

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Saad Dahlab Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences biologiques



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Biologie et Physiologie de la Reproduction

Effet de cryoconservation de la semence bovine

Présenté par

ABDERRAHMANE Meriem

DAHEL Amel

Soutenu le : 06 /07/2021

Devant les jurés :

- | | | |
|---|------------|------------------|
| · <i>Présidente : M^{me} TOUAIBIA.M</i> | <i>MCA</i> | <i>U Blida-1</i> |
| · <i>Examinatrice : M^{me} CHAICHI.W</i> | <i>MCA</i> | <i>U Blida-1</i> |
| · <i>Promoteur : M^r LARBI DOUKARA. K</i> | <i>MCA</i> | <i>U Blida-1</i> |

[2020/2021]

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier notre Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la force, ainsi que permis d'atteindre cette étape dans notre carrière d'étude, c'est tout grâce à Dieu

« EL HAMDO-LI-ALLAH ».

On n'oublie jamais le soutien de nos parents avec leurs prières. Ainsi que notre famille pour tous les encouragements.

Nos sincères remerciements à notre promoteur M^r LARBI DOUKARA. K pour la proposition de ce thème, aussi pour la confiance qu'il a nous misé en acceptant de superviser ce travail, et pour l'aide très précieuse qu'il a nous apporté et sa patience.

Nous remercions également les membres du jury ; M^{me} TOUAIPIA. M d'avoir acceptée de présider le jury de notre soutenance et M^{me} CHAICHI.W d'avoir acceptée d'examiner notre travail. Merci de votre disponibilité.

Un grand merci à l'ensemble des professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie à Blida particulièrement du département BPO d'avoir partagé avec nous leur savoir et expérience dans notre cursus universitaire.

Nous remercions M^r KOURAT. A pour ses conseils précieux, M^{me} BENOUARETH. H de nous aider à accéder dans laboratoire CNIAAG et toutes les personnes qui ont participées d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce mémoire.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A mon cher papa, qui m'a toujours encouragé et m'a donné la force pour continuer ce travail...

Tu as été et tu resteras toujours mon premier soutien, que Dieu te protège mon tout.

A ma chère maman, ma source d'inspiration et mon bon exemple, mon professeur depuis mon enfance. Mon guide à tous égards. Dieu te bénit, mon paradis...

*A mes chers frères **ABDE-EL-RAHIM** et **ABDE-EL-GHANI** et ma sœur **NESERINE**.*

A ma famille, mes grands-pères et mes grands-mères.

*Mes chères tantes et mes chers oncles, leurs époux et épouses, mes cousins et cousines,
spécialement **IMEN** et **ROUKIA**.*

Merci, vous m'avez toujours soutenu.

*Mes chères amies d'enfance **AMINA**, **IKRAM**, **RAHIL**, **RIMA** et ma chère **CHOUROK**...*

*Mes amies du lycée **HAYAT BOUZIANE** et **RANIA HAMIANE**. Mes meilleures amies de l'université **FATIHA BOUMAZONA**, **ROUMAISSA NOURINE** et **HIBA MEHALLI**.*

*A toute la promo **BPR**, spécialement **ASSALA**, **IBTISSEM**, **FATIMA**, **NABILA**,
YOUSRA,*

*A mon cher binôme « **MERIEM** » pour tous les jours passant à rédiger ce mémoire.*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans ce travail...

MERCI.

AMEL

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

*A mes parents **NAIMA** et **MOUSSA** pour m'encourager et me soutenir.*

*A ma sœur **ZINEB** pour ses conseils précieux, et mes sœurs **FAIROUZ** et **KHADIDJA**.*

*A mes frères **MOHAMED ALI** et **OMAR**.*

*A mon neveu **ABDELHAFED** et ma nièce **NADA**.*

A toute ma famille, spécialement mes cousines.

*A mes amies **MOUNIRA HALA**, **KHAWLA** et **HADJER**, et mes collègues de l'université*

***ZINEB**, **NABILA**, **FATIMA** et **IBTISSEM**, ainsi que toute la promo **BPR**.*

*A mon cher binôme **AMEL** pour tous les jours passant à rédiger ce mémoire.*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans ce travail..

MERCI.

MERJEM

RESUME

Pour assurer le succès de l'insémination artificielle chez les bovins, il est important d'utiliser une semence de bonne qualité, et pour avoir cette semence dans laquelle les spermatozoïdes sont en bon état de vitalité, de mobilité et de morphologie et en nombre suffisant tout en maintenant leur pouvoir fécondant une période plus longue, on a tendance d'utiliser le processus de la cryoconservation qui a facilité l'IA et qui nous a aidé à garder le potentiel génétique des meilleurs races bovines.

L'objectif de notre étude est de voir l'effet de la cryoconservation sur la semence, en représentant une étude rétrospective de plusieurs données existantes sur la semence bovine. Au début, il faut contrôler la qualité du sperme collecté (par le vagin artificiel ou par l'électro-éjaculation) grâce aux examens séminologiques. On commence la préparation de la semence par la dilution pour augmenter le volume de la semence, puis le refroidissement à 4°C pour éviter le choc thermique, et le conditionnement dans les paillettes pour les congeler dans le liquide d'azote à -196°C. Cela garantit la conservation à long terme de la semence pour son utilisation dans l'insémination artificielle.

A la fin, on discute les résultats des autres auteurs dans le but de voir l'efficacité de la cryoconservation sur la semence bovine en utilisant les méthodes connues pour chaque analyse spermatique, on a conclu qu'elle engendre des effets néfastes sur la vitalité, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes.

Mots clés: Bovins, qualité, spermatozoïdes, cryoconservation, examens séminologique, semence bovine.

SUMMARY

To ensure the success of artificial insemination in cattle, it is important to use a good quality semen, and to have this semen in which the spermatozoa are in good state of vitality, mobility and morphology and in sufficient number while maintaining their fertilizing power for a longer period, we tend to use the process of cryopreservation which facilitated AI and which has helped us to keep the genetic potential of the best breeds of cattle.

The objective of our study is to see the effect of cryopreservation on semen, representing a retrospective study of several existing data on bovine semen. In the beginning, the quality of the semen collected (by the artificial vagina or by electro-ejaculation) should be checked by means of seminological examinations. We start the preparation of the semen by diluting to increase the volume of the semen, then cooling to 4°C to avoid thermal shock, and conditioning in straws to freeze them in nitrogen liquid at -196°C. This guarantees the long-term storage of the semen for its use in artificial insemination.

At the end, we discuss the results of the other authors in order to see the effectiveness of cryopreservation on bovine semen using the known methods for each sperm analysis, it was concluded that it has adverse effects on vitality, sperm mobility and morphology.

Key words: Cattle, quality, spermatozoa, cryopreservation, seminological examinations, bovine semen.

ملخص

لضمان نجاح التلقيح الصناعي في الماشية ، من المهم استخدام سائل منوي عالي الجودة ، والحصول على هذا السائل المنوي الذي تكون فيه الحيوانات المنوية في حالة جيدة من الحيوية والحركة والتشكل وبأعداد كافية مع الحفاظ على قدرتها على التخصيب من أجل لفترة أطول ، نميل إلى استخدام عملية الحفظ بالتبريد التي سهلت الذكاء الاصطناعي والتي ساعدتنا في الحفاظ على الإمكانات الوراثية لأفضل سلالات الماشية.

الهدف من دراستنا هو معرفة تأثير الحفظ بالتبريد على السائل المنوي ، والذي يمثل دراسة بأثر رجعي للعديد من البيانات الموجودة حول السائل المنوي البقري. في البداية ، يجب التحقق من جودة السائل المنوي الذي يتم جمعه (عن طريق المهبل الاصطناعي أو عن طريق القذف الكهربائي) عن طريق الفحوصات اللاهوتية. نبدأ تحضير السائل المنوي بالتخفيف لزيادة حجم السائل المنوي، ثم التبريد إلى 4 درجات مئوية لتجنب الصدمة الحرارية، وتكييفه في القش لتجميده في سائل النيتروجين عند -196 درجة مئوية. وهذا يضمن تخزين السائل المنوي على المدى الطويل لاستخدامه في التلقيح الصناعي.

في النهاية ناقشنا نتائج المؤلفين الآخرين لمعرفة فاعلية الحفظ بالتبريد على السائل المنوي البقري باستخدام الطرق المعروفة لكل تحليل للحيوانات المنوية ، وخلصنا إلى أن لها آثارًا سلبية على حيوية وحركة الحيوانات المنوية وشكلها.

الكلمات المفتاحية: الماشية ، الجودة ، الحيوانات المنوية ، الحفظ بالتبريد ، الفحوصات اللاهوتية ، السائل المنوي البقري.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. La reproduction chez le bovin	3
I.1. L'anatomie de l'appareil génital du taureau	3
I.1.1. Les testicules	4
I.1.2. Les voies spermatiques	6
I.1.3. Les glandes annexes	7
I.2. La physiologie de l'appareil reproducteur male	7
I.2.1. Emission du sperme	8
I.2.1.1. La spermatogenèse	9
I.2.1.2. Contrôle hormonal	10
II. La technologie de la semence	12
II.1. Collecte du sperme	12
II.1.1. Le vagin artificiel	12
II.1.2. Electro – éjaculation	13
II.2. Evaluation et analyse de la qualité du sperme	14
II.2.1. Examen séminologique	14
II.2.2. Analyse du spermogramme	18
II.3. Méthode de conservation de la semence	18
II.3.1 Principe de préparation de la semence	18
II.3.2. Les techniques de la cryoconservation	19
a. Dilution	19
b. Conditionnement	19
c. Conservation	20
II.4. Contrôle de la qualité de la semence	20
II.4.1. Notion de spectrophotométrie	21
II.5. L'insémination artificielle	21
II.5.1. La décongélation	22
II.5.2. Le dépôt du sperme	22
PARTIE EXPERIMENTALE	
III. Matériel et méthodes	23

SOMMAIRE

III.1. L'objectif	23
III.2. Zone d'étude	23
III.3. Matériel et méthodes	23
III.2.1. La récolte du sperme	23
III.2.2. L'analyse du sperme récolté	26
III.2.3. La préparation de la semence	29
III.2.4. La décongélation	31
III.2.5. L'insémination artificielle	31
IV.1. Résultats et discussion	32
IV.1.1. Analyse macroscopique et microscopique avant la congélation	32
IV.1.2. Effet de la dilution et refroidissement sur les spermatozoïdes	33
IV.1.3. Effet de la congélation sur les spermatozoïdes	35
CONCLUSION PERSPECTIVE	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45

LISTE DES FIGURES

N°	Figure	Page
1	Anatomie de l'appareil génital mâle (THIBIER, 1977).	03
2	Organisation interne du testicule (SOLTNER, 2001).	04
3	Les enveloppes testiculaires (BARONE, 2001, modifié).	05
4	Structure d'un spermatozoïde bovin (BARTH et OKO, 1989).	08
5	Déroulement de la spermatogenèse (KONFE 2014) et (BALL et al., 2004).	10
6	Le contrôle hormonal du fonctionnement du testicule (QUANG NHUAN, 2003).	11
7	Vagin artificiel (HAGEN, 2011).	13
8	La sonde Electrojac (RIGAL, 2008).	13
9	Quadrillage des cellules de Thomas (HANZEN, 2009).	16
10	Spermatozoïdes anormales dans l'espèce bovine (DUMONT, 1997).	17
11	La distinction entre Spermatozoïdes morts (tête rouge) et vivants (tête incolore) (AMMAR KESKES, 2013).	17
12	Schéma d'une paillette de type « CASSOU» (MBAINDINGATOLOUM, 1982).	20
13	La mise en place de la semence (HANZEN, 2010).	22
14	Salle de monte (ORIGINALE, 2021).	24
15	Un stérilisateur (ORIGINALE, 2021).	24
16	Un mâle castré (ORIGINALE, 2021).	25
17	Phase d'attente (ORIGINALE, 2021).	25
18	La collecte dans le tube collecteur (ORIGINALE, 2021).	26
19	La monte (ORIGINALE, 2021).	26
20	Bain marie à 37°C (ORIGINALE, 2021).	27
21	Tubes de collecte (ORIGINALE, 2021).	27
22	Le diluteur à droite et le spectrophotomètre à gauche (ORIGINALE, 2021).	28
23	Machines « MRS3 » et « LINX » attachées (ORIGINALE, 2021).	30
24	Congélateur programmable par les vapeurs d'azote (ORIGINALE, 2021).	30
25	Les biostat d'azote liquide (ORIGINALE, 2021).	31

LISTE DES FIGURES

26	Evolution de la motilité des spermatozoïdes (échelle de 0 à 5) dans six milieux de dilution, conservation à +5 °C pendant 28 jours (GBANGBOUCHE et al., 2011).	34
27	Evolution de la viabilité de spermatozoïdes (% de spermatozoïdes vivants) dans six milieux de dilution, conservation à +5 °C pendant 28 jours (GBANGBOUCHE et al., 2011).	34
28	Spermatozoïdes morts et vivants colorés avec le mélange SYBR et PI (GARNER et JOHNSON, 1995).	35
29	Répartition des 34 paillettes de semences (1 paillette/éjaculat, 2 éjaculats et 17 taureaux) en fonction de spermatozoïdes vivants avant congélation (histogramme noir) ou avant décongélation (histogramme gris) (ADAMOU-N'DIAYE et al., 2003).	36
30	Pourcentage de spermatozoïdes vivants après incubation de 3 heures à +38° C en fonction de la durée de refroidissement de la semence dans 204 paillettes correspondant à 17 taureaux (2 éjaculats par taureau et 6 paillettes/éjaculat) (ADAMOU-N'DIAYE et al., 2003).	37
31	Images représentatives par le microscope électronique à balayage montrant des exemples d'anomalies des spermatozoïdes qui se produisent pendant la cryoconservation du sperme de taureau. A : tête détachée et fissurée, B : queue enroulée (KHALIL et al., 2017).	39
32	Changements morphologiques du spermatozoïde dus à des stress physique et/ou chimique suite à la cryoconservation (LEAHY et GADELLA, 2011).	40
33	Micrographies représentatives montrant des changements ultra-structuraux dans l'acrosome du sperme. ACS1 : Acrosome intact, ACS2 : réaction acrosomique typique (AR) et ACS3 : AR atypique (KHALIL et al., 2017).	41
34	Effets néfastes de la congélation-décongélation sur un spermatozoïde. Les effets morphologiques et physiologiques des processus de congélation et de décongélation sur le sperme de taureau sont résumés (UGUR et al., 2019).	43

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableau	Page
I	Le système reproducteur masculin.	03
II	La taille moyenne des spermatozoïdes chez le taureau (MARCHALL, 1990).	08
III	Les différents résultats de l'examen macroscopique.	14
IV	Notation de la motilité massale du sperme dans l'espèce bovine (PAREZ et DUPLAN, 1987).	15
V	Valeurs standard d'un spermogramme (<i>in.</i> SAGE, 2020).	18
VI	Composition des dilueurs les plus utilisés (LAMINOUE, 1999).	19
VII	Spermogramme comparé de certaines races bovines tropicales (<i>in.</i> GBANGBOCHE et al., 2011).	33
VIII	L'effet des différentes étapes de traitement de la cryoconservation du sperme sur la motilité, la viabilité et les formes anormales des spermatozoïdes examinés par microscope optique (KHALIL et al., 2017, modifié).	38

LISTE DES ABREVIATIONS

°C: Degré Celcius.

ABP: Androgène Bending Protéine.

BSP: Binder of SPerm.

CASA: Computer Assisted Semen Analysis.

CNIAAG: Centre National de l'Insémination Artificielle et l'Amélioration Génétique.

COPELSO : Coopérative Agricole d'Elevage du Sud-Ouest.

FSH: Follicule Stimulating Hormone.

GnRH: Gonadotrophine Releasing Hormone.

LH: Luteinizing Hormone.

MAR: Mixed Antiglobulin Reaction.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PH: Potentiel Hydrogène.

PI: Propidium Iodide.

ROS: Reactive Oxygen Species.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'élevage des taureaux dépend de la sélection génétique des génomes, qui aident à choisir les taureaux d'élites pour extraire leurs semences utilisées dans l'Insémination artificielle.

L'Insémination artificielle (IA) est la biotechnologie de la reproduction de première génération qui a profondément contribué à l'amélioration génétique, particulièrement chez les bovins laitiers. Mais cela n'aurait jamais été possible sans la cryoconservation de la semence des taureaux les plus performants (**DUNGDUNG et al., 2016**).

La Cryoconservation du sperme est devenue la technique la plus répandue pour la conservation durable du sperme d'animaux génétiquement supérieurs. Il existe des méthodes développées utilisées pour avoir les meilleurs résultats qui restent subjectifs ; ces méthodes sont liées au pouvoir fécondant des spermatozoïdes qui sont contrôlés par des paramètres séminologiques. Donc, la qualité de la semence est l'une des majeures conditions pour le succès de l'insémination artificielle.

Au centre d'Insémination artificielle, l'examen de routine de la semence est un contrôle qui vise à détecter des variations dans les valeurs propres à chaque animal avant d'effectuer la mise en paillettes et la congélation. Par contre, pour l'opérateur, la décision de rejet ou d'acceptation d'un éjaculat pour la congélation peut être délicate compte tenu des conséquences financières que cela implique, en particulier pour les taureaux d'élite (**CABANNES, 2008**).

C'est ce qu'on entame dans ce travail, qui est présenté en deux parties ;

Une synthèse bibliographique, qui commence premièrement par un rappel sur l'anatomie ainsi que la physiologie de l'appareil génital du taureau. Deuxièmement, on présente les techniques de la récolte du sperme, où les taureaux les plus performants sont choisis dès leur puberté, ils sont amenés vers la salle de monte, après de nombreuses fausses montes, l'éleveur dévie le vagin artificiel vers le pénis du taureau et enfin, l'éjaculation aura lieu. On peut aussi extraire la semence par l'électro-éjaculation.

Après, on examine la semence récoltée par des examens séminologiques, qui divisent en deux types d'examen ; l'examen macroscopique qui est visuelle, dont on note le volume de la semence directement du tube collecteur gradué ainsi que la couleur, la viscosité et le PH, et l'examen microscopique, qui évalue la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes par des colorants et le microscope optique et enfin l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes par le spectrophotomètre. Puis, on entame les méthodes de la préparation de la semence, qui commence par la dilution, on rajoutant des diluants à la semence, afin d'augmenter le volume de la semence et d'assurer un milieu bénéfique à la survie des spermatozoïdes *in vitro*.

INTRODUCTION GENERALE

Ensuite, cette semence diluée passe par le conditionnement dans des paillettes à l'aide d'une machine à remplir et à souder « MRS3 » et une autre machine à jet d'encre « LINX ». Puis on va diminuer graduellement la température de la semence de 37°C jusqu'à -196°C premièrement dans un réfrigérateur à 4°C puis dans un congélateur sous vapeur d'azote liquide à -140°C et enfin dans les biostats d'azote liquide à -196°C où la semence est conservée pendant une longue durée, c'est la cryoconservation (Congélation). Afin de l'utiliser dans l'IA, la semence doit être décongelée à 37°C pendant quelque seconde.

Une partie expérimentale, où on aborde le matériel et les méthodes utilisées pour l'analyse du sperme collecté, ainsi que la discussion des résultats obtenus par différents auteurs, on a les effets des différents milieux de diluants sur la semence, on a aussi des effets du temps de refroidissement sur la vitalité des spermatozoïdes, et enfin on voit les effets de la congélation sur le spermatozoïde après la décongélation, elle affecte des changements structuraux et ultra-structuraux observés par le microscope électronique à balayage et à transmission, au niveau de la membrane plasmique, au niveau de l'acrosome, ainsi que des changements au niveau des mitochondries, l'ADN, et l'ARN.

Pour assurer que la cryoconservation peut préserver le potentiel génétique des races bovines élites, on doit poser les questions suivantes ; la cryoconservation est-elle bénéfique ou non pour la semence ? A-t-elle des effets négatifs plus que positifs sur les spermatozoïdes ? Est-ce qu'elle est la méthode plus réussie ?

En répondant à ces questions, on trouve que la cryoconservation a des effets néfastes sur les caractéristiques de la semence, et elle provoque une forte diminution sur la qualité des spermatozoïdes. Mais reste toujours la méthode plus utilisée pendant des années.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'anatomie de l'appareil génital mâle

Le système reproducteur masculin (Tableau I) comprend tous les organes responsables de développement du sperme et son dépôt dans les voies génitales féminines où s'effectue la fécondation. L'appareil génital mâle peut se grouper en trois parties principales (Figure 1) (HAZEN, 2009 ; 2010).

Tableau I : Le système reproducteur masculin.

Les gonades	Les voies excrétrices	Les glandes annexes
Les testicules (Figure 2) et leurs enveloppes (Figure 3) qui présentent le scrotum, le dartos, le crémaster, la gaine vaginale, et l'albuginée.	Les voies génitales : épидидymes, canal déférent (Figure 1). Et les voies urogénitales : urètre, pénis (Figure 1).	Prostate, vésicules séminales, glandes de Cowper (Figure 1).

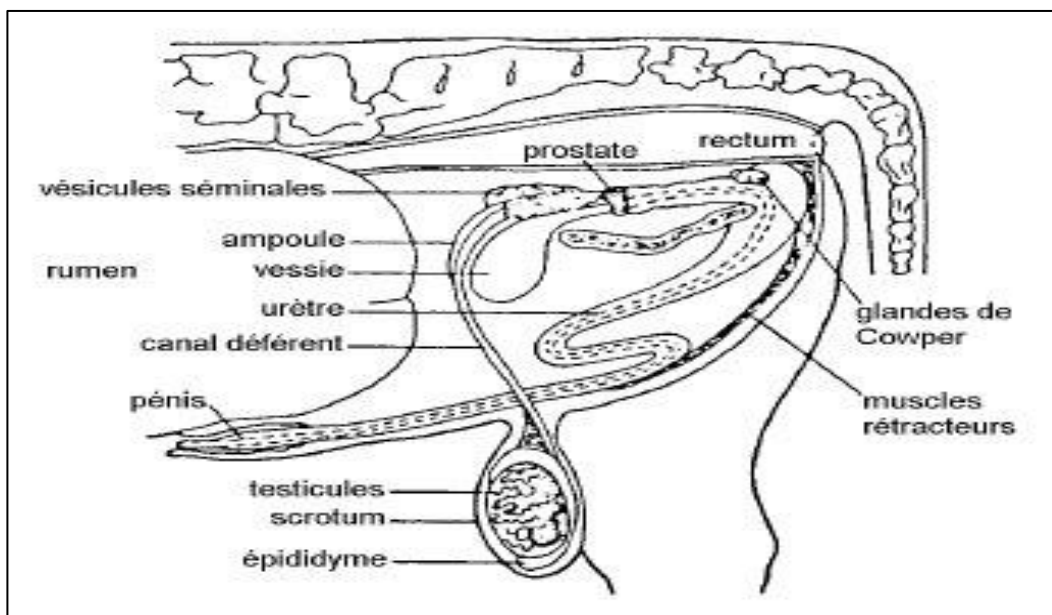


Figure 1 : Anatomie de l'appareil génital mâle (THIBIER, 1977).

1.1. Les testicules

Les testicules proviennent de la méso néphropathie, chez l'embryon, ils sont dans la position abdominale et ensuite descendent avant la naissance sous la région inguinale dans les enveloppes testiculaires vers trois à quatre mois de la vie embryonnaire (**CHENOWETH, 1979 ; RAHMAN et al., 2011; KASTLIC, 2013**).

Ce sont des organes pairs logés dans les bourses, le poids est basé sur la race (taureau 500 grammes à l'âge de deux ans), et la mesure varie entre 11 et 15 cm de hauteur, entre 7 et 9 cm de largeur et entre 7 et 9 cm d'épaisseur (**SETCHELL, 1991 in. RIGAL, 2008**) (Voir annexe 1).

Chaque testicule (Figure 2) est formé de tubes séminifères séparés par un tissu interstitiel, ces tubes convergent vers le hile du testicule pour former le corps d'Highmore et entrent en relation avec les tubes droits où s'y anastomosent dans le rete testis (**CHENOWETH et al., 2007**).

Prolongent par les canaux efférents, l'épididyme et le canal de Wolf qui aboutit au sommet de l'urètre (**DADOUNE, 2001**). Le tube séminifère contient un épithélium séminal composé des cellules de Sertoli et des cellules germinales ainsi qu'un tissu de soutien (**BARONE, 1990**).

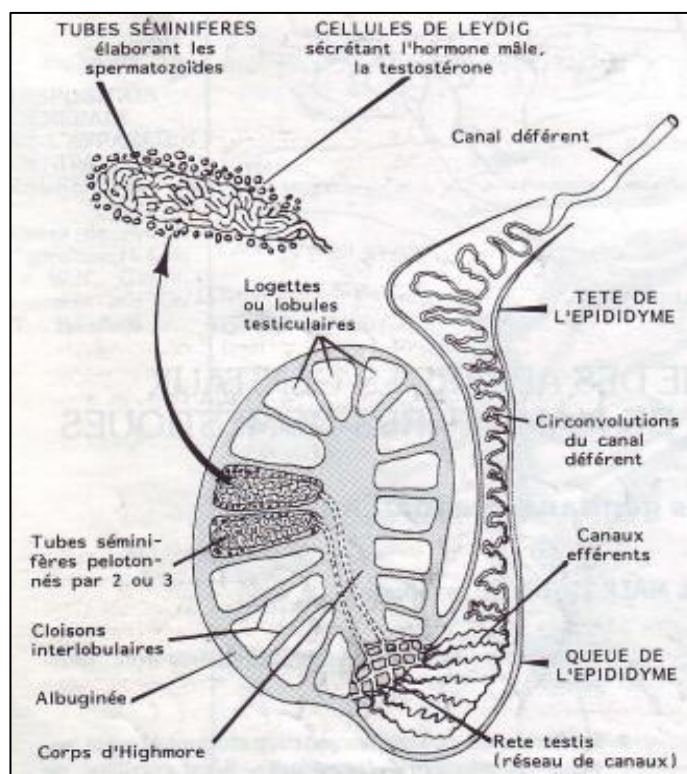


Figure 2 : Organisation interne du testicule (**SOLTNER, 2001**).

Les deux testicules reliés aux corps par le cordon testiculaire, ils sont suspendus de chaque côté de pénis et sont enveloppés dans une série de sacs; les bourses, qui sont constitués par cinq couches de tissus (Figure 3):

a. Scrotum : C'est un repli de la peau qui est commun entre les deux testicules. Il présente des récepteurs thermiques qui ont notamment pour effet d'abaisser et de maintenir la température des testicules à 30° jusqu'à 33°C (la thermorégulation), pour le bon déroulement de la spermatogenèse (KONFE, 2014).

b. Dartos : Remonte entre les deux testicules de manière indépendante. Il est constitué de fibres musculaires lisses et de tissu conjonctif dense qui assurent les mouvements lents lorsqu'il se contracte (CUQ, 1973).

c. Crémaster : C'est un muscle qui induit les mouvements rapides, il peut modifier la position plus ou moins haute du testicule.

d. Gaine vaginale : C'est l'ensemble de la tunique fibreuse et la tunique vaginale, elle a un double feuillet fibro-conjonctif (la fibreuse et la séreuse), entre c'est deux feuillets on trouve un espace qui peut se remplir de liquide.

e. Albuginée : C'est la dernière couche qui stabilise les testicules dans leurs enveloppes et elle émet des invaginations pour former les lobes testiculaires, et réunies au centre pour former le corps d'Highmore (CUQ, 1973).

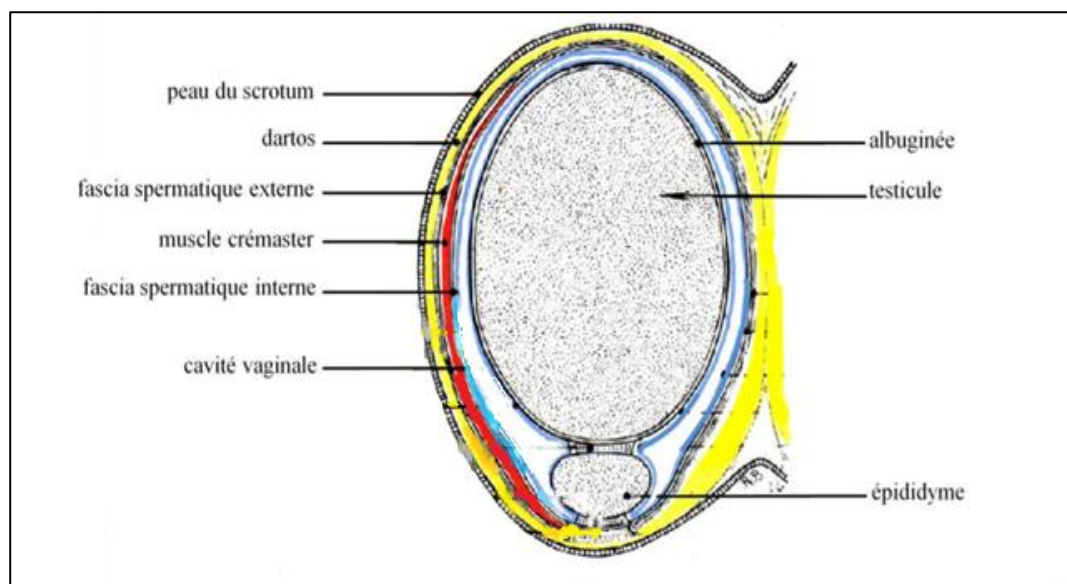


Figure 3 : Coupe transversale du testicule et ses enveloppes (BARONE, 2001, *modifié*).

1.1. Les voies spermatiques

Les premières parties de ces voies sont le tube droit, le rete-testis, et les tubules efférents. Ces voies se poursuivent ensuite avec une longue conduite qui présente deux parties distinctes (**BARONE, 1990 ; DACHEUX, 2001**) :

- L'extrémité proximale : L'épididyme.
- L'extrémité distale : Canal déférent, qui pénètre dans l'urètre et présente la glande séminale.

1.1.1. L'épididyme

C'est un canal allongé qui coiffe les extrémités du testicule (**CUQ, 1973**). Il se divise en trois parties (**JOHNSTON et al., 2005**) : La tête (reçoit les canaux efférents), le corps (a la capacité de stockage d'environ 70 milliards de spermatozoïdes, et achève la maturation des spermatozoïdes), la queue (traverse le canal déférent).

1.1.2. Le canal déférent

Il s'étend le long du canal épидидymaire jusqu'à la partie pelvienne de l'urètre (**BARONE, 1978 ; BONNES et al., 1998**), où il se termine par les vésicules séminales correspondantes à travers le canal éjaculateur.

1.1.3. L'urètre

C'est un tube impair long de 100 à 120 cm, qui peut transporter l'urine et le sperme en même temps, il se divise en trois parties : l'urètre pelvien, le bulbe de l'urètre et l'urètre pénien (**RIGAL, 2008**).

1.1.4. Le pénis

Il est formé par l'urètre pénien avec des muscles et des structures érectiles. Il est recouvert par le fourreau qui est riche en glandes sécrétrices de phéromones. On distingue trois parties dans le pénis : la racine, le corps et l'extrémité qui commence par le S pénien et se termine par le gland (**BARONE, 1978**).

1.2. Les glandes annexes

On distingue trois glandes accessoires du système reproducteur masculin : la prostate, les deux vésicules séminales, et les deux glandes bulbo-urétrales ou de Mery ou glandes de Cowper (**RIGAL, 2008**).

1.2.1. La prostate

Entoure complètement l'urètre du taureau, elle se compose de trois zones dont l'une est le corps de la prostate (zone centrale) qui est petite chez le taureau, et l'autre est dispersée autour de l'urètre (zone périphérique) et s'étend jusqu'aux glandes bulbo-urétrales (zone de transition) (**DAYON, 2008**).

1.2.2. Les vésicules séminales

Elles sont deux glandes lobulées de forme et de taille variable, situées des deux côtés de l'urètre, au-dessus de la prostate. Les sécrétions des vésicules séminales représentent 60% du liquide séminale (**GERNIGON, 1993**).

1.2.3. Les glandes de Cowper

Appelées aussi les glandes bulbo-urétrales ou de Mery. Chaque glande est formée de lobules séparés par une cloison conjonctive riche en fibres élastiques et en cellules musculaires lisses. Elles sont de faibles dimensions chez le taureau (**MARC, 2015**). Elles contiennent des phéromones qui jouent un rôle dans l'attraction des femelles (**KNOBIL et al., 1988**).

2. La physiologie de l'appareil reproducteur mâle

La fonction testiculaire comprend deux fonctions complémentaires (**GARRIGUE, 2017**) :

➤ **Fonction exocrine** : production des cellules reproductrices (les spermatozoïdes) à l'aide des cellules de Sertoli dans les testicules, qui sont émis hors de l'organisme par le pénis dans un liquide de composition complexe appelé ; le sperme (**KNOBIL et al., 1988**).

➤ **Fonction endocrine** : production des hormones sexuels males par les cellules de Leydig dans les testicules appelées ; androgènes, notamment la testostérone.

2.1. Emission du sperme

Le sperme est un liquide de composition complexe qui joue au même temps un rôle de transport, nutrition et protection des spermatozoïdes (BALL *et al.*, 2004). Il contient deux parties cellulaire et liquidiennne :

a. Les spermatozoïdes (partie cellulaire) : représentent 20% du liquide spermatique (KONFE, 2014), un spermatozoïde normal mesure environ 70 μm chez le taureau (CABANNES, 2008).

La figure 4 présente les trois parties d'un spermatozoïde chez le taureau : la tête (60% représente l'acrosome (BAHR et ZEITLER, 1964), qui comprend une crête apicale), la pièce intermédiaire, et le flagelle (divisé en pièce principale et pièce terminale).

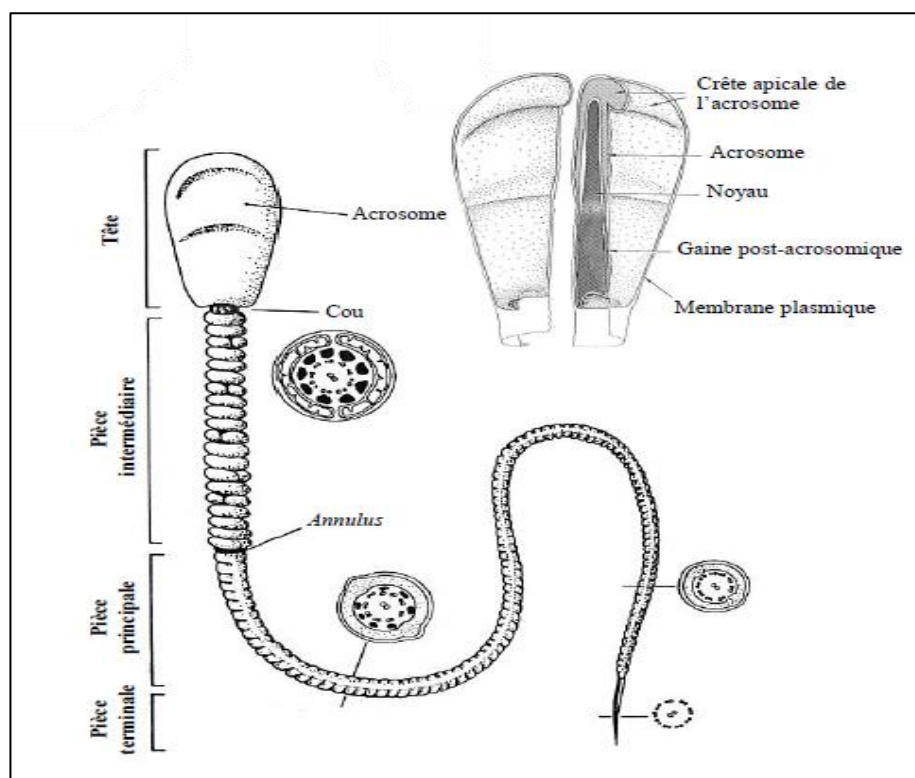


Figure 4 : Structure d'un spermatozoïde bovin (BARTH et OKO, 1989).

Le tableau II récapitule de façon comparative les tailles moyennes des différentes sections du spermatozoïde chez le taureau.

Tableau II : La taille moyenne du spermatozoïde chez le taureau (MARCHALL, 1990).

Longueur	Espèce		
	La tête	La pièce intermédiaire	Totale
Taureau	6.8 μm	9.8 μm	53.5 μm

b. Le plasma séminal (partie liquidienne) : c'est un composant essentiel pour l'accouplement naturel, qui transporte et protège les spermatozoïdes (**PEITZ et OLDS-CLARKE, 1986 ; MURER et al., 2001**). Il représente 80% du liquide spermatique (**KONFE, 2014**), son rôle majeur est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes qui étaient absents lorsqu'ils étaient stockés dans l'épididyme.

Les sécrétions des glandes séminales constituent une famille des protéines appelée BSP (*Binder of Sperm*) qui représentent 65% des protéines totales du plasma séminal (**LUSIGNAN, 2011**).

2.1.1. La spermatogenèse

La spermatogenèse désigne le processus de transformation de cellules souches appelées spermatogonies en cellules spécialisées dans la reproduction ; les gamètes males ou spermatozoïdes (**THIBAUT et LEVASSEUR, 2001**), ce processus se fait dans l'appareil génital male au niveau des tubes séminifères du testicule (**STAUB et JOHNSON, 2018**).

La spermatogenèse est d'environ 54 jours chez le taureau (**HOCHEREAU et al., 1964**), elle se déroule en trois principales phases (**HESS et DE FRANCA, 2009**) (Figure 5) :

a. Spermatocytogenèse : des cellules filles reposant sur la couche basale des tubes séminifères en effectuant une première division mitotique qui génère des spermatogonies (**STAUB et JOHNSON, 2018**), ces derniers entrent dans une succession de mitoses pour transformer en spermatocytes I (**HESS et DE FRANCA, 2009**). Cette étape de différenciation dure 13,5 jours dans l'épithélium du tube séminifère chez le bovin (**HOCHEREAU, 1964**). A la fin, les spermatocytes de type I traversent la barrière hémato-testiculaire et sont prêts à entrer dans la prophase méiotique.

b. Méiose : de spermatocyte I subit la première division méiotique pour donner des spermatocytes II diploïdes, qui vont subir à leur tour une deuxième division de méiose pour donner des spermatides haploïdes (**STAUB et JOHNSON, 2018**).

c. Spermiogénèse : c'est la phase de différenciation des spermatides en spermatozoïdes (**HOPPER, 2015**). Ils atteignent leurs caractéristiques morphologiques en aboutissant à la formation d'une tête et d'un flagelle (**AMAR KESKES, 2013**).

Pour avoir le pouvoir fécondant, les spermatozoïdes transitent à l'épididyme (**HAFEZ et al., 2000**) qui dure entre 8 et 11 jours (**ORGEBIN, 1961**) au cours d'une étape finale appelée spermiation (**STAUB et JOHNSON, 2018**).

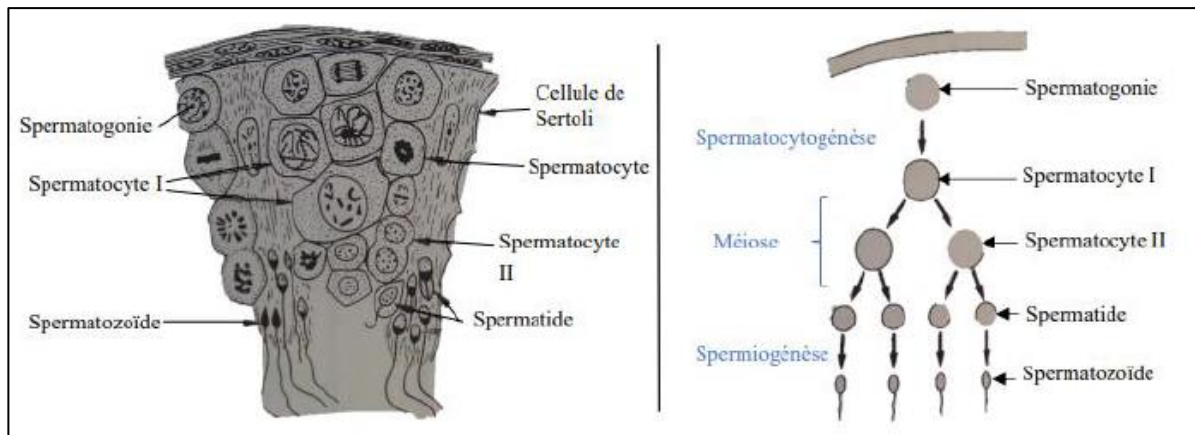


Figure 5 : Déroulement de la spermatogénèse (BALL *et al.*, 2004).

2.1.2. Contrôle hormonal

La spermatogénèse est régulée par la GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone) qui est sécrétée par l'hypothalamus (BALL *et al.*, 2004), stimulée l'adénohypophyse pour synthétiser :

- **LH** (Luteinizing Hormone) : agit sur les cellules de Leydig pour sécréter l'œstradiol et la testostérone (KAYA *et al.*, 2014), en stimulant davantage la spermatogénèse (GOLDBERG *et ZIRKIN*, 2018), mais aussi en exerçant un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (AMANN, 1983).
- **FSH** (Follicle Stimulating Hormone) : agit sur les cellules de Sertoli (HAFEZ *et al.*, 2000) qui conduisent la spermatogénèse (SOLTNER, 2001) en sécrétant l'inhibine (pour avoir un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH) et l'Androgène Binding Protéine « ABP » (pour transporter les androgènes).

La figure 6 illustre le contrôle hormonal du fonctionnement du testicule :

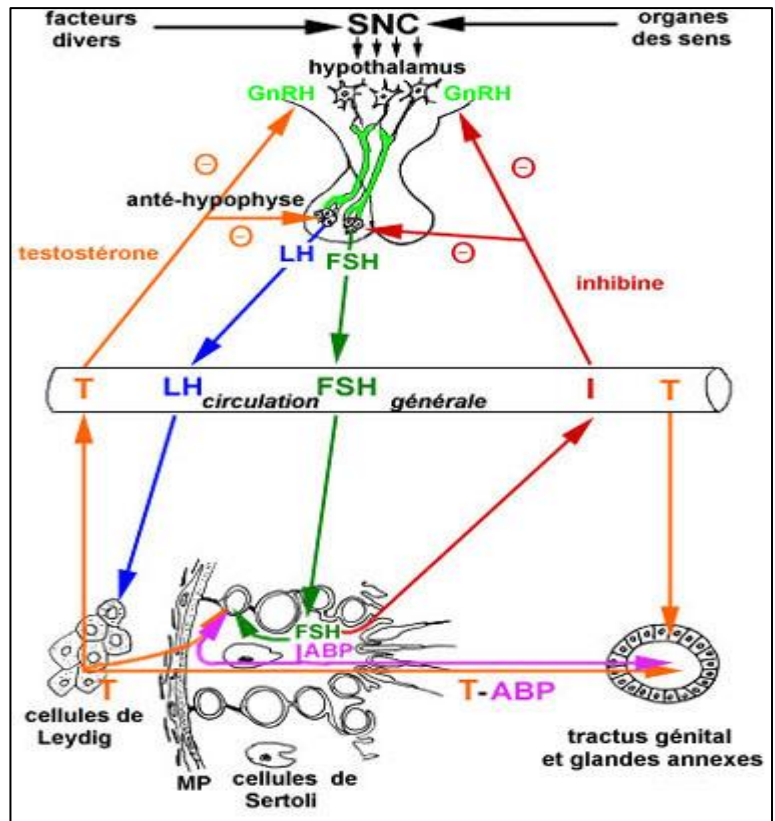


Figure 6 : Le contrôle hormonal du fonctionnement du testicule (AMMAR KESKES, 2013).

1. Collecte du sperme

Afin d'obtenir la semence, le sperme doit être récolté à l'aide des méthodes communes qui sont le vagin artificiel (le plus souvent pratiqué chez les taureaux) et l'électro-éjaculateur (le fruit d'investigations expérimentale à la lumière de la physiologie sexuelle (**BOLY, 1986 in. KONFE, 2014**)).

Avant chaque collecte, les taureaux nécessitent une bonne préparation pour avoir une qualité favorable.

1.1. Le vagin artificiel

C'est la méthode la plus proche aux conditions naturelles d'éjaculation (**BOLY, 1986**), et à la stimulation offerte par le vagin de la vache (température et pression). Elle recueille rapidement un éjaculat total et non souillé (**DUMONT, 1997**).

Le vagin artificiel (Figure 7) utilisé est composé de deux parties :

- **Une partie extérieure (un manchon extérieur)** : le plus souvent en caoutchouc rigide ou plastique, avec une ouverture fermée par un bouchon (**MESKINI, 2017**), sa longueur est entre 26 et 40cm et son diamètre est entre 6 et 8cm.
- **Une partie intérieure (un manchon intérieur)** : en latex ou en caoutchouc souple, qui se termine avec un cône qui est liée avec un tube gradué en plastique ou en verre. Dans ce dernier le sperme est recueilli. L'autre extrémité est lubrifiée par la vaseline ou le gel gynécologique pour faciliter l'entrée du pénis.

C'est deux parties déterminent une chambre cylindrique remplie d'eau à 37°C en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin féminin (**PAREZ et DULPAN, 1987**).

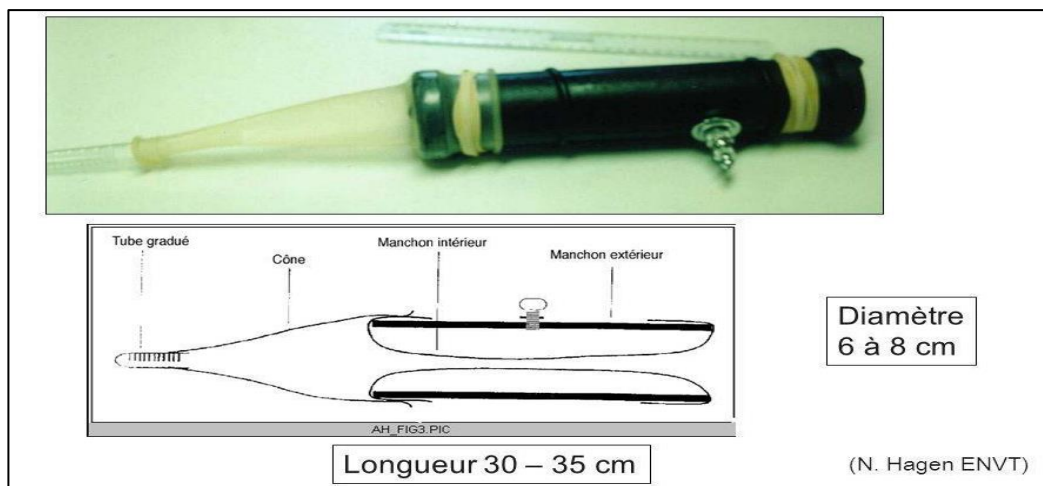


Figure 7 : Vagin artificiel (HAGEN, 2011).

1.2. L'électro-éjaculation

Cette méthode provoque l'éjaculation du sperme par stimulation électrique et l'excitation de nerfs érecteurs et éjaculateurs. Elle est appliquée dans le rectum du taureau, à l'aide d'un opérateur (Figure 8), pour transmettre l'électricité à l'animal (STIEVENART, 1996).

Par conséquent, le générateur doit attendre que le sperme vire au blanc laiteux avant de commencer la collecte pour obtenir le sperme le plus concentré possible (LACROIX, 1988 et ALBERT, 2007).



Figure 8 : La sonde Electrojac (RIGAL, 2008).

Malgré le volume est important, la concentration des spermatozoïdes reste faible par rapport à celle du vagin artificiel (SALISBURY et VANDERMARK, 1961).

2. Evaluation et analyse de la qualité du sperme

On étudie les caractéristiques qualitatives et quantitatives du sperme pour l'utilisation artificielle (**RUKUNDO, 2009**), à l'aide des examens au niveau macroscopique et microscopique. En vise à détecter les différentes anomalies de spermatozoïdes.

2.1. L'examen séminologique

Il comprend l'examen macroscopique et microscopique, dont le but est d'évaluer la qualité de la semence. Cette évaluation permet de décider si l'éjaculat peut être congelé et dilué avant la mise en paillettes (**CABANNES, 2008**), pour l'utilisation de l'insémination artificielle. Il se réalise immédiatement après la récolte.

a. Macroscopique

C'est une évaluation visuelle qui porte sur : le volume, la consistance, la couleur, la viscosité, et le PH (Tableau III).

Tableau III : Les différents résultats de l'examen macroscopique.

La couleur	Blanchâtre (crémeuse) chez le taureau (PAREZ et DUPLAN, 1987 in. KONFE, 2014), mais elle peut changer selon la concentration en spermatozoïdes ou à cause des pathologies.
Le volume	Il est lu sur le tube de collecte gradué, chez le taureau. Le volume moyen est de 2 à 10 ml (CUPPS, 1991), et varie selon l'âge, la race, le régime alimentaire, la saison, le rythme de récolte, ...
L'aspect et consistance	Elle est généralement laiteuse à crémeuse (CABANNES, 2008).
La viscosité	Chez le taureau, elle est 3,7 (PAREZ et DUPLAN, 1987 in. KONFE, 2014). Elle dépend de la concentration en spermatozoïdes (CABANNES, 2008).
Le PH	Compris entre 6,5 et 6,9 (HANZEN, 2009 in. KONFE 2014).

b. Microscopique

➤ **Motilité** : C'est un paramètre clé qui définit la vie ou la mort des spermatozoïdes. La motilité est le résultat de la contraction du filament axial et elle dépend de la présence des spermatozoïdes dans un milieu et un PH normaux.

L'examen de la motilité doit se faire directement après le prélèvement de la semence en la maintenant à 37°C pour éviter de refroidir la semence et de tuer les spermatozoïdes.

Elle comporte :

✓ **La motilité massale** : Une goutte de sperme non diluée est déposée sur une lame préchauffée à 37°C (CABANNES, 2008). L'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables par un microscope à contraste de phase au faible grossissement de 40 à 125 avec une échelle d'évaluation de 0 à 5.

Un sperme est éliminé si sa motilité massale est inférieure ou égale à 3 (GERARD et KHIRREDINE, 2002). Les résultats de l'observation sont illustrés dans le tableau ci-dessus (Tableau IV).

Tableau IV : Notation de la motilité massale du sperme dans l'espèce bovine (PAREZ et DUPLAN, 1987).

Note	Pourcentage approximative	Observation
0	0 %	Aucun mouvement en surface
1	20 %	Léger mouvement à la surface
2	40 %	Mouvements net mais ne formant pas de vagues
3	60 %	Début de vagues
4	80 %	Vagues très nettes
5	100 %	Tourbillons nettement visibles

En cas d'absence de motilité massale en passe à l'examen de motilité individuelle :

✓ **La motilité individuelle** : L'examen de la motilité individuelle ayant une mobilité propre et non pas se mouvant de façon passive (DUMONT, 1997 ; CABANNES, 2008). Elle est réalisée après dilution de sperme 10 à 40 fois par un dilueur « Extender » ou par un sérum physiologique préchauffé. La note est prise en présentant des spermatozoïdes « fléchantes » dans une trajectoire quasi rectiligne (CABANNES, 2008).

Cette motilité est considérée comme bonne quand le spermatozoïde traverse le champ du microscope rapidement avec des mouvements de rotation de la tête.

Les spermatozoïdes (50 %) ne sont pas considérés comme mobiles quand ils présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue, ou se déplacent de manière curviligne ou plus lentement, (GERARD et KHIRREDINE, 2002).

On utilise aussi le système CASA (Computer Assisted Semen Analysis) qui donne des résultats plus précis de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes (GERARD *et al.*, 2008).

➤ **Concentration du sperme :** Une concentration supérieure ou égale à 300000spermatozoïde/ml désigne un taureau comme fertile (PIETREMONT, 1995).

Elle peut être évaluée:

• **Directement :** par comptage à l'aide des cellules hématimétriques ou cellules de Thomas et aussi appelées cellules de Malassez (Voir annexe 2). C'est la méthode la plus efficace et moins couteuse (GERARD et KHIRREDINE, 2002).

Ces cellules sont constituées d'une lame de verre, avec un quadrillage de 16 grands carrés chacun contient 16 petits carrés (GAULIARD, 2008) (Figure 9). Après le dépôt d'une goutte du sperme dilué dans une solution de NaCl à 3% ou de formaldéhyde à 1% (solution de Hancock), on détermine le nombre de spermatozoïdes contenu dans 4 grands carreaux sous microscope au grossissement x400.

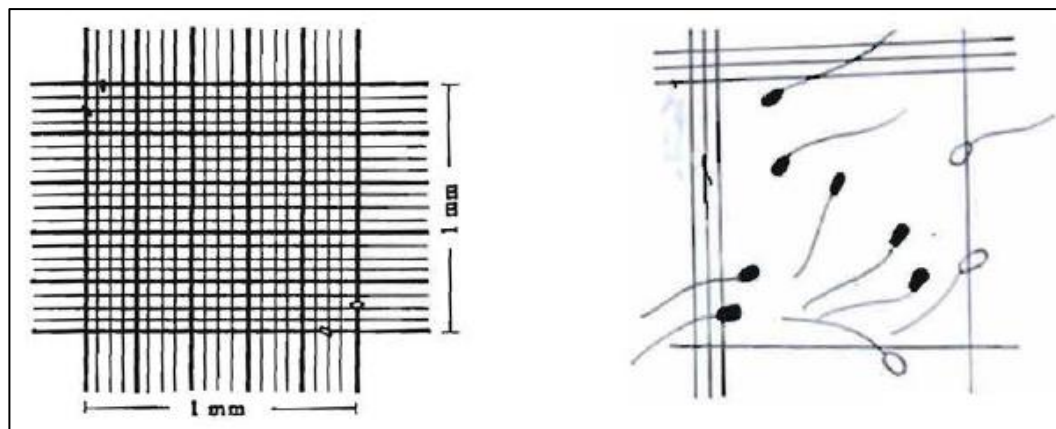


Figure 9 : Quadrillage des cellules de Thomas (HANZEN, 2009).

• **Indirectement :** par comptage électrique à l'aide du spectrophotomètre étalonné qui mesure la densité optique du sperme dilué (BARIL *et al.*, 1993). La concentration peut être augmentée en présence de débris cellulaire.

➤ **Morphologie des spermatozoïdes** : Cette méthode se base sur des frottis du sperme coloré (HASKOURI, 2001), afin de séparer les spermatozoïdes normaux des anormaux (Figure 10).

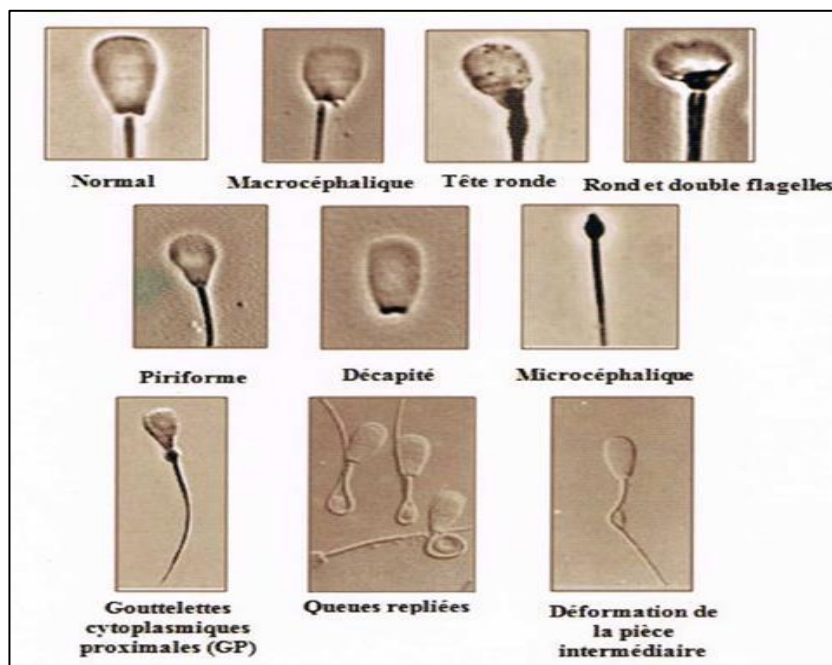


Figure 10 : Spermatozoïdes anormales dans l'espèce bovine (DUMONT, 1997).

➤ **Vitalité** : On distingue les spermatozoïdes morts grâce aux colorants éosine-nigrosine (DONOGHUE et al., 2000) par le microscope optique. Les spermatozoïdes vivants apparaissent incolores car les colorants ne passent pas dans leurs membranes (HASKOURI, 2001), alors que les spermatozoïdes colorés en rouge (éosine) sont morts (Figure 11). Le sperme est accepté si les spermatozoïdes morts < 25% (MANCIAUX et CHAMBON, 2011).

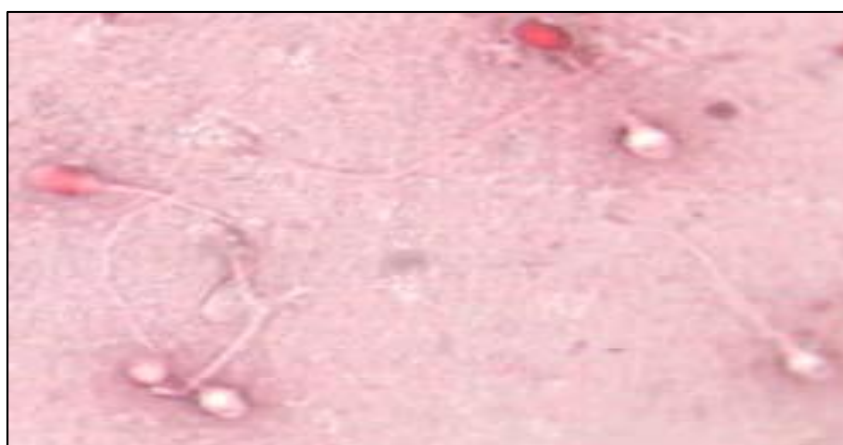


Figure 11 : La distinction entre Spermatozoïdes morts (tête rouge) et vivants (tête incolore) (AMMAR KESKES, 2013).

2.2. Analyse du spermogramme

Le spermogramme aide l'estimation de la qualité d'un éjaculat dans le but d'utiliser pour l'insémination artificielle (**PAREZ et THIBIER, 1983**). En 2010, l'OMS a publié des instructions présentées dans le tableau V qui énumère les valeurs standards générales d'un spermogramme. Ces valeurs varient selon le mode de collecte, l'hygrométrie, la température, la pluviométrie, la saison et l'alimentation (**KABERA, 2008**).

Tableau V : Valeurs standard d'un spermogramme (*in.* **SAGE, 2020**).

Volume en mL	au moins 1,5 mL
Nombre total de spermatozoïdes	au moins 39 millions
Pourcentage de spermatozoïdes actifs	au moins 58%
Sperme par mL	au moins 15 millions
pH	entre 7 et 8
Pourcentage de spermatozoïdes mobiles	au moins 32%
Pourcentage de spermatozoïdes normalement formés	au moins 4%
Nombre de globules blancs	moins de 1 million par mL
Temps de liquéfaction	entre 30 et 60 minutes
Test MAR	moins de 50% d'anticorps de spermatozoïdes

3. Méthode de conservation de la semence

L'ensemble des opérations de préparation de la semence bovine peut être comparé à une chaîne dont chaque maillon constitue un stade technologique très important (**ADAMOU N'DLAYE et al., 2003**).

Cette chaîne est chronologiquement découpée comme suit : la collecte du sperme, l'analyse du sperme récolté, la préparation de la semence, le conditionnement en doses individuelles, la congélation, la conservation et en fin la décongélation de la semence congelée pour qu'elle soit prête à l'IA (**JONDET, 1980**).

3.1. Principe de préparation de la semence

On obtient la semence par une technique convient pour l'insémination artificielle. En effet, les spermatozoïdes dans le sperme récolté sont supérieurs à ceux requis pour la fécondation. Alors il faut les diluer pour augmenter le volume de l'éjaculat et le nombre des vaches inséminés. Après la dilution, le sperme doit être conditionné en petites doses ensuite conservé (**KABERA, 2008**).

3.2. Les techniques de la cryoconservation

a. La dilution

L'objectif de la dilution est d'augmenter le volume de la semence, d'assurer un milieu bénéfique à la survie des spermatozoïdes *in vitro*, et inséminer plusieurs femelles par un seul éjaculat (HANZEN, 2010). Ce milieu doit être non toxique, cryoprotecteur, apport énergétique et nutritif et réduit les développements microbiens ou bactériens.

Le taux de dilution diffère selon la concentration des spermatozoïdes souhaités pour l'insémination, sachant que la dose fécondante doit avoir 10 à 12 millions de spermatozoïdes. Les dilueurs assurent un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes *in vitro* et augmentent le nombre de doses à inséminer (ENGLAND, 199).

De plus, ils protègent les spermatozoïdes de l'effet négatif de la baisse des températures (PENA, 2000). Chaque milieu est basé sur des compositions différentes illustrées dans le tableau VI.

Tableau VI : Composition des dilueurs les plus utilisés (LAMINOUE, 1999, *modifié*).

Milieu à base de jaune d'œuf et de citrate de sodium	Milieu IVT (Illinois, Variable, Température)	Milieu à base de lait de vache
<ul style="list-style-type: none"> · Citrate de sodium 2,9% · Jaune d'œuf 25% · Glycérol 7,5% · Antibiotiques 	<ul style="list-style-type: none"> · Bicarbonate de soude 0,2g · Citrate trisodique (2H₂O) 2g · Chlorure de potasse 0,04g · Glucose 0,3g · Jaune d'œuf 10% · Antibiotiques 	<ul style="list-style-type: none"> · Lait 54% · Jaune d'œuf 10% · Glycérol 6% · Antibiotiques

b. Conditionnement

Sa consiste à conditionner la semence en paillettes (Figure 12) (CASSOU, 1968 ; GERARD *et al.*, 2008). La semence doit être déjà refroidie à 4°C pendant 2 à 4 heures, afin de maintenir la qualité de la semence.

Les paillettes contiennent des doses individuelles : 15000000 spermatozoïdes par dose (RUKUNDO, 2009) et de volume entre 0,25 et 5ml. Les tubules sont ouvertes sur un côté pour pousser la semence, l'autre côté est soudé après remplissage de la paillette par un appareil de soudage.

Lorsque le but est de conserver à long terme, les paillettes doivent être identifiées par le nom de la race, le code, la date de récolte, et le centre de production, etc (RIGAL, 2008) (Voir annexe 3).

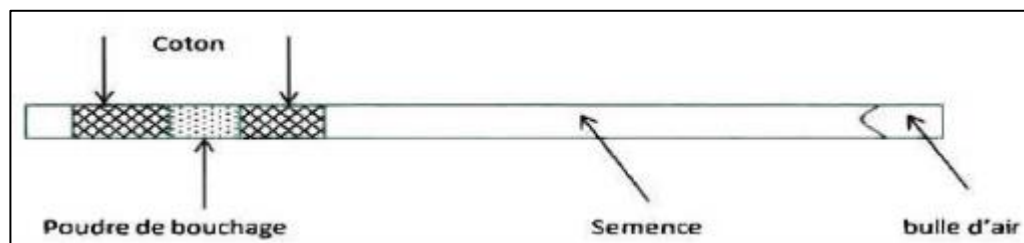


Figure 12 : Schéma d'une paillette de type « CASSOU » (MBAINDINGATOLOUM, 1982).

c. Conservation

Au moment d'utilisation de la semence, elle doit être conservée à 37°C. La température de la semence change dépend de:

- **La conservation à court terme** : il s'agit de conserver la semence quelques heures ou quelques jours sans qu'elle soit congelée. C'est par la réfrigération du sperme à environ 5°C (HANZEN, 2015 ; 2016) pendant 2 à 4 jours pour réduire la mobilité et le métabolisme des spermatozoïdes et prolonger leur survie (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1995).

- **La conservation à long terme (la cryoconservation)** : elle consiste à congeler la semence à -140°C au-dessus d'une vapeur d'azote liquide pendant 9 min, puis l'entreposer dans l'azote liquide à -196°C.

A cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (BAKHACH *et al.*, 2007).

4. Contrôle de la qualité de la semence

Lors des processus de la dilution et de la conservation, la semence est menacée par plusieurs risques : le choc thermique, le choc osmotique, l'acidification du milieu extracellulaire, la diminution de la qualité et la mobilité des spermatozoïdes, etc.

Ces risques influencent beaucoup plus la concentration des spermatozoïdes qui est mesuré à l'aide d'un hématimètre, ou un spectrophotomètre. En plus, ils influencent le volume de l'éjaculat, le pourcentage de gamètes anormaux et l'aptitude de la semence à supporter la congélation (GERARD *et al.*, 2008).

On peut utiliser la méthode du cytomètre en flux qui permet de donner des informations plus précises sur la concentration et la vitalité (**FERNANDEZ, et al., 2013**), et sur les paramètres de déplacement et de vitesse des spermatozoïdes (**GERARD et al., 2008**).

C'est une technique pour étudier les caractéristiques des cellules isolées dans un flux liquide (**RONOT et al., 2006**).

4.1. Notion de la spectrophotométrie

Le spectrophotomètre est utilisé dans les laboratoires d'insémination artificielle pour estimer le nombre des spermatozoïdes. C'est la technique la plus efficace car elle combine la vitesse et la précision.

Le principe général est de mesurer la densité optique (à une longueur d'onde de 550 nm) de la solution saline formulée précédemment, contenant les spermatozoïdes, et de la comparer à un blanc (ne contenant pas des spermatozoïdes).

Avant d'utiliser cette technique dans des conditions de routine, il est nécessaire d'obtenir une courbe standard à partir de 20 à 50 échantillons de concentration de spermatozoïdes différentes et connues, préalablement déterminées en comptant à l'œil nu par l'hématimètre (Cellule de Thomas ou de Malassez).

La corrélation et la pente de la régression linéaire sont calculées entre la densité optique de l'échantillon et sa concentration en spermatozoïdes (**CABANNES, 2008**). Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,9 et la pente proche de 1, alors un diagramme, ou la même formule de calcul, peut être utilisé dans des conditions de routine (**BARIL et al., 1993**).

5. L'insémination artificielle

Elle consiste à déposer la semence dans les voies génitales femelles sans aucun rapport sexuelle entre le mâle et la femelle (**GILLES, 2007**).

Chez les vaches cyclées, l'insémination artificielle se fait pendant la phase ovulatoire dans des bonnes conditions et qu'elles expriment des chaleurs (**GERARD et al., 2008**). Donc la vache doit être inséminée le même jour que l'éleveur détecte les signes de chaleurs (**PAREZ et DUPLAN, 1987**).

5.1. La décongélation

Cette méthode utilisée par (**HOPKINS et al., 1988**) dépend de la température (35°C à 37°C), le temps de décongélation (30 secondes à 2 minutes), et la solution de décongélation (extraire le glycérol du milieu pour éviter les altérations et les anomalies des spermatozoïdes ou l'eau physiologique).

5.2. Le dépôt du sperme

Le cathéter rempli par le sperme est injecté directement dans la cavité utérine, à l'aide du toucher des cornes par la palpation manuelle (Figure13).

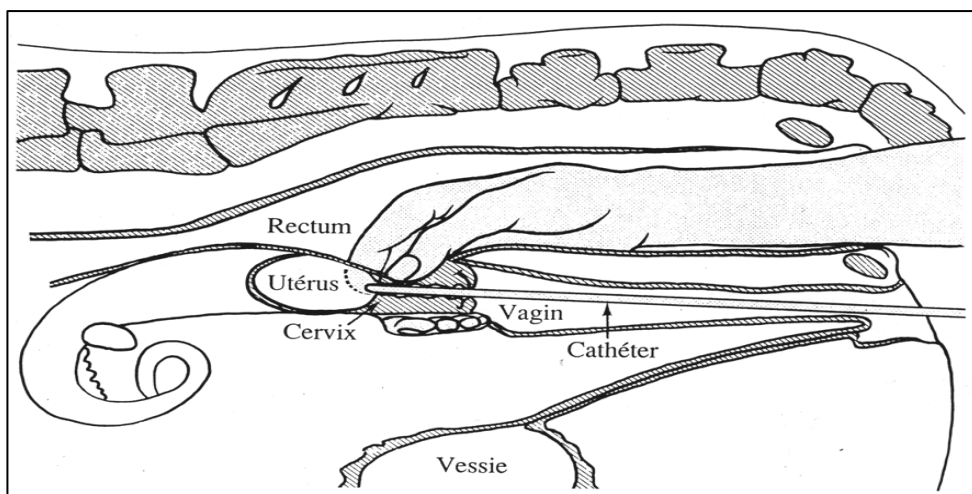


Figure 13 : La mise en place de la semence (**HANZEN, 2010**).

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Objectif

Le but est de préserver le potentiel génétique d'une race du taureau la période la plus longue possible et le transmettre à d'autres générations, même si l'animal ne pourra plus se reproduire à cause d'une maladie sanitaire ou s'il est mort.

Ainsi de transporter la semence en gardant toutes ses conditions nécessaires, et aussi permettre de réaliser l'insémination artificielle au moment voulu.

2. Zone d'étude

Le centre national de l'insémination artificielle et l'amélioration génétique (CNIAAG) consiste à la diffusion du progrès génétique par la mise en place de la semence, situé à Birtouta, Alger.

3. Matériel et méthodes

Pour décrire le matériel et les méthodes d'évaluation de la semence bovine, on a déplacée au CNIAAG, pendant deux mois à la saison du printemps (du Mars jusqu'à Mai). En utilisant deux taureaux JETSKY de la race HOLSTEIN.

3.1. la récolte du sperme

Les taureaux sont choisis le plus tôt possible après la puberté dont l'âge varie selon les individus en fonction de facteurs génétiques, mais aussi environnementaux et alimentaires (*in. GERARD et al., 2008*). Ces taureaux n'ont jamais eu un contact avec une femelle pour agir avec le vagin artificiel.

L'obtention d'une semence de qualité au moyen d'un vagin artificiel nécessite une bonne préparation des taureaux préalablement à la collecte (**RIGAL, 2008**). La collecte doit suivre les conditions suivantes :

- Le sperme est récolté dans une salle de monte (Figure 14). Elle doit être spacieuse, lumineuse, aérée, et facile à nettoyer et désinfecter (**GERARD et al., 2008**). Le sol de l'aire de monte propre et non glissant.



Figure 14 : Salle de monte (*ORIGINALE*, 2021).

- Réaliser des tests sanguins aux taureaux pour contrôler leur statut sanitaire.
- Nettoyer et désinfecter le vagin artificiel après chaque utilisation dans une étuve à 37°C pour garder une température ambiante.
- Des mains gantées du récoltant.
- Les tubes de récolte sont stériles et conservés dans un stérilisateur (Figure 15).



Figure 15 : Un stérilisateur (*ORIGINALE*, 2021).

- Les taureaux sont préparés et collectés sur des mâles castrés (Figure 16), les femelles étant déconseillées pour des raisons sanitaires et de sécurité (**GERARD et al., 2008**).



Figure 16 : Un mâle castré (*ORIGINALE*, 2021).

- Le voyeurisme des taureaux qui sont entraînés de faire l'acte sexuel, et la reconnaissance des odeurs et des bruits, stimulent la libido des autres taureaux qui attendent (Figure 19).

- Le taureau autorisé pour chevaucher doit premièrement sentir le bœuf en train (réaction de Flehmen) (GERARD *et al.*, 2008), la figure 17 récapitule la phase d'attente de la préparation sexuelle.



Figure 17 : Phase d'attente (*ORIGINALE*, 2021).

- La salle de réception de la semence communique avec la salle de collecte (CABANNES, 2008), La figure 18 illustre le contact avec le collecteur par une fenêtre.



Figure 18 : La collecte dans le vagin artificiel (*ORIGINALE*, 2021).

Après un nombre de fausses montes du taureau sur le bote en train ou sur le mannequin (Figure 19), le préservatif du vagin artificiel se dilatera plus ou moins.

Le contact simple entre le vagin artificiel et le pénis du taureau à travers le fourreau est suffisant pour déclencher l'éjaculation en quelques secondes et le sperme sera collecté dans le tube collecteur (*DUMONT, 1997 ; GERARD et KHIRREDINE, 2002*).



Figure 19 : La monte (*ORIGINALE*, 2021).

3.2. L'analyse du sperme récolté

Directement après la récolte, le tube de collecte rempli du sperme est conservé dans un bain marin à 37°C (Figure 20), pendant les examens séminologiques.



Figure 20 : Bain marin à 37°C (*ORIGINALE*, 2021).

a. Examen macroscopique

On se base sur l'observation visuelle pour noter le volume (lu directement au tube de collecte gradué ; Figure 21) et la couleur (crémeuse).



Figure 21 : Tubes de collecte (*ORIGINALE*, 2021).

b. Examen microscopique

✓ **La motilité**

Ce paramètre est étudié directement après la récolte en mettant une goutte du sperme à la surface de la lamelle pour l'observer sur un microscope optique à grossissement x 10. En utilisant une lame chauffante à 37/38°C pour observer les vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes qui seront évaluées de 0 - 5.

✓ **La concentration**

La méthode la plus utilisée dans les centres d'insémination artificielle et d'amélioration génétique est :

➤ Diluer le sperme par l'eau physiologique à l'aide d'un diluteur « MICROLAB 500 » jusqu'au le volume finale de 1ml.

➤ Prendre le sperme dilué et le mettre dans une cuvette placée sur le spectrophotomètre digital « ACCUCCEL-IMV », ce qui donne la valeur de la concentration d'une part et le volume de diluant nécessaire pour la dilution d'une autre part (Voir annexe 2).

La figure 22 représente la disposition des appareils ; le diluteur et le spectrophotomètre, dans la paillasse.



Figure 22 : Le diluteur à droite et le spectrophotomètre à gauche (**ORIGINALE, 2021**).

✓ La morphologie

Elle est constatée à l'aide des frottis de sperme, colorés par Giemsa, l'encre de Chine, Bleu de bromophénol, rose Bengale, et le plus souvent l'éosine-nigrosine, sous microscope à contraste de phase à un grossissement élevé (x 400 à x 600) (**CABANNES, 2008**).

✓ La vitalité

L'estimation de la vitalité des spermatozoïdes grâce à la coloration éosine/nigrosine (**FERNANDEZ et al., 2013**), bleu de méthylène, bleu de bromophénol, etc.

3.3. La préparation de la semence

a. La dilution

Après évaluation, la semence est diluée dans un milieu salin contenant du glycérol (cryoprotecteur), avec ou sans jaune d'œuf (**GERARD et al., 2008**). Le volume ajouté de dilueur est donné par le spectrophotomètre (la concentration du sperme x le volume du sperme).

Pour ce cas, CNIAAG a utilisé un diluant commercial à base du lait de soja qui est généralement le lait préchauffé à 95°C pendant 10 minutes (cryoprotecteur du choc thermique).

On peut utiliser aussi la protéine du jaune d'œuf qui empêche la lésion de la membrane cellulaire des spermatozoïdes, et des antibiotiques qui préviennent la croissance bactérienne.

Les diluants utilisés doivent fournir aux spermatozoïdes les conditions suivantes :

- Source nutritive et énergétique.
- Pouvoir tampon : Une molécule qui se comporte comme base dans un milieu acide ou l'inverse, pour maintenir le PH du milieu de conservation.
- Protectrice des agents pathogènes : les antibiotiques.
- Cryoprotectrice : On a deux types ;
 - ✓ Les cryoprotecteurs pénétrant « Glycérol » : qui pénètrent la membrane plasmique des spermatozoïdes et font sortir l'eau pour éviter la formation des cristaux intracellulaires lors de la congélation. On rajoute 4 à 8% de glycérol.
 - ✓ Les cryoprotecteurs non pénétrant « Lécithine » : qui réduisent les ports d'eau dans la membrane cytoplasmique des spermatozoïdes en diminuant le flux d'H₂O pour éviter l'éclatement de la membrane au cours de la décongélation.

b. Le refroidissement et le conditionnement

Après la dilution, la semence est réfrigérée à 4°C dans une vitrine pour entamer la phase d'équilibration (**GERARD et al., 2008**). Ensuite elle est conditionnée par une machine à remplir et souder par trois paillettes « MRS3 », équipée d'une pompe à vide pour le remplissage de semence. Dans cette pompe se trouve des tubes liés à un dispositif qui aspire la semence automatiquement et la met en place dans les paillettes. Ce dispositif a une tête sonotrode pour l'émission d'ultra-sons, servant à sceller hermétiquement les paillettes.

Une autre machine à jet d'encre « LINX » imprime les paillettes. Ces dernières sont identifiées par un code à barres indiquant le taureau donneur, la date de la collecte et le traitement de la semence (**GERARD et al., 2008**).

Les deux machines (Figure 23) sont attachées avec un ordinateur pour afficher le nombre des paillettes conditionnées, avec un appareil de la surveillance d'impression des paillettes (Voir annexe 3).

Chaque race des taureaux a une paillette avec un code de couleur spécifique :

- La race Montbéliard et Holstein : Paillette transparente.
- La race Normande : Paillette verte.
- La race Fleckvieh : Paillette jaune.

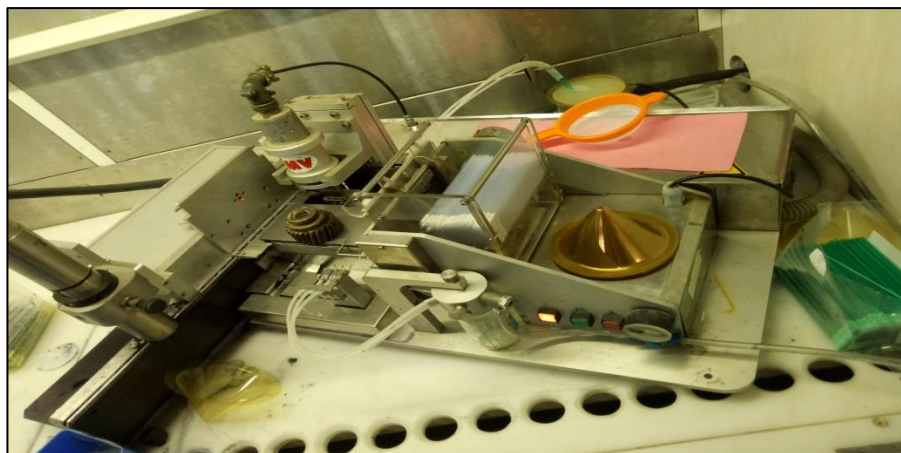


Figure 23 : Machines « MRS3 » et « LINX » attachées (*ORIGINALE*, 2021).

Ces paillettes sont ensuite placées dans des rampes pour les compter (100 paillettes par rampe) et éliminer celles qui sont non remplies, demi-remplies ou mal imprimées (Voir annexe 2). Enfin on les remet dans la vitrine réfrigérative à 4°C pendant 3 heures.

c. La cryoconservation

Cette technique consiste à mettre les rampes tout d'abord dans le mini digit cool lié avec un tank de vapeur d'azote (Figure 24). La température des paillettes au début est à 4°C, puis elle diminue à -140°C par la vapeur d'azote, cette étape dure 9 min.



Figure 24 : Congélateur programmable par les vapeurs d'azote (*ORIGINALE*, 2021).

Puis les paillettes sont entreposées des canisters et mises dans les biostat d'azote liquide à -196°C, comme illustré dans la figure 25, pour les conserver à long terme.



Figure 25 : Les biostat d'azote liquide (*ORIGINALE, 2021*).

3.4. La décongélation (GERARD et al., 2008) :

- ✓ Déterminer l'emplacement du réservoir.
- ✓ Remonter le canister au milieu du col de la cuve dans les vapeurs d'azote.
- ✓ Sortir la paillette à l'aide de pinces brucelles préalablement refroidies (Voir annexe 3), et la mettre rapidement dans le décongélateur (décongeler deux paillettes maximum en même temps), à température de 34 - 38°C pendant au moins 20 secondes pour les paillettes fines et 40 secondes pour les paillettes moyennes.

Les retards et les chocs de température lors de la décongélation affectent la qualité de la semence durant l'utilisation de l'insémination artificielle (**GERARD et al., 2008**). C'est pourquoi il est important d'évaluer la qualité de la semence après décongélation en utilisant deux à trois paillettes. On utilise les mêmes méthodes de la semence fraîche, comme la motilité et le pourcentage de spermatozoïdes morts et vivants (**CABANNES, 2008**).

3.5. L'insémination artificielle (Voir annexe 4)

On commence par la palpation manuelle. On utilise un pistolet de 40 à 45 cm de longueur et de 5 à 6mm d'épaisseur, comportant un corps externe qui comporte la paillette de la semence et un mandrin interne.

Il se complète d'une gaine en plastique externe fixée au pistolet d'insémination au moyen d'une petite rondelle pour pousser la semence dans la cavité utérine de la vache.

Le dépôt se fait 1 à 2 cm après la sortie du col en évitant l'entrée plus profonde du pistolet (risque de blessure) (**GERARD et al., 2008**).

D'après la situation sanitaire (Covid 19) on n'a pas pu terminer notre stage au niveau du CNIAAG pour valider nos résultats, on va discuter des résultats de la bibliographie sous forme d'étude de synthèse.

1. Résultats et discussions

1.1. Analyse macroscopique et microscopique avant la congélation

✓ Couleur

D'après l'étude de **CABANNES (2008)**, l'évaluation de la qualité du sperme est faite dans un centre d'insémination (COPELSO), situé à Saoul dans le Tarn, France.

- **Jaunâtre** : anomalie dans la mesure, ou la présence de pus ou d'urine dans le sperme.
- **Rosée** : la présence du sang en nature dans l'échantillon et peut signer une lésion urétrale ou de la verge.
- **Brunâtre** : le signe d'une affection du tractus génital engendrant une hémorragie.
- **Grisâtre** : peut être due à une contamination par du pus.

A travers cette étude, on a conclu que tout échantillon avec une coloration anormale sera éliminé et considéré comme une anomalie.

✓ Spermogramme

Selon **GBANGBOUCHE et al., (2011)**, ils ont testé dix-sept taureaux reproducteurs de race Borgou, au Bénin. Le but est de voir l'effet de la fréquence de récolte sur la qualité du sperme.

Les éjaculats sont récoltés en deux collectes par taureau. Après l'examen de chaque éjaculat récolté, on trouve que les paramètres spermatiques tels que le volume, la motilité, le pourcentage de spermatozoïdes vivants et la concentration sont restés statistiquement inchangés avec les jours de récolte et le nombre de récolte par séance.

Par ailleurs, ces valeurs peuvent être changées selon la race, le pays ou la région, voir le tableau VII.

Tableau VII : Spermogramme comparé de certaines races bovines tropicales (*in. GBANGBOUCHE et al., 2011*).

Races	Volume (ml)	Motilité de masse (05)	Concentration (x 10 ⁶ spz)	% de spermatozoïdes vivants	Pays ou région	Auteurs
Baoulé	2,7	3,1	0,96	63,4	Savane Burkina faso	Cloé et al., 1989
Angoni	3,25	2,9	1,7	81,5	Nord Nigeria	Igboeli et al., 1971
Goudali	6,5		0,6	68,83	Nord Nigeria	KumiDiaka et al., 1981
Créoles	4,3	3	0,57	66	Guadeloupe	Gauthier et Varo, 1985
cubaine	5,88	4	0,81		Cuba	MenendezBuxadera et al., 1983
Zébu Criollo	5,85	4	0,90		Cuba	MenendezBuxadera et al., 1983
N'Dama x N'Damance	4,05	2,5	0,9	51,2	Sudforestier	Tamboura et al., 1992
Muturu	2,1 ± 0,1		19,2 ± 0,46	34,5 ± 1,6	Nord Nigeria	Igboeli et al., 1987
Borgou	3,11 ± 0,57	4,24 ± 0,51	775,73 ± 188,04	90,18 ± 3,61	Benin	AdamouN'Diaye et al., 2000

On observe que les taureaux Borgou présentent de meilleures concentrations et motilités (Tableau 7) que celles rapportées pour les taureaux N'Dama x N'Damance et Zébu Angoni.

1.2. Effet de la dilution et refroidissement sur les spermatozoïdes

✓ Motilité et viabilité

GBANGBOUCHE *et al.*, (2011) ont utilisés six milieux de dilution à 5°C sur la motilité et la vitalité des spermatozoïdes pendant 28 jours *in vitro*, comme le montrent les figures 26 et 27.

➤ A J3, en moyenne la motilité est de $3,9 \pm 0,2$ et la vitalité des spermatozoïdes est de $73,6 \pm 11,0\%$ chez les différents milieux de dilution.

➤ A J5, on remarque une perte de spermatozoïdes et leur motilité dans les milieux à base de glucose 5% et 10%.

➤ Jusqu'à J10, la perte quotidienne des spermatozoïdes dans un milieu à base de lait commercial est la même dans les milieux à base de lait de vache et de jaune d'œuf.

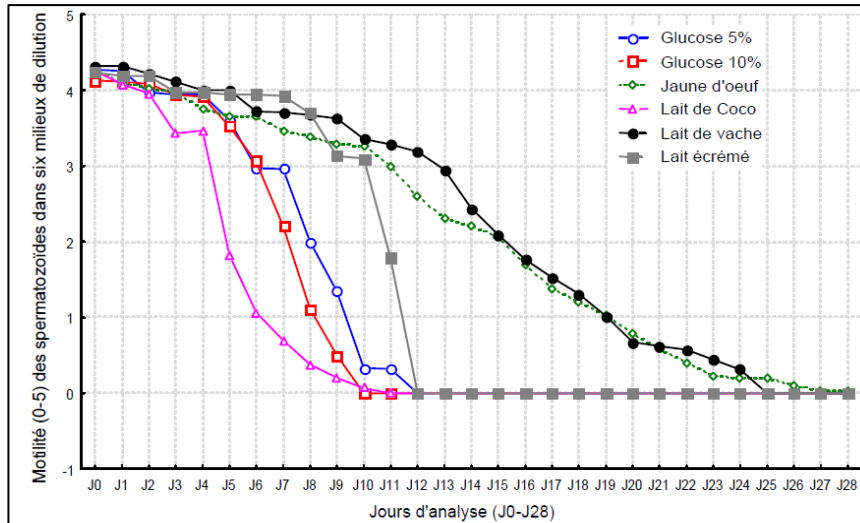


Figure 26 : Evolution de la motilité des spermatozoïdes (échelle de 0 à 5) dans six milieux de dilution, conservation à +5 °C pendant 28 jours (GBANGBOUCHE *et al.*, 2011).

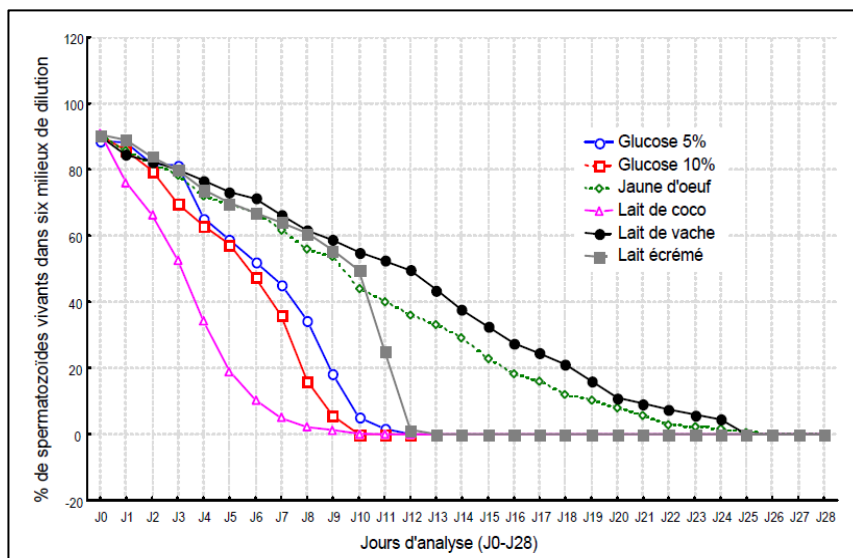


Figure 27 : Evolution de la viabilité de spermatozoïdes (% de spermatozoïdes vivants) dans six milieux de dilution, conservation à +5 °C pendant 28 jours (GBANGBOUCHE *et al.*, 2011).

Les spermatozoïdes traités par le milieu à base de lait de coco sont moins tolérants par rapport au milieu à base de jaune d'œuf et de lait de vache.

On conclut que tous les milieux de dilution testés peuvent être utilisés pour conserver les semences à +5 °C pendant 48 heures. Sauf le lait de vache et le jaune d'œuf, leur durée de conservation peut être prolongée jusqu'à 72 heures.

En effet, la partie lipidique et lipoprotéique du jaune d'œuf protège les spermatozoïdes contre les chocs thermiques et favorise leur conservation.

✓ Vitalité

D'après **GARNER et JOHNSON (1995)**, ils ont fait une étude sur plusieurs types de mammifères tels que les bovins. Ils ont récolté leurs semences et suivi les processus de préparation de la semence : dilution et refroidissement.

Ensuite, 500 μ l de la semence est mélangés avec une combinaison des colorants fluorescents ; 0.27 μ l de SYBR-14 et 2 μ l de PI (Iodure de Propidium). Ces colorants sont préalablement préparés par dilution de SYBR-14 au 1/10 avec du méthyl sulfoxyde anhydre et de PI dans une solution saline de Tyrode à 2 mg/ml.

La coloration fluorescente des spermatozoïdes est surveillée et photographiée avec un microscope à épi-fluorescence Zeiss Axiophot. L'examen en microscopie à fluorescence révèle que les spermatozoïdes colorés en vert par le SYBR-14 sont vivants et les spermatozoïdes colorés en rouge vif par le PI sont morts, car ils ont perdu leur intégrité membranaire, comme l'illustre la figure 28.

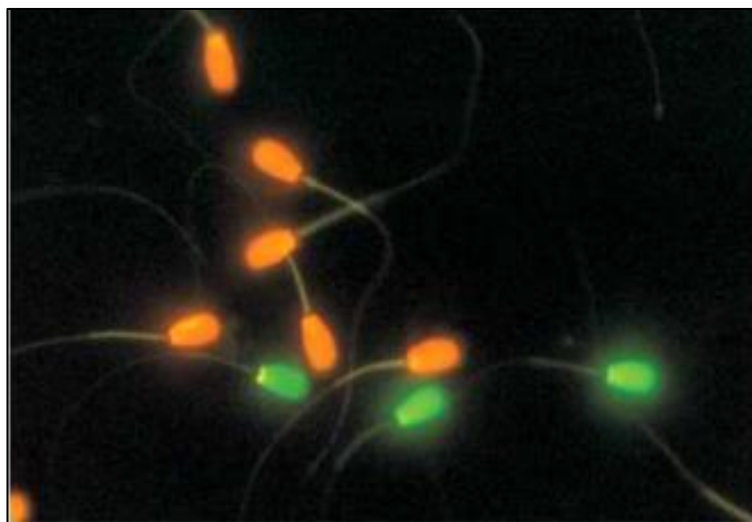


Figure 28 : Spermatozoïdes morts en rouge et vivants colorés en vert avec le mélange SYBR et PI (**GARNER et JOHNSON, 1995**).

1.3. Effet de la congélation sur les spermatozoïdes**✓ Vitalité**

ADAMOU-N'DIAYE et al., (2003) ont fait une étude sur 17 taureaux Borgou au Bénin. Leurs semences récoltées sont placées dans un bain-marie à +32°C, pour une dilution en deux phases successives.

D'abord, ils ont ajouté le 1^{er} diluant puis, les semences ont été réparties en trois lots pour abaisser graduellement la température de +32°C à +5°C. Les temps de refroidissement sont de 30, 60 et 120 minutes pour les lots 1, 2 et 3 respectivement. Deux heures après, ils ont ajouté le 2^{ème} diluant à la semence maintenue à +5°C. Puis, la semence a été mise en paillettes et conservée à +5°C pendant 3 heures.

Ensuite, les trois lots de semence ont été cryoconservés dans l'azote liquide à -89,4°C, -116°C et -163°C, à la 10^{ème} min, 15^{ème} et 35^{ème} min respectivement.

Enfin, 34 paillettes (Figure 30) de chaque lot ont été décongelées dans de l'eau à +35° C pendant 7 min et 204 paillettes (Figure 31) ont été réparties en 6 groupes de 34 et incubées à +38° C pendant 30 minutes, 1, 2,3, 4 et 5 heures respectivement.

On remarque dans la figure 29 qu'il y a une forte diminution dans le pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation, donc on conclut que la congélation a un effet sur la teneur en spermatozoïdes vivants des semences.

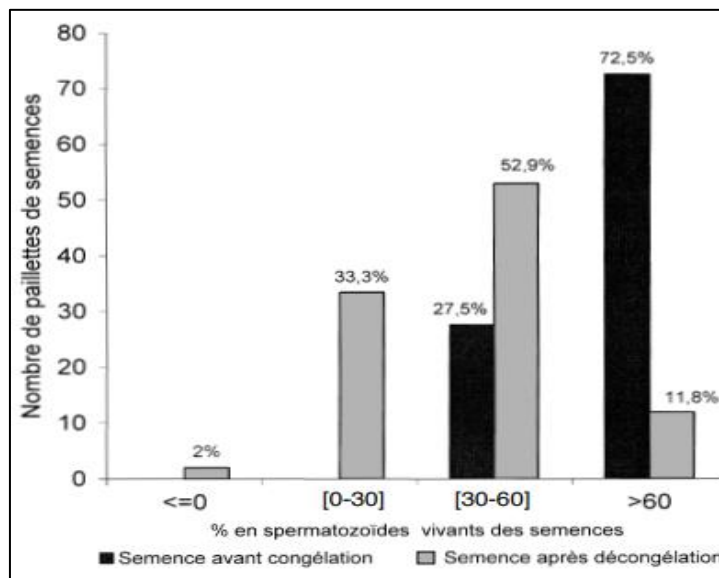


Figure 29 : Répartition des 34 paillettes de semences (1 paillette/éjaculat, 2 éjaculats et 17 taureaux) en fonction de spermatozoïdes vivants avant congélation (histogramme noir) ou avant décongélation (histogramme gris) (ADAMOU-N'DIAYE *et al.*, 2003).

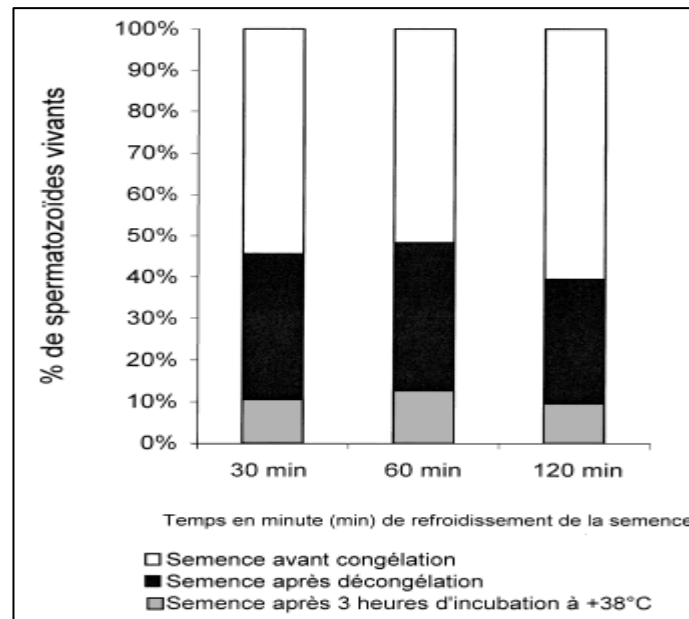


Figure 30 : Pourcentage de spermatozoïdes vivants après incubation de 3 heures à +38° C en fonction de la durée de refroidissement de la semence dans 204 paillettes correspondant à 17 taureaux (2 éjaculats par taureau et 6 paillettes/éjaculat) (ADAMOU-N'DIAYE *et al.*, 2003).

Pour la figure 30, le pourcentage de spermatozoïdes vivants avant congélation est presque identique pour les trois temps de refroidissement. Après décongélation, le refroidissement le plus lent (120 minutes) correspond au plus faible pourcentage des spermatozoïdes vivants, ce qui montre l'efficacité du temps de refroidissement sur la vitalité des spermatozoïdes.

On conclut que la fragilité des spermatozoïdes de cette race bovine induit une diminution importante de 25% de la vitalité des spermatozoïdes.

✓ Morphologie

a. Changements structurale

En effet, KHALIL *et al.*, (2017) ont fait une étude sur cinq taureaux âgés de 4 à 8 ans, élevés au centre international de formation à la gestion du bétail, à l'Égypte.

D'abord, le sperme a été collecté deux fois par semaine pendant 5 semaines en utilisant un vagin artificiel préchauffé à 42°C.

Puis ils ont sélectionné les éjaculats distingués de 70% de motilité pour des expériences de cryoconservation. La semence a été préparée (dilution, refroidissement, conditionnement et cryoconservation).

Enfin, Les échantillons ont été évalués avant et juste après dilution (à +37°C), à 2h et 4h pendant l'équilibrage et après décongélation (à +37°C pendant 30s au bain-marie).

L'évaluation des échantillons comporte à la fois la mobilité, la viabilité, les dommages structurels induits par la cryoconservation et l'intégrité de la chromatine, qui sont déterminés en utilisant le microscope à contraste de phase, le microscope optique, le microscope électronique à balayage et à transmission.

Les échantillons de sperme brut et fraîchement dilués maintenus à 37°C présentent une motilité et une viabilité similaires. Cependant, au début du refroidissement et pendant la période d'équilibration, il y a une réduction significative de la motilité des spermatozoïdes et une diminution significative de la viabilité des spermatozoïdes, comme illustré dans le tableau VIII.

On observe dans la figure 31 une augmentation du pourcentage d'anomalies des spermatozoïdes (des queues fêlées et des têtes détachées).

Tableau VIII : L'effet des différentes étapes de traitement de la cryoconservation du sperme sur la motilité, la viabilité et les formes anormales des spermatozoïdes examinés par microscope optique (KHALIL *et al.*, 2017, *modifié*).

	Motilité	Mort	Anormale
Sperme fraîchement collecté	77 ± 1.7	23 ± 0.7	19 ± 0.8
Sperme fraîchement dilué	71 ± 0.8	26 ± 0.4	20 ± 1.2
Sperme refroidie	67 ± 1.1	30 ± 1.6	22 ± 1.0
Sperme équilibré	63 ± 1.7	35 ± 1.3	24 ± 0.5
Sperme congelé-décongelé	50.8 ± 2.7	45 ± 2.2	29 ± 1.5

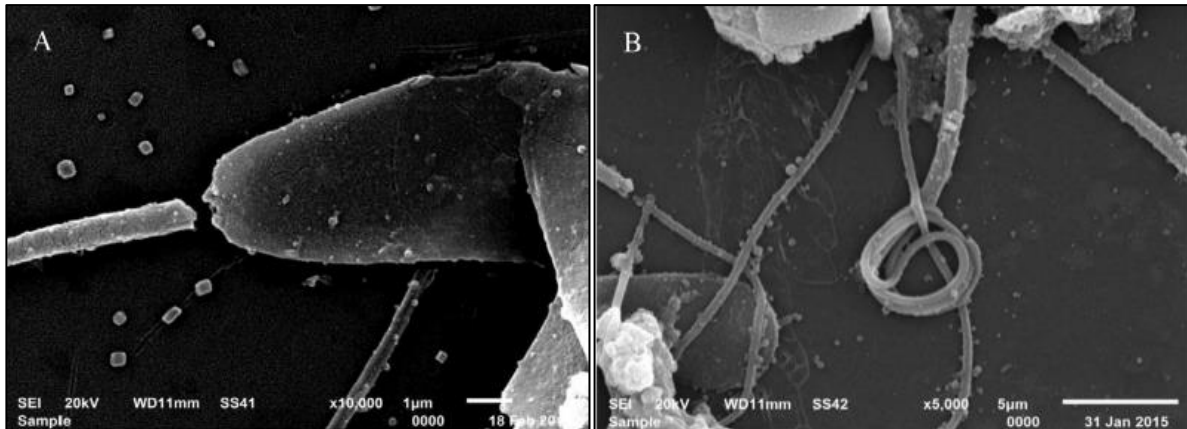


Figure 31 : Images représentatives par le microscope électronique à balayage montrant des exemples d'anomalies des spermatozoïdes qui se produisent pendant la cryoconservation du sperme de taureau. A : tête détachée et fissurée, B : queue enroulée (KHALIL *et al.*, 2017).

b. Changements ultra-structurale

o Dommages à la membrane plasmique

La figure 32 présenté par LEAHY et GADELLA (2011) :

A) Le sperme après éjaculation : les spermatozoïdes se caractérisent par l'acquisition des glycoprotéines du plasma séminal (orange) qui adhèrent fortement à la surface du spermatozoïde et stabilisent efficacement la cellule pendant le transport à travers le tractus génital féminin. Et des protéines (vert) qui sont impliquées dans la liaison spermatozoïdes et les facteurs de stabilisation de surface (1).

B) La cryoconservation affecte la surface du spermatozoïde : elle élimine les facteurs de décapacitation (orange). C'est la capacitation précoce due au stress physique. De plus, le stress chimique tel que les changements de température, de tampons et de pression, peut provoquer des changements dans les propriétés de surface du sperme: séparation de phase des lipides dans la membrane plasmique du sperme (2), perte d'acrosome (3), production mortelle de ROS et la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne (4) et des dommages de l'ADN (5).

Ainsi, au niveau du flagelle (6) il y'a une phosphorylation de la tyrosine induite par les ROS (qui inhibe l'hyper-activation du flagelle), malgré le fait que les spermatozoïdes soient immobiles.

C) L'endommagement de la membrane plasmique, la libération de protéines (vert) et de vésicules (en bleu) de la membrane du sperme et la détérioration des cellules.

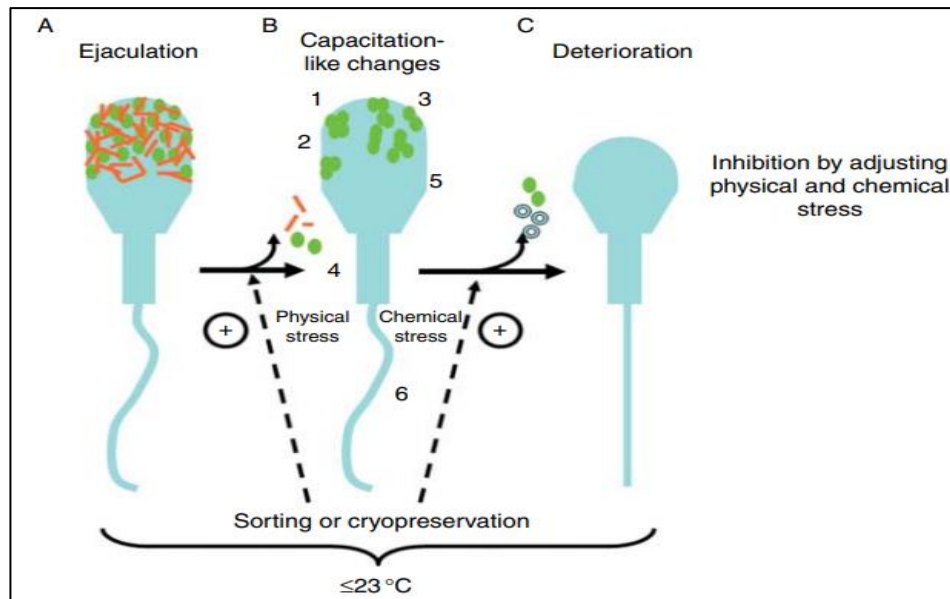


Figure 32 : Effets de la manipulation du sperme sur la surface du sperme (LEAHY et GADELLA, 2011).

En conclusion, la cryoconservation de la semence bovine entraîne des effets néfastes sur la semence, des changements physiologiques qui provoquent un dysfonctionnement irréversible du spermatozoïde, ce qui diminue la qualité de la semence après la décongélation.

o Dommages aux acrosomes

KHALIL et al., (2017) ont classé différents schémas acrosomiques en :

ACS1) Acrosome intact: dont les têtes de spermatozoïdes présentent une membrane acrosomique intacte entourant la substance fondamentale acrosomique.

ACS2) Réaction acrosomique typique (AR) : un gonflement de la substance fondamentale acrosomique avec des vésicules de plasma fusionné et des membranes acrosomiques externes.

ACS3) Réaction acrosomique atypique : un gonflement de la substance fondamentale acrosomale dispersée sous la membrane acrosomale externe gonflée. Peu de spermatozoïdes présentent un acrosome complètement absent (Figure 33).

De plus, la congélation a significativement augmenté la réaction acrosomique typique par rapport au sperme dilué (37°C), a également augmenté la réaction acrosomique atypique et avait tendance à augmenter la probabilité de perte complète de l'acrosome. Le refroidissement et l'équilibrage n'ont pas induit de changements significatifs dans la structure acrosomique.

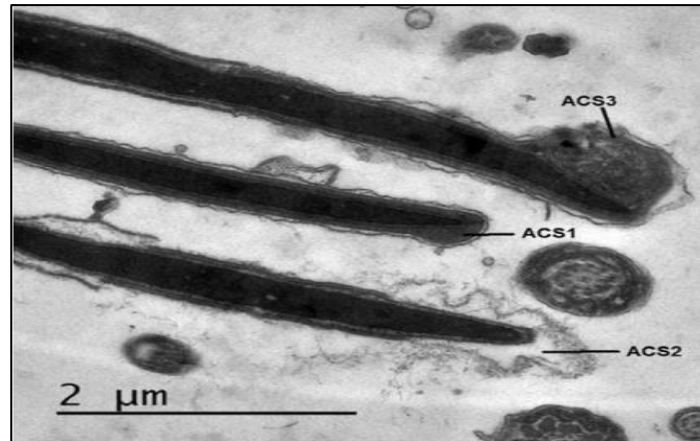


Figure 33 : Micrographies représentatives montrant des changements ultra-structuraux dans l'acrosome du sperme. ACS1 : Acrosome intact, ACS2 : réaction acrosomique typique (AR) et ACS3 : AR atypique (KHALIL *et al.*, 2017).

En conclusion, le processus de cryoconservation a détérioré plusieurs propriétés du sperme. Les dommages les plus prononcés ont été observés dans la structure de la membrane plasmique.

En plus, des dommages mineurs aux acrosomes, aux mitochondries et à la chromatine, la réduction des dommages dans la membrane plasmique des spermatozoïdes, les mitochondries et l'ADN devrait être évaluée et ciblée pendant l'équilibrage et la cryoconservation, avant que la plupart des dommages ne soient initiés. Cela est pour améliorer les protocoles de cryoconservation du sperme de taureau utilisé pour l'IA.

c. Changements morphologiques et physiologiques

UGUR *et al.*, (2019) montrent que la cryoconservation du sperme est un processus séquentiel de réduction de température, déshydratation de la cellule, congélation, stockage et décongélation. Contrairement aux autres cellules de l'organisme, les spermatozoïdes sont moins sensibles aux dommages causés par la cryoconservation en raison de leur faible teneur en eau et de la haute fluidité des membranes.

Pendant le refroidissement, les cellules sont exposées à de nombreux effets nocifs, notamment le découplage métabolique, le déséquilibre ionique, l'activation des protéases, l'acidose cellulaire, la privation d'énergie, la transition de phase membranaire, déstabilisation du cytosquelette et production de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (BAILEY *et al.*, 2000).

Au cours du processus de congélation, les spermatozoïdes sont prédisposés aux effets néfastes de la formation de cristaux de glace, hyper-osmolarité, altérations de la volume cellulaire et protéine dénaturation

Les effets morphologiques et physiologiques des processus de congélation et de décongélation sur le sperme de taureau sont résumés dans la figure 34 :

- **Changements membranaires :** La principale cause de lésion cellulaire en cryoconservation est l'endommagement subi par la membrane plasmique.

Les changements de phase impliquant les membranes lipidiques conduisent à une séparation des phases lipidiques, ainsi les protéines sont regroupées de manière irréversible (**DE LEEUW et al., 1990**).

- **Changements mitochondriales :** Le changement de la température détruit la mitochondrie.

- **Production excessive de ROS :** Pendant la cryoconservation, toute modification de la fluidité de la membrane mitochondriale peut entraîner la libération de ROS et des modifications dans le potentiel membranaire (**SAID et al., 2010**).

Les ROS sont le produit d'une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire qui peuvent, à des niveaux élevés, endommager l'ADN (Cassures double brin) (**MC CARTHY et al., 2010**), et causer l'apoptose.

- **Motilité réduite :** On remarque une motilité lente des spermatozoïdes.

- **Changements moléculaires :** Les méthodes de congélation et le stade de la cryoconservation peuvent influencer la structure de la chromatine qui est principalement altérée au stade de la décongélation de la cryoconservation (**HAMMADECH et al., 2001 ; CASTRO et al., 2016**).

En outre, les altérations nucléaires du sperme sont attribuées à des cycles de congélation et de décongélation qui sont ensuite liés à des dommages à l'ADN (**EVENSOM, 2016 ; CASTRO et al., 2016**). Mais aussi, les spermatozoïdes cryoconservés présentent une altération d'ARN non codants (**CAPRA et al., 2017**).

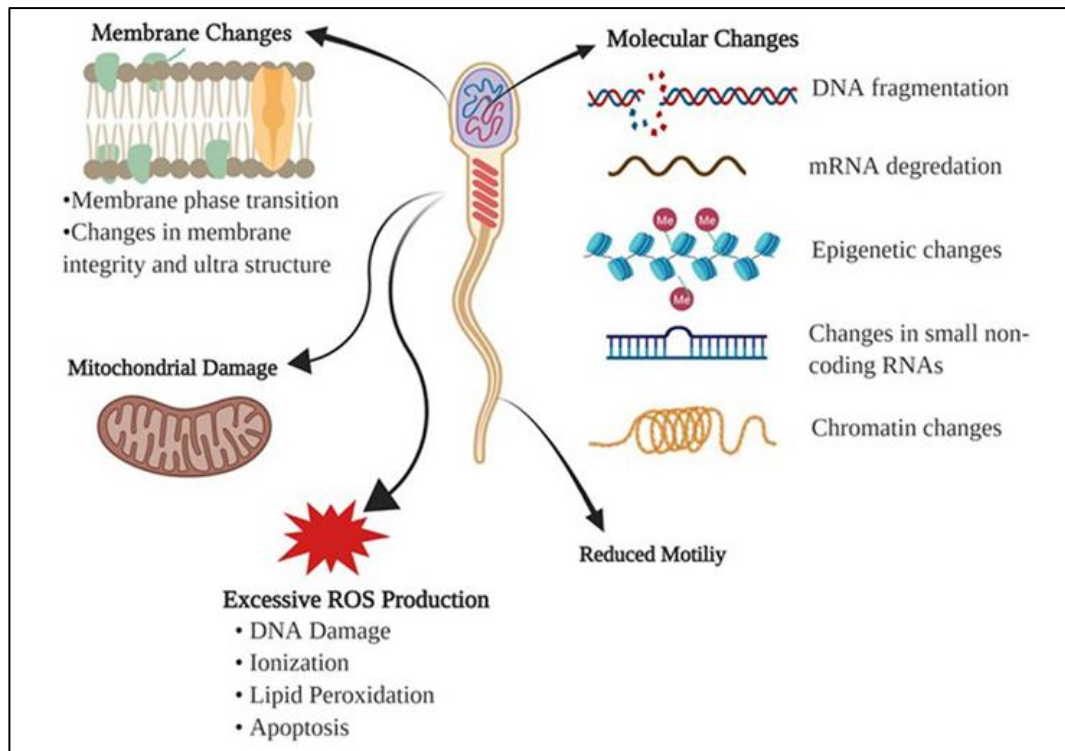


Figure 34 : Effets néfastes de la congélation-décongélation sur un spermatozoïde (UGUR et *al.*, 2019).

CONCLUSION PERSPECTIVE

CONCLUSION PERSPECTIVE

La cryoconservation a été introduite dans les années 1960s comme voie de préservation de la fertilité (**HEZAVEHE et al., 20018**). Cette méthode a des effets néfastes sur la physiologie et les propriétés du sperme, ce qui engendre des dommages et des modifications conduisant à la mort du sperme. Cela réduit les paramètres de qualité du spermatozoïde congelé-décongelé. Donc, l'évaluation de la qualité du sperme décongelé est un paramètre indispensable dans l'IA, pour envisager les effets causés par la cryoconservation sur les spermatozoïdes afin d'éliminer ceux qui sont invalides et ont perdu leurs propriétés.

On est arrivé à recenser les effets de processus de la cryoconservation sur le sperme, grâce à l'observation, d'une part, des résultats de différents articles analysant la semence cryoconservée, et d'autre part, des résultats obtenus lors des examens séminologiques de la semence fraîche.

En revanche, la cryoconservation entraîne une diminution d'environ 50% de la vitalité des spermatozoïdes en raison de : (1) la température, (2) les effets osmotiques, (3) les changements morphologiques se produisant dans l'organisation, (4) la fluidité, (5) la perméabilité et la composition lipidique des membranes des spermatozoïdes (**THOMAS et al., 1998**), (6) les caractéristiques individuelles de chaque animal, (7) la concentration des semences, (8) le dilueur, (9) le temps de refroidissement, et (10) le mode de congélation, de décongélation et d'incubation de la semence.

En perspective, ce travail peut être étendu en utilisant d'autres méthodes qui confirment les données étudiées. En utilisant les appareils suivants : CASA au laboratoire de biotechnologie de la reproduction animale, ISV, université de Blida1, et la cytométrie en flux au centre nationale d'insémination artificielle et l'amélioration génétique « CNIAAG » à Birtouta, Alger.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ADAMOU-N'DIAYE, M., GBANGBOCHE, A. B., ADJOVI, A et HANZEN, CH., 2000. Caractéristiques spermatiques des taureaux de race Borgou au Bénin. *Annales des Sciences Agronomiques du Bénin*, 2(1): 71-83.
- [2] ADAMOU-N'DIAYE, M., GBANGBOCHE, A. B., ADJOVI, A et JONDET R., 2003. Cryopréservation du sperme de taureau de race Borgou au Bénin. *Revue Méd. Vét.*, 154 (1), P: 3-8.
- [3] ALBERT, D. B., 2007. Evaluation of potential breeding soundness of the bull. *Current Therapy in large animal theriogenology, Second edition R Saunders Elsevier*, P: 230-233.
- [4] AMANN, R. P., 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 1983, vol. 66, n° 12, P: 2606-2622.
- [5] AMMAR KESKES, L., 2013. Biologie de la reproduction: Atlas de spermologie. Faculté de médecine de Sfax, Tunisie.
- [6] BAHAR, G. F et ZEITLER, E., 1964. Study of bull spermatozoa: Quantitative electron microscopy. *The Journal of cell biology*, vol 21, n° 2, P: 175-189.
- [7] BAILEY, J. L., BILODEAU, J. F et CORMIER, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, vol 21, n° 1, P: 1-7.
- [8] BAKHACH, J., CASOLI, V et GUIMBERTEAU, J. C., 2007. La cryopréservation des tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52 (5): 531-547.
- [9] BALL J, H et PETERS, A. R., 2004. Reproduction in cattle. *3rd edition*. Oxford, UK; Ames: Iowa: Wiley-Blackwell Pub; 252 P.
- [10] BARIL, G., CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUERIN, Y., LEBŒUF, B., ORGEUR, P et VALLET, J. C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Station de la physiologie de la reproduction. Institut national de la recherche agronomique (INRA).
- [11] BARONE, R., 1978. Anatomie comparée des mammifères domestiques. *Tome 3, Splanchnologie*. Vigot. Vol 1, 879 P.
- [12] BARONE, R., 1990. Anatomie comparée des mammifères domestiques. *Tome 4, Splanchnologie II*. Vigot. Editeurs. Paris, 2^{ème} édition, Vol. 1, 501 P.
- [13] BARONE, R., 2001. Anatomie comparée des mammifères domestique. *Tome 4, Splanchnologie II, 3ème édition*, Vol. 2, 896 P.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [14] BARTH, A. D et OKO, R. J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press. *1^{er} edition*.
- [15] BEZUIDENHOUT, C., FOURIE, F. R., MEINTJES, M., BORNMAN, M. S., BARTELS, P et GODKE, R. A., 1995. Comparative epididymal sperm cell motility of African ungulate and equid game species stored at 4°C.
- [16] BOLY, H., 1986. La récolte du sperme chez le babouin (*Papio papio*) Par la technique de l'électro-éjaculation. Thèse de *Dr Vét.* Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires (*EISMV*). Université de Dakar.
- [17] BONNES, G., DESCTAUDE, J., DROGOUL, C., GADOUD, R., Le LOC'H, A., MONTMEAS, L., ROBIN, G., 1988. Reproduction des mammifères d'élevage. *1ère édition*, Paris.
- [18] BRIAND-AMIRAT, L., ANTON, M., GERARD, O et TAINTURIER, D., 2006. Etude de la fertilité in vitro de la semence de taureau après congélation-décongélation avec les LDL du jaune d'œuf de poule: Comparaison avec l'Optidyl®, dilueur commercial à base de jaune d'œuf. *Revue Méd. Vét. Vol. 157, n° 4, P : 205-212.*
- [19] CABANNES, C. R., 2008. Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine (Thèse de doctorat vétérinaire. Université Toulouse 3) 107 P.
- [20] CHENOWETH, P. J., BRINKS J. S., NETT, T. M., 1979. Comparison of three methods of assessing sex-drive in yearling beef bulls and relationships with testosterone and LH levels. *Theriogenology, Vol. 12, n°4, P: 223-233.*
- [21] CUPPS, P. T., 1991. Reproduction in domestic animals. *Fourth edition* SanDiego. *Academic press*, 670 P.
- [22] CUQ, P., 1973. Bases anatomiques et fonctionnelles de la reproduction chez le zébu (*Bos indicus*). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, Vol. 26, n° 4, P : 21a-48a.*
- [23] DACHEUX, F., 2001. La Reproduction chez les mammifères et l'homme – *INRA Editions Ellipses*, Paris.
- [24] DADOUNE, P. J et DEMOULIN, A., 2001. Structure et fonctions du testicule. *In: THIBAUT, C et LEVASSEUR, M. C. La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, Paris : 256-289 P.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [25] DAYON, A., 2008. Rôle de la sphingosine kinas-1 dans la survie et la progression des cellules tumorales prostatiques LNCaP vers l'androgéno-indépendance. Thèse de Doctorat, l'université de Toulouse.
- [26] DE LEEUW, F. E., CHEN, H. C., COLENBRANDER, B et VERKLEIJ, A. J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, Vol. 27, n° 2, P: 171-183.
- [27] DONOGHUE, A. M et WISHART, G. J., 2000. Storage of poultry semen. *Animal reproduction science*, Vol. 62, n° 1-3, P: 213-232.
- [28] DUMONT, P., 1997. Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le Point Vétérinaire*. P: 28. 1617-1628.
- [29] DUNGDUNG, S. R., BHOUMIK, A., SAHA, S., GHOSH, P., DAS, K., MUKHERJEE, S., NATH, D., CHAKRABARTY, J., KUNDU, C., JAISWAL, B.S., MANDAL, M., MAITI, M., BANERJEE, S., ROYCHOWDHURY, M., RAY, D., BHATTACHARYYA, D et MAJUMDER, G. C., 2016. Sperm motility regulatory proteins: a tool to enhance sperm quality. *In: Insights from Animal Reproduction. InTech*.
- [30] EDDY, E. M., 1998, August. Regulation of gene expression during spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 9, n° 4, P: 451-457. Academic press.
- [31] ENGLAND, G., 1993. Cryopreservation of dog semen: a review, *journal of reproduction and fertility supplements*. Vol. 4, P: 243-255.
- [32] FERNÁNDEZ-GAGO, R., DOMINGUEZ, J. C et MARTÍNEZ-PASTOR, F., 2013. Seminal plasma applied post thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, P: 1 -11.
- [33] GARNER, D. et JOHNSON, L. A., 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of reproduction*, Vol. 53, n° 2, P : 276-284.
- [34] GARRIGUE, M., 2017. Effet du stress thermique sur les paramètres séminologiques de taureaux de centre d'insémination. Thèse de doctorat.
- [35] GAULIARD, L., 2008. La congélation de la semence de chat domestique, étude bibliographique et expérimentale. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- [36] GBANGBOCHE, A. B., ALKOIRET, T. I., CHRYSOSTOME, C. A. A. M., DOSSOU-BODJRENOU, J., AISSI, E., ADJOVI, A., ADAMOU-N'DIAYE, M. S., BISTER, J. L., 2011. Effet de la fréquence de récolte et des milieux de dilution sur la qualité du sperme de taureau de race Borgou. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, Vol. 5, n°5, P: 1871-1882.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [37] GERARD, O et KHIRREDINE, B., 2002. Production de semence bovine. Didacticiel de maîtrise de la reproduction des bovins. P : 73.
- [38] GERARD, O., PONSART, C., PETIT, M et HUMBLLOT, P., 2008. Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. Union nationale des coopérateurs d'insémination animale (*UNCEIA*), France. Rencontres autour des recherches sur les ruminants, *Vol. 15*, P : 351-354.
- [39] GERNIGON, T., 1993. Embryologie générale humaine. Office des publications universitaires 1, place centrale de ben-aknoun, Alger. P : 53.
- [40] GILLES, L. H. T., 2007. Amélioration de la pratique de l'insémination artificielle bovine dans le bassin arachidier et dans la zone Sylvo-pastorale au Sénégal, mémoire Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires de Dakar, P : 7.
- [41] GOLDBERG, E, ZIRKIN, B. R., 2018. Spermatogenesis. Overview. *In: Encyclopedia of reproduction. Second edition.* San Diego: Elsevier; P: 13-8.
- [42] HAFEZ, B et HAFEZ, E. S. E., 2000. Reproduction in farm animals. *7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 509 P.*
- [43] HAGEN, P. N et GAYRARD, T. V., 2005. Mémento des critères numériques de reproduction des mammifères domestiques. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 8 P.
- [44] HAGEN, P. N, et GAYRARD, T. V., 2011. L'infertilité du taureau: approche pratique. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire Elevages et Sante, 2011, Vol. 4, n° 18, P : 15-22.*
- [45] HANZEN, C. H., 2009. La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. *ORBI Université de Liège, P : 21.*
- [46] HANZEN, C. H., 2010. Cours de rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction de la vache. Faculté de médecine vétérinaire, Université de liège. Service de Thériogénologie des animaux de production.
- [47] HANZEN, C. H., 2011. Propédeutique de l'appareil génital male des ruminants, Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire, Service de Thériogénologie des animaux de production.
- [48] HANZEN, C. H., 2015-2016. L'insémination artificielle chez les ruminants. Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire, Service de Thériogénologie des animaux de production. P : 5-6.
- [49] HASKOURI, H., 2001. Gestion de la reproduction chez la vache ; insémination artificielle et détection des chaleurs. Royaume du Maroc institut agronomique et vétérinaire Hassen 11 département de la reproduction animale et de l'insémination artificielle. 10 P.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [50] HAZEN, C., 2009-2010. Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. *ORBI*. Université de Liège, 8 P.
- [51] HESS, R. A et DE FRANCA L. R., 2009. Spermatogenesis and cycle of seminiferous epithelium. Dans: *Cheng DY*, rédacteur. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Springer New York, *Vol.* 636, P: 1 - 15.
- [52] HEZAVEHEI, M; SHARAFI, M; KOUCHESFAHANI, H. M; HENKEL, R; AGARWAL, R; ESMAEILI, V et SHAHVERDI, A., 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Vol.* 37, P: 327-339.
- [53] HOCHEREAU, M. T., COUROT, M., et ORTAVANT, R., 1964. Durée de la spermatogénèse chez le taureau; étude par autoradiographie testiculaire. *In: Proceedings of fifth international congress on animal reproduction, Trento*. P: 541.
- [54] HOPKINS, S. M., ARMSTRONG, D. L et HUMMEL, S. K. C., 1988. Successful cryopreservation of gaur (*Bos gaurus*) epididymal spermatozoa. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, P: 195-201.
- [55] HOPPER, R. M., 2015. Bovine reproduction. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. P: 800.
- [56] IGBOELI, G. et RAKHA, A. M., 1971. Gonadal and extragonadal sperm reserves of indigenous Central African bulls. *Reproduction*, *Vol.* 25, n° 1, P: 107-109.
- [57] JOHNSTEN, D. S., JELINSKY, S. A., BANG, H. J., DICANDELORO, P., WILSON, E., KOPF, G. S et TURNER, T. T., 2005. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of reproduction*, *Vol.* 73, n° 3, P : 404-413.
- [58] JONDET, R., 1980. Contribution à l'amélioration de la technologie du sperme de taureau. Thèse Doctorat ès Sciences, *U. E.R Sciences biologiques*. Université de Rennes. France, P: 166.
- [59] KABERA, F., 2008. Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (CNAG) de Dahra au Sénégal. Mémoire de diplôme d'études de production animales. Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaire de Dakar.
- [60] KAIDI, R. Corus de biotechnologies de la reproduction. Département des sciences vétérinaires, université de Blida.
- [61] KASTELIC, J. P., 2013. Male Involvement in Fertility and Factors Affecting Semen Quality in Bulls. *Animal Frontiers* 3, n°4. P: 20–25.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [62] KAYA, A., BIRLER, S., ENWALL, L et MEMILI, E., 2014. Determinants of Sperm morphology. Editors: Chenoweth, P. J., Lorton, S. *Animal Andrology Theories and Applications*, CAB International, USA. P: 34-55.
- [63] KHALIL, W. A., EL-HARAIRY, M. A., ZEIDAN, A. E. B., HASSAN, M. A. E et MOHEY-ELSAEED, O., 2017. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International journal of veterinary science and medicine*, Vol. 6, P: S49-S56.
- [64] KHLADI, S., NAJJAR, A., BEN SAÏD, S., GUESMI, R., JELJLI, A., ZAIDI, I., DAALOUL, M et MESSADI, L., 2018. Microbiological quality of fresh sperm and ready-to-use semen of artificial insemination bulls in Tunisia. Qualité microbiologique du sperme frais et de la semence prête à l'emploi issu des taureaux d'insémination artificielle en Tunisie.
- [65] KNOBIL, E et NEILL, J., 1988. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York.
- [66] KONFE, H., 2014. Etude spermiologique des bovins de races locales de l'Afrique de l'Ouest : cas du Borgou, du taurin Lagunaire, du taurin N'Dama et du Zébu Peulh., université polytechnique de Bobo-Dioulasso. Institut du Développement Rural.
- [67] LACROIX, C., 1988. Le prélèvement de sperme par électro-éjaculation chez le taureau charolais – *Rec. Med. Vét. Vol. 164*, n° 6-7, P : 519-525.
- [68] LAMINOUE, M. L., 1999. L'amélioration génétique par la biotechnologie de l'insémination artificielle bovine ; bilan et perspectives. Thèse : *Méd, Vét.* Dakar ; 9.
- [69] LEAHY, T et GADELLA, B. M., 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, vol. 142, n° 6, P : 759.
- [70] LUSIGNAN, M. F., 2011. Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait.
- [71] MANCIAUX, L, CHAMBON, G., 2011. Santé reproductive et conduite du taureau en monte naturelle. *Nouv Prat Vét. Vol. 4(18)* P: 23-9.
- [72] MARC, S., 2015. Actualités en cryoconservation des semences des principales espèces d'intérêt vétérinaire. Lyon: 163.
- [73] MARCHALL, F. H. A., 1990. *Marshall's physiology of reproduction. 4^{ème} édition.* Lamming G.E, Vol. 2. 966 P.
- [74] MBAINDINGATOLOUM, T. M., 1982. L'insémination artificielle bovine au Sénégal. Thèse *Doc. Vét.*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [75] MC CARTHY, M. J., BAUMBER, J., KASS, P. H et MEYERS, S. A., 2010. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biology of reproduction*, Vol. 82, n° 3, P: 644-651.
- [76] MESKINI, Z., 2017. L'insemination artificielle chez les caprins de la race arbia dans la région de Tiaret. Mémoire de master, Université de Mostaganem, Alger. 94.
- [77] MURER, V., SPETZ, J. F., HENGST, U., ALTROGGE, L. M., AGOSTINI, A et MONARD, D., 2001. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 98 n° 6, P: 3029-3033.
- [78] ORGEBIN, M. C., 1961. Etude du transit épидidymaire des spermatozoïdes de taureau marqués à l'aide du 32P. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. Vol. 1, n° 2, P : 117-120.
- [79] PAREZ, M, et DUPLAN, J. M., 1987. L'insémination artificielle bovine, *ROGER MARION édition*. Reproduction et amélioration génétique, Paris, France. 256 P.
- [80] PAREZ, M, et THIBIER, M., 1983. Contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon. *Elevage et Insémination*, 197: 3–16.
- [81] PEITZ, B et OLDS-CLARKE, P., 1986. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biology of Reproduction*, Vol. 35, n° 3, P: 608-617.
- [82] PENA, A. L. F., 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 54, P: 859-875.
- [83] RAHMAN, M. B; VANDAELE, L; RIJSSELAERE, T; MAES, D; HOOGEWIJS, M; FRIJTERS, A; NOORDMAN, J; GRANADOS, A., DERNELLE, E., SHAMSUDDIN, M., PARRISH, J. J et VAN SOOM, A., 2011. Scrotal Insulation and Its Relationship to Abnormal Morphology, Chromatin Protamination and Nuclear Shape of Spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue Bulls. *Theriogenology*, Vol. 76, n°7, P: 1246–1257.
- [84] RIGAL, F., 2008. Comparaison de la qualité de la semence de Taureau collectés à l'électro éjaculateur ou vagin artificiel: Thèse. Université Paul- Sabastier de Toulouse.
- [85] RONOT, X., GRUNWALD, D., MAYOL, J. F et BOUTONNANT, J., 2006. La cytométrie en Flux. *Editions Tec et Doc*. Lavoisier. P : 235-253.
- [86] RUKUNDO, J. C., 2009. Evaluation des résultats de l'insémination artificielle bovine dans le département de Mbour au Sénégal : cas du projet GOANA. Thèse: *Méd. Vét.* Dakar; n° 23.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

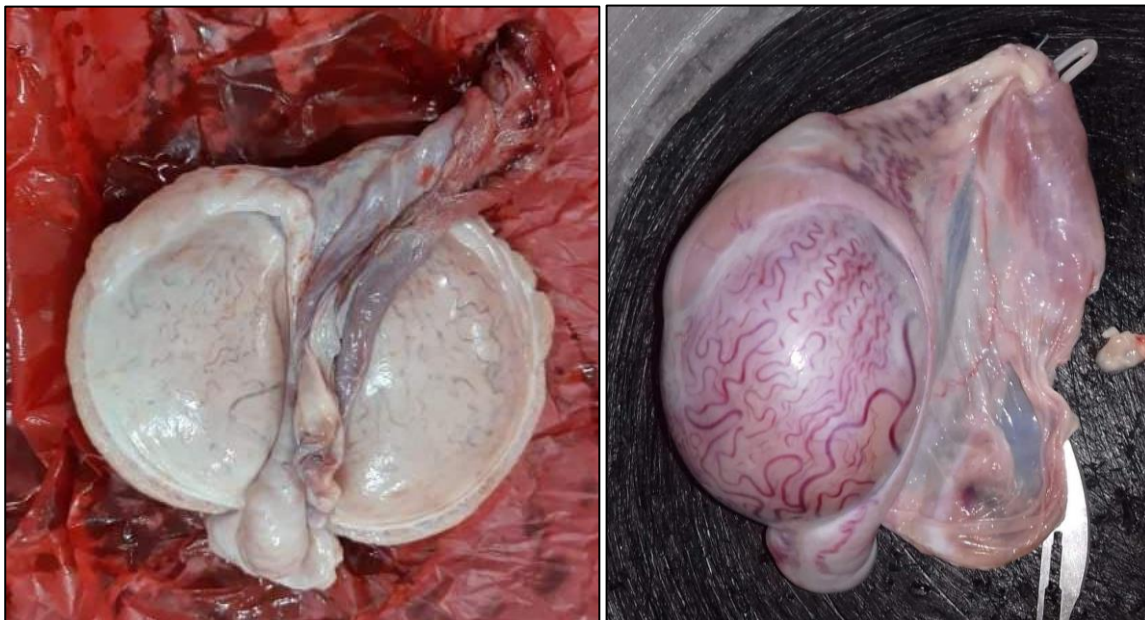
- [87] SAGE, N., 2020. Le spermogramme : tout ce que vous devez savoir.
- [88] SAID, T. M., GAGLANI, A et AGARWAL, A., 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, Vol. 21, n° 4, P: 456-462.
- [89] SALISBURY, G. W et VANDERMARK, N. L., 1961. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco: *Freeman & co.* 639 P.
- [90] SETCHELL, B. P., 1991. Male reproductive organs and semen. In: *CUPPS, PT*; Reproduction in domestic animals, P: 221-249.
- [91] SOLTNER, D., 2001. La reproduction des animaux d'élevage. Tome 1. 3^{ème} édition, collection sciences et techniques. P : 201-202, Lavoisier. Paris.
- [92] STAUB, C et JOHNSON, L., 2018. Spermatogenèse chez le taureau. *Le consortium animal*. 9, 1.
- [93] STIEVENART, M., 1996. L'électro-éjaculation chez les mammifères. Revue bibliographique. Thèse: *Med.vet.* : Lyon : n°6609.1996, P : 56.
- [94] THIBAUT, C et LEVASSEUR, M. C., 2001. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. *Nouv éd. ent. ref. ed.* Paris: INRA Ellipses.
- [95] THIBIER, M., 1977. La fonction sexuelle du jeune taurillon (*Bos taurus*).- Thèse de Doctorat et Sciences, Paris, 100 P.
- [96] THOMAS, C. A; GARNER, D. L; DEJARNETTE, J. M et MARSHALL, C. E., 1998. Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Organelle Function and Viability As Determined by Flow Cytometry. *Biology of reproduction*, Vol. 58, P: 786-793.
- [97] UGUR, M. R., ABDELRAHMAN, S. A., EVANS, H. C., GLIMORE, A., HITIT, M., ARIFIANTINI, R. I., PURWANTARA, B., KAYA, A et MEMILI, E., 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, Vol. 6, P: 268.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1

- Photos réels des testicules d'un taureau prenent durant un TP pendant notre année universitaire 2018/2019.



Testicules du taureau (*Originale*).

ANNEXES

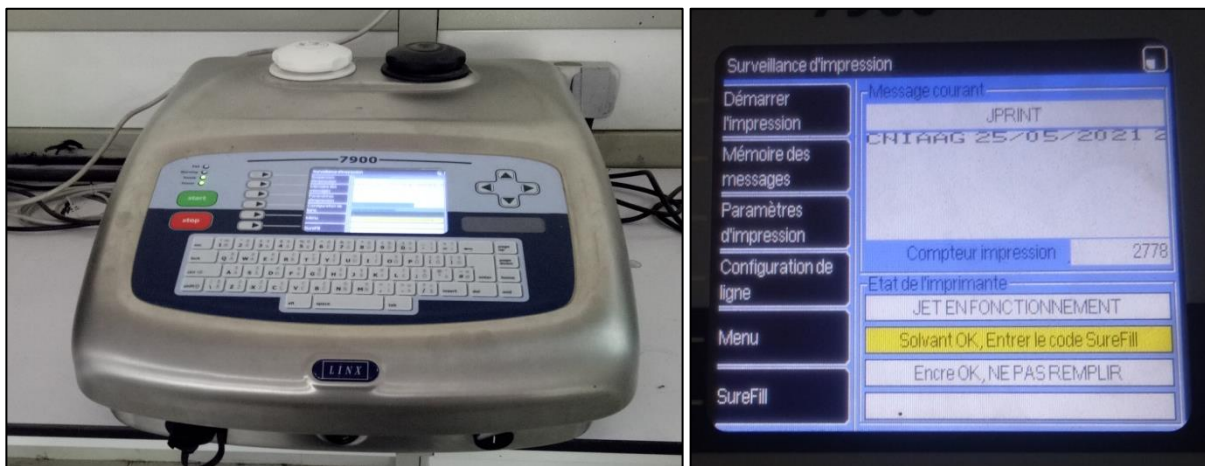
ANNEXE 3

- L'ordinateur contrôle les deux machines pour commencer le conditionnement ou fixer en cas d'un échec.



Equipement pour le conditionnement de la semence (*Originale*).

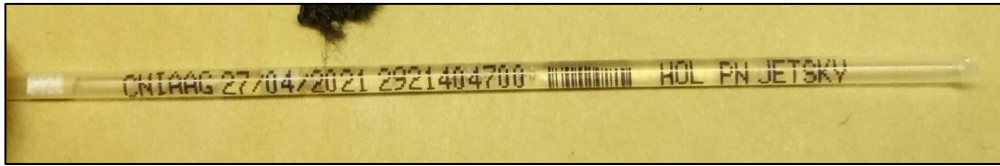
- Cet appareil permet de contrôler et écrire les informations imprimées sur les paillettes dont la date, le centre de la récolte, la race du taureau ...etc.



Appareil de la surveillance d'impression des paillettes (*Originale*).

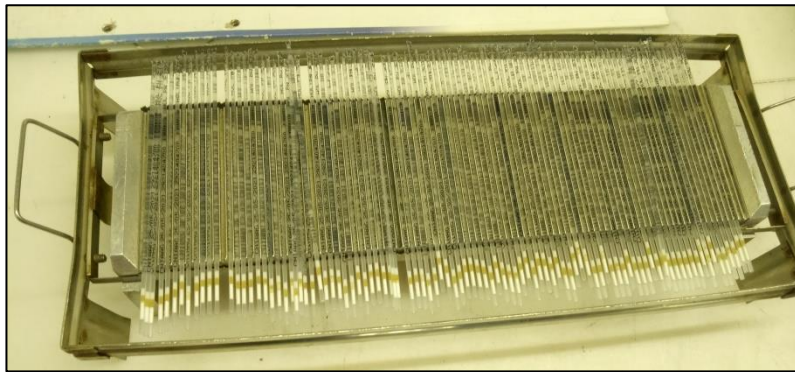
ANNEXES

- Voici un exemple d'une paillette conditionnée :



Paillettes conditionnées (*Originale*).

- Les paillettes sont ordonnées et déposées sur les rampes pour les mettre dans le réfrigérateur à 4°C pendant 3 heures.



Rampes de congélation remplis par les paillettes (*Originale*).

- Cette figure présente une biostat d'azote liquide ouverte froidisse ne contient pas des paillettes dans le milieu du col.



Biostat d'azote liquide vide (*Originale*).

ANNEXES

ANNEXE 4

○ L'éleveur dans cette figure cherche les cornes utérines par palpation rectale pour insérer le pistolet vers le vagin de la vache. On observe aussi la glaire cervicale qui consiste comme un signe de chaleur.



L'insémination artificielle proprement dite (*Originale*).