



834THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMC

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb de Blida -1-

Institut des sciences vétérinaires



# Mémoire de Fin d'Etudes

*En vue d'obtention d'un diplôme de Docteur Vétérinaire*

Thème

**Control de la qualité de la semence  
épididymaire bovine avant et après  
congélation .**

*Réalisé par :*

*BELMILOUD Nacer*

*CHERFI Mustapha*

*Dirigé par: M<sup>r</sup> AIT BELKACEM*

*Promotion: 2013/2014*

# Remerciements

*Nous tenons à remercier, en premier lieu, DIEU; qui nous a guidés dans notre cursus. Ainsi que toute la famille et compris nos parents.*

*Nous remercions Mr AIT BELKACEM pour nous avoir encadrés et dirigés.*

*Nous remercions également tous les enseignants ainsi que tous les étudiants de la promotion 2013/2014 de l'institut vétérinaire pour avoir contribué à notre formation et toutes personnes qui nous ont aidés de près ou de loin.*

*Enfin, nos remerciements vont aux membres du jury qui nous ferons l'honneur de juger ce modeste travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à*

*A ceux qui ont fait de moi hier ce que je suis aujourd'hui et qui sont présents pour me consolider dans les pires et meilleurs moments.*

*A ma très chère mère .*

*A mon père et ma chère sœur grand amour pour leur soutien et encouragement, ainsi que leurs sacrifices qu'ils ont consentis durant tous mes années d'études.*

*A mes chers frères : Mourad, Aziz, Tarik et Soso Amazouz .*

*A ma chère tante et mes cousins : Hayet, Lamia, wiwi et Nounous Amazouz*

*A Toutes les Familles : CHERFI, DJADID, ABD EL HAMID, RABHI, HAMDI .*

*A mes oncles, mes tantes, mes cousins : STIVE, HAKIM, MADJID, Hafidh.*

*Pour votre soutien et vos encouragements.*

*A mes chères neveux : nadir, sarha, soheib, et la petite princesse qu'on a hâte d'accueillir.*

*A mon binôme : NACER ZABIM ainsi que sa Famille.*

*A mon promoteur Mr: AIT BELKACEM, A.*

*A mes Amis : OMAR, FARID, FARES, MOUMOUH, HAMED LE REBEL, LE MONUMENT, MOUHOU ZACHOUR, HAKIM, ABD NOUR, MOURAD, SAID, YACIN, AMAR, OMAR, AMAR AWADHIUS, DDA IDIR, TOUFIK, MUS,*

*A Toute la promotion 2013/2014.*

*Merci pour votre amitié, votre soutien et tous les meilleurs moments passés ensemble*

*A tous ceux que j'ai oubliés, que vous m'en excusiez...*

*Cherfi Mustapha*

## Résumé

Les résultats obtenus ont montré que la qualité de la semence épидидymaire est dans les standards rapportés par la littérature pour la plupart des paramètres spermatiques. Dans cette étude, à l'état frais, le volume est de 1,5ml par récolte en moyenne. La couleur est satisfaisante varie de blanc laiteux à blanc crémeux. La concentration moyenne est de  $2.02 \times 10^9$  elle ne dépasse pas les limites inférieures ; qui est de  $(\geq 0,5.10^9$  spermatozoïdes/ ml) et en fin la motilité individuelle et massale sont respectivement 75% et 3,5. Ces limites s'accordent avec celles fixées par le CNIAG qui est de 60% et note de 3 respectivement. Un seul paramètre est évalué après décongélation c'est la motilité (massale et individuelle qui sont de 2,8 et de 68% respectivement).

**Mots clés :** bovin, semence épидидymaire, congélation .paramètres spermatiques.

## Summary

The results showed that the quality of epididymal reprimand is in the standard reported in the literature for most sperm parameters. In this study and fresh, the volume is 1.5 ml per harvest greater than that reported by A. Darin-bennetti average. G. (1977), which is 0.5 ml. The color ranges from milky white to creamy white satisfactory according Ezekwe (1988). The average concentration of  $2.02 \times 10^9$  does not exceed the lower limits cited by Dumont, 1997; which is ( $\geq 0,5.10^9$  sperm / ml) and individual end massal motility and are 75% and 3.5 respectively. These limits are consistent with those set by the CNIAG which is 60% and grade 3, respectively. One parameter is evaluated after thawing is motility (and individual massal are 2.8 and 68%, respectively) that appears in the literature cited Dumont (1997).

**Key words:** bovine, epididymal semen, frozen, semen parameters.

## ملخص

أظهرت النتائج أن نوعية السائل المنوي هي في نفس المستوى مقارنة مع النتائج التي ذكرت في البحث النظري بالنسبة لمعظم مؤشرات السائل المنوي. في هذه الدراسة و قبل التجميد, الحجم هو بمعدل 1.5 مل لكل محصول أكبر من تلك التي ذكرت من قبل G.(1977). الذي هو 0.5 مل. اللون يتراوح من لون أبيض حليبي إلى أبيض دسم, يعتبر لون مقبول حسب Ezekwe,(1988). التركيز هو بمعدل  $2.02 \times 10^9$  لا تتجاوز الحدود الأدنى التي ذكرها Dumont,(1997) وهي ( $\leq 0,5.10^9$  الحيوانات المنوية / مل) و أخيرا الحركية الفردية و الجماعية هي حسب الترتيب 75% و 3.5 هذه الحدود تتفق مع التي حددتها المركز الوطني للتلقيح الاصطناعي و التطوير الوراثي. و التي هي 60% و 3 علي التوالي. مؤشر واحد مقيم بعد التجميد و هو الحركية (الجماعية هي 2.8 و الفردية هي 68%) مطابقة مع التي ذكرها Dumont, (1997) في البحث النظري .

الكلمات الرئيسية: البقر, السائل المنوي, التجميد مؤشرات, السائل المنوي.

# SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction** 1

## Partie bibliographique

### Chapitre I. structure de l'épididyme

I.1.2. Anatomie de l'épididyme 2

I.2. Histologie de l'épididyme 3

I.2.1. L'épithélium 3

I.2.1.1. Les cellules principales 3

I.2.1.2. Les cellules étroites 3

I.2.1.3. Les cellules claires 3

I.2.1.4. Les cellules basales 4

I.2.1.5. Les cellules halo 4

I.3. Fonction de l'épididyme 5

I.3.1. Réabsorption de l'eau 5

I.3.1.1. La famille des aquaporines 6

I.3.2. Maturation épididymaire 6

I.3.3. Intérêt du sperme épididymaire 8

### Chapitre II. Méthode d'évaluation de la qualité du sperme

II.1. Techniques de récoltes du sperme épididymaire 11

II.1.1. Méthode de float-up 11

II.1.2. Méthode de rétrograde flushing 11

II.2. Évaluation macroscopique 11

II.2.1. Volume 11

II.2.5. Etude physico-chimique et biochimique du sperme	12
II.3. Evaluation microscopique	13
II.3.1. Motilité massale	13
II.3.2. Motilité individuelle	13
II.3.2.1. Evaluation avec méthode classique	14
II.3.2.2. Evaluation avec analyseur ou automatisé	15
II.4. Numération ou La concentration	16
II.5. La vitalité	18
II.6. La morphologie des spermatozoïdes bovins	18
II.6.1. Spermocytogramme	19
II.6.1.1. Examen au microscope	19
II.6.1.2. Evaluation automatisée	19
<b>III. Préparation et conservation de la semence en vue de l'insémination artificielle</b>	<b>21</b>
III.1. Techniques de préparation et conservation de la semence	21
III.1.1. dilution	21
III.1.1.1. Le glycérol	22
III.1.1.2. L'éthylène glycol	22
III.1.1.3. Le diméthyl-sulfoxyde (DMSO)	22
III.1.1.4. Le jaune d'œuf	22
III.1.1.5. Le lait	23
III.1.1.6. Le sodium dodécyl sulfate (SDS)	23
III.1.1.7. Substances tampon	23
III.1.1.8. Substances nutritives	23
III.1.1.9. Antibiotiques	24
III.1.2. Refroidissement de la semence	24
III.1.3. Conditionnement de la semence	25

III.1.3. La congélation	26
III.1.4. La décongélation	28
III.1.5. Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes	29

### **Partie Expérimentale**

I. Objectif	30
II. Période et lieu de stage	30
III. La récolte des semences	30
IV. Matériels et méthodes	30
IV.1. Matériels	30
IV.2. Méthodes	31
V. Résultats et discussion	35
VI. Conclusion Générale et Recommandations	38
Références bibliographique	



## Liste des figures

---

**Figure N°1** : Représentation schématique de différents types cellulaires épидидymaires des mammifères (Modifié d'après Hermo et Robaire, 2002).

**Figure N°2** : Schéma de l'épididyme. *Initial segments* = segments Initiaux, *caput* = tête, *corpus* = corps, *cauda*=queue. (Cooper, T. G., and Brooks, D. E. (1981)).

**Figure N°3** : Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde mûr  
Source: (<http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/images/Pagee12a.jpeg>)

**Figure N°4** : Microscope à platine chauffante (Kumar, et Naqvi.2010).

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

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

**Figure N°7** : Schéma d'une paillette « CASSOU »

**Figure N°8** : dissection de l'épididyme

**Figure N°9** : injection du TRIS A

**Figure N°10** : récolte du sperme épидидymaire

**Figure N°11**: sperme épидидymaire dans le tube à essaye.

## Liste des tableaux

---

**Tableau N°1** : classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : recommandation de la société de Theriogenology (Elmore ,1985).

**Tableau N°2** : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale

**Tableau N°3**: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

**Tableau N°4** : Composition des dilueurs les plus utilisés.

**Tableau N°5** : Protocole de congélation de la semence du taureau Chenoweth (PJ) et al,(1978).

**Tableau N°6** : récapitulatif des travaux effectués par certains auteurs sur le conditionnement de la semence epididymaire bovine

## Liste des abréviations

---

**ABP** : Androgen Binding Protein

**AI** : Artificial Insemination

**°C** : Degré Celsius

**Cc** : centimètre cube

**CNIAAG** : Centre National d'Insemination artificiel et d'Amélioration Génétique

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone

**IA** : Insémination Artificielle

**I** : Inhibine

**Km** : Kilomètre

**LH** : Luteinizing Hormone

**MP** : Membrane Plasmique

**MI** : millilitre

**PMSG** : Pregnant Mare Serum Gonadotropin

**PGF2 $\alpha$**  : Prostaglandines F2 $\alpha$

**Spz** : spermatozoïdes

**T** : Testostérone

## Liste des abréviations

---

**CASA** : Computer Aided Sperm Analysis

**IL** : interleukine

**IGF1** : Insulin-like Growth Factor),

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**MIP** : Major Intrinsic Proteins

**TRIS** : trishydroxyméthylaminométhane

**CHL** : cholestérol

**CLD** : cyclodextrine

**ATP** : adenine tri phosphate

**IVT** : Illinois, Variable, Temperature

**SDS** : sodium dodécyl sulfate

**DMSO** : diméthyl-sulfoxyde

# Introduction

L'insémination artificielle vue ses grands avantages qu'elle possède par rapport à la saillie naturelle dont on peut citer l'amélioration génétique et l'éloignement des maladies vénériennes, occupe une grande partie dans la reproduction des troupeaux, et notamment l'espèce bovine.

Cependant pour parvenir à des meilleurs résultats de cette biotechnologie la qualité de la semence joue un rôle prépondérant. De ce fait, le contrôle des différents paramètres de la semence est toujours en évolution et sollicite vraiment des moyens d'évaluation scrupuleux pour assurer cet objectif. Néanmoins en évaluant les taux importants de vaches pleines inséminées artificiellement on pourra bien corroborer l'idée que les techniques citées auparavant sont en corrélation avec les résultats souhaités.

Du fait que la semence récoltée depuis l'épididyme possède une fécondité non négligeable, selon Orgebin-Gist et al (1975) les spermatozoïdes deviennent mobiles et féconds dans l'épididyme à travers un laps de temps, et elle pourra bien permettre de diminuer les risques de perte du génotype des géniteurs incapables de se reproduire ou perdus accidentellement, cette semence a aussi le privilège de ne pas être en contact avec les différentes sécrétions des glandes males et évite une grande part des maladies extra-génitales.

de ce fait il est préférable de recourir aux paillettes contenant des spermatozoïdes epididymaire dans le choix de la relève de son cheptel, pour faire face aux obstacles et pertes rencontrés.

Mais ce qu'elle répond bien aux normes requis par les centres de l'insémination, et est ce vraiment une semence qui procure une bonne rentabilité pour les éleveurs de bovin et les professionnels de la reproduction animale, en outre ce qu'est apporté par la bibliographie signale l'existence d'un accroissement des études qui se réalisent sur cette semence, pour mesurer le potentiel fécondant des spermatozoïdes issus celle-là.

C'est pourquoi on doit procéder aux différents examens macroscopique (volume, couleur, consistance...) et microscopiques (motilité, viabilité, concentration) de routine et d'évaluer quel est le stade de longivité qui pourra être atteint par le spermatozoïde après les traitements de cryoconservation.

Pour mieux clarifier les procédures effectuées pour conserver la semence epididymaire bovine, nous avons essayé d'apporter le maximum des études que procure la bibliographie dans ce domaine, avant de procéder à l'étude expérimentale.

# Partie Bibliographique

# Chapitre I

## Partie bibliographique

---

### I. structure de l'épididyme

L'épididyme forme un organe allongé placé à la face médiale du testicule, et recouvrant et recouvrant les extrémités de celui-ci (correspond au transit, stockage et à la maturation des spermatozoïdes).

Il pèse en moyenne 35 à 40 grammes (Chatelin 1986). La durée du passage des spermatozoïdes dans l'épididyme varie selon les espèces (Depleche 1991). Anatomiquement et histologiquement décrit en trois secteurs :

- Tête : large et aplatie, surmonte l'extrémité dorsale et déborde même sur le bord crânial du testicule. En outre elle se trouve fixée par une mince expansion fibreuse : le ligament de la tête (Chatelin 1989).
- le corps : relativement étroit, se moule sur la face médiale. Il est attaché par un court méso (le mesoepididyme) à la face latérale du mésochorium (Chatelin 1986).
- la queue : renflé proéminent aisément palpable en conséquence de l'élargissement du canal et de sa fluctuosité (Parez, Duplin 1986).

Sa taille varie avec l'âge (Chatelin 1986), sa structure est formée par un système caniculaire maintenu par une mince albuginée.

Ce système caniculaire comprend les amas de fluctuosité des canalicules efférents qui confluent en un conduit epididymaire unique de 45 mètres environ (Chatelin 1986).

#### ➤ Irrigation

a) Les artères : proviennent des rameaux issus de l'artère testiculaire et des branches de l'artère du conduit déférent.

b) Les veines : rejoignent le plexus pampiniforme près de l'anneau vaginal.

➤ Innervation : même origine que la glande (Chatelin 1986).

### I.1.2. Anatomie de l'épididyme

L'épididyme est un organe, formé d'un long canal tortueux hautement spécialisé, reposant sur la partie dorso latérale du testicule que l'on retrouve chez tous les mammifères supérieurs. Il est directement relié au testicule par les canaux efférents qui entrent par le pôle supérieur, ou tête de l'épididyme, et il se continue au niveau de sa queue, dans le canal déférent (Charrois, 1973). Les canaux efférents sont les prolongations du rete testis, ce petit bout de canal effectuant la jonction entre les différents tubules séminifères du testicule. L'épididyme se divise généralement en 3 régions: la tête (caput), le corps (corpus)



## Partie bibliographique

---

et la queue (cauda). Celles-ci sont caractérisées par une variation dans la dimension du tubule et de l'épithélium, incluant une diminution de l'épaisseur cellulaire et, une augmentation du diamètre tubulaire et de la couche musculaire de la tête vers la queue. L'épithélium de toutes les régions contient 4 types cellulaires: les cellules principales, les cellules claires, les cellules basales et, les cellules halo ou lymphocytes intra épithéliaux (Goyal, 1985; Robaire et Hermo, 1987).

### **I.2. Histologie de l'épididyme**

#### **I.2.1. L'épithélium**

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

##### **I.2.1.1. Les cellules principales**

Sont des hautes cellules de forme cylindrique partant de la membrane basale jusqu'à la lumière du canal. Ces cellules deviennent progressivement plus petites vers la région distale de l'épididyme (Hermo L, Robaire, B.2002). très actives en terme de Transport et de sécrétion. Les cellules principales sécrètent à la fois sels ioniques, de petites molécules organiques, des protéines et des glycoprotéines dans la lumière de l'épididyme. Ces molécules sécrétées sont essentielles à la maturation des spermatozoïdes (Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC, 1995).

##### **I.2.1.2. Les cellules étroites**

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

##### **I.2.1.3. Les cellules claires**

Elles sont intercalées entre les cellules principales. Les cellules claires sont des cellules larges. Elles contiennent des vésicules de tailles diverses dans leur région apicale (dont des puits recouverts), des lysosomes dans leur région moyenne, et des gouttelettes

## Partie bibliographique

---

lipidiques dans leur partie basale (Robaire and Viger, 1995). Cette distribution d'organites est cohérente avec une fonction d'élimination active de matériel depuis la lumière épидидymaire. En effet, elles présentent une forte capacité d'endocytose (Robaire and Viger, 1995). De plus à l'instar des cellules apicales, un rôle dans l'acidification du fluide épидидymaire a été proposé pour les cellules claires (Beaulieu et al. 2004; Hermoal, 2000).

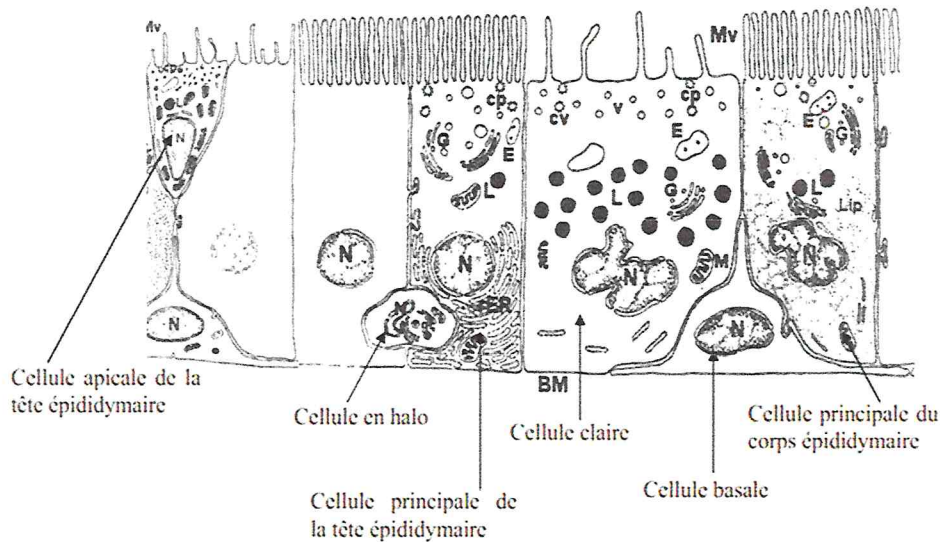
### **I.2.1.4. Les cellules basales**

Sont des petites cellules à la fois rondes et allongées. Elles ont, par conséquent, une apparence dite hémisphérique. De plus, ces cellules comportent de longues et minces projections qui enveloppent une grande proportion de la base de l'épithélium. Ces cellules sont distribuées tout le long de l'épididyme et sont situées du côté basal de l'épithélium (Hermo L, Robaire, B,2002). Entre autres, les cellules basales sont importantes dans la formation du fluide épидидymaire en régulant le transport des électrolytes et de l'eau par les cellules principales (Leung GP, Cheung KR, Leung CT, Tsang MW, Wong PY,2004).

### **I.2.1.5. Les cellules halo**

Les cellules en halo sont de petites cellules présentes sur toute la longueur de l'épididyme généralement situées à la base de l'épithélium (Hermo and Robaire, 2002).sont présentes tout au long de l'épididyme. Ces cellules font partie du système immunitaire, il peut s'agir de lymphocytes T, B, de monocytes ou de macrophage (LINDE-FORSBERG C,1995).

## Partie bibliographique



**Figure N°1** : Représentation schématique de différents types cellulaires épидидymaires des mammifères cp : puits recouverts, E : endosomes, L : lysosomes, G : appareil de Golgi, rER : reticulum endoplasmique rugueux, lip : gouttelettes lipidiques, Mv : microvillosités, BM : membrane basale, N : noyau, v : petites vésicules apicales (Modifié d'après Hermo et Robaire, 2002).

### I.3. Fonction de l'épididyme

Dans les canaux efférents, les mouvements ciliaires des cellules réparties le long de la lumière assurent le transport du sperme Dans l'épididyme.(Kreda, S. M. Et al.2001) Le stockage des spermatozoïdes s'effectue dans la partie distale de l'épididyme, Il peut durer jusqu'à trois semaines, le stockage des spermatozoïdes se fait essentiellement (70 %) dans la queue de l'épididyme. Seulement 2 % sont emmagasinés dans le canal déférent. Les spermatozoïdes non éjaculés sont résorbés ou éliminés dans les urines.

Dans la plupart des espèces, les spermatozoïdes sont potentiellement mobiles mais en réalité immobiles dans la queue. La composition ionique, le pH, la présence de macromolécules comme l'immobiline permettent l'établissement d'un état de dormance du sperme. (Da Silva, N.,Silberstein, C., al, . (2006)).

#### I.3.1. Réabsorption de l'eau

L'augmentation de la concentration du sperme au fur et à mesure de son transit le long de l'épididyme vers les régions distales, de même que l'établissement d'un fluide hypertonique, indique qu'une considérable de liquide est réabsorbée dans l'épididyme CLULOW, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., and Man, S. Y. (1998).

## Partie bibliographique

---

La nature absorbante de l'épithélium épидидymaire est mise en évidence par l'augmentation de la concentration cellulaire, ou spermique, lors de la progression dans Le tractus. La composition changeante du fluide intraluminal de la tête à la queue de l'épididyme reflète non seulement l'activité de résorption de l'épithélium épидидymaire qui diffère d'un segment à l'autre, mais l'élaboration de substances spécifiques y étant produites ou sécrétées (Arnann, 1987; Goyal, 1985). L'épithélium épидидymaire semble perméable aux petites molécules, et transporte ces composés contre un gradient de concentration dans le lumen.

Des études biochimiques ont établies que la composition changeante du fluide épидидymaire comprend stéroïdes, ions, glycérylphosphocholine, carnitine, acide sialique, myo-inositol et protéines (Amann, 1987; Brooks, 1979; Cooper, 1986, Jones et Glover, 1975; Yanagimadu, 1994). Le transport régional de molécules à l'intérieure du lumen au niveau de la tête de l'épididyme est plus grand qu'au niveau du corps et de la queue pour l'inositol, et la carnitine (Yeung et al., 1980).

### **I.3.1.1. La famille des aquaporines**

L'identification de la famille des protéines Major Intrinsic Proteins a changé la compréhension du phénomène de transport de l'eau à travers les membranes plasmiques.

Les MIP sont des protéines transmembranaires, qui forment un canal aqueux dans la double couche lipidique, ce qui aboutit à une régulation de la perméabilité de la membrane à l'eau.

Ainsi de nombreux travaux ont été débutés pour déterminer le rôle des aquaporines dans l'appareil reproducteur masculin.

Ces aquaporines pourraient être des cibles potentielles pour contrôler la fertilité masculine .

La lumière de l'épididyme est maintenue à un pH acide en comparaison au pH plasmique (6,6 dans la tête, 6,8 à l'extrémité distale). Ces conditions permettent la maturation des spermatozoïdes, et leur stockage dans un état quiescent (Zardoya R 2005).

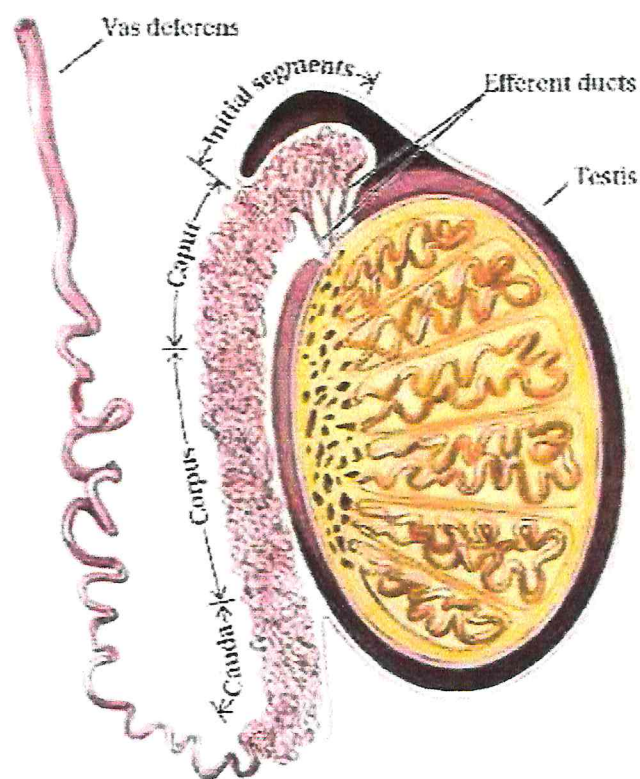
### **I.3.2. Maturation épидидymaire**

La maturation c'est l'acquisition par les spermatozoïdes la capacité de se mouvoir ainsi que de pouvoir se lier et féconder l'ovule. Il est de plus en plus reconnu que la maturation épидидymaire se fait de façon progressive le long de l'épididyme, et que la composition changeante du fluide luminal y est pour beaucoup dans le processus de maturation (Slott V, Suarez J, Poss P, Linder R, Strader L, Perreault S)

## Partie bibliographiques

Les spermatozoïdes immatures et immobiles quittant le testicule séjournent un certain temps dans l'épididyme. Au cours de leur transport (laps de temps qui varie selon les espèces), les spermatozoïdes deviennent mobiles et féconds (Bedford, 1966; Bedford, 1975; Cooper, 1991; Orgebin-Gist et al., 1975).

Les modifications fonctionnelles des spermatozoïdes dans l'épididyme incluent une altération du métabolisme, des changements dans le profil et l'efficacité de l'activité flagellaire (Acott et al., 1983; Cooper, 1986), et l'acquisition de la capacité de liaison à la zone pellucide (Orgebin-Crist et Fournier-Delpech, 1982; Saling, 1982). Ces étapes de la maturation épидидymaire sont accomplies grâce aux différentes fonctions de l'épithélium épидидymaire. En effet, ses fonctions majeures sont de maintenir un microenvironnement approprié pour la maturation dans la tête et le corps, et le maintien de spermatozoïdes fertiles dans la queue de l'épididyme (Amann, 1987; Jones et Glover, 1975).



**Figure N°2:** Schéma de l'épididyme. *Initial segments* = segments Initiaux, *caput* = tête, *corpus* = corps, *cauda*=queue. (Cooper, T. G., and Brooks, D. E. (1981)).

## Partie bibliographique

---

### I.3.3. Intérêt du sperme épидидymaire

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

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

L'acquisition et les changements de la motilité des spermatozoïdes durant le transit épидидymaire sont amplement décrits depuis plusieurs années (Acott et Carr, 1984; Acott et Hoskins, 1983; Bardin et Gagnon, 1982; Brandt et al., 1978; Carr et Acott, 1984; Dacheux et Paquignon, 1980; Eddy, 1988; Gaddum, 1968; Morton et al., 1974; Soler et al., 1994). L'épididyme a une action à la fois de maturation (Chevrier et Dacheux, 1992) et

## Partie bibliographique

---

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

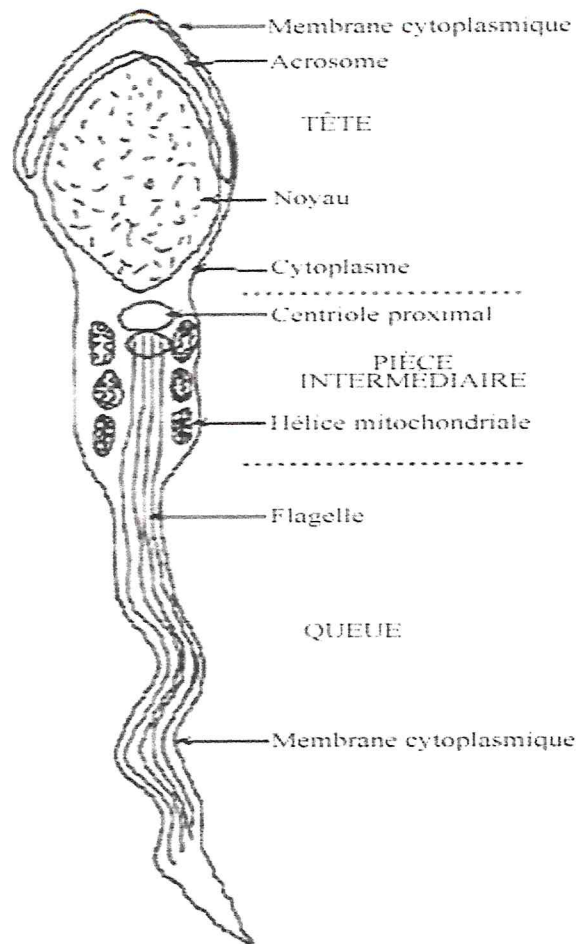
la maturation épидидymaire résulte des interactions entre l'épithélium épидидymaire, le fluide intra-liminal et la membrane plasmique du spermatozoïde qui provoquent 1) la perte ou transformation des molécules de la surface spermique par l'action de protéases, glucosidases, glucoaminidases, glycosyltransférase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

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

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

## Partie bibliographique

---



**Figure N°3 :** Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde mûr

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



# Chapitre II

## Partie bibliographique

---

### II. Méthodes d'évaluation de la qualité du sperme

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché.

#### II.1. Techniques de récoltes du sperme épидидymaire

##### II.1.1. Méthode de float-up

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

##### II.1.2. Méthode de rétrograde flushing

La méthode de rétrograde flushing a été décrite par (Martinez-Pastor et al. 2006). La queue de l'épididyme et le canal déférent sont isolées du reste de l'épididyme en effectuant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corpus et la queue proximale. Après cela, la lumière du canal déférent a été pourvue d'une canule avec une aiguille de 22G émoussée. Les spermatozoïdes ont ensuite été rincés dans une direction rétrograde des canaux déférents à travers la queue de l'épididyme avec une seringue chargée avec environ 4 ml de TRIS A réchauffé (37 ° C).

Après la récolte, la semence est rapidement contrôlée, les tests d'évaluation sont regroupés en trois types d'examen : macroscopiques (volume, couleur, consistance, et poids spécifique), microscopiques (motilité, concentration, forme anormale), et biochimiques (pH et tests métaboliques).

#### II.2. Évaluation macroscopique

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

##### II.2.1. Volume

Dans le cas du vagin artificiel en général les secondes éjaculations d'une même session de collecte sont plus abondantes que les premières (Eduardo Villena et al ,2003).

## Partie bibliographique

---

Le volume varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987). Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte.

### II.2.2. Couleur

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

Le plus souvent blanchâtre, elle peut être modifiée pour des raisons physiologiques (concentration) .Mais le plus souvent pathologiques. Certains *taureaux* ont un sperme de couleur jaunâtre imputable à la présence d'un lipochrome provenant des vésicules séminales et dont la présence est sans rapport avec l'alimentation. Cette couleur jaune peut également résulter de la présence de pus ou d'urine ce qui compromet le pouvoir fécondant du sperme.(HENZEN 2009).

### II.2.3. Viscosité

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

### II.2.4. Poids spécifique

Dans la pratique le poids spécifique moyen de la semence est directement proportionnel à la concentration spermatique. Aussi les variations de ce paramètre sont en relation avec le nombre des spermatozoïdes mûrs (plus lourds) et immatures (plus légers)(Eduardo Villena et al ,2003).

### II.2.5. Etude physico-chimique et biochimique du sperme

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

## Partie bibliographique

**Tableau N°1** : classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : recommandation de la société de Theriogenology (Elmore ,1985).

<b>Couleur</b>	<b>Turbidité</b>	<b>Consistance et viscosité</b>	<b>Concentration prévue en spermatozoïdes par ml</b>	<b>Qualité attribué au sperme</b>
Blanc	Opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
Blanc	Opaque	Faiblement visqueuse	400 à 750millions	Bonne
blanc sale	Légèrement translucide	Laitieuse	250 à 400 millions	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	Translucide	Aqueuse	Inférieur à 200 millions	Mauvaise

### II.3. Evaluation microscopique

#### II.3.1. Motilité massale

Une goutte de semence pure est posée sur une lame chauffée à 37°C, on observe le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes qui forment des tourbillons plus ou moins rapides (Eilts, 2004).

La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale (HENZEN 2009).

## Partie bibliographique

**Tableau N°2 : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale**

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

Source : Présentation de la coopérative de l'AIGLE.

On conserve les éjaculats ayant une motilité supérieure ou égale à 3,5 et 4, selon les centres d'insémination. Il faut noter que l'intensité des vagues est beaucoup plus importante dans les mêmes conditions chez le taureau que chez le bélier (Lacroix, 1976).

### II.3.2. Motilité individuelle

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

#### II.3.2.1. Evaluation avec méthode classique

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 spermatozoïdes, l'intensité, la rapidité et la trajectoire de leurs mouvements. On peut ainsi apprécier d'une manière subjective, le pourcentage de spermatozoïdes 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 spermatozoïdes (Lacroix, 1976 ; Douet, 2000). Certains spermatozoïdes

## Partie bibliographique

présentent des mouvements rotatoires circulaires ou des mouvements d'amplitude très réduite, ils ne sont donc pas comptabilisés dans les spermatozoïdes mobiles. (Dumont, 1997).

**Tableau N°3:** Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

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

### II.3.2.2. Evaluation avec analyseur ou automatisé

Il est aussi possible de réaliser une estimation objective de la motilité par ordinateur (C.A.S.A. : Computer Aided Sperm Analysis). Cette analyse informatisée de la cinétique des spermatozoïdes permet une mesure plus fine des mouvements puisqu'il est possible, avec cette méthode, d'identifier chaque spermatozoïde et de suivre son déplacement (Kumar, et Naqvi.,2010).

Le SQA (Sperm Quality Analyzer) a également été validé pour son utilisation dans l'espèce canine par IGUER-OUADA et VERSTEGEN (2001b) et par RIJSSEJAERE et al. (2002).

Une cellule photométrique détecte les variations de densité optique dans un tube capillaire contenant un échantillon de la phase spermatique: Ces variations sont converties en un index de mobilité du sperme ou SMI (Sperm Motility Index). Selon la valeur de cet index, dépendant de la concentration en spermatozoïdes mobiles, le sperme peut être classé en trois catégories :

- sperme de qualité médiocre :  $SMI < 100$ ,
- sperme de qualité moyenne :  $100 < SMI < 250$ , et
- sperme de bonne qualité :  $SMI > 250$ .

Les principaux inconvénients de ces systèmes automatisés sont leur coût, la nécessité de leur validation et de leur standardisation. Mais, une fois standardisés, ils montrent une très grande répétabilité, avec des coefficients de variation inférieurs à 10 %. Ils s'avèrent donc très utiles pour évaluer de façon objective et précise la mobilité des spermatozoïdes.



**Figure N°4 :** Microscope à platine chauffante (Kumar, et Naqvi.2010).

### **II.4. Numération ou La concentration**

Elle est déterminée par comptage des spermatozoïdes au moyen de la cellule de Thoma ou encore par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, par comptage électronique ou encore par néphélométrie. La concentration moyenne de l'éjaculat d'un taureau est de 1 milliard de spermatozoïdes par millilitre. (Parez et Duplan, 1987).

La numération directe se fait au moyen d'un hématimètre. Ce type de numération suppose la dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de Formaldéhyde à 1 %

## Partie bibliographique

---

Le taux de dilution dépend de la concentration apparente du sperme. On conseille une dilution de 1 % pour les spermatozoïdes de taureau, de bélier et de bouc (HANZEN 2008,2009).

Il existe différents types d'hématimètre qui se caractérisent notamment par leur surface (S) et la profondeur de leur chambre de numération (P) :

- Malassez (S: 5 mm<sup>2</sup>, P : 0.2 mm),
- Thoma (S : 1 mm<sup>2</sup>, P: 0.1 mm),
- Neubauer (S : 9 mm<sup>2</sup>, P: 0.1mm) et
- Türk (S:9 mm<sup>2</sup>, P: 0.1 mm).

L'hématimètre est constitué d'une lame de verre, creusée d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage. La cellule de Thoma comporte un quadrillage de 16 grands carrés comprenant chacun 16 petits carrés.

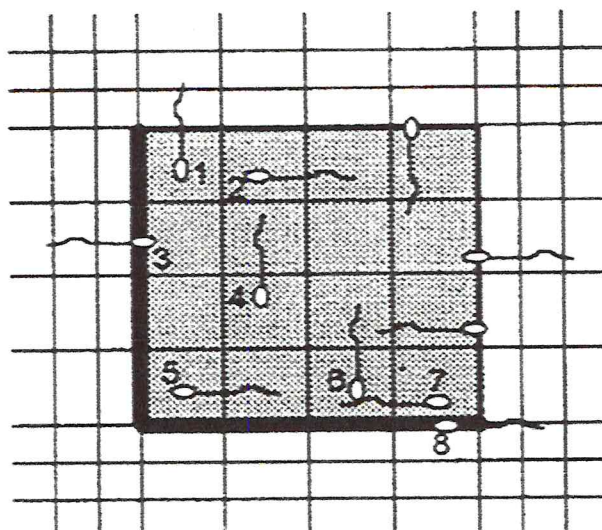
La surface des grands carrés est égale à 1 mm<sup>2</sup>. La chambre de numération a une hauteur de 0.1mm. Après dépôt d'une goutte de sperme et son recouvrement par une lamelle, le nombre de spermatozoïdes est déterminé au grossissement 10 x 40 sur une surface correspondant à 4 grands carrés. Le calcul de la concentration se fait de la manière suivante :

$$\text{Concentration} = N \times 4 \times 10 \times D$$

N : est le nombre de spermatozoïdes comptés dans 4 grands carrés (pour le verrot les spermatozoïdes sont le plus souvent dénombrés sur 10 grands carrés et la règle de trois est appliquée pour compter les spermatozoïdes sur l'ensemble des carrés).

4 : puisque l'hématimètre comporte 16 grands carrés d'une surface totale égale à 1mm<sup>2</sup> puisque la hauteur de la chambre de numération est égale à 0.1 mm .D : c'est le degré de dilution.(HANZEN 2008,2009)





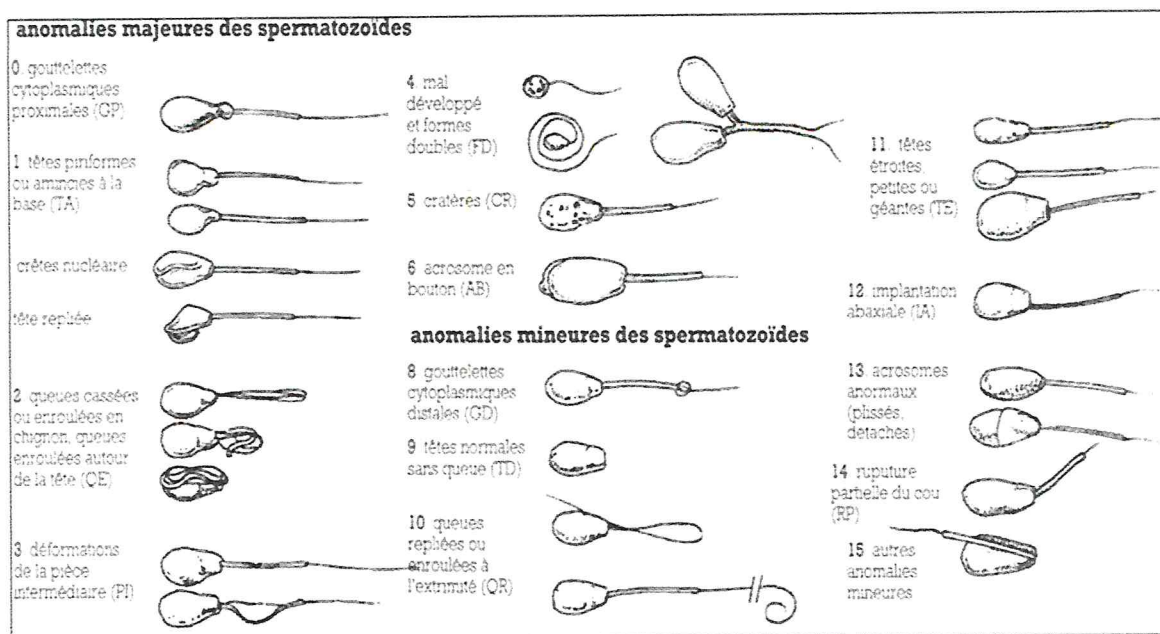
**Figure N°5:** Comptage des spermatozoïdes à la cellule de Thoma prise en compte des éléments « à cheval » sur les graduations.

### II.5. La vitalité

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

### II.6. La morphologie des spermatozoïdes bovins

Le spermatozoïde normal mesure environ 70  $\mu\text{m}$  chez le taureau. La tête du spermatozoïde est de forme ovoïde et aplatie, elle mesure 8 à 9  $\mu\text{m}$  de longueur, 4 à 4,5  $\mu\text{m}$  de largeur et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. L'acrosome couvre environ 60% de la tête et forme sur le bord antérieur une crête apicale, sorte de bourrelet. La pièce intermédiaire fixée à la tête, forme un cylindre d'environ 10 à 12  $\mu\text{m}$  de long et d'un diamètre de 1  $\mu\text{m}$ . Le flagelle mesure de 52 à 55  $\mu\text{m}$  de longueur pour un diamètre de 0,5  $\mu\text{m}$  et se termine par une section filamenteuse de 0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre (Bahr et Zeitler, 1964). Une semence sera considérée de bonne qualité si elle contient plus de 70 % de spermatozoïdes normaux, avec moins de 10 % d'anomalies primaires et moins de 20 % d'anomalies secondaires (Feldman et Nelson, 2004).



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

### II.6.1. Spermocytogramme

Faire un spermocytogramme consiste à analyser la morphologie des spermatozoïdes et à déterminer le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux.

#### II.6.1.1. Examen au microscope

On a montré que, selon la technique de coloration employée, il existe des variations : chaque technique est susceptible d'augmenter de façon artefact la proportion de certaines anomalies tout en diminuant l'importance d'autres, la proportion des spermatozoïdes normaux restant plus ou moins la même. Ces auteurs ont également démontré que d'importantes variations existent entre les opérateurs pour la répartition des anomalies, ce qui confirme la subjectivité et la variabilité inhérentes à cette évaluation au microscope. RootKustritz et al. (1998)

#### II.6.1.2. Evaluation automatisée

Comme pour l'évaluation de la mobilité, les chercheurs ont essayé de s'affranchir de la subjectivité et de la variabilité liée à l'évaluation au microscope de la morphologie des spermatozoïdes. On a ainsi montré qu'un système automatisé, le Leica, peut être utile pour évaluer la morphologie des spermatozoïdes. Il permet de calculer la longueur, la largeur, la surface et la rondeur de la tête des spermatozoïdes. Dahlbom et al. (1997)

## Partie bibliographique

---

Le système Hamilton-Thorne, précédemment décrit, a également été validé par Rijssejaere et al pour l'analyse morphométrique de la semence. Il permet d'obtenir des paramètres morphologiques tels que la longueur, la largeur, la surface et le périmètre de la tête des spermatozoïdes, la longueur du flagelle et le pourcentage de spermatozoïdes normaux. L'intérêt de ces systèmes est de permettre une évaluation objective et répétable de la morphologie des spermatozoïdes, mais aussi de mettre en évidence des anomalies non décelables par un opérateur. Cependant, ils ne permettent pour l'instant une évaluation précise que de la tête des spermatozoïdes et des référentiels de normes doivent être créés avant de pouvoir les utiliser en routine .Rijssejaere et al. (2004)

# Chapitre III

## Partie bibliographique

---

### III. Préparation et conservation de la semence en vue de l'insémination artificielle

L'insémination artificielle est une technique de reproduction qui consiste à prélever la semence d'un mâle sain pour la déposer à l'aide d'instruments appropriés dans les voies génitales d'une femelle au moment le plus opportun. L'insémination artificielle est une technique d'application ancienne. Elle a été mise au point et utilisée dans de nombreuses espèces (mammifères, oiseaux, poissons) au cours des dernières décennies (Seegers, 1997).

L'IA a connu un développement rapide et universel depuis le début des années 50 surtout après le succès en 1952 de Polges et Rowson qui obtiennent la congélation profonde de semence de taureau (Eduardo Villena et al., 2003).

Cette méthode de reproduction qui supprime le rapprochement sexuel non seulement permet d'éviter la transmission des maladies sexuellement transmissibles mais aussi de multiplier considérablement la capacité de reproduction des géniteurs ayant reçu préalablement un agrément zootechnique et sanitaire (Bizimungu, 1991).

#### III.1. Techniques de préparation et conservation de la semence

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

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

##### III.1.1. dilution

La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles. (Hanzen, 1999). 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 spermatozoïdes,
- avoir un pH proche de la neutralité et posséder un pouvoir tampon, pour maintenir un pH optimal pendant tout le temps de la conservation,

## Partie bibliographique

---

- avoir un pouvoir anti-oxydant, pour contrecarrer les actions des radicaux libres,
- avoir une activité antimicrobienne,
- posséder une action stabilisatrice et protectrice des membranes.

### III.1.1.1. Le glycérol

C'est le plus utilisé des cryoprotecteurs de part le monde.

Il possède une action à la fois intra- et extracellulaire. Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes 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 spermatozoïdes.

Cependant, le glycérol possède également des effets néfastes. HAY et al. (1997) (2) ont montré que le glycérol diminue la capacité de fixation aux ovocytes des spermatozoïdes. Il semblerait que le glycérol provoque une altération de l'organisation et de la viscosité du cytoplasme et une altération de la perméabilité et de la stabilité membranaire.

### III.1.1.2. L'éthylène glycol

Est une substance proche du glycérol, mais dont le poids moléculaire est plus faible ce qui lui confère une plus grande perméabilité cellulaire. MARTINS-BESSA et al. (2006) et ROTA et al. (2006) ont étudié l'utilisation de l'éthylène glycol comme cryoprotecteur. Ces deux études n'ont pas mis en évidence d'intérêt à utiliser de l'éthylène glycol en plus ou en remplacement du glycérol.

### III.1.1.3. Le diméthyl-sulfoxyde (DMSO)

est un cryoprotecteur intra-cellulaire qui s'est révélé moins efficace que le glycérol et qui n'est donc pas utilisé (OLAR et al., 1989).

### III.1.1.4. Le jaune d'œuf

Un des composants les plus employés dans les dilueurs. Grâce aux phospholipides qu'il contient, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes 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.

## Partie bibliographique

---

### III.1.1.5. Le lait

Contient des protéines qui protègent les membranes des spermatozoïdes contre le choc thermique. On a comparé la mobilité, la vitalité et la morphologie de l'acrosome des spermatozoïdes 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. ROTA et al. (2001)

### III.1.1.6. Le sodium dodécyl sulfate (SDS)

Il s'agit d'un détergent anionique dont la propriété est de solubiliser les protéines. C'est le principe actif présent dans l'Equex STM paste®, l'Equexpasta® et l'Orvus ES paste® qui ont été récemment introduits dans la composition des dilueurs de congélation. L'ajout de 0,5 % d'Equex STM Paste® à un dilueur classique permet d'obtenir de meilleurs résultats en termes de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomiale et de longévité des spermatozoïdes après décongélation. Elles sont également montré que l'Equex STM paste® réduit les mouvements d'hyper-activation des spermatozoïdes, semblables à ceux présents lors de la capacitation, après décongélation Pena et Linde-Forsberg (2000). L'utilisation d'1 % d'Equex STM Paste® améliore les capacités de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes après décongélation STROM-HOLST et al. (2000). Par contre on n'a pas mis en évidence de différence significative en terme de taux de gestation ou de taille de la portée entre l'ajout ou non d'Equex STM paste® au dilueur congélation. ROTA et al. (1999a).

Les autres études qui ont porté sur l'utilisation d'EquexPasta® ou d'Orvus ES paste® ne se sont pas montrées aussi encourageantes (PENA et al., 2003 et NIZANSKI et al., 2001).

### III.1.1.7. Substances tampon

Le métabolisme des spermatozoïdes engendre une acidification du milieu extracellulaire ce qui est toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes (ENGLAND, 1993). Des substances tampon doivent donc être utilisées afin de maintenir le pH autour de la neutralité. Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane ou TRIS est le plus communément employé, en association avec de l'acide citrique monohydraté. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible. Le jaune d'œuf et le lait possèdent également un pouvoir tampon, mais qui reste limité.

### III.1.1.8. Substances nutritives

Le jaune d'œuf et/ou le lait constituent une partie des substances nutritives employées dans les dilueurs. Cependant, afin de fournir suffisamment d'énergie aux spermatozoïdes, des sucres sont

## Partie bibliographique

rajoutés. De plus, ces derniers permettent de maintenir la pression osmotique du milieu et possèdent une action cryoprotectrice. Il a été démontré que les spermatozoïdes peuvent métaboliser le glucose et le fructose, deux composés présents dans le liquide séminal (RIGAU et al., 2001). Les dilueurs contiennent donc soit du glucose soit du fructose.

Un éventuel avantage à utiliser l'un ou l'autre de ces deux sucres dans le dilueur décongélation, comme de réfrigération, n'a pas pu être démontré de façon consensuelle par les différents auteurs qui se sont intéressés à ce sujet (YILDIZ et al., 2000 ; RIGAU et al., 2001 ;IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001c ; PONGLOWHAPAN et al., 2004a).

### III.1.1.9. Antibiotiques

Le sperme n'étant pas stérile et le dilueur pouvant être un bon milieu de culture, des antibiotiques sont utilisés pour lutter contre la prolifération bactérienne. En général, la dihydrostreptomycine et la benzyl-pénicilline sont utilisées car elles sont bien tolérées par les spermatozoïdes (LEBLANC, 2004).

Tableau N°4 : Composition des dilueurs les plus utilisés.

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

Source :NAGASE et NIWA cités par LAMINO, 1999.

### III .1.2. Refroidissement de la semence

La température est le premier facteur influençant le métabolisme des cellules. En effet, un spermatozoïde peut être maintenu en vie à l'intérieur d'une gamme de température qui varie de +45°C environ à -269°C (température d'hélium liquide). Dans ces limites, plus la température est élevée ( $\geq +7^{\circ}\text{C}$ ), plus le métabolisme de la cellule est intense. Par ailleurs, Salisbury et Vandemark (1961) soulignent une meilleure motilité, mais un temps de survie assez court à ces températures positives. Ainsi, la motilité des spermatozoïdes décroît avec la température de conservation et



## Partie bibliographique

---

n'existe plus à des températures de +4 et +5°C. Le métabolisme à ces températures, est considérablement réduit (Adamou-N'Diaye, 1994).

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

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

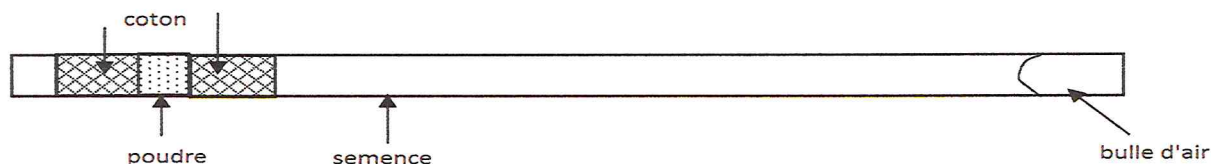
### **III.1.3. Conditionnement de la semence**

Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Après la dilution, le sperme est alors reparti en dose individuelles soit en ampoules de verre scellé en ampoule plastiques, soit les paillettes de chlorure de polyvinyle.(Johnson et al, 1995).

Il consiste à fractionner la semence en doses fécondantes destinées à être utilisées à court, moyen ou long terme. La forme de conservation la plus courante et la plus pratiquée reste les paillettes. Ce sont des tubules spéciaux en matière plastique creuses avec des volumes de 0,25 ou 0,5ml. Elles sont ouvertes sur un côté avec 2 boules de coton pour pousser la semence (Figure4).

L'autre côté est soudé automatiquement après remplissage de la paillette par une machine de remplissage et de soudage. Lorsque la semence est destinée à une utilisation lointaine la paillette fait l'objet d'une identification. Elle va porter ainsi les renseignements sur la traçabilité de la semence (le nom du géniteur, race, numéro de code, date de récolte, N° de récolte, centre ou lieu de production, etc.)..(Johnson et al, 1995).

## Partie bibliographique



**Figure N°7** : Schéma d'une paillette « CASSOU »

### III.1.3. La congélation

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

Polge et Rowson rapporté par Adamou-N'Diaye( 1994).

**Tableau N°5** : Protocole de congélation de la semence du taureau Chenoweth (PJ) et al,(1978).

Le sujet	Taureau
Récolte	Par électro éjaculation
	↓
Dilution a 37 °c	Dilution a ½ au glycerol
	↓
Equilibration	10 minute a 37°C
	↓
Refroidissement a 22°C	
	↓
Refroidissement a 4°C Et dilution a 4°C	Dilution finale avec Dilueur glycerol Equilibration a 10 mn a 37°C
	↓
Remplissage des paillette	
Equilibration des paillettes a 4°C	Pendant 1 heure
	↓
Congélation dans la vapeur d'azote	1 h et 30 minute
	↓
Immersion dans l'azote liquide	1) -0.7°C/10sec de 4°C a -10°C. 2) -7°C/10sec de -10°C a -130°C.

## Partie bibliographique

---

Compte tenu de ces effets délétères de la congélation et de la décongélation sur la qualité de la semence après décongélation, il est préférable de congeler de la semence de bonne qualité afin d'espérer obtenir une semence de qualité convenable après décongélation. Nothling et al. (1997)

Ainsi, même si on a prouvé que la qualité de la semence fraîche n'est que peu utile pour prédire la mobilité de la semence après décongélation et, même si aucun consensus n'a pu être établi, la plupart des auteurs appliquent les conditions suivantes pour savoir si une semence peut être congelée ou non :

- pourcentage de spermatozoïdes mobiles supérieur à 70 %, et
- pourcentage de formes anormales inférieur à 30 à 40 %. Nothling et al. (1997)

Ce sont ces critères qui sont appliqués par le CERCA pour déterminer si une semence est « congelable » ou non.

Il faut tout de même préciser que les effets néfastes de la congélation et de la décongélation sont plus ou moins prononcés en fonction des procédés utilisés et qu'il existe de fortes variations individuelles. Nothling et al. (1997). De nombreux auteurs ont étudié les effets de la congélation et de la décongélation sur les spermatozoïdes. Ils ont montré que la congélation et la décongélation altèrent de façon significative la mobilité, la vitalité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes (Stromet al., 1997 ; Moggiaet Perros, 1999 ; Talon, 1999 ; Burgess et al., 2001 ; Veyer, 2002). On a également montré que la congélation et la décongélation engendrent une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ce qui provoque des changements structurels et fonctionnels proches de la capacitation : réaction acrosomiale et hypermotilité Rota et al. (1999).

Enfin, on a prouvé que la capacité de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes après décongélation est significativement diminuée Ivanova et al. (1999).

Une fois les effets néfastes de la congélation et de la décongélation démontrés, certains de ces auteurs ont cherché à savoir quelles étapes sont les plus délétères pour les spermatozoïdes.

Les études montrent que les étapes de dilution et d'équilibration n'altèrent que de façon très limitée l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes, et que la congélation proprement dite et la décongélation sont les étapes les plus nuisibles (Stromet al., 1997 ; Moggiaet Perros, 1999 ; Talon, 1999 ; Burgess et al., 2001).

## Partie bibliographique

**Tableau N°6** : recapitulatif des travaux effectués par certains auteurs sur le conditionnement de la semence epididymaire bovine

Auteurs	congélation	Equilibration	Vapeur d'azote	Température de décongélation
Martins 2009 bv epididym	5°c-4heures	5°c-4heures	-80 a -120 pendant 20 minutes	35°c pendant 60 sec
Aurini(2009) Bison epididym	4°-4heures	4°- 4heures	2 cm a distance Pendant 15 minutes	36° pendant 60 secs
Kozdrowski(2011) Bison epididym	5°c- 4heures	5°c- 4heures	A 5 cm pendant 15 minutes	37°c pendant 30 secs

### III.1.4. La décongélation

La mobilité de spermatozoïdes peut nous renseigner sur la qualité du sperme, or il semble que cette mobilité est en fonction du dilueur employé, ne reflète pas toujours le réel pouvoir fécondant du sperme, Bedelpechon (M) (1996).

Après décongélation, des modifications brutales des équilibres osmotique du milieu de congélation se produisent lorsque la concentration extra cellulaire en glycérol est réduite.

Ce choc osmotique entraîne des anomalies du flagelle et peut altérer les membranes des spermatozoïdes.

C'est pour minimiser ce choc que certains auteurs préconisent, suite à la décongélation, le rééquilibrage du milieu par des lavages afin d'extraire le glycérol du milieu à revenir à des conditions isotoniques (Correia(G.R) et al (1996), Salhab (S.A),(1996). De telles opérations sont réalisables lors de manipulation in vitro de la semence.

Au cours de la décongélation, trois principaux paramètres sont à considérer :

La température, le temps et la solution de décongélation. La bonne combinaison de ces trois paramètres permettra de minimiser, ou mieux de prévenir les risques encourus par les spermatozoïdes au cours de la décongélation : choc thermique et choc osmotique principalement. Bedelpechon (M) (1996), Crosia(I.L),(1974) .

Lors de la décongélation, sur le terrain, la paillette sélectionnée dans la cuve, est immédiatement immergée, pendant 30 secondes, dans une bouteille thermos contenant de l'eau à environ 37° c. puis essuyé pour enlever toute trace d'eau. L'extrémité de la paillette (second) bouchon est sectionnée à

## Partie bibliographique

---

1 cm du cote de l'embout fermé au laboratoire. L'embout encore est induit dans l'extrémité distale du pistolet (piston sorti), Bedelpechon (M) (1996), Crosia(I.L),(1974) .).

### III.1.5. Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés

#### Définition du stress oxydant

Etat de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de l'organisme. La cryoconservation du sperme induit un stress oxydant à la fois par une production accrue d'EOR, mais aussi par dégradation des antioxydants (notamment les enzymes) (Baumber et al. 2003; Mazzilli et al. 1995).

Par exemple, chez le taureau, la congélation réduit le taux de deux antioxydants spermatiques que sont la superoxydedismutase et le glutathion (Bilodeau et al. 2000).

Ce stress entraîne une altération de la membrane plasmique par lipoperoxydation, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN augmente avec le nombre de cycles de congélation/décongélation (Linfor and Meyers, 2002).

C'est l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plus que l'anion superoxyde, qui est responsable de cette fragmentation. Par ailleurs, la catalase et le glutathion réduit permettent de limiter ces effets (Baumber et al. 2003).

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

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à +5°C. Le métabolisme des spermatozoïdes est ainsi réduit. Le refroidissement peut se faire pendant ou après la dilution. La vitesse de refroidissement doit être rapide pour réduire au maximum la durée du passage dans la zone critique de température mais aussi suffisamment lente pour éviter le choc thermique. La température de +5°C est obtenue après un refroidissement progressif en une heure 30 minutes, maximum dans une vitrine réfrigérée. Il peut être nécessaire d'ajouter de la glace à partir de +15°C. Il importe donc de diluer le sperme avant le refroidissement et de refroidir le sperme dilué (la semence) de façon progressive, pour prévenir les effets néfastes du choc thermique. Plusieurs auteurs dont (Salisbury et Vandemark, 1961) ont montré que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est accru de 6 à 9% lorsque l'éjaculat est dilué avant que la température ne soit abaissée.

# *Partie expérimentale*

# Partie expérimentale

## I. Introduction

Notre travail vise à collecter la semence épидидymaire bovine en post mortem pour l'examiner à l'état frais, et d'évaluer la motilité et la viabilité des spermatozoïdes dont l'objectif est de vérifier es que la semence épидидymaire bovine répond aux critères d'évaluation exigés par le CNIAG .

### ➤ Période et lieu de stage

L'étude expérimentale a été réalisée durant la première moitié du mois d'avril 2014 au niveau du laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale de l'Université Saad Dahleb de Blida I.

### ➤ La collecte de la semence

On a récolté des semences à partir des testicules ramenés depuis des abattoir tôt le matin, après l'isolement de l'épididyme du fait que les spermatozoïdes sont mature a ce niveau (Guerin,y et al,2003).

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Matériels

#### II.1.1.matériels biologiques

- Les testicules

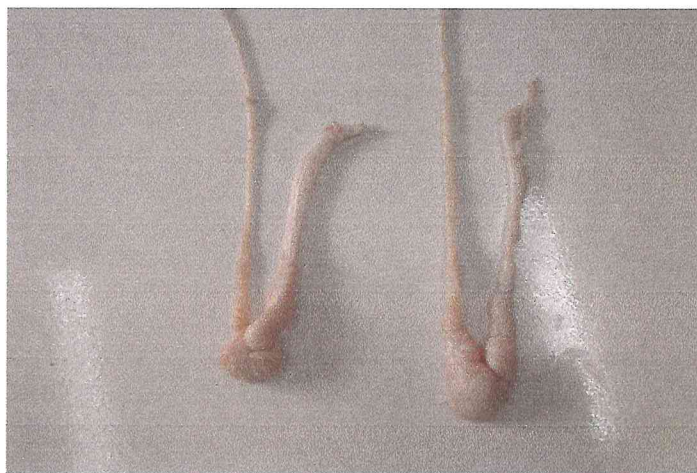
#### II.1.2. Matériels non biologique (appareillage du laboratoire et matériel de collecte)

Matériel de collecte	Appareillage du laboratoire
<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Ciseau</li><li>✚ Bistouri</li><li>✚ Seringue</li><li>✚ Gants</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Les tubes à essais stériles et Portes tubes</li><li>✚ Pipettes graduées</li><li>✚ Microscope optique à platine chauffante</li><li>✚ Lames et lamelles</li><li>✚ Na cl à 3%</li><li>✚ Œufs</li><li>✚ Vitrine réfrigérative</li><li>✚ Paillettes</li><li>✚ Biostat d'azote liquide</li><li>✚ Bain-marie et Analyseur CASA</li></ul>

### II.2. Méthodes

#### II.2.1. la Collecte

On isole l'épididyme des testicules cueilli tôt le matin à l'abattoir, nous avons effectué la collecte en utilisant la méthode de rétrograde Flushing, auparavant la queue et le canal déférent ont été isolés du reste de l'épididyme en utilisant un scalpel en effectuant une incision très près de la jonction du corps de la queue proximale. (Figure n°8).



**Figure N°8** : dissection de l'épididyme

Puis on a introduit dans le canal déférent une canule avec une aiguille de 22G émoussée. On a rincés par la suite les spermatozoïdes dans une direction rétrograde des canaux déférents à par la queue de l'épididyme à l'aide d'une seringue chargée de 4 ml de TRIS A réchauffé (37°C),

L'étape suivante consiste à mettre notre échantillon au bain-marie. (Figure N°9).

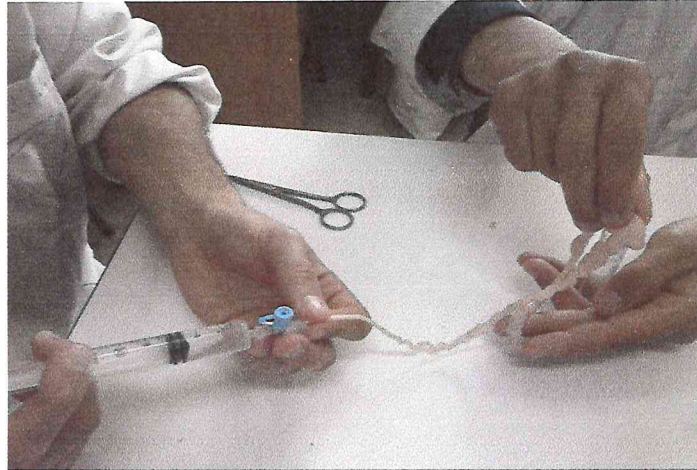
Composition du TRIS A :

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



## Partie expérimentale

---



**Figure N°9 : injection du TRIS A**

Notre travail a commence par l'évaluation des paramètres de la semence (la mobilité, la viabilité, la couleur la concentration et le volume) des trois récoltes a l'état frais et après décongélation. (Figure N°10).



**Figure N°10 : récolte du sperme épидидymaire**

### **II.2.2. Examen du sperme a l'état frais**

#### **II.2.2.1. Evaluation visuelle**

La semence est examiné à l'œil nu, puis au microscope ou on a mis en évidence ses caractéristiques (volume, couleur, motilité massale, motilité individuelle, concentration) que nous avons enregistrées. Le volume et la couleur nous les avons appréciés visuellement sur le tube gradué.



Figure N°11: sperme épидидymaire dans le tube à essai.

### II.2.2.2. Evaluation microscopique

#### ➤ La motilité massale

Par un microscope optique nous avons appréciés la motilité massale. On a déposé une goutte sur la lame puis directement nous avons observée (grossissement x10).

#### ➤ La motilité individuelle

Une goutte plus fine déposée entre lame et lamelle est visualisée pour l'évaluation de la motilité individuelle (grossissement x40).

Une note est donnée respectivement de 0 à 5 pour la motilité massale et en pourcentage pour la motilité individuelle.

#### ➤ La concentration

Nous avons déterminée par l'utilisation des cellules de Thoma la concentration, elle qui est exprimée en milliards de spermatozoïdes ( $10^9$  spz/ml).

Examen pratique :

On a usé de la cellule de Thoma Pour déterminés par comptage direct des spermatozoïdes après une dilution a 3% de Na Cl, le nombre de spermatozoïdes est déterminé par la formule suivante :  $C=N \times 4 \times 10^4 \times d$ .

A une concentration supérieure à  $0,5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml le sperme est bon.

Après que nous avons déterminé la concentration, on a procéder a une dilution de la semence pour avoir une concentration de  $50 \times 10^7$ , qui sera ultérieurement conservée et analysée.

## Partie expérimentale

---

### II.2.3. Evaluation du sperme après décongélation

La décongélation des paillettes a pour objectif l'appréciation de l'effet de la congélation et de la décongélation sur la motilité et viabilité des spermatozoïdes.

Les paillettes congelées et identifiées nous les avons plongées dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes, puis on a coupé le bout des paillettes pour faire couler la semence dans chacun des tubes correspondant au numéro de la paillette, les tubes sont mis en bain-marie pour effectuer la dernière étape de l'analyse.

### II.3. Etapes de conservation de la semence

#### ➤ La dilution du sperme

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

On a utilisé le dilueur TRIS A préparé au niveau de notre laboratoire.

Après mesure de la concentration du spermatozoïde récolté, la quantité de dilueur à apporter et le nombre de doses qui peuvent être produites sont alors calculées en fonction du volume de la semence prélevé. Le nombre de spermatozoïdes qui en résulte est de  $500 \times 10^6$ .

Remarque : Son ajout à la semence le dilueur doit être porté à une température de 35°C avant.

#### ➤ La réfrigération

Avant la mise en réfrigération des tubes on ajoute aux complexes le dilueur TRIS B préparé au laboratoire un volume de 1ml pour chaque tube, le volume total est de l'ordre de 2ml, avec une concentration de  $125 \times 10^6$  de spz.

Le TRIS B est composé de : TRIS : 3,03g Acide citrique : 1,7g. Glucose : 1,25g Pénil G : 0,1g. DHS : 0,1g. Jaune d'œuf : 20ml. Eau distillée : jusqu'à 100ml

On va diminuer la température petit à petit par le placement des tubes contenant la semence diluée et traitée, dans la vitrine réfrigérée (4°C).

Remarque : La température de (4°C) est obtenue après un refroidissement progressif en 2 heures.

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

## Partie expérimentale

---

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

### ➤ La mise en paillettes

On a identifiés et refroidies les paillettes vides (0,25 ml) à 4°C même température que notre échantillon. Les paillettes et la semence nous les avons gardés à la même température afin d'éviter le choc thermique préjudiciable aux spermatozoïdes. Précédemment nous avons effectués le marquage des paillettes en nombre de trait correspond au numéro du tube. Pour chacun des tubes nous avons disposé 3 paillettes.

La dernière étape consiste a procéder au remplissage manuel.

### ➤ La congélation

Les paillettes rempli précédemment avec de la semence nous les avons mis dans l'azote liquide.

Auparavant nous avons préparés la boîte en polyester contenant de l'azote liquide pour déposer les palettes à 5 cm de hauteur à la vapeur d'azote durant 15 minutes, cela pour procéder à l'étape de conservation. Juste après la mise en vapeur des paillettes, on a passé directement à la congélation des semences, on plonge les paillettes misent en vapeur dans l'azote liquide à une température proche de -196°C.

## III. Résultats et discussion

### III.1. L'état frais

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

#### a. La couleur

On a appréciée directement après la récolte la couleur des trois récoltes.

#### ➤ Lecture

les résultats sont enregistrés dans le tableau qui suit :

La collecte	La couleur
première collecte	blanche crémeuse
seconde collecte	blanche crémeuse
troisième collecte	blanche laiteuse

## Partie expérimentale

La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant. Cette variation normale de la couleur du sperme peut être liée à la teneur de l'éjaculat en spermatozoïdes ou à la présence des pigments lipochromes sans rapport avec l'alimentation. EZEKWE (1988).

Nous avons constatés que la couleur est inconstante dans les trois collectes.

On a enregistrées pour notre échantillon une acceptable couleur.

### b. Le volume

#### ➤ Lecture

Les résultats sont enregistrés dans le tableau qui suit :

La collecte	Le volume (ml)
première collecte	2
seconde collecte	1.5
troisième collecte	1

Le volume est d'une moyenne de 1.5 ml, cependant il est acceptable comparativement a celui cité par (A. Darin-Bennett I.G.1977).

### c. La concentration

#### ➤ Lecture

Les résultats sont enregistrés dans le tableau qui suit :

La récolte	La concentration ( $10^9$ spz/ml)
première collecte	1.53
seconde collecte	2.62
troisième collecte	1.93

La concentration est d'une moyenne de  $2.02 \times 10^9$ , la concentration est acceptable pour les trois semences car elle ne dépasse pas les limites inferieures cités par Dumont, 1997 ; qui est de ( $\geq 0,5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml).

## Partie expérimentale

### d. La motilité massale et la motilité individuelle

On a apprécié la motilité massale et individuelle pour chaque semence

➤ **Lecture**

les résultats sont enregistrés dans le tableau qui suit :

La récolte	La MM (0-5)	La M indv (%)
première collecte	4	75
Seconde collecte	4.5	80
troisième collecte	3	70

La méthode utilisée pour apprécier la motilité permet d'avoir une idée sur la présence ou non d'anomalies et de cellules étrangères. Cependant le CNIAG a fixée une limite minimale d'acceptabilité qui y est respectivement de l'ordre de 60% et 3 pour la motilité individuelle et motilité massale. Ces normes son assortis avec celles fixées par (Dumont, 1997). De ce fait on peut considérer les semences comme étant convenables pour la mise en paillette et pour l'insémination artificielle.

### III.2. Après décongélation

On a appréciée la motilité massale et individuelle de la semence après décongélation de cette dernière.

➤ **Lecture**

Les résultats sont enregistrés dans le tableau qui suit :

La collecte	La M m (0-5)	La M indv(%)
première collecte	2.5	60
seconde collecte	3	70
troisième collecte	3	70

Il existe une versatilité de la mobilité d'une récolte à une autre.

Selon Dumont (1997) on note que les collectes 2 et 3 ont une bonne motilité massale et individuelle, semblable a celle cité par cet auteur, nonobstant la première récolte est non acceptable pour l'utilisation dans l'insémination artificielle d'après le même auteur.

## Conclusion

La semence épидидymaire bovine malgré qu'elle n'est utilisée que récemment procure des avantages qui ne sont pas fournis par le sperme éjaculé. Notre étude qu'est consacrée à l'évaluation des différents paramètres spermatiques épидидymaire bovin à l'état frais et après décongélation. Nos résultats montrent qu'il n'existe pas une différence significative avant et après congélation (pour la motilité individuelle et motilité massale à l'état frais sont respectivement de l'ordre de 75% et 4.16 et après décongélation sont de l'ordre de 66,66% 2,83). Ajoutant que ces résultats nous ont permet de conclure que cette semence répond bien à des normes standards recherchés par des centres d'insémination artificielle. De ce fait, la préparation des paillettes à partir de sperme récolté en post-mortem chez le bovin n'affecte pas la qualité de ces dernières.

Cette solution peut être dans les prochaines années un choix pour les banques de sperme. Elle surmonte plusieurs entraves retrouvées dans le terrain.

## Lists des références

- Acott TS, Katz DF, Hoskins DD (1983)**: Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation *Bi01 Reprod* 29289399.
- **Adamali HI, Hermo L(1996)** : Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 1996; 17: 208-222.
- Adamou-n'diaye M. (1994)** : Technologie du sperme de taureau de race Borgou. Thèse : Reproduction Animale : Tours (Faculté des Sciences et Techniques. Université François Rabelais), 94 TOUR 4015.
- Amann RP (1987)**: Function of the epididymis in bulls and rams. *J Reprod Fertil Suppl*34:115-131.
- Bedel-Pichon (M.)** : Amélioration de la technique de congélation du sperme de chien: intérêt de la glutamine. Mémoire de DfA biologie-agronomie, Université de Rennes I - ENSAR.1996.
- **Corrfa (J.R.),Rodriguez (M.C.),Patterson (O.I.),Zavos (P.M.)(1996)** :  
Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46,413-420.
- Crosia (L.)**: Contribution à l'étude de la congélation du sperme de bélier. Thèse de doct. vet., ENVT.1974.
- Chatelin.E (1986)** : anatomie descriptive de l'appareil génital du taureau. *el et ins.* -214,p5-18
- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., and Baumbe, J. (2001)** : Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 56, 577-589.



-Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2003) : Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24, 621-628.

-Bizimungu J. (1991) : Insémination artificielle au Rwanda : Bilan et perspective Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 15

- Brown, D., Katsura, T., Kawashima, M., Verkman, A. S., and Sabolic, I. (1995) *Histochem Cell Biol* 104(1), 1-9

-Badran, H. H., and Hermo, L. S. (2002) *J Androl* 23(3), 358-373

-Barone, R. – Anatomie comparée des mammifères domestiques – Tome 4 : Splanchnologie. Paris : Vigot, 1990. 501p.

-Beaulieu, V., Da Silva, N., Brown, C. R., Smith, P. J., Brown, D., and Breton, S. (2004) : Modulation of the action cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H<sup>+</sup>ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem*.

-Barone, R., (1978). Anatomie comparée des mammifères domestiques. Editions Vigot frères – Tome 3. LYON, 851p.

-Bedford Jhf (1966): Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit *J Exp Zool* 163:319-329.

-Bedford JM (1975): Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. Dans E. D.W. Hamilton & RO. Greep (Eds): "Handbook of Physiology, Sect. 7." Washington, D.C. American Physiological Society, pp. 303- 318.

-Bonnes, G., Desclaude, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Montméas, L., et al., (2005). -Reproduction des animaux d'élevage. *Educagri édition, deuxième édition, 407 P.*

-Boukhliq, R., (2002). Cours en ligne sur la reproduction ovine. Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II - MAROC.

- Brooks DE (1979):** Biochemical environment of sperm maturation. Dans E. D.W. Fawcett & J.M. Bedford (eds): "The Spennatozoon" Baltimore: Urban and Schwartzberg inc, pp. 23-30.
- Cooper TG (1986):** The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization New York Springle-Verlag, pp. 1-281.
- Charrois R (1973):** Mechanisms: Men. Dans J. Collins & J.E. Rioux (eds): The Canadian Fertility Swety; A practical manual on reproduction. Québec: Les Presses de Yuniversité Laval, pp. 12-37.
- Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML, (2004):** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. Can Vet J 45, 35–41.
- Crockett EL, (1998):** Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. Am Zool 38, 291–304.
- Contantinesca, G. Et I. (2004):** – Clinical dissection guide for large animals. Horse and Large Ruminants – 2ème édition. Iowa: Iowa State Press,. p 321.
- Cooper TG (1991):** Function of the epididymis and its secretory productç. Dans Springler-Verlag (ed): "The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilition." New York, 281pp.
- Clulow, J., Jones, R. C., and Hansen, L. A. (1994)** *Exp Physiol* 79(6), 915-928
- Clulow, J., Jones, R.C., Hansen, L. A., and Man, S. Y. (1998)** *J Reprod Fertil Suppl* 53,1- 14
- Cooper, T. G., and Brooks, D. E. (1981)** *J Reprod Fertil* 61(1), 163-169.  
2005; 97: 397-414. Biol Reprod 1996; 55.
- Cooper, T. G., and Brooks, D. E. (1981)** *J Reprod Fertil* 61(1), 163-169.
- Dumont, P. (1997) :** Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. Le Point Vétérinaire, 1997, 28, 185, 19-32.

-**Da Silva, N., Silberstein, C., Beaulieu, V., Pietrement, C., Van Hoek, A. N., Brown, D., and Breton, S. (2006)** *Biol Reprod* 74, 427-438

-**De Jonge C 2005** Biological basis for human capacitation. Human

-**Douet, D-G. N., (2000)**. Congélation de sperme de mammifères, application aux antilopes.  
*Thèse Docteur vétérinaire. Ecole nationale de Nantes 111P.*

-**Derivaux J., (1971)** : Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège.-Edition Derouaux.-175p.

-**Dadoune, J-P., Demoulin, A., (2001)**. Structure et fonction du testicule.  
*In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme,*  
*756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.*

-**Dacheux, F., Dacheux, J-L., (2001)**. L'épididyme et les glands annexes.  
*In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme,*  
*290-315 pp. Coédition INRA-Ellipses.*

-**Dadoune, J-P., Demoulin, A., (2001)**. Structure et fonction du testicule.  
*In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), la reproduction chez les mammifères et l'Homme,*  
*756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.*

-**England G. (1993)** Cryopreservation of dog semen : a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47 (suppl), 243-255.

-**Ehrenwald E, Foote RH & Parks JE 1998** Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Research* 20 1-13.

-**Eddy EM (1988)**: The Spermatozoon. Dans E. Knobil et al. (eds): *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, pp. 27-68.

-**Eduardo Villena, F., Jose Jimenez, R.M., Mendoza, E., Lopez, J.C., (2003)**.  
Technicien en élevage. *Editions Cultural, S.A Tome2, MADRID – Espagne, 226 p.*

identification of proteins secreted in various regions of the adult boar epididymis.

spermatozoa in toxicological studies. *Fundamental Applied Toxicology* 1993; 21: 298

-**Hay M., King W., Gartley C., Leibo S. et Goodrowe K. (1997a)** Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51 (suppl), 99-108.

-**Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC(1995)** : The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 731-745.

- **Jones R, Glover TD (1975)**: Interrelationships between spermatozoa, the epididymis and epididymal plasma. Dans J.G. Duckett & P.M. Racey (eds): "The Biology of the male gamete." London: Academic Press, pp. 367-384.

- **Johnson L(1995)** : Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 1995; 32: 385-422.

-**Khorasani AM, Cheung AP & Lee CYG 2000** Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. *Journal of Andrology* 21 586–594.

-**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..

-**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.

-**Kreda, S. M., Gynn, M. C., Fenstermacher, D. A., Boucher, R. C., and Gabriel, S. E. (2001)**

*Am J Respir Cell Mol Biol* 24(3), 224-234

-**Leblanc B. (2004)** Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse

Méd. Vét., Alfort, n°102, 55 p.

-**Linde-forsberg c. (1995)** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, 48-58.

-**laminou m. I. (1999)** :L'Amélioration génétique par la biotechnologie de l'insémination artificielle bovine : bilan et perspectives. Thèse : Méd.Vét. : Dakar ; 9.

- **Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2002)** : Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 23, 107-113.

-**Lacroix, M., (1976)**.Circuit physique de la semence ovine, 81-93 pp.  
*In Insémination artificielle ovine Editions SEARLE-PARIS, 105 P.*

-**Leung GP, Cheung KR, Leung CT, Tsang MW, Wong PY(2004)** : Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol*2004; 216: 5-. 13.

-**Langlais J & Roberts KD 1985** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian sperm. *Gamete Research* 12 183–224.

-**Leblanc B. (2004)** Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien vue d'une utilisation au centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA). Thèse  
Méd. Vét., Alfort, n°102, 55 p.

-**Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2002)** : Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 23, 107-113.

-**Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F. M., Rapone, S., Dondero, F., and Gazzaniga, P. P. (1995)** : Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 26, 145-148.

-**Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M(1995)** : The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 1995;27:195 –206.

-Melrose dr et Turner c., (1952) : Pyruvate metabolism and assessment of semen quality. Proc Soc Exp Biol Med. Jun; 80(2):298–300.

-Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F. M., Rapone, S., Dondero, F., and

-Montane, Bourdelle, Bressou., (1978).Anatomie régionale des animaux domestiques, fascicule II Ruminants, 2ème édition. Editions J. B. BAILLIERE- PARIS.

-Morrier A, Theriault M, Castonguay F, Bailey J, (2004) : Effect of cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting, Vancouver, Canada, 239 pp. (Abstract 636).

-Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C, (2008): Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreser- vation of rainbow trout spermatozoa. Biol Reprod 78, 390– 399.

- Mocé E, Purdy PH, Graham JK, (2010): Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Anim Reprod Sci 118, 236–247.

-Nolan JP, Graham JK & Hammerstedt RH 1992 Artificial induction of exocytosis in bull sperm. Archives of Biochemistry and Biophysics 292 311–322.

-Olar t., Bowen r. Et pickett b. (1989) Influence of extender, cryopreservative and seminal procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. Theriogenology, 31, 451-461.

-Orgebin Crist MC, Fournier-Delpech S (1982): Spenn-egg interaction Evidence for maturational changes during epididymal transit. J Androl3:429-433.

-Parapanov, R., Vargas, J., et al.,(2009).Spermatogenèse et perturbateurs endocriniens: étude sur la qualité du sperme en Suisse Fondation andrologie, biologie, endocrinologie, reproduction (Faber) en Suisse.

-Parez, M ; Duplan, J.M(1987) : L'insémination artificielle bovine : Reproduction, Amélioration génétique. Paris : ITEB-UNCEIA, 1987, 256 p. 187.p17-82.

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

-PENA A. et LINDE-FORSBERG C. (2000a) Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology, 54, 859-875.

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

- Hanzen .Ch . la propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme de ruminants (2008,2009).

-RIGAU T., FARRE M., BALLESTER J., MOGAS T., PENA A. et RODRIGUEZ-GIL J. (2001)

Effects of glucose and fructose on mobility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology, 56, 801-815.

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

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

-Ruckebusch, Y.,(1981). Physiologie pharmacologie thérapeutique. Maloines. a., éditeur, 611P.

-SIRIVAIIDYAPONG S., URSEM P., BEVERS M. ET COLENBRANDER B. (2001) effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility, 57 (suppl), 383-386. Male Theriogenology: Semen Evaluation. Reproduction Update 11 205-214.. Reproduction des Mammifères d'élevage. 1986. Coll. INRAP. Ed Fourcher.

-**Vaillancourt, V., Lefebvre, R., (2003).** La gestion de la reproduction chez les petits ruminants : le contrôle du cycle oestral. *Le médecin vétérinaire au Québec*, volume : 33, n°1 et 2. 43-49.

-**STROM-HOLST B., LARSSON B., LINDE-FORSBERG C. et RODRIGUEZ-MARTINEZ H.(2000)** Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119, 201-206.

-**Seegers, H., (1997).** Insémination artificielle : Des résultats pour une utilisation à bon escient. *Le point vétérinaire, Volume 28 n°185, 1599-1600.*

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

- **Slott V, Suarez J, Poss P, Linder R, Strader L, Perreault S.** Optimization of the

- **Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti J, Okamura N, Dacheux J.** Characterization and

-**Silverthorn, D, U., Ober, W, C., Garrison, C, W., Silverthorn, A, C., Johnson, B, R., (2007).** Physiologie humaine. Une approche intégrée. Pearson education France, 976 P.

- **Turner TT (1979):** On the epididymis and its function *Invest Urol*16811-321.

-**THIBAUT, C et LEVASSEUR, M-C.** – La Reproduction chez les mammifères et l’homme – nouvelle édition. Paris : INRA Editions ellipses, 2001, 256-289.

-**THIBIER M., 1977** La fonction sexuelle du jeune taurillon (*Bos taurus*).- Thèse : Sciences :Paris

-**Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning XP, Moore GD, Valenzuela**

-**JP, Jorgez CJ, Alvarez JG & Kopf GS 1999** Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *Journal of Biological Chemistry* 274 3235–3242.

-**Watson PF, (1981):** The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London, pp. 189–218.



-Wong, P. Y. (1998) *Mol Hum Reprod* 4(2), 107-110

- Yeung CH, Cooper TG, Waites GMH (1980): Carnitine transport into the perfused epididymis of the rat: regional differences, stereospecificity, stimulation by choline and effects of other luminal compounds. *Biol Reprod* 23:294-304.

-Zardoya R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell*