1.



VCL (curvilinear velocity) : vitesse curviligne ; VSL (straight line velocity) : vitesse linéaire ; VAP (average path velocity) : vitesse de trajet moyenne ; LIN (linearity) : indice de linéarité ; HAc :Hyperactif ; BCF (beat cross frequency) : fréquence de battement transversale

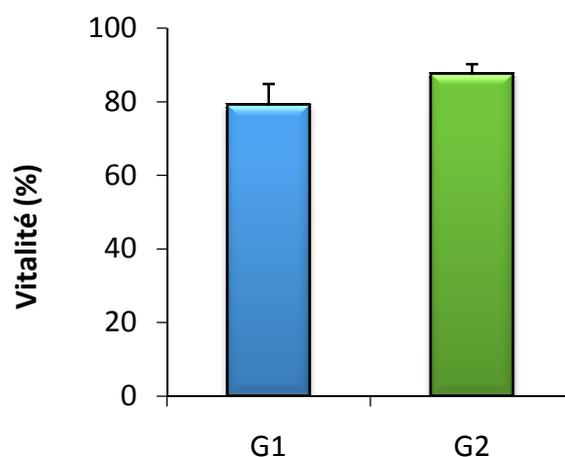
**Figure 22** : Paramètres cinétiques analysés par CASA de G1 et G2 des béliers de race Ouled Djellal croisée

Les résultats mesurés par le CASA montrent que VCL augmente avec l'âge. Ceci peut être lié à la viscosité (Hyun et *al.*, 2012) expliqué par les principes de base de la mécanique des fluides « un objet se déplaçant à travers un fluide est subjugué aux forces de frottement créées par la viscosité du milieu ». Une explication possible de l'augmentation de la force de déplacement du sperme est en rapport avec la production énergie par le spz (génération d'ATP dans la pièce intermédiaire mitochondrial) en réponse à l'environnement plus visqueux (Hyun et *al.*, 2012).

Par rapport aux résultats des autres races ovines obtenues sur le sperme éjaculé, les paramètres de vitesse (ou la cinétique des spermatozoïdes) des béliers de race Ouled Djellal croisée sont très différents. Cette différence peut lier à un certains nombres de facteurs tels que l'âge, le temps de la collecte, les réserves d'énergie de sperme, présence des agents de surface agissant dans la membrane cellulaire tels que les agglutinines et les détergents, la viscosité, osmolarité, pH, température, ioniques la concentration du plasma séminal, et la présence des éléments minéraux tels que Cu, Zn, Mn et des hormones, des prostaglandines (Blasco, 1984). En effet, Kumar et *al.* (2010) ont rapporté un effet âge, race et poids corporel sur les paramètres cinétique (VCL, VAP, VSL et BFC).

## II.5. Vitalité

Les résultats de la vitalité sont présentés dans le tableau 8 et la figure 22. Le pourcentage de vitalité des spz de G1 et G2 est de  $78,9 \pm 5,9$  et  $87,7 \pm 2,8$  respectivement (Tableau 8). La différence entre les deux groupes est de 10,7%.



**Figure 23** : Pourcentage de la vitalité des spz épидидymaire de G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée

Le taux de vitalité est semblable à celui retrouvé chez la race Ouled Djellal (Safsaf et *al.*, 2015) et il est supérieur à celui retrouvé chez la même race par Litim et Bereksi (2015), chez la race Ghezel-Merinoise (Soltanpour et Moghaddam, 2013) et chez la race Djallonké (Haye et *al.*, 2004). Par contre, elle est inférieure à celui retrouvé chez la race Turkana Alba (Faucsaneunu et *al.*, 2014).

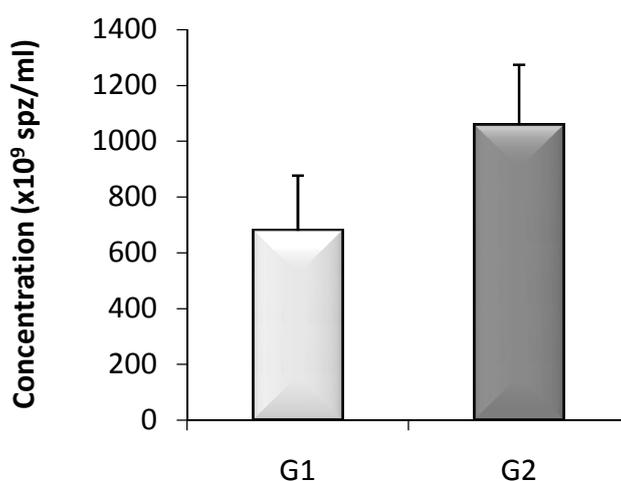
**Tableau 8 :** Vitalité (%) chez quelques races ovines

Races	Age (mois)	Type de récolte	Vitalité (%)	Références bibliographiques
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12	Epididyme	<b>78,9±5,9</b>	<b>Résultats personnels</b>
	G2 : 15-24		<b>87,4±2,8</b>	
Ouled Djellal	Adulte	Ejaculat	82,1±1,5	Safsaf et <i>al.</i> (2015)
	24-40		35,1±9,1	Litim et Bereksi(2015)
	48		60,5	Ghozlane et <i>al.</i> (2005)
Ghezel-Merinoise	36	Ejaculat	60,3±2,8	Soltanpour et Moghaddam(2013)
Turkana Alba	18		87,5±0,5	Faucsaneunu et <i>al.</i> (2014)
	30		89,7±0,16	
Djallonké	8	71,2	Haye et <i>al.</i> (2004)	
	48	72,5		

## II.6. Concentration en spermatozoïdes

Après 3 heures de transport, la concentration en spz est de  $679 \pm 198 \times 10^6$  spz/ml pour G1 et de  $1057 \pm 217 \times 10^6$  spz/ml pour G2 (Figure 23) (Tableau 9).

L'analyse statistique révèle une différence statistiquement non significative (55,7% ;  $p < 0,05$ ) entre G1 et G2.



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 24 :** Concentration en spz ( $\times 10^6$  spz/ml) de G1 et G2 chez les béliers de race Ouled Djellal croisée

La concentration retrouvée de G1 dans notre travail est comparable à celle retrouvée chez la race de Bangladesh (Hassan et *al.*, 2009). Elle est inférieure aux résultats rapportés par de nombreuses auteurs chez la race Ouled Djellal (Ghozlane et *al.*, 2005 ; Taherti et *al.*, 2014 ; Litim et Bereksi, 2016, 2015 ; Saadi et *al.*, 2016) (Tableau 8).

Pour G2, la concentration est comparable à celle obtenue chez la race Mehraban (Shakeri et *al.*, 2008). Elle est supérieure à celle retrouvée chez la même race Ouled Djellal rapportée par Ghozlane et *al.* (2005) et Taherti et *al.* (2014) et par Saadi et *al.* (2016) et chez la race Karakachan rapportée par Sabev et *al.* (2006). Par contre, elle est inférieure à celle retrouvée chez la race Pramenka (Martin et *al.*, 2012) et chez la race Indigène du Bangladesh (Azizunnesa et *al.*, 2014) et à celle rapportée par Litim et Bereksi (2015, 2016) chez la race Ouled Djellal.

Les variations dans les résultats obtenus pourraient être liées à la race, à l'âge, au poids corporel, la saison et à l'alimentation.

**Tableau 9** : Quelques données bibliographiques de la concentration en spz chez quelques races ovines

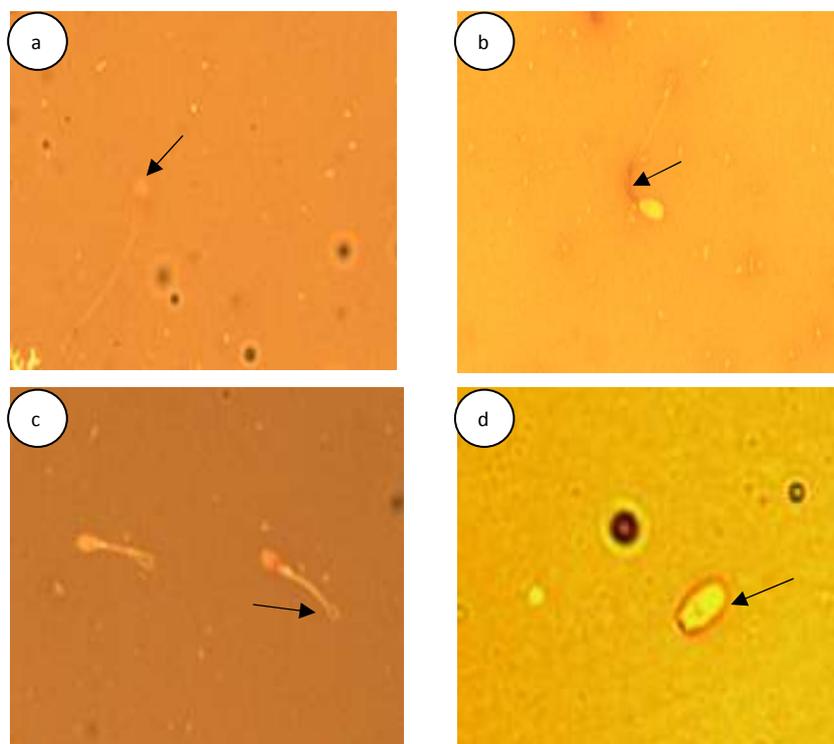
Races	Age (mois)	Type de récolte	Concentration ( $\times 10^6$ spz/ml)	Références bibliographiques
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12 G2 : 15-24	Epididyme	<b>679±198</b> <b>1075±217</b>	<b>Résultats personnels</b>
Ouled Djellal	3-4	Ejaculat	370±42	Taherti et <i>al.</i> (2014)
	48		368	Ghozlane et <i>al.</i> (2005)
	Jeune		401±27	Saadi et <i>al.</i> (2016)
	Adulte		425±19	
24-40	4960±1190		Litim et Bereksi (2015, 2016)	
Karakachan	Adulte		246±7	Sabev et <i>al.</i> (2006)
Bangladech	12		103±61	Hassan et <i>al.</i> (2009)
	24		327±34	
Indigène du Bangladesh	4-5	4500±100	Azizunnesa et <i>al.</i> (2014)	
Mehraban	-	1439±85,6	Shakeri et <i>al.</i> , 2008	

## II.7. Anomalies morphologiques

Les principales anomalies morphologiques des spz observées (Figure 25) sont :

- Anomalies de la tête : tête en poire (Figure 25a)
- Anomalies de la pièce intermédiaire : plié (Figure 25b)
- Anomalies du flagelle : enroulé (Figure 25c), absent (Figure 25d).

Le taux de spz anormaux est de  $60,4 \pm 5,5$  % pour G1 et de  $49,6 \pm 6,5$  % pour G2 (Figure 25). Les valeurs moyennes des anomalies des flagelles sont de  $57,4 \pm 4,2$  % pour G1 et de  $47,2 \pm 5,4$  % pour G2. Les valeurs moyennes des anomalies de la tête sont de  $0,8 \pm 0,5$  % pour G1 et de  $1,1 \pm 0,5$  % pour G2.

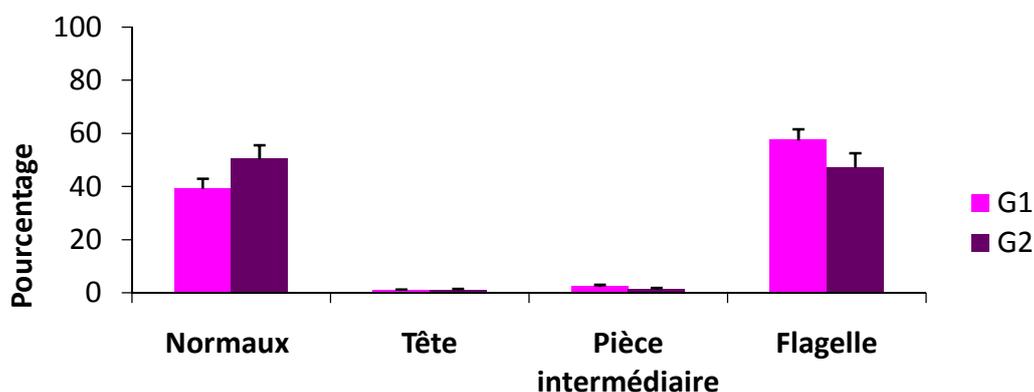


a : tête en poire ; b : cou plié ; c : flagelle enroulé ; d : absence de flagelle ; Flèche noire : lieu de l'anomalie. X20

**Figure 25** : Anomalies morphologiques des spz observés au microscope à contraste de phase

Les valeurs moyennes des anomalies de la pièce intermédiaire sont de  $2,2 \pm 0,8$  % pour G1 et de  $1,3 \pm 0,6$  % pour G2 (Figure 25).

Les valeurs obtenues pour ces trois types anomalies morphologiques ne présentent aucune différence significative ( $p > 0,05$ ).



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 26** : Pourcentage des anomalies morphologiques des spz épидидymaire pour G1 et G2 chez le bélier de race Ouled Djellal croisée

Par rapport aux données bibliographiques, le taux de spz morphologiquement anormaux est nettement supérieur à celui rapporté par Belkhir et *al.* (2015) et Litim et Bereksi (2015) chez des béliers Ouled Djellal. Par contre, il est inférieur à celui retrouvé chez la race Indienne (Lone et *al.*, 2010) (Tableau 9). De l'ensemble des résultats apporté par la bibliographie, le pourcentage des anomalies morphologiques trouvées au niveau de l'épididyme est supérieur à celui trouvé dans l'éjaculat (Tableau 9).

**Tableau 10** : Quelques données bibliographiques des anomalies des spz chez les races ovines

Races	Age (mois)	Type de récolte	Anomalies	Références bibliographiques
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12 G2 : 12-24	Epididyme	<b>60,4±5,5</b> <b>49,3±6,6</b>	<b>Résultats personnels</b>
Indienne	24-36		78,0 ± 2,2	Lone et <i>al.</i> (2010)
Mehraben	24-48		35,1±3,3	Shakeri et <i>al.</i> (2008)
Ouled Djellal	24-40	Ejaculat	4,7±1,8	Litim et Bereksi (2015)
	Adulte		11,3 ± 1,0	Belkhiri et <i>al.</i> (2015)
Karakachan	Adulte		17,4±1,4	Sabev et <i>al.</i> (2006)
Boujaad	36-48		21,0 ± 0,8	Allai et <i>al.</i> (2015)

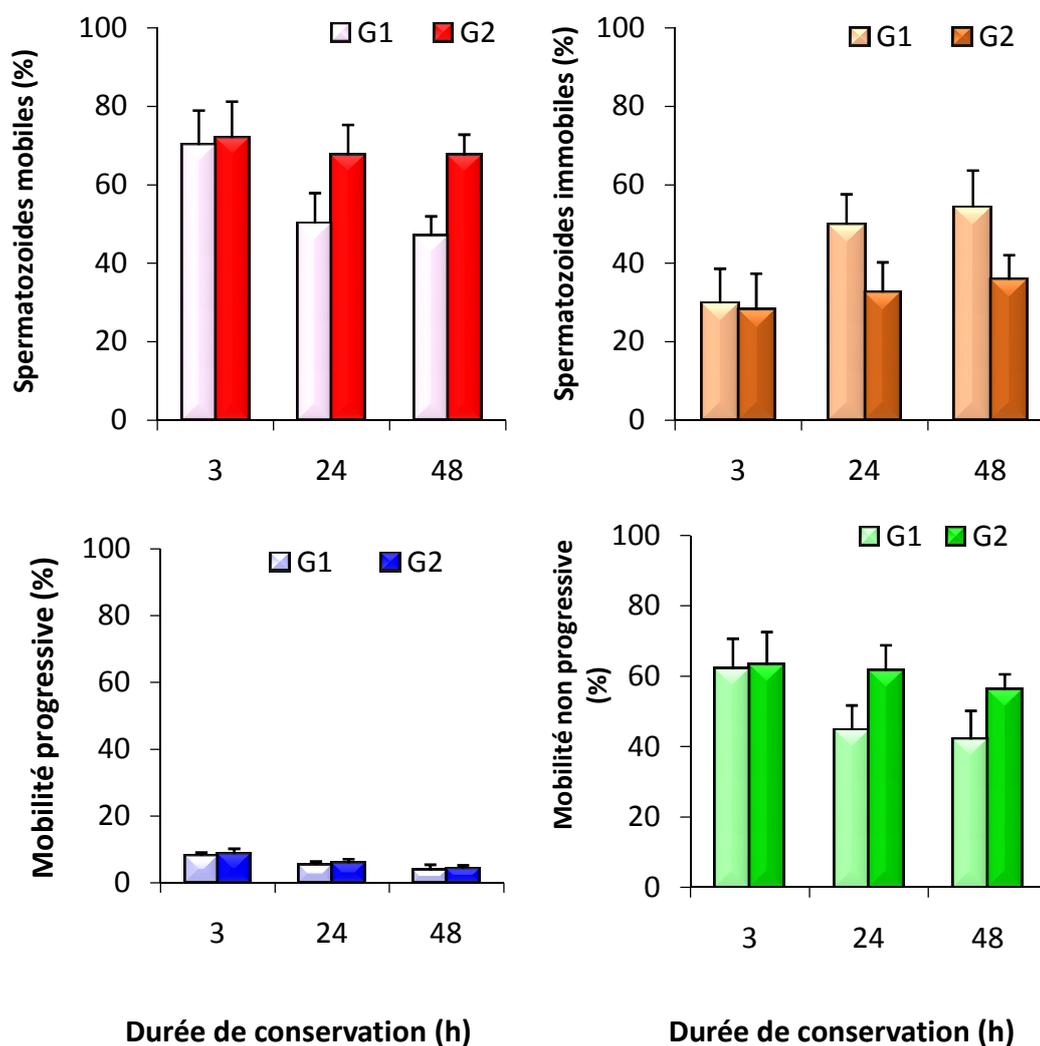
Les variations dans le pourcentage des anomalies des spz pourraient être liés aux procédures de préparation des échantillons spermatiques (facteur de dilution et lavage du sperme) et des lames qui vont servir à l'analyse morphologique assistée par ordinateur pour l'analyse morphométrique des spz (Davis et Gravance, 1993 ; Boersma et *al.*, 2001).

## Deuxième partie

### Effet de la durée de conservation sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes

#### 1. Mobilité

La figure 18 montre les résultats de la mobilité des spz en fonction de la durée de conservation de l'épididyme à 4°C.



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 27 :** Mobilité en pourcentage de G1 et G2 en fonction de la durée de conservation chez les béliers de race Ouled Djellal croisée

Après conservation du sperme dans l'épididyme à 4°C, les résultats (Figure 18) montrent une diminution du :

- Taux des spz mobiles de 70,2±8,8 à 46,7±5,0% pour G1 et de 71,9±9,3 à 67,5±5,3% pour G2.
- Taux des spz à mobilité progressive 8,1±1,0 à 3,7±1,8% pour G1 et de 8,7±1,6 à 4,2±1,0% pour G2.
- Taux des spz à mobilité non progressive de 62,1±8,7 à 42,1±8,1% pour G1 et de 63,2±9,4 à 56,2±4,5% pour G2.

Par contre, le taux des spz immobiles augmente de 29,8±8,8 à 54,2±9,4% pour G1 et de 28,1±9,3 à 35,8±6,3% pour G2.

L'analyse statistique du taux des spz mobiles de G1 révèle une diminution statistiquement significative ( $p > 0,05$ ) après 24h et très significative (33,0% ;  $p < 0,01$ ) après 48h de conservation. Pour G2, la diminution est statistiquement significative (6,2% ;  $p > 0,05$ ) après 48h de conservation.

L'analyse statistique de la mobilité progressive de G1 révèle une diminution significative ( $p > 0,05$ ) entre 24h vs 48h et très significative (54,5% ;  $p < 0,01$ ) entre 3h vs 48h.

Le taux de spz mobiles de G2 est semblable à celui rapporté chez des béliers Boujaad (Allai et *al.*, 2015) et chez la race Karakachan de Bulgarie (Sabev et *al.*, 2006). Il est inférieur à celui retrouvé chez la race Fine-Fleece (Stefanov et *al.*, 2015) et la race Yunnan (Quan et *al.*, 2016) (Tableau 11).

La vitesse de déplacement des spz est l'un des éléments clés dans le processus de fertilisation, qui a été également démontrée par Gage et *al.* (2004).

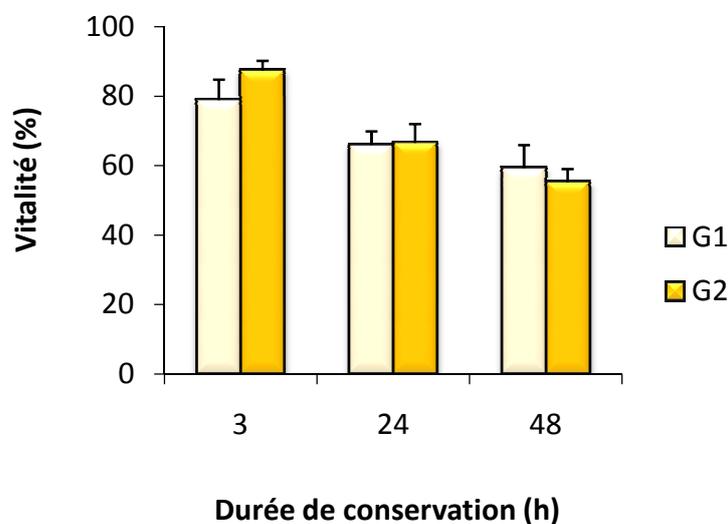
Par rapport aux autres races ovines, le taux de la mobilité progressive obtenu pour G1 et G2 est très faible (Sabev et *al.*, 2006 ; Shakeri et *al.*, 2008 ; Alvarey et *al.*, 2012 ; Soltanpour et *al.*, 2013 ; Allai et *al.*, 2015 ; Stefanov et *al.*, 2015 ; Quan et *al.*, 2016). Par contre, au cours de la durée de conservation la diminution observée est également dans le sperme éjaculé et épидидymaire rapporté par Shakeri et *al.* (2008), Soltanpour et *al.* (2013) et Allai et *al.* (2015) (Tableau 11).

**Tableau 11** : Quelques données bibliographiques de la mobilité et de la mobilité progressive chez les races ovines

Races	Age (Mois)	Type de récolte	Mobilité (%)			Mobilité progressive (%)			Références bibliographiques
			3h	24h	48h	3h	24h	48h	
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12 G2 : 15-24	Epididyme	<b>70,2±8,8</b> <b>71,9±9,3</b>	<b>50,1±7,7</b> <b>67,5±7,7</b>	<b>46,7±5,0</b> <b>67,5±5,3</b>	<b>8,1±1,0</b> <b>8,7±1,6</b>	<b>5,4±1,0</b> <b>5,9±1,1</b>	<b>3,7±1,8</b> <b>8,1±3,9</b>	Résultats personnels
Mehraben	24-48		-	52,3±5,1	38,1±3,6	-	33,6±5,5	13,2±0,6	Shakeri et al. (2008)
Assafe	Adulte		62,0±16,2			41,5±11,5			Alvarey et al. (2012)
Boujaad	Adulte	Ejaculat	87,5±0,7	76,4±0,9	72,1±1,1	66,7±1,1	45,8±1,8	26,2±0,4	Allai et al. (2015)
Karakachan	Adulte		83,5±3,7			-	-	-	Sabev et al., 2006
Ghezel Merinose	36		-	-	-	61,2	51,5	48,0	Soltanpour et al. (2013)
Fine-fleece	3 ans		-	77,0±0,9	70,0±0,1	-	-	-	Stefanov et al. (2015)
Yunnan	Adulte		-	71,3±12,1	-	-	-	-	Quan et al.(2016)

## 2. Vitalité

Le taux de vitalité des spz décroît avec la durée de conservation de  $78,9 \pm 5,9$  à  $59,3 \pm 6,6\%$  pour G1 et de  $87,3 \pm 2,8$  à  $55,3 \pm 3,7\%$  pour G2 après 48 h de conservation (Figure 19).



G1 : 8-12 mois d'âge ; G2 : 12-24 mois d'âge

**Figure 28** : Vitalité en pourcentage de G1 et G2 en fonction de la durée de conservation chez les béliers de race Ouled Djellal croisée

L'analyse statistique révèle une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) entre 3h vs 24h et significative ( $p > 0,05$ ) entre 3h vs 48h pour G1 ; elle est hautement significative entre les 3h vs 48h pour G2.

Les spz épидидymaires conservés à 4°C pendant 48 h préservent leur vitalité de presque de moitié pour G1 et G2. Des résultats comparables ont été rapportés par Belkadi et *al.* (2013) chez la race Ouled Djellal et par Haye et *al.* (2004) chez la race de Djallonké (Tableau 7).

Le taux des spz vivants est élevé par rapport à ceux rapportés chez les races Ghezel-Merinoise (Soltanpour et Moghaddam, 2013) et la race Assaf (Alvarez et *al.*, 2012). Par contre, il est inférieur à celui retrouvé chez les races ovines Turkana Alba, Boujaad et Garut respectivement par Faucsaneunu et *al.* (2014), Allai et *al.* (2015) et Boediono et *al.* (2004).

La différence entre individus du taux de spz vivants semble être liée au type de naissance (Rege et *al.*, 2000) et du mode de récolte du sperme.

**Tableau 12** : Quelques données bibliographiques de la vitalité chez les races ovines

Races	Age (mois)	Type de récolte	Vitalité (%)			Références bibliographiques
			3h	24h	48h	
Ouled Djellal croisée	G1 : 8-12 G2 : 15-24	Epididyme	<b>78,9±5,9</b> <b>87,4±2,8</b>	<b>66,0±3,9</b> <b>66,6±5,4</b>	<b>59,4±6,6</b> <b>55,3±3,7</b>	<b>Résultats personnels</b>
Ouled Djellal	Adulte		82,1±1,5	77,7±1,7	66,6±2,0	Safsaf et <i>al.</i> (2015)
Assaf	Adulte		35,7±14,5			Alvarez et <i>al.</i> (2012)
Ouled Djellal	24-40	Ejaculat	35,1±9,0			Litim et Bereksi (2015)
	48		60,5			Ghozlane et <i>al.</i> (2005)
Ghezel-Merinoise	36		60,3±2,8	50,3±2,5	46,2±3,2	Soltanpour, et Moghaddam (2013)
Turkana Alba	18		87,5±0,2			Faucsaneunu et <i>al.</i> (2014)
	30		89,7±0,1			
Djallonké	8		71,1			Haye et <i>al.</i> (2004)
	48		72,4			
Garut	Adulte		91,5±3,1			Boediono et <i>al.</i> (2004)
Boujaad	24-40		79,5±0,7		75,2±0,9	Allai et <i>al.</i> (2015)

## **Conclusion et perspectives**

De l'ensemble des paramètres analysés, on conclut que les résultats montrent :

- Un effet âge sur les paramètres biométriques (poids testiculaire, poids épидидymaire et circonférence scrotale), sur les paramètres spermatiques (taux de vitalité des spz, concentration en spz, taux des spz mobiles et immobiles et sur les paramètres cinétiques (VCL, VAP et VSL).
- Un effet de la durée de conservation de l'épididyme après 48h à 4°C sur la mobilité et la vitalité des spz.
- Qu'il est possible de récupérer spz viables avec un taux de mobilité acceptable au niveau de la queue de l'épididyme à 4°C pendant 48h.
- Que la récupération de sperme postmortem de l'épididyme peut constituer un moyen pour la conservation du matériel génétique des races ovines à préserver.

En perspective, notre travail mérite d'être complété par :

- une étude morphométrique des spz ;
- une étude comparative des effets de la T° de transport des prélèvements sur les paramètres spermatiques ;
- une étude comparative des effets des milieux de conservation (dilueurs) sur les paramètres spermatiques.

## **Références bibliographiques**

- Agarwal A., Rakesh S., David R., Nelson D.R., 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Androl.*, 24(3): 343-352
- Aguado M.J., Garde J., Madridano J.M., Perez S., Garrido D., et al., 1994. Freezing epididymal semen of postmortem sheep, preliminary results. *Proceeding of the 7th International Working Day on Animal Reproduction, Murcia University, Murcia, Spain*, 283-297
- Albert M., Auer J., Auger J., de Almeida M., Dulioust E., Eiss D., Eustach F., Fauque P., Hélénon O., Jouannet P., et al., 2009. Exploration de la fonction de reproduction versant masculin. *Biol. Méd.*, 42:220
- Allai L., Druart X., Contell J., Louanjli N., Ben Moula A., Badi A., Essamadi A., Nasser B., El Amiri B., 2015. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris orskim milk based extenders. *J. Reprod. Sci.*, 160:57-67
- Almeida F.L., Leal M.C., França L.R., 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol. Reprod.*, 75:792-799
- Al-Samarrae S.H., 2015. Breeds variation in semen quality of some local iraqi rams. *Bas.J.Vet.Res.*, 14(1):274-281
- Alvarez M., Tamayo-Canul J., Martinez-Rodriguez C., López-Uruena E., Gomes-Alves S., Anel L., Martinez-Pastor F., de Paz P., 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Anim. Reprod. Sci.*, 132(3-4):145-154
- Amann R.P., 1987. Function of the epididymis in bulls and rams. *J. Reprod. Fertil. suppl.*, 134:115-131
- Axner E., 2006. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66: 14-24
- Azizunnesa B.F.Z., Bari F.Y., Shahi Alam Md.G., 2014. Baseline study of reproductive performances of indigenous rams in Bangladesh. *IOSR- J. Agric. Vet. Sci.*, 2319-2372(7):83-89
- Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeuret P., Vallet J.-C., 1993. *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO production et santé animales*, 111
- Bedford J.M., 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev.* 79:429-460
- Belkadi S., Alloui N., Belkacem Laissi A., Safsaf B., Djaaba M., Idir K., 2013. Study of the survival and mobility of the epididymal spermatozoids preserved at 4°C in Ouled Djellel rams. *Renc. Rech. Rumin.*, 20:1
- Belkadi S., Alloui N., Aissi A., Belkacem L., Safsaf B., Idir K., 2015. Influence of age on epididymal sperm parameters and testicular measurements of the Ouled Djellal Algerian sheep breed. *Renc. Rech. Ruminants*, 22
- Bielli A., Genovese P., Ungerfeld R., Katz H., 2007. Histology of lamb epididymal development. *Anat. Histo. Embryo.*, 36(6):437-441
- Blanchard Y., Robaire B., 1997. Le mode d'action des androgènes et la 5 $\alpha$ -réductase. *Médecine/sciences*, 13:467-73

- Blaquier J.A., Cames M.S., Burgos M.H., 1972. The role of androgen in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea-pig. *Endocrinology*, 90:839-842
- Blasco L., 1984. Clinical tests of spermfertilizing ability. *Fert.Steril.*, 41(2):177-192
- Boediono A., Herdisu., Rizal M.2004. Preservation of garut rams spermatozoon as a source of male germ plasm. *Biotropia*, 23: 40-46
- Boersma A., Braun J., 1999. Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 112(3):81-5
- Boland M.P., Al-Kamali A.A., Crosby T.F., Haynes N.B., Howles C.M., Kelleher D.L., Gordon I., 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Anim. Reprod. Sci.*, 9:241-252
- Boussena S., Aimeur R., Hireche S., Bouaziz O., Tainturier D., 2014. Contrôle des performances de reproduction (corporelles, testiculaires et spermatiques) chez les antenais de race Ouled Djellal de la puberté jusqu'à la mise à la reproduction. *Archiv. Appl. Sci. Resear.*, 6(3):102-107
- Brooks D.E., 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J. Biol. Sci.*,36(3):205-21
- Brown B.W., 1994. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod. Nutri. Dev.*, 34(2):89-114
- Campbell R.C., Dott H.M., Glover T.D., 1956. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agr. Sci.*, 48(1):1-8
- Chemineau P., Malpoux B., Pelletier J., Leboeuf B., Delgadillo J.A., Deletang F., Pobel T., Brice G., 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 9:45-60
- Christensen P., Labouriau R., Birck A., Boe-Hansen G.B., Pedersen J., Borchersen S., 2011. Relationships among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J. Dairy. Sci.*, 94:1744-1754
- Christian C., Songsasen N., Leibo S.P., 1993. Presence of motile sperm in mice 24 h postmortem. *Theriogenology*, 39:201-201
- Coe P.H., 1999. Associations among age, scrotal circumference, and proportion of morphologically normal spermatozoa in young beef bulls during an initial breeding soundness examination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 214(11):1664–1667
- Colas G., Guerin Y., Clanet V., Solari A., 1985. Influence of the photoperiod on the production and fecundity of spermatozoa in the adult Ile-de-France ram. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25:101-111
- Cooper T.G., 1986. The epididymis, maturation and fertilization. New York springle -varlag, 1-281
- Cooper T.G., 1991. Function of the epididymis and its secretry. Product. Ed. springle -varlag (ed). Maturation and Fertilization. New York, 1-281
- Cooper T.G., Yeung C.H., 2006. Sperm maturation in the human epididymis. In *The Sperm Cell. Prod, Matur, Fertili, Regen* Cambridge University Press, Cambridge, UK, 72-107
- Cooper M.C.C., Barbas J.P., Baptista M.C., 2010. Who laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Ed. Fifth, Trevor G., World Health Organization

- Cosentino M.J., Takihara H., Burhop J.W., Cockett A.T.K., 1984. Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *J. Androl.*, 5:216–222
- Crabo B., 1965. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Vet. Scand. Suppl.*, 5(1):94-153
- Cuasnicu P.S., Echeverria F.G., Piazza A., Blaquier J.A., 1984. Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 70(2):541-547
- Davis R.O., Gravance C.G., 1993. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil. Steril.*, 59(2):412-7
- Derivaux J., Ectors F., 1989. *Reproduction chez les animaux domestiques. Troisième Edition revue.* Cabay, Belgique, 1141p
- Dooley M.P., Pineda M.H., 1986. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.*, 47(2):286-292
- Douet D-G.N., 2000. *Congélation de sperme de mammifères, application aux antilopes.* Ecole nationale de Nantes, 111
- Dussault J., 2009. Le spermogramme. *Sommaire scientifique*, 16(2):9p
- Elzoghby I.M.A., Sosa G.A., Mona N.A.H., Manshawy, A.A., 2014. Postnatal development of the epididymis in the sheep. *BENHA. J. Vet. Med.*, 26(1):67-74
- England G.C.W., 1993. Cryopreservation of dog semen : a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47:243-255
- Esmailzadeh A.K., 2014. Detection of chromosomal segments underlying scrotal circumference in ram lambs and age at onset of puberty in ewe lambs. *Anim. Prod. Sci.*, 55(8):1018-1024
- Etim N.N., 2015. Testicular and Epididymal Morphometric Characteristics : Viable Indicators of Reproductive Ability of Farm Animals. *American J. Bio. Sci. Engineering*, 1(4):39-44
- Fantodji A., Soro D., TreYavo M., 2009. Caractéristiques spermatiques et maturité des gonades des aulacodes mâles d'élevage en Côte d'Ivoire. *Revue. Méd. Vét.*, 160(1):44-53
- Focsaneanu V., Liviu B., Sanda A., Sidonia B., Anamaria B.P., 2014. Performance of some variables used as a procedure for estimating sexual capacity (fertility) of the ram. *Bulletin UASVM Vet. Med.*, 71 (1): 52-58
- Folch J., 1984. The influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. In: *The male in farm animal reproduction.* Ed. Courot, M., Martinus Nijhoff, Amsterdam. 141-160
- Foot R.H., 1978. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J. Anim. Sci.*, 47(2):1-11
- Ford J.J., Wise T.H., Lunstra D.D., Rohrer GA., 2001. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. *Biol. Reprod.*, 65:906-912

- Fournier-Delpech S., Colas G., Courot M., Ortavant R., 1977. Observations on the motility and fertilizing ability of ram epididymal spermatozoa. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 17:987-990
- Frenette G., Lessard C., Sullivan R., 2004. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.*, 69(4): 448-456
- Frunza I., Cernescu H., Korodi G., 2008. Physical and chemical parameters of boar sperm. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, Vol. XLI, Timisoara, 634-640
- Gaddum P., 1968. Sperm maturation in the male reproductive tract : Development of motility. *Anat.Rec.*, 161(4):471-482
- Gage M.J.G., Macfarlane C.P., Yeates S., Ward RG., Searle B., Parker G.A., 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in atlantic salmon. *Current Biology*, 14(1):44-47
- Ghozlane F., Ziki B., Yakhlef H., 2005. Seasonal variation of the quantitative parameters of adult ram semen of the Ouled-Djellal race. *Institut National Agronomique El-Harrach, Alger*, 162p
- Guérin Y., 2003. Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. *Les Actes du BRG*, 4173-183, 173
- Hafez E.S.E., 1993. *Reproduction in Farm Animals*, 6th Edition, Ed. Lea & Febiger, Philadelphia
- Hafez B., Hafez E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*, Williams and Wilkins, Lippincott
- Hamani M., Yenikoye A., Banoin M., 1987. Quelques données sur le sperme de béliers Peul blanc et Touareg du Niger. *Faculté d'Agronomie, Université Abdou Moumouni*, 237p
- Harouna A., 1987. Etude de quelques caractéristiques morphologiques de sperme de béliers Peul bicolore du Niger. *Rapport du stage*, 17
- Hassan M.R., Pervage S., Ershaduzzaman M., Talukder M. A. I., 2009. Influence of age on the spermogramic parameters of native sheep. *Goat & Sheep Prod Res Divi, BLRI, Savar, Dhaka-1341, Bangladesh*
- Hay M.A., Goodrowe KL., 1993. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47:297-305
- Hay M.A., King W.A., Gartley C.J., Leibo S.P., Goodrowe K.L., 1997. Canine spermatozoacryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48:1329-1342
- Haye C. M'betiegue L. G., Nazaire Tanon B., 2004. Evaluation de la qualité du sperme du bélier de race Djallonké en région de savane humide de Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 16(3):37- 46
- Hermo L., Wright J., Oko R., Morales C.R., 1991. Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Bio.Reprod*, 44(6):1113-1131
- Hermo L., Robaire B., 2002. Epididymal cell types and their functions, in *The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA, 81-102

- Holt WV., 2011. Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reprod.Domest.Anim.*, 46(2): 68-74
- Hulet C.V., Foote W.C., Blackwell R.L., 1965. Relationship of semen quality and fertility in the ram to fecundity in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 9:311-315
- Hyun N., Chandsawangbhuwana C., Zhu Q., Shi L.Z., Yang-Wong C., Berns M.W., 2012. Effects of viscosity on sperm motility studied with optical tweezers. *J. Biomed. Optics*, 17(2):025005-6
- Ibrahim SA., 1997. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim. Reprod. Sci.*, 49(2-3):161-7
- Ibrahim A.A., Jibril A.J., Ashiru R.M., Mustapha J.M., 2012. Biometric Study of the Reproductive organs of three breeds of sheep in Nigeria. *Int. J. Morphol.*, 30(4):1597-1603
- Ilyasu D., Paulline C.N., Sankey R.J., Bisalla M., Ate L.U., Fati B.M., Bugau J.S., 2014. Gonadal and extragonadal sperm reserves of yankasa rams experimentally infected with *Fasciola gigantica* in Zaria, Nigeria. *J. Vet. Adv.*, 4(5):529-534
- Jaakkola U.M., 1983. Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo. *J. Reprod. Fertil.*, 68:465-470
- Jennings J.J., McWeeney J., 1976. Effect of frequent ejaculation on semen characteristics in rams. *Vet. Rec.*, 98:230-233
- Johnson A. L., Howards S.S., 1975. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *Am. J. Physiol.*, 228: 556-564
- Joseph A., Okere C., Ezekwe M., 2005. Seasonal and genotype variations in libido, semen production and quality in artificial insemination boars. *J. Anim. Vet. Adv.*, 4:885-888
- Joseph A., Yao H., Hinton B.T., 2009. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Devl. Bio.*, 325(1):6-14
- Kamp G., Busselmann G., Jones N., Wiesner B., Lauterwein J., 2003. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *J. Reprod.Fertil.*, 126:517-525
- King G.J., Macpherson J.W., 2005. Alkaline and Acid Phosphatase Activity, pH and Osmotic Pressure of Boar Semen. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 30: 304-307
- Kishore P.V.S., Ramesh G., Basha S.H., 2012. Postnatal differentiation and regional histological variations in the ductus epididymidis of rams. *Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci.*, 8(3):145-151
- Knight T.W., 1984. Testicular growth and size in rams from flocks of different reproductive potential, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 27(2):179-187
- Kumar D., Joshi A., Naqvi S.M.K., 2010. Comparative semen evaluation of Malpura and Bharat Merino rams by computer-aided sperm analysis technique under semi-arid tropical environment. *Inter. J. Anim. Vet. Adv.*, 2(1):26-30
- Kumar D., Naqvi A-J.S.M.K., 2010. Objective assessment of sperm motion characteristics of Malpura ram lambs raised under intensive management system in semiarid tropical environment. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 42:653-658
- Lacroix M., 1976. Circuit physique de la semence ovine .In *Insémination artificielle ovine*. Editions SEARLE-Paris, 105:81-93

- Leblanc B., 2004. Améliorations des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'étude en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 55p
- Linde Forsberg C., 2001. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In : Recent Advances in Small Animal Reproduction, Concannon P.W., England G., Verstegen J. and Linde-Forsberg C. (Eds.). International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Document No. A1209.0501
- Litim Mi., Bereksi R.K., 2015. Variations in semen characteristics rams of Ouled Djellal breed have received an important dietary supplement after regular and intensive collection. *Asian Pacific J. Reprod.*, 4(1): 13-16
- Litim M., Bereksi R.K., 2016. Changes in sperm characteristics of the three main breeds of sheep in Algeria after dietary supplementation. *Asian Pacific. J. Reprod.*, 5(3):236-239
- LoneF.A., Islam R., Khan M.Z., Sofi K.A., 2010. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim.Reprod. Sci.*, 123:54-59
- Martinez-Pastor F. , Garcia-Macias V., Alvarez M., Chamorro C., Herraes P., de Paz P., Anel L., 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65(3):471-485
- Melo F.C.S.A., Matt S.L.P., Paula T.A.R., Gomes M.L.M., Oliverira L.C., 2010. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult wistar rats. *Biol. Res.*, 43:445-450
- Menon A.G., Barkema H.W., Wilde R., Kastelic J.P., Thundathil J.C., 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Can J. Vet. Res.*, 75(4): 241–247
- Moce E., Graham J.K., 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim.Reprod.Sci.*, 105:104-118
- Moghaddam G.H., Pourseif M.M., Rafat S.A., 2012. Seasonal variation in semen quantity and quality traits of iranian crossbred rams. *Slovak J. Anim. Sci.*, 45(3):67-75
- Moreda R., 2013. Technique de dénombrement, l'hématimètre de Malassez : numération directe. : Fiche technique. Lycée Docteur Lacroix, Narbonne, 1p
- Morris L., 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, 58:643
- Mortimer S. T., 2000. CASA practical aspects. *J. Androl.*, 21:515-524
- Nielsen M., Galet D., Syolens C., Hardouin J., 1985. Note sur la stérilisation provoquée en milieu tropicale. *Rev. Elev. Med. Pays. Trop.*, 38(2):195-199
- Notter D.R., Lucas J.R., Mcclaugherg, F. S., 1981. Accuracy of estimation of testis weight from in situ testis measures in rams lambs. *Theriogenology*, 15:227-234
- Ogebin-Gist M.C., Danzo B.J., Davies J., 1975. Endocrin control of the developpement and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. Dans Dans E D.W Hamilton and RO. Greep (Eds) *Handbook in physiology, section VII Endocrinology* Wasington, DC: Am.Physiol. Soc., 319-338

- Ogebin-Gist M.C., Fournier-Delpech S., 1982. Sperm-egg interaction Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.*, 3:429-433
- Olar T.T., Bowen R.A., Pickett B.W., 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31:451-461
- Orgebin-Crist M.C., 1967. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature*, 216:816-818
- Ott R.S., Goffaux M., Thibier M., 1987. Examen morphologique des spz. *Elevage Insém.*, 221:15-20
- Pinart E., Puigmulé M., 2013. Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality. In Chapter : Boar Reproduction. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 109-202
- Platz C., Wildt D., Seager S., 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 52:279-282
- Ponthier J., Van Den Berghe F., Parrilla-Hernandez S., Hanzen C., Deleuze S., 2014. Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives. *Ann. Méd. Vét.*, 159:56-71
- Price E.O., 1987. Male sexual behaviour. In : Price EO (ed) *The veterinary Clinics of North America. Farm Anim. Behav.*, 3:405-422
- Quan G.B., Quan W.G., Wang Y.J., Dong Jiang Li., Yuan M., Qiong H.H., 2016. Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Rum. Resear.*, 134:14-21
- Rathje T.A., Johnson R.K., Lunstra D.D., 1995. Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. *J. Anim. Sci.*, 73:2177-2185
- Rege J.E.O., Toe F., Mukasa-M.E., Tembely S., Anindo D., Baker R. L., LahlouKassi A., 2000. Reproductive Characteristics of Ethiopian Highland sheep. II. Genetic Parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. *Small Rum. Res.*, 37:173-187
- Rigau T., Farrem M., Ballester J., Mogas T., Pena A., Rodriguez-Gil J.E., 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56:801-815
- Robaire B., Viger R.S., 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.*, 52(2): 226-236
- Robaire B., Hinton B.T., Orgebin-Crist M.C., 2006. The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Chapitre 22, Third Edition edite par Jimmy D. Neill, Elsevier*, 1071-1148
- Rodríguez-Martínez H., 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? *Reprod. Domes. Anim.*, 38(4):312-318
- Rosa H.J.D., Bryant M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum. Res.*, 48:155-171
- Rota A., Frishling A., Vannozzi I., Camillo F., Romagnoli S., 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 57:383-386

- Rota A., Milani C., Cabianca G., Martini M., 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65:1848-1858
- Saadi M.A., Mefti k.h., Benia A.R., Bellala R., Kaidi R., 2016. Effect of season and age rams breed "Ouled Djellal" on quality of their seed and reproduction in vivo. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 3(5): 42-47
- Sabev M., Nikolov I., Ivanova-kicheva M., Stefanov R., Chemshirova T., Baycheva E., Popova M., 2006. Cryopreservation of ram sperm from autochthonous breeds during a non-mating season. *J. Central Europ. Agric.*, 7(4):677-682
- Safsaf B., Belkadi S., Belkacem L., Mamache B., Tlidjane M., 2015. Variations of motility and survival with storage time at 4°C of epididymal spermatozoa Ouled-Djellal breed rams in Eastern Algeria. *Vet. World*, 2231-0916
- Salhab S.A., Zarkawi M., Wardeh M.F., Al-Masri M.R., Kassem R., 2003. Characterization and evaluation of semen in growing Awassi ram lambs, *Trop. Anim. Health Prod.*, 35:455-463
- Schmehl M.L., Graham E.F., 1989. Ultrastructure of the domestic tomcat (*Felis catus*) and Tiger (*Panthera tigris altaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 31:861-874
- Shakeri M., Roshanferkr H., Mamoei M., Mirzadeh K., 2008. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 3:400-408
- Söderquist L., Hultén F., 2006. Normal values for the scrotal circumference in rams of Gotlandic breed. *Reprod. Dom. Anim.*, 41:61-62
- Soltanpour F., Moghaddam G., 2013. Effects of frozen diluents on storage of ram sperm. *Inter. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 1: 1698-1704
- Stachecki J.J., Ginsburg K.A., Leachre, A.D.R., 1993. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J. Androl.*, 14(1):60-65
- Stefanov R.G., Anev G., Abadjieva D.V., 2015. Effect of different extenders and storage periods on motility and fertility of ram sperm. *Mac Vet. Rev.*, 38(1): 85-89
- Syntin P., Dachew F., Drurat X., Gatti J.L., Okamura N., Dacheux J.L., 1996 : characterization and identification of proteins secreted in the various region of adult boar epididymis. *Biol. Reprod.*, 55(9): 974
- Tabbaa M.J., Kridli R.T., Amashe M.G., Barakeh F.S., 2006. Factors affecting scrotal circumference and semen characteristics of Awassi ram. *Jordan. J. Agricul. Sci.*, 2(3):243-250
- Taherti M., Zidane K., Aggad H., Kaidi R., 2014. Sexual activity of the ram Ouled Djellal bred raised in the region of Chlef. *I.J.S.B.A.R.*, 17(2):283-287
- Teodoro S.M., Pereira A.M.F., Filho J.D.G., Jadir Nogueira da Silva J.N., 2013. Influence of availability of shade on testicular characteristics of Santa Ines rams. *Acta. Sci. Anim. Sci.*, 35(4):441-446
- Vasan S.S., 2011. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian J. Urol.*, 27(1):41-48

- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1):149-179
- Walker S., Robinson O.W., Whisnant C.S., Cassady J.P., 2004. Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars. *J. Anim. Sci.*, 82:2259-2264
- Wolf J., Smital J., 2009. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J. Anim. Sci.*, 87(5):1620-7
- Yarney T. A., Sanford L.M., Palmer.W.M., 1990. Pubertal development of ram lambs : Body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function. *Can. J. Anim. Sci.*, 70:139-147
- Yue D., Yan L., Luo H., Xu X., Jin X., 2010. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 118(2-4):217-22