

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie des Organismes

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Reproduction Animale

Thème

**Essai de conservation optimale de la semence bovine par
l'utilisation de certains diluants à base d'un produit biologique**

Date de soutenance :

Le 25/10/2015

Soutenu par : Tebaili Renda

Zemouchi Imene

Devant le Jury :

M^{me} Guessaibia N

MCB

U.S.D. Blida

Présidente

M^{me} Birem Z

MAA

U.S.D. Blida

Examinatrice

M^{me} Djazouli / Alim, F.Z

MCA

U.S.D. Blida

Promotrice

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

Nos gracieux remerciements s'adressent à DIEU, notre créateur tout puissant qui nous a donné la volonté, la patience et qui nous a fourni l'énergie nécessaire pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice, M^{me} Djazouli / Alim, F.Z d'avoir accepté de suivre notre travail, pour ces orientations judicieuses et pour ces conseils. Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude et notre respect.

Nos remerciements beaucoup la présidente M^{me} GUESSAIBIA N et l'examinatrice M^{me} BIREME Z. d'avoir accepté de gérer cette soutenance

Nos remerciements vont également à notre responsable du Master reproduction animal, M. BESSAD MOHAMED EL AMINE et BELALA REDHA

Nous tenons à remercier chaleureusement M. BOUCHEMAL, Directeur Général du CNIAAG, d'avoir accepté généreusement de nous accueillir au sein du centre afin de pouvoir réaliser notre stage.

Nous adressons nos sincères remerciements à M. DJAZOULI Z. de nous avoir accepté dans son laboratoire de phytopharmacie.

Nous remercions vivement M. TAGHLIT Mohamed et KOURAT AHCENE qui ont partagé avec nous, cœur et âme, son savoir et son expérience.

Nous remercions aussi vivement M^{me} DJAAFRI Hadjira., M. LAMRI Ziane., membres de l'équipe du laboratoire de production de semences bovines du CNIAAG pour leur gentillesse, leur aide et leur disponibilité.

Enfin, nous ne manquerons pas de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de notre travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A toi MAMAN, merci d'être la meilleure maman sur terre, ton amour et ton soutien n'ont d'égale que cette envie de me voir réussir que je vois dans tes yeux lorsque tu me regardes. Tu es ma force, mon inspiration j'espère par ce présent mémoire te rendre fier de ta fille tu resteras à jamais ma raison d'être. Je t'aime infiniment

A toi PAPA tout mon respect et mon amour envers toi.

A toi ma sœur KARIMA, tu es une véritable source de bonheur. Merci de m'avoir toujours soutenu je te souhaite le meilleur que cette vie puisse t'offrir. Tu resteras à jamais ma princesse

A mon frère OUSSAMA que dieu te garde pour moi merci pour tout. Tu es le meilleur

A mon beau frère NESSREDINE je te souhaite le bonheur

A ma nièce LYDIA d'amour je t'aime beaucoup

A ma copine d'amour KAHINA merci de répondre toujours présent et de m'avoir toujours soutenu merci ma chérie

A ma binôme IMENE d'être avec moi dans le bien et le mauvais et fier de vivre avec toi cette expérience inoubliable.

A mes oncles mes tantes

A mes collègues et amis

Aux personnels du laboratoire du CNIAAG Ahcene, Ammi Mouh. Merci je vous respectez beaucoup

Tous ceux que nous n'avons pas cités, et qui ont œuvré de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

RENDA

Dédicaces

Je dédie ce travail

A toi maman, merci d'être la meilleure maman sur terre, ton amour et ton soutien n'ont d'égale que cette envie de me voir réussir que je vois dans tes yeux lorsque tu me regardes. Tu es ma force, mon inspiration j'espère par ce présent mémoire te rendre fière de ta fille tu resteras à jamais ma raison d'être. Je t'aime infiniment

A toi papa tout mon respect et mon amour envers toi.

A toi ma sœur IBTISSEM, tu es une véritable source de bonheur. Merci de m'avoir toujours soutenu je te souhaite le meilleur que cette vie puisse t'offrir. Tu resteras à jamais ma princesse

A mon frère ABDALRAOUF et MA BELLE SŒUR NASSIMA que dieu vous protège

A mon beaux frère ALI je te souhaite le bonheur

A mes chères neveux CHAHINEZ et MOHAMED NASSIM je vous aime beaucoup

A mes chers amis CHAOUI AHMED ET OUIS MOATEZ ET SEKHAL MAHDIA merci de répondre toujours présent et de m'avoir toujours soutenu merci mes chères

A ma binôme RENDA d'être avec moi dans le bien et le mauvais et fière de vivre avec toi cette expérience inoubliable.

A mes oncles mes tantes

A mes collègues et amis

Aux personnels du laboratoire du CNIAAG Ahcene, Ammi Mouh. Merci je vous respecterez beaucoup

Tous ceux que nous n'avons pas cités, et qui ont oeuvré de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

IMENE

Liste des abréviations

CNIAAG : centre national de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique.

DC : dilueur commercial.

DT : dilueur 3 témoins sans gelée royale.

D3-1 : dilueur 3 avec 0.10g gelée royale.

D3-2 : dilueur 3 avec 0.40g gelée royale.

D3-3 : dilueur3 avec 0.80g gelée royale.

D3-4 : dilueur4 avec 3.2g gelée royale.

Ej : éjaculat

IA : insémination artificielle.

MRS3 : machines à remplir et souder par 3 paillettes.

SPZ : spermatozoïde

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I	Circonférence scrotale minimale recommandée (cm) selon l'âge et la race	4
Tableau II	la production journalier des spermatozoïdes dans les deux testicules du taureau	8
Tableau III	Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale	15
Tableau IV	Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5	16
Tableau V	analyse du spermogramme	17
Tableau VI	Composition des dilueurs les plus utilisés	18
Tableau VII	Liste des races bovines utilisées pour récolter la semence.	19
Tableau VIII	composition de dilueur	22
Tableau IX	Les doses de gelée royale ajouté au dilueur	23
Tableau X	L'examen macroscopique de chaque éjaculats	28
Tableau XI	Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité	29
Tableau XII	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 1	36
Tableau XIII	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3H de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 2	37
Tableau XIV	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 3	38
Tableau XV	La moyen de viabilité des spermatozoïdes vivant après 3h de réfrigération	38
Tableau XVI	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 1	42
Tableau XVII	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 2	43
Tableau XVIII	Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 3	44
Tableau XIX	La moyen de viabilité des spermatozoïdes vivant après 24h de réfrigération	45
Tableau XX	La moyen de viabilité des spermatozoïdes vivant après décongélation	47

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure1	Appareil reproducteur du taureau	3
Figure 2	Coupe transversale du testicule et de ses enveloppes	5
Figure3	spermatogenèse	13
Figure 4	Anatomie du spermatozoïde de taureau	14
Figure 5	Matériel utilisé pour l'examen macroscopique : microscope à contraste de phase (A) relié à une caméra (B), une plaque chauffante permettant de maintenir les lames à la bonne température (C) et un écran permettant de visualiser l'image (D)	20
	Calcul de la concentration du sperme, (A) Dilueur automatique permettant d'effectuer la dilution avec de l'eau physiologique, (B), Photomètre ACCUCCELL	21
Figure 6	(A) peser les produits par la balance de précision (B) agitateur magnétique (C) filtration (D) l'ajout du glycérol au dilueur (E) PH mètre (F) mettre le mélange dilueur + glycérol dans des tubes en verre	24
	Mise en paillettes, congélation et stockage de la semence :(A) MRS3, (B) Rampe de congélation, (C) MINI-DIGITCOOL, (D) canister d'azote liquide	25
Figure 7	Mise en paillettes, congélation et stockage de la semence :(A) MRS3, (B) Rampe de congélation, (C) MINI-DIGITCOOL, (D) canister d'azote liquide	25
Figure 8	Mise en paillettes, congélation et stockage de la semence :(A) MRS3, (B) Rampe de congélation, (C) MINI-DIGITCOOL, (D) canister d'azote liquide	25
Figure 9	Cymomètre en flux	26
Figure 10	Fenêtre permettant le lancement de l'analyse	26
Figure11	Volume, couleur et viscosité du sperme	28
Figure 12	Motilité massale des spermatozoïdes dans le liquide séminale sous microscope (Gx40)	29
	Figure 13 Résultat du test de viabilité obtenu par le cytomètre en flux (A) premier graphique obtenu à l'état brut (B) traitement du graphique pour éliminer les débris du résultat (C) résultat final du test ne présentant que les spermatozoïdes vivants (en vert) et les spermatozoïdes morts (en rouge).	30
Figure14	(A) spermatozoïdes vivants, (B) spermatozoïdes morts	31
Figure15	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-1 de l'animal 1éjaculat 1 après 3h de réfrigération	31
Figure16	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par	32

	le dilueur D3-2 de l'animal 1 éjaculat 1 après 3h de réfrigération	
Figure 17	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 1 après 3h de réfrigération	32
Figure18	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 3 éjaculat 1 après 3h de réfrigération	32
Figure19	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	33
Figure20	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 3 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	33
Figure 21	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3H de réfrigération	33
Figure 22	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	34
Figure 23	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 1 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	34
Figure 24	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	35
Figure 25	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 3 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	35
Figure 26	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 1 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	35
Figure 27	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération	35
Figure28	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	39
Figure29	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	39
Figure30	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	39
Figure31	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 témoin de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	40
Figure32	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 témoin de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	40

Figure 33	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-3 de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	40
Figure 34	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-3 de l'animal 3 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	41
Figure 35	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération	41
Figure 36	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 témoin de l'animal 1 éjaculat 3 après décongélation	45
Figure 37	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 1 de l'animal 1 éjaculat 3 après décongélation	46
Figure 38	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 1 de l'animal 1 éjaculat 3 après décongélation	46
Figure 39	Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-3 de l'animal 2 éjaculat 3 après décongélation	47

Sommaire

Résumé	
Introduction générale	1
Chapitre I : Données bibliographiques	
I. Lieu de production de stockage et de transport des spermatozoïdes	3
I.1. Les testicules: organes de la production des spermatozoïdes	3
I.2. Le système canulaire	5
I.2.1. Le canal épидидymaire	5
I.2.1.1. Les fonctions du canal épидидymaire	6
I.2.2. Le canal déférent	6
I.3. La spermatogenèse	6
II. Glandes annexes et leur rôle dans l'élaboration du liquide spermatique	8
II.1. Les glandes annexes	8
II.2.1. Les vésicules séminales	8
II.2.2. La prostate	9
II.2.3. Les glandes bulbo-urétrales	9
II.3. Emission parcours du sperme	9
II.4. Composition du sperme	10
III. Chimie, enzymologie et aspect du sperme	10
III.1. La couleur du sperme	12
III.2. La consistance du sperme	12
IV. Structure et développement des spermatozoïdes	13
IV.1. Spermatozoïde ultra structure.	13
V. Biotechnologie liée la conservation de la semence animale	14
V. 1. Evaluation de la qualité de la semence	14
1.1. Examens microscopiques	14
1.1.1. La Motilité	15
1.1.2. Motilité massale	15
1.1.3. Motilité individuelle	15
1.1.4. Concentration du sperme	16
1.1.5. Pourcentage de spermatozoïdes vivants	16
1.1.6 Morphologie des spermatozoïdes	17
1.2. Analyse du spermogramme	17

V.2. Dilution	17
V.3. Conservation de la semence	18
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Lieu de réalisation des étapes expérimentales	19
II. Matériel Biologique	19
II.1. Animaux	19
II.1. 1. Préparation des animaux pour la collecte de la semence	19
II.1.2. Collecte de la semence	19
III. Tests d'évaluation de la qualité du sperme	20
III.1. Examen macroscopique	20
III.2. Examen microscopique	20
III.2.1. Calcule de la concentration	21
III.2.2. Calcule des dilutions	21
IV. Etape de préparation de la semence pour la conservation au froid	21
IV.1. Préparation des diluants	21
IV.2. Mise en paillettes	24
IV.3. Refroidissement à +4°C	25
IV.4. Ultra-congélation à l'azote liquide	25
V. Tests de qualité de la semence diluée après conservation au froid	25
V.1. Etude de viabilité avec cytométrie en flux après réfrigération 4°C	25
V.2. Technique de coloration de sperme avec éosine- nigrosine	26
V.3. Tests après Ultra-congélation à l'azote liquide	27
Troisième partie : résultats et discussion	
I. Tests d'évaluation de la qualité du sperme	28
I.1. Examen macroscopique	28
I.2. Examen microscopique	28
I.2.1. Mobilité massale	28
II. Contrôle des caractéristiques de la semence après réfrigération +4°C	30
II.1. Test de viabilité	30
II.1. 1 Résultats après 3H	31
II.1. 2 Résultats après 24H	39
III. Tests après Ultra-congélation à l'azote liquide	45
III.1. Résultats des caractéristiques après la décongélation après 30 secondes	45
Chapitre IV : Discussions	
I. Caractéristiques du sperme récolté	48
II. Effet du milieu de dilution sur la qualité de la semence	48
Conclusion	52
Référence bibliographique	53
Annexes	

Résumé

Actuellement, l'insémination artificielle a pris une place importante dans le domaine de l'amélioration génétique des animaux d'élevage. En effet, plusieurs centres de production spécialisés s'occupent de la production de semences de différentes espèces. La raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à l'évaluation d'un milieu de dilution adéquat à la survie des spermatozoïdes avant et après leur conservation tout en réduisant le coût d'achat. Ce dilueur est à base de produit biologique : gelée royale ajoutée à une base de produits assurant un pH favorable à la survie des spermatozoïdes.

Une analyse du sperme collecté a été faite par un examen macroscopique (couleur blanc crémeux et le volume entre 9,5 et 3,5) de plus un examen microscopique de la motilité massale dont on a trouvé un pourcentage de 70% /40 pour tous les éjaculats.

Une analyse comparative entre la semence collectée et diluée dans le dilueur commercial et le dilueur fabriqué a été menée tel que le contrôle par le cytomètre en flux des caractéristiques de la semence après réfrigération à +4°C après 3h révèle une moyenne de viabilité varie entre 66.10% à 23.33% et les moyennes de viabilité trouvée après 24H varient entre 46,66% et 4,44%, Un test après Ultra-congélation à l'azote liquide révèle une moyenne de viabilité varient entre 46,10% et 7%.

Les résultats obtenus des spermatozoïdes dilués dans nos dilueurs font preuve d'une bonne viabilité pendant une durée de trois heures de réfrigération et après décongélation, en revanche nous avons noté que les spermatozoïdes dilués ont une faible viabilité durant les 24 h de réfrigération.

Mots clés : Semence bovine, Dilution, Dilueurs, Gelée royale, conservation

ملخص

في الوقت الحاضر التلقيح الاصطناعي اخذ مكان مهم في مجال التحسين الوراثي لحيوانات. في الواقع، كثير من المراكز المتخصصة في إنتاج تهتم حاليا في حفظ إنتاج المني لأنواع مختلفة من الحيوانات السبب الذي جعلنا نهتم بتحسين أوساط التخفيف المناسبة لابقاء حيوية الحيوانات المنوية قبل وبعد الحفظ في حين خفض تكلفة شراء الحواظ التجارية وكشفت مراقبة الجودة العيانية والمجهرية لمني الأبقار التي تم جمعها أن هذه الاخيرة هي ذات نوعية جيدة. في هذه الدراسة قد توصلنا إلى تركيز الحيوانات المنوية وحجم التخفيف الذي يجب ان يضاف إلى المني. تم إجراء تحاليل للسوائل المنوية التي تم جمعها عن طريق الفحص العياني (اللون ابيض كريمي والحجم يتراوح بين 9,5 و 3,5) بالاضافة الى الفحص المجهرى للحركة حيث تم العثور على نسبة 70% / 40 لجميع القذفات, التحليل المقارن بين السائل المنوي الذي تم جمعه وتخفيفه بمخفف تجاري والمخفف المصنوع وقد اجريت مراقبة بواسطة التدفق الخلوي لخصائص المني بعد التبريد تحت 4 درجات بعد ثلاث ساعات تم الكشف على نسبة الحيوية للنطاف تتراوح بين 66,10% و 23,36% ونسبة التي تتراوح بين , 66% و 46,44% وجدت بعد 24 ساعة, اختبار بعد التجميد لتتروجين السائل كشف عن نسبة الحيوية تتراوح بين 7% و 46,66%

النتائج التي تم الحصول عليها للمني المخفف في الحافظ المصنوع تظهر قابلية جيدة لمدة ثلاث ساعات بعد تبريد وبعد الذوبان, لكن لاحظنا أن الحيوانات المنوية المخففة لديهم قابلية منخفضة لمدة 24 ساعة تحت التبريد.

كلمات المفتاح: مني الأبقار، وسط حافظ مخفف، الغذاء الملكي، الحفظ

Abstract

Actually the artificial insemination she took an important place in the field of genetic improvement of livestock. Indeed, several specialized production centers are currently involved in the production of seeds of different species. The reason we were interested in evaluating an appropriate dilution medium for sperm survival before and after conservation while reducing the purchase cost.

An analysis of the collected semen was made by macroscopic examination (color wait creamy and volume between 9,5 and 3,5) over a microscopic examination of the motility including massal found a percentage of 70% /40 for all ejaculates a comparative analysis between semen collected and diluted with commercial dillueur and manufactured diluent was conducted as control the flow cytometer of the seed characteristics after cooling + 4 ° C after 3 hours revealed an average viability varies between 66.10 % to 23.33 % and the average viability found after 24 hours ranging from 46, 66% and 4.44%, test after Ultra- freezing with liquid nitrogen reveals an average viability between 46.10% and 7%.

The results obtained in our diluted semen extenders show good viability for a period of three fortunes and refrigerated after thawing, however we noted that the diluted sperm have low viability for 24 h refrigeration.

Keywords : Bovine semen , Dilution, Royal jelly, conservation

Introduction

L'insémination artificielle (IA) Déjà utilisée par les arabes au XIVème siècle, ne fut réellement appliquée qu'en 1779 par le physiologiste italien Lauro Spallanzani consiste à déposer le sperme au moyen d'un instrument, au moment le plus opportun et à l'endroit le plus approprié du tractus génital femelle (Chemineau, *et al* 1996). La méthode offre donc un double avantage: celui, d'une part, de contribuer à l'amélioration génétique et d'autre part de constituer un moyen préventif contre les maladies sexuellement transmissibles. Elle permet aussi la mise à la reproduction des femelles à distance des mâles présentant des facultés performantes, évitant ainsi le stress de déplacement.

La production de semence comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, le sperme est récolté (ou collecté) selon un rythme variable d'une espèce à une autre. Puis un contrôle de la qualité est effectué afin d'éliminer les éjaculats de qualité insuffisante et de déterminer le taux de dilution nécessaire. La conservation du sperme récolté pour un but d'insémination nécessite sa dilution un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes. Son milieu naturel renferme des glucides (fructose, glucose) qui constituent le substrat énergétique nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes (Cole et Cupps, 1959), des lipides (Fontbonne et Dumont, 1992), des protéines (phosphatases), des ions et des électrolytes (sodium, chlore, zinc...) et diverses autres molécules comme l'acide citrique (Cole et Cupps, 1959), des hormones (testostérone, progestérone (Prings, 1998). Le milieu de dilution doit donc renfermer des substances proches de celles retrouvées dans le milieu naturel, comme les substances tampons permettant de maintenir l'osmolarité et le PHentre (6.4 et 6.8).et source énergétique comme le fructose ou le glucose (Vishwanath R, Shannon P , 2000). Enfin la semence est conditionnée en petites doses puis cryoconservée et stockée dans des banques spécifiques pour être prête à l'insémination (Vishwanath *et al.*, 2000 ; Ardoui, 2013).

Bien que les spermatozoïdes des mammifères peuvent être conservés sans être congelés à 4°C pendant une courte durée, allant quelques heures à quelques jours, la cryoconservation dans l'azote liquide à -196°C permet de leur stockage pendant plusieurs années (Vishwanath *et al.*, 2000 ; Watsonque, 2000). Cependant, les spermatozoïdes étant des cellules sensibles aux changements de température, certaines précautions doivent être prises lors de la production et la conservation de la semence (Watson, 2000) notamment la qualité du diluant qui maintien sa fécondité pour une longue durée.

Actuellement l'IA de part ses revenus bénéfiques du côté de l'éleveur par la fécondation de ses bêtes par une semence performante et du côté des centres nationaux de la production et la préparation de la semence et de amélioration génétique. La production énorme de cette matière nécessite la consommation d'énorme quantité de milieux de dilution.

Ces derniers sont importés de l'étranger et reviennent excessivement cher.

Pour cette raison notre étude vise à la fabrication d'un milieu de dilution alternative à base d'un produit biologique naturel : la gelée royale qui vise à préserver les spermatozoïdes tout en gardant leur motilité et leur fécondité.

I. Lieu de production de stockage et de transport des spermatozoïdes

L'appareil génital mâle comporte selon Barone (1990) trois grandes parties dont chacune possède son équivalent dans l'appareil génital femelle: les sections glandulaire, tubulaire et uro-génitale. On trouve ainsi la section glandulaire constituée surtout des deux testicules, les voies spermatiques constituées par l'épididyme, les conduits déférents, l'urètre (Vaissaire, 1977; Bonnes *et al.*, 2005) et le pénis (organe copulateur) qui est constitué de l'union de la partie extra pelvienne de l'urètre et des formations érectiles dont la principale est le corps caverneux (Barone, 1990; Bonnes *et al.*, 2005).

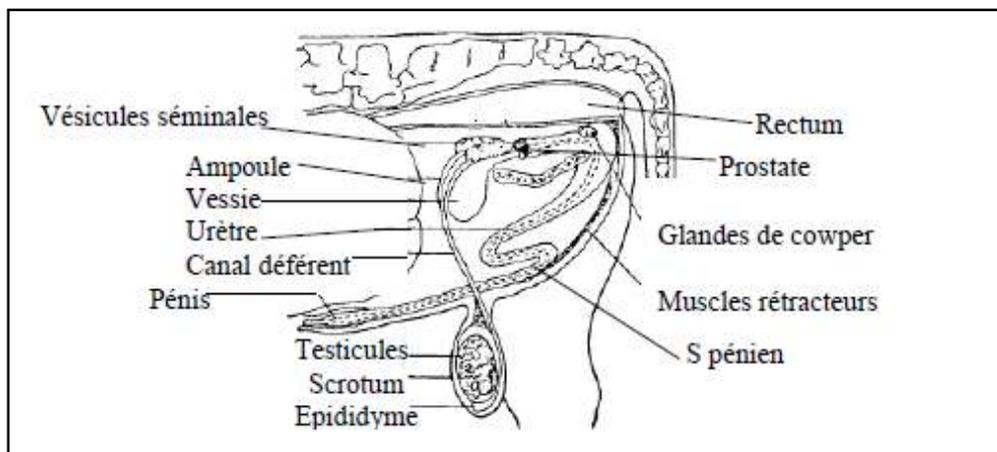


Figure1. Appareil reproducteur du taureau (Thibier, 1977)

les spermatozoïdes sont transportés des testicules jusqu'à l'urètre par le canal déférent et sont expulsés par le pénis.

I.1. Les testicules: organes de la production des spermatozoïdes

Les testicules sont des organes pairs, ils assurent une double fonction : une fonction exocrine avec la production de spermatozoïdes ou spermatogenèse et une fonction endocrine avec la production des hormones mâles. Ils sont logés avec l'épididyme dans la tunique vaginale et le scrotum.

Chez le taureau, la descente des testicules dans les enveloppes testiculaires s'effectue avant la naissance, vers 3 à 4 mois de gestation (Chenoweth, 1997). Le testicule est pendulaire, à axe vertical et pèse approximativement 500 grammes vers deux ans. Il mesure alors en moyenne 11 à 15 cm de haut sur 7 à 9 cm de large, et 7 à 9 cm d'épaisseur pour une circonférence scrotale de 35 cm (Setchell, 1991).

Des différences individuelles importantes de taille des testicules existent chez le taureau, elles sont corrélées à la production de spermatozoïdes. C'est pourquoi la mesure de la circonférence scrotale des taureaux est une partie importante de l'évaluation de leur fertilité; des valeurs minimales existent en fonction de l'âge et de la race (Wenkoff, 1988). (voir annexe)

Tableau I. Circonférence scrotale minimale recommandée (cm) selon l'âge et la race

RACES				
Âge (mois)	Simmental	Angus Charolais Maine Anjou	Hereford Shorthorn	Limousin Blonde d'Aquitaine
12-24	33	32	31	30
15-20	35	34	33	32
21-30	36	35	34	33
> 30	37	36	35	34

Lorsque l'opérateur a pris les précautions de sécurité nécessaires, il peut manipuler le testicule à l'intérieur du scrotum. Un testicule normal a une consistance homogène et ne présente pas d'adhérences avec le scrotum. La palpation peut permettre de détecter la présence d'anomalies telles que des abcès, tumeurs, hématoécèles, calcifications (Albert, 2007). Chaque testicule est entouré d'une capsule fibreuse, l'albuginée est cloisonnée par des septums en lobules (Fig.2). Chaque lobule contient 1 à 4 tubes séminifères à l'intérieur desquels a lieu la spermatogenèse. La structure du tube séminifère comprend un épithélium séminal composé des cellules de Sertoli et des cellules germinales ainsi qu'un tissu de soutien, la lamina propria, formée de fibres de collagène et de couches de cellules myoïdes (Barone, 1990). Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales migrent de manière centripète vers la lumière des tubules où ils sont relargués. Le liquide contenu dans la lumière assure le transport des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes formés dans les tubes séminifères passent dans des structures tubulaires: les tubes droits puis le rete testis avant de rejoindre les canaux éférents et l'épididyme (Dadoune, 2001).

Les testicules sont irrigués par l'artère testiculaire, issue de l'aorte abdominale, qui se divise en branches terminales situées à l'intérieur de l'albuginée et des cloisons interlobulaires. Les veines testiculaires sont regroupées autour de l'artère testiculaire pour constituer le plexus pampiniforme qui permet le refroidissement du sang artériel.

Les testicules sont innervés par des rameaux sensitifs et moteurs qui accompagnent l'artère testiculaire (Dadoune, 2001).

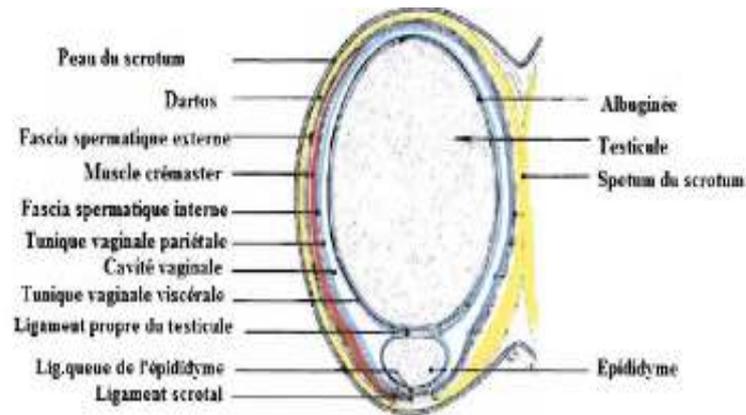


Figure 2. Coupe transversale du testicule et de ses enveloppes (Barone, 2001)

I.2. Le système canalaire

I.2.1. Le canal épидидymaire

-L'épididyme est un corps allongé le long du bord postérieur du testicule auquel il fait suite chez les ruminants (Fig. 2). Il est constitué d'un épithélium pseudo-strié et de nombreuses microvillosités. L'épididyme est composé de trois parties qui sont: la tête, le corps et la queue. Chez le taureau, la durée du transit épидидymaire des spermatozoïdes est de 9 à 13 jours (HAZEN, 2009-2010). Cet épithélium comporte 2 types cellulaires :

(1) Cellules glandulaires cylindriques au noyau ovalaire sub-basal et au pôle apical pourvu de bouquets de longues microvillosités (stéréocils). L'ultrastructure des cellules épидидymaires révèle la présence de nombreuses vésicules de pinocytose, d'endocytose; elles possèdent en outre un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique granuleux très développés nécessaires à leur fonction sécrétoire.

(2) Cellules de remplacement au noyau arrondi situées contre la membrane basale. Les spermatozoïdes, concentrés par la réabsorption du liquide séminal et par leur production constante dans les tubes séminifères, s'entassent dans la queue de l'épididyme.

I.2.1.1. Les fonctions du canal épидидymaire

Il joue un rôle déterminant dans la composition du fluide épидидymaire dans lequel les spermatozoïdes poursuivent leur maturation dans la partie initial du canal, réabsorption de 90% du liquide séminal primitif

- les cellules de la tête et du corps synthétisent et sécrètent des protéines et des glycoprotéines Spécifiques dont certaines se fixent sur la membrane plasmique des spermatozoïdes
- les cellules du corps concentrent, à partir du sang, des molécules comme la carnitine
- les cellules de la queue synthétisent et sécrètent des lipides.

Les cellules glandulaires ont donc un rôle important: au cours du trajet épидидymaire, elles sécrètent de nombreuses substances assurant **la nutrition des spermatozoïdes, l'acquisition de leur mobilité** et de leur **pouvoir fécondant**; elles produisent en outre un **facteur de décapacitation** se fixant sur la membrane des spermatozoïdes pour empêcher l'expression prématurée de leur pouvoir fécondant.

Pendant le transit épидидymaire et en cas de séjour prolongé dans la queue de l'épididyme, de nombreux spermatozoïdes dégènèrent; les macrophages (spermiphages) assurent la digestion des spermatozoïdes vieillissants et dégénérés.

I.2.2. Le canal déférent

Le canal déférent s'élargit en une ampoule (résorption liquidienne et spermiphagie) qui s'abouche à l'urètre.

L'ampoule du canal déférent a chez le taureau une longueur de 10 à 15 cm et une largeur de 5 à 8 mm. Le canal déférent joue également un rôle physiologique assez semblable à celui du canal épидидymaire.

I.3. La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus chronologiquement long, qui à partir de cellules initiales basales (cellules de la ligné germinale mâle) des tubes séminifères, aboutit après mitose, méiose et différenciation en spermatozoïdes à la libération de spermatozoïdes mûrs dans la lumière des tubes séminifères (Amann et Schanbacher, 1983; Johnson, 1991). Ainsi, l'épithélium séminifère est composé de trois types de cellules germinales: spermatogonies, spermatocytes (primaires et secondaires) et les spermatides (Desjardins, 1978; Noakes *et al.*, 2001) à chacune des quelles correspond une phase du cycle spermatogénétique: la spermatocytogenèse, la méiose et la spermiphogenèse (Johnson, 1991).

Une fois le processus de la spermatogenèse déclenché, il ne s'arrête pas (Courot, 1962) et se poursuit même chez les sujets âgés (Vaissaire, 1977). Au fur et à mesure que les lignées

spermatogénétiques évoluent, d'autres entrent en activité dans la paroi des tubes séminifères des testicules (Courot, 1962).

La spermatocytogenèse est assurée par un processus mitotique dont le nombre est variable selon les espèces la transformation d'une spermatogonie A (chromatine poussiéreuse) en spermatogonie B (chromatine croutelleuse) décrits par (Johnson, 1991) et (Noakes *et al.* 2001) puis en spermatocyte 1. Cette phase dite de multiplication a une durée d'une douzaine de jours. Elle se déroule essentiellement au niveau de la membrane basale.

Le spermatocyte 1 subit alors entre les cellules de Sertoli une phase de division méiotique qui aboutit après 15 à 17 jours à la formation de deux spermatocytes secondaires chacun d'eux se divisant en spermatide.

La spermiation constitue la phase de différenciation (14 étapes) de la spermatide en spermatozoïde au niveau des cryptes du tube séminifère. Elle est suivie de la libération du spermatozoïde dans la lumière du tube séminifère. En moyenne une spermatogonie aboutit à la formation de 256 spermatozoïdes. La spermatogénèse dure 54 jours chez le taureau (Thibault et Levasseur, 2001).

Le tableau ci-dessous synthétise les principales caractéristiques spermatogéniques de taureau observera la production journalière en spermatozoïdes des deux testicules (DSP : Daily Sperm Production) et le nombre Anatomio-physio-histologie du tractus génital du taureau

Le tissu testiculaire possède une intense activité: la production journalière serait de 9.106 spermatozoïdes par gramme chez le taureau soit environ 6.000 spermatozoïdes par minute. Cette transformation s'étale donc dans le temps mais également dans l'espace puisqu'elle se fait progressivement de la membrane basale jusque la lumière du tube séminifère.

Tableau II. la production journalier des spermatozoïdes dans les deux testicules du taureau

Caractéristiques	Taureau
Poids de l'animal	1200
Poids des deux testicules	800
Production /jour en spz (x 1000) des deux testicules	7700
Production /jour en spz (x 1000) par g	12
Récolte journalière potentielle en spz (x 1000)	7200
Durée du transit epididymaire (jours)	7 à 13
Total des reserves extra gonadiques (x1.000.000.000)	69
Tête de l'épididyme	19
Corps de l'épididyme	4.7
Queue de l'épididyme	38
Canal défèrent	7.6

II. Glandes annexes et leur rôle dans l'élaboration du liquide spermatique

II.1. Les glandes annexes

Elles sont chargées de l'élaboration du plasma séminal, qui assure la dilution, la nutrition et permet les mouvements des spermatozoïdes (Kolb, 1975). Mélangé aux spermatozoïdes, il constitue le sperme dans l'urètre (Luquet *et al.*, 1978 ; Setchell, 1991 ; Bonnes *et al.*, 2005).

II.2.1. Les vésicules séminales

Font suite au canal défèrent, situées dorsalement et un peu latéralement à ce dernier, entre la vessie et le rectum (Kolb, 1975 ; Barone, 1990; Bonnes *et al.*, 2005). elles sont lobulées et compactes chez les ruminants (Barone, 1990 ; Getty, 1975). elles ont chez le taureau une longueur comprises entre 8 et 15 cm , une largeur de 3 à 5 cm et une épaisseur de 1 à 2 cm. Leur taille varie selon les individus, elles sont nettement lobulées et mobiles (Barone, 1990). Elle déverse dans un canal commun avec le canal défèrent (canal éjaculateur) leur développement et sécrétions étant sous le contrôle des androgènes.

Leurs sécrétions constituent une grande partie du liquide séminale (60% du volume total du sperme) (Bonnes *et al.*, 2005). Il s'agit d'un liquide riche en fructose qui constitue une source d'énergie pour les spermatozoïdes selon (White et Wales., 1961) et (Bonnes *et al.*, 2005), en acide citrique et en prostaglandines (Setchell, 1991; Baril *et al.*, 2005).

II.2.2.La prostate

La prostate comprend deux parties l'une (corps de la prostate) petite chez le taureau et une partie disséminée autour de l'urètre et s'étendant jusqu'aux glandes bulbo-urétrales. Le corps de la prostate a chez le taureau une longueur de 3 cm, une largeur d'1 cm et une hauteur de 2 à 3 cm. Le liquide prostatique étant riche en acides aminés, enzymes, fructose et surtout en Zinc (rôle bactéricide), contribue d'une grande part dans la formation du sperme (Barone, 1978).

II.2.3.Les glandes bulbo-urétrales

Glande paire, appelée glande de Cowper (Barone, 1990; Setchell, 1991), étendu du revers médial de la tubérosité ischiatique à la face dorsale de la terminaison de l'urètre pelvien (Barone, 1990). Elle secrète un liquide clair visqueux à pH alcalin (pH=7,8) servant au nettoyage et à la lubrification de l'urètre juste avant l'éjaculation (Barone, 1978 ; Noakes *et al.*,2001).

II.3.Emission parcours du sperme

Le sperme est composé de deux parties :

les spermatozoïdes produits par les testicules et stockés dans l'épididyme; le plasma séminal (liquide séminal) produit par les glandes accessoires (prostate, vésicules séminales).

Les deux parties ne se mélangent qu'au moment de l'éjaculation pour donner le sperme. Son émission dans les conditions naturelles est obtenue lors de l'éjaculation qui fait suite à l'érection. Ce sont des phénomènes réflexes contrôlés par les centres nerveux médullaires. Les voies sensibles afférentes sont assurées par le nerf honteux innervant les zones érogènes du tractus génital. Les voies motrices efférentes sont représentées par le sympathique vasoconstricteur pour l'éjaculation et le parasympathique vasodilatateur pour l'érection. Il y a interaction entre le centre érecteur et le centre de l'éjaculation : l'activation prolongée du centre érecteur entraîne l'activation du centre de l'éjaculation. La meilleure connaissance du mécanisme physiologique de l'émission du sperme a permis de développer un ensemble de technique pour créer les conditions réflexes d'éjaculation et de récolte du sperme.

Les spermatozoïdes sont fabriqués par les testicules (92 jours), ils passent dans l'épididyme où la queue des flagelles est formée, puis dans le canal déférent, les canaux éjaculateurs. Ils se mélangent ensuite au liquide séminal produit par les vésicules séminales où le sperme est stocké, puis aux sécrétions de la prostate le sperme est ensuite éjaculé par l'urètre. En quelques secondes, ils sont dans le vagin où ils ne peuvent survivre que quelques heures du fait de l'acidité vaginale. S'il n'y a pas d'ovule à féconder, les spermatozoïdes peuvent

stagner dans la glaire au niveau du col de l'utérus, jusqu'à 72 heures (1 à 5 jours) avant de féconder l'ovule.

II.4. Composition du sperme

Le sperme contient les spermatozoïdes, qui ne représentent que 1% du volume total, le liquide séminal produit par les vésicules séminales (65%-70%), dans lequel on trouve du sucre, le fructose et des protéines, les sécrétions produites par la prostate (15-20%), par les anses épидидymo - déférentielles (10-12%) et enfin le liquide sécrété par les glandes de Cowper (4-5%), des glandes situées sous la prostate, qui sont responsables du liquide pré-éjaculatoire.

Le sperme contient des sucres comme le fructose (qui nourrit les spermatozoïdes), des protéines, des phosphatases alcalines (prostate), des carnitines (épididyme), des minéraux tels que le zinc, le citrate, de l'hormone de croissance, des cellules épithéliales et des globules blancs. L'activité métabolique des spermatozoïdes est un important indicateur de la qualité du sperme. L'évaluation peut se faire par plusieurs moyens tels que la mesure du pH (DERIVAUX, 1971), l'indice de fructolyse, la réduction du bleu de méthylène, le test de résistance au NaCl, l'oxydation du pyruvate (MELROSE et TERNER, 1952), la réduction de la résazurine, etc. Le pH normal du sperme est proche de la neutralité (pH=7) avec de faibles variations (6,8 à 7,2). Mais plusieurs auteurs cités par TRAORE (1996) préconisent qu'il est légèrement acide car le pH peut descendre à 6,5.

III. Chimie, enzymologie et aspect du sperme

Le sperme entier est une suspension de spermatozoïdes dans un milieu liquide, le plasma séminal. Les spermatozoïdes sont produits par les testicules et le plasma séminal par les glandes mâles annexes.

Les études très poussées de l'ultra structure du spermatozoïde ont révélé que les deux parties principales, la tête et la queue, n'ont pas la même composition chimique.

Le noyau du spermatozoïde est composé d'un conjugué de protamine et d'acide désoxyribonucléique (ADN), au niveau duquel sont codées et enregistrées des informations génétiques. Dans l'acrosome, il y a un complexe de lipoglycoprotéine (acrosomine) et différents enzymes mucolytiques et protéolytiques. On a récemment préparé, à partir d'acrosomes de spermatozoïdes de bélier, de taureau et de lapin, un complexe lipoglycoprotéinique possédant des propriétés enzymatiques, qui pourrait jouer un rôle dans la pénétration du spermatozoïde. La queue contient les enzymes de glycolyse et d'oxydation qui

interviennent dans le métabolisme des spermatozoïdes. Elle est également riche en lécithine et en plasmalogène; celui-ci pourrait servir de source d'énergie endogène.

On pense généralement que l'adénosinetriphosphate (ATP) des spermatozoïdes est un intermédiaire entre les réactions productrices d'énergie et la motilité. La dégradation de l'ATP fournit probablement l'énergie nécessaire à l'activité des éléments contractiles sensiblement de la même façon qu'au niveau des fibres musculaires.

Les constituants chimiques et leur apport relatif par les glandes annexes varient beaucoup selon les espèces, ce qui explique les différences considérables tant de volume que de composition du sperme.

Le plasma séminal offre un grand intérêt biochimique, car il contient quelques composés organiques (fructose, acides citrique, sorbitol, glycérylphosphorylcholine, phosphorylcholine, inositol, ergothionéine et spermine, par exemple) à des concentrations élevées qu'on n'observe nulle part ailleurs dans l'organisme. Des mucoprotéines, des peptides, des acides aminés libre, des acides gras (y compris les prostaglandines), des vitamines et un grand nombre d'enzymes peuvent également exister dans le sperme de certaines espèces. Plusieurs de ces substances sont produites par les différentes glandes annexes elles-mêmes peut donc servir d'indice de l'activité androgène chez le mâle.

Des recherches sur la cytochimie et l'ultrastructure des glandes annexes devraient donner des renseignements précieux.

D'après certains auteurs, une antiagglutinine, agent protecteur spécifique s'opposant à l'agglutination des spermatozoïdes par la tête aurait été décelée dans le sperme de plusieurs espèces de mammifères, elle ne serait pas particulière à l'espèce, les antiagglutinines pourraient jouer un rôle tant dans le plasma séminal que dans l'appareil génital femelle.

La concentration en sodium est plus faible dans les spermatozoïdes que dans le plasma séminal ; c'est généralement l'inverse pour la concentration en potassium, en magnésium et en calcium. La dilution ou le lavage excessif des spermatozoïdes dans un tampon isotonique nuit à leur motilité et à leur métabolisme. Dans ces conditions, ils perdent du potassium, du magnésium et du calcium.

C'est dans le plasma séminal que les spermatozoïdes sont transportés de l'appareil génital femelle. Ce plasma peut aussi constituer pour les spermatozoïdes une source d'énergie directement utilisable (fructose et sorbitol , par exemple) ou le devenant par mélange avec les sécrétions femelles (glycérylphosphorylcholine, par exemple).

L'appréciation la fonction sécrétoire des glandes sexuelles mâles in vivo et l'évaluation de la qualité du sperme peuvent également se faire par l'analyse chimique et par des mesures

métaboliques du sperme. Une des méthodes permettant d'apprécier l'activité sécrétoire consiste à étudier les effets d'éjaculations fréquents sur la composition chimique du plasma séminal. Parmi les facteurs qui peuvent altérer la qualité du sperme figurent, par exemple, les infections, le stress affectif, la déshydratation et la température.

III.1. La couleur du sperme

Le sperme a habituellement une couleur blanchâtre (PAREZ et DUPLAN, 1987). Cette couleur peut être cependant modifiée pour des raisons d'ordre physiologiques et surtout pathologiques. La couleur jaune du sperme est due à une teneur élevée en carotène provenant des vésicules séminales. Elle peut également résulter de la présence de pus ou d'urine dans le sperme. Une coloration rosâtre ou rougeâtre traduit la présence de sang et de phénothiazine dans le sperme. Elle peut être aussi due à une lésion de la verge ou de la muqueuse urétrale dans sa portion terminale. La coloration brunâtre traduit la présence de sang altéré ou d'éléments sanguins dégénérés dans le sperme. La couleur bleue de l'éjaculat est due à une faible concentration en spermatozoïdes ou l'administration de bleu de méthylène. (Djabakouet *al.*, 1984).

III.2. La consistance du sperme

Le sperme normal est un liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre selon les espèces consistant en une suspension de spermatozoïdes dans le plasma séminal.

Deviens plus clair au fur et à mesure que sa concentration en spermatozoïdes diminue. Le sperme du taureau et du bélier est de consistance visqueuse et de coloration blanchâtre. Le sperme du bélier est blanc crémeux, plus dense et plus opaque que celui du taureau.

Les spermatides sont les plus petites cellules de l'épithélium germinatif. Ils se trouvent en proximité de la lumière du tube séminifère (Parez et Duplan, 1987).

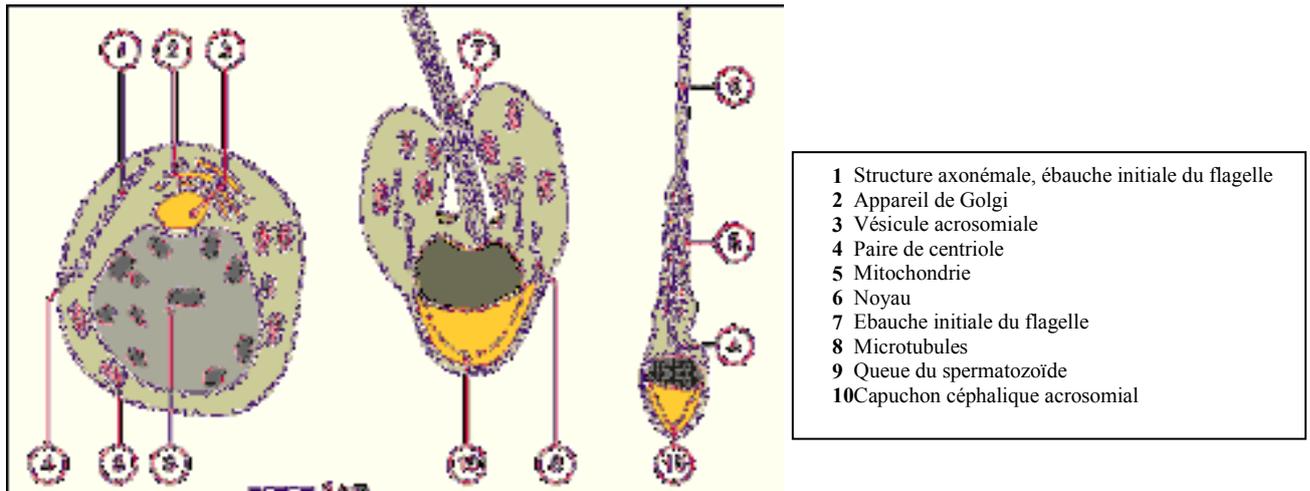


Figure3.spermatogenèse

Trois différents stades de la spermiogenèse: à gauche, une spermatide jeune, à droite un spermatozoïde immature, au milieu, un stade intermédiaire. Suite à une rotation du noyau, la vésicule acrosomiale change de position. Cette dernière se glisse comme un capuchon sur le noyau de plus en plus condensé (ligne pointillée). Les composants cellulaires inutiles du cytoplasme sont ligaturés (puis éliminés sous la forme d'un corps résiduel) et les mitochondries sont concentrées en manchon autour de la portion initiale du flagelle. Signe de son immaturité, le spermatozoïde libéré dans la lumière possède encore un peu de cytoplasme au niveau du col

IV. Structure et développement des spermatozoïdes

IV.1. Spermatozoïde ultra structure :

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui ne grossit plus et ne se divise plus. Sa taille varie entre 50 à 80 μ m. Le spermatozoïde comporte trois principales parties (Fig4).

- la tête, partie essentielle, est presque exclusivement constituée d'un noyau haploïde et coiffé de l'acrosome.

-l'acrosome Formation de l'acrosome

La spermatide encore au contact de la cellule de Sertoli change de polarité. L'appareil de Golgi se déplace du côté du noyau de la spermatide proche de la cellule de Sertoli, alors que les centrioles migrent en direction opposée, c'est-à-dire vers la lumière du tube séminifère. A l'intérieur de l'appareil de Golgi se forment des granules qui confluent pour former une grande structure qui se plaque sur le noyau, recouvrant ce dernier comme un capuchon sur sa

plus grande partie. Cet acrosome correspond fonctionnellement à un lysosome et contient de ce fait des enzymes lysosomiales (entre autre, des hyaluonidases).

-Condensation du noyau :la mise en place d'un organite essentiel pour la fécondation: l'acrosome

-L'organisation d'un appariel locomoteur : leflagelleL'élimination quasi complète du cytoplasme au terme de la différenciation

- La pièce intermédiaire, elle est riche en mitochondries et en enzymes propre aux métabolismes du spermatozoïde.

- A la formation du flagelle. très tôt, dans la spermatide, une structure ciliaire typique se développe à partir d'un des deux centrioles dans le cytoplasme, petites structures de forme cylindrique perpendiculaires l'une à l'autre, qui se trouvent d'abord à proximité de l'appareil de Golgi. La future structure axonémale croît à partir de l'un des centrioles (distal). Celle-ci est constituée de 9 doublets de microtubules périphériques et d'une paire de microtubules centrale. Suite à la rotation susmentionnée du noyau et de la vésicule acrosomiale, l'ébauche initiale du flagelle se situe au cours du développement au pôle opposé à l'acrosome.

Le spermatozoïde mature mesure environ 60 μm de long et est totalement enveloppé par la membrane plasmique.

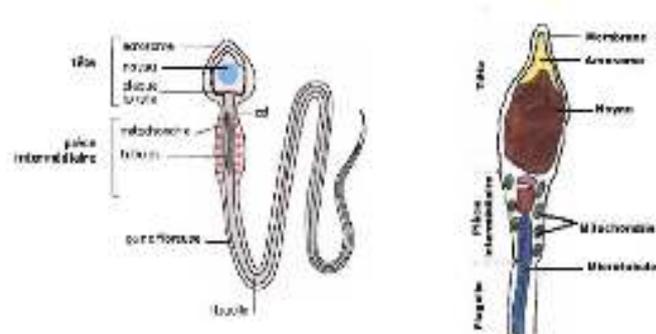


Figure 4. Anatomie du spermatozoïde de taureau (*In* YAYE, 2009)

V. Biotechnologie liée la conservation de la semence animale

V. 1. Evaluation de la qualité de la semence

1.1.Examens microscopiques

Ils comportent l'évaluation de la motilité, de la concentration en spermatozoïdes, du pourcentage en spermatozoïdes vivants et de la morphologie des spermatozoïdes.

1.1.1. La Motilité

La motilité des spermatozoïdes est un élément clé d'appréciation de la qualité de l'éjaculat. C'est un examen classique, constant et obligatoire sur le quel on se base pour effectuer une première élimination des éjaculats considérés comme inaptes à la congélation (GOFFAUX,1986). Un autre examen de la motilité est également réalisé sur un autre échantillon de semence décongelée avant la mise en stock définitive. Ce dernier examen donne lieu à une dernière élimination des éjaculats inaptes. On distingue deux types de motilité: la motilité massale et la motilité individuelle.

1.1.2. Motilité massale

Elle s'apprécie au microscope, l'examen microscopique d'une goutte de sperme non diluée, l'observateur s'intéresse aux mouvements et à l'effet du déplacement des spermatozoïdes dans le liquide séminal. A l'issue de l'observation, en fonction du mouvement de masse des spermatozoïdes, une note de 0 à 5 est attribuée à chaque éjaculat. Certains auteurs convertissent cette note en pourcentage fictif de spermatozoïdes mobiles. L'exigence minimale pour un éjaculat correspond à un bon mouvement de masse qui doit être tourbillonnant [une note supérieure à 3 (environ 60% de spermatozoïdes mobiles) (Parez et Duplan, 1987).

Tableau III. Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale

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

1.1.3. Motilité individuelle

Le mouvement individuel des spermatozoïdes est apprécié sous microscope optique. Les mouvements normaux des spermatozoïdes sont oscillatoires et progressifs (Rukundo, 2009). Ce test se réalise sur du sperme dilué à 1/10 au sérum physiologique. Il permet de déterminer approximativement le taux de spermatozoïdes vivants et d'affecter au sperme une note allant de 0 à 5 (Tab IV). Un bon sperme doit avoir au moins 60 à 70 % de spermatozoïdes vivants

Tableau IV. Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

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

1.1.4. Concentration du sperme

La concentration exprime le nombre de spermatozoïdes par mm³ (ou par ml) d'un éjaculat. Elle peut être directement déterminée par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standards par comptage électronique ou encore par néphélométrie. L'évaluation de la concentration en spermatozoïdes par la méthode directe permet d'avoir un résultat plus objectif (Parez et Duplan, 1987). Cependant elle présente l'inconvénient d'être méticuleuse et demande trop de temps. La méthode indirecte est présentement la plus utilisée dans les centres d'insémination artificielle. Elle consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Cette opacité peut cependant être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. Elle est moins exacte chez les espèces dont le plasma séminal présente de grandes variations d'opacité (verrat, étalon). La numération directe qui se fait au moyen d'un hématimètre exige une dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes: solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de formaldéhyde à 1 % (solution de Hancock). Le taux de dilution dépend de la concentration apparente du sperme. Une dilution de 1 % est recommandée pour le sperme de taureau (HANZEN,2008-2009b).

1.1.5. Pourcentage de spermatozoïdes vivants

La détermination se fait à l'aide de colorants spéciaux (Eosine nigrosine, bleu de méthylène ou bleu de bromophénol) qui peuvent traverser la membrane des spermatozoïdes morts et les différencient donc des vivants. En fonction du taux de spermatozoïdes vivants, une note est attribuée à chaque éjaculat et varie de 0 à 5 (Tab IV).

1.1.6. Morphologie des spermatozoïdes

L'examen morphologique permet de différencier les spermatozoïdes normaux des anormaux et les spermatozoïdes vivants des morts. Cette méthode est basée sur la coloration sélective de certains organes selon qu'ils soient normaux ou anormaux ou selon que les cellules soient mortes ou vivantes. La morphologie est appréciée sur des frottis de sperme colorés (encre de Chine, Giemsa, Eosine-aniline ou bleu de bromophénol). Pour être admissible, le sperme doit contenir moins de 25% de spermatozoïdes anormaux et plus de 60 % de spermatozoïdes vivants (note ≥ 3 : Tab IV).

1.2. Analyse du spermogramme

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

Tableau V. analyse du spermogramme

Qualité du sperme	Résultats
Volume	> 1 ml
concentration supérieure	3
pourcentage de spermatozoïdes vivants	> 60%
taux de spermatozoïdes sans anomalies majeures	> 80%
pH	6,5 et 7,2

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

V.2. Dilution

Le milieu de dilution doit être non toxique pour les spermatozoïdes, cryoprotecteur et réduire le développement microbien. Ainsi, les substances bactéricides ou bactériostatiques (Sulfanilamide (0,3 %), la pénicilline (500 à 1000 UI/ml), la streptomycine (1mg/ml)) sont additionnées aux milieux de dilution. Les milieux les plus utilisés (Tab V) sont à base de lait préchauffé, écrémé et dont le pouvoir protecteur est accru avec addition de 10% de jaune d'oeuf de poule et d'antibiotique; ou à base de solution de citrate de sodium (2,9%) additionné au jaune d'oeuf (25%). Dans l'optique de limiter tous les risques possibles de transmission des pathologies entre espèce, l'utilisation des milieux de dilution synthétiques est de plus en plus courante.

Le taux de dilution dépend de la concentration en spermatozoïde dans la dose de semence, du volume et de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat prélevé

Tableau VI. Composition des dilueurs les plus utilisés (Laminou, 1999)

Milieu à base de jaune d'oeuf et de citrate de sodium	Milieu IVT (Illinois, Variable, Temperature)	Milieu à base de lait de vache (LAICIPHOSND)
Citrate de sodium 2,9 % Jaune d'oeuf 25 % Glycérol 7,5 % Antibiotiques	Bicarbonate de soude 0,2 g Citrate trisodique (2H ₂ O) 2 g Chlorure de potasse 0,04 g Glucose 0,3 g Jaune d'oeuf 10 % Antibiotiques	Lait 54% Jaune d'oeuf 10% Glycérol 6% Antibiotiques

La réalisation pratique de la dilution se fait en deux étapes. Elle consiste à :

diluer avec la moitié du diluant contenant 3 % de glycérol (faiblement toxique pour les spermatozoïdes à 30°C) et à réfrigérer de façon progressive à 5°C. Notons que le refroidissement peut se faire aussi après la dilution finale, selon la pratique du centre et le dilueur utilisé ;

effectuer la 2ème phase de dilution (la glycérolisation). Ajouter progressivement à 5°C (1/4 toutes les 15 mn), le reste du dilueur à 11 % de glycérol (ou 14 % si la première dilution n'en contenait pas). Le glycérol se trouve alors à un volume de 7 %. Le taux final de glycérol ajouté à la solution est fixé, pour des problèmes de toxicité, à 7%.

Le glycérol, par ses effets cryoprotecteurs, permet :

- un ralentissement du processus de cristallisation extra et intra cellulaire, ainsi que la formation de cristaux plus petits et cela de façon réversible ;
- une atténuation du choc osmotique en réduisant la quantité d'eau qui se transforme en glace;
- une protection des membranes cellulaires en réduisant le phénomène de dislocation cellulaire.

V.3. Conservation de la semence

Les spermatozoïdes ont une durée de vie très brève (de quelques minutes) à la température ambiante. Leur conservation est en fonction du mode d'utilisation de la semence. Pour une utilisation directe, la semence conditionnée est maintenue dans un bain-marie à la température de 37 à 38°C, À 4°C, -5°C, la semence à une durée de vie maximale de trois jours (GERARD *et al.*, 2008; Parez et Duplan, 1987). Pour une conservation à long terme (plus de 20ans), la semence bovine est stockée dans de l'azote liquide à -196°C.

I. Lieu de réalisation des étapes expérimentales

Notre étude a été réalisée, sur une période de trois mois, au Laboratoire de phytopharmacie, Département de Biotechnologie (Agronomie, université Blida1) et au laboratoire de Production et de Conservation des Semences Bovines du Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique (CNIAAG) de Baba Ali, Birtouta, Alger) d'une période de 3 mois (mai, juin, juillet).

II. Matériel Biologique

II.1. Animaux (voire annexe)

Le matériel biologique comprend la semence bovine issue de taureaux (Tab.6) en bonne santé de grande taille Sur le plan productif; la semence est de très bonne qualité .Deux éjaculats sont prélevés par semaine. La collecte se fait par un vagin artificiel.

La nutrition de ces animaux comprend le foin, un bouté par jour qui contient 15 kg à 20kg pour l'énergie nécessaire et 4kg par jour de concentré qui contient un complexe vitaminé riche en sels minéraux.

Tableau VII. Liste des races bovines utilisées pour récolter la semence

Animaux	Race	Date de naissance	Boucle auriculatif
HAELTOP	Holstein	08/06/2012	FR2922493398
HOUARI	Holstein	11/04/2012	FR4406207561
HEVOL	Holstein	14/07/2012	FR7261520812

II.1. 1. Préparation des animaux pour la collecte de la semence Le taurellier promène le taureau puis l'amène au contact des boutes en train (taureaux éliminés de la production à cause de leur âge avancé) . Lorsque le taureau présente des signes d'excitation, le taurellier lui fait effectuer plusieurs fausses montes. Celles-ci consistent à laisser le taureau monter sur le bote en train sans lui laisser le temps de donner le coup de rein concomitant de l'éjaculation. Les taureaux réalisent en moyenne deux fausses montes avant la récolte au vagin artificiel.

II.1.2. Collecte de la semence

La collecte est effectuée dans une aire de collecte spécialement adaptée à cet effet (calme, propreté, sol non glissant,...). Au moment de la monte, l'opérateur dévie, légèrement avec la main, le pénis du taureau en le manipulant au niveau du fourreau. Simultanément, avec l'autre main, il avance le vagin artificiel (voir annexe) pour faire entrer complètement le pénis à l'intérieur (. L'éjaculation se produit alors immédiatement. Juste après l'éjaculation, le taureau

redescend et le taurellier donne deux ou trois mouvements énergiques au vagin artificiel afin de faire descendre la totalité de l'éjaculat à l'extrémité du tube de collecte gradué. Ceci afin d'éviter que la semence ne reste trop longtemps en contact avec le caoutchouc du cône les éjaculats sont maintenus à une température de 37-38°C dans un bain , dans le but de préserver leur vitalité

III. Tests d'évaluation de la qualité du sperme

III.1. Examen macroscopique

Immédiatement après la collecte, le sperme collecté est transporté vers le laboratoire afin d'effectuer un contrôle rapide, à l'œil nu, permettant de vérifier le volume de l'éjaculat (par lecture directe sur le tube gradué), sa couleur, sa viscosité et son odeur. Les éjaculats dont la qualité est douteuse (présence de sang ou de pus, volume insuffisant,...) sont éliminés sur place. Dans le cas contraire, le sperme est transvasé dans un biberon en verre préalablement plongé dans un bain marie à 37°C afin éviter les chocs thermiques

L'évaluation se fait grâce à un microscope à contraste de phase couplé à un écran téléviseur.

III.2. Examen microscopique

Une goutte de sperme pur est déposée sur une lame, préalablement posée sur une platine chauffante à 37°C, puis observée au microscope afin d'évaluer la motilité massale des spermatozoïdes (Fig5) Celle-ci permet de déterminer la proportion de spermatozoïdes mobiles à travers les vagues générées par les mouvements des spermatozoïdes. Une semence de bonne qualité étant caractérisée par des tourbillons visibles au microscope.



Figure 5. Matériel utilisé pour l'examen macroscopique :

microscope à contraste de phase (A) relié à une caméra (B), une plaque chauffante permettant de maintenir les lames à la bonne température (C) et un écran permettant de visualiser l'image (D)

III.2.1. Calcul de la concentration

Juste après l'examen microscopique, le sperme pur est déposé dans une cuvette puis dilué au 1/10 avec une solution physiologique (0,9000%). Cette étape est réalisée grâce à un appareil de dilution automatique. La cuvette est ensuite récupérée, puis placée dans un photomètre (Fig6). Ce dernier, permet de mesurer la concentration des spermatozoïdes, de déterminer le volume de dilueur nécessaire à ajouter pour avoir une dilution totale, ainsi que le nombre de paillettes à remplir. Une imprimante liée au photomètre imprime toutes les données calculées. Pour chaque taureau dont le sperme a été récolté, les données concernant la qualité du sperme pur (motilité massale/vitesse), le volume récolté, la concentration et le volume nécessaire pour la dilution totale sont reportées au fur et à mesure dans des fiches appelées spermogrammes .

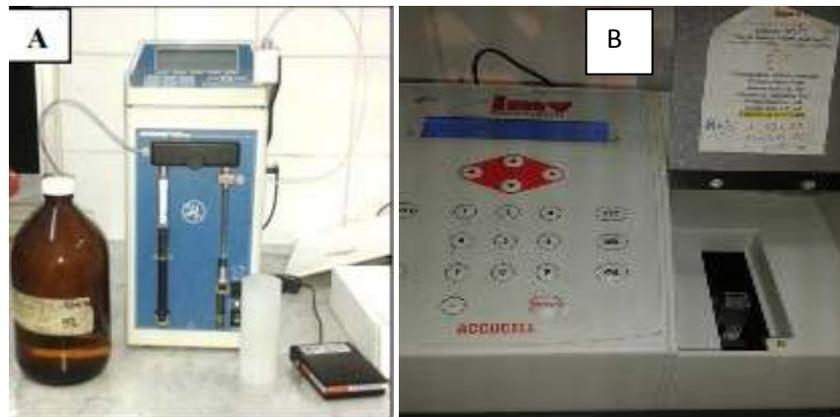


Figure 6. Calcul de la concentration du sperme, (A) Dilueur automatique permettant d'effectuer la dilution avec de l'eau physiologique, (B), Photomètre ACCUCCELL.

III.2.2. Calcul des dilutions

Le volume de dilueur est indiqué par le photomètre ce qui permet de calculer le volume de dilueur à ajouter au sperme par rapport au volume de la semence et la concentration (voir annexe) ce dernier est mis dans des eppendorf à des doses choisies par nous maintenu à 37° c. Le dilueur utilisé et le dilueur commercial (voir annexe) et notre dilueur (D3-T, D3-1, D3-2, D3-3, D3-4) on les mélange avec le sperme.

IV. Etape de préparation de la semence pour la conservation au froid

IV.1. Préparation des dilueurs

Pour la réalisation de nos dilueurs pour le D3 on a pesé à l'aide d'une balance de précision (fig7 A) ces produits (Fructose, acide citrique, tris base, vitamine C), une fois mélangés on ajoute de l'eau distillée (Tab8) Mettre le mélange dans un agitateur magnétique (fig7 B) pendant 10mn puis le filtrer (Fig.7C). On ajoute le Glycérol (7% dans 100ml) dans le mélange filtré (Fig. 8 D) et on contrôle le PH du mélange à l'aide d'un PH mètre (

Fig.7E) puis les verser dans 5 tubes en verre (Fig.7F) mettre les tubes dans une étuve à 120°C pendant 30 mn après on garde un tube comme un témoin D3T sans gelée royale puis on joute de dose minimal jusqu'a de dose maximal de gelée royal pour les restes des tubes (D3-1 , D3-2 ,D3-3,D3-4) (Tab.8)

Tableau VIII. composition des dilueurs

Diluer	Composants	Les doses
D 1	Tompan phosphate 0,1M	50 ml
	Saccharose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	5 g
	Nacl	0.9 g
	Tris C ₄ H ₁₁ No ₃	4,5 g
	Acide citrique C ₆ H ₈ O ₇	2,3 g
	Fructose C ₆ H ₁₂ O ₆	0,73 g
	Acide ascorbique C ₆ H ₈ O ₆	0 ,1 g
	Éthylène glycol C ₂ H ₆ O ₂	30 ml
	Antibiotique gentamicine	5 ml

Diluer	Composants	Les doses
D 2	Tompan phosphate 0,1M	50 ml
	Saccharose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	5 g
	Nacl	0.9 g
	Tris C ₄ H ₁₁ No ₃	4,5 g
	Acide citrique C ₆ H ₈ O ₇	2,3 g
	Fructose C ₆ H ₁₂ O ₆	0,73 g
	Acide ascorbique C ₆ H ₈ O ₆	0 ,1 g
	Glycérol	30 ml
	Antibiotique gentamicine	5 ml

Diluer	Composants	Les doses
D 3	Vitamine C (0.58)	0.32g
	Fructose 200ml	1.008g
	Acide citrique200ml	3.648g
	Tris base 200ml	7.26g
	Glycérol(7% dans 100ml)	13.09ml
	L'eau distillé	100 ml

Diluer	Composants	Les doses
D 4	Nacl	1 ,588g
	Kcl	0,039
	Na2Hpo4	0,122g
	KH2po4	0,038 g
	Vitamine C	0,32g
	Fructose	1,008g
	Glycérol (7% dans 100ml)	7ml
	L'eau distillé	100ml

On a ajouté la gelée royale pour le dilueur D3 ETD4

Tableau IX.les dose de gelée royale ajouté au dilueur

Diluers	composant	Les doses
D3-1	Gelée royale	0.10g
D3-2		0.40g
D3-3		0.80g
D3-4		3.2g

Diluers	composant	Les doses
D4-1	Gelée royale	0.10g
D4-2		0.40g
D4-3		0.80g
D4-4		3.2g

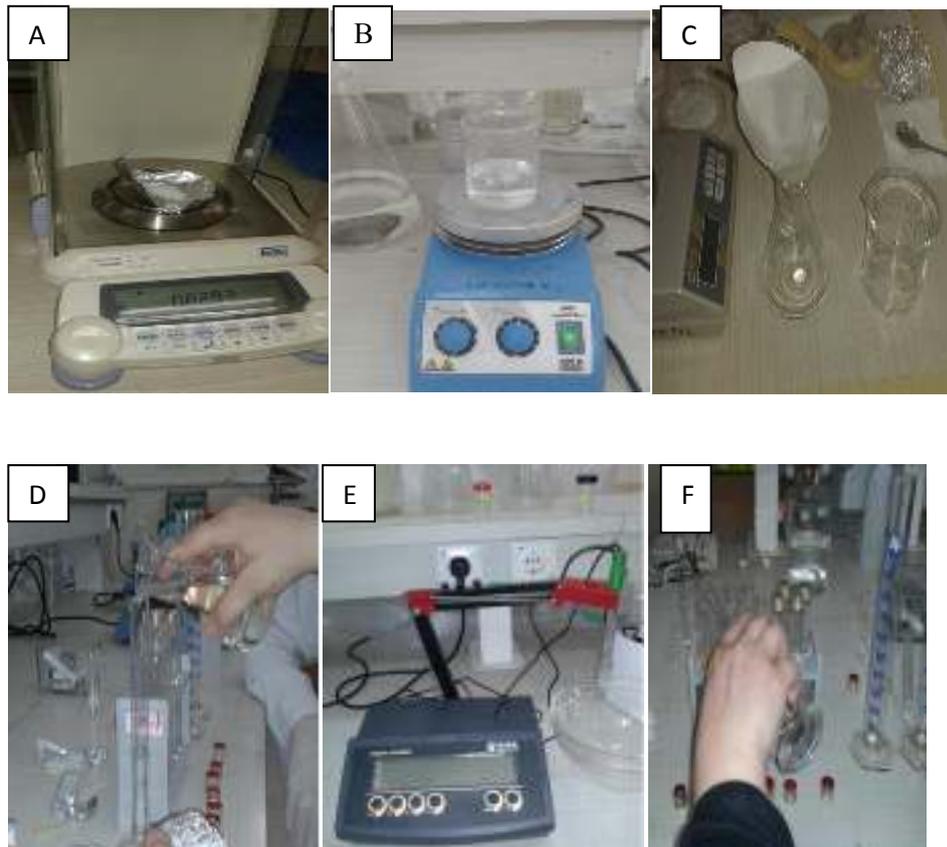


Figure 7. (A) peser les produits par la balance de précision (B) agitateur magnétique (C) filtration (D) l'ajout du glycérol au dilueu (E) PH mètre (F) mettre le mélange dilueur + glycérol dans des tubes en verre.

IV.2. Mise en paillettes

Une fois refroidi après 3heurs dans le réfrigérateur, le sperme sera conditionné dans des paillettes en plastique. Cette étape est effectuée à +4°C par un appareil automatique nommé MRS3 (Machine à Remplir et Souder par 3 paillettes ayant une capacité de production de 12900 paillettes par heure (Fig8 A). Celle-ci est équipée d'une pompe à vide servant au remplissage des paillettes et d'une tête sonotrode qui émet des ultra-sons permettant de sceller hermétiquement les paillettes. Les paillettes sont fines avec un diamètre de 2 mm et une longueur de 133. Chacune peut contenir un volume utile de 0.25 ml (volume suffisant pour une IA). Elles sont de couleurs différentes afin de faciliter leur identification. Le nom du taureau, son numéro d'identification, la date de récolte et l'identification du centre d'insémination, seront imprimés sur les paillettes grâce à une imprimante à jet d'encre (LINX). Dans notre on a utilisé 6 paillettes pour chaque éjaculat (3 animaux pour chaque animal 3 éjaculat)

IV.3. Refroidissement à +4°C

Les spermés dilués sont mis dans un réfrigérateur à +4°C pendant environ deux à trois heures. Ceci afin de laisser au glycérol le temps de pénétrer dans les spermatozoïdes. Le temps nécessaire à cette étape, dite d'équilibration, est considéré comme étant le temps nécessaire aux spermatozoïdes pour s'adapter au milieu qui leur est imposé après il sont examinés au microscope pour voir l'efficacité de notre dilueur (D3T , D3-1 , D3-2 , D3-3 , D3-4) et le comparée avec le (DC)

IV.4. Ultra-congélation à l'azote liquide

Après impression et remplissage, les paillettes sont disposées en position horizontale sur une rampe de congélation, préalablement déposée sur un calibre contenant de fines gouttières pouvant abriter un total de 100 paillettes (Fig 8B). La rampe de congélation est ensuite récupérée puis déposée dans un MINI-DIGITCOOL relié à une citerne d'azote en vapeur (Fig8 C). Il s'agit d'un automate permettant de baisser progressivement la température de +4°C à -140°C grâce aux vapeurs d'azote liquide. Cette étape de pré- congélation dure environ 7 minutes. Les paillettes sont ensuite retirées du MINIDIGITCOOL, placées dans des gobelets puis plongées dans de l'azote liquide à -196°C (Fig8 D). Une fois les paillettes congelées sont mis dans des visotubes ces derniers sont ensuite placés dans des gobelets, qui sont eux-mêmes déposés dans d'autres gobelets de taille plus grande appelés canisters.



Figure 8. Mise en paillettes, congélation et stockage de la semence

(A) MRS3, (B) Rampe de congélation, (C) MINI-DIGITCOOL, (D) canister d'azote liquide.

V. Tests de qualité de la semence diluée après conservation au froid

V.1. Etude de viabilité avec cytométrie en flux après réfrigération 4°C

Le cytomètre utilisé est l'EasyCyte 5HT, IMV qui requiert l'utilisation d'un logiciel pilote nommé guavaSoft IMV et d'un Kit nommé EasyKit (Fig9).

Avant et après chaque manipulation, un lavage est effectué à l'aide d'un fluorochrome (EasyBuffer). Ceci afin d'éviter que le capillaire du cytomètre ne se bouche, de récupérer

toutes les cellules qui restent à l'intérieur du système après l'analyse précédente et de récupérer toutes les molécules qui peuvent altérer les résultats de la prochaine analyse.

Un volume de 1µl de chaque éjaculat est mélangé avec 199µl d'eau distillée, le tout est déposé dans des puits placés sur une plaque spéciale appelée Porte-puits. Le nombre de puits est déterminé selon le nombre d'échantillons à analyser. La plaque, est ensuite recouverte par un cache noir pour empêcher la pénétration des rayons lumineux et une incubation est effectuée à 37°C pendant 10 minutes.

Sur la première fenêtre qui apparaît sur l'interface du logiciel Cytosoft IMV, l'espèce bovine est sélectionnée et le type d'analyse, dans ce cas « viabilité », est choisit.

La plaque est ensuite récupérée de l'incubateur puis placée dans le cytomètre. Après avoir attribué le nom des taureaux aux puits correspondants et enregistrement des fichiers générés dans un emplacement choisi sur le microordinateur, l'analyse est lancée (Fig 10).



Figure 9. Cytomètre en flux **Figure 10. Fenêtre permettant le lancement de l'analyse**

V.2 Technique de coloration de sperme avec éosine- nigrosine

La vitalité des spermatozoïdes correspond à la proportion de spermatozoïdes vivants. La vitalité des spermatozoïdes doit être déterminée dans les échantillons de sperme contenant moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles progressifs. Utilise une technique de coloration à l'éosine-nigrosine pour établir le pourcentage de spermatozoïdes vivants. La technique se base sur le principe que les cellules mortes absorbent l'éosine et prennent une couleur rouge. La nigrosine fait office d'arrière-plan noir facilitant l'évaluation des lames. Permet de vérifier la précision de l'évaluation de la motilité, parce que le pourcentage de spermatozoïdes morts ne peut excéder le pourcentage de spermatozoïdes immobiles. peut contribuer à évaluer le diagnostic et la prise en charge de la stérilité masculine.

La méthodologie est :

1. Mélanger 50 µl de sperme avec deux gouttes de réactif 1 dans un tube à essai stérile.
2. Après 30 secondes, ajouter trois gouttes de réactif 2 et mélanger soigneusement.

3. Dans les 30 secondes qui suivent l'ajout du réactif 2, placer une goutte du mélange sperme-colorant sur une lame de microscope et créer un frottis mince au moyen d'une lamelle couvre-objet.

4. Couvrir le frottis d'une lamelle couvre-objet avant que le frottis soit sec et procéder immédiatement à l'examen au microscope. Lors du séchage du frottis, des cristaux de nigrosine susceptibles d'interférer avec l'interprétation des résultats se forment

V. 3. Tests après Ultra-congélation à l'azote liquide

Une paille congelée dans l'azote liquide est déposée dans de l'eau tiède à +37°C pendant 30 secondes. Une fois décongelée, elle est secouée puis soigneusement séchée. En effet, lorsqu'elle rentre en contact avec le sperme, une seule goutte d'eau suffit pour induire des lésions cellulaires irréversibles et provoquer la mort des spermatozoïdes. La paille est ensuite coupée et son contenu est versé dans une lame déposée sur une plaque chauffante et examinée au cytométrie en flux afin de vérifier la qualité finale de la semence et par la suite connaître l'efficacité de notre dilueur après décongélation. Si l'examen est satisfaisant, donc elle peut être conservée et inséminée par la suite (voir annexe)

Discussion

I. Caractéristiques du sperme récolté

Au cours de notre études nous avons collecté le sperme de différents animaux de bovins dont la couleur retrouvée dans les éjaculats est blanc crémeux. Il est bien connu que, la couleur du sperme normale de bovin varie du blanc clair au jaune brillant (Parez et Duplan, 1987).

Les volumes des éjaculats récoltés se situaient entre 3.5 et 9.5ml. En effet, le volume de l'éjaculat est en fonction de l'état de santé, de l'alimentation et les conditions de récolte (Cabannes, 2008), il peut varier entre 3ml et 9.5ml (Bahakat *et al*, 2011; Sowder *et al*, 2002).

L'étude de la motilité massale a révélé une intensité importante de vagues produites par les déplacements des spermatozoïdes, elle est estimée à un pourcentage de 70%. Cet valeur s'accorde parmi celles fixées par (Thibier, 1991). Ceci pourrait expliquer une bonne concentration du spermatozoïdes et d'une vitesse adéquate de déplacement des spermatozoïdes (Konfe, 2014).

Les concentrations en spermatozoïdes trouvées sont différentes, elle varient entre $0,769 \times 10^9$ spz/ml et 2×10^9 spz/ml. Ces résultats seraient probablement dûs à l'effet de la saison températures élevées (été), l'alimentation, l'état de santé de l'animale et la fréquence de collecte. La limite minimale d'acceptation par le CNIAAG est fixée à $0,5 \times 10^9$ spz/ml. Ce qui est légèrement inférieur aux limites rapportées par Thibier (1991) et Rosenberg (1979) qui sont de ($0,6 \times 10^9$ spz/ml).

II. Effet du milieu de dilution sur la qualité de la semence

Le milieu de dilution développé au sein de notre laboratoire à est pour but de remplacer le milieu naturel des spermatozoïdes secrétés par les glandes annexes. Il a pour rôle la protection des spermatozoïdes des chocs thermiques au moment de la cryoconservation et permet une meilleure survie des spermatozoïdes après la décongélation au moment de l'insémination.

Les résultats trouvés après 3h de réfrigération et après 24h de réfrigération et après décongélation pour le D1et D2 et D4 ont révéler aucun résultat dans tous les éjaculats cela s'explique que les composant utiliser font pas preuve d'un bon milieu

dans notre travail, nous avons utilisé, le D3 en parallèle, un dilueur commercial utilisé par le CNIAAG dont les résultats de la réfrigération et de la décongélation sont enregistrés dans les tableaux (Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14, Tab. 15, Tab. 16, Tab. 17, Tab. 18, Tab. 19).

L'analyse faite après 3 heure de réfrigération, nous a permis de révéler la concentration idéale de la gelée royale, en calculant le nombre de spermatozoïdes vivants dans chaque milieu de dilution.

Les semences diluées dans notre dilueur (D3) à révélé des résultats variant de 52.22 % à 23.33% au moment de la réfrigération. Ces résultats corroborent avec les données de l'OMS (WHO, 2010). Un sperme normal contient au moins 40% de spermatozoïdes mobiles (mobilité totale) et/ou au moins 32 % de spermatozoïdes à mobilité progressive (OMS-WHO, 2010).

En comparant avec le dilueur commercial l'ANDROMED[®] qui présente des résultats satisfaisants 66,10 % supérieur à ceux trouvé avec le dilueur fabriqué. Les résultats observés dans le cas de notre expérimentation s'explique par la présence des tampons : tris base et l'acide citrique les deux permettent de garder un pH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes qui varie de 6,7 à 7,0. (Graham *et al.*, 1984), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350 mOsm) (Vishwanath, Shannon, 2000). La présence des antioxydants (Vitamine C) dans le milieu de dilution D3, permet de préserver la viabilité des spermatozoïdes. En effet, cet antioxydant comme la vitamine C permet d'éviter la régénération des espèces réactives d'oxygènes (ROS), tels que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂- et l'ion superoxyde O₂⁻, par les spermatozoïdes morts suite à une réaction catalysée par une oxydase d'acides aminés aromatiques, (Upreti *et al.*, 1998; Aitken et Baker, 2004). Ces superoxydes provoquent une diminution de la mobilité par inhibition de la production d'ATP par les mitochondries et une altération de la membrane plasmique par peroxydation des lipides (acide gras) membranaires (Maxwell et Watson, 1995).

L'interprétation des résultats concernant le pourcentage des spermatozoïdes vivants dans les milieux de dilutions nous permet de focaliser le regard sur l'importance du taux représenté qui est estimé à 52,22% obtenu à une concentration de 0,4 g de gelée royale présente dans le milieu D3-2. Ceci pourrait être expliquer par la présence dans ce produit biologique de quantité suffisante de substance amino-organique qui jouent le rôle de tampon (Good *et al.*, 1966) et aussi les Métaux et minéraux (Na, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu...) dont il conditionne la mobilité des spermatozoïdes et interviennent dans la capacitation et la réaction acrosomique

de plus les antioxydants (vitamine B12, vitamine B6, vitamine C, cuivre) issues de la gelée royale. Comparativement aux résultats obtenus avec les autres milieux de dilution possédant des concentrations inférieures ou supérieures à 0,4 g de gelée royale.

D'autre part, l'effet obtenu après 24h de réfrigération

L'analyse de semence diluée dans nos 5 dilueurs (D3) après 24 h de réfrigération à 4°C a révélé que le nombre des spermatozoïdes vivants a diminué par rapport à celui obtenu après 3 h, ceci a été approuvé par (Adoue, 1991). Les résultats varient entre une moyenne de 14,44% et 4,44% ce qui est inférieur à ceux trouvés par le dilueur commercial de CNIAAG Andromède 51,66%, et aussi inférieur à ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont obtenu un taux de 75% après conservation avec des dilueurs à base de lait pendant 40-48 heures, de 77% au bout de 70 heures et de 57% après 80 heures (Heiskanen *et al.*, 1994 a et b]. On suppose que la diminution des spermatozoïdes est dû à l'absence d'antibiotiques ce qui permet la prolifération des bactéries dans le milieu conduisant à la diminution de leur mobilité. Cette dernière peut être causée suite à une concentration insuffisante de tampon (acide citrique, tris base) pour une durée de 24h menant à un déséquilibre de pH et de l'osmolarité. De plus le manque d'énergie nécessaire et un facteur limitant de la mobilité des spermatozoïdes suite à une concentration insuffisante de fructose par rapport au dilueur commercial utilisé au CNIAAG qui contient des concentrations bien déterminées.

Les résultats du sperme dilué dans le D3 après décongélation varient entre 36,11% et 7%, ces résultats sont acceptables beaucoup plus dans le D3-2 avec un pourcentage de 36,11%. Ce dilueur contient 0,40g de gelée royale ceci s'explique par la présence des cryoprotecteurs dans la gelée royale comme les acides aminés, par exemple la proline, en réponse à des températures froides et cette accumulation serait associée à une tolérance au froid (Dionne, Castonguay, Nadeau, Desjardins, 2001). Également, certains types d'acides aminés présents dans cette gelée peuvent protéger les cellules animales durant la cryoconservation (Kruuv, Glofcheski, 1992). La proline, la glutamine ou la bêtaïne (un dérivé triméthyle de la glycine qui porte un groupe pseudo choline) augmentent le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après la cryoconservation des spermatozoïdes.

Ainsi que les résultats de la semence diluée dans le dilueur D3T sans gelée royale après décongélation sont moins acceptables par rapport au D3-2 mais peuvent être utilisés pour l'insémination, cela est dû à la présence d'un agent cryoprotecteur le *glycérol*; il pénètre et diffuse à l'intérieur des cellules (Vishwanath, Shannon, 2000) (Holt, 2000). Il abaisse la

température de nucléation de l'eau à l'intérieur de la cellule, conduisant à la diminution des risques de formation de glace intracellulaire qui est létale pour les cellules. De plus, le glycérol diminue la température aux quelles les membranes subissent un changement de phase (phase liquide-cristalline à phase gel) pendant le refroidissement. Le glycérol permet donc de conserver les membranes plus fluides jusqu'à des températures plus basses, diminuant ainsi le risque de cassure des membranes des spermatozoïdes causées par le choc dû au froid. Il atténue également les changements de volume que les spermatozoïdes subissent lors de l'augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur de la cellule provoquée par la congélation de l'eau extracellulaire (Mazur, Cole, 1989). La présence d'une source énergétique comme le sucre dont fait partie le fructose est particulièrement abondant dans le spermatozoïde, où il représente la principale source d'énergie. La fructolyse s'effectue dans la queue du spermatozoïde, la mobilité est en très étroite relation avec la quantité de fructose présent (Yildiz, Kaya, Aksoy, Tekeli ., 2000).D'autres sources énergétiques et nutritives présentes dans la gelée royale comme le glucose, participent à l'équilibre osmotique du diluant. elles ont comme rôle la stabilisation des membranes des spermatozoïdes (Vishwanath R, Shannon P. 2000).

De plus, la présence de saccharose dans la gelée royale joue un rôle de cryoconservation des spermatozoïdes bovins permettant d'augmenter le pourcentage de motilité après la décongélation de la semence (Foote, Kaproth ., 2002) .

I. Tests d'évaluation de la qualité du sperme

I.1. Examen macroscopique

Tous les éjaculats collectés sont d'aspect normal et acceptable, en effet ils présentent une couleur blanchâtre à blanc jaunâtre et une consistance semi (Fig.11). Le volume peut varier d'un taureau à l'autre (TabX)



Figure.11. Volume, couleur et viscosité du sperme

Tableau X. l'examen macroscopique de chaque éjaculats

Animaux	Ejaculat	Couleur	Volume
Hevol	Ej1	Blanc crémeux	3,5ml
	Ej2	Blanc crémeux	7,5ml
	EJ3	Blanc crémeux	5ml
Houari	EJ1	Blanc crémeux	5ml
	EJ2	Blanc crémeux	5.5ml
	EJ3	Blanc crémeux	3ml
Haeltop	EJ1	Blanc crémeux	8ml
	EJ2	Blanc crémeux	6 ,5ml
	EJ3	Blanc crémeux	9,5ml

I.2. Examen microscopique

I.2.1. Motilité massale

L'observation microscopique a révélé que les spermatozoïdes effectuent des mouvements en tourbillonnant en formant des vagues. Ces mouvements de groupe sont appelées la motilité massale indiquant l'orientation dynamique des spermatozoïdes dans le liquide séminale. Des pourcentages approximatifs des spermatozoïdes mobiles qui seront utilisés les étapes ultérieures.

Tableau XI. Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité massale

Animaux	éjaculat	Motilité massale/ vitesse
Hévol	EJ1	70% / 40
	EJ2	70% / 35
	EJ3	70% / 40
Houari	EJ1	70% / 40
	EJ2	70% / 40
	EJ3	70% / 40
Healtop	EJ1	70% / 40
	EJ2	70% / 40
	EJ3	70% / 40

Motilité massale 70% excellente = Pourcentage important de Spermatozoïdes, vagues noires et denses

Vitesse = 40 excellente = Vitesse des vagues très importantes

Vitesse= 35 acceptable = Vitesse des vagues importante



Figure 12. Motilité massale des spermatozoïdes dans le liquide séminale sous microscope (Gx40)

II. Contrôle des caractéristiques de la semence après réfrigération +4°C

Les résultats trouvée pour le sperme diluée dans D1, D2,D4 étaiis nul dons on a poursuite l'études avec le sperme diluer dans D3 après 3H et 24H de réfrigiration

Après 03 heures de réfrigération du sperme dilué dans le D3 des tests microscopiques ont été performés

II.1. Test de viabilité

Les résultats sont obtenus sous forme d'un tableau de données avec des graphiques correspondant à chaque échantillon sous forme d'un nuage de points sur lequel deux populations peuvent être distinguées : la première, colorée en rouge, représente le taux de spermatozoïdes vivants, la seconde, colorée en vert représente les débris. Les graphiques obtenus doivent être traités pour optimiser la précision lors de la lecture (**Fg.12**)

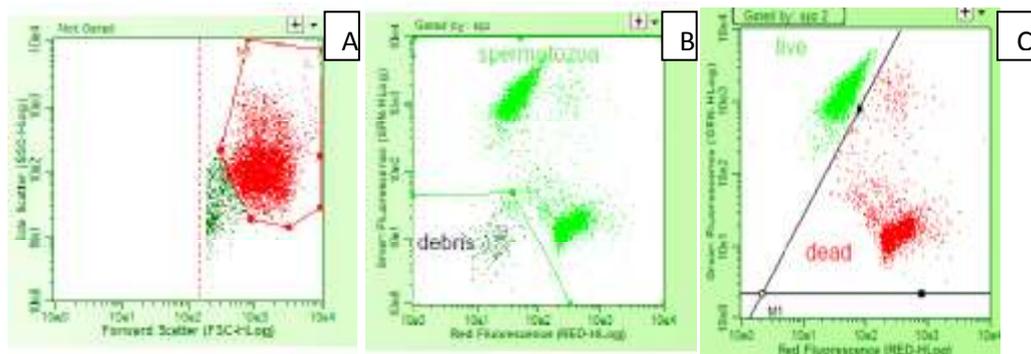


Figure 13. Résultat du test de viabilité obtenu par le cytomètre en flux

(A) premier graphique obtenu à l'état brut (B) traitement du graphique pour éliminer les débris du résultat (C) résultat final du test ne présentant que les spermatozoïdes vivants (en vert) et les spermatozoïdes morts (en rouge).

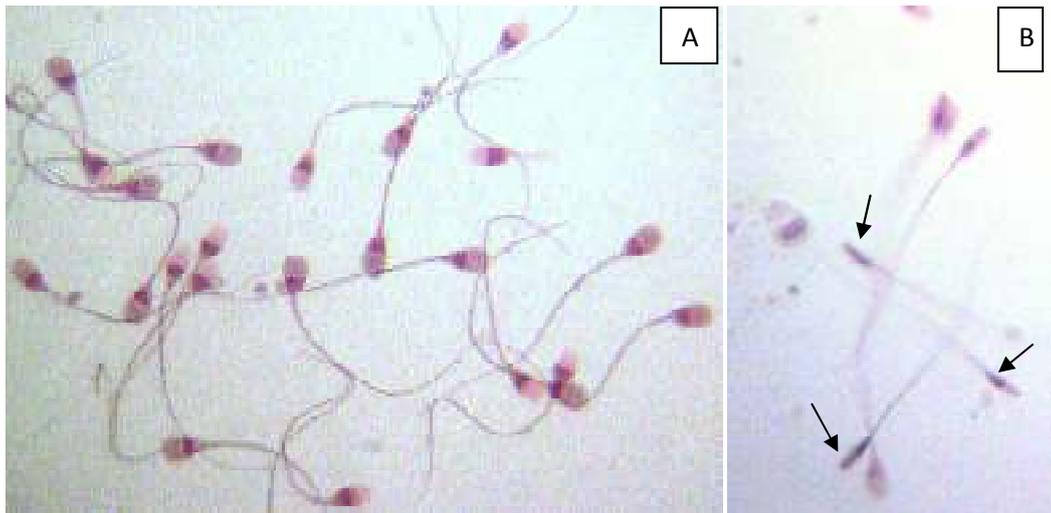


Figure14. (A) spermatozoïdes vivants, (B) spermatozoïdes morts (flèches).

II .1 .1 Résultats après 3H

Photos pris par le microscope optique détermine la viabilité des spermatozoïdes après 3 h de réfrigération

-Ejaculat 1 D3-1

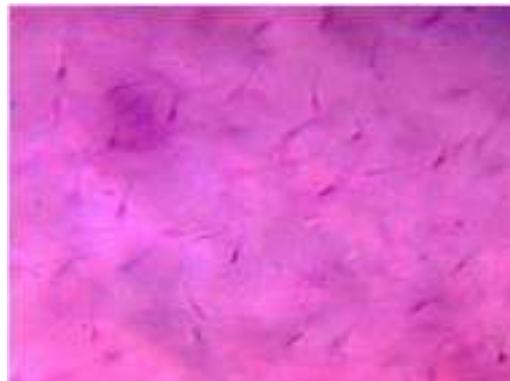


Figure15.observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-1 de l'animal 1 éjaculat 1 après 3h de réfrigération

-Ejaculat 1 D3-2



Figure16.observation de la mobilité avec microscope (Gx10) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 1 éjaculat 1 après 3h de réfrigération

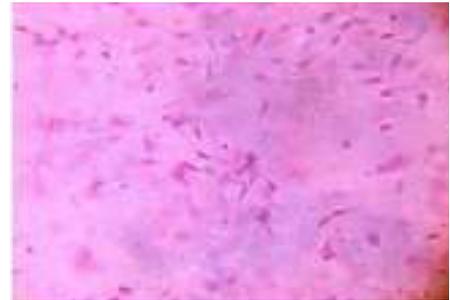


Figure17.observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 1 après 3h de réfrigération



Figure18. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 3 éjaculat 1 après 3h de réfrigération

-Ejaculat 3 DC



Figure19. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération



Figure20. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 3 éjaculat 3 après 3h de réfrigération

-Ejaculat 3 D3 témoin

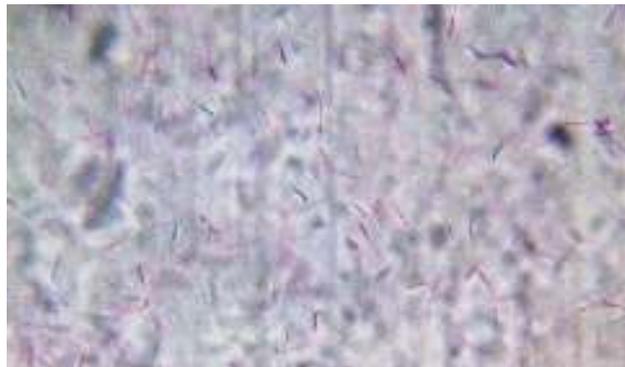


Figure 21. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3H de réfrigération

-Ejaculat 3 D3-1



Figure 22. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération

Ejaculat 3 D3-2

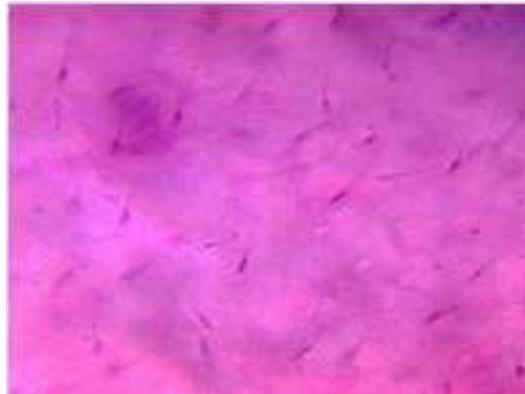


Figure 23. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 1 éjaculat 3 après 3h de réfrigération

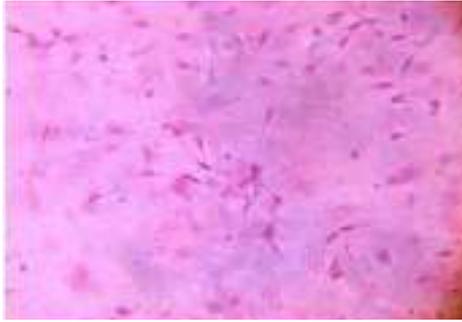


Figure 24. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération



Figure 25. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-2 de l'animal 3 éjaculat 3 après 3h de réfrigération

-Ejaculat 3 D3-4



Figure 26. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 1 éjaculat 3 après 3h de réfrigération



Figure 27. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 2 éjaculat 3 après 3h de réfrigération

Tableau XII.Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 1

Animal 1	Ejaculats	dilueurs	spermatozoïde vivant
Hevol	Ej1	D-C	50%
		D3-T	60%
		D3-1	50%
		D3-2	60%
		D3-3	30%
		D3-4	5%
	EJ2	D-C	60%
		D3-T	40%
		D3-1	10%
		D3-2	40%
		D3-3	40%
		D3-4	20%
	EJ3	D-C	90%
		D3-T	75%
		D3-1	35%
		D3-2	70%
		D3-3	50%
		D3-4	50%

Tableau XIII. Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3H de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 2

Animal 2	Ejaculats EJ1	Dilueurs	Spermatozoïde vivant
Houari		D-C	25%
		D3-T	0%
		D3-1	5%
		D3-2	60%
		D3-3	15%
		D3-4	20%
	EJ2	D-C	60%
		D3-T	30%
		D3-1	10%
		D3-2	50%
		D3-3	50%
		D 3-4	30%
	EJ3	D-C	90%
		D3-T	70%
		D3-1	90%
D3-2		60%	
D3-3		90%	
	D3-4	20%	

Tableau XIV. Taux de viabilité des spermatozoïdes après 3h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 3

Animal 3	Ejaculats	dilueurs	spermatozoïde vivant
Haeltop	EJ1	D-C	70%
		D3-T	40%
		D3-1	50%
		D3-2	60%
		D3-3	50%
		D3-4	50%
	EJ2	D-C	80%
		D3-T	30%
		D3-1	15%
		D3-2	10%
		D3-3	5%
		D3-4	5%
	EJ3	D-C	70%
		D3-T	30%
		D3-1	45%
		D3-2	60%
		D3-3	65%
		D3-4	10%

Tableau XV. La moyenne de viabilité des spermatozoïdes vivant après 3h de réfrigération

dilueur	Animale 1	Animale 2	Animale 3	totale
DC	73,33%	58,33%	66,66%	66 ,10%
D3-T	58.33%	33.33%	33.33%	41.67%
D3-1	31.67%	35%	36.67%	33.33%
D3-2	56.67%	56.67%	43.33%	52.22%
D3-3	40%	51.67%	40%	43.89%
D3-4	25%	23.33%	21.67%	23.33%

II.1 .2 Résultats après 24H

On a laissé le sperme diluer 24h dans le réfrigérateur puis l'étudier avec cryométrie de flux les image sont obtenu par un microscope photonique

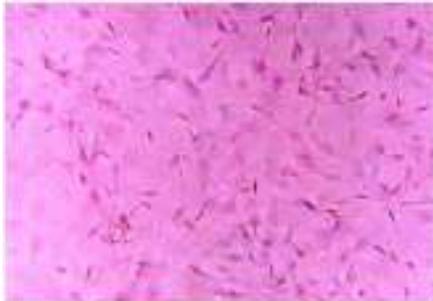
-Ejaculat 3 DC

Figure28. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération



Figure29. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

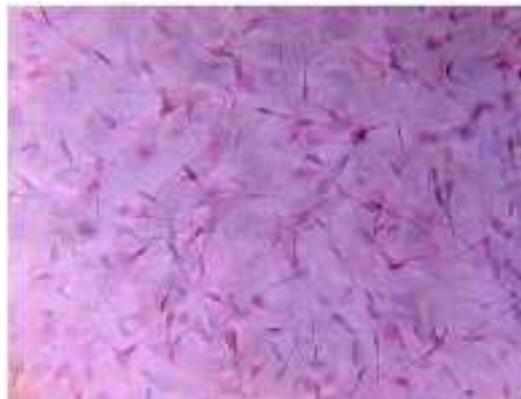


Figure 30. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur DC de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

-Ejaculat 3 D3 temoin

Figure31. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 temoin de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

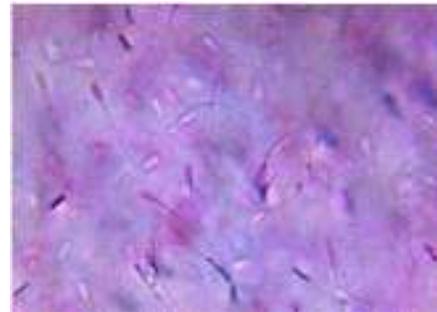


Figure32. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 temoin de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

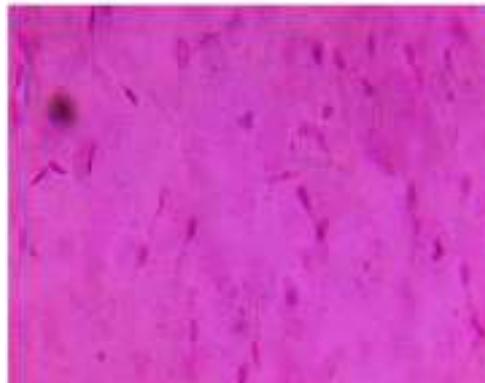
-Ejaculat 3 D3-3

Figure 33. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-3 de l'animal 1 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

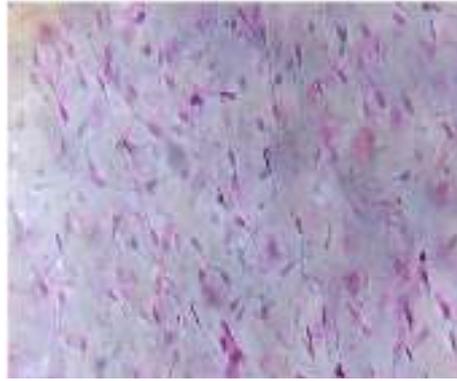


Figure 34. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueurD3-3 de l'animal 3 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

-Ejaculat 3 D3-4

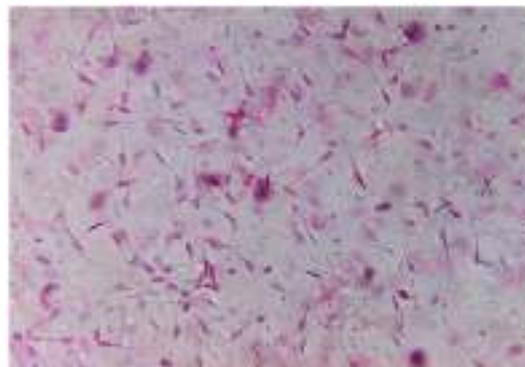


Figure 35. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-4 de l'animal 2 éjaculat 3 après 24h de réfrigération

Tableau XVI.Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 1

Animal 1	Ejaculats	Dilueurs	Spermatozoïde vivant
HEVOL	EJ1	D-C	40%
		D3-T	20%
		D3-1	0%
		D3-2	15%
		D3-3	5%
		D3-4	0%
	EJ2	D-C	20%
		D3-T	0%
		D3-1	0%
		D3-2	0%
		D3-3	0%
		D3-4	0%
	EJ3	D-C	70%
		D3-T	20%
		D3-1	5%
D3-2		10%	
D3-3		10%	
D3-4		10%	

Tableau XVII.Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 2

Animal 2	Ejaculats	Dilueurs	Spermatozoïde vivant
HOUARI	EJ1	D-C	5%
		D3-T	0%
		D3-1	0%
		D3-2	20%
		D3-3	5%
		D3-4	5%
	EJ2	D-C	50%
		D3-T	10%
		D3-1	0%
		D3-2	25%
		D3-3	20%
		D3-4	15%
	EJ3	D-C	80%
		D3-T	20%
		D3-1	5%
D3-2		10%	
D3-3		5%	
D3-4		10%	

Tableau XVIII. Taux de viabilité des spermatozoïdes après 24h de réfrigération pour chaque éjaculat de l'animal 3

Animal 2	Ejaculats	Dilueurs	Spermatozoïde vivant
HEALTOP	EJ1	D-C	50%
		D3-T	1%
		D3-1	0%
		D3-2	15%
		D3-3	1%
		D3-4	5%
	EJ2	D-C	50%
		D3-T	10%
		D3-1	0%
D3-2		25%	
D3-3		20%	
D3-4		15%	
EJ3	D-C	55%	
	D3-T	5%	
	D3-1	30%	
	D3-2	10%	
	D3-3	35%	
	D3-4	5%	

Tableau XIX. La moyenne de viabilité des spermatozoïdes vivant après 24h de réfrigération

dilueur	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Totale
DC	43,33%	45%	51,66%	46,66%
D3-T	13,33%	10%	5,33%	9,55%
D3-1	1,66%	1,66%	10%	4,44%
D3-2	8,33%	18,33%	16,66%	14,44%
D3-3	5%	10%	18,66%	11,22%
D3-4	3,33%	10%	8,33%	7,22%

III. Tests après Ultra-congélation à l'azote liquide

III.1. Résultats des caractéristiques après la décongélation après 30 secondes

Les résultats trouvée pour le sperme diluée dans D1, D2,D4 étai nul après décongélation donc on a poursuit l'études avec le sperme diluer dans D3

-Ejaculat 3 D3 témoin



Figure 36. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 témoin de l'animal 1éjaculat 3 après décongélation

-Ejaculat 3 D3-1



Figure 37. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 1 de l'animal 1éjaculat 3 après décongélation

-Ejaculat3 D3-2



Figure 38. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3 1 de l'animal 1éjaculat 3 après décongélation

-Ejaculat 3 D3-3



Figure 39. Observation de la mobilité avec microscope (Gx40) de sperme dilué par le dilueur D3-3 de l'animal 2éjaculat 3 après décongélation.

Tableau XX. La moyen de viabilité des spermatozoïdes vivant après décongélation

Dilueur	Animale 1	Animale 2	Animale 3	totale
DC	48,33%	46,66%	43,33%	46,10%
D3-T	43,33%	26,66%	11,66%	27,22%
D3-1	23,33%	28,33%	13,33%	21,66%
D3-2	48,33%	45%	15%	36,11%
D3-3	18,33%	40%	20%	26,11%
D3-4	8,33%	6,66%	5%	7%

Conclusion

Nous avons essayé dans notre travail de réaliser un dilueur alternatif à base d'un produit biologique: la gelée royale, connue pour sa richesse nutritionnelle et pour son effet sur la fertilité. Ce produit a subi des dilutions dans des solutions contenant des produits complémentaires et des tampons assurant un milieu favorable pour la survie des spermatozoïdes récoltés à partir des bovins mâles adultes.

Les spermatozoïdes conservés par réfrigération 3h dans le milieu contenant une concentration de 0,40g de gelée royale (D3-2) présentaient une vitalité de 52,22%, ceux conservés dans la concentration de (D3-3) de 0,80g présentaient une vitalité de 43,89% .

Ces résultats sont proches en les comparants de ceux obtenus par le dilueur commercial qui a révélé une vitalité de 66,10% d'un bon milieu alternatifs.

D'une autre part, les résultats obtenus après 24h de réfrigération varient entre 4,44% et 14,44% de viabilité. Ils semblent bien inférieurs en les a comparant avec ceux obtenus par le dilueur commercial qui sont de 46,66%.

Concernant les analyses de décongélation de la semence, le résultat de vitalité obtenu pour le D 3-2 avec 0,40 g de concentration de gelée royal est de 36,11%., celui du dilueur commercial est de 46,10%.

En conclusion, les résultats de vitalité des spermatozoïdes conservés dans le dilueur commerciale et celui à base de différentes concentrations de gelée royale semblent proches, il reste que les pourcentages du premiers sont plus efficaces.

En perspective, il serait intéressant d'utiliser un antibiotique dans le dilueur pour éviter toutes prolifération des bactéries dans le milieu aussi il est intéressant de tester la performance et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes durant les 24h et après décongélation qui sont conservés dans le dillueur alternative par fécondation in vitro ou in vivo par insémination artificiel des vaches afin d'observer la possibilité d'une fécondation réel et pouvoir juger quant à la performance de ce produit.

1. **ADOUE, C., 1991.** Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin : influence de la Durée d'équilibration et de la température de décongélation . thèse Méd .Vét , Alfort .
2. **AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D., 1983.** Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci., 57: 380-403 p.
3. **BARONE, R., 1990.** Anatomie comparée des animaux domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital. Fœtus et Annexes. Péritoine et topographie abdominale. Ed. Vigot, Paris : 951 p.
4. **BARONE, R., 1978** Anatomie comparée des animaux domestiques. Tome 3. Splanchnologie II. Appareil uro-génital. Fœtus et Annexes. Péritoine et topographie abdominale. Ed. Vigot, Paris : 951 p.
5. **Bhakat M., Mohanty T.K., Raina V.S., Gupta A.K., Khan H.M., Mahapatra R.K. et Sarkar, M., 2011.** Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. Tropical Animal Health and Production : 456-459 p.
6. **BONNES G., DESCLAUDE J., DROGOUL C., GADOUD R., JUSSISAU R., LE LOC'H, A., MONTMEAS L., ROBIN G. et al., 2005.** Reproduction des animaux d'élevages. 2 ème Ed. Dijon : Educagri (Ed.): 407 p.
7. **Cabannes C.R., 2008.** Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovines, canine et humaine. Thèse de Doctorat. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.
8. **CHEMINEAU, P., COGNIE, Y. et HEYMAN, Y., 1996.** Maitrise de la reproduction des mammifères d'élevage. INRA Prod. Anim. Vol. 9, n° HS, pp. 5-15.
9. **CHENOWETH P.J., ROBERT S., YOUNGQUIST, WALTER R. et THREFALL., 2007.** Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull in current therapy in large animal, second edition Edition. Theriogenology, 217 p.
10. **CHERBULIEZ ,Th., DOMEREGO, R., 2003.** L'apithérapie Médecine des abeilles. Bruxelles : Amyris, 2003. 255p
11. **CHICOTEAU, P., 1989.** Adaptation physiologique de la fonction sexuelle
12. **COLE H.H, CUPPS P.T., 1959.** Reproduction in domestic animals. First edition. Volume 2. Academic press, New York, 451 p.
13. **COUROT, M., 1962 .** Action des hormones gonadotropes sur le testicule de l'agneau impubère. Réponse particulière de la lignée Sertolienne. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 2 : 157-162.p

14. **DADOUNE. JP et DEMOULIN. A., 2001.** Structure et fonctions du testicule (257-285) - In Reproduction chez les mammifères et l'homme.- Paris : INRA.- 928p.
15. **DERIVAUX J., 1971.** Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège.-Edition Derouaux.-175p
16. **DESJARDINS C., 1978.** Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. J. Anim. Sci., 47: 56-79 p
17. **Dionne J, Castonguay Y, Nadeau P, Desjardins Y., 2001 .** Amino acid and protein changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.)
18. Ecotypes. Crop Sci ; 41: 1862-1870 p
19. **Foote RH, Kaproth MT., 2002 .** Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. J Dairy Sci ; 85: 453-456p.
20. **GERARD O, PONSART, c, P-ETIT M. et HUMBLOT P., 2008.** Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. Rene. Rech. Ruminants 15,351-354 p.
21. **GETTY R., 1975.** The anatomy of the domestic animals. 5e edition, London: W. B. Saunders Company, Vol. 2: 2095 p.
22. **GOFFAUX M., 1986.** Quelques aspects relatifs à la technologie de l'insémination artificielle des bovins. Banques de gènes et technologie de la reproduction bovine. Analyse et perspectives. Coopérative d'amélioration de l'élevage et d'insémination artificielle du Bearn Symposium de PAU 20 juin 1986,55-75
23. **GOOD, N.E, G.D . Winget , W. Winter, T.N . Connolly, S. Izawa and R. M.M.Singh ., 1966.** Hidrogen ion buffers for biological research. Biochemistry 5 : 467- 477 p.
24. **HANZEN C .(2008-2009b).** La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. ORBi Université de Liège, 21 P
25. **HAZEN C., 2009-2010.** Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. ORBI. Université de Liège, 8 P.
26. **Holt WV., 2000.** Fundamental aspect of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology ; 53: 47-58.p
27. <http://www.cia-laigle.com/laboratoire.htm>, page consulté le 12 Septembre 2007
28. <https://books.google.fr/books?id=Ost7PN6plaUC&printsec=frontcover&dq=Précis+d'histo>

29. **JOHNSON L. (1991)**. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. 4th Ed., Academic Press, Inc. San Diego. New York. Boston. London. Sydney. Tokyo: 670 p.
30. **KOLB, E., 1975**. Physiologies des animaux domestiques. Ed. Vigot Frères Paris (Ed.) : 974 p
31. **Kruuv J, Glofcheski DJ., 1992**. Protective effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* ; 29: 291-295 p
32. **LAMINOUE, M. I. (1999)** . L'Amélioration génétique par la biotechnologie de l'insémination artificielle bovine : bilan et perspectives. Thèse : Méd.Vét. : Dakar ; 9 p
33. **LUQUET, F., BERNY, F., BRINCE, G., COURNOT, J., DELAHAYE, J., DES TOUCHES, C., GILBERT, L., GUGGER, R., JARDON, C., LAIDET, M., LECLOUX, J. M., LEIMBACHER, F., MAITRE, C., MANNO, J. M., MARCHAND, G., PERRET, G., PEVRAUD, D., VAN QUACKEBEKE, E., 1978**. L'élevage ovin. Hachette (Ed.): 255p.
34. **MAENPAA PH., 1994b**. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta. Vet. Scand.* 35 (3) 257-62.p
35. **MARTINI ,M.-C., SEILLER, M.(2006)** Actifs et additifs en cosmétologie. 3e édition. Paris : Editions Tec & Doc ; Cachan : Éditions Médicales internationales, 2006. XXVIII-1051 p.
36. **Maxwell W.M. et Watson P.F. (1996)**. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim.Reprod. Sci*, 42 : 55-65 p
37. **Mazur P, Cole KW.(1989)** . Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology* ; 26:1-29 p
38. **MELROSE ,DR et TERNER, C . (1952)** . Pyruvate metabolism and assessment of semen quality. *Proc Soc Exp Biol Med.* Jun; 80(2):298–300
39. **ML, HUHTINEN M, PIRHONEN A, MAENPAA PH. (1994a)** Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. *Theriogenology.* 42 (6) 1043-51. p
40. **NELSON KL, CRICHTON EG, DOTY L, VOLENEC DE et al., 1999**. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology*, 51, 290

41. **NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J., ENGLAND, G. C. W., 2001** . Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics (Theriogenology). 8 th Ed., Saunders Elsevier (Ed.): 868 p
42. **PAREZ, M. et DUPLAN, J.M., 1987** . L'insémination artificielle bovine, ROGER MARION Edition. reproduction et amélioration génétique, Paris, France 256 p.
43. **PLANCHENAULT, D., 1987**. Essai d'amélioration génétique des bovins
44. **Précis d'histologie humaine - Page 592**
45. **Présentation de la coopérative de l'AIGLE**
46. **PRINS G.S., 1998** Semen. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
47. **ROSENBERGER G., 1979** . Appareil génital mâle (324-372) In: « Examen cliniques des bovins ».-Maison Alfort : Edit. du Point Vétérinaire.-526p.
48. **ROSSANT ,A ., DESMOULIERE, A(directeur) ., 2011**. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. 132 p. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges
49. **Rukundo J. (2009)**. Evaluation des résultats de l'insémination artificielle bovine dans le département de Mbour au Sénégal : cas du projet Goana. Thèse de Doctorat. Université cheikh anta diop de dakar.
50. **SETCHELL, B.P. , 1991**. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.) Reproduction in domestic animals. 4th Ed., Academic Press, Inc. San Diego. New York. Boston. London. Sydney. Tokyo: 670 p.
51. **THIBIER M., 1991**. Sélection des taurillons sur leurs performances sexuelles pour l'insémination artificielle. Contracep. Fertil. Sec, 19,9 : 741-748p. In : 30ème Réunion Soc. Française d'Etude de la Fertilité, Paris.
52. **TRAORE, P., 1996**. Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insémination artificielle. Thèse : Méd. Vét. : Rabat (IAV Hassan II)
53. **Upreti G.C., Jensen K., Munday R., Duganzich D.M., Vishwanath R.et Smith J.F.(1998)**. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci.* **51** : 275-287p.

54. **VAISSAIRE, J.P., 1977.** Sexualité et reproduction des mammifères. Maloine S.A. Ed., Paris : 457 p.
55. **Vishwanath R, Shannon P .,(2000).** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reprod Sci 2000; 62: 23-53p.
56. **Wenkoff, M.S., 1987.** The Evaluation of Bulls for Breeding Soundness. CVMA, 1987

Annexes

Annexe I

I. Matériel utilisé

1. Animaux



Figure . les animaux utilisés : (A) HEVOL , (B) HOUARI ,(C) HAELTOP

2. Matériel de collecte

Le vagin artificiel est constitué d'un cylindre en caoutchouc rigide (manchon extérieur), doublé à l'intérieur d'une capote gonflable (manchon intérieur). Il est prolongé d'un cône en silicone (25 cm de long), à l'extrémité duquel sera fixé le tube de collecte. Avant chaque utilisation, les vagins sont maintenus dans un stérilisateur (étuve) réglé à 45°C pendant 48h (Fig 5 A). Cette température ainsi que le temps ont été choisis de telle sorte à avoir une stérilisation optimale sans endommager le caoutchouc les vagins artificiels. Ces derniers ne seront retirés de l'étuve qu'au dernier moment, juste avant leur utilisation (Fig

5 B). L'ensemble du vagin est protégé des chocs mécaniques, thermiques et de la lumière par un manchon opaque et isolant (Fig 5 C). L'eau présente dans la paroi du vagin permet de maintenir une certaine pression et une température d'environ 42°C lors de la collecte. Après utilisation, l'ensemble du vagin sera entièrement démonté pour être lavé, séché et désinfecté.

Pour la récolte du sperme des vagins artificiels (Fig. ???) munis d'un manchon en silicone et un tube gradué sont utilisés un feutre protège-tube de récolte a été utilisé pour protéger le tube de collecte contre les radiations ultra-violetes et les chocs thermiques. Les éjaculats sont maintenus à une température de 37-38° (fig.,D) dans un bain, dans le but de préserver leur vitalité.

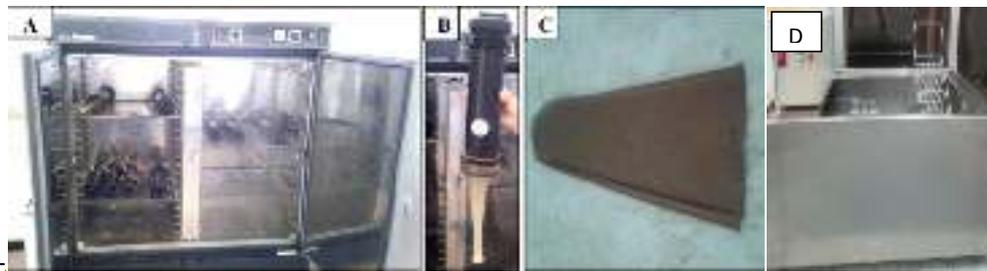


Figure : (A) Stérilisateur, (B) Vagin artificiel (C) Manchon isolant .(D) bain marie

Mis en forme : Police : (Par défaut)
+ Titres CS, 12 pt, Police de script
complexe : + Titres CS, 12 pt

Annexe II

II.2.2 Calcul de la concentration

La concentration des spermatozoïdes de chaque éjaculats et la dilution totale sont reveler par le photomètre ACCUCELL donc on a calculé par la suite le volume de dilueur quand doit ajouté

Tableau 11. Détermine la concentration des spz et la dilution totale pour chaque éjaculat

Animaux	Ejaculats	Concentration de spz	Dilution totale	volume de dilueur quand doit ajoutée
Hevol	EJ1	2091 M /ml	82 ml	480µl
	EJ2	769 M /ml	60 ml	180µL

	EJ3	1690 M /ml	94 ml	396 μ L
Houari	EJ1	1287 M /ml	70 ml	145 μ L
	EJ2	1909 M /ml	117 ml	480 μ L
	EJ3	1249 M /ml	41 ml	200 μ L
Healtop	EJ1	2192 M /ml	197 ml	480 μ L
	EJ2	1320 M /ml	94 ml	200 μ L
	EJ3	2420 M /ml	259 ml	646 μ L

Annexe III

III.Dilution

Dilueur commercial : AndroMed® contient des phospholipides, du TRIS, de l'acide citrique, sucres, des antioxydants, des tampons, le glycérol et l'eau la plus pure.

La version standard contient des antibiotiques selon le Directive CE 88/407

(Tylosin, gentamicine, Spectinomycine, Lincomycin).



AndroMed® CSS ne contient pas d'antibiotiques.

Figure. Dilueur commercial AndroMed®

Annexe IV

IV.1. Calcul de la dilution utilisée

Explication : exemple

Animal 1 , éjaculat 1 :

- Volume 3,5 ml

Les résultats donnés par spectrophotomètre digital

- 82 ml le volume de dilueur quand doit ajoutée

- concentration : 2091 million

Volume totale : $82 + 3,5 = 85,5 \text{ ml}$

85,5 ml \longrightarrow 100%

3,5 ml \longrightarrow X

$X = 4,09$, $X = 4\%$ on aura 4% de semence et 96 % de dilueur

Donc : on va prendre 20 μl de semence

20 μl \longrightarrow 4%

Y \longrightarrow 96%

Y = 480 μl / 480 μl de dilueur ajouté au 20 μl de semence

Annexe V



Figure 13 : colorant éosine et nigrosine

Annexe VI

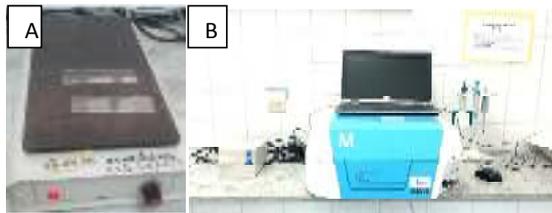


Figure 13 .(A) plaque chauffante (B) Cytomètre en flux (EasyCyte 5HT, IMV)

Annexe VII

Circonférence scrotale

Circonférence scrotale La mesure de la circonférence scrotale chez les jeunes taureaux est une méthode précise servant à évaluer la capacité présente et future du taureau à produire des spermatozoïdes; elle est aussi facile à répéter. La mesure donne une estimation du poids des testicules, ce qui est directement relié au niveau de production de spermatozoïdes. La mesure scrotale est également positivement corrélée avec le volume et la qualité du sperme. Le tableau présente les mesures scrotales minimales recommandées selon la race et l'âge. Les taureaux présentant un développement scrotal adéquat en fonction de leur âge ont une plus forte probabilité de devenir de bons reproducteurs que les taureaux ayant des circonférences scrotales plus petites. (Wenkoff, 1987)

Annexe VIII

VI. La gelée royale



VI.1. Définition

La gelée royale est sécrétée par les glandes pharyngiennes et mandibulaires de jeunes ouvrières nommées nourricières. Elle est en partie dérivée des protéines et des nutriments présents dans le pollen ingéré par les abeilles.

En quelque sorte, elle constitue du pollen prédigéré. C'est la substance centrale de la ruche : elle assure son existence et son fonctionnement. En effet, elle est la nourriture unique et exclusive de toutes les larves pendant leurs trois premiers jours de vie puis de la reine pendant toute son existence (Figure 5) (Rossant, 2011). La reine vit 50 fois plus longtemps qu'une ouvrière et seule l'alimentation due à la gelée royale fait la différence, puisqu'au départ la reine et l'ouvrière sont génétiquement et anatomiquement identiques. Il s'agit là de la notion d'épigénétisme.

VI.1.2. Elaboration de la gelée royale

Les abeilles produisent exclusivement la quantité nécessaire à leurs besoins et ne font pas de réserve comme avec le miel. Il s'agit donc d'un produit noble de production très limitée et de très haute valeur ajoutée.

La technique de production consiste à rendre la ruche orpheline en lui enlevant sa reine pour que les ouvrières élèvent alors une nouvelle reine. On insère dans la ruche des cadres comportant des ébauches de cellules royales artificielles dans lesquelles on dépose de jeunes larves, âgées de 12 à 36 heures, sur une goutte de gelée royale. La plupart d'entre elles sont adoptées et alimentées en gelée royale par les abeilles nourricières. Trois jours plus tard, le cadre est retiré, les larves sont délicatement prélevées, et la gelée royale est récoltée à l'aide d'une spatule de verre, ou avec un petit aspirateur (Cherbuliez et Domerego, 2003). Dès son extraction, elle est conditionnée dans des pots en verre et conservée entre 1 et 5°C. La gelée royale est donc une substance fragile et produite en faible quantité qui demande, de la part de l'apiculteur, un grand savoir-faire, justifiant ainsi un prix élevé.

VI.2.3. Composition chimique de la gelée royale

La composition de la gelée royale est différente suivant qu'elle est destinée aux larves d'abeilles ouvrières ou aux larves de reines et dépend également de la race des abeilles la produisant.

La composition moyenne générale de la gelée royale est décrite dans le tableau ci-dessous (Tab) :

Composition	Pourcentage total	Type de composés	Principaux composants
Eau	57 à 70 % (moyenne 70 %)		
Hydrates de	14 %	Monosaccharides	Glucose et fructose
		Disaccharides	Saccharose, maltose...

carbone		Polysaccharides	Mélibiose, erlose, ribose...
Protides	13 %	Acides aminés (dont les 8 essentiels)	Proline, lysine, leucine, arginine, valine, phénylalanine...
		Peptides	Défensine (la royalisine), apisimine, jelleines I, II, III, IV...
		Protéines	MRJP1, MRJP2, MRJP 3, MRJP4
Lipides	4,5 %	Acides gras	<i>Trans</i> -10-hydroxy-2-décénoïque...
		Stérols	Cholestérol et stigmastérol
		Cires	
		Phospholipides	
		Minéraux	K, Na, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, S, P, N, C...
		Vitamines	B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8 ou H, inositol, B9, (B12, C A, D, E, K)

Substances diverses	2 à 8 %	Enzymes	Glucose-oxydase, ...
		Acétylcholine 1mg/g	
		Hormones (gelée fraîche)	(Estradiol, testostérone, progestérone)