

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida



Université Saad  
Dahlab-Blida 1-

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

## **Master en Sciences Vétérinaires**

**Contrôle de qualité biologique de la semence bovine congelée  
produite en Algérie**

Présenté par

**MEDJKOUNE Myra**

**Devant le jury :**

<b>Président(e) :</b>	KELANAMER R.	MCA	ISV Blida
<b>Examineur :</b>	DJOUDI M.	MCB	ISV Blida
<b>Promoteur :</b>	BELALA R.	MCA	ISV Blida
<b>Co-promoteur :</b>	YAHIMI A.	MCA	ISV Blida

**Année : 2021/2022**

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida



Université Saad  
Dahlab-Blida 1-

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

## **Master en Sciences Vétérinaires**

**Contrôle de qualité biologique de la semence bovine congelée  
produite en Algérie**

Présenté par

**MEDJKOUNE Myra**

**Devant le jury :**

<b>Président(e) :</b>	KELANAMER R.	MCA	ISV Blida
<b>Examineur :</b>	DJOUDI M.	MCB	ISV Blida
<b>Promoteur :</b>	BELALA R.	MCA	ISV Blida
<b>Co-promoteur :</b>	YAHIMI A.	MCA	ISV Blida

**Année : 2021/2022**

## REMERCIEMENTS

Merci ALLAH de nous avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout et le bonheur de lever nos mains vers le ciel et dire ALHAMDOULLAH.

A Monsieur BELALA Redha,

Qui a dirigé ce travail et veillé à son aboutissement, qui a toujours su avoir les bons mots pour me conseiller et me rappeler à l'ordre lorsque je flanchais, qui m'a accordé toute l'attention et la bienveillance d'un père, qui m'a inspiré depuis le tout début et qui continuera à m'inspirer jusqu'à la fin. Mille fois merci à vous, vous sans qui rien tout ce que j'ai pu accomplir jusqu'ici n'aurait pu être possible.

A Monsieur YAHIMI Abdelkarim,

Pour m'avoir fait l'honneur de me co-encadrer, pour sa pédagogie, sa bienveillance, sa disponibilité, son implication et sa confiance.

Au Président du jury,

Dr. KELANAMER Rabah, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

Hommage respectueux.

Au Dr. DJOUDI Mustapha,

Qui a bien voulu accepter d'examiner mon mémoire.

Hommage respectueux

## DEDICACES

*À mes parents,*

*Pour votre soutien tout au long de mes études, pour votre amour, votre patience et votre confiance. Maman pour ta douceur, ta prévenance, tes conseils et toutes tes attentions, Papa pour m'avoir toujours donné la force de me battre, pour ta bienveillance et ta confiance. Je n'en serais pas là sans vous et je ne serai pas qui je suis sans votre implication et votre éducation.*

*À mon petit frère,*

*Ali, qui restera toujours petit à mes yeux du haut de ses 20ans ...  
Je te souhaite tout le bonheur du monde, un brillant parcours scolaire et surtout une vie remplie de joie et d'aventures. Sache que je serai toujours là pour toi et merci d'avoir toujours été là pour moi.*

*Medjkoune Myra.*

## RESUME

La présente étude consiste à évaluer la qualité biologique de la semence bovine congelée en Algérie en utilisant un système CASA (HT IVOS II) pour l'analyse de la mobilité et la morphométrie, la cellule Neubauer (OMS, 2021) pour la concentration, et le test hypo-osmotique (HOST) pour l'intégrité membranaire flagellaire. Trente paillettes, issues de 17 lots et cinq races laitières ont été analysées. Elles se répartissent en 26 doses analysées pour un CQ de production et 04 doses pour un CQ de stockage chez l'inséminateur. La concentration moyenne des spermatozoïdes est de  $81,83 \pm 3,10$  M/ml avec un nombre moyen de cellules par paillette de 17,18 million/dose. Les pourcentages moyens des spermatozoïdes motiles et progressifs sont respectivement de  $22,09 \pm 2,6\%$  et de  $11,72 \pm 2\%$ . Les taux d'intégrité membranaire flagellaire et de morphologie normale sont  $42,40 \pm 4,2\%$  et  $66,6 \pm 4\%$  respectivement. L'anomalie la plus fréquente est la gouttelette proximale (16,00%) elle atteint des taux de 49,9%, 51,1% et 78,4% chez certains taureaux d'IA, traduisant la présence de troubles de spermatogénèse chez ces géniteurs. L'application des normes de qualité permet de conclure que sur les 17 lots analysés, un lot seulement était conforme aux normes d'acceptation en IA qui s'avère être une semence importée donc ne comptant pas pour le contrôle de qualité de production. Sur les 16 lots restants, 08 (50%) sont de mauvaise qualité biologique et à retirer du réseau de distribution, et 08 (50%) de qualité douteuse, qui requièrent le contrôle d'autres paillettes de chaque lot. La mauvaise qualité de la semence bovine congelée produite en Algérie serait une cause déterminante parmi d'autres pouvant expliquer les taux élevés d'échec en IA. Seule l'implémentation d'un système de gestion de la qualité et d'analyse des risques adapté aux conditions de fonctionnement du CNIAAG permettrait d'identifier les origines de cette mauvaise qualité, corriger la situation et améliorer la qualité de la semence.

**Mots-clés** : CNIAAG, IA, Semence bovine, Contrôle de Qualité, CASA, CMF.

## ملخص

تمثل الدراسة الحالية تقييماً للجودة البيولوجية لأمشاج الثيران المجمدة في الجزائر باستعمال نظام التحليل المعلوماتي للأمشاج في تحليل الحركة وقياس التشكل، شريحة العد "نيوباور" لقياس تركيز النطف، والاختبار قليل التناضح (HOST) لفحص سلامة الغشاء الهبولي للسوط النطفي. تم تحليل 30 قصبية بلاستيكية حاوية للأمشاج المجمدة من أصل 17 دفعة مصنعة وخمسة سلالات بقرية. تنقسم إلى 26 قصبية تم تحليلها لمراقبة جودة الإنتاج و04 لمراقبة جودة التخزين لدى الملقح. معدل التركيز الخلوي هو  $81.83 \pm 3.10$  مليون خلية/مل بـ  $17.18$  مليون كمتوسط عدد الخلايا لكل قصبية. متوسط النسب المئوية للحيوانات المنوية المتحركة والمتقدمة هي على التوالي  $22.09 \pm 2.6\%$  و  $11.72 \pm 2\%$ . سلامة الغشاء الهبولي للسوط الخلوي ومعدلات التشكل الطبيعي هي  $42.40 \pm 4.2\%$  و  $6.66 \pm 4\%$  على التوالي. الشذوذ الأكثر شيوعاً هو القطيرة الدانية (16,00%)، وتصل إلى معدلات 49.9% و 51.1% و 78.4% عند بعض ثيران التلقيح الاصطناعي، مما يعكس وجود اضطرابات في تكوين الحيوانات المنوية لدى هؤلاء الفحول. تشير معايير الجودة المستخدم إلى أنه من بين الـ 17 دفعة التي تم تحليلها، دفعة واحدة فقط تفي بشروط القبول في التلقيح الاصطناعي؛ وبما أنها دفعة أمشاج مستوردة فلا يعتد بها في مراقبة جودة الإنتاج المحلي. أما الـ 16 دفعة المتبقية، فنصفها كان ذا جودة بيولوجية رديئة ويجب سحبها من شبكة التوزيع، والنصف الأخر ذا جودة مشكوك فيها، وتتطلب تحليل قصبية أخرى من كل دفعة. بناء على ما سبق، فقد تكون النوعية الرديئة للسائل المنوي البقري المجمد المنتج في الجزائر سبباً حاسماً من بين أسباب أخرى يمكن أن تفسر معدلات الفشل المرتفعة في التلقيح الاصطناعي. إن تطبيق نظام لإدارة الجودة وتحليل المخاطر يكون متكيفاً مع ظروف عمل م.ت.إ.ت. وهو السبيل الأوضح لتصحيح الوضع الحالي وتحسين جودة الأمشاج المجمدة في الجزائر.

**الكلمات المفتاحية:** م.ت.إ.ت.و - التلقيح الاصطناعي - أمشاج الثيران - مراقبة الجودة - نظام التحليل المعلوماتي للأمشاج - نظام القياس الخلوي بالتدفق.

## ABSTRACT

The present study consists in evaluating the biological quality of frozen bovine semen in Algeria using a CASA system (HT IVOS II) for motility and morphometric analysis, the Neubauer cell (WHO, 2021) for the concentration, and the hypo-osmotic test (HOST) for flagella membrane integrity. Thirty frozen semen straws from 17 batches and 5 dairy breeds were analyzed. They are divided into 26 doses analyzed for a production QC and 04 doses for a storage QC at the inseminator. The average sperm concentration is  $81.83 \pm 3.1$  M/ml with an average number of cells per straw of 17.18 million/dose. The average percentages of motile and progressive spermatozoa are respectively  $22.09 \pm 2.6\%$  and  $11.72 \pm 2\%$ . The flagella membrane integrity and normal morphology rates are  $42.40 \pm 4.2\%$  and  $66.6 \pm 4\%$  respectively. The most common anomaly is the proximal droplet (16,00%), it reaches rates of 49.9%, 51.1% and 78.4% in some AI bulls, reflecting the presence of spermatogenesis disorders in these parents. Applying the quality standards allowed us to conclude that from 17 batches analyzed, only one batch meeting AI acceptance standards; the latter turns out to be an imported semen and does not count for production quality control. From the 16 other batches, 08 (50%) are of poor biological quality and should be withdrawn from the distribution network, and 08 (50%) of dubious quality, which require the control of further straws from each batch. The poor quality of frozen bovine semen produced in Algeria would be a determining cause among others that could explain the high failure rates in AI. Only the implementation of a quality management and risk analysis system adapted to the operating conditions of the CNIAAG would make it possible to identify the origins of this poor quality, correct the situation and improve the quality of the semen.

**Keywords:** CNIAAG, AI, Bovine Semen, Quality Control, CASA, CMF.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	
DEDICACES.....	
RESUME.....	
ملخص.....	
ABSTRACT .....	
SOMMAIRE .....	
LISTES DES TABLEAUX .....	
LISTES DES FIGURES.....	
LISTE DES ABREVIATIONS .....	
INTRODUCTION .....	
INTRODUCTION .....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE .....	3
1- Production de semence bovine.....	4
1.1. Méthode de récolte du sperme par vagin artificiel.....	4
1.1.1. La préparation des taureaux dans les centres de collecte. ....	4
1.1.2. Préparation et technique de récolte au vagin artificiel.....	4
1.2. Préparation et conservation de la semence : .....	5
1.2.1. Principe.....	5
1.2.2. Dilution .....	6
1.2.3. Refroidissement et équilibrage de la semence .....	6
1.2.4. Conditionnement de la semence .....	7
1.2.5. Cryoconservation .....	7
1.2.6. Décongélation .....	8
1.2.7. Mise en quarantaine .....	8
1.2.8. Stockage .....	8
1.2.9. Transport et distribution .....	9
2. Gestion de qualité en production de semence bovine congelée.....	10
2.1. Techniques d'analyses de la qualité du sperme récolté .....	10
2.1.1. Examen microscopique .....	10
2.1.2. Analyse spermatique assistée par ordinateur et Cytométrie en flux.....	13
2.2. Contrôle de qualité et seuils d'acceptation en IA : .....	14
2.2.1. La semence fraîche (éjaculat).....	14
2.2.2. Semence congelée-décongelée.....	15
2.4. Assurance qualité et système HACCP.....	18
2.4.1. Points de contrôle critiques .....	18
2.4.2. Évaluation des risques et de la gravité des dangers .....	19
3. Point de situation sur la qualité de la semence bovine produite en Algérie : .....	20
3.1 Etudes bibliométrique :.....	20



3.2 Application des seuils d'acceptation en IA :.....	22
PARTIE EXPERIMENTALE .....	25
1. MATERIELS ET METHODES .....	27
1.1. Lieu et période de l'étude : .....	27
1.2. Matériels .....	27
1.2.1. Matériel biologique « Paillettes bovines » : .....	27
1.2.2. Matériel de préparation et d'évaluation de la semence.....	29
1.3. Méthodes .....	30
1.3.1. Conception d'une fiche de contrôle de qualité : .....	30
1.3.2. Décongélation de la paillette .....	31
1.3.3. Examen microscopique .....	32
1.3.4. L'analyse par le système HAMILTON THORN IVOS II.....	35
1.3.5. Saisie des données : .....	38
1.3.6 Analyse statistique : .....	38
2. RESULTATS.....	40
2.1. Contrôle de qualité de production .....	40
2.1.1. Etude descriptive.....	40
2.1.2. Etude de corrélation.....	44
2.1.3. Contrôle de qualité et application des seuils de décision en IA.....	49
2.1.4. Simulation de correction du nombre de spz par dose ajusté à 32M. ....	53
2.2. Contrôle de qualité de stockage.....	57
2.2.1. Les paramètres spermatiques des paillettes exposées au risque de réchauffement .....	57
2.2.2. Contrôle de qualité et application des seuils de décision en IA : .....	57
4. DISCUSSION .....	59
CONCLUSION .....	74
RECOMMANDATIONS .....	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	81
ANNEXES .....	.....

## LISTES DES TABLEAUX

<b>TABLEAU 1</b> : FLUCTUATIONS DE TEMPERATURE DANS LE COU D'UNE BOMBONNE TYPIQUE DE STOCKAGE DE SEMENCE EN AZOTE LIQUIDE.....	9
<b>TABLEAU 2</b> : GRILLE DE NOTATION DE LA MOTILITE MASSALE .....	10
<b>TABLEAU 3</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 01 (OULEBSIR, 2015) .....	20
<b>TABLEAU 4</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 02 (GACEM, 2016).....	20
<b>TABLEAU 5</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 03 (TAHRI ET DJOUABI, 2018).....	21
<b>TABLEAU 6</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 01 (OULEBSIR, 2015) AVEC APPLICATION DES SEUILS .....	23
<b>TABLEAU 7</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 02 AVEC APPLICATION DES SEUILS (GACEM, 2016).....	23
<b>TABLEAU 8</b> : RESULTATS DE L'ETUDE N° 03 (TAHRI ET DJOUABI, 2018) AVEC APPLICATION DES SEUILS.....	23
<b>TABLEAU 9</b> : IDENTIFICATION DES PAILLETES PRODUITES AU CNIAAG .....	28
<b>TABLEAU 10</b> : IDENTIFICATION DES PAILLETES IMPORTEES .....	29
<b>TABLEAU 11</b> : DIFFERENCES ACCEPTABLES ENTRE DEUX COMPTES DE REPLICATION POUR UNE SOMME DONNEE SUR LA BASE DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE ARRONDI A 95%.....	33
<b>TABLEAU 12</b> : STATISTIQUE DESCRIPTIVE DES PARAMETRES DE CONCENTRATION, MOBILITE TOTALE (MOT), PROGRESSIVE (PROG) ET VITALITE DES 26 PAILLETES EVALUEES PAR LE SYSTEME HT IVOS II.....	40
<b>TABLEAU 13</b> : STATISTIQUE DESCRIPTIVE DES PARAMETRES CINETIQUES DES 26 PAILLETES EVALUEES PAR LE SYSTEME HT IVOS II.....	41
<b>TABLEAU 14</b> : STATISTIQUE DESCRIPTIVE DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES (GOUTTELETTE PROXIMALE, GOUTTELETTE DISTALE, DISTAL MID-PIECE REFLEX « DMR », COILED TAIL AND BENT TAIL) DES 26 PAILLETES EVALUEES PAR LE SYSTEME HT IVOS II.....	41
<b>TABLEAU 15</b> : PARAMETRES DE CONCENTRATION, MOBILITE TOTALE (MOT), PROGRESSIVE (PROG), FONCTIONNALITE MEMBRANAIRE DU FLAGELLE (HOST) ET POURCENTAGE DE MORPHOLOGIE NORMALE, PRESENTES PAR TAUREAU (N=15).....	42
<b>TABLEAU 16</b> : PARAMETRES DE CONCENTRATION, MOBILITE TOTALE (MOT), PROGRESSIVE (PROG), FONCTIONNALITE MEMBRANAIRE DU FLAGELLE (HOST) ET POURCENTAGE DE MORPHOLOGIE NORMALE, PRESENTES PAR RACE (MOY±SEM). .....	43
<b>TABLEAU 17</b> : PARAMETRES DE CONCENTRATION, MOBILITE TOTALE (MOT), PROGRESSIVE (PROG), FONCTIONNALITE MEMBRANAIRE DU FLAGELLE (HOST) ET POURCENTAGE DE MORPHOLOGIE NORMALE PRESENTES PAR LIEU DE PRODUCTION (CNIAAG VS. IMPORTATION).....	44
<b>TABLEAU 18</b> : COMPARAISON ENTRE MORPHOLOGIE STANDARD ET MORPHOMETRIE IVOSII (N=11) : .....	45
<b>TABLEAU 19</b> : ANOVA DU PARAMETRE POURCENTAGE DE MORPHOLOGIE NORMALE (MICROSCOPIE VS. IVOS II).....	45
<b>TABLEAU 20</b> : COEFFICIENT DE CORRELATION DE PEARSON ENTRE LA TECHNIQUE MICROSCOPIQUE ET L'ANALYSEUR IVOS II POUR L'EVALUATION DE LA MORPHOLOGIE SPERMATIQUE (IBM, SPSS STATISTICS, VERSION 25). .....	46
<b>TABLEAU 21</b> : COMPARAISON DES VALEURS DE CONCENTRATION CALCULEES PAR CELLULE DE NEUBAUER ET L'IVOS II (N=26).....	47
<b>TABLEAU 22</b> : ANOVA DU PARAMETRE CONCENTRATION (NEUBAUER VS. IVOS II) (IBM, SPSS STATISTICS, VERSION 25). .....	48
<b>TABLEAU 23</b> : COEFFICIENT DE CORRELATION DE PEARSON ENTRE LA TECHNIQUE STANDARD NB ET L'ANALYSEUR HT IVOS II POUR L'EVALUATION DE LA CONCENTRATION SPERMATIQUE (IBM, SPSS STATISTICS, VERSION 25).....	49
<b>TABLEAU 24</b> : LES PARAMETRES DE CONCENTRATION, MOBILITE ET FONCTIONNALITE MEMBRANAIRE DU FLAGELLE DE 04 PAILLETES BOVINES CONGELEES EXPOSEES AU RISQUE DE RECHAUFFEMENT : .....	57

## LISTES DES FIGURES

<b>FIGURE 1</b> : ESPACE DE RECOLTE ET PREPARATION DU TAUREAU.....	4
<b>FIGURE 2</b> : SECTION LONGITUDINALE D'UN VAGIN ARTIFICIEL ET TECHNIQUE DE COLLECTE DE LA SEMENCE BOVINE.....	5
<b>FIGURE 3</b> : FLUCTUATIONS DE TEMPERATURE DANS LE COU D'UNE BOMBONNE DE STOCKAGE DE SEMENCE.....	9
<b>FIGURE 4</b> : REALISATION DU MELANGE POUR LE TEST HYPOTONIQUE.....	12
<b>FIGURE 5</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES SOUMIS AU TEST HYPO-OSMOTIQUE.....	12
<b>FIGURE 6</b> : ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DE SPERMATOZOÏDES DE TAUREAU, CLASSIFICATION DE BLOM (1973) SIMPLIFIEE PAR OTT (1986) ET MODIFIEE PAR DUMONT (1997).....	13
<b>FIGURE 7</b> : MICROGRAPHIE DES CERTAINES ANOMALIES DE MALFORMATION MAJEURS DES SPERMATOZOÏDES BOVINS	17
<b>FIGURE 8</b> : PLATEFORME BIOTECHNOLOGIQUE EN REPRODUCTION DES CARNIVORES/ UNIV. BLIDA 1.....	27
<b>FIGURE 9</b> : ANALYSEUR DE SEMENCE ASSISTE PAR ORDINATEUR HAMILTON THORN IVOS II.....	29
<b>FIGURE 10</b> : MATERIEL UTILISER DANS CETTE ETUDE (P.B.R.C).....	30
<b>FIGURE 11</b> : ETAPES DE DECONGELATION DES PAILLETES.....	31
<b>FIGURE 12</b> : NUMERATION SPERMATIQUE (CELLULE DE NEUBAUER).....	33
<b>FIGURE 13</b> : REALISATION DES LAMES DE MORPHOLOGIE.....	35
<b>FIGURE 14</b> : PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE.....	36
<b>FIGURE 15</b> : ETAPES D'ANALYSE PAR L'HT IVOS II D'UN ECHANTILLON.....	37
<b>FIGURE 16</b> : MOBILITE TOTALE ET PROGRESSIVE PRESENTEE PAR RACE.....	43
<b>FIGURE 17</b> : POURCENTAGE DES SPERMATOZOÏDES VIVANTS ET NORMAUX PRESENTE PAR RACE.....	44
<b>FIGURE 18</b> : GRAPHE DE CORRELATION ENTRE LA TECHNIQUE STANDARD MICROSCOPIQUE ET L'ANALYSEUR IVOS II POUR L'EVALUATION DE LA MORPHOLOGIE (IBM, SPSS STATISTICS, VERSION 25).....	46
<b>FIGURE 19</b> : GRAPHE DE CORRELATION ENTRE LA TECHNIQUE STANDARD NB ET L'ANALYSEUR HT IVOS II POUR L'EVALUATION DE LA CONCENTRATION SPERMATIQUE (IBM, SPSS STATISTICS, VERSION 25).....	48
<b>FIGURE 20</b> : NOMBRE TOTAL DES SPERMATOZOÏDES PAR DOSE DES 09 LOTS (2 PAILLETES/LOT) CONTROLES AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=9).....	49
<b>FIGURE 21</b> : POURCENTAGE DES SPERMATOZOÏDES MOBILES ET PROGRESSIFS DES NEUF LOTS (2 PAILLETES/LOT) CONTROLES AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=9).....	50
<b>FIGURE 22</b> : POURCENTAGE DES VIVANTS ET DES NORMAUX DES NEUF LOTS (2 PAILLETES/LOT) CONTROLES AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=9).....	50
<b>FIGURE 23</b> : NOMBRE TOTAL DES SPERMATOZOÏDES PAR DOSE DES HUIT LOTS CONTROLES (1 PAILLETTE/LOT) AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=8).....	51
<b>FIGURE 24</b> : POURCENTAGE DES SPZ MOBILES ET PROGRESSIFS DES 08 LOTS (1 PAILLETTE/LOT) CONTROLES AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=8).....	52
<b>FIGURE 25</b> : POURCENTAGE DES VIVANTS ET DES NORMAUX DES 08 LOTS (1 PAILLETTE/LOT) CONTROLES AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=8).....	52
<b>FIGURE 26</b> : POURCENTAGE DES SPZ PAR PAILLETTE DES 09 LOTS CONTROLES APRES SIMULATION DE CORRECTION DE CE PARAMETRE AJUSTE A 32MILLIONS.....	54
<b>FIGURE 27</b> : POURCENTAGE DES SPZ MOBILES ET PROGRESSIFS DES 09 LOTS CONTROLES APRES SIMULATION DE CORRECTION DU NOMBRE DES SPZ PAR DOSE.....	54
<b>FIGURE 28</b> : POURCENTAGE DES VIVANTS ET DES NORMAUX DES 09 LOTS CONTROLES APRES SIMULATION DE CORRECTION DU NOMBRE DES SPZ PAR DOSE.....	55
<b>FIGURE 29</b> : POURCENTAGE DES SPZ PAR PAILLETTE DES 08 LOTS CONTROLES APRES SIMULATION DE CORRECTION DE CE PARAMETRE AJUSTE A 32MILLIONS.....	56
<b>FIGURE 30</b> : POURCENTAGE DES SPZ MOBILES ET PROGRESSIFS DE 08 LOTS CONTROLES APRES SIMULATION DE CORRECTION DU NOMBRE DES SPZ PAR DOSE.....	56
<b>FIGURE 31</b> : POURCENTAGE DES VIVANTS ET DES NORMAUX DES 8 LOTS CONTROLES APRES AJUSTEMENT DU NOMBRE DES SPZ PAR DOSE A 32 MILLIONS.....	56
<b>FIGURE 32</b> : POURCENTAGE DES SPZ MOBILES ET PROGRESSIFS DES QUATRE PAILLETES CONTROLEES APRES EXPOSITION AU RISQUE DE RECHAUFFEMENT AVEC APPLICATION DES NORMES DE QUALITE (N=8).....	57

## LISTE DES ABREVIATIONS

CQ : Contrôle de Qualité

IA : Insémination Artificielle

CPS : Centre de Production de Semence

CNIAAG : Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique

EPIC : Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

CCP : Points Critiques de Contrôle

CMF : Cytométrie en Flux

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SFT: Society for Theriogenology

CS: Circonférence Scrotale

SPZ: Spermatozoïdes

HOS<sub>t</sub>: Hypo-Osmotic Swelling test

CASA: Computer Assisted Semen Analysis

DMR: Distal Mid-piece Reflex

MOT: Motile

PROG: Progressive

VCL: Curvilinear velocity

VAP: Average-path velocity

VSL: Straight-line velocity

ALH: Amplitude of lateral head displacement

BCF: Beat/cross frequency

STR: Straightness

LIN : Linearity

M : Millions

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

μl : Microlitres

ml : Millilitres

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

En Algérie, les pourcentages de réussite à la première insémination artificielle bovine oscillent entre 30 et 44% pour un taux d'échec de 56 à 70% (Bouzebda et *al.*, 2006 ; Moussouni et Bordjihane, 2019), alors que l'objectif de réussite fixé par l'ensemble des auteurs est de 60 % (Mimoune et *al.*, 2017).

Le succès comme l'échec de l'insémination artificielle (IA) dépendent de plusieurs facteurs tenant d'une part à la vache (les pathologies, les conditions zootechniques, l'alimentation, la génétique, ...), et d'autre part au taureau dont principalement la qualité de la semence qui est un facteur déterminant et largement incriminé dans les échecs d'IA bovine (Brito et *al.*, 2002 ; DeJarnette et *al.*, 2004 ; Sellem et *al.*, 2015). Il est donc primordial de disposer de techniques analytiques fiables et précises permettant l'évaluation de la qualité de la semence (Hopper, 2021).

La méthode la plus fiable pour évaluer la fertilité d'un mâle reproducteur est l'estimation du taux de gestation suite à l'IA. Cependant, cette méthode est longue, coûteuse et ne renseigne qu'à posteriori sur la fertilité du mâle. De ce fait, d'autres techniques ont été développées pour tenter d'évaluer la fertilité d'un reproducteur par l'analyse in vitro de sa semence (Vincent et *al.*, 2014 ; Sellem et *al.*, 2015).

Ainsi, pour assurer une fertilité acceptable après IA, les paillettes congelées-décongelées doivent présenter un certain nombre de critères dont une concentration suffisante ainsi qu'un taux de mobilité, de vitalité et de morphologie normale au-dessus des seuils d'acceptation préétablis (Traore, 1996 ; Kabera, 2008 ; Gerard et *al.*, 2008 ; Pousga, 2002 ; Prasad, 2020). C'est pour cela qu'un contrôle de qualité de la semence produite est une mesure impérative à réaliser au niveau des centres de production de semence (Harstine et *al.*, 2018 ; Vincent et *al.*, 2021).

Dans notre pays, beaucoup d'études se sont intéressées aux facteurs de réussite et d'échec de l'IA tenant à la vache (Djeralfia et Fadel, 2010 ; Chihani et Zerdani, 2013 ; Hammadi, 2016 ; Senoussi et Abdellaoui, 2018 ; Moussouni et Bordjihane, 2019 ; Ait Mahfoud et Maamri., 2020 ; Debbous et Rahmani, 2020 ; Hafsi et Labdani, 2020), cependant, très peu sont destinées au facteur qualité de la semence.

En effet, notre recherche bibliographique axée sur les dix dernières années a été très fruste. A la limite de nos connaissances, très peu d'études ont été réalisées dans cet objectif, dont principalement les travaux de Master de Oulebsir en 2015, Gacem en 2016 et Tahri & Djouabi en 2018. L'application des normes de qualité « Au moins 8 millions de spermatozoïdes mobiles progressifs par paillette selon (Traore, 1996) » aux résultats de ces auteurs, montre que sur les 31 lots de semence bovine étudiés « produits par le CNIAAG à partir de 23 taureaux reproducteurs entre 2014 et 2018 », 16 lots (51,61%) sont de qualité douteuse et 15 (48,38%) de mauvaise qualité biologique et non conformes aux normes d'acceptation en IA (Oulebsir ; 2015 ; Gacem, 2016 ; Tahri & Djouabi ; 2018). Cet état des lieux, souligne la nécessité d'explorer la qualité de la semence congelée comme cause probable, parmi d'autres, des taux d'échec rapportés en IA (Bouzebda et *al.*, 2006 ; Moussouni et Bordjihane, 2019).

Ainsi, notre objectif est d'analyser la qualité biologique d'un échantillon de semence bovine congelée produite en Algérie au moyen de plusieurs techniques conventionnelles et non conventionnelle en appliquant plusieurs normes de qualité et seuils d'acceptation en IA.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1- Production de semence bovine

## 1.1. Méthode de récolte du sperme par vagin artificiel

### 1.1.1. La préparation des taureaux dans les centres de collecte.

Avant la récolte, une préparation passive du taureau se fait par une stimulation de sa libido par un conditionnement : la reconnaissance des bruits et des odeurs propres à la salle de monte. Une préparation active se fait ultérieurement par la mise en contact du taureau reproducteur et du bœuf en train « taureaux éliminés de la production pour des raisons génétiques et qui sont gardés en raison de leur robustesse et de leur docilité, les vaches étant interdites dans les centres de production de semence pour des raisons sanitaires et de sécurité ».

Lorsque le taureau présente des signes d'excitation (érection, flehmen...); les taurelliers lui font réaliser en moyenne deux fausses montes qui consistent à le laisser monter sur le bœuf en train sans lui laisser le temps de donner le coup de rein concomitant de l'éjaculation avant d'être récoltés au vagin (Gerard et Khirredine, 2002).

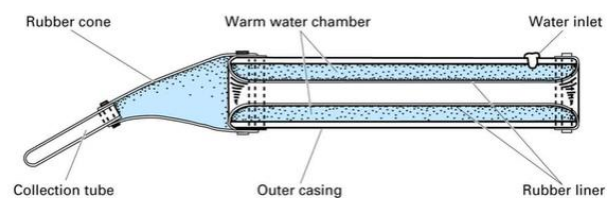
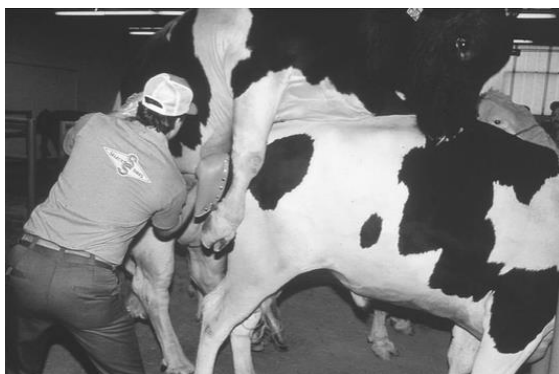


**Figure 1** : Espace de récolte et préparation du taureau (Warner, 2021)

### 1.1.2. Préparation et technique de récolte au vagin artificiel

Le principe du vagin artificiel est de reproduire l'ensemble des sensations présentées par les voies génitales femelles lors du coït (chaleur, pression, lubrification) (Dumont, 1997). L'ensemble du vagin lorsqu'il est prêt à être utilisé est lui-même isolé thermiquement. Après utilisation, il est entièrement démonté pour être lavé, séché et désinfecté. (Gerard et Khirredine, 2002).

Avant chaque utilisation, les vagins sont maintenus dans une étuve à une température de 45°C. L'eau présente dans la paroi du vagin permet de maintenir une certaine pression et une température d'environ 42 °C, lors de la collecte il est sorti de l'étuve au dernier moment. Le taurellier laisse alors le taureau monter sur le bote en train, le préleveur s'accroche au taureau, il dévie son pénis en érection dans le vagin artificiel en le saisissant à travers le fourreau, ce simple contact suffit en général à déclencher le saut et l'éjaculation qui ne durent que quelques secondes. L'opérateur retourne ensuite le vagin artificiel et le sperme s'écoule dans le tube collecteur. (Dumont, 1997 ; Gerard et Khirredine, 2002).



**Figure 2 :** Section longitudinale d'un vagin artificiel et technique de collecte de la semence bovine (Warner, 2021)

## 1.2. Préparation et conservation de la semence :

### 1.2.1. Principe

La semence est le sperme préparé (dilué - conditionné - conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. En effet, un éjaculat contient un nombre de spermatozoïdes supérieur à ce qui est requis pour une insémination.

Selon plusieurs auteurs rapportés par Traore (1996), au moment de l'insémination, une paillette doit contenir au minimum 8-10 millions de spermatozoïdes mobiles après décongélation, selon le même auteur, il a été admis qu'une paillette de semence bovine peut contenir au moins 15 à 20 millions spermatozoïdes avant congélation. Prenant en compte les pertes liées à la congélation et à la décongélation, certains auteurs préconisent la concentration de 30 à 40 millions de spermatozoïdes par dose au conditionnement (Kabera, 2008).

Ainsi, la préparation de la semence a pour objectifs :

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

### **1.2.2. Dilution**

Le milieu de dilution doit être non toxique pour les spermatozoïdes, cryoprotecteur et doit réduire le développement microbien. Ainsi, les substances bactéricides ou bactériostatiques : sulfanilamide (0,3 %), la pénicilline (500 à 1000 UI/ml), la streptomycine (1mg/ml) sont additionnées aux milieux de dilution. Les milieux les plus utilisés sont à base de lait préchauffé, écrémé et dont le pouvoir protecteur est accru avec addition de 10% de jaune d'œuf et d'antibiotique, ou à base de solution de citrate de sodium à 2,9% additionné au jaune d'œuf à 25%.

Dans l'optique de limiter tous les risques possibles de transmission des pathologies entre les espèces, l'utilisation des milieux de dilution synthétiques est de plus en plus courante. Le taux de dilution dépend de la concentration en spermatozoïdes souhaitée dans la dose de semence, du volume et de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat prélevé (Kabera, 2008).

### **1.2.3. Refroidissement et équilibration de la semence**

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à +4 °C, le métabolisme des spermatozoïdes est ainsi réduit.

Le refroidissement peut se faire pendant ou après la dilution. La vitesse de refroidissement doit être assez 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 +4 °C est obtenue après un refroidissement progressif en 30 minutes à une heure maximum, dans une vitrine réfrigérée.

Pour permettre aux spermatozoïdes de perdre une partie de l'eau de façon à réduire la cristallisation intra cellulaire, il faut laisser équilibrer de 3 à 5 heures, avant le

conditionnement et la congélation de la semence. Cette période dite « d'équilibration » est considérée comme le temps nécessaire aux spermatozoïdes pour s'adapter au milieu qui leur est imposé (contact avec le glycérol du dilueur).

#### **1.2.4. Conditionnement de la semence**

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, l'autre côté est soudé automatiquement après le remplissage de la paillette par une machine de remplissage et de soudage (Kabera, 2008).

Les paillettes doivent être pré-identifiées avant leur remplissage et doivent porter 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.)

#### **1.2.5. Cryoconservation**

La conservation est en fonction du mode d'utilisation de la semence. Ainsi, pour une utilisation directe, la semence est maintenue dans un bain-marie à la température de 36 à 38 °C, pour une utilisation de la semence dans 24 à 48 h, la semence peut se conserver au frais, les dilueurs utilisés permettent la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes à + 4 °C pendant 48 à 72 h.

Pour une utilisation à long terme, après le conditionnement, la conservation de la semence se fait dans une bonbonne contenant de l'azote liquide à -196 °C, la congélation doit être progressive et peut se faire à l'aide de machines spécialisées ou de façon manuelle. Les paillettes sont d'abord congelées à - 140 °C au-dessus d'une vapeur d'azote liquide pendant 9 minutes, puis plongées dans l'azote liquide.

Après quelques jours, un test de congélabilité de la semence est réalisé avant sa conservation, et est représenté par l'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes après décongélation et de l'examen de la motilité individuelle. Si la semence présente une bonne congélabilité, elle est retenue.

### **1.2.6. Décongélation**

La décongélation doit prendre en compte trois paramètres : la température, le temps et la solution de décongélation.

En pratique, la température du bain marie utilisée est de 35 à 40 °C, la durée de décongélation est de l'ordre de 30 secondes à 2 minutes. Des lavages peuvent être envisager afin d'extraire le glycérol du milieu et de revenir à des conditions isotoniques pour éviter une altération des membranes des spermatozoïdes et le développement d'anomalies des flagelles (Hopkins *et al.*, 1988).

### **1.2.7. Mise en quarantaine**

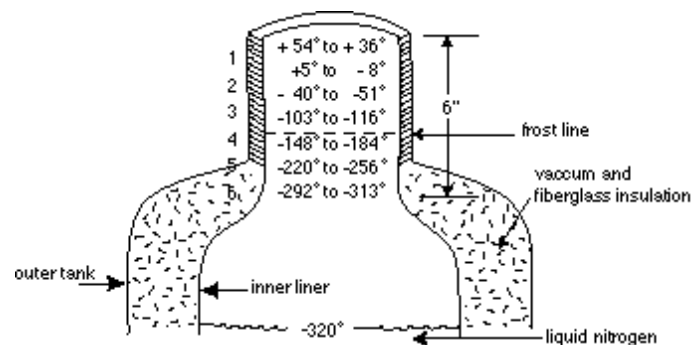
Après vérification de la qualité de la semence lors de la décongélation de deux paillettes représentatives du lot, ce dernier va être mis en quarantaine pendant 30 jours. En effet la semence congelée produite doit être conservée dans des bombonnes spécifiques au moins 30j avant le jour de son expédition (Prasad, 2020), ce qui correspond au temps nécessaire pour s'assurer de la non déclaration de toute maladie reconnue à transmission sexuelle chez le taureau à l'origine de cette semence. Après vérification de la mobilité post dégel, si elle est acceptable, la semence est conservée 7 jours supplémentaires puis elle est transférée dans les conteneurs ou tank de stockage définitif (Prasad, 2020).

### **1.2.8. Stockage**

Dans la plupart du temps la semence bovine est toujours conditionnée dans des paillettes de 0,25 ml. La paillette est placée dans un gobelet avec quatre autres paillettes du même taureau. Deux gobelets sont mis dans un canister en métal qui porte le numéro de code du taureau imprimé sur le dessus, les canisters sont ensuite stockées dans une bombonne. Le stockage et la manipulation de paillettes de 0.25ml et de 0,5ml sont similaires. Le maintien des basses températures est la clé du succès du stockage de la semence congelé. Ainsi un contrôle de niveau et un appoint d'azote doit se faire régulièrement dans les containers de stockage de semence (Swanand, 2021 ; Vincent, 2021).

### 1.2.9. Transport et distribution

La semence doit être bien conservée en dessous des températures critiques où la recristallisation de la glace commence à se former entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les températures fluctuent dangereusement du tiers inférieur au tiers supérieur du cou du réservoir (Saacke and *al.*, 1997). De plus, les paillettes stockées peuvent être exposées à des températures élevées défavorables lorsqu'elles sont retirées du réservoir pour la décongélation, lors de leur transfert d'un réservoir à un autre ou lors de leur manipulation dans le col pour la localisation et de décongélation d'une paillette spécifique. La durée nécessaire pour atteindre la température critique de recristallisation de la glace ( $-80$  à  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) est d'environ 10 à 20 secondes. Les lésions thermiques des spermatozoïdes sont permanentes et ne peuvent pas être corrigées en remettant les paillettes dans l'azote liquide. Ainsi, pour assurer le maintien de la viabilité des spermatozoïdes, les paillettes doivent être élevés dans le col du réservoir et maintenues sous la ligne de gel seulement pendant cinq à huit secondes (Swanand, 2021).



**Figure 3 : Fluctuations de température dans le cou d'une bombonne de stockage de semence (Saacke et al., 1997)**

**Tableau 1 : Fluctuations de température dans le cou d'une bombonne typique de stockage de semence en azote liquide.**

Localisation dans le cou du tank de stockage	Température (°C)
Haut du cou	2.2 to 12.2
2.54 cm du haut	-15 to -22.2
5.08 cm du haut	-40 to -46
7.62 cm du haut	-75 to -82
10.16 cm du haut	-100 to -120
12.7 cm du haut	-140 to -160
15.24 cm du haut	-180 to -192

Adapté par (Kasimanickam, 2021) d'après (Saacke et *al.*, 1997).

## 2. Gestion de qualité en production de semence bovine congelée

### 2.1. Techniques d'analyses de la qualité du sperme récolté

#### 2.1.1. Examen microscopique

L'examen microscopique du sperme regroupe l'évaluation de différents paramètres. La motilité et la morphologie des spermatozoïdes, en particulier, font partie des indicateurs les plus importants pour prédire la fertilité d'un taureau (Utt et *al.*, 2016).

##### 2.1.1.1. La concentration

Elle est évaluée par comptage direct des spermatozoïdes à l'aide d'une cellule hématimétrique ou par mesure au spectrophotomètre. En monte naturelle, une concentration minimale de 300000 spermatozoïdes/mL est nécessaire pour considérer le taureau comme fertile (Pietremont, 1995).

##### 2.1.1.2. La motilité massale

La motilité massale est l'examen qualitatif le plus rapide et le plus informatif (Manciaux, Chambon, 2011). Il s'agit d'une observation au microscope à faible grossissement (x10) (Dumont, 1997) d'une goutte de sperme frais déposée sur une lame maintenue à une température de 37 °C. Elle évalue le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes (Bordas, 1988). L'échelle de notation varie de 0 à 5 en fonction des mouvements, l'objectif étant d'obtenir une note supérieure ou égale à 3 (tableau 2) (Kastelic et Thundathil, 2008).

**Tableau 2:** Grille de notation de la motilité massale (Manciaux et Chambon, 2011)

Note	Caractérisation des mouvements
0	Absence totale de mouvements
1	Mouvements légers
2	Mouvements nets sans vague
3	Début de vagues
4	Vagues très nettes
5	Tourbillons

##### 2.1.1.3. La motilité individuelle ou progressive

Pour évaluer la motilité individuelle, le sperme est dilué entre 10 et 40 fois dans une solution de dilution. Contrairement à la motilité massale, l'observation microscopique doit se faire

avec un grossissement d'au moins (x40). La motilité progressive correspond aux spermatozoïdes doués d'une motilité propre et traçante c'est-à-dire ayant une trajectoire rectiligne et un déplacement rapide (Dumont, 1997). L'objectif pour un sperme fertile est une motilité progressive d'au moins 30% (Tableau 3) (Kastelic et Thundathil, 2008).

#### **2.1.1.4. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants (vitalité)**

L'évaluation de ce paramètre peut se faire par deux méthodes :

##### 2.1.1.4.1. Coloration éosine/négrosine

Les spermatozoïdes morts perdent leur intégrité membranaire et de ce fait fixent le colorant dans leur cytoplasme (se colorent en rouge). Ceci permet de les différencier et de pouvoir les compter (Dumont, 1997). L'objectif est d'avoir moins de 25% de spermatozoïdes morts dans l'échantillon de sperme analysé (Manciaux et Chambon, 2011).

##### 2.1.1.4.2. Test hypotonique :

Ce test permet de vérifier l'intégrité de la membrane plasmique. En effet la membrane plasmique intervient dans la capacitation, la réaction acrosomique et l'attachement des gamètes qui sont des phénomènes indispensables à la fécondation (Jeyendran et *al.*, 1984).

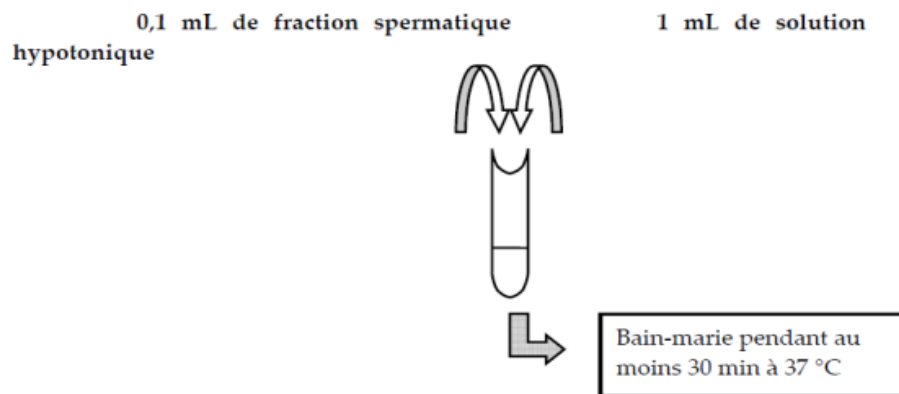
La semence est mélangée à une solution hypotonique de 50 et 150 mOsm/L puisque les spermatozoïdes réagissent à cette osmolarité, puis le mélange est incubé au bain-marie à 37°C. Des aliquotes de chaque solution (1ml) sont préparés.

La procédure utilisée pour le test HOS est similaire à celle décrite par Jeyendran et ses collaborateurs. Le dosage a été réalisé en ajoutant et en mélangeant 0.1ml de l'échantillon contenant les spermatozoïdes avec 1ml de chacune des différentes osmolalités des solutions hypo-osmotiques. Les solutions (mélange de sperme) ont été incubées à 37°C pendant 1 h.

Les spermatozoïdes sont ensuite observés au microscope optique à contraste de phase au grossissement x 40 en plaçant une goutte d'échantillon bien mélangé entre lame et lamelle pour évaluer le nombre des spermatozoïdes ayant répondu positivement par un gonflement. Un total de 200 spermatozoïdes doit être compté dans au moins 5 différents champs de vision. La proportion totale et les différents modèles de gonflement de spermatozoïdes sont calculés en divisant le nombre de cellules ayant réagi (x 100) par le total des spermatozoïdes

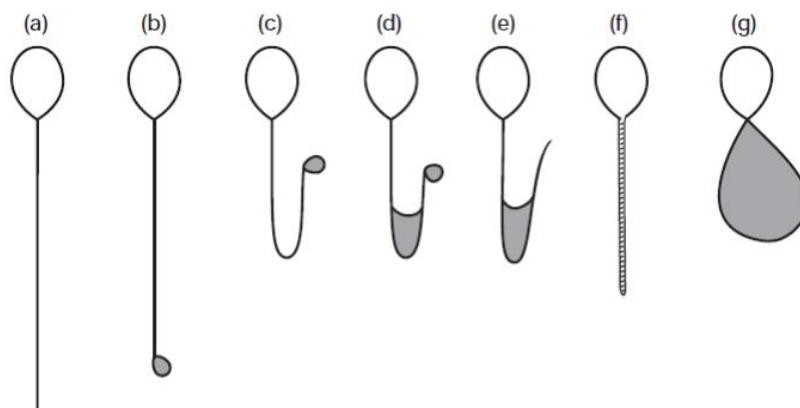


comptés dans la même zone. La proportion de spermatozoïdes gonflés est exprimée en pourcentage (Correa et Zavos, 1994).



**Figure 4 :** Réalisation du mélange pour le test hypotonique

Les spermatozoïdes dont la membrane cytoplasmique est intègre, se déforment (figure 07). Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g ». Les catégories les plus aisés à reconnaître sont les catégories b, e et g. (Guide OMS 2010)

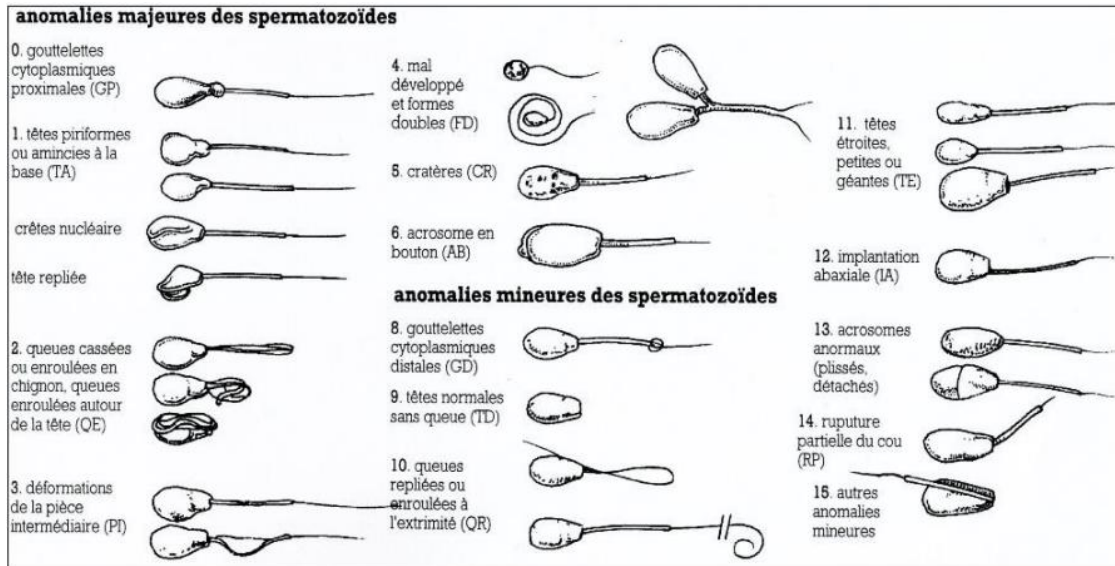


**Figure 5 :** Représentation schématique des différentes modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique. (Guide OMS 2010)

#### 2.1.1.5. La morphologie des spermatozoïdes

La morphologie est évaluée par observation microscopique à l'immersion d'un sperme préalablement coloré. Elle doit être réalisée sur au moins 100 spermatozoïdes voire plus de

300 si plusieurs malformations sont identifiées (Kastelic et Thundathil, 2008). Les malformations morphologiques des spermatozoïdes sont classées par site (tête, queue, pièce intermédiaire, acrosome), par origine (primaire : testicules, secondaires : épидидyme, tertiaire : glandes accessoires ou post éjaculation) et aussi selon leur impact sur la fertilité du taureau (Parkinson, 2004).



**Figure 6 :** Anomalies morphologiques de spermatozoïdes de taureau, classification de Blom (1973) simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (1997).

## 2.1.2. Analyse spermatique assistée par ordinateur et Cytométrie en flux

### 2.1.2.1. Le système CASA (Computer Assisted Semen Analysis) :

Les importantes variations liées à l'évaluation subjective de la mobilité des spermatozoïdes au microscope ont incité les chercheurs à développer des systèmes d'évaluation objectifs et standardisés, les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou systèmes CASA. Le système CASA est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes motiles et leur mouvement. Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chacun des spermatozoïdes séparément dans le temps et l'espace. Cette méthode a donc l'avantage d'estimer plus précisément la mobilité d'un grand nombre de spermatozoïdes en un minimum de temps, et cela de façon assez simple, selon un paramétrage spécifique. De plus, elle peut être utilisée sur de la semence fraîche mais également sur semence réfrigérée ou encore congelée/décongelée (Allimant, 2010). Le système Hamilton-Thorn est un

analyseur d'image comprenant un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes et l'utilisation facultative d'une illumination fluorescente et d'un fluorochrome de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu.

#### **2.1.2.2. Cytométrie en flux :**

L'application de la cytométrie en flux minimise, en partie, plusieurs difficultés d'analyse rencontrées. La cytométrie en flux est une approche automatisée capable de mesurer la quantité d'un ou de plusieurs marqueurs fluorescents associés avec la cellule de manière non biaisée. Cet appareil offre une précision, une sensibilité et une rapidité incomparable, il permet également l'analyse multiparamétrique sur un nombre de cellules statistiquement approprié (Cordelli et *al.*, 2005). De plus, la découverte d'une variété de fluorochromes et de composants conjugués à une sonde fluorescente rend possible une grande gamme d'analyses pour l'évaluation de la semence à des niveaux biochimiques, ultra structuraux et fonctionnels (Gillan et *al.*, 2005).

#### **2.2. Contrôle de qualité et seuils d'acceptation en IA :**

Le contrôle de la qualité biologique d'une semence consiste en l'ensemble des procédures, analyses et normes utilisées tout au long de la chaîne de production de semence (paillettes congelées) dans le but de produire et de distribuer une semence de qualité, utilisée dans le programme d'IA et qui sera conforme aux normes régies pour cette dernière. Pour cela, il est important que les taureaux utilisés dans le programme d'IA répondent aux normes de qualité, ils doivent tout d'abord être indemnes de toute maladie réputée contagieuse par voie sexuelle, que leur semence soit récoltée et traitée conformément aux protocoles standards (Anonyme, 2012).

##### **2.2.1. La semence fraîche (éjaculat)**

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

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

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

Afin de garantir une semence de bonne qualité, un contrôle doit être effectué avant et après congélation des paillettes. Le procédé initial utilisé dans la plupart des centres de production de semences consiste à estimer la concentration de la semence en spermatozoïdes par un hémocytomètre ou par un spectrophotomètre, mais aussi à estimer la viabilité des spermatozoïdes par la méthode classique de la coloration éosine/nigrosine. Cependant, des méthodes plus élaborées, telles que la cytométrie en flux, sont actuellement utilisées et permettent d'analyser un nombre plus important de paramètres liés à la concentration ainsi qu'à la viabilité des spermatozoïdes (Fernández-Gago et *al.*, 2013).

## **2.2.2. Semence congelée-décongelée**

### **2.2.2.1. Concentration**

Le nombre de spermatozoïdes par paillette est variable, avec quelques réductions du nombre commun aux taureaux d'élite à forte demande et des nombres sensiblement inférieurs pour le sperme trié par sexe.

Certains auteurs préconisent une norme de concentration des spermatozoïdes de 25 millions de spermatozoïdes par paillette pour des paillettes de 0,25 ml. La concentration minimale en spermatozoïdes des paillettes, au conditionnement, étant de 15 à 20 millions, cette concentration est satisfaisante. Elle donne une marge suffisante permettant d'espérer une survie de plus de 10 millions de spermatozoïdes par paillette, au moment de l'insémination. (Kabera, 2008). Alors que d'autre estime que la concentration en spermatozoïdes d'une paillette de 0.25ml est de 20 millions de spermatozoïdes/paillettes. (Prasad, 2020).

#### **2.2.2.2. Mobilité**

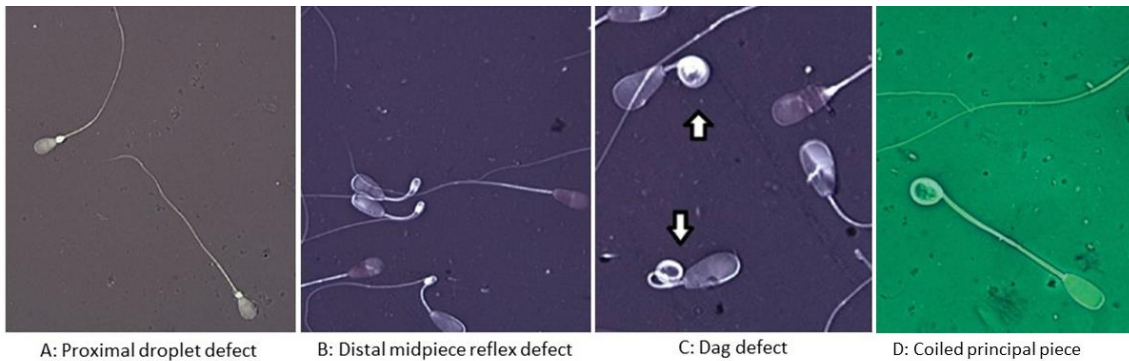
Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et leur motilité est déterminé par microscopie optique. Certains laboratoires équipés de CASA (Computer Assisted Semen Analyser) mesurent les paramètres de déplacement et de vitesse des spermatozoïdes. Les critères de qualité varient d'un centre de collecte à un autre, mais les acteurs de la filière ont validé des recommandations communes (« guide qualité » de l'UNCEIA, 1994). Après évaluation, la semence est diluée dans un milieu salin contenant du glycérol (cryoprotecteur), avec ou sans jaune d'œuf. L'ajout d'anti-oxydant (Oxyfree, ND) augmente in vitro les paramètres de vélocité des spermatozoïdes et pour certains taureaux améliorent la fertilité in vivo (Gérard et *al.*, 2006 ; Grigal et *al.*, 2008). Malgré des variations selon le taureau et la race, l'objectif est d'obtenir au moins 6 millions (est équivalent à pas moins de 30%) de spermatozoïdes mobiles après décongélation (Gerard et *al.*, 2008). Selon plusieurs autres auteurs rapportés par TRAORE en 1996, à l'insémination, une paillette doit contenir au minimum 8-10 millions de spermatozoïdes mobiles après décongélation ce qui correspond à au moins 40% de spermatozoïdes mobiles (fléchants) par paillette après décongélation.

#### **2.2.2.3. Vitalité**

Les normes de vitalité varient de 40 à 50 % de spermatozoïdes vivants dans les paillettes d'insémination après décongélation ; (Prasad, 2020) estime qu'une paillette doit contenir plus de 40% de spermatozoïdes vivants ayant réagi positivement au test de HOST après décongélation ce qui équivaut à 8 millions de spermatozoïdes vivants par paillette. Alors que (Pousga, 2002) affirme que les paillettes doivent contenir au moins 10 millions (50%) de spermatozoïdes normaux et vivants après décongélation.

#### **2.2.2.4. Morphologie :**

Le seuil maximal d'acceptation de malformation des spermatozoïdes après décongélation et de moins de 20 % (4 millions spz) de spermatozoïdes anormaux par paillette (Prasad, 2020). D'autres auteurs tolèrent jusqu'à 30% (6 millions spz) de spermatozoïdes anormaux mais sans que les anomalies majeures ne dépassent les 20% (Dumond, 1997 ; Palmer, 2021). Les anomalies les plus retrouvées chez les spermatozoïdes bovins sont généralement les gouttelettes proximales et distales les DMR et les enroulements de la pièce principale.



**Figure 7 : Micrographie des certaines anomalies de malformation majeurs des spermatozoïdes bovins (Palmer, 2021)**

### **Résumé des normes de qualité dans la littérature**

La synthèse de tous les seuils d'acceptation en IA rapportés dans la littérature nous permet de les organiser à différents niveaux de restriction en trois normes de qualité.

#### **Norme 01**

La norme générale qui semble actuellement faire le consensus entre les auteurs ou laboratoires d'analyse impliqués dans le CQ de la semence bovine est comme suit :

**Pour qu'une paillette soit acceptée en IA, elle doit contenir après décongélation au moins :**

- « 8 millions de spermatozoïdes mobiles (progressifs) »
- « 10 millions de spermatozoïdes vivants »
- « 16 millions de spermatozoïdes normaux »

#### **Norme 02**

La norme 01 pourrait être allégée en exigeant que les spermatozoïdes aient une mobilité totale et non pas progressive (spz fléchant) et en élevant le seuil des anormaux jusqu'à 30% au lieu de 20%. Elle se présente alors comme suit :

**Pour qu'une paillette soit acceptée en IA, elle doit contenir après décongélation au moins :**

- « 8 millions de spermatozoïdes mobiles »
- « 10 millions de spermatozoïdes vivants »
- « 14 millions de spermatozoïdes normaux »

#### **Norme 03**

Une autre norme beaucoup moins stricte est rapportée par certains auteurs (Gerard et al ; 2008). Elle se présente comme suit :

**Pour qu'une paillette soit acceptée en IA, elle doit contenir après décongélation au moins :**

- « 06 millions de spermatozoïdes mobiles »
- « 08 millions de spermatozoïdes vivants »
- « 14 millions de spermatozoïdes normaux »

### **2.2.2.5. Autres paramètres établis par cytométrie :**

La cytométrie en flux (CMF) est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative, de particules en suspension dans un liquide. Un appareil fait défiler des particules, molécules ou cellules, à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Elle permet de mettre en évidence plusieurs paramètres cellulaires dont la viabilité qui consiste à déterminer l'intégrité de la membrane cytoplasmique d'un spermatozoïde, elle est évaluée par la coloration avec l'iodure de propidium (PI) par une sonde fluorescente qui se lie à l'ADN ainsi que la concentration, mais aussi l'évaluation de l'intégrité de l'acrosome grâce à l'utilisation des lectines végétales liées à la fluorescéine isothiocyanate (FITC), ces lectines se lient de façon spécifique à des composés glycosylés de la membrane acrosomiale externe. Ou alors l'analyse de la fonction mitochondriale qui se fait par l'utilisation d'un colorant JC-1 (Mitochondrial Membrane Potential Probe), qui émet une fluorescence verte, ce colorant est utilisé pour séparer les spermatozoïdes possédant des mitochondries non fonctionnelles des spermatozoïdes possédant des mitochondries fortement fonctionnelles.

## **2.4. Assurance qualité et système HACCP**

Dans les centres de production de semence, la surveillance de la qualité de la semence est fréquente et généralement efficace, mais le contrôle de la qualité des procédures hygiéniques menées pendant la collecte et le traitement de la semence est généralement défaillant. De nombreuses sources potentielles de variabilité pouvant affecter la qualité finale des doses de semence (Alvarez et *al.*, 2005), le contrôle qualité des programmes capables de traiter un plus large éventail de facteurs de risque sont toujours nécessaires pour les taureaux en centre de production de semence (CPS). Un contrôle efficace de la qualité peut être réalisé grâce à des systèmes d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP), afin d'identifier, d'évaluer et de contrôler les dangers importants, en se concentrant sur la prévention plutôt que sur des mesures d'inspection ou des mesures correctives (Goularte et *al.*, 2015).

### **2.4.1. Points de contrôle critiques**

Bien que toutes les étapes du processus de traitement du sperme soient des points de contrôle, les étapes qui ne peuvent pas être contrôlées par la suite à des étapes ultérieures du processus sont considérées comme des points de contrôle critiques et leur danger doit

être maîtrisé en permanence pour être réduit, prévenu ou éliminé jusqu'à un niveau acceptable (Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire, 1997).

Le système HACCP a classé les dangers identifiés comme suit : microbiologique ; chimique ; et physique.

- Les dangers microbiologiques comprenant les éléments suivants : bactéries, virus et protozoaires (Givens et Marley, 2008).
- Les risques chimiques comprenant les composants utilisés dans la préparation des dilueurs et les résidus des désinfectants utilisés lors de la préparation des taureaux et lors du nettoyage des ustensiles.
- Les risques physiques incluant la présence de saleté dans les échantillons, les différences de température entre les échantillons de sperme et le dilueur (choc dû au froid), les erreurs de mesure des volumes de dilueur et la présence de résidus d'eau dans l'équipement et les ustensiles utilisés pour la collecte du sperme.

#### **2.4.2. Évaluation des risques et de la gravité des dangers**

La sévérité des risques physiques consiste à surveiller les variations de la période de conditionnement, de la température pendant la cryoconservation de la semence et la présence de débris dans les éjaculats, ce qui entraînerait une élimination de l'échantillon.

En supposant qu'il soit impossible d'assurer que la production de doses de semence congelée ne puisse se faire sans aucune contamination, la gravité des risques microbiologiques considère que les numérations microbiologiques dans la semence traitée doivent être inférieures à 5000 UFC/ml (OIE, 2001).

La gravité des risques chimiques tient compte de leur toxicité spermatique et de la composition du dilueur, qui joue un rôle clé dans le succès de la cryoconservation du sperme (Holt, 2000 ; Watson, 2000). Dans un centre de production de semence, les tampons ajoutés aux dilueurs ont été stérilisés par filtration (0,22µm) et ont été préparés avec de l'eau stérile autoclavée à 121°C pendant 30 min. Chaque fois qu'une source de protéines animales (telle que le lait ou le jaune d'œuf) est incluse dans le dilueur, elle doit provenir de sources fiables, être exempte d'agents pathogènes ou être stérilisée. Les dilueurs ne doivent pas être stockés plus de 72 h à des températures égales ou > 5 °C, bien que des périodes de stockage plus longues puissent être autorisées, les dilueurs doivent être stockés à -20°C (OIE, 2014).



### 3. Point de situation sur la qualité de la semence bovine produite en Algérie :

En Algérie, la semence bovine est produite au niveau du centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique (CNIAAG) situé à Baba Ali (Alger), constituant ainsi une banque nationale de semence congelée. Il s'agit d'un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) relevant du ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, créée par décret Présidentiel n° 88-04 du 05 janvier 1988, dans le cadre de la politique nationale du développement de la production animale. Ce centre est chargé de la promotion de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique.

#### 3.1 Etudes bibliométrique :

En compulsant la littérature universitaire en Algérie, notamment les mémoires de Master effectués durant les dix dernières années, nous n'avons trouvé que très peu dont essentiellement trois (03) mémoires, réalisés sur le contrôle de qualité de la semence bovine produite par le CNIAAG et ce à la limite de notre connaissance.

La première étude a porté sur 44 paillettes issues de 4 taureaux (Oulebsir, 2015), la deuxième sur 5 taureaux (Gacem, 2016) et la troisième sur 14 taureaux (Tahri et Djouabi, 2018) appartenant au CNIAAG. Les résultats de ces études sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 3: Résultats de l'étude n° 01 (Oulebsir, 2015)**

Nom du taureau	Race	Viabilité % (Post dégel)
Happy Isi	NOR	31.79
Humar	NOR	32.7
Morly	Kleckvieh	27.39
Waldy	Kleckvieh	24.74

**Tableau 4 : Résultats de l'étude n° 02 (Gacem, 2016)**

Nom du taureau	Race	CQ1 (Etat frais)	Viabilité % (Etat réfrigéré)	Viabilité % (Post dégel)
JETSTREAM	Mont	65/40	53.84	27.68
JEFFREY	HO.PR	70/40	72.45	21.52
JOPIK	HO.PR	70/40	55.42	28.49
JOJOBA	Mont	70/40	54.12	20.67
WINZER	Kleckvieh	70/40	51.92	21.45

Les auteurs des études n° 01 et n° 02 n'ont pas exploité les pourcentages de spermatozoïdes mobiles (MOT% et PROG%) calculés automatiquement par le système SCA et se sont limités aux paramètres cinétiques générés dans le fichier des données. Cela semble être dû au fait que, dans la version SCA utilisée par les auteurs, le fichier des résultats brutes généré « sous forme Excel » ne contient paradoxalement pas ces pourcentages (MOT% et PROG%) qu'il faudra aller chercher dans une autre entrée du système, ce qui représente à notre sens une limitation technique du SCA. Les auteurs, ont même essayé de calculer les pourcentages des spermatozoïdes motiles « MOT » et progressifs « PROG » à partir des données cinétiques individuelles présentées par spermatozoïdes.

A défaut des pourcentages de spermatozoïdes motiles « MOT » et progressifs « PROG », les auteurs ont exploité le pourcentage des spermatozoïdes vivants (vitalité), mais sans appliquer aux résultats obtenus les seuils (normes) d'acceptation ou de rejet. Cependant, et même en considérant, de façon exagérée, tous les spermatozoïdes vivants comme étant mobiles (Ce qui n'est jamais le cas), la qualité de la semence produite et contrôlée dans ces études demeure en dessous des normes d'acceptation en IA.

**Tableau 5 : Résultats de l'étude n° 03 (Tahri et Djouabi, 2018)**

Nom Du taureau	Date de récolte	Mobilité % (CASA : SCA).		Viabilité % (% des vivants)	
		MOT%	PROG%	(E/N)	CMF
RAMY	30/01/2018	23.04	6.37	19.5	8.05
JEZINA	08/02/2018	18.69	//	20.5	34.49
CHARLY	19/04/2017	36.25	7.59	12.5	8.48
REDY	03/12/2017	13.84	6.89	16.5	16.7
STRONG	17/01/2018	11.26	6.56	9	11.82
SYMBA	15/09/2017	16.8	4.44	23.5	11.62
SERVUS	03/12/2017	25.43	5.15	27	14.13
JEFRY	29/11/2017	15.57	13.94	12	28.28
IOTA	26/03/2018	16.89	3.12	16.5	41.85
MARBOUH	29/11/2017	20.1	12.07	29.5	38.41
MABROUK	27/03/2017	13.92	1.1	8	11.4
ISYJET	21/02/2017	37.67	12.77	31.5	16.62
GOTENGEN	28/11/2017	13.84	8.48	35	6.68
HEALTOP	28/11/2017	14.61	5.4	8	10.86

Dans l'étude n° 03, l'évaluation de la concentration peut être critiquable. En effet, l'analyse de cette dernière a été établie par le système SCA (Microoptics, Spain) sans aucune mention du type de chambre d'analyse utilisée ni du paramétrage technique (setting) du système. Les valeurs de concentration présentées sont visiblement erronées, pouvant être influencées par plusieurs facteurs de manipulation et de dilution de la semence ainsi que de paramétrage technique du système SCA « notamment les paramètres de détection cellulaire qui méritent une bonne optimisation espèce-dépendante ». Les valeurs de concentration données par le cytomètre, bien que faibles par rapport à l'objectif, semblent s'inscrire dans un ordre plus logique que celles du SCA pour des paillettes bovines. Cependant, les auteurs rapportent qu'ils ont utilisé des kits de fluorochromes (Easykit 1) ayant largement dépassé la durée de validité, ce qui aurait pu compromettre les résultats. Une évaluation de la concentration par la technique standard de référence (numération par cellule de comptage) aurait été préférable dans ce cas-là.

Par ailleurs, les auteurs de cette étude semblent confondre entre la concentration (cellules/ml) et le nombre total de spermatozoïdes par paillette. En effet, même en prenant en considération les valeurs de concentrations « fortement surestimées » du système SCA ou même celles du cytomètre utilisé avec des kits périmés, il est nécessaire de les multiplier par le volume utile d'une paillette fine qui est réellement de 0.21ml (volume théorique : 0.25ml) pour pouvoir obtenir le nombre de spermatozoïdes par paillette (dose). C'est ce dernier paramètre qui est utilisé comme critère de qualité, et doit être d'au moins 20 millions comme seuil d'acceptation en IA (*le CNIAAG semble avoir fixé 18 millions/dose comme objectif selon Gacem en 2016*).

### **3.2 Application des seuils d'acceptation en IA :**

Pour les deux premières études (Oulebsir, 2015 ; Gacem, 2016), étant donné que les pourcentages de motiles et de progressifs ne sont pas disponibles, il sera appliqué le seuil d'acceptation par rapport à la vitalité qui varie entre 08 et 10 millions spz vivants par paillette (norme 01 et 02). Ainsi, les valeurs moyennes de vitalité par taureau oscillant entre 3.72 et 5.89%, (Voir tableaux 5-6) sont toutes en dessous du seuil d'acceptation même en appliquant la norme la moins restrictive (norme 02).

**Tableau 6: Résultats de l'étude n° 01 (Oulebsir, 2015) avec application des seuils**

Nom du taureau	Race	Viabilité % (Post dégel)	Nb spz vivants par dose (x10 <sup>6</sup> /paillette)	Norme 01 d'acceptation en IA	Norme 02 d'acceptation en IA
Happy Isi	NOR	31.79	<b>5.72</b>	<b>+10 millions spz vivants par paillette.</b>	<b>+08 millions spz progressifs par paillette.</b>
Humar	NOR	32.7	<b>5.89</b>		
Morly	Kleckvieh	27.39	<b>4.93</b>		
Waldy	Kleckvieh	24.74	<b>4.45</b>		

**Tableau 7: Résultats de l'étude n° 02 avec application des seuils (Gacem, 2016).**

Nom du taureau	Race	CQ1 (Etat frais)	Viabilité % (Etat réfrigéré)	Viabilité % (Post dégel)	Nb spz vivants par dose (x10 <sup>6</sup> /paillette)	Norme d'acceptation en IA
JETSTREAM	Mont	65/40	53.84	27.68	<b>4.98</b>	<b>8-10 millions spz vivants par paillette.</b>
JEFFREY	HO.PR	70/40	72.45	21.52	<b>3.87</b>	
JOPIK	HO.PR	70/40	55.42	28.49	<b>5.13</b>	
JOJOBA	Mont	70/40	54.12	20.67	<b>3.72</b>	
WINZER	Kleckvieh	70/40	51.92	21.45	<b>3.86</b>	

Concernant la troisième étude (Tahri et Djouabi, 2018), vu que les pourcentages de motiles et de progressifs sont disponibles, les normes relatives peuvent être appliquées. Selon la norme 01 « +8M spz prog/dose », aucune paillette des 14 de l'étude n'atteint le seuil d'acceptation, par contre si on applique la norme la moins restrictive (norme 03 : « +6M spz mob/dose »), deux paillettes seulement sur 14 dépassent légèrement le seuil exigé avec des valeurs de 6.60 et 6.78 millions spz mobiles par paillette pour les taureaux CHARLY et ISIJET respectivement.

**Tableau 8: Résultats de l'étude n° 03 (Tahri et Djouabi, 2018) avec application des seuils**

Nom du taureau	Date de récolte	Mobilité % (CASA : SCA).		Viabilité % (% des vivants)		Nb des spz par dose (Millions par paillette)		Norme d'acceptation en IA
		MOT%	PROG%	(E/N)	CMF	Mobiles	Progressifs	
RAMY	30/01/2018	23.04	6.37	19.5	8.05	4.15	<b>1.15</b>	<b>+08 millions spz progressifs par paillette.</b>
JEZINA	08/02/2018	18.69	//	20.5	34.49	3.36	//	
CHARLY	19/04/2017	36.25	7.59	12.5	8.48	<b>6.60</b>	<b>1.37</b>	
REDY	03/12/2017	13.84	6.89	16.5	16.7	2.49	<b>1.24</b>	
STRONG	17/01/2018	11.26	6.56	9	11.82	2.03	<b>1.18</b>	
SYMBA	15/09/2017	16.8	4.44	23.5	11.62	3.02	<b>0.80</b>	
SERVUS	03/12/2017	25.43	5.15	27	14.13	4.58	<b>0.92</b>	
JEFREY	29/11/2017	15.57	13.94	12	28.28	2.80	<b>2.51</b>	
IOTA	26/03/2018	16.89	3.12	16.5	41.85	3.04	<b>0.56</b>	
MARBOUH	29/11/2017	20.1	12.07	29.5	38.41	3.62	<b>2.17</b>	
MABROUK	27/03/2017	13.92	1.1	8	11.4	2.51	<b>0.20</b>	

ISYJET	21/02/2017	37.67	12.77	31.5	16.62	<b>6.78</b>	<b>2.30</b>	
GOTENGEN	28/11/2017	13.84	8.48	35	6.68	2.49	<b>1.53</b>	
HEALTOP	28/11/2017	14.61	5.4	8	10.86	2.63	<b>0.97</b>	

**En résumé :**

En appliquant les normes de qualité aux résultats des trois études, nous concluons que :

**Sur les 31 lots de semence étudiés :**

« Produits par le CNIAAG en des dates différentes entre 2014 et 2018 à partir de 23 taureaux »

- **Quinze (15) représentant 48,38% des lots contrôlés sont de mauvaise qualité biologique** « non conformes aux normes d'acceptation en IA »
- **Seize (16) représentant 51,62% des lots contrôlés sont de qualité douteuse** « nécessitant la décongélation d'autres paillettes des mêmes lots »

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

# **MATERIELS ET METHODES**

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Lieu et période de l'étude :

Cette étude a été réalisée au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des carnivores de l'université de Blida1 durant la période allant du 20/09/2021 au 10/ 06/2022.



**Figure 8** : Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores/ Univ. Blida 1.

### 1.2. Matériels

#### 1.2.1. Matériel biologique « Paillettes bovines » :

Cette étude a été réalisée à partir de 30 paillettes de semence bovine congelée (Tableau 2). Elles se scindent en deux groupes d'étude à savoir un groupe de 26 paillettes destinées au CQ de production et 4 au CQ de stockage. Les 26 paillettes du premier groupe se répartissent en 9 paires de paillettes représentant chacune un lot produit (2 paillettes par lot pour un total de 9 lots) et 8 paillettes individuelles représentant chacune un lot produit (1 paillette par lot pour un total de 8 lots).

Les paillettes destinées au CQ de production (n=26) ont été acquises auprès du CNIAAG et acheminées directement au laboratoire d'analyse des semences animales de la PBRC/U.B1. Le niveau d'azote a été contrôlé à la réception pour s'assurer du respect des conditions de conservation et de transport. L'idéal aurait été d'avoir au moins 2 paillettes par lot pour la totalité des lots analysés (17 lots), cependant, cette condition a été difficile à satisfaire dans les conditions de notre travail.



Les 4 paillettes ayant servi pour le CQ de stockage représentent un échantillon d'un lot ayant été exposé au risque de réchauffement (renversement de BT) chez l'inséminateur.

**Tableau 9** : Identification des paillettes produites au CNIAAG

N°	CPS	Date-Product	N° de lot	Race	Taureau	Couleur	Ordre de paillette/lot
01	CNIAAG	23.09.2020	256.321.528	FLECKVIE	SYMBA	JAUNE	01
02	CNIAAG	23.09.2020	256.321.528	FLECKVIE	SYMBA	JAUNE	02
03	CNIAAG	25.02.2021	292.1404.700	HOL PN	JETSI	BLANCHE	01
04	CNIAAG	18/10/2018	3105	HOL PN	JETSI	BLANCHE	01
05	CNIAAG	18/10/2018	3105	HOL PN	JETSI	BLANCHE	02
06	CNIAAG	03/10/2021	2671	Mont	JETON	ROUGE	01
07	CNIAAG	11/10/2021	2921360074	HOL PR	JEFREY	ROUGE	01
08	CNIAAG	11/11/2021	040	MONT	CHARLY	ROUGE	01
09	CNIAAG	11/11/2021	040	MONT	CHARLY	ROUGE	02
10	CNIAAG	17/02/2021	58141712	HOL PN	JUKEBO	BLANCHE	01
11	CNIAAG	25/01/2021	2930875287	HOL PR	JOF	BLANCHE	01
12	CNIAAG	12/03/2014	06047	HOL PN	BAHBELL	BLANCHE	01
13	CNIAAG	17/01/2019	378.8966.828	FLECKVIE	SERUUS	Jaune	01
14	CNIAAG	17/01/2019	378.8966.828	FLECKVIE	SERUUS	Jaune	02
15	CNIAAG	17/01/2019	378.8966.828	FLECKVIE	SERUUS	Jaune	03
16	CNIAAG	15/03/2020	5210	Mont	MARKUS	Rouge	01
17	CNIAAG	22/02/2018	2212232	NOR	HAPPY-ISY	Verte	01
18	CNIAAG	25/04/2018	2212232	NOR	HAPPY-ISY	Verte	01
19	CNIAAG	20/12/2017	5031530151	NOR	HUMAR	VERTE	01
20	CNIAAG	20/12/2017	5031530151	NOR	HUMAR	VERTE	02
21	CNIAAG	26/01/022	3105	FLECKVIE	MAMMUT	Jaune	01
22	CNIAAG	26/01/2022	3105	FLECKVIE	MAMMUT	Jaune	02
23	CNIAAG	13/02/2022	23027	FLECKVIE	JAHK	Jaune	01
24	CNIAAG	13/02/2022	23027	FLECKVIE	JAHK	Jaune	02
25	CNIAAG	21/12/2021	8536	MONT	HERBORD	Rouge	01
26	CNIAAG	21/12/2021	8536	MONT	HERBORD	Rouge	02
27	CNIAAG	21/12/2021	2666	MONT	JACK	Rouge	01
28	CNIAAG	21/12/2021	2666	MONT	JACK	Rouge	02

**Tableau 10 : Identification des paillettes importées**

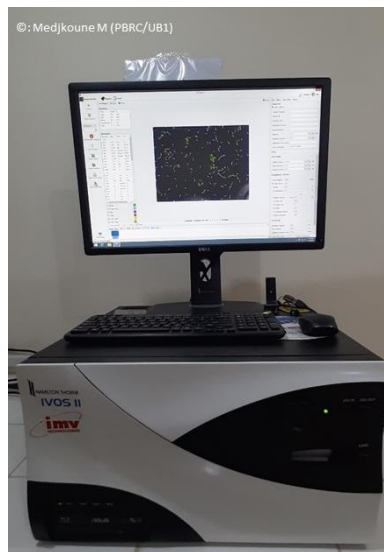
N°	Date collecte	N° d'agrément CCS*	N° national (taureau)	Contenu du code à barres XXXXX XXXX X			Code Race	Nom du Taureau	Couleur
	AAJJ	FRCBXXN	FRXXXXXXXXXX	Numéro taureau	Date collecte	Fract. Ejac.	XX		
01	17.05.2019	FRCB350	FR2601116748	91576	6346	1	66	MERCUTIO	VERTE
02	17.05.2019	FRCB350	FR2601116748	91576	6346	1	66	MERCUTIO	VERTE

### 1.2.2. Matériel de préparation et d'évaluation de la semence

Le matériel utilisé dans notre étude se présente comme suit :

#### 1.2.2.1 Analyseur de semence assisté par ordinateur (Hamilton Thorne IVOS II)

Il s'agit d'un analyseur d'image comprenant un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes et l'utilisation facultative d'une illumination fluorescente et d'un fluorochrome de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu.



**Figure 9 : Analyseur de semence assisté par ordinateur HAMILTON THORN IVOS II**

#### 1.2.2.2. Matériel divers :

1. Microscope binoculaire à champs clair (Nikon E100) avec platine chauffante.
2. Lame prote objet et lamelle couvre objet
3. L'Hémocytomètre de Neubauer amélioré.
4. Bain marie 37° 30s
5. Etuve à 37°

6. Vortex
7. Décongélateur de paillettes
8. Coupe paillettes
9. Mandrin de pistolet d'insémination bovine
10. Solution tampon commerciale (Easy buffer B)
11. Tubes de micro-centrifugation (Eppendorf®)
12. Colorant Diff-Quick®
13. Solution de montage Eukitt®
14. Solution hypotonique (HOSt)
15. Papier buvard
16. Boîtes de rangement de lames



**Figure 10 :** Matériel utiliser dans cette étude (P.B.R.C)

### 1.3. Méthodes

#### 1.3.1. Conception d'une fiche de contrôle de qualité :

Une fiche individuelle de contrôle de qualité biologique de la semence bovine congelée a été conçue, afin de permettre l'identification et la retranscription des résultats du CQ obtenus pour chaque lot produit.

Afin d'évaluer la qualité d'un lot de semence, il est nécessaire de décongeler et d'analyser 2 paillettes de ce même lot. Si la différence entre les deux paillettes est significativement éloignée (L'une de bonne qualité et l'autre non), une 3eme paillette doit alors être décongelée pour trancher entre les deux et permettre de prendre une décision quant au devenir de ce lot.

Cette fiche de CQ contient une partie destinée à l'identification de l'échantillon ainsi qu'à toutes les informations le concernant (Provenance, mode de transport, respect de la chaîne de froid et date de réception), une deuxième partie dédiée à l'identification des paillettes, et enfin une dernière partie consacrée aux résultats de CQ obtenus (Concentration, Mobilité,

Morphologie ainsi que vitalité) 10min après décongélation des paillettes ainsi que leurs confrontations aux seuils d'acceptation en IA. La décision d'acceptation ou de rejet du lot contrôlé est présentée en conclusion de cette fiche (Voir annexe 02).

Plusieurs normes de qualité ont été utilisées dans ce travail, elles traduisent les seuils de décision ou d'acceptation de la semence bovine congelée-décongelée en IA. La norme la plus largement utilisée et rapportée par les auteurs étant l'exigence d'au moins 8 millions spz mobiles progressifs par paillette « +8M spermatozoïdes prog/dose » (Traore, 1996). D'autres seuils beaucoup moins stricts rapportés par certains auteurs ont été aussi appliqués tel que l'exigence d'au moins 6 millions de spermatozoïdes mobiles « +6M spermatozoïdes mob/dose »

### 1.3.2. Décongélation de la paillette

La décongélation de la paillette se fait par son dépôt pendant 30s dans un bain marie à 37°C, elle est ensuite retirée et séchée au papier buvard afin d'éliminer tout résidu d'eau (humidité) qui est spermicide pouvant se mélanger au sperme.

La paillette est ensuite secouée quelques secondes puis ouverture par la coupure du côté soudé. Un mandrin est ensuite placé du côté opposé (du côté du coton) afin de pousser la semence et s'assurer du raclage de tous les spermatozoïdes présents dans la paillette et qui auraient pu se sédimenter au niveau des bords latéraux de la paillette au moment de l'équilibration (En cas d'équilibration en paillette).

La semence est mise dans un tube Eppendorf qui est déposé dans un portoir chauffant à 37°C. Le volume utile d'une paillette fine est de 0.21 ml.



**Figure 11** : Etapes de décongélation des paillettes

### **1.3.3. Examen microscopique**

#### **1.3.3.1. Numération spermatique à l'hémocytomètre de Neubauer amélioré.**

La numération des spermatozoïdes par l'hémocytomètre de Neubauer a été réalisée conformément aux directives de l'OMS (Guide 2010, 2021) à travers plusieurs étapes à savoir :

##### Préparation des aliquotes :

A partir de l'échantillon, préparer deux aliquotes dans les mêmes conditions et suivant les mêmes étapes, en diluant la semence au 1/20<sup>ème</sup> dans une solution hyper osmotique préparée préalablement, afin d'obtenir une concentration adéquate pour le comptage (250 000 - 2,5 millions de cellules par ml). On mélange les solutions à l'aide du Vortex, à une vitesse de 20 Hertz, pendant 15s.

##### Remplissage de la lame de Neubauer,

Après avoir accolé la lamelle couvre-objet sur lame de Neubauer, mélanger soigneusement la suspension (Vortex pendant 15 secondes à la vitesse maximale), et aspirer par micropipette 10 $\mu$ L de liquide immédiatement pour éviter la sédimentation des spermatozoïdes. Ensuite, mettre la pointe de la pipette au bord de la lamelle couvre-objet, à l'extrémité de la cellule de Neubauer et laisser le liquide pénétrer par capillarité dans la 1<sup>ère</sup> chambre. Répéter les mêmes étapes pour le remplissage de la 2<sup>ème</sup> chambre.

##### Décantage de la lame de Neubauer,

Laisser la lame pendant 10min dans une boîte humide et sombre pour permettre le décanter des spermatozoïdes (Leurs superposition sur le carré de la grille de comptage).

##### Observation et numération au microscope

Monter la lame sur la platine du microscope et effectuer la mise au point au grossissement x400. Le comptage commence au niveau de la grille n°5 suivant une technique bien définie et les résultats du comptage des deux chambres (N1 et N2) sont notés sur une fiche.

##### Calcul de la concentration :

Calculer la somme (N1+N2) et la différence (N1-N2) des deux nombres, puis vérifier l'acceptabilité de la différence à l'aide du tableau (Tableau n° 03). Si la différence est

acceptable, procéder au calcul de la concentration sinon préparer une nouvelle dilution, et répéter toutes les étapes précédentes de la numération.

La formule pour calculer la concentration :  $N/n \times (1/20) \times \text{facteur de dilution}$ .



**Figure 12 : Numération spermatique (Cellule de Neubauer)**

**Tableau 11 : Différences acceptables entre deux comptes de réplification pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95% (Guide laboratoire d'analyse de sperme OMS 2010).**

Sum	Acceptable Difference*	Sum	Acceptable Difference*
144–156	24	329–346	36
157–169	25	347–366	37
170–182	26	367–385	38
183–196	27	386–406	39
197–211	28	407–426	40
212–226	29	427–448	41
227–242	30	449–470	42
243–258	31	471–492	43
259–274	32	493–515	44
275–292	33	516–538	45
293–309	34	539–562	46
310–328	35	563–587	47

### **1.3.3.2. Test hypo-osmotique (HOST) :**

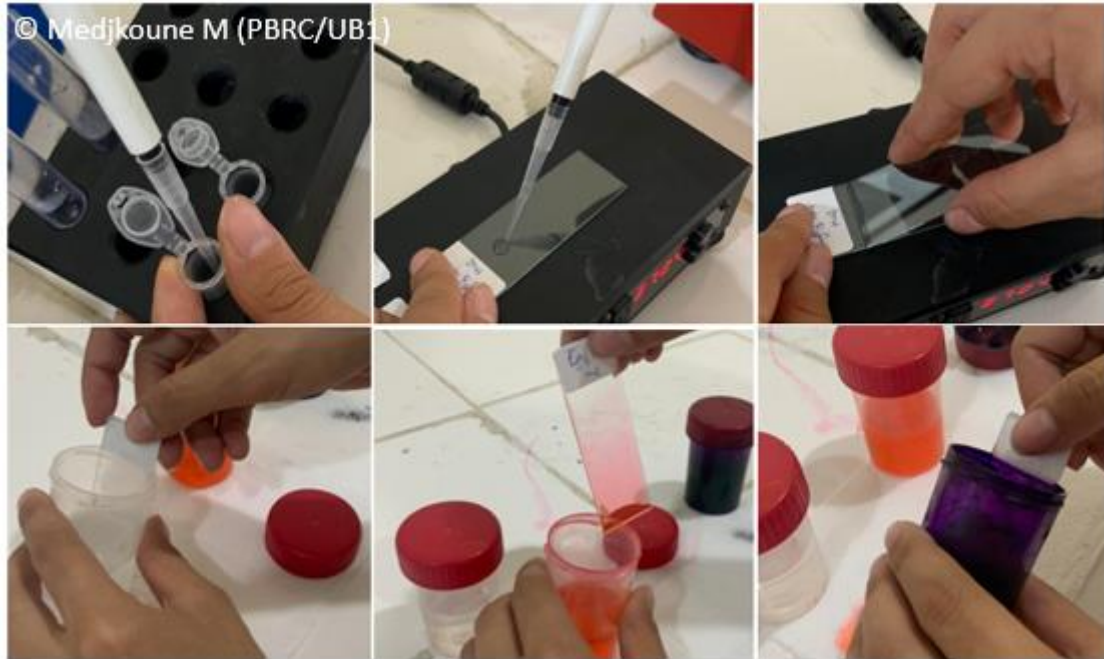
Le test hypo-osmotique est un test utilisé pour l'évaluation de l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane flagellaire, il est réalisé tout de suite après décongélation par la dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la semence dans une solution hypotonique préparée au préalable et mise à 37°C. Les aliquotes sont ensuite mise à 37° pendant 45 à 60 min puis des frottis sont réalisé fixés, colorés puis observé afin de calculer le nombre de spermatozoïdes ayant réagi par gonflement (Spermatozoïdes vivant). Les résultats sont ensuite transcrits dans la fiche de CQ correspondant au taureau analysé.

### **1.3.3.3. La morphologie des spermatozoïdes**

La morphologie est évaluée par observation microscopique à l'immersion d'un sperme préalablement coloré.

- Pour ce faire, une dilution au 1/20<sup>ème</sup> est réalisée à partir de la semence. Dans un tube 40µl de sperme sont ajoutés à 760µl de solution de dilution (Easy Buffer B).
- Le tube est ensuite homogénéisé pendant 15s, et une goutte de 20µl est prise et mise sur un lame porte objet pré identifiée.
- Un frotti est ensuite réalisé et séché à l'air libre quelques minutes
- La lame est fixée, colorée, montée et observée sous microscope optique au grossissement x100.

Au moins 100 spermatozoïdes sont comptés afin de déterminer le pourcentage des multiples anomalies pouvant atteindre les différentes parties du spermatozoïde. Les résultats sont ensuite transcrits dans la fiche de CQ correspondant au taureau analysé.



**Figure 13 : Réalisation des lames de morphologie**

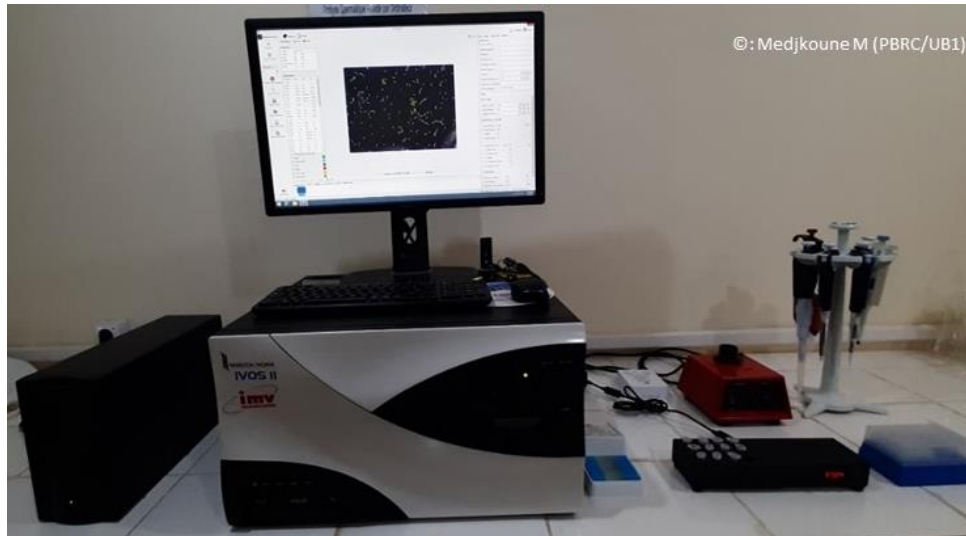
#### **1.3.4. L'analyse par le système HAMILTON THORN IVOS II**

L'analyse spermatique assistée par ordinateur a été réalisée au moyen du système HAMILTON THORN IVOS II à travers plusieurs étapes à savoir :

##### **1.3.4.1. Préparation de l'échantillon :**

- Des pipettes étalonnées et des chambres précalibrées (Leja 20 $\mu$ m) ont été utilisées.
- Un volume de 3 à 4  $\mu$ l de semence a été déposé dans la chambre par capillarité et sans excès (Un excédent peut provoquer une dérive des spermatozoïdes et sur-estimé la mobilité).
- La dilution de la semence à l'Easy Buffer B a été ajustée pour avoir 40 à 100 spermatozoïdes par champ (Concentration : 20 à 30 Million/ml).
- Le milieu de dilution, les tubes, les embouts et les lames ont été maintenus à 37°C.
- L'intervalle de temps entre la dilution et l'analyse a été maintenu constant.





**Figure 14 : Préparation de l'échantillon pour l'analyse**

#### **1.3.4.2. Analyse de l'échantillon :**

- Les positions A, B, C, D ont été ajustées pour voir le bord de la chambre.
- Un écartement de 2 à 3 champs du bord de la chambre a été effectué.
- L'absence de toute dérive des spermatozoïdes a été vérifiée.
- Le paramètre d'illumination a été vérifié et une auto-illumination a été faite le cas échéant.
- La température de la platine a été vérifiée (37°C)
- La mise au point a été réalisée d'abord sur les spermatozoïdes statiques puis remontée légèrement pour avoir toutes les cellules. Une vérification de la mise au point est enfin effectuée par la fonction (Live overlay).
- L'analyse a été lancée sur 10 champs.
- Le playback du 10<sup>ème</sup> champ a été observé pour s'assurer que l'acquisition des trajectoires est correcte. Le cas échéant, l'analyse est relancée après réajustement de la mise au point et vérification de la position de la lame.
- Les vignettes (Images des champs capturés) ont été observés pour vérifier l'absence de corps étrangers ou des bulles d'air. Le cas échéant, Les champs concernés sont éliminés.
- L'entrée des données d'identification des paillettes a été vérifiée.
- Les données ont été enfin enregistrées et effacées.



**Figure 15 :** Etapes d'analyse par l'HT IVOS II d'un échantillon

### 1.3.4.3. Les paramètres cinétiques et morphométriques :

Les paramètres générés par le Système HT IVOS II et utilisés dans notre étude sont comme suit :

- **Concentration et pourcentages de mobilité :**
  - Concentration (M/ml)
  - Pourcentage des spermatozoïdes mobiles (MOT, %)
  - Pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PROG, %)
- **Paramètres cinétiques :**
  - Vitesse curvilinéaire (VCL,  $\mu\text{m/s}$ )
  - L'amplitude de mouvements latéraux de la tête (ALH,  $\mu\text{m}$ ).
  - Vitesse de déplacement linéaire (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ).
  - Vitesse moyenne (VAP,  $\mu\text{m/s}$ )
  - Fréquence de croisements des trajectoires (BCF, Hz).
  - Straightness (STR %)
  - Liniarity (LIN %)
- **Paramètres morphométriques :**
  - Pourcentage des spermatozoïdes normaux
  - Gouttelette proximale
  - Gouttelette distale

- DMR
- Flagelle replié.
- Flagelle enroulé

#### **1.3.4.3. Le paramétrage technique (setup) de l'IVOS II :**

Concernant le paramétrage technique de l'analyseur HT-IVOS II, un réglage (setting) recommandé par O'Meara et ses collaborateurs en 2021 a été appliqué dans notre étude (Voir annexe n° 02). Il s'agit d'un paramétrage intitulé « *Bull frozen semen Standardized Qualivets settings* », destiné au contrôle de qualité de la semence bovine congelé par le système IVOS II, ayant fait l'objet d'une standardisation par un groupes de laboratoires spécialisés dans cinq pays Européens (France, Belgique, Ireland, Danemark et les Pays bas) et une validation au niveau de cinq centres de production de semences (O'Meara et *al.*, 2021).

#### **1.3.5. Saisie des données :**

Les résultats bruts des différents paramètres des 30 paillettes analysées ont été, d'une part, saisis sur un fichier Excel pour calculer la moyenne, l'écart-type (ET) et l'erreur standard de la moyenne (SEM), et d'autre part, consignés sur les fiches de contrôle de qualité avec application des seuils d'acceptation et de rejet en IA. Ce contrôle de qualité s'applique à deux situations à savoir un CQ de production des différents lots dans lequel deux paillettes de chaque lot sont analysées, ou de stockage lors d'exposition au risque de réchauffement.

#### **1.3.6 Analyse statistique :**

Les données brutes d'analyse cinétique récupérées des fichiers ASCII du système HT IVOS II ainsi que les données des autres tests saisies sur des tables Excel, sont chargées sur le logiciel d'analyse statistique SPSS pour effectuer d'abord des statistiques descriptives. Ensuite, les données ont subi une transformation logarithmique suivie d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) afin de comparer les résultats des quatre races bovines étudiées, ainsi que des différentes techniques d'analyse utilisées (Neubauer vs. HT IVOS II ; microscopie standard vs. HT IVOS II). Une étude de corrélation (de Pearson) entre les deux techniques comparées a été faite également par SPSS. La différence est significative à  $p < 0.05$  et les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM.

# **RESULTATS**

## 2. RESULTATS

Les 30 paillettes analysées dans la présente étude se répartissent en 26 paillettes qui ont servi au contrôle de qualité biologique de production et 4 paillettes au contrôle de qualité de stockage chez l'inséminateur après exposition au risque de réchauffement.

Ainsi, ce chapitre se scinde en deux sections principales à savoir le CQ de production (§ 2.1.) et le CQ de stockage (§ 2.2.).

### 2.1. Contrôle de qualité de production

Cette section se divise en plusieurs sous sections à savoir : une étude descriptive (§ 2.1.1.), une étude de corrélation (§ 2.1.2.), un contrôle de qualité avec applications des seuils de décision (§ 2.1.3.) et enfin un contrôle de qualité après simulation de correction (§ 2.1.4.).

#### 2.1.1. Etude descriptive

Cette étude consiste en une analyse descriptive des paramètres spermatiques de mobilité, (MOT% et PROG%) et de vitalité (HOST), des paramètres cinétiques ainsi que des paramètres morphométriques (HT-IVOS II) et ce sur la totalité des paillettes (n=26) destinées au CQ de production ainsi que leurs croisements par races, taureaux et lieux de production.

##### 2.1.1.1. Les paramètres spermatiques de mobilité et de vitalité

**Tableau 12** : Statistique descriptive des paramètres de concentration, mobilité totale (MOT), progressive (PROG) et vitalité des 26 paillettes évaluées par le système HT IVOS II.

Paramètre	N	Minimum	Maximum	Moyenne	
	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Erreur standard
Concentration	26	52,50	112,25	81,83	3,10
% Spz Mot	26	6,60	54,50	22,09	2,64
% Spz Prog	26	2,30	38,60	11,71	2,08
Vitalité (HOST)	26	,00	81,00	31,73	4,24

Les moyennes des paramètres de concentration, mobilité totale, progressive et vitalité des 26 paillettes évaluées sont  $81.83 \pm 3.10$ ,  $22.09 \pm 2.64$ ,  $11.71 \pm 2.08$ ,  $31.73 \pm 4.24$ , respectivement pour la concentration, la motilité totale et progressive ainsi que la vitalité.

### 2.1.1.2. Les paramètres cinétiques

**Tableau 13** : Statistique descriptive des paramètres cinétiques des 26 paillettes évalués par le système HT IVOS II.

Paramètre	N	Minimum	Maximum	Moyenne	
	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Erreur standard
VCL (µm/s)	26	130,93	227,83	183,37	5,78
VSL (µm/s)	26	47,83	116,41	75,51	3,07
VAP (µm/s)	26	63,92	132,66	95,80	3,08
LIN (%)	26	31,67	53,71	41,63	1,23
STR (%)	26	66,79	85,76	77,05	1,15
ALH (µm)	26	6,25	11,18	8,85	0,26
BCF (Hz)	26	21,14	34,37	26,94	0,70

Les moyennes des paramètres cinétiques des 26 paillettes évaluées sont  $183.37 \pm 5.87$ ,  $75.51 \pm 3.07$ ,  $95.80 \pm 3.08$ ,  $41.63 \pm 1.23$ ,  $77.05 \pm 1.15$ ,  $8.85 \pm 0.26$  et  $26.94 \pm 0.70$  respectivement pour la VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH et BCF.

### 2.1.1.3. Les paramètres morphométriques

**Tableau 14** : Statistique descriptive des paramètres morphométriques (Gouttelette proximale, gouttelette distale, distal mid-piece reflex « DMR », coiled tail and bent tail) des 26 paillettes évaluées par le système HT IVOS II.

Paramètre	N	Minimum	Maximum	Moyenne	
	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Erreur standard
% Normaux	26	13,40	88,30	66,10	4,01
% PD	26	1,00	78,40	16,00	4,03
% DD	26	2,40	14,30	6,50	0,55
% DMR	26	0,20	5,80	1,15	0,23
% COILED	26	0,60	11,30	3,15	0,52
% BENT	26	6,80	46,30	16,12	1,82

Les pourcentages moyens des paramètres morphométriques des 26 paillettes évaluées sont  $66.10 \pm 4.01$ ,  $16 \pm 4.03$ ,  $6.50 \pm 0.55$ ,  $1.15 \pm 0.23$ ,  $3.15 \pm 0.52$ , et  $16.12 \pm 1.82$  respectivement pour le pourcentage des normaux, gouttelette proximale, gouttelette distale, DMR, coiled tail et bent tail.

#### 2.1.1.4. Paramètres spermatiques présentés par taureau

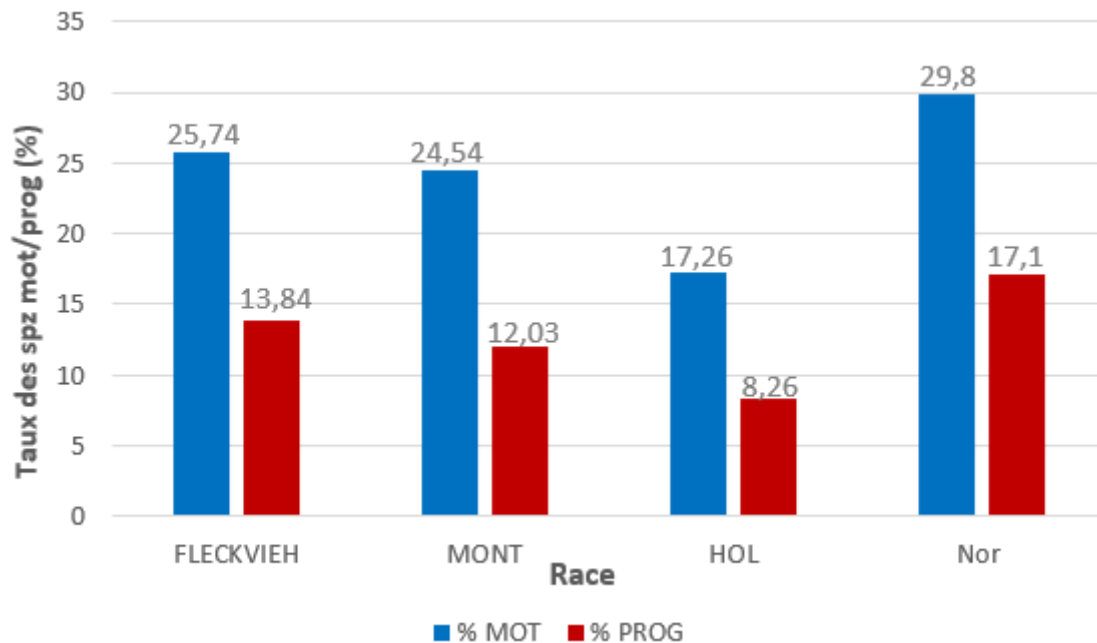
**Tableau 15** : Paramètres de concentration, mobilité totale (MOT), progressive (PROG), fonctionnalité membranaire du flagelle (HOSt) et pourcentage de morphologie normale, présentés par taureau (n=15)

N°	Taureau	Concentration (Millions spz/ml)	Motilité (HT- IVOS II)		HOSt % vivants	Taux des normaux (%)
			MOT (%)	PROG (%)		
01	SYMBA	79,405	12,1	4,35	39	70
02	JETSI	84,46	20,13	7,53	29,67	70,87
03	JETON	66	8,6	5,1	34	32,30
04	JEFREY	53,5	27,1	16,6	40	36,60
05	CHARLY	85,4	20,3	14,35	47	30,2
06	JUKEBO	82,31	17,2	10,8	46	47,80
07	JOF	98,25	9,5	3,3	18	66,60
08	BAHBELL	105	6,6	4,5	19	69,40
09	MERCUTIO	92,09	52,65	37,75	70	78,7
10	HAPPY-ISY	98,55	26,23	21,13	11,15	78,45
11	HUMAR	67,01	11,60	2,50	27,50	78,70
12	MAMMUT	71,6	39,85	25,85	36,19	80,5
13	JAHK	70,33	13,15	4,5	36,28	76,25
14	HERBORD	96,21	24,35	11,25	47,5	85
15	JACK	82,71	23,35	9,3	42	86,45
Moyenne		82,18	20,84	11,92	36,21	65,85
SEM		3,73	3,21	2,56	4,69	4,99
Minimum		53,50	6,60	2,50	11,15	30,20
Maximum		105	52,65	37,75	70	86,45

### 2.1.1.5. Paramètres spermatiques présentés par races

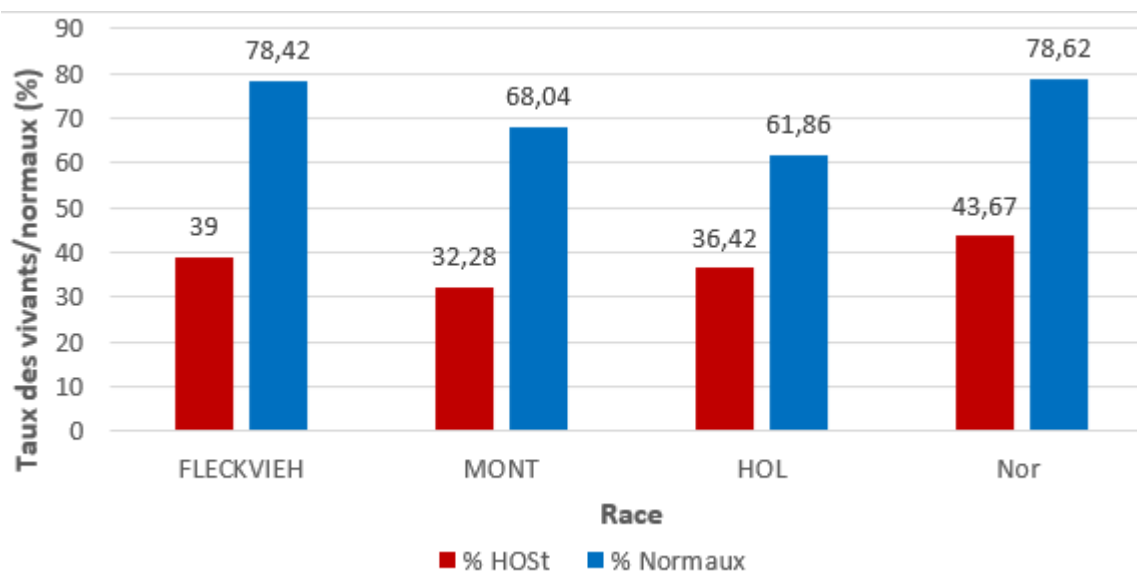
**Tableau 16** : Paramètres de concentration, mobilité totale (MOT), progressive (PROG), fonctionnalité membranaire du flagelle (HOSt) et pourcentage de morphologie normale, présentés par race (Moy±SEM).

N°	Race	Concentration (Millions spz/ml)	Motilité (HT-IVOS II)		HOSt % vivants	Taux des normaux (%)
			MOT (%)	PROG (%)		
01	FLECKVIEH (n=09)	67,24±6,5	25,74±6,1	13,84±4,9	39,00±6,5	78,42±2,5
02	MONT (n=08)	85,11±3,8	24,54±4,3	12,03±2,2	32,28±9,1	68,04±9,7
03	HOL (n=07)	86,79±6,5	17,26±3,06	8,26±2	36,42±5,8	61,86±5,4
04	Nor (n=06)	80,49±9,5	29,80±8,21	17,10±6,8	43,67±10,1	78,62±2,4



**Figure 16** : Mobilité totale et progressive présentée par race





**Figure 17** : Pourcentage des spermatozoïdes vivants et normaux présenté par race

#### 2.1.1.6. Paramètres spermatiques présentés par lieu de production

**Tableau 17** : Paramètres de concentration, mobilité totale (MOT), progressive (PROG), fonctionnalité membranaire du flagelle (HOST) et pourcentage de morphologie normale présentés par lieu de production (CNIAAG vs. Importation).

N°	Lieu de production	Concentration (Millions spz/ml)	Motilité (HT-IVOS II)		HOST % vivants	Taux des normaux (%)
			MOT (%)	PROG (%)		
01	CNIAAG	79,62	20,35	10,41	36,05	63,89
02	IMPORT*	92,09	52,65	37,75	70	57,25

(\*) : Cette moyenne n'est pas représentative car elle représente seulement deux (02) paillettes importées sur les trente (30) étudiées.

#### 2.1.2. Etude de corrélation

Cette étude vise à déterminer les corrélations possibles entre la technique IVOS II et le spermocytogramme standard pour la morphologie d'une part (§ 2.1.2.1.) et la numération microscopique à la cellule de Naubauer améliorée pour la concentration d'autre part (§2.1.2.1.).

### 2.1.2.1. Comparaison entre morphologie standard et morphométrie IVOSII

**Tableau 18** : Comparaison entre morphologie standard et morphométrie IVOSII (n=11) :

N°	Taureau	Date de production	Taux des normaux (%)	
			Microscopie	IVOS II
01	SYMBA	23.09.2020	70	28,30
02	SYMBA	23.09.2020	65,00	48,10
03	JUKEBO	17.02.2021	47,80	80,80
04	BAHBELL	12.03.2014	69,40	64,70
05	MERCUTIO	17.05.2019	87,00	44,10
06	HERBORD	21.12.2021	76,92	86,30
07	HERBORD	21.12.2021	79	83,70
08	JACK	21.21.2021	81	88,3
09	JACK	21.12.2021	84	84,6
10	JETSI	18.10.2021	85	77,6
11	JETSI	18.10.2021	86	65,6
<b>Moyenne</b>			75,56	68,37
<b>SEM</b>			3,56	5,58
<b>Minimum</b>			47,80	28,30
<b>Maximum</b>			87	88,30

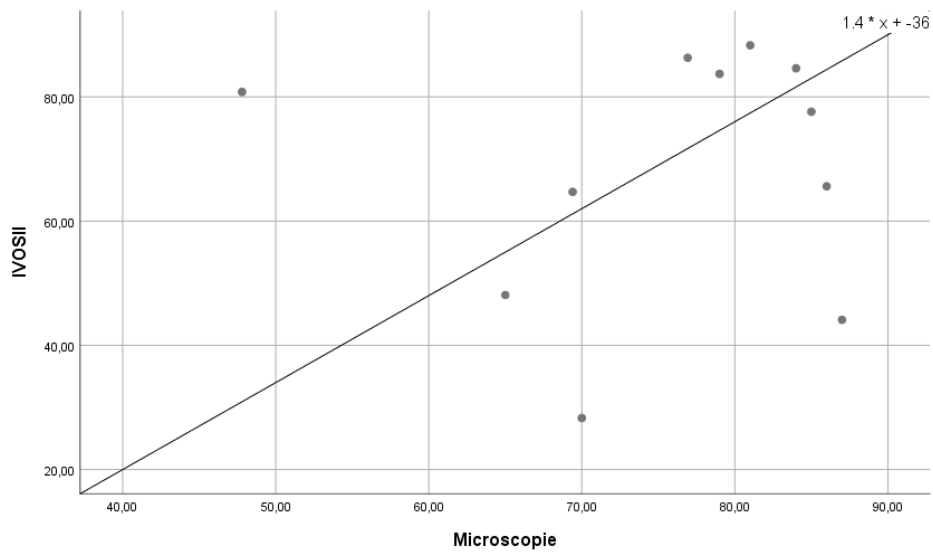
Les pourcentages moyens de morphologie normale sont très comparables entre la technique microscopique et l'analyseur HT IVOS II,  $75.56 \pm 3.56$  et  $68.37 \pm 5.58$  respectivement.

L'analyse de variances effectuée au moyen du logiciel SPSS pour comparer les moyennes de morphologie entre la technique standard microscopique et l'analyseur HT IVOS II a montré que la différence est non significative avec un  $p = 0,478$  (Voir tableau 19).

**Tableau 19** : ANOVA du paramètre pourcentage de morphologie normale (Microscopie vs. IVOS II)

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	126,336	1	126,336	,523	,478
Intragroupes	4830,007	20	241,500		
Total	4956,343	21			

Cependant, l'analyse de la corrélation de Pearson a mis en évidence une corrélation non significative ( $p=0.395$ ) avec un coefficient de 0.091 (Voir tableau 19 et graphe 15)



**Figure 18** : Graphe de corrélation entre la technique standard microscopique et l'analyseur IVOS II pour l'évaluation de la morphologie (IBM, SPSS statistics, version 25).

**Tableau 20** : Coefficient de corrélation de Pearson entre la technique microscopique et l'analyseur IVOS II pour l'évaluation de la morphologie spermatique (IBM, SPSS statistics, version 25).

		Microscopie	IVOSII
Microscopie	Corrélation de Pearson	1	,091
	Sig. (Unilatérale)		,395
	N	11	11
IVOSII	Corrélation de Pearson	,091	1
	Sig. (Unilatérale)	,395	
	N	11	11

## 2.1.2.2. Comparaison de la concentration par cellule de Neubauer et l'IVOS II

**Tableau 21** : Comparaison des valeurs de concentration calculées par cellule de Neubauer et l'IVOS II (n=26)

N°	Taureau	Date de production	Concentration (Millions spz/ml)	
			Neubauer	IVOS II
01	SYMBA	23.09.2020	75,56	142,54
02	SYMBA	23.09.2020	83,25	136,88
03	JETSI	25.02.2021	86,86	68,82
04	JETON	03.10.2021	66	88,34
05	JEFFREY	11.10.2021	53,5	86,82
06	CHARLY	11.11.2021	84,93	122,03
07	CHARLY	11.11.2021	85,87	135,22
08	JUKEBO	17.02.2021	82,31	44,83
09	JOF	25.01.2021	98,25	29,52
10	BAHBELL	12.03.2014	105	173,66
11	MERCUTIO	17.05.2019	79,68	157,02
12	MERCUTIO	17.05.2019	104,50	85,19
13	HAPPY-ISY	22.02.2018	112,25	163,11
14	HAPPY-ISY	25.04.2018	52,5	65,09
15	HUMAR	20.12.2017	67,16	46,74
16	HUMAR	20.12.2017	66,87	33,67
17	MAMMUT	26.01.2022	58,37	103,70
18	MAMMUT	26.01.2022	84,83	144,64
19	JAHK	13.02.2022	71,83	61,46
20	JAHK	13.02.2022	68,83	59,03
21	HERBORD	21.12.2021	94,6	24,49
22	HERBORD	21.12.2021	97,83	21,47
23	JACK	21.12.2021	83,25	64,98
24	JACK	21.12.2021	81,93	28,68
25	JETSI	18.10.2021	82,12	61,83
26	JETSI	18.10.2021	99,5	71,91
<b>Moyenne</b>			81,83	85,45
<b>SEM</b>			3,10	9,25
<b>Minimum</b>			52,50	21,47
<b>Maximum</b>			112,25	173,66

Les concentrations spermatiques moyennes sont très comparables entre la technique standard et l'analyseur HT IVOS II,  $81.83 \pm 3.10$  et  $85.45 \pm 9.25$  respectivement.

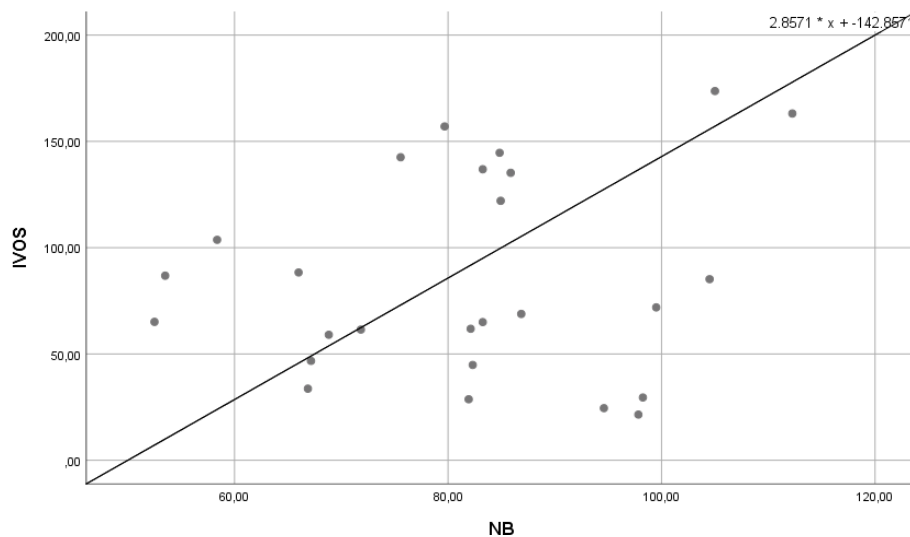
L'analyse de variances effectuée au moyen du logiciel SPSS pour comparer les deux, a montré que la différence est non significative avec un  $p = 0,391$  (Voir tableau 21).

Cependant, l'analyse de la corrélation de Pearson a mis en évidence une corrélation non significative ( $p = 0.180$ ) avec un coefficient de 0.189 (Voir tableau 22 et figure 19).

**Tableau 22 : ANOVA du paramètre concentration (Neubauer vs. IVOS II) (IBM, SPSS statistics, version 25).**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergruppes	926,739	1	926,739	,749	,391
Intragruppes	56895,427	46	1236,857		
Total	57822,167	47			

L'analyse de variances effectuée au moyen du logiciel SPSS pour comparer les moyennes de concentration spermatique entre la technique de numération Neubauer et l'analyseur HT IVOS II a montré que la différence est non significative avec un  $p = 0,391$  ( $p > 0.05$ ).



**Figure 19 : Graphe de corrélation entre la technique standard NB et l'analyseur HT IVOS II pour l'évaluation de la concentration spermatique (IBM, SPSS statistics, version 25).**

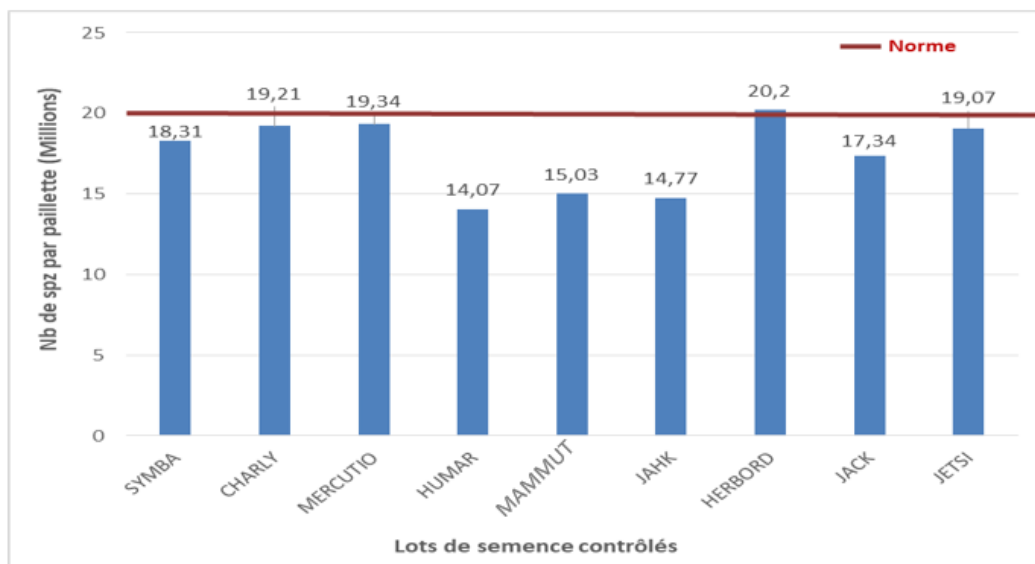
**Tableau 23** : Coefficient de corrélation de Pearson entre la technique standard NB et l'analyseur HT IVOS II pour l'évaluation de la concentration spermatique (IBM, SPSS statistics, version 25).

		NB	IVOS
NB	Corrélation de Pearson	1	,180
	Sig. (Unilatérale)		,189
	N	26	26
IVOS	Corrélation de Pearson	,180	1
	Sig. (Unilatérale)	,189	
	N	26	26

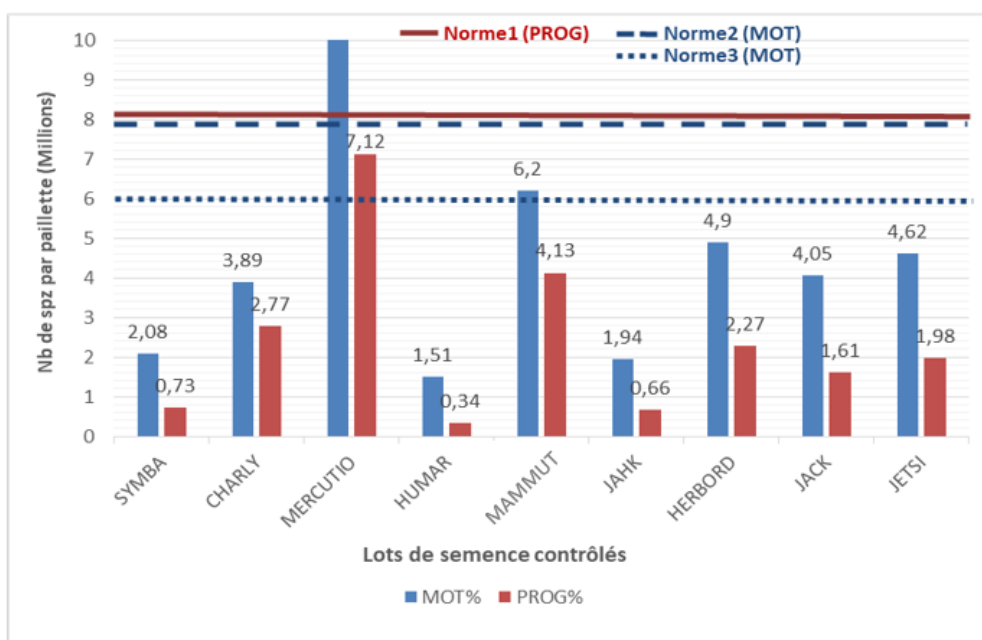
### 2.1.3. Contrôle de qualité et application des seuils de décision en IA

Cette section consiste en un contrôle de qualité proprement dit qui sera effectué avec application des seuils de décision en IA qui définissent les normes de qualité. Il se scinde en CQ du 1<sup>er</sup> groupe (G1) de 09 lots de semence représentés par 2 paillettes chacun (§2.1.3.1.), suivi du CQ du 2<sup>ème</sup> groupe (G2) de 08 lots de semence représentés par une seule paillette chacune (§ 2.1.3.2.).

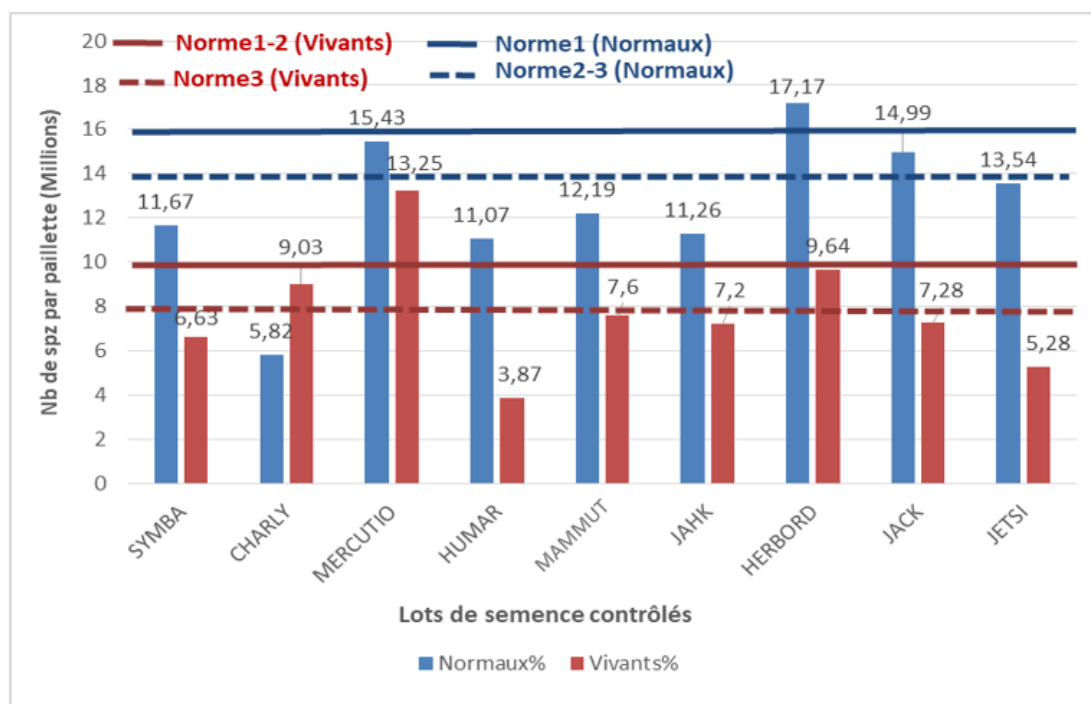
#### 2.1.3.1. Contrôle de qualité du 1<sup>er</sup> groupe (G1) de lots représentés par deux paillettes



**Figure 20** : Nombre total des spermatozoïdes par dose des 09 lots (2 paillettes/lot) contrôlés avec application des normes de qualité (n=9).



**Figure 21** : Pourcentage des spermatozoïdes mobiles et progressifs des neuf lots (2 paillettes/lot) contrôlés avec application des normes de qualité (n=9).



**Figure 22** : Pourcentage des vivants et des normaux des neuf lots (2 paillettes/lot) contrôlés avec application des normes de qualité (n=9).

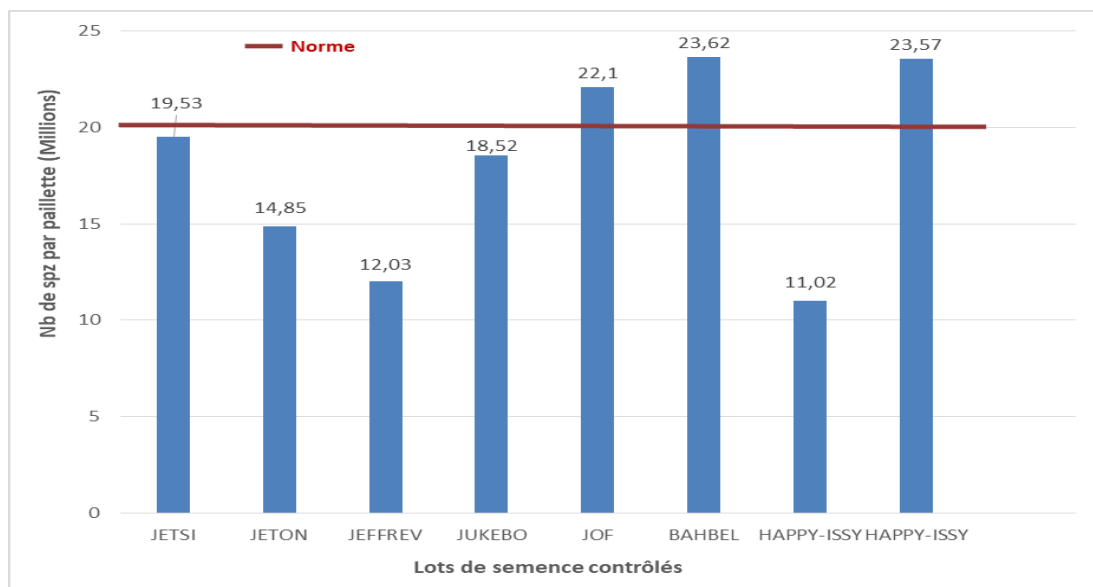
Concernant la norme 01, et à l'exception du lot MERCUTIO (17/05/2019) qui est un lot de semence importée d'un centre français et qui ne compte pas pour le contrôle de qualité de

production, il semble qu'aucun autre lot des 08 analysés n'ait pu atteindre les seuils d'acceptation en IA et ce pour la mobilité et la vitalité.

Quant à la norme 02 qui est moins restrictive que la première, car elle exige 8 millions de spermatozoïdes mobiles par dose, et si on retire MERCUTIO (17/05/2019), aucun autre des 08 lots analyses n'a pu atteindre les seuils d'acceptation en IA pour la mobilité. Par contre, pour la norme la moins stricte (norme 03) qui n'exige que 6 millions de spermatozoïdes mobiles comme seuil d'acceptation en IA, son application a permis d'observer que seulement MAMMUT (06/01/2022) satisfait cette condition avec 6.20 millions spermatozoïde mobiles par dose.

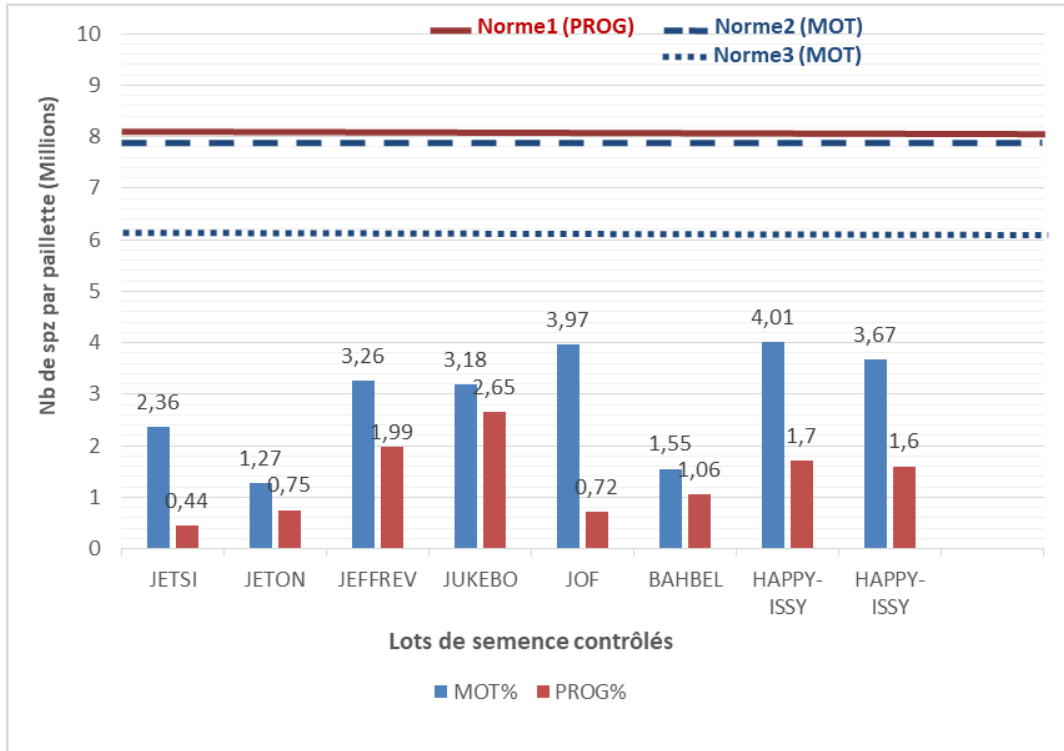
**En résumé**, en retirant le lot MERCUTIO (17/05/2019) qui est un lot de semence importée ne comptant pas pour le contrôle de qualité de production, et considérant que le lot MAMMUT (06/01/2022) est éliminé pour la vitalité et la morphologie, les 08 lots de semence bovine congelée du groupe 01 (G01) (Voir figures 20-22), sont tous de mauvaise qualité biologique et s'inscrivent nettement en dessous des normes d'acceptation en IA. Ces lots seraient à retirer du réseau de distribution.

### 2.1.3.2. Contrôle de qualité du 2<sup>ème</sup> groupe (G2) de lots représentés par une seule paillette

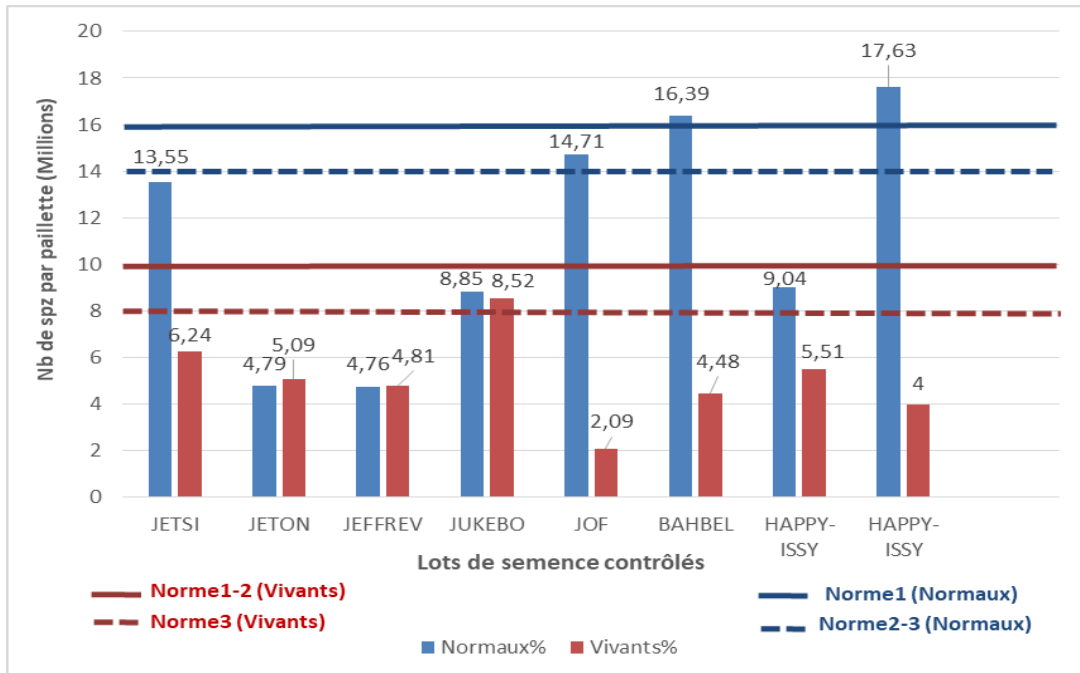


**Figure 23** : Nombre total des spermatozoïdes par dose des huit lots contrôlés (1 paillette/lot) avec application des normes de qualité (n=8).





**Figure 24 :** Pourcentage des spz mobiles et progressifs des 08 lots (1 paillette/lot) contrôlés avec application des normes de qualité (n=8).



**Figure 25 :** Pourcentage des vivants et des normaux des 08 lots (1 paillette/lot) contrôlés avec application des normes de qualité (n=8).

Concernant les pourcentages de mobilité (MOT% et PROG%, Fig. 24), Aucun des 08 lots contrôlés n'a atteint aucun des trois normes de qualité utilisées. La totalité des lots de ce deuxième groupe (G02) sont loin des seuils d'acceptation en IA pour la mobilité.

Quant aux paramètres de vitalité et de morphologie (Vivants%, Normaux%, Fig.25), 2 lots ont atteint le seuil de la norme1 et trois lots celui des normes 2 et 3 pour la morphologie. Il s'agit de « JOF (25/01/2021) », « BAHBELL (12/03/2014) » et « HAPPY-ISSY (22/02/2018) » avec respectivement 14.71, 16.39 et 17.63 millions spermatozoïdes normaux par paillette.

Pour la vitalité, un seul lot « JUKEBO (17.02.2021) » a légèrement dépassé le seuil de la norme3 avec la valeur de 8.52M spermatozoïdes vivants/paillette, et aucun des 08 contrôlés n'a pu atteindre le seuil des normes 1 et 2 les plus restrictives.

**En résumé**, et comme les 08 lots du G02 ont été rejetés en totalité pour les paramètres de mobilité (Figure 24), ils sont jugés non conformes aux normes d'acceptation en IA quels que soient leurs résultats de contrôle des autres paramètres, car une paillette de semence doit dépasser les seuils d'acceptation de tous les paramètres contrôlés sous peine d'être rejetée. Par ailleurs, et étant donné que seulement une seule paillette par lot a pu être analysée pour ce groupe (G02), leur qualité biologique est dite douteuse et reste à vérifier par la décongélation et le contrôle d'une deuxième voir une troisième paillette du même lot.

#### **2.1.4. Simulation de correction du nombre de spz par dose ajusté à 32M.**

Une simulation de correction du nombre de spermatozoïdes par dose a été effectuée dans notre étude en ajustant ce paramètre à 32 millions pour les lots déjà contrôlés avant ajustement.

##### **2.1.4.1. Simulation de correction du 1<sup>er</sup> groupe (G1) de lots.**

Cette compensation a permis alors de récupérer 05 sur 08 lots représentant (62,5%) « CHARLY – MAMMUT - HERBORD – JACK – JETSI ». Ces lots étaient non conformes et destinés à la destruction, et grâce à cette mesure compensatrice, ils ont pu atteindre les seuils d'acceptation en IA pour la mobilité, la vitalité et la morphologie avec la même qualité initiale pour ces paramètres (Voir Figures 26-28).

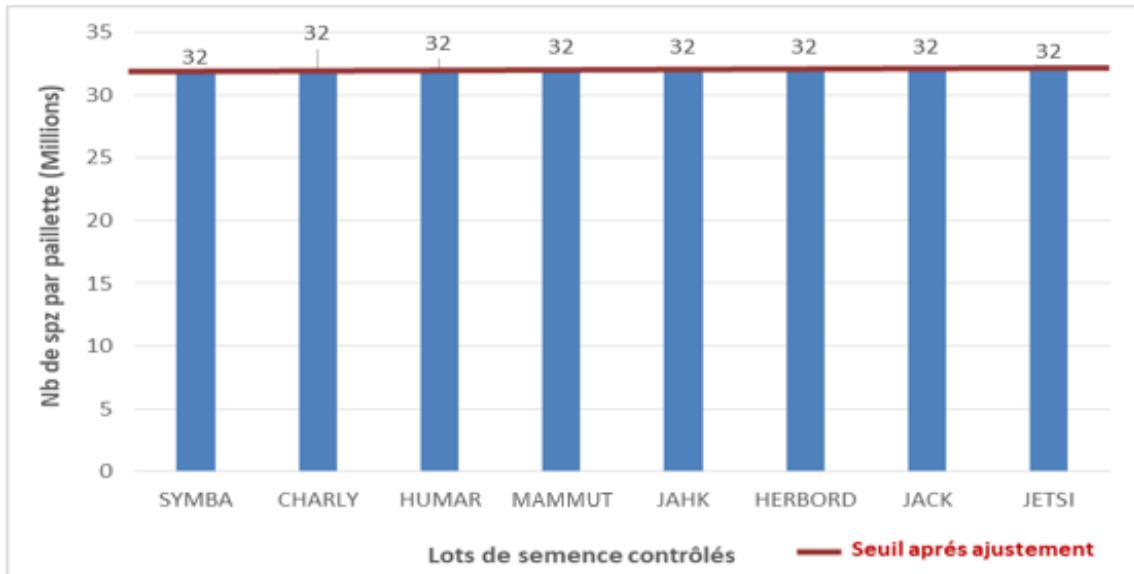


Figure 26 : Pourcentage des spz par paillette des 09 lots contrôlés après simulation de correction de ce paramètre ajusté à 32Millions.

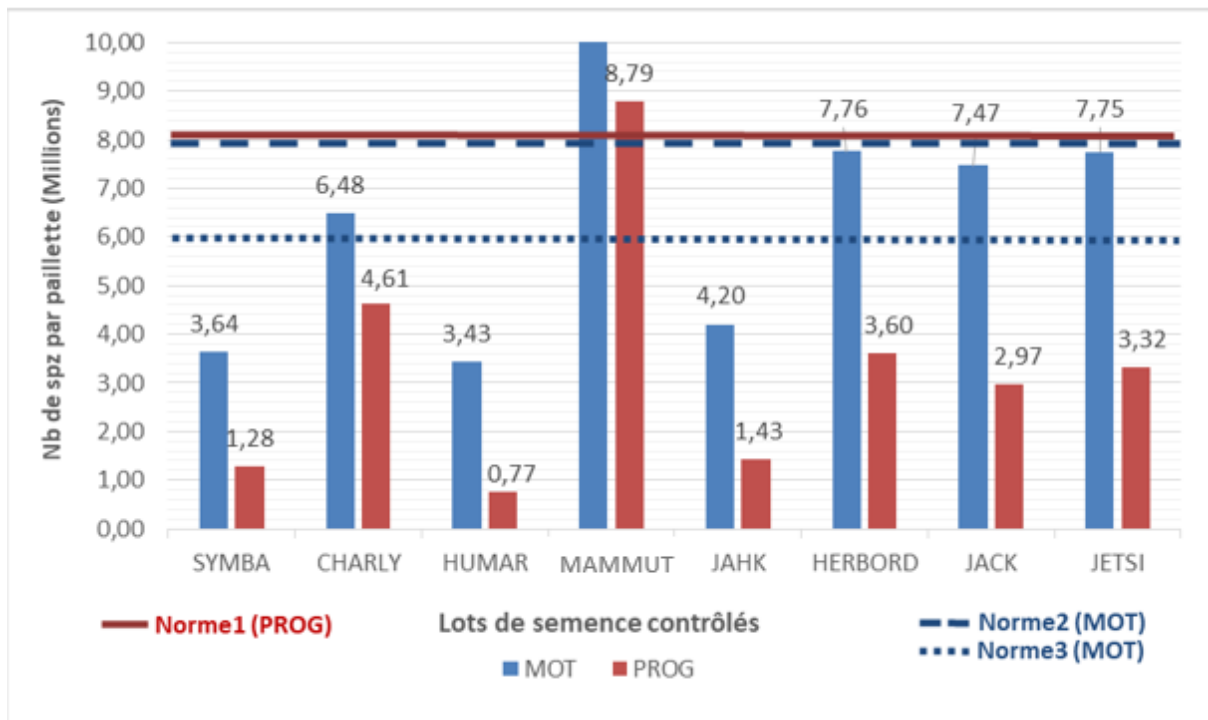


Figure 27 : Pourcentage des spz mobiles et progressifs des 09 lots contrôlés après simulation de correction du nombre des spz par dose.

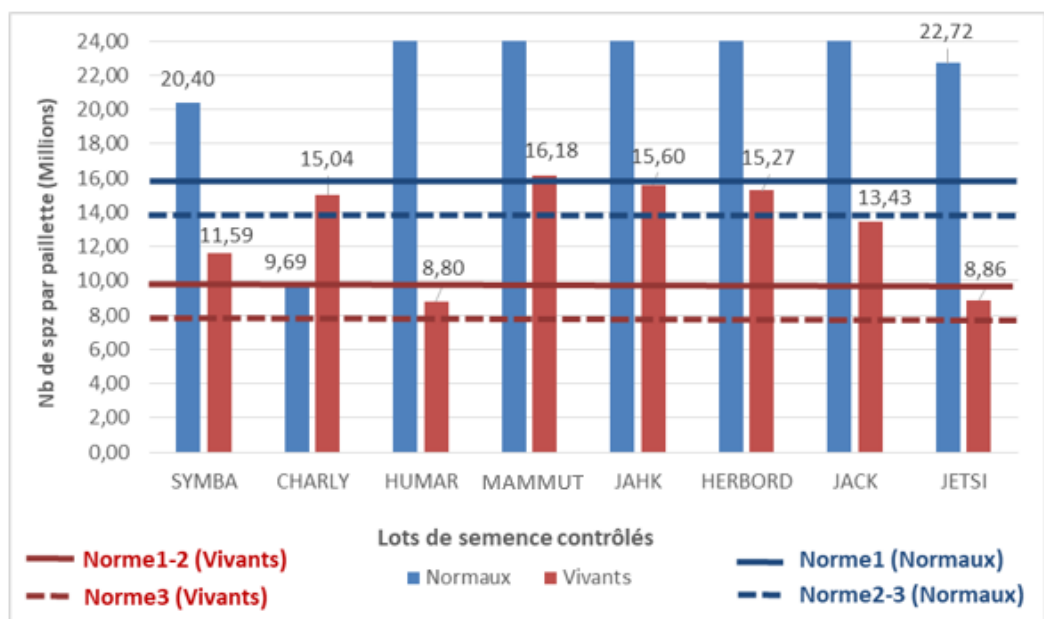
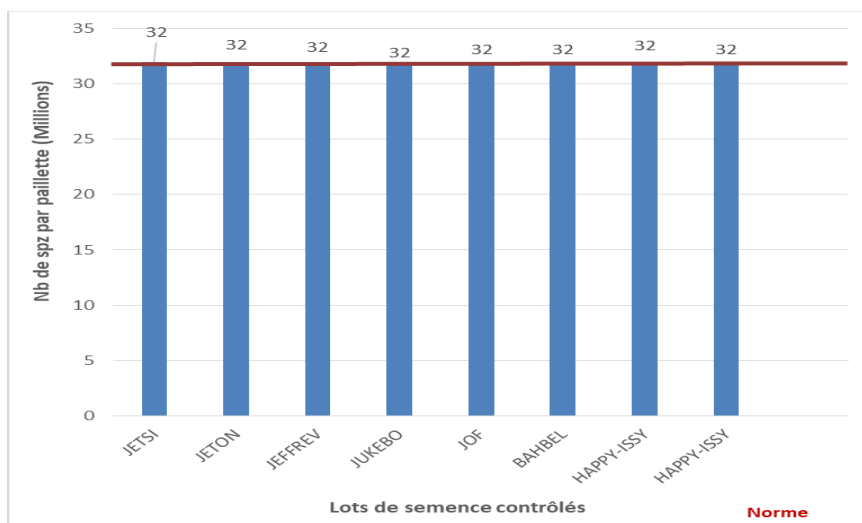


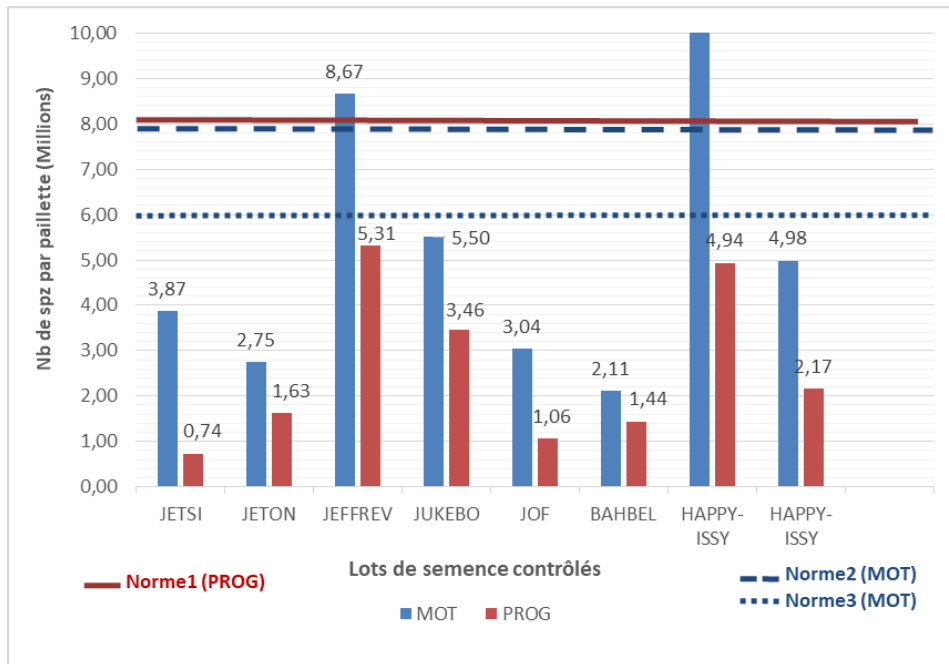
Figure 28 : Pourcentage des vivants et des normaux des 09 lots contrôlés après simulation de correction du nombre des spz par dose.

#### 2.1.4.2. Simulation de correction du 2ème groupe (G2) de lots.

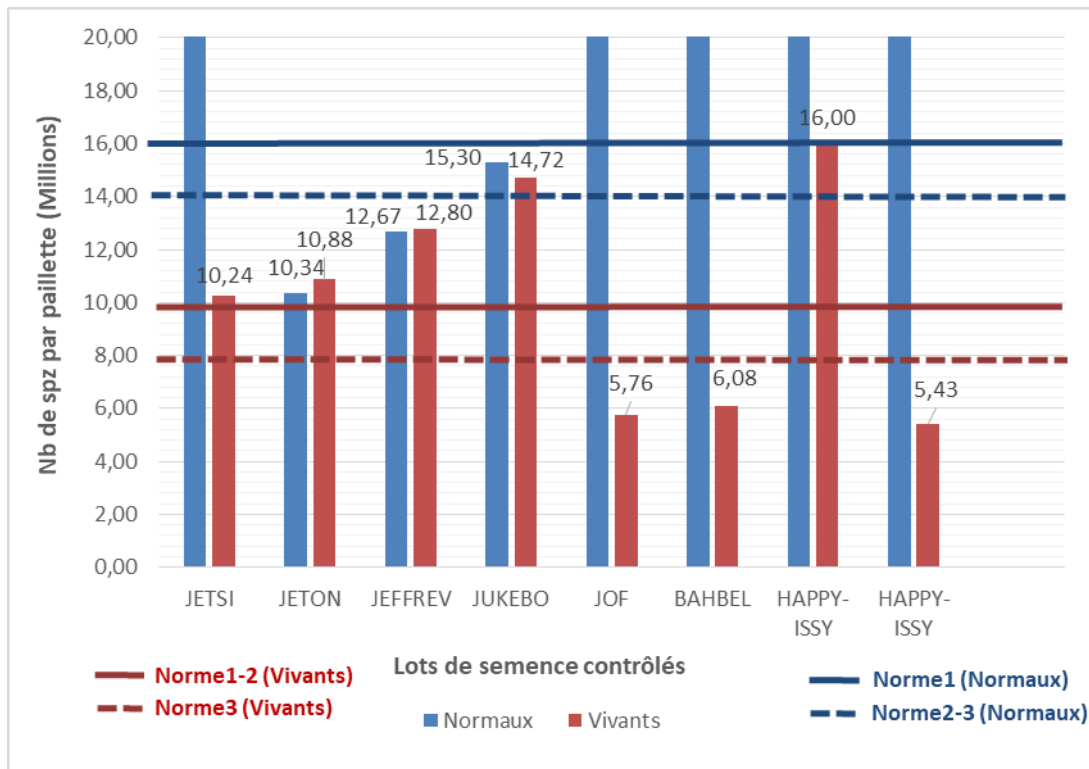
L'ajustement du nombre total de spermatozoïdes par dose à 32 Millions a permis de récupérer 02 sur 08 lots (25%) du groupe 2 (G02) qui sont JEFREV– HAPPY-ISSY et qui étaient de mauvaise qualité avant. Grâce à cette correction, ils ont pu atteindre les seuils d'acceptation en IA pour la mobilité, la vitalité et la morphologie avec la même qualité initiale pour ces paramètres (Voir Figures 29-31).



**Figure 29 : Pourcentage des spz par paillette des 08 lots contrôlés après simulation de correction de ce paramètre ajusté à 32Millions.**



**Figure 30 : Pourcentage des spz mobiles et progressifs de 08 lots contrôlés après simulation de correction du nombre des spz par dose.**



**Figure 31 : Pourcentage des vivants et des normaux des 8 lots contrôlés après ajustement du nombre des spz par dose à 32 millions.**

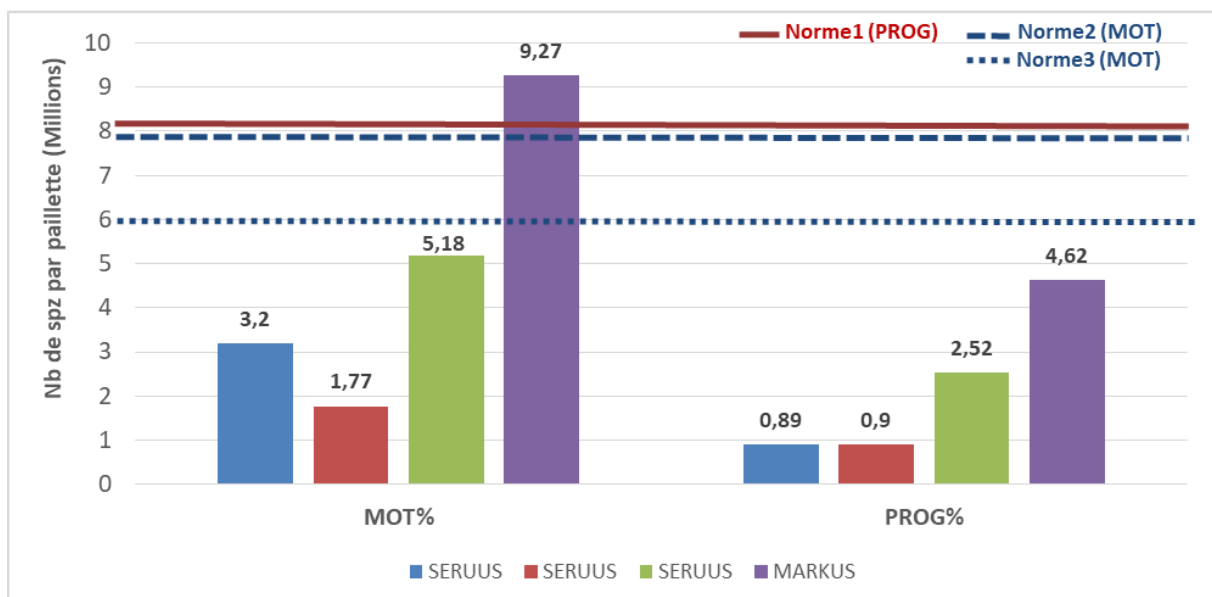
## 2.2. Contrôle de qualité de stockage

### 2.2.1. Les paramètres spermatiques des paillettes exposées au risque de réchauffement

**Tableau 24** : Les paramètres de concentration, mobilité et fonctionnalité membranaire du flagelle de 04 paillettes bovines congelées exposées au risque de réchauffement :

N°	Taureau	Date de production	Concentration (Millions spz/ml)	% des spz mobiles (MOT, %)	% des spz progressifs (PROG, %)	Morphologie % spz normaux
01	SERUUS	17/01/2019	67.49	21.08	05.88	78.20
02	SERUUS	17/01/2019	34.08	23.10	11.80	87
03	SERUUS	17/01/2019	46.32	49.60	24.20	74.70
04	MARKUS	15/03/2020	86.73	47.50	23.70	70.90

### 2.2.2. Contrôle de qualité et application des seuils de décision en IA :



**Figure 32** : Pourcentage des spz mobiles et progressifs des quatre paillettes contrôlées après exposition au risque de réchauffement avec application des normes de qualité (n=8).

Les 04 paillettes bovines congelées analysées dans le cadre d'un contrôle de qualité de stockage « après exposition au risque de réchauffement », s'avèrent être d'une mauvaise qualité biologique, et s'inscrivent en dessous des normes d'acceptation en IA. Le lot dont sont issues ces paillettes est à retirer du circuit d'insémination, car il a été exposé au même risque de réchauffement de l'échantillon contrôlé (n=4).

# **DISCUSSION**

## 4. DISCUSSION

Le centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique (CNIAAG) est un établissement public à caractère industriel et commercial, placé sous la tutelle du MADR, créé par le décret N°88-04 du 05 janvier 1988 modifié par le décret exécutif N° 05-434 du 10 Novembre 2005. Il est chargé essentiellement de tenir et gérer le stock national stratégique de sécurité des semences principalement bovines pour l'amélioration génétique des différentes races dans le cadre de la politique de développement de la production animale en Algérie. Le CNIAAG produit localement la semence à partir des taureaux d'IA importés de l'étranger et la distribue à travers un réseau national d'inséminateurs dans le but d'améliorer le bovin Algérien, il recourt aussi à l'importation de semence congelée de l'étranger.

Dans un centre de production de semence bovine (CPS), tel que le CNIAAG en Algérie, le contrôle de qualité (CQ) doit être systématique et s'adresse à plusieurs facteurs dont les caractéristiques spermatiques ayant un impact direct sur la fertilité et la réussite de l'insémination artificielle. Son objectif est donc de vérifier que la semence produite correspond aux attentes de l'utilisateur et possède un pouvoir fertilisant en IA. Il se pratique en fin du processus de production et permet de prendre une décision quant à l'accepter ou le rejeter de la semence (Sellem et *al.*, 2015). Les paramètres les plus couramment évalués sont la concentration, la mobilité, la vitalité et la morphologie.

### **La concentration spermatique et dilution finale de la semence :**

La concentration spermatique finale en paillette représente un paramètre indispensable, fortement corrélé à la fertilité *in vivo* (Mohanty et *al.*, 2018). La valeur usuelle du nombre de spermatozoïdes dans une paillette produite oscille entre 10 et 20 millions de cellules (Mohanty et *al.*, 2018). Toute chute de ce nombre de spermatozoïdes est associée à une baisse considérable de la fertilité (Vincent et *al.*, 2015 ; Mohanty et *al.*, 2018).

Selon les normes minimales d'Assurance Qualité implémentée en production de semence bovine, 20 millions spermatozoïdes par dose d'IA ou paillette fine (0.25mL) est le seuil appliqué dans le contrôle de ce paramètre en dessous duquel toute semence produite doit être éliminée (Goularte, 2018). Pour avoir 20 millions de spermatozoïdes par paillette fine



ayant un volume utile de 0.21ml, il est nécessaire que la dilution finale de la semence se fasse à la concentration d'environ 95 million/ml ( $20 \div 0.21$ ).

Dans notre étude, la moyenne de concentration spermatique ( $81,83 \pm 3,10$  M/ml) est inférieure à la norme (95 M/ml) et permet d'obtenir des paillettes dosées à 17.18 millions de spermatozoïdes au lieu de 20 millions qui est la norme en vigueur (Goularte, 2018). Notre moyenne s'inscrit au-dessus de celle ( $81,83$  vs.  $67,12$ ) rapportée par Tahri et Djouabi (2018) en utilisant le cytomètre en flux.

L'intervalle de variation de notre moyenne oscille entre 52,5 et 112,25 million/ml. Cette variabilité pourrait s'expliquer par des erreurs dans la dilution finale de la semence lors du processus de cryoconservation. En effet, les sources probables d'erreurs sont la mesure du volume de sperme et du milieu de congélation, la mesure de la concentration spermatique par le photomètre (calibration de l'appareil) et la dilution proprement dite. Selon les données rapportées par Gacem en 2016, le CNIAAG dispose d'un appareil de dilution automatique (diluteur, microlab) qui n'est malheureusement pas utilisé dans la dilution de la semence par le milieu de congélation. Cette dilution est donc effectuée manuellement dans des biberons gradués, ce qui augmente les risques d'erreur.

C'est pour toutes ces raisons que la dilution finale a été considérée comme étant un point de contrôle critique (CCP : critical control point) non compensable dans le système HACCP implémenté pour la première fois en production de semence bovine au Brésil (Goularte et *al.*, 2015), impliquant une concentration inadéquate et une faible vitalité des paillettes.

Par ailleurs, les valeurs moyennes observées sont comparables dans l'évaluation de la concentration spermatique entre la technique de référence (numération à la cellule Neubauer selon OMS 2021) et le système HT IVOS II ( $81,83 \pm 3,10$  M/ml vs.  $85,45 \pm 9,25$ ). Contrairement à nos résultats, une parfaite discordance a été rapporté antérieurement dans la comparaison d'un système CASA différent du nôtre (SCA, Microptics) avec le cytomètre de flux (EasyCyte) à savoir  $313,27$  vs.  $67,12$  Millions spermatozoïdes/ml (Tahri et Djouabi, 2018).

Même si la différence entre les deux techniques paraît être statistiquement non significative, les intervalles de variations sont très différents ( $[52,5 - 112,25]$  M/ml vs.  $[21,47 - 173,66]$  M/ml et  $15,51$  vs.  $46,25$  respectivement pour la microscopie standard et le système HT IVOS II). La comparaison des valeurs individuelles entre elles montre une différence importante

entre les deux techniques. En effet, la corrélation entre les deux techniques n'est pas significative ( $p= 0.19$ ) et le coefficient de Pearson est de 0.18 (Voir Tableau n° 22 et figure 16).

Cette différence pourrait s'expliquer d'un côté par le paramétrage technique (Setup) du système pouvant interférer avec la détection des spermatozoïdes ainsi que le phénomène d'agglutination, comme source de sous-estimation de la concentration, et d'un autre côté par le phénomène de collision entre spermatozoïdes morts et vivants et diffraction et dédoublement de leurs trajectoires comme source de surestimations de la concentration. Une optimisation de ce paramétrage de détection cellulaire des spermatozoïdes bovin par le système HT IVOS II serait fortement recommandée afin de rendre ce système fiable dans la mesure de la concentration, ce qui représenterait un gain de temps en CQ (Verstegen et al., 2002 ; Douglas-Hamilton et al., 2005 ; Gączarzewicz, 2015 ; Shubert et al., 2019).

Une étude récente s'est intéressée à la comparaison de plusieurs paramétrages du système IVOS II dans l'évaluation de la semence bovine congelée et a recommandé un Setup standardisé (O'Meara et al., 2021). Cependant cette étude ne s'est pas intéressée à la comparaison entre le système HT IVOS II et la technique standard de référence ni à l'optimisation des paramètres de détection cellulaire qui impactent directement le paramètre concentration.

### **La mobilité spermatique :**

La mobilité est l'une des caractéristiques les plus importantes à associer à la capacité fécondante des spermatozoïdes. Elle est mieux analysée aux moyens des systèmes assistés par ordinateur (CASA) offrant l'avantage de la précision et la rapidité, notamment dans le contexte du contrôle de qualité. Cependant, à l'instar de beaucoup d'autres CPS, le CNIAAG, ne disposant pas de moyens d'analyse objective « Système CASA » effectue le contrôle de qualité de la semence congelée-décongelée par une analyse subjective basée sur l'observation microscopique de la mobilité. Hors, plusieurs auteurs (Farrell et al., 1998 ; Junaskanskas et al., 1999 ; Sellem et al., 2015) rapportent que l'analyse subjective de la motilité du sperme n'est pas corrélée à la fertilité du sperme en IA et que par contre, cette dernière est corrélée significativement à la motilité totale (Wood et al., 1986, Kjaestad et al.,

1993, Correa et *al.*, 1997, Gillan et *al.*, 2008) et progressive (Kathiravan et *al.*, 2008) des spermatozoïdes bovins.

Les moyennes de motilité totale ( $22,09 \pm 3,10\%$ ) et progressive ( $11,72 \pm 2,64\%$ ) évaluées dans notre étude au moyen du système HT IVOS II s'avèrent être très insuffisantes et s'inscrivent en dessous des normes d'acceptation en IA (40%). Nos résultats s'inscrivent légèrement au-dessus de ceux (MOT : 19,85% ; PROG : 07,22%) rapporté par Tahri et Djouabi (2018) dans une étude antérieure sur 14 taureaux du CNIAAG. Malheureusement, dans cette étude, l'analyse de la mobilité par le système SCA (Version 6.2 Evolution) pourrait être compromise par le milieu de dilution utilisé ainsi que l'emploi d'une lame-lamelle ordinaire au lieu d'une chambre d'analyse pré calibrée à usage unique (tel que la Leja, 20 $\mu$ m) comme recommandé dans la littérature. L'utilisation d'une lame-lamelle ordinaire provoquerait l'incidence de plusieurs phénomènes de mécanique des fluides qui peuvent modifier par écrasement les trajectoires des spermatozoïdes induisant des erreurs dans l'analyse cinétique et générer des erreurs (par défaut et par excès) dans l'estimation de la concentration et des pourcentages de mobilité.

#### **La vitalité spermatique et l'intégrité fonctionnelle flagellaire des spermatozoïdes :**

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants est un paramètre très important dans l'évaluation de la qualité de la semence bovine congelée-décongelée qui est fortement corrélé avec la fertilité in vivo (Palmer, 2021). Dans notre étude, il a été évalué au moyen du test hypo-osmotique (HOST) et a donné une moyenne de  $31,73 \pm 4,24\%$ . Cette valeur est inférieure à la norme d'acceptation en IA la plus restrictive qui est d'au moins 50% de spermatozoïdes vivants. Elle est par contre supérieure aux pourcentages de vitalité rapportés dans les études antérieures à savoir 29,15% (Oulebsir, 2015), 23,96% (Gacem, 2016), 19,21% et 18,53% (Tahri et Djouabi, 2018).

Ces écarts pourraient s'expliquer par deux éléments à savoir :

- Une relative amélioration dans la gestion de la qualité en production de semence au CNIAAG entre 2015-2018 et la période actuelle de notre étude ;
- Une différence des techniques d'analyse utilisées.

En effet, concernant ce deuxième point, la vitalité a été évaluée dans les études comparatives, par la coloration vitale éosine/nigrosine (29.15%, Oulebsir, 2015), (19.21%, Tahri et Djouabi, 2018) et par cytométrie de flux (23.96%, Gacem, 2016 ; 18.53%, Tahri et Djouabi, 2018) qui renseignent sur l'intégrité membranaire structurale du spermatozoïde, alors que dans notre étude, le test hypo-osmotique explore l'intégrité et la fonctionnalité membranaire flagellaire (Correa et Zavos, 1994). Dans nos études antérieures sur la semence canine, les résultats du test hypo-osmotique ont toujours été relativement supérieurs à ceux des colorations vitales (SYBR14/IP) à savoir  $92.60 \pm 1.22$  vs.  $87.00 \pm 1.66$  (Belala et *al.*, 2016) et  $50.03 \pm 3.21$  vs.  $40.16 \pm 2.06$  (Belala et *al.*, 2019) respectivement pour le test hypo-osmotique et la coloration vitale SYBR14/IP.

Par ailleurs, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs s'avère être dans notre étude trop faible par rapport au seuil d'acceptation en IA (11,72 vs. 40%) par rapport au pourcentage de vitalité comparé à la norme (31,73 vs. 50%). Cette faible corrélation entre la vitalité et la motilité progressive s'expliquerait selon Palmer (2021) par :

- Un taux élevé d'anomalies morphologiques de la pièce intermédiaire et la pièce principale des spermatozoïdes ;
- Une éventuelle contamination chimique de la semence pendant le procès de production (Palmer, 2021).

Concernant la première hypothèse explicative, elle pourrait concorder avec nos résultats de la morphométrie qui montrent que les anomalies les plus fréquentes sont la gouttelette proximale (16%) et le flagelle replié (16,12%). Cependant, ces taux demeurent en dessous du seuil de rejet (30%).

Quant au risque de contamination chimique de la semence, il n'existe aucun moyen dans notre étude de le confirmer ou de l'infirmier, car il faudra effectuer une démarche d'audit au niveau du CNIAAG pour évaluer et identifier ce risque chimique. Ce dernier, s'il existe, serait éventuellement associé aux résidus des produits de détergence et désinfection utilisés dans l'hygiène et la préparation des taureaux d'IA, du boute-en-train et de la semence ainsi que le nettoyage et la désinfection du matériel pouvant rentrer en contact avec la semence (Goularte et *al.*, 2015 ; 2018).

### **La morphologie et la morphométrie des spermatozoïdes :**

Le pourcentage moyen des spermatozoïdes normaux évalué par le système HT IVOS II (n=26) est à la limite satisfaisant ( $66,10 \pm 4,01$  %) car égal au seuil d'acceptation en IA qui est d'au moins 70% (Palmer, 2021). Notre résultat est inférieur à celui rapporté antérieurement (66,10 vs. 80,49) dans une étude conduite sur 14 taureaux du CNIAAG (Tahri et Djouabi, 2018).

Cependant, les valeurs individuelles par paillettes varient de 13,4% pour le taureau CHARLY récolté le 11/11/2021 et 88,3% pour JACK récolté le 21/12/2021. Dans cet intervalle, cinq paillettes oscillent entre 13,4 et 66,6% spermatozoïdes normaux, s'inscrivant ainsi en dessous du seuil d'acceptation en IA. Pour ces 5 lots de semence, il sera tenu compte de ces résultats individuels dans le contrôle de qualité biologique.

Les taux des anomalies enregistré dans notre étude est de 33,9% réparti sur les anomalies suivantes : la gouttelette proximale ( $16 \pm 4,03\%$ ), la gouttelette distale ( $6,50 \pm 0,55\%$ ), la pièce intermédiaire réfléchie « DMR » ( $1,15 \pm 0,23\%$ ), le flagelle enroulé ( $3,15 \pm 0,52\%$ ) et le flagelle replié ( $16,12 \pm 1,82\%$ ). Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Tahri et Djouabi (2018) à savoir un taux d'anomalie de 19,50% dont 18,96% concerne seulement le flagelle. Il est à remarquer dans notre étude, que les anomalies les plus fréquentes sont la gouttelette proximale (16%) et le flagelle replié (16,12%) totalisant à elles seules un taux de 32,12%.

La gouttelette cytoplasmique proximale est une anomalie fortement corrélée à la fertilité du taureau car les spermatozoïdes atteints ont été prouvés récemment incapables de se fixer et de pénétrer l'ovocyte (Palmer, 2021). Cette anomalie majeure non compensable est un bon indicateur de la spermatogénèse, les cellules atteintes apparaissent dans l'éjaculat du taureau environ une semaine après l'atteinte de la spermatogénèse. Un taux élevé de cette anomalie signifie donc une perturbation de la spermatogénèse au niveau épидидymaire ou testiculaire. Cette anomalie morphologique est utilisée comme indicateur fiable et un critère restrictif dans le suivi de la fonction reproductrice et la classification du pouvoir reproducteur des taureaux d'IA (Barth, 1989 ; Morrel et *al.*, 2008 ; Palmer, 2021).

Le pourcentage de gouttelette cytoplasmique varie dans notre étude de 1 à 78,4% avec des pourcentages dépassant le seuil de 30% pour seulement cette anomalie chez 4 taureaux d'IA parmi ceux étudiés. Il s'agit de JETON récolté le 02/11/2021 (50,10%), JEFREV récolté le

11/10/2021 (49,9%), CHARLY récolté le 11/11/2021 (32,60% et 78,4%) et SYMBA récolté le 23/09/2020 (53,8%).

Pour les deux derniers taureaux (JEFREY et CHARLY), les taux de motilité totale sont respectivement 27,1% et 32,5%, la motilité progressive respectivement 16,6% et 23,2% et la vitalité respectivement 40% et 55%. Ces résultats de mobilité et de vitalité qui tendent vers la satisfaction des critères d'IA confirment que cette anomalie n'est pas corrélée avec la mobilité et la vitalité (Palmer, 2021). Ces résultats de bonne mobilité et vitalité peuvent induire en erreur dans le CQ car ces spermatozoïdes porteurs de gouttelette proximale restent incapables de se fixer et pénétrer la zone pellucide.

Il est donc fortement recommandé à l'intention du CNIAAG de procéder à un suivi de la fonction reproductrice de ces taureaux à la recherche d'éventuelles atteintes épидидymaires et/ou testiculaires et de se prononcer quant à leur avenir reproducteur.

Par ailleurs, une comparaison a été faite sur 11 paillettes et a montré une parfaite concordance ( $p > 0.05$ ) entre la technique microscopique standard et le système HT IVOSII dans l'évaluation du pourcentage des spermatozoïdes normaux ( $75,56 \pm 3,56$  vs.  $68,37 \pm 5,58$  respectivement). Ceci est en faveur de l'utilisation du système IVOS II en CQ comme une technique fiable et beaucoup plus rapide que la microscopie. Cependant, en vue de la faible taille de l'échantillon étudié ( $n=11$ ) il est recommandé d'effectuer à l'avenir des études comparatives sur des échantillons plus importants.

Même si la différence entre les deux techniques est statistiquement non significative, les résultats de la microscopie standard tendent à être supérieurs à ceux de l'analyseur HT IVOSII. En effet la comparaison des valeurs individuelles entre elles montre une différence importante entre les deux techniques. La corrélation entre elle n'est pas significative ( $p = 0.39$ ) et le coefficient de Pearson est de 0.09 (Voir figure 15 et tableau 19).

Cette tendance pourrait s'expliquer par le fait que ce système est paramétré pour évaluer seulement cinq types d'anomalies concernant la pièce intermédiaire et la pièce principale du spermatozoïde. Les anomalies de la tête échappent à la morphométrie ce qui aurait une légère tendance à sur estimer le pourcentage des spermatozoïdes normaux et sous-estimer celui des anormaux.

### **Justification des normes de qualité utilisées en CQ.**

Les valeurs moyennes discutées jusque-là donnent une idée globale de la qualité de la semence bovine congelée, mais ne constituent pas un contrôle de qualité qui est l'objectif du présent travail. En effet, le CQ s'adressent individuellement à des lots de semence produits pour juger leurs qualités et permettre la prise de décision quant à leur correspondance aux objectifs des utilisateurs « pouvoir fertilisant » (Harstine *et al.*, 2018). Donc, on ne peut appliquer un contrôle de qualité sans disposer de normes de qualité ou autrement dits de seuils de décision (acceptation et rejet) en IA. L'objectif de la qualité étant la fertilité, donc la réussite en IA. En effet, il existe dans la littérature plusieurs seuils d'acceptation en IA de la semence bovine congelée-décongelée. Généralement, ces seuils concernent le nombre total en millions de spermatozoïdes par paille, la mobilité, la vitalité et la morphologie.

Concernant la concentration ou plus exactement le nombre total des spermatozoïdes par paille, exprimé en millions de spermatozoïdes par paille ou dose, l'objectif varie de 10-15 millions à 30-40 millions (Référence) avec un optimum de 20 millions/dose (Goularte, 2015 ; Prasad, 2020).

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est un paramètre déterminant dans le contrôle de qualité de la semence, plusieurs seuils sont aussi rapportés à savoir 8 millions spermatozoïdes mobiles fléchant « progressifs » (Traore, 1996), 8 millions spermatozoïdes mobiles sans condition de progressivité et même 6 millions spermatozoïdes mobiles pour certains auteurs (Gerard *et al.*, 2008).

Quant à la vitalité, deux seuils sont rapportés, 10 millions spermatozoïdes vivant « soit 50% pour une paille dosée à 20 millions spermatozoïdes » et 8 millions spermatozoïdes vivants et réactifs au test hypo-osmotique « HOST » « soit 40% pour une paille dosée à 20 millions spermatozoïdes » (Poussga, 2002 ; Prasad, 2020).

En morphologie, beaucoup d'auteurs ont rapporté le seuil de 16 millions spermatozoïdes normaux pour 4 millions d'anormaux « soit 80% de normaux et 20% d'anormaux pour une paille dosée à 20 millions » (Prasad, 2020). D'autres auteurs ont rapporté le seuil de 14 millions de normaux « soit 70% pour une paille dosée à 20 millions » en admettant 6 millions (30%) d'anormaux, mais sans pour autant que les anomalies majeures qui

impliquent des troubles de spermatogénèse ne dépasse les 2 millions « soit 20% » (Dumont, 1997 ; Palmer, 2021).

A partir de toutes ces données, nous avons hiérarchisé ces seuils de décision sur une échelle de degré de restriction et présenté trois normes de qualité depuis la plus restrictive (soit la norme 01) jusqu'à la moins stricte (soit la norme 03). Notre objectif étant de proposer pour le CQ la norme la moins restrictive qui s'adapte le mieux à la situation en Algérie en attendant l'amélioration des choses par l'implémentation d'un système de gestion de la qualité. Ainsi, le CQ n'aura pas de lourdes conséquences économiques en matière de pertes consécutives au rejet de la semence jugée de mauvaise qualité.

### **Résultats du Contrôle de Qualité**

En général, sur les 17 lots de semence bovine congelée contrôlés dans notre étude, 08 lots montrent une mauvaise qualité biologique et s'inscrivent nettement en dessous des normes d'acceptation et sont à retirer du réseau de distribution en IA, 08 lots de qualité douteuse méritant une confirmation par décongélation et contrôle d'une deuxième voire troisième paillette du même lot. Seulement un lot conforme aux normes d'acceptation en IA ; ce dernier s'avère être un lot de semence importée.

Comme le lot MERCUTIO (17/05/2019) est un lot de semence importée de l'étranger ; il ne représente pas la production locale et devrait être retiré de la base du calcul. Les résultats deviennent alors 08/16 (50%) lots de mauvaise qualité et 08/16 (50%) lots de qualité douteuse.

Ces résultats restent très insuffisants même en appliquant la norme de qualité la moins restrictive « norme3 » n'exigeant que 6 millions spermatozoïdes mobiles par paillette au lieu de 8 millions fléchant (progressifs) et juste 8 millions de vivants au lieu de 10 millions par dose. Ils sont par ailleurs en concordance avec ceux rapportés dans des études précédentes (Oulebsir 2015 ; Gacem, 2016 ; Tahri et Djouabi, 2018) effectuées sur 31 lots de semence produite par le CNIAAG entre 2014 et 2018. En l'occurrence, 50% versus 51,62% (16/31) lots de qualité douteuse et 50% versus 48,38% (15/31) lots de mauvaise qualité impliquant la décision de rejet en IA et le retrait du réseau de distribution.



### **Compensation de la qualité par augmentation de la concentration**

Face à cette situation inquiétante liée à la mauvaise qualité de la semence bovine produite en Algérie, et vu que l'on ne peut descendre en dessous de 6 millions de mobiles comme objectif de fertilité, il serait judicieux de recommander au CNIAAG de procéder à une mesure compensatrice en augmentant le nombre de spermatozoïdes par dose. L'objectif actuel du CNIAAG est 18Millions (Gacem, 2016), son augmentation à 32Millions pourrait apporter l'effet de compensation souhaitée. Ce nouvel objectif (32Millions) est obtenu par la concentration de 150 millions spermatozoïdes par ml après dilution finale de la semence avant mise en paillettes. Cette mesure transitoire, en attendant l'implémentation d'un système de gestion de la qualité, serait à même de compenser la faible mobilité et vitalité observée et de permettre d'atteindre aisément les seuils d'acceptation de la norme 3 la moins restrictive (6 millions mobiles, 8 millions vivants et 14 millions normaux par paillette contenant 32 millions spermatozoïdes) et peut être même la norme 2 pour certains lots contrôlés.

Un nombre total de spermatozoïdes par dose de l'ordre de 30 et 40 millions a déjà été recommandé dans la littérature et beaucoup de centres de production de semence fixent leur objectif à 25 millions spermatozoïdes par paillette (Kabera, 2008 ; Prasad, 2020).

En effet, une simulation de correction du nombre de spermatozoïdes par dose a été effectuée dans notre étude en l'ajustant à 32 millions pour les lots déjà contrôlés. Cette compensation a permis alors de récupérer au total 07 lots sur 16 (43,75%) qui étaient non conformes soit de qualité douteuse (2/8 : 25%) ou de mauvaise qualité avérée (5/8 : 62,50%) et destinés à la destruction. Grâce à cette mesure compensatrice simulée, ils ont pu atteindre les seuils d'acceptation en IA pour la mobilité, la vitalité et la morphologie avec la même qualité initiale pour ces paramètres (Voir Figures 26-31). Ceci confirme la validité de cette mesure compensatrice qui permet d'éviter des pertes économiques lourdes de conséquences dues soit à la destruction des lots en cas de CQ soit à un échec d'IA certain en cas de distribution de cette semence de mauvaise qualité.

Enfin, il serait plus judicieux de pratiquer cette compensation pour les taureaux d'IA qui ne donnent pas complète satisfaction en matière de mobilité et de vitalité « gardés temporairement en production » et de conserver éventuellement l'objectif actuel de 18

millions voire 20 millions spermatozoïdes par paillette pour les taureaux de bonne qualité spermatique.

Cependant, il faudra faire attention aux traits spermatiques non compensables, tel que les taux élevés d'anomalies majeures « morphologie » reflétant des troubles de spermatogénèse dans quel cas la destruction de l'éjaculat et le suivi du taureau sont des mesures indispensables.

### **Les causes de la mauvaise qualité de la semence :**

Pour remonter jusqu'à l'origine et trouver les vraies raisons de cette mauvaise qualité biologique de la semence, il faudra adopter une démarche d'audit afin d'inspecter tous les points de contrôle ordinaires ou critiques (HACCP) pouvant influencer la qualité de la semence à travers les différentes étapes du process technologique de production ou organigramme de production. Cet organigramme varie d'un centre de production à un autre en fonction des méthodes technologiques adoptées. Ainsi, pour cerner cette problématique, il est fortement recommandé de lancer à l'avenir une étude sur la mise en place d'un système de gestion de la qualité et d'une démarche d'analyse de risque (HACCP) au niveau du CNIAAG.

A partir des données rapportées par Gacem en 2016 (Gacem, 2016), nous avons essayé d'arrêter une esquisse d'organigramme de production le plus adapté possible au CNIAAG et qui se compose de 14 étapes présentées ci-dessous :

1. Statut sanitaire du taureau
2. L'hygiène du prépuce des taureaux et du bout en train
3. Collecte de sperme
4. Identification et acheminement du prélèvement (Fenêtre à doubles vitre)
5. Peser de l'échantillon pour la détermination du volume
6. Détermination de la concentration spermatique
7. Evaluation de la mobilité spermatique
8. Dilution (Une seule étape à 37°C)
9. Courbe de refroidissement et équilibrage
10. Remplissage et identification des paillettes
11. Courbe de congélation

12. Immersion en azote liquide
13. Décongélation et évaluation des paillettes (24h après)
14. Stockage

Parmi les causes probables pouvant expliquer la mauvaise qualité biologique de la semence produite par le CNIAAG, on peut citer **la contamination microbiologique** de la semence et le statut infectieux ainsi que sanitaire du taureau d'IA et du bœuf en train. Notamment que ce point a été identifié comme un point critique de contrôle non compensable dans l'étude de Goularte et ses collaborateurs en 2015.

En effet, certains agents pathogènes peuvent influencer directement la fertilité du taureau soit en provoquant des maladies reproductives ou en affectant le pouvoir fertilisant des spermatozoïdes (Givens et Marley, 2008). Certaines maladies virales telles que la BVD et l'IBR peuvent se transmettre par la semence de taureaux infectés (Givens et Waldrop, 2004) et peuvent aussi se transmettre par semence congelée car ces virus résistent au processus de cryoconservation (Daliri *et al.*, 2007), d'où l'intérêt d'un suivi rigoureux du statut sanitaire des taureaux d'IA ainsi que l'observation d'une quarantaine de la semence congelée avant de la stocker définitivement en banques de semence. D'autres sources de contamination microbiologique de la semence par mauvaise hygiène sont à rechercher lors de la récolte, l'acheminement et la manipulation de la semence jusqu'à sa mise en paillettes.

Il est vrai que l'ajout d'antibiotiques au milieu de congélation de la semence bovine (conformément à la norme CEE 88/407) représente une protection contre la contamination bactérienne du sperme. Cependant, cette protection est loin d'être infaillible car d'un côté elle est inefficace contre les virus, et de l'autre beaucoup de microorganismes peuvent résister à ces antibiotiques (Madeira *et al.*, 2014).

En plus de la contamination microbiologique de la semence, **la fertilité des taureaux d'IA** du CNIAAG est une cause probable à incriminer dans la mauvaise qualité de la semence produite (Brito *et al.*, 2002 ; DeJarnette *et al.*, 2004). En effet, une évaluation continue de la fonction reproductrice des taureaux d'IA est obligatoire en centre de production de semence (Sellem *et al.*, 2015).

Plusieurs auteurs ont développé des standards d'évaluation de la fonction reproductrice permettant d'effectuer une classification du potentiel reproducteur des taureaux d'IA. Ainsi,

le taureau d'IA peut être classé comme : satisfaisant, différé ou non satisfaisant et il sera par conséquent soit maintenu ou réformé (Barth, 2013 ; Koziol et Armstrong, 2018). Cette évaluation se base sur trois catégories majeures de tests à savoir : l'examen médical général, la circonférence scrotale et la qualité de la semence (spermogramme). Ce dernier est l'examen le plus important, il comprend la couleur, la consistance et le volume du sperme, ainsi que la concentration, la mobilité massale, la mobilité individuelle, la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes (Palmer, 2021).

Ainsi, le CNIAAG pourrait améliorer la qualité de la semence produite en effectuant un suivi rigoureux de la fonction reproductrice de ses taureaux et en adoptant par conséquent une politique de réforme et de renouvellement des animaux classés non satisfaisants.

En plus de la contamination bactérienne de la semence et la fertilité des taureaux d'IA, **la valeur génétique** (additive) des reproducteurs du CNIAAG peut également être une cause expliquant la mauvaise qualité de la semence. En effet, la sélection à l'achat des taureaux d'IA doit se faire avec le maximum de rigueur scientifique et technique, sur la base de l'ascendance, les collatéraux, la descendance ainsi que les performances individuelles, et l'élaboration des cahiers de charge doit être confiée à des experts nationaux.

Par ailleurs, il a été observé que contrairement aux paillettes produites par le CNIAAG, celles importées (n=02) ont satisfait à la norme d'acceptation en IA (MOT : 8,46 et 11,95 M/dose ; PROG : 6,15 et 8,09 M/dose) qui varie de 6 à 10 avec une moyenne de 8 M/dose. Ces résultats nous permettent donc d'éliminer d'emblée un éventuel **problème de stockage et de contrôle du niveau d'azote liquide** étant donné que toutes les paillettes (locales et importées) se trouvent dans les mêmes conditions. Cependant, en vue du nombre réduits des paillettes importées (n=02), ces résultats ne peuvent être considérés comme significatifs. Il est donc recommandé de relancer une étude comparative avec un nombre plus important de paillettes.

#### **Discussion des résultats du CQ de stockage chez l'inséminateur :**

En plus de la production, le CQ peut s'adresser à l'évaluation des conditions de stockage et de transport de la semence et peut être motivé par une exposition au risque de réchauffement des paillettes suite à un incident de stockage.

En effet, si les problèmes de stockage et de contrôle du niveau d'azote liquide sont à éliminer d'emblée au niveau du CNIAAG, comme mentionné précédemment, il n'en est pas de même chez l'inséminateur. Ce dernier est un intervenant capital dans le réseau de distribution et de stockage de la semence et il représente ainsi un facteur impactant agissant sur la qualité de la semence bovine congelée qui peut être fortement détériorée par des incidents de stockage.

Avant de parler du risque de réchauffement par exposition à des températures positives, il faudra évoquer le risque le plus récurrent qui passe inaperçu par imprudence de l'inséminateur ou de ses assistants qui ne sont pas formés en conséquence. Il s'agit du risque de recristallisation de l'eau à des températures entre -100 et -80°C généralement à l'occasion d'une manipulation des paillettes en zone dangereuse (à moins de 10 cm du haut du cou de la bombonne) pendant plus de 10 secondes en vue de les transférer ou les vérifier avant utilisation (Swanand, 2021 ; Saacke et *al.*, 1997).

Dans notre étude, les 4 paillettes utilisées pour le CQ de stockage proviennent de chez un vétérinaire inséminateur bovin suite à un incident de renversement de la bombonne d'azote qui est restée par terre (en position horizontale) pendant environ 15min avant la remise à niveau de l'azote liquide et l'envoi de quatre paillettes de ce lot pour un CQ.

Les résultats obtenus pour ces paillettes s'inscrivent en dessous des normes d'acceptation en IA, d'où leur mauvaise qualité biologique impliquant leur rejet du réseau d'IA (Voir Figure 32). Malgré cela, les résultats de mobilité (21,08, 23,10, 49,60 et 47,50 % de motilité totale, voir tableau 24) obtenus ne concordent pas avec l'incident de réchauffement des paillettes à température ambiante pendant 15min. Si tel était vraiment le cas, la mobilité serait nulle.

L'hypothèse explicative est que le renversement du contenant ne l'a pas complètement vidé d'azote liquide. Un volume résiduel a permis de conserver la vitalité et la mobilité des paillettes. En effet, selon le guide des haras nationaux, un seuil limite du niveau d'azote de 10 cm dans la bombonne peut préserver au minimum la semence. Dans ce cas, une remise à niveau immédiate de l'azote liquide et un CQ des paillettes exposées s'avère être obligatoire. Si par contre le niveau d'azote descend en dessous du seuil de 10cm, une destruction automatique de paillettes est recommandée sans recourt au CQ (Anonyme, 2009).

A la lumière de ces résultats, il est fortement recommandé à l'intention des inséminateurs intervenant dans le réseau de distribution de la semence bovine congelée d'observer les règles de bonne conduite en matière de stockage, en effectuant un contrôle régulier du niveau d'azote liquide ainsi qu'un contrôle de la qualité biologique de la semence en cas d'exposition au risque de réchauffement des paillettes.

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

A l'issu de cette étude, il est à conclure ce qui suit :

- La concentration spermatique moyenne ( $81,83 \pm 3,10$  M/ml) est légèrement inférieure à la norme (95 M/ml) et permet d'obtenir des paillettes dosées à 17.18 millions de spermatozoïdes au lieu de 20 millions qui est la norme en vigueur.
- Les pourcentages moyens de spermatozoïdes motiles ( $22,09 \pm 2,24\%$ ) et progressifs ( $11,72 \pm 2,08\%$ ) évalués par le système HT IVOS II sont très insuffisants et s'inscrivent en dessous des normes d'acceptation en IA (30-40%).
- Le pourcentage moyen des spermatozoïdes vivants à flagelle réactionnel ( $42,40 \pm 19,08\%$ ) évalué au moyen du test hypo-osmotique (HOST) est légèrement inférieur à la norme d'acceptation en IA qui est d'au moins 50% de spermatozoïdes vivants pour la norme la plus restrictive. Par contre, ce pourcentage dépasse légèrement le seuil de la norme la moins restrictive n'exigeant que 40% de spermatozoïdes vivants.
- Le pourcentage moyen des spermatozoïdes normaux évalué par le système HT IVOS II est à la limite satisfaisant ( $66,10 \pm 4,01\%$ ) car il atteint presque le seuil d'acceptation en IA qui est d'au moins 70% pour les normes les moins restrictives. Par contre, ce pourcentage n'atteint pas le seuil de la norme qui exige au moins 80% de normaux.
- Le pourcentage de gouttelette cytoplasmique varie dans notre étude de 1 à 78.4% avec des pourcentages dépassant le seuil de 30% pour seulement cette anomalie chez 3 taureaux d'IA parmi ceux étudiés. Il s'agit de JETON récolté le 02/11/2021 (50,10%), JEFREY récolté le 11/10/2021 (49,9%), CHARLY récolté le 11/11/2021 (32,60% et 78,4%). Ceci signifie la présence d'une perturbation de la spermatogénèse au niveau épидidymaire ou testiculaire chez ces taureaux.
- L'application des normes de qualité permet de conclure que sur les 17 lots de semence contrôlés, 08 sont de mauvaise qualité biologique car en dessous des normes d'acceptation en IA et seraient à retirer du réseau de distribution, 08 (une seule paillette analysée) sont de qualité douteuse et nécessitent la décongélation et le contrôle d'une 2<sup>ème</sup> paillette, et seulement un lot de bonne qualité biologique qui s'avère être un produit d'importation. Ces résultats médiocres du CQ « 50% mauvaise qualité et 50% qualité douteuse » restent inchangés même en appliquant les seuils



d'acceptation en IA les moins restrictifs « au moins 6 millions spermatozoïdes mobile, 8 millions spermatozoïdes vivant et 14 millions normaux ».

- La mauvaise qualité de la semence bovine congelée produite en Algérie s'avère être une cause déterminante par d'autres pouvant expliquer les taux élevés d'échec en IA. Cependant, ses causes ne peuvent être déterminées sans l'implémentation d'un système de gestion de la qualité en production de semence.
- L'objectif actuel du CNIAAG en matière du nombre des spermatozoïdes par paillette est « 18 millions/dose ». Son rehaussement jusqu'à 32 millions/dose a permis de compenser la qualité et de récupérer au total 07 lots sur 16 (43,75%) qui étaient non conformes soit de qualité douteuse (2/8 : 25%) ou de mauvaise qualité avérée (5/8 : 62,50%) et destinés à la destruction.
- Le système HT IVOS II est une technique objective ayant un grand intérêt (Précision, exactitude, rapidité) en CQ essentiellement dans l'analyse de la mobilité. Son intérêt dans la mesure de concentration et la morphométrie comme alternative aux techniques standard demeure sous réserve d'une optimisation de son paramétrage technique afin de standardiser et valiser son utilisation en CQ.

# **RECOMMENDATIONS**

## RECOMMANDATIONS

A l'issu de notre travail, il est à recommander ce qui suit :

### ❖ **A l'attention du secteur de la recherche scientifique :**

- ✓ Intensifier les enquêtes de terrain et les explorations sur l'impact de la qualité de la semence sur la réussite et l'échec de l'IA (*Le facteur semence est le moins exploré par les chercheurs en Algérie*).
- ✓ Orienter les mémoires, les thèses et les projets de recherche sur la problématique de la gestion de la qualité en production de semence bovine congelée en Algérie.

### ❖ **A l'attention des responsables du CNIAAG (Secteur MADR) :**

#### ➤ Mesures à moyen terme :

- ✓ Il est fortement recommandé au CNIAAG de procéder à un large CQ de son stock stratégique de semence bovine aux moyens des techniques objectives (*CASA+CMF*) notamment qu'il dispose déjà d'un CMF.
- ✓ Confronter les résultats du CQ sur semence congelée aux résultats de fertilité du terrain (*in vivo*) des différents taureaux et lots soumis préalablement au CQ (*l'application « Plagiart-dz » pourrait être exploitée à cette fin : fertilité exprimée par taureaux et par lots*).
- ✓ Envisager la destruction des lots de mauvaise qualité biologique et renouvellement du stock avec une semence remplissant les conditions de qualité (*voir plus loin stratégie AQ*).
- ✓ Utiliser l'application « *Plagiart-dz* » pour évaluer objectivement la fertilité par taureau (*Sélectionner des inséminateurs et des élevages pilot pour éviter l'effet des autres facteurs d'influence*).
- ✓ Confronter simultanément ces résultats (*fertilité par taureau*) à ceux du CQ sur semence fraîche et du suivi de la fonction reproductrice de ces mêmes taureaux (*Lequel suivi est censé être pratiqué systématiquement par le centre de testage du CNIAAG*).

- ✓ Instaurer une politique de réforme et de renouvellement des taureaux d'IA en fonction des résultats précédents.
  - ✓ La sélection (*A l'achat et à la production*) des taureaux d'IA doit se faire avec le maximum de rigueur scientifique et technique, et l'élaboration des cahiers de charge doit être confiée à des experts nationaux (*Génétiens, zootechniciens, andrologues, juristes : garantie contractuelle et période et rétrocession ...*).
  - ✓ Implémentation d'un système de gestion de la qualité et d'analyse des risques (HACCP) qui soit adapté aux conditions de fonctionnement du CNIAAG (S'inspirer des expériences d'autres pays : Brésil, Inde).
  - ✓ Application rigoureuse du contrôle sanitaire sur taureaux d'insémination (*Dépistage régulier BVD, IBR, Leptospirose, Brucellose, Tuberculose, Campilobactériose, Trichomonose, Leucose bovine enzootique*), et de la mesure préventive de mise en quarantaine de la semence congelée pour une période de 30j (*Période d'observation du taureau donneur*).
- Mesures à court terme (Mesures transitoires ou compensatrices) :
- ✓ Introduire un système de CQ hybride associant la technique standard (*Microscopie*) et la technique objective utilisant conjointement (*CASA + CMF*).
  - ✓ Alléger temporairement les normes de qualité et les seuils de décision (*Acceptation et rejet en IA*) en les adaptant à la situation en Algérie « **+6 Million spermatozoïdes mobiles/dose ; +8 Million spermatozoïdes vivants/dose ; +14 Million spermatozoïdes normaux/dose** ».
  - ✓ Augmenter le nombre de spermatozoïdes par paillette de 18 Millions (*Objectif actuel*) à **32 Millions spermatozoïdes / paillette** pour ainsi compenser la mauvaise qualité par la concentration.
  - ✓ Adapter le CQ en fonction des performances et de la fertilité des taureaux : Application des seuils restrictifs de décision (*+8 Million spermatozoïdes progressifs ; +10 Millions spermatozoïdes vivants ; 16 Millions spermatozoïdes normaux/dose*) pour les taureaux de bonne fertilité et les seuils les moins restrictifs « *+6 Million spermatozoïdes mobiles/dose ; +8 Million spermatozoïdes vivants/dose ; +14 Million spermatozoïdes normaux/dose* » proposés précédemment pour les taureaux de moindre fertilité.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alvarez, C., Castilla, J.A., Ramirez, J.P., Vergara, F., Yoldi, A., Fernandez, A., Gaforio, J.J., 2005. External quality control program for semen analysis: spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 22, 379–387
- Allimant M., 2010. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.
- Anonyme, 2009. Insémination artificielle équine. Les Haras nationaux, 4<sup>ème</sup> édition, Librairie des Haras nationaux, 271p.
- Anonyme 2012. Minimum Standards for Production of Bovine Frozen Semen. 56p.
- Ait Mahfoud, R. et Maamri, S., 2020. Contribution à l'étude des échecs de l'insémination artificielle dus aux mauvaises détections des chaleurs chez la vache. Mémoire de fin d'étude : Science vétérinaire, Institut des sciences vétérinaires, université Blida 1, 57p.
- Brito, L.F., Silva, A.E., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A., Kastelic, J.P., 2002. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci*; 70: 181–90.
- Barth, A., 2013. Bull Breeding Soundness, 3e. Saskatoon, SK: Western Canadian Association of Bovine Practitioners.
- Bordas, C., 1988. L'examen microscopique du sperme et l'interprétation de ses résultats dans le contexte de la monte naturelle en zone charolaise. *Recl Médecine Vét.* 164 (6/7).
- Belala R., Delay J., Amirat L., Ropers M-H., Le Guillou J., Anton M., Schmitt E., Thorin C., Michaud S., Kaidi R., Bencharif D., 2016. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 °C *Animal Reproduction Science*. journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci). 168: 100-109.
- Belala R., Briand-Amirat., Martinot A., Thorin C., Michaud S., Desherces S., Youngs C., Bencharif D., 2019. A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa.

- Bouzebda, F., Guellati, M.A. et Grain, F., 2006. Evaluation des paramètres de la gestion de la reproduction dans un élevage du nord est algérien. *Sciences et Technologie C– N°24*, 13-16.
- Correa, J.R. and Zavos, P.M., 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional of the frozen-thawed bovine sperm membrane, *Theriogenology* 42:351-360.
- Correa, J., Pace, M., and Zavos, P., 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48: 721–731.
- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M., Spano, M., 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*; 72:273-289.
- Codex Committee on Food Hygiene, 1997: HACCP System and Guidelines for its Application, Annexe to CAC/RCP 1– 1969, Rev 3 in Codex Alimentarius Commission Food Hygiene Basic Texts, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, World Health Organisation, Rome.
- Chihani, S. et Zerdani, Z., 2013. Enquête sur les échecs de l'insémination artificielle dans les régions de Blida et Bouira. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, département des sciences vétérinaire, université Blida 1, 71p.
- DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., Lenz, R.W., Monke, D.R., Ayars, W.H., Sattler C.G., 2004. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. *J Dairy Sci*; 87: E93–104.
- Douglas-Hamilton, D., Smith, N.G., Kuster, C.E., Vermeiden, J.P.W., Althouse, G.C., 2005a. Capillary-Loaded Particle Fluid Dynamics: Effect on Estimation of Sperm Concentration. *JAndrol. Jan-Feb*;26(1):115–22.
- Douglas-Hamilton, D., Smith, N., Kuster, C., Vermeiden J., Althouse G., 2005b. Capillary loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology* 26, 115-122.
- Daliri, M., Ghorashi, S., Morshedi, D., Hajian, T., Afshar, k., 2007. Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Bovine Semen Using Nested-PCR. *Iranian Journal of Biotechnology*, pp 48-51.

- Djeralfia, H. et Fadel, H., 2010. Enquête sur les facteurs limitant la réussite de l'insémination artificielle chez les bovins dans les régions de Médéa, Setif et Blida. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, département des sciences vétérinaire, université Blida 1, 86p.
- Dumont, P., 1997. Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. Point Vét. 28(185) : 19- 30.
- Debbous, N. et Rahmani, O., 2020. Contribution à l'étude des facteurs influençant le taux de réussite de l'insémination artificielle chez l'espèce bovine. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, Institut des sciences vétérinaires, université Blida 1, 69p.
- Fernández-Gago, R., Dominguez, JC, Martmez-Pastor, F., 2013. Séminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. Theriogenology, 1 -11.
- Farrell, P., Presicce, G., Brockett, C., and Foote, R., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology 49: 871–879.
- Gerard, O. et Khirredine, B., 2002. Production de semence bovine Didacticiel de Maîtrise de la reproduction des bovins. 73 p.
- Gillan, L, Evans, G, Maxwell, WM., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology, 63 :445-570.
- Gérard, O., Druard, X., Sellem, E., Humblot, P., 2006, 18th European AI Vets Meeting. Boras, 12-14.
- Givens, M.D., Marley, M.S.D., 2008. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. Theriogenology 70, 504–507.
- Givens, M.D., Waldrop, J.G., 2004. Bovine viral diarrhea virus in embryo and semen production systems. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 21–38.
- Gerard, O., Ponsar, C., Petit, M., Humblo, P., 2008. Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins, Renc. Rech. Ruminants 351-354.
- Grigal, M., Nehring, H., Leiding, C., 2008. XXV Wold Buiatric Congress 6-11 July 2008 Budapest, Hungary. p 297.



- Goularte, K.L., Madeira, E.M., Ferreira, CER., Duval, E.H., Vieira, A.D., Mondadori, R.G and Lucia Jr, T., 2015. Hazard Analysis and Critical Control Points System for a Bull Semen Production Centre; *Reprod Dom Anim* 50, 972–979.
- Gacem, A., 2016. Etude des paramètres spermatiques : Comparaison entre la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et spermatozoïdes décongelés. Mémoire de master : Génétique et reproduction animale, Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem, 59p.
- Goularte, K.L., Ferreira, CER., Madeira, E.M., Duval, E.H., Vieira, A.D., Mondadori, R.G., Lucia Jr, T., 2018. The implementation of a HACCP system improved the efficiency of a bull semen collection and processing center; *Anim. Reprod.*, v.15, n.2, p.108-113.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W., and Evans, G., 2008. Assessment of in vitro; sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 103 : 201–214.
- Gaczarzewicz, D., 2015. Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation. *Journal of Veterinary Sciences*, 9p.
- Hopkins, S.M., Armstrong, D.L., Hummel, SKC., Junior, S., 1988. Successful Cryopreservation of Gaur (*Bos gaurus*) epididymal spermatozoa. *Journal of Zoo Animal Medicine.*, P: 19, 195-201.
- Hopper, R.M., 2021. *Bovine Reproduction*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley et Sons Inc. Honoken, USA, 1214p.
- Harstine, B. R., Utt, M. D., DeJarnette, J. M., 2018. Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization. *The Animal Consortium*, 12p.
- Hammadi M., 2016. Insémination artificielle bovine dans la région de blida. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, institut des sciences vétérinaire, université Blida 1, 59p.
- Holt, WV., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3–22.

- Hafsi, N. et Labdani, M., 2020. Etudes statistique de l'insémination artificielle bovine dans la région d'Oumelboughi. Mémoire de master : Biologie et Physiologie de la Reproduction, Département des sciences de la nature et de la vie Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi, 90p.
- ICAR Guidelines for straw identification for bovine semen. [http://www.icar.org/Documents/Rules%20and%20regulations/Guidelines/Guidelines\\_2\\_007.pdf](http://www.icar.org/Documents/Rules%20and%20regulations/Guidelines/Guidelines_2_007.pdf), SECTION 8.1 - ICAR GUIDELINES FOR STRAW IDENTIFICATION FOR BOVINE SEMEN, 8.1.7.1 Collection code, p 251
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Grabo, B.G., Zaneveld, W.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* ;70 :219-225.
- Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L. et *al.*, 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52 : 641–658.
- Kabera, F., 2008. Application de la qualité de la semence bovine produite au centre nation d'amélioration génétique (CNAG) DE DAHRA au Senegal, P24.
- Kastelic, J.P, Thundathil, J.C., 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* 43 Suppl 2 :368-373.
- Kjaestad, H., Ropstad, E., and Berg, K., 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.* 34: 299–303.
- Kasimanickam, R., 2021. Artificial Insemination. *In: Bovine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> Ed., Hopper R.M. (Edited by), Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., USA, pp 447-457.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Edwin, M., Veerapandian, C., 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro*; fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 104 : 9–17.
- Koziol, J.H., and Armstrong, C.L., 2018. *Society for Theriogenology Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls*, 2e, 5–70.
- Louisiana State University Department of Veterinary Clinical Sciences 2005.

- Manciaux, L., Chambon, G., 2011. Santé reproductive et conduite du taureau en monte naturelle. *Nouv Prat Vét.* 4(18) :23- 9.
- Mohanty, T.K., Lone, S.A., Kumaresan A, Bhakat, M., Kumar, R., Rubina K.B., Sinha, R., Paray, A.R., Hanuman P Yadav, H.P., Sahu, S.K., Mohanty, A.K., 2018. Identification of biomarker candidates for fertility in spermatozoa of crossbred bulls through comparative proteomics. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4p.
- Moussouni, B. et Bordjihane, L., 2019. Facteurs d'échec de l'insémination artificielle bovine. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, Institut des sciences vétérinaires, université Blida 1, 67p.
- Mimoune, N., Messai, C.R., Khelef, D., Salhi, O., Azzouz, M.Y. and Kaidi, R. 2017. Reproductive parameters and metabolic profile of repeat breeder cows. *Livestock Research for Rural development*, 29 (8).
- Oulebsir, E.A., 2015. Evaluation de la fonction reproductrice chez quatre taureaux reproducteurs de deux races différentes : Normande et Fleckvieh. Mémoire de master : Reproduction Animale. Université Blida 1. 107p.
- O'Meara, C., Emilie Henrotte, Kupisiewicz, K., Latour, C., Broekhuijse, M., Camus, A., Gavin-Plagne, L., Sellem, E., 2021. The effect of adjusting settings within a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system on bovine sperm motility and morphology results. *Animal reproduction*, 14p.
- Parez, M. et Thibier, M., 1983 Contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon. *Elevage et Insémination*, 197 : 3-16.
- Pietremont, J.L., 1995. Testage du taureau. Appréciation de son aptitude aux fonctions de reproduction, appréciation de la qualité de son éjaculat. *Bull GTV*, (2):33-7.
- Prasad, J.K., 2020: Minimum standard protocol for production of bovine frozen semen p 39-41.
- Parkinson, T.J., 2004. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J Lond.* 68(3):215- 29.
- Palmer, C.W., 2021. Evaluation of Breeding Soundness: The Spermogram. *In: Bovine reproduction 2<sup>nd</sup> edition*, Honoken, USA, pp 102-119
- Pousga, S., 2002. Analyse des résultats de l'insémination artificielle bovine dans des projets d'élevage laitier : Exemple du BURKINA FASO, du MALI et du SENEGALE.

Thèse de doctorat : Science et Médecine vétérinaire. Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaire, université Cheikh-Anata-Diop, Dakar, 112p.

- Saacke, R, Lineweaver, J, Aalseth, E., 1997. Procedures for handling frozen semen. Proceedings of the 12<sup>th</sup> Conference on AI in Beef Cattle of the NAAB, p. 49. (Bovine reproduction 2021).
- Schubert, B., Badiou, M., Force, A., 2018. Computer-aided sperm analysis, the new key player in routine sperm assessment. *Andrologia*, 14p.
- Swanand, S., 2021. Cryopreservation of Semen. *In: Bovine Reproduction, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Hopper R.M. (Edited by), Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., USA, pp. 986-999.
- Senoussi, A. et Abdellaoui, O., 2018. L'insémination artificielle chez les bovins. Mémoire de fin d'étude : Sciences vétérinaires, Institut des sciences vétérinaires, université Blida 1, 79p.
- Sellem, E., Broekhuijse, M.L.W.J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., Koenen, E.P.C., 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen, p13.
- Traore, 1996. Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insémination artificielle. These: Méd. Vét.: Rabat (IAV Hassan II).
- Tahri, S. et Djouabi, S., 2018. Caractérisation de la semence bovine (paillettes) par méthode CASA et cytométrie en flux. Mémoire de master : Sciences de la Nature et de la Vie. Université Saad Dahlab blida 1. 69p.
- Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Hellström, K., Ahola, T., Merits, A., 2016. Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLOS ONE* 11(3): e0151616.
- Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., Blondin, P., 2021. *In: Bovine Reproduction, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Hopper R.M. (Edited by), Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., USA, pp. 1019-1031.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., and Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57 : 149–179.
- Warner, G., 2021. Management of Bulls at Custom Collection Studs. *In: Bovine Reproduction, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Hopper R.M. (Edited by), Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J., USA, pp. 137-143.

- Wrathall, A., Simmons, H., and Van Soom, A., 2006. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virusinfected semen. *Theriogenology* 65 : 247–274.
- World Health Organization, 2010 (OMS 2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen “FIFTH EDITION”. 978 92 4 154778 9, NLM classification: QY 190, 271p.
- Wood, P., Foulkes, J., Shaw, R., and Melrose, D. (1986). Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI. *J. Reprod. Fertil.* 76: 783–795.
- Watson, PF., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60–61, 481–492.

# **ANNEXES**

## Annexe 01: Setting “Bull frozen semen Standardized QualiVets settings”

Setup	Name	Bull frozen semen Standardized QualiVets settings
Analysis limits	Min motility Percent	0
	Min progressive Percent	0
	Min total Count	200
Calibration	Objective	1:Zeiss 10x NH IVOS-II 160nm
	Objective Magnification X	1.2
	Objective Magnification Y	1.2
Camera	Exposure (Ms)	16
	Gain	300
	Integrate Enabled	FALSE
	Integrate Time (Ms)	500
Cell Detection	Elongation Max (%)	90
	Elongation Min (%)	1
	Enable Advanced Tail Detection	FALSE
	Head Brightness Min	168
	Head size Max ( $\mu\text{m}^2$ )	70
	Head size min ( $\mu\text{m}^2$ )	6
	Static Tail Filter	TRUE
	Tail Brightness Min	96
	Tail Min Brightness Auto Offset	8
Chamber	Tail Min Brightness Mode	AUTO FIRST FRAME
	Capillary Correction	1.3
	Chamber Depth ( $\mu\text{m}$ )	20
	Chamber type	CAPILLARY
Illumination	Contains Auto illum Calibration	TRUE
	Histogram Smooth Width	0
	Illumination Primary	LED
	Max Photometer	70
Kinematics	Min Photometer	60
	Cell Travel Max ( $\mu\text{m}$ )	15
	Enable Motile Static Collision Avoidance	FALSE
	Motile cells require a tail	FALSE
	Motile require Tails Max VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	0
	Progressive STR (%)	60
	Progressive VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	40
	Slow VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	20
	Slow VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	2
	Static Algorithm	LENGTH
	Static VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	5
Static VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	3	
Static Width Multiplier	0.5	
Morph	DMR Droplet to tail end Max ( $\mu\text{m}$ )	5
	DMR Tail Length Max ( $\mu\text{m}$ )	15
	Droplet Distal Distance Min ( $\mu\text{m}$ )	4
	Droplet Proximal Head Length ( $\mu\text{m}$ )	12
	Min Tail Length ( $\mu\text{m}$ )	4
	Morph Normal Minimum Percentage	0
	Tail Bend Angle Averaging Length ( $\mu\text{m}$ )	5
Tail Bending Angle Rate Min ( $^\circ/\mu\text{m}$ )	20	
Stage	Tail coiled Angle Min ( $^\circ$ )	180
Viadent	Stage Temp	37
Video Capture	Viadent Fluo Sperm	NON VIABLE
	Frame Capture Speed (Hz)	60
	Frame count	30

## Annexe 02 :

### Conseils aux inséminateurs pour éviter les incidents de stockage

- Utiliser un planning mural de stockage à proximité du tank. Conserver la semence de chaque taureau séparément et identifier le canister et les gobelets au nom ou au numéro du taureau. Ce système vous évitera des recherches inutiles des paillettes en les exposant au risque fatal de réchauffement.
- Effectuer un transfert rapide de paillettes entre bombones. Impliquer deux assistants et disposer les tanks côte à côte. Commencer par emplir la bombone d'azote si possible et ne remonter les canisters qu'au niveau nécessaire à localiser les paillettes à transférer.
- Pendant la préparation de la décongélation, veiller à garder le canister au niveau le plus bas possible dans le cou de la bombone où le gobelet recherché peut être saisi, pour ainsi protéger les autres paillettes des cryo-lésions consécutives au risque de réchauffement.
- Utiliser des pinces pour retirer les paillettes et les transférer au bain de décongélation. Aussitôt la paillette retirée, rabaisser rapidement le canister dans le corps de la bombone.