REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mr.GACEM Abdelbasset

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité: **GÉNÉTIQUE ET REPRODUCTION ANIMALE**

THÈME

Etude des paramètres spermatiques :

Comparaison entre la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et spermatozoïdes décongelés

Soutenue publiquement le **12/06/2016**

DEVANT LE JURY

Président	**BENABDELMOUMENE Djilali**	**Maitre de conférences U. Mostaganem**
Encadreur	**FASSIH Aicha**	**Maitre-assistante U. Mostaganem**
Examinateur	**MAZOUZ Mustapha**	**Maitre-assistant U. Mostaganem**

Thème réalisé au Laboratoire du CNIAAG

Remerciements

En ces quelques lignes je tiens à remercier, ***Dieu*** *le tout puissant de m'avoir donné la patience et le courage pour terminer ce travail, et toutes les personnes qui m'ont apporté leurs soutien et leurs aide tous au long de ce travail de mémoire et plus particulièrement :*

La directrice de ce mémoire, ***Mme. FASSIH Aicha****, maître-assistante à l'université de Mostaganem pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

Je souhaite remercier aussi:

Mr. BENABDELMOUMENE Djilali*, maître de conférences à l'université de Mostaganem de bien vouloir accepter la présidence de jury.*

Je tiens à remercier également ***Mr. MAZOUZ Mustapha,*** *maître-assistant à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

Je souhaite ensuite exprimer ma profonde reconnaissance a ***Mr. BOUCHEMAL Alaoua,*** *directeur général du CNIAAG pour son accueil.*

J'exprime ma gratitude a toutes les personnes qui m'ont aidée durant mon parcours, spécialement le personnel du laboratoire du CNIAAG :

Mme.BENOUARETH Hind*,* ***Ahcen, Mouh Akhina, Hadjira, Ami Mouh, Mme Amel, Madame, Khaled, Ziane et H'ssicen***

Pour leurs gentillesses, disponibilité et leurs aides.

Je dédie ce mémoire à :

Celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière...

Mon très cher père

La plus belle créature que Dieu a créée sur terre…

La source de tendresse, de patience et de générosité…

Ma mère !

Ma Chère Sabrina et sa famille

Mes neveux Mohamed Nour et Mimi

Mon Frère Amine, mes sœurs et mon beau-frère Salim

Mes grand parents que Dieu vous protège

Mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines

Mes amis, Youcef, Islem, Billel, Selmane, Abdelhadi, Rahim, Nori, Zake et Adlane

Tous ceux et celles qui de près ou de loin

M'ont aidé, je le leur dédit

Résumé

De nos jours 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 actuellement de la production de semences de différentes espèces. Dans les protocoles de production et de conservation de la semence, un contrôle doit être effectué à différents niveaux afin de garantir une semence de bonne qualité dans laquelle les spermatozoïdes sont en nombre suffisant tout en préservant leur pouvoir fécondant. Selon les moyens disponibles, différentes méthodes peuvent être utilisées. La cytométrie en flux étant l'une des techniques les plus élaborées. En effet, contrairement aux techniques classiques, elle permet de contrôler un nombre de paramètres plus important.

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier deux principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences bovines : la concentration et la viabilité des spermatozoïdes. Pour cela, la concentration de la semence en spermatozoïdes a été évaluée par la méthode : spectrophotométrie et la viabilité a été évaluée par la méthode : cytométrie en flux. Nous avons ensuite effectué une étude comparative de la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et spermatozoïdes décongelés

Mots clés : Semences bovines, spermatozoïde, viabilité, cytométrie en flux, spermatozoïdes réfrigérés, spermatozoïdes décongelés

Sommaire

I. Introduction générale…….. 1

II. Synthèse bibliographique

1. Rappels anatomiques de l'appareil reproducteur du taureau……. 2

2. Physiologiques de l'appareil génital mâle…… 3
2.1. Spermatogenèse…… **3**
2.2. Composition et Emission du sperme…… **4**

3. Amélioration génétique…… 5
3.1. Sélection……... **5**
3.1.1. Sélection sur la performance……...…… **5**
3.1.2. Sélection sur l'ascendance et la descendance…… **5**
3.1.3. Sélection assistée par marqueurs (SAM)…… **6**
3.1.4. Sélection génomique (SG)…… **6**
3.1.5. Sélection assistée par les gènes…… **7**
3.2. Croisement…….. **7**
3.3. Insémination artificielle…… **7**

4. Technologie de la semence…… 7
4.1. Récolte du sperme …… **8**
4.1.1. Récolte au vagin artificiel …… **8**
4.1.2. Electro-éjaculation…… **8**
4.2. Evaluation de la qualité du sperme ……. **9**
4.3. Examens macroscopiques …… **9**
4.4. Volume de l'éjaculat …… **9**
4.5. Couleur du sperme …… **9**
4.6. Viscosité du sperme …… **9**
4.7. Examens microscopiques …… **10**
4.8. Motilité …… **10**
4.8.1. Motilité massale …… **10**
4.8.2. Motilité individuelle …… **11**
4.9. Pourcentage de spermatozoïdes vivants…… **11**
4.10. Morphologie des spermatozoïdes…… **11**
4.11. Analyse du spermogramme …… **12**

5. Préparation et conservation de la semence …… 12
5.1. Principe …… **12**
5.2. Techniques de préparation et conservation de la semence …… **12**
5.3. Dilution …… **12**
5.4. Refroidissement de la semence …… **13**
5.5. Conditionnement de la semence …… **13**

5.6. Conservation …… 13

6. Méthode de contrôle de la qualité de la semence…… 14

6.1. Méthode classique de l'hématimètre…… 15

6.2. Spectrophotométrie…… 15

6.3. Cytométrie en flux…… 15

6.3.1. Principe de la cytométrie de flux…… 15
6.3.2. Exemples des paramètres analysables par le Cytomètre en flux…… 16
6.3.3. Viabilité cellulaire et concentration…… 16
6.3.4. Intégrité de l'acrosome…… 16
6.3.5. Fonction mitochondriale…… 17
6.3.6. Tri des spermatozoïdes au cours de l'amélioration par sexage…… 17

III. Matériels et méthodes

1. Milieu d'étude…… 18

2. Matériel…… 18

2.1. Matériel biologique…… 18
2.2. Matériel de collecte du sperme …… 18
2.3. Matériel d'évaluation du sperme …… 18
2.4. Matériel de dilution du sperme (préparation de la semence) …….. 18
2.5. Matériel de refroidissement et d'équilibration …… 20
2.6. Matériel d'impression des paillettes…… 20
2.7. Matériel de pré-congélation …… 21
2.8. Matériel de congélation et de conservation de la semence …… 21
2.9. Matériel de teste de viabilité…… 21

3. Méthode…… 22

3.1. Collecte du sperme…… 22
3.2. Premier contrôle de la qualité du sperme…… 22

3.2.1.Examen macroscopique…… 22
3.2.2. Examen microscopique…… 22
3.2.3. Calcul de la concentration…… 22
3.2.4. Spectrophotométrie…… 22
3.2.5. Dilution…… 23
3.2.6. Refroidissement et mise en paillettes…… 23
3.2.7. Congélation…….. 23
3.2.8. Deuxième contrôle de qualités de la semence et stockage…… 23
3.2.9. Test de viabilité par le Cytomètre …… 23

IV. Résultats et discussion

1. Résultats…… 25

1.1. Collecte du sperme …….…… **25**

1.2. Spectrophotométrie……..…….. **25**

1.3. Cytométrie en flux…… **26**

1.4. Viabilité des spermatozoïdes réfrigérés…… **26**

1.5. Viabilité des spermatozoïdes décongelés…… **27**

2. Discussion…… 28

V. Conclusion et perspectives…… 30

VI. Références bibliographiques …… 31

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
1	Appareil reproducteur du taureau (THIBIER, 1977).	2
2	Les phases de la spermatogenèse (Vernet, 2006).	3
3	La structure du spermatozoïde (Yaye, 2009)	4
4	Les différentes étapes du clonage positionnel (Bernot, 1999 ; Eggen, 2000).	6
5	Représentation schématique du vagin artificiel (Quint, 2004).	8
6	Les différents types d'anomalies des spermatozoïdes du taureau (Dumont, 1997).	14
7	Principe de fonctionnement du Cytomètre de flux (d'après Robinson, 1999).	16
8	La monte.	18
9	Vagin artificiel.	19
10	Microscope photonique.	19
11	Plaque chauffante, de lames et de lamelles.	19
12	Spectrophotomètre digital (ACCUCEL-IMV).	19
13	Bain-marie 37°	19
14	Diluteur (MICROLAB 500).	19
15	Vitrine réfrigérée.	20
16	Machine de remplissage **e**t de soudage (MRS3).	20
17	Les rampes de congélation.	20
18	Congélateur programmable Digitcool.	21
19	Cytomètre (EasyCyte 5HT, IMV).	21
20	Solution de lavage.	24
21	Mélange de chaque éjaculat avec 199 ul d'eau distillée.	24
22	L'incubation.	24
23	Résultat du test de viabilité obtenu par le Cytomètre en flux.	26
24	Les taux de viabilité des spermatozoïdes réfrigérés des différents taureaux.	27
25	Les taux de viabilité des spermatozoïdes décongelés des différents taureaux.	27

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
1	Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité massale (Rukundo. 2009).	**10**
2	Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.	**11**
3	Résultats des spermiogrammes.	**25**

I. INTRODUCTION GENERALE

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

III. MATERIEL ET METHODES

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction générale

L'amélioration des animaux d'élevage est une préoccupation majeure des éleveurs qui cherchent à sélectionner les meilleurs reproducteurs afin d'obtenir des descendants plus performants et mieux adaptés aux conditions d'élevage **(Colombani, 2012)**. En effet, l'un des objectifs principaux des éleveurs est d'améliorer les performances des animaux d'élevage tel que la quantité et la qualité de lait et de la viande. Ce qui définit des objectifs et des critères qui permettent de répondre aux besoins du consommateur et de l'éleveur **(Ponsart et *al.*, 2014)**. L'amélioration génétique se base, soit sur la sélection du cheptel local et la diffusion des produits sélectionnés afin d'améliorer les races actuellement disponibles tout en conservant les caractères d'origine, ou bien par croisement avec des races exotiques plus performantes par importation de semences congelées **(Bouyer, 2006)**. Dans les années 1950, la sélection a bénéficié des nouvelles techniques de reproduction comme l'insémination artificielle qui est devenue, par la suite, l'outil principal de l'amélioration génétique car elle permet une diffusion large et rapide du progrès génétique.

En Algérie, le bovin est une source importante dans la production de viande et de lait. Pour cela, des efforts sont consentis dans ce sens par des essais d'amélioration génétique de nos races locales, l'importation de races étrangères à grande productivité, l'introduction des biotechnologies animale, notamment l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire. Malgré le fait que l'insémination artificielle ait été introduite en Algérie durant l'époque coloniale, en 1945, son utilisation dans nos élevages reste très limitée malgré les efforts et la maîtrise de la technologie par le CNIAAG **(Laghrour, 2012).**

La production de semence commence par la collecte du sperme **(Kabera, 2008)**. Ensuite les paramètres sémiologiques sont évalués principalement par l'analyse macroscopique de la semence puis par l'analyse microscopique. Une fois la qualité du sperme contrôlée, il peut être utilisé, sous forme fraîche, directement pour l'insémination artificielle, ou bien sous forme réfrigérée, si son utilisation est de courte durée sinon il peut être dilué puis cryoconservé. Une semence cryoconservée peut être maintenue durant plusieurs années **(Rigal, 2008).**

De ce fait, le succès de l'insémination artificielle dépend, en grande partie, de la qualité de la semence utilisée. C'est pourquoi il est important de disposer de techniques analytiques fiables permettant de l'évaluer **(Cabannes, 2008).** L'examen de routine de la semence est un contrôle qui vise à détecter des variations dans les valeurs propres à chaque animal avant d'effectuer la mise en paillettes et la congélation **(Cabannes, 2008).** Par ailleurs, le succès de l'insémination artificielle est fortement lié à la qualité de la congélation de la semence. En effet, durant le processus de congélation-décongélation, divers compartiments biochimiques et anatomiques du spermatozoïde peuvent être lésés altérant la capacité fécondante des spermatozoïdes **(Briand-Amirat et a., 2006).**

Au cours des dix dernières années, différents marqueurs fluorescents ont été développés pour tester les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes. L'interprétation des tests basés sur l'utilisation de ces marqueurs nécessite le recours à des techniques telles que la cytométrie en flux **(Cabannes, 2008).** En effet, c'est l'une des méthodes les plus utilisées actuellement pour la production de paillettes sexées **(Maillard, 2004).** En effet, les éleveurs ont maintenant la possibilité de choisir le sexe de la progéniture grâce à la commercialisation de semence sexée ou par sexage des embryons transférés **(Chevalier, 2011).**

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier deux principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences bovines : la concentration par la spectrophotométrie et la viabilité par la cytométrie en flux. Nous avons ensuite effectué une étude comparative entre la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et décongelés.

1. Rappels anatomiques de l'appareil reproducteur du taureau

L'appareil génital mâle comprend les glandes génitales que sont les testicules, productrices des spermatozoïdes, et les voies spermatiques représentées successivement par l'épididyme, le canal déférent et l'urètre. Des glandes annexes se trouvent associées aux voies spermatiques ainsi que des formations érectiles. L'essentiel du tractus génital mâle se trouve hors de la cavité abdominale : testicules et épididymes dans le scrotum, extrémité pénienne dans la cavité du prépuce. La cavité abdominale héberge les conduits excréteurs des gamètes et des liquides dans lesquelles ceux-ci baignent, ainsi que les glandes annexes génératrices de ces sécrétions. La **Figure 1** illustre les différentes parties de l'appareil reproducteur du taureau.

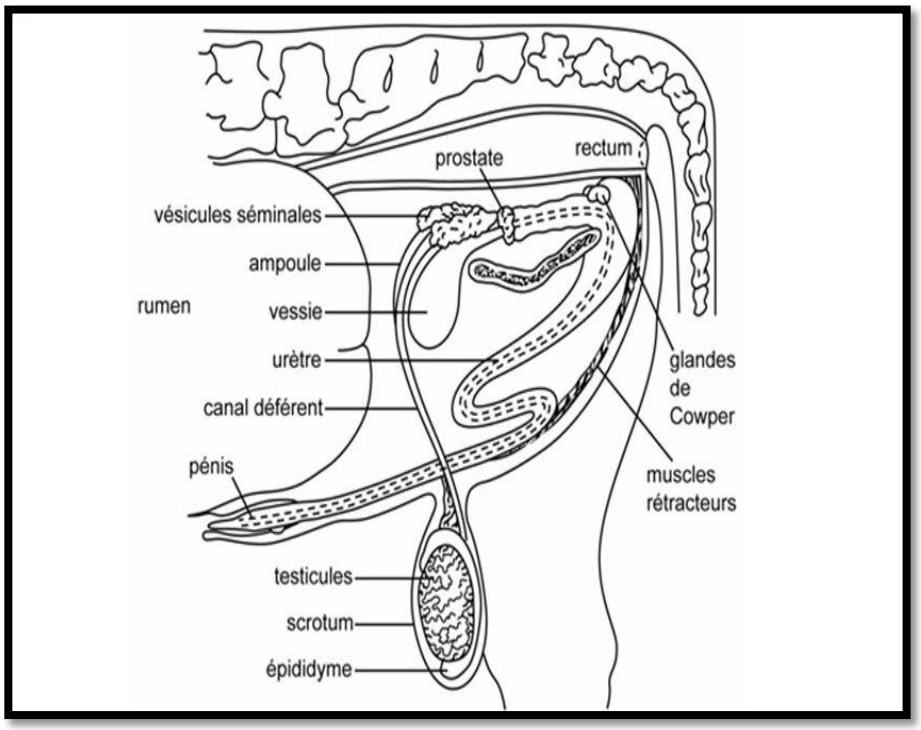


Figure 1 : Appareil reproducteur du taureau **(Thibier, 1977).**

Les tubes séminifères constituent l'unité fonctionnelle des testicules chargées d'élaborer les spermatozoïdes. Le sperme est continuellement produit par les testicules et entreposé dans l'épididyme. La prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper) sécrètent le liquide spermatique. Le canal déférent faisant suite à l'épididyme présente un épaississement appelé ampoule différentielle qui est le lieu de stockage des spermatozoïdes avant l'éjaculation.

Pendant l'accouplement, le pénis sort du fourreau à la suite du déploiement de l'inflexion sigmoïde du pénis en forme de S, les spermatozoïdes sont transportés des testicules jusqu'à l'urètre par le canal déférent et sont expulsés par le pénis.

2. Physiologiques de l'appareil génital mâle

2.1. Spermatogenèse

La production des gamètes est un processus complexe appelé spermatogenèse **(Figure 2)** qui à partir des cellules germinales primordiales, conduit à la formation des cellules très différenciées, les spermatozoïdes. Elle est influencée principalement par la température et l'alimentation.

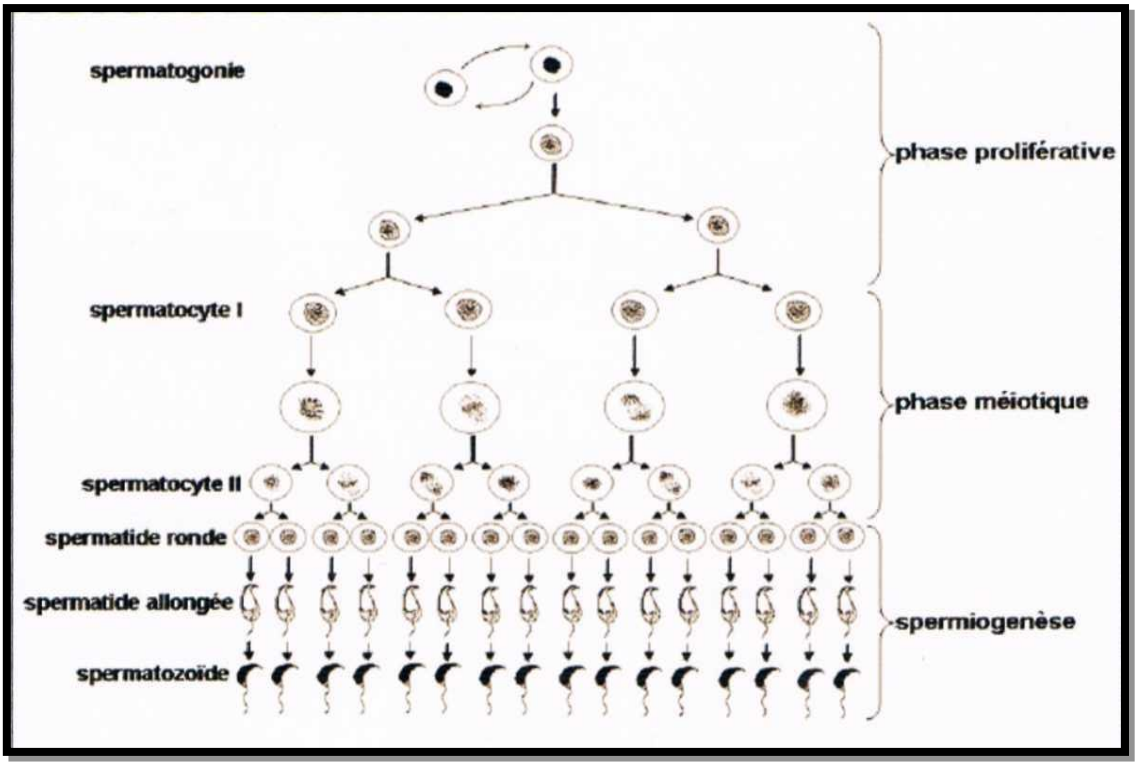


Figure 2 : Les phases de la spermatogenèse **(Vernet, 2006).**

En effet, la température excessive au niveau des testicules entraîne une dégénérescence de la lignée germinale. Chez le jeune, une carence marquée en calories se traduit par une hypoplasie des testicules et des glandes annexes, avec un retard de la puberté. Chez l'adulte, la sous-alimentation en général, la carence en protéines et en vitamine A en particulier, se traduit par un déclin de la libido, une fonte testiculaire une baisse du volume de l'éjaculât et de ses qualités biologiques. L'obésité induit également une détérioration de la spermatogenèse et une baisse de la fertilité du fait de l'accumulation de graisses au niveau du scrotum qui gène la thermorégulation testiculaire. Ainsi, les taureaux reproducteurs doivent être alimentés correctement et collectés durant les moments de fraîcheur.

Les spermatozoïdes **(Figure 3)** sont en suspension dans le liquide spermatique et l'ensemble est appelé « sperme ». Le fructose est la seule source énergétique de leur métabolisme. La pièce intermédiaire constitue la principale zone d'activité métabolique. Le flagelle constitué de fibrilles contractiles joue un rôle moteur. La capacité de motilité (mouvements sans déplacement) des spermatozoïdes est acquise lors du transit épididymaire.

Leur activité métabolique est aérobie dans le milieu extérieur et anaérobie dans le milieu intra-utérin. Leur durée de survie hors des voies génitales mâles est de 24 heures.

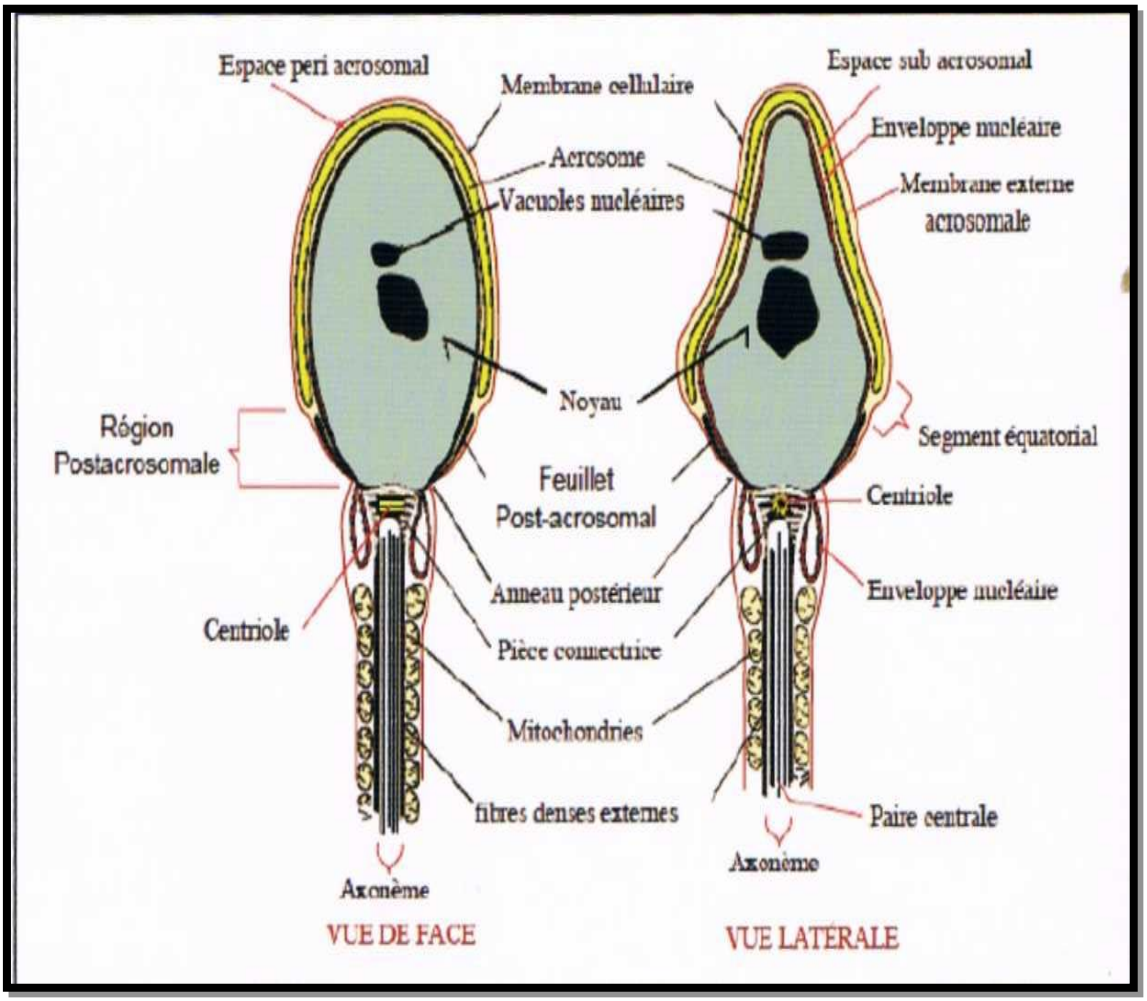


Figure 3: La structure du spermatozoïde **(Yaye, 2009)**

2.2 Composition et Emission 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 sensitives 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.

3. Amélioration génétique

Les études génétiques effectuées sur le génome bovin ont révélé qu'il comprend au minimum 22000 gènes codants **(Elsik et *al,* 2009).** Par ailleurs, certaines études comparatives ont révélé que les chromosomes bovins présentent de grandes régions orthologues avec les chromosomes humains. C'est le cas, par exemple, du chromosome 15 du bœuf qui contient des QTL influençant la qualité de la viande et le chromosome 11 de l'Homme **(Gautier et *al,* 2002 ; Snelling et *al,* 2004)**.

D'autre part, les études cytogénétiques ont montré que certaines anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, telle que la translocation robertsonienne 1:29, peuvent être liées à une baisse de la fertilité **(Gustavsson et Rockborn, 1964 ; Dyrendhal et Gustavsson, 1979 ; Iannuzzi, 2007).** Aussi, la connaissance de la séquence complète du génome du bovin et son annotation est essentielle pour la compréhension du déterminisme et de l'expression des caractères de production, de qualité et d'adaptation. Chez les bovins laitiers, le but de l'amélioration génétique est de produire une vache avec un génotype qui lui permet de produire le plus efficacement possible et de maximiser le profit de l'éleveur tout en considérant les contraintes de l'environnement dans lequel l'animal produit son lait **(Boujenane, 2003).** Cette discipline intègre de nombreux outils comme la génétique des populations, la génétique quantitative, la génétique moléculaire et les biotechnologies de la reproduction **(Antony et *al,* 2002).**

3.1 Sélection

La sélection consiste à choisir les individus qui possèdent le plus haut potentiel héréditaire possible des parents pour les générations suivantes. Un programme de sélection repose sur l'évaluation de la valeur génétique des individus supérieurs et de les utiliser pour la reproduction **(Bouquet, 2006).**

3.1.1 Sélection sur la performance

La sélection sur la performance est une méthode efficace pour les caractères mesurables qui ne nécessite pas de connaître les généalogies. Puisque, la performance d'un animal est la résultante de son potentiel génétique (génotype), mais aussi des conditions d'élevage (environnement). En effet, dans un milieu donné, plus la performance est élevée, plus la valeur génétique est élevée **(Bouquet, 2006).** Ainsi, chez les bovins laitiers, les caractères économiques et morphologiques dépendent de plusieurs gènes dont l'expression peut être influencée par l'environnement **(Tissier, 2009).**

3.1.2 Sélection sur l'ascendance et la descendance

La sélection sur l'ascendance consiste à choisir un reproducteur sur la base de la valeur de ses parents et leur généalogie par contre la sélection sur la descendance consiste à choisir un reproducteur sur la base des performances de ses descendants. Cette méthode

nécessite de produire des descendants puis les évaluer. Elle est donc longue et coûteuse, mais sa précision est très élevée **(Bouquet, 2006 ; Labatut, 2009).**

3.1.3 Sélection assistée par marqueurs (SAM)

Il s'agit d'une stratégie qui utilise l'information des caractères de performances liés à des QTL (Quantitative Trait Loci) **(Eggen, 2000 ; Hayes et Goddard, 2001).** Il existe de nombreux marqueurs, répartis tout le long des chromosomes, servant de repères pour retrouver ces régions. Les plus utilisés actuellement sont les microsatellites (séquence d'ADN formée par une répétition en tandem de 1 à 10 pb) et les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) **(Lu et al, 2013; Utsunomiya et al, 2013).**

Chez le bovin de nombreux QTL en relation avec des performances à intérêt économique ont été cartographiés**.** Les estimations des effets de QTL sont réalisées désormais dans l'ensemble de la population bovine. Elles permettent d'évaluer, avec la même précision, tout individu portant le même haplotype (un groupe d'allèles de différents gènes situés sur un même chromosome), indépendamment de son origine **(Fritz et al., 2008) (Figure 4).**

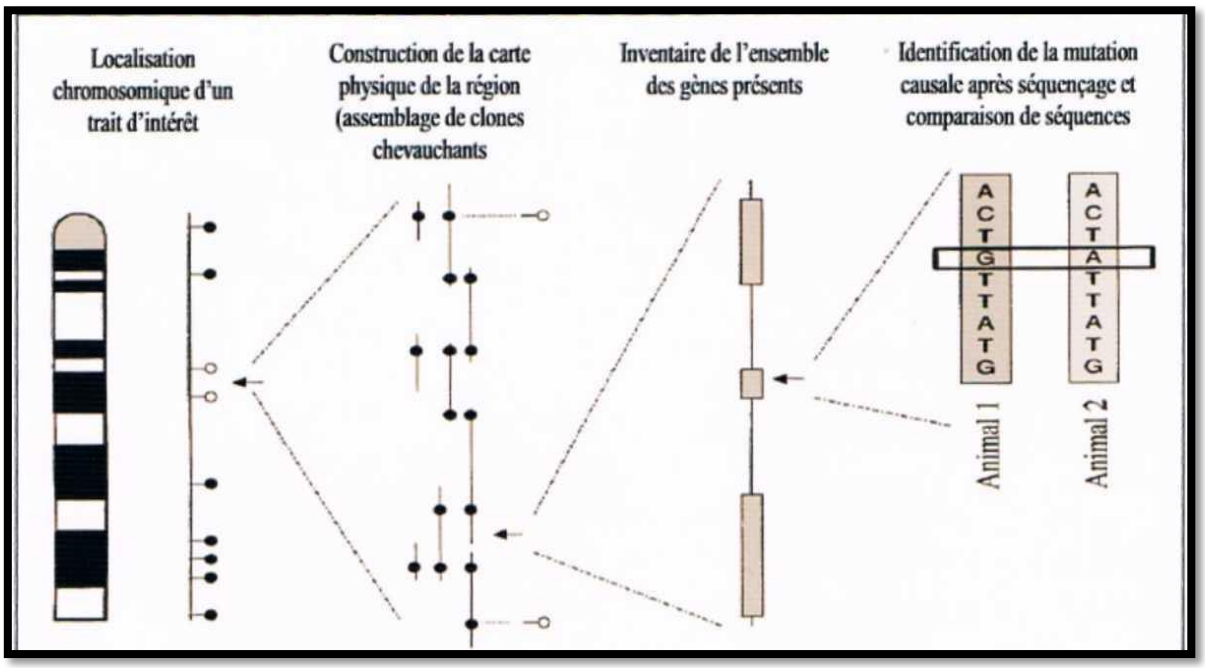


Figure 4 : Les différentes étapes du clonage positionnel **(Eggen, 2000).**

3.1.4 Sélection génomique (SG)

Ce type de sélection consiste à estimer le niveau génétique global d'un animal à l'aide d'un modèle statistique de prédiction, n'utilisant pas l'information des QTL. Cette approche met au point des analyses par balayage du génome entier au moyen d'une puce à ADN identifiant d'infimes parcelles d'information génétique appelées SNP. Cette stratégie permet de prédire, avec précision, la valeur génétique d'un animal dès sa naissance **(Herpin, 2009).**

3.1.5 Sélection assistée par les gènes

Ce type de sélection est basé sur les études de génomique comparative en recherchant dans le génome bovin des gènes d'intérêt dits « candidats » qui sont déjà connus dans le génome d'autres espèces pour leurs effets sur le métabolisme **(Jussiau et *al,* 2006).**

3.2 Croisement

Le croisement est une méthode d'amélioration génétique. Il peut être utilisé pour modifier une race locale en améliorant sa valeur génétique ou pour créer une nouvelle race (race synthétique), qui combine les caractères d'intérêt de deux races **(Bouquet, 2006).** Le croisement présente des avantages provenant de deux composants principaux, l'hétérosis (croisement inter-race visant à atténuer la consanguinité) et la complémentarité (consiste à regrouper plusieurs caractères chez le même individu). Pour optimiser les avantages du croisement, il faut utiliser un système performant de sélection afin d'identifier les animaux reproducteurs qui ont une valeur génétique supérieure **(Bertrand, 2006).**

3.3 Insémination artificielle

L'insémination artificielle est la technique dans laquelle le sperme avec les spermatozoïdes vivants est recueilli par le mâle et introduit dans tractus génital féminin au bon moment à l'aide d'instruments. Ceci a été trouvé pour résultat une descendance normale. Dans ce processus, le sperme est inséminé dans la femelle en plaçant une partie de celui-ci soit dans une forme collectées ou dilué dans le col ou de l'utérus par des méthodes mécaniques au bon moment et dans la plupart des conditions d'hygiène.

Les expériences ont montré que le pouvoir fertilisant des spermatozoïdes résident dans, et non dans la partie liquide du sperme. (La première recherche scientifique dans l'insémination artificielle des animaux domestiques a été réalisée sur des chiens en 1780 par le savant italien, Lazanno Spalbanzani).L'insémination artificielle est non seulement un nouveau procédé d'imprégnation provoqué chez les femelles. Au lieu de cela, il est un outil puissant pour la plupart employés pour l'amélioration du bétail.

Dans l'insémination artificielle du matériel génétique des taureaux de qualité supérieure peut être utilisée efficacement avec le moindre égard pour leur emplacement dans des lieux éloignés. Par l'adoption de l'insémination artificielle, il y aurait une réduction considérable dans les deux maladies génitales et non génitales dans le cheptel de la ferme.

4 Technologie de la semence

La semence est obtenue après récolte du sperme, examen, dilution, conditionnement et conservation.

4.1 Récolte du sperme

La récolte du sperme est un procédé par lequel on obtient le sperme sur l'animal vivant. La récolte ne se fait que sur des animaux sains, reconnus indemnes vis-à-vis de certaines infections.**).** Il existe plusieurs méthodes de collecte dont les plus utilisées sont le vagin artificiel et l'électro-éjaculateur **(Parez et Duplan, 1987)**. Le vagin artificiel est un dispositif qui reproduit les conditions des voies génitales femelles. Il est constitué d'un cylindre en caoutchouc rigide doublé à l'intérieur d'une capote **(Gérard et Khirredine, 2002) (Figure 5).** Chez le bovin, le sperme des taureaux est le plus souvent collecté au vagin artificiel.

4.1.1 Récolte au vagin artificiel

La récolte au vagin artificiel est la méthode la plus couramment utilisée sur le terrain. Le vagin artificiel simule les conditions naturelles offertes par le vagin de la vache.

Le principe est de rassembler dans un appareil simple et pratique les conditions naturelles présentées par les voies génitales de la vache au moment du coït et de recueillir rapidement un éjaculat total et non souillé **(Derivaux, 1971).** Le vagin artificiel est un assemblage de quatre pièces:

- le corps du vagin (manchon cylindrique rigide) muni d'un orifice à valve par lequel on peut introduire de l'eau tiède ou l'air : 35 cm de longueur et 7,5 cm de largeur.
- le manchon interne en caoutchouc souple. Entre le manchon et le corps, la température de l'eau et la pression de l'air sont réglées à 38°C.
- le cône : permet de relier le corps du vagin artificiel au tube gradué.
- le tube gradué pour l'appréciation de la quantité de sperme récoltée.

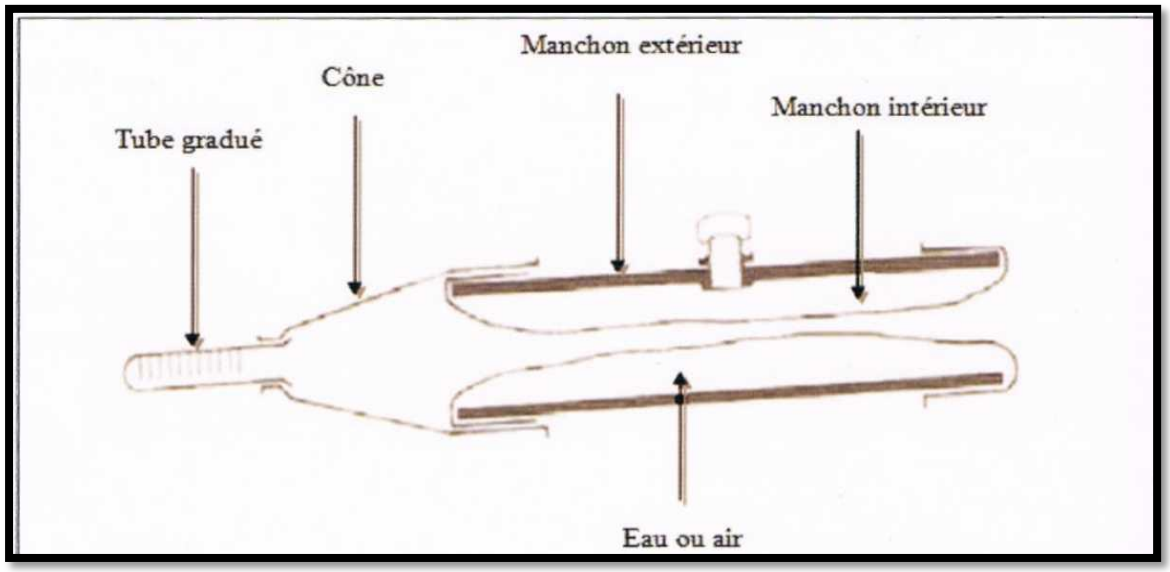


Figure 5: Représentation schématique du vagin artificiel **(Quint, 2004).**

4.1.2 Electro-éjaculation

L'électro-éjaculation s'accomplit par stimulation électrique des muscles lisses de l'ampoule et du canal déférent à l'aide d'une sonde intra-rectale et d'une source électrique avec contrôle de la tension. Elle permet d'obtenir le prélèvement de sperme à partir du taureau sans intervention des mécanismes normaux, sensoriels et psychiques de l'éjaculation.

Après contention de l'animal, l'électrode lubrifiée est introduite dans son rectum vidé au préalable. Puis, une série de stimulations répétées est appliquée au rectum, en augmentant progressivement l'intensité selon les instructions du fabriquant jusqu'à l'érection complète et l'éjaculation de l'animal. Le sperme est recueilli par un appareil de récolte.

Les éjaculats recueillis par électro-éjaculation sont généralement d'un volume plus important et d'une concentration plus faible en spermatozoïdes que ceux recueillis parle vagin artificiel **(Salisbury et Vandermark, 1961).**

Cependant, le nombre total de spermatozoïdes, le pouvoir fertilisant et l'aptitude à la congélation ne semblent pas être affectés **(Haskouri, 2001).**

L'utilisation de l'électro-éjaculation même durant une longue période (plus d'une année) n'a aucun effet néfaste sur la santé et sur la fertilité de l'animal **(Haskouri, 2001).**

4.2 Evaluation de la qualité du sperme

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques, physico-chimiques et biochimiques.

4.3 Examens macroscopiques

Ils ont pour but d'apprécier le volume de l'éjaculat, sa couleur et sa viscosité.

4.4 Volume de l'éjaculat

Le volume de l'éjaculat est lu sur le tube de collecte gradué. Ce volume varie de 0,5 à 14 ml, en fonction de l'âge, la race, l'alimentation, l'état de santé, les conditions de récolte ainsi que de la fréquence de récolte. Le volume moyen est de 6 ml chez un taureau adulte, tandis qu'il est de l'ordre de 2 ml chez le jeune.

4.5 Couleur du sperme

Chez le taureau, la couleur normale du sperme est dans la plupart des cas ivoire-crème ou blanc-laiteux, blanc-jaunâtre (en fonction de la concentration de spermatozoïdes). La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant **(Ezekwe, 1988).** L'aspect est généralement homogène et crémeux **(Djabakou et all., 1984).**
Le sperme pathologique peut avoir, selon les cas, une couleur brunâtre, rosée, bleuâtre, jaunâtre, rougeâtre ou grisâtre.

4.6 Viscosité du sperme

Elle traduit la consistance du sperme et en même temps sa concentration en spermatozoïdes. Une bonne viscosité est probablement synonyme d'une bonne concentration en spermatozoïdes.

4.7 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.

4.8 Motilité

C'est un élément d'appréciation de la vie ou de la mort des spermatozoïdes et de leur niveau de vivacité. Elle peut porter sur la semence globale après récolte (motilité massale et motilité individuelle) ou sur la semence diluée en s'intéressant aux spermatozoïdes individualisés (motilité individuelle).

4.8.1 Motilité massale

Elle s'apprécie au microscope au grossissement x10**.** A 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. L'exigence minimale pour un éjaculat correspond.

Un bon mouvement de masse qui doit être tourbillonnant (environ 60% de spermatozoïdes mobiles) **(Tableau 1)**.

Tableau 1:Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité massale **(Rukundo. 2009).**

	Note	Observation
Motilité massale	70% excellente	Pourcentage important de Spermatozoïdes, vagues noires et denses
	65% acceptable	Pourcentage moins important de Spermatozoïdes, vagues moins denses
	< 65 % à éliminer	Faible taux de Spermatozoïdes, vagues plus claires jusqu'à absence total
Vitesse	40 excellente	Vitesse des vagues très importantes
	35 acceptable	Vitesse des vagues importante
	<35 à éliminer	Vitesse des Spermatozoïdes est moins importante ou nulle

4.8.2 Motilité individuelle

Elle s'apprécie au microscope au grossissement x40**.** C'est l'appréciation du mouvement des spermatozoïdes par leur déplacement à travers le champ microscopique. Les mouvements normaux des spermatozoïdes sont oscillatoires et progressifs. Ce test se réalise sur du sperme dilué à 1/10 de sérum physiologique. Un bon sperme doit avoir au moins 60 à 70 % de spermatozoïdes vivants **(Tableau 2).**

Tableau 2 : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

Critères	Note
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

4.9 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.

4.10 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.

4.11 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) :**

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

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

5 Préparation et conservation de la semence

5.1 Principe

La semence est le sperme préparé (dilué - conditionné - conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. En effet, un éjaculat contient un nombre de spermatozoïdes supérieur à ce qui est requis pour une insémination. Selon plusieurs auteurs rapportés par **Traore (1996),** au moment de l'insémination, une paillette doit contenir au minimum 8-10 millions de spermatozoïdes mobiles après dégel. Selon le même auteur, il a été admis qu'une paillette de semence bovine doit contenir au moins 15 à 20.10^6 spermatozoïdes avant congélation. Prenant en compte les pertes liées à la congélation et à la décongélation, certains auteurs préconisent la concentration de 30 à 40. 10^6 spermatozoïdes par dose au conditionnement.

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

5.2 Techniques de préparation et conservation de la semence

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

5.3 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 sont à base de lait préchauffé, écrémé et dont le pouvoir protecteur est accru avec addition de 10% de jaune d'œuf de poule et d'antibiotique, ou à base de solution de citrate de sodium (2,9%) additionné au jaune d'œuf (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 spermatozoïdes souhaitée dans la dose de semence, du volume et de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat prélevé.

5.4 Refroidissement de la semence

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à +4°C. Le métabolisme des spermatozoïdes est ainsi réduit. Le refroidissement peut se faire pendant ou après la dilution.

La vitesse de refroidissement doit être rapide pour réduire au maximum la durée du passage dans la zone critique de température mais aussi suffisamment lente pour éviter le choc thermique. La température de +4°C est obtenue après un refroidissement progressif en une heure 30 minutes, maximum dans une vitrine réfrigérée.

5.5 Conditionnement de la semence

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

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

5.6 Conservation

La conservation est fonction du mode d'utilisation de la semence. Ainsi :

- Pour une utilisation directe, les semences en paillettes sont maintenues dans un bain-marie (thermos) à la température de 36-38°C ;
- Pour une utilisation de la semence dans 24 à 48 h, la semence peut se conserver au frais. Les dilueurs utilisés permettent la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes à +4°C pendant 46 à 72 heures ;
- pour une utilisation à long terme, après le conditionnement, la conservation de la semence se fait dans une bonbonne contenant de l'azote liquide à – 196°C.

La congélation est progressive et peut se faire à l'aide de machines spécialisées ou de façon manuelle. Les paillettes sont d'abord congelées à -140°C au-dessus d'une vapeur d'azote liquide pendant 9 minutes, puis plonger dans l'azote liquide.

Après quelques jours, un test de congélabilité de la semence est réalisé avant sa conservation. C'est un test de vitalité des spermatozoïdes après décongélation renvoyant à

l'examen de motilité individuelle. Si la semence présente une bonne congélabilité, elle est retenue.

6. Méthode de contrôle de la qualité de la semence

Afin de garantir une semence de bonne qualité, un contrôle doit être effectué avant et après congélation des paillettes. Le procédé initial utilisé dans la plupart des centres de production de semences consiste à estimer la concentration de la semence en spermatozoïdes par un hémocytomètre ou par un spectrophotomètre mais aussi à estimer la viabilité des spermatozoïdes par la méthode classique de la coloration éosine/nigrosine (Donoghue et *al*, 1996) **(Figure 6)**. Cependant, des méthodes plus élaborées, telles que la cytométrie en flux, sont actuellement utilisées et permettent d'analyser un nombre plus important de paramètres liés à la concentration ainsi qu'à la viabilité des spermatozoïdes **(Fernândez-Gago et all., 2013).**

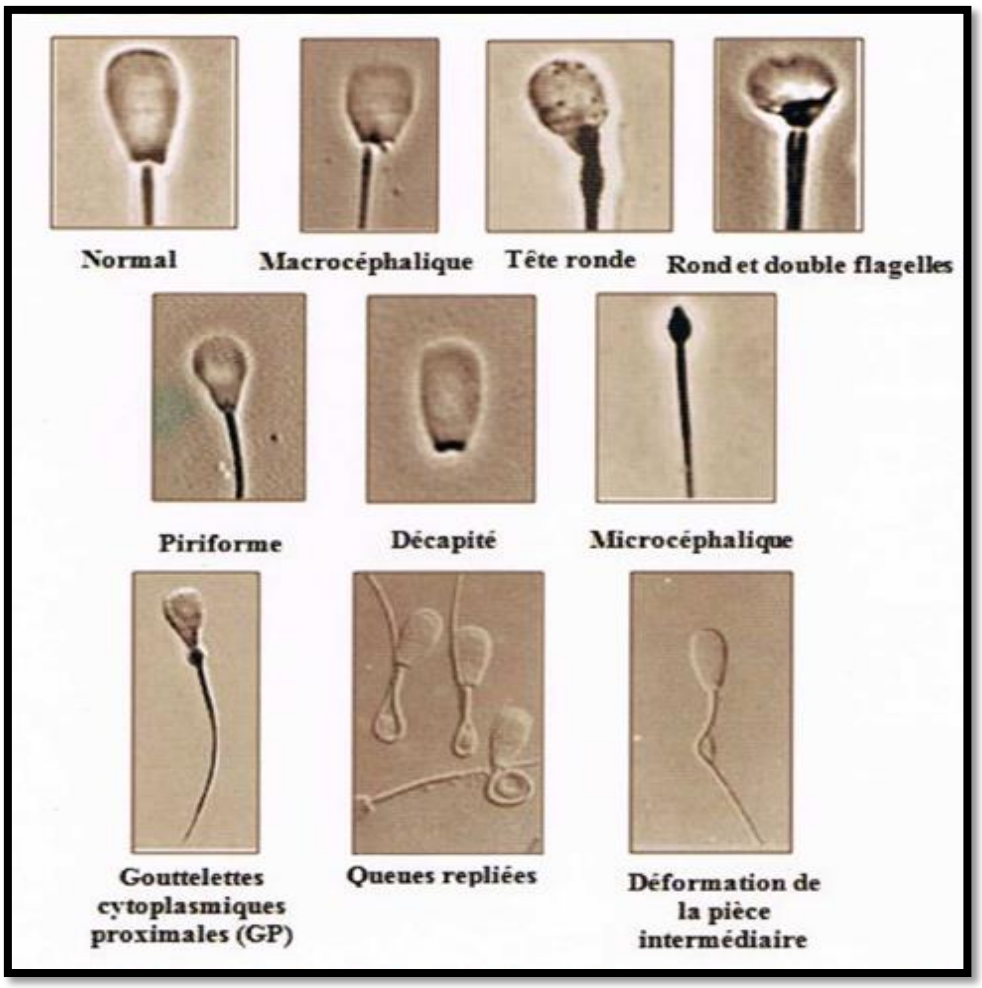


Figure 6 : Les différents types d'anomalies des spermatozoïdes du taureau **(Dumont, 1997).**

5.7 Méthode classique de l'hématimètre

La mesure de la concentration est réalisée par un comptage, à l'œil nu, des spermatozoïdes en utilisant un hématimètre (cellule de Thomas ou de Malassez). Cette méthode est considérée comme la méthode de référence **(OMS, 1999).** En effet, il s'agit de la méthode la plus ancienne et a été longtemps utilisée aussi bien dans les centres de production que dans le diagnostic des troubles de fertilité chez l'Homme **(Kumar et al., 2012).**

5.8 Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est couramment utilisée, dans la plupart des laboratoires d'insémination artificielle à travers le monde, afin d'estimer le nombre de spermatozoïdes **(Hansen et *al*., 2002).** Contrairement à d'autres méthodes qui évaluent la matière particulaire, la spectrophotométrie utilise une procédure d'estimation de la couleur des solutions fournies **(Parathalingam et *al*., 2006).** En effet, elle est basée sur la mesure de l'absorption d'un flux lumineux à travers le sperme dilué à une longueur d'onde de 535 nm. Le rapport de la densité optique finale sur la densité optique émise est corrélé à la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon considéré **(Cabannes, 2008).**

5.9 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative des particules en suspension dans un liquide **(Ronot et al., 2006).**

5.9.1 Principe de la cytométrie en flux

Dans le cytométrie en flux, Les cellules sont aspirées par un système de pompe, puis envoyées une à une devant un faisceau laser qui permet de les mesurer ou d'évaluer certains paramètres cellulaires. Les signaux relatifs aux propriétés optiques intrinsèques de la particule analysée ou à sa fluorescence sont séparés par des filtres optiques (filtres dichroïques) et collectés par des photo-multiplicateurs (PMT). Ces informations sont transmises à un ordinateur qui les transcrit. La lumière diffractée mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre FSC). La lumière diffractée, mesurée à 90° (paramètre SSC) donne une mesure de la granulosité de la cellule, c'est-à-dire de la complexité interne de la cellule considérée. L'utilisation de fluorochromes (colorantsfluorescents) permet de détecter, de manière spécifique, la présence de certaines molécules, le fluorochrome est choisi en fonction du marqueur à mettre en évidence **(Cabannes, 2008) (Figure7).** Depuis quelques années, une nouvelle génération de cytométres aux performances nettement accrues a relancé l'intérêt envers une nouvelle technologie de séparation des cellules selon leur taille ou leur contenu**.**

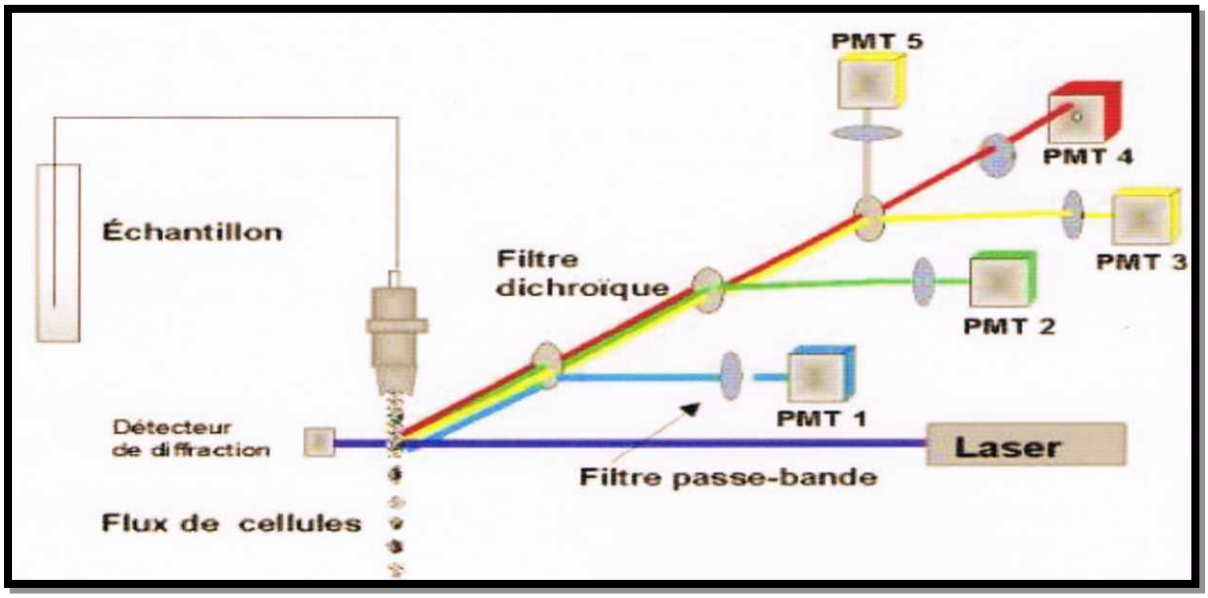


Figure 7 : Principe de fonctionnement du Cytomètre de flux **(Robinson, 1999).**

5.9.2 Exemples des paramètres analysables par le Cytomètre

Les procédures de la cytométrie en flux actuelles ont été développées pour évaluer simultanément plusieurs paramètres: la concentration et la viabilité cellulaire des spermatozoïdes, l'intégrité de l'acrosome et la fonction mitochondriale.

5.9.3 Viabilité cellulaire et concentration

Un spermatozoïde viable est défini comme une cellule qui possède une membrane plasmique intacte. Cet attribut est évalué par la coloration d'un échantillon de sperme avec l'iodure de propidium (PI), une sonde fluorescente qui se lie à l'ADN. En effet, le PI se lie sélectivement et quantitativement au niveau de la structure poly nucléotidique en double hélice en s'intercalant entre les paires de bases des acides nucléiques **(Le Pecq et Paoletti, 1967).**

Une membrane plasmique intacte, empêche la pénétration du PI à l'intérieur de la cellule, contrairement à une membrane endommagée. Dès qu'il pénètre dans la cellule, le PI se lie à l'ADN, ce qui provoque l'apparition d'une fuorescence rouge dans les cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Par contre, aucune fluorescence n'apparait dans les cellules dont la membrane plasmique est intacte **(Graham et al., 1990 ; Wilhelm et al., 1996).** L'utilisation du PI permet aussi de déterminer la concentration en spermatozoïdes en même temps que l'évaluation de la viabilité **(Eustache et al., 2001).**

5.9.4 Intégrité de l'acrosome

L'intégrité de l'acrosome peut être mesurée en utilisant des lectines végétales liées à la fluorescéine isothyocyanate (FITC), par exemple, la Peanut Agglutinin (FITC-PNA) ou la Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA). Ces lectines se lient de façon spécifique à des

composés glycosylés de la membrane acrosomiale externe. Si l'acrosome est intact, cette liaison engendre une fluorescence très nette de la région acrosomiale, alors qu'aucune fluorescence n'apparaît en cas où l'acrosome est endommagé **(Cheng et al., 1996).**

5.9.5 Fonction mitochondriale

La fonction mitochondriale est évaluée par l'utilisation d'un colorant JC-1 (Mitochondrial Membrane Potential Probe), qui émet une fluorescence verte. Ce colorant est utilisé pour séparer les spermatozoïdes possédant des mitochondries mal fonctionnelles des spermatozoïdes possédant des mitochondries fortement fonctionnelles. En effet, le JC-1 est transporté à l'intérieur des mitochondries fonctionnelles, sa concentration augmente et forme un agrégat qui a une fluorescence orange. Donc, Y émission d'une fluorescence verte indique que les spermatozoïdes possèdent des mitochondries mal fonctionnelles, par contre la fluorescence orange révèle que les spermatozoïdes possèdent des mitochondries fonctionnelles **(Thomas et al., 1998).**

5.9.6 Tri des spermatozoïdes au cours de l'amélioration par sexage

Au cours de la méiose, le nombre de chromosomes passe de 2n à n. Les spermatozoïdes possèdent donc un seul chromosome de chaque paire originale. Dans le cas des chromosomes sexuels, ils possèdent soit le chromosome X, soit le chromosome Y. Le chromosome X ayant une taille supérieure à celle du chromosome Y, son contenu en ADN est supérieur à celui du spermatozoïde Y. Les spermatozoïdes X des bovins contiennent environ 3,8% de quantité d'ADN en plus par rapport aux spermatozoïdes Y **(Peters et Bail, 2004).**

De ce fait, le tri de la semence des principales espèces domestiques est techniquement réalisable en séparant les spermatozoïdes en fonction de leur contenu en ADN par cytométrie en flux **(Dmart et Ribeiro Bento, 2004).** C'est la méthode utilisée actuellement pour la production de paillettes sexées **(Chevalier, 2011).**

Le principe de cette technique est basée sur la coloration précise de l'ADN des spermatozoïdes avec du Hoechst 33342 (fluorophore spécifique aux acides nucléiques), pour différencier les sous-populations des spermatozoïdes X et Y **(Duane et al., 2013).** En effet, lorsque le Hoechst est lié à l'ADN et est excité par une lumière ultra-violette, il émet une fluorescence bleue. L'intensité de fluorescence émise par un spermatozoïde marqué au Hoechst et excité par un faisceau UV est directement proportionnelle à son contenu en ADN. La quantité de fluorescence émise par un spermatozoïde X bovin sera donc supérieure de 3,8 % à celle émise par un spermatozoïde Y. Des capteurs mesurent, ensuite, avec précision la quantité de fluorescence émise et assignent des charges électriques positives ou négatives à chaque microgouttelette contenant, chacune, un spermatozoïde. Ensuite, des plaques de métal chargées électriquement (champ magnétique) trient l'échantillon en trois flux. Les particules chargées positivement correspondant à un sexe sont déviées dans une direction, les particules chargées négativement correspondant au sexe opposé sont déviées dans une autre direction, tandis que les particules non chargées, contenant éventuellement plus d'un spermatozoïde par microgouttelette, les spermatozoïdes dont le sexe n'a pas été identifié ou les spermatozoïdes morts ou déficients **(Hamano, 2007).**

1. Milieu d'étude

Centre Nationale de l'insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique (CNIAAG) situé à BABA ALI Daïra de BIROUTA.

2. Matériel

2.1.Matériel biologique

Durant mon stage j'ai assisté à une seule collecte de sperme effectué sur 5 taureaux appartenant à 3 races différentes: Pie Rouge Holstein (PRH), Montbéliarde (MO), Fleckvieh **(Figure 8).**

Figure 8 : La monte.

2.2. Matériel de collecte du sperme

Il comprend le vagin artificiel, les manchons de protection (contre les rayons ultra-violets) pour tube et cône et le taureau boute-en-train **(Figure 9).**

2.3.Matériel d'évaluation du sperme

Il est constitué de microscope photonique **(Figure 10)**, de plaque chauffante, de lames et de lamelles **(Figure 11)**, de spectrophotomètre digital **ACCUCEL-IMV (Figure 12)** et de bain-marie réglé à 37° **(Figue 13)**.

2.4. Matériel de dilution du sperme (préparation de la semence)

Dans l'étape de dilution j'ai utilisé le diluteur **(MICROLAB 500) (Figure 14)** ainsi que le dilueur (OPTIXCELL) qui est composé d'eau distillée, de fructose, de glycérol et de phospholipides végétaux (jouant le rôle de cryoprotecteurs), d'acide citrique (jouant le rôle d'un tampon), d'antibiotiques (tylosine, gentamicine, spectinomycine, lincomycine), de vitamines et d'antioxydants.

Figure 9 : Vagin artificiel

Figure 10 : Microscope Photonique

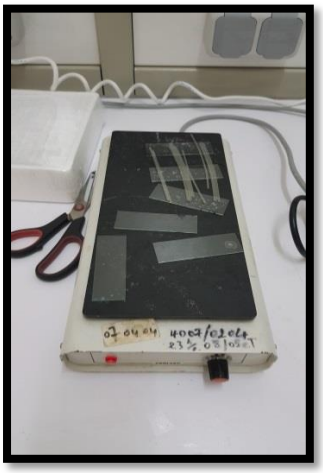


Figure 11 : plaque chauffante, de lames et de lamelles

Figure 12 : Spectrophotomètre digital (**ACCUCEL-IMV).**

Figure 13 : Bain-marie 37°

Figure 14 : Diluteur **(MICROLAB 500)**.

2.5.Matériel de refroidissement et d'équilibration

Il comprend une vitrine réfrigérée, et un thermomètre **(Figure 15).**

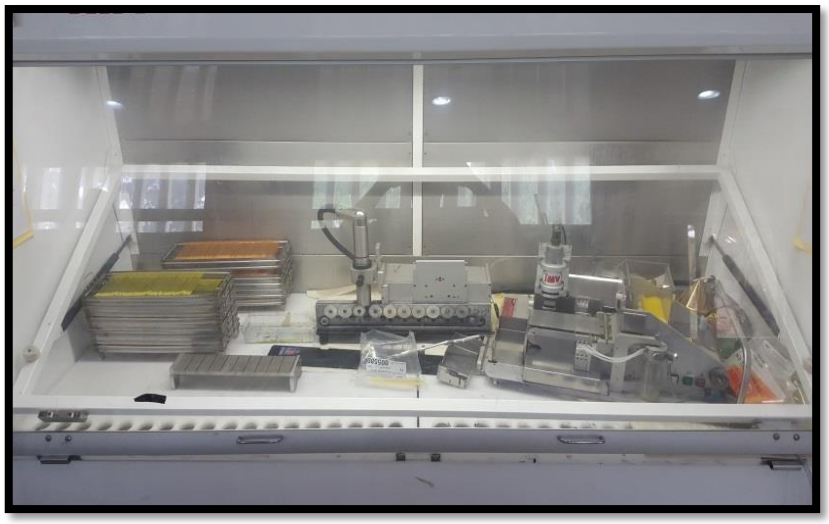


Figure 15 : Vitrine réfrigérée.

2.6.Matériel d'impression des paillettes

On utilise des paillettes fines, d'un diamètre de 2 mm et d'un volume de 0.25 ml, et pour Le remplissage, l'impression (nom du taureau, son numéro d'identification, la date de collecte et l'indentification du centre d'insémination) et soudage des paillettes on utilise une machine de remplissage et de soudage (MRS3) **(Figure 16)** et des rampes de congélation (à raison de 100 paillettes par rampe) **(Figure 17).**

Figure 16: Machine de remplissage Et de soudage (MRS3).

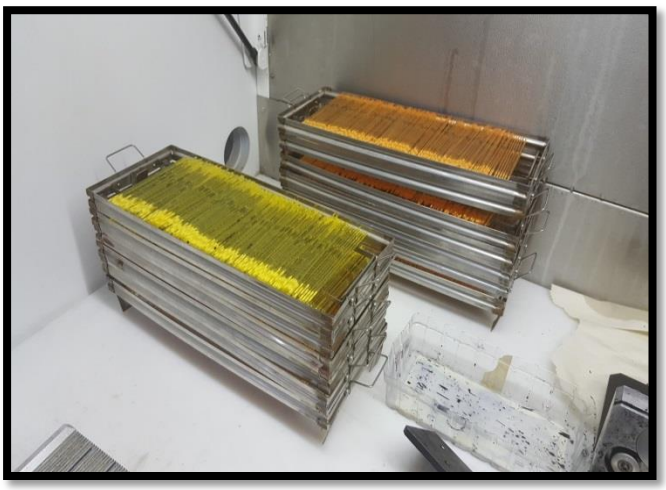


Figure 17 : les rampes de congélation.

2.7. Matériel de pré-congélation

Il comprend un congélateur programmable Digitcool couplé à un tank d'azote liquide (congélation verticale), un ordinateur couplé à une boîte de commande et des rampes pour contenir les paillettes conditionnées **(Figure 18)**.

Figure 18 : congélateur programmable Digitcool.

2.8. Matériel de congélation et de conservation de la semence

La congélation s'effectue dans une cuve (digit cool) ensuite dans l'azote liquide à -196°C

2.9. Matériel de teste de viabilité

C'est la méthode de cryométrie en flux qui utilise le cymomètre EasyCyte5 HT**(Figure19)** qui requière l'utilisation d'un logiciel pilote nommé guavaSoft IMV et d'un Kit nommé EasyKit**,** pour le calcul du taux de viabilité on utilise aussi l'eau de javel, l'eau distillé, des tubes eppendorf, micropipettes, un kit de rinçage de cymomètre, un kit destiné à l'évaluation du taux de viabilité, des embouts pour les micropipettes et un portoir.

Figure 19 : Cytomètre (EasyCyte 5HT, IMV).

3. Méthode

3.1. Collecte du sperme

La collecte du sperme a été effectuée à l'aide d'un vagin artificiel préalablement chauffé à une température comprise entre 35 et 38°C. Ceci afin d'éviter aux spermatozoïdes tout choc thermique.

Avant de procéder à la collecte, les taureaux ont été préparés. Pour cela, le taurellier promène le taureau puis l'amène au contact du boute en train (un taureau éliminé de la production pour des raisons génétiques, et gardé pour sa docilité et sa petite taille).

Au moment où l'animal monte le boute en train, le taurellier saisit d'une main le fourreau du pénis et l'introduit dans le vagin artificiel tenu de l'autre main**.** Dès que le pénis est au contact de la surface interne du vagin, l'animal éjacule. Le taurellier retourne ensuite le vagin artificiel et le sperme s'écoule dans le tube collecteur gradué. Ce dernier est transporté rapidement au laboratoire afin de réduire les risques d'altération liés à l'action de la lumière ou de la température**.**

Chaque éjaculat doit être identifié, sur une fiche spéciale appelée spermiogramme, le nom du taureau, la date de collecte, la race du donneur, le volume récolté, la qualité du sperme (motilité massale et concentration) et le volume nécessaire pour effectuer la dilution.

3.2. Premier contrôle de la qualité du sperme

3.2.1. Examen macroscopique

Ce premier contrôle permet une évaluation générale de la qualité de l'éjaculat. Pour cela, un examen visuel est effectué, immédiatement après la collecte, afin d'évaluer les paramètres suivants : le volume (mesuré par la lecture directe sur le tube de collecte), la couleur, la viscosité ainsi que l'odeur de l'éjaculat.

3.2.2. Examen microscopique

L'évaluation de la motilité massale, constitue le premier contrôle microscopique. Elle est effectuée à partir du sperme pur, dans les minutes qui suivent la collecte. Une goutte de sperme pur est déposée sur la lame préalablement chauffée à 37°C sur une platine chauffante puis observée au microscope photonique au grossissement XI0. L'intensité des vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes est ensuite évaluée**.**

3.2.3. Calcul de la concentration

La concentration de cinq échantillons de sperme, appartenant aux quatre races : Fleckvieh, Holstein PR, Holstein PN et Montbéliarde, a été évaluée par la spectrophotométrie

3.3.3. Spectrophotométrie

Le sperme pur est déposé dans une cuvette puis dilué au 1/100 avec une solution physiologique. Cette étape est réalisée grâce à un appareil de dilution automatique. La cuvette est ensuite récupérée, puis placée dans un spectrophotomètre ACCUCEL-IMV. Ce dernier, permet de mesurer la concentration des spermatozoïdes d'une part et d'autre part de déterminer le volume de dilueur nécessaire à ajouter pour effectuer la dilution. Enfin, une imprimante reliée au spectrophotomètre imprime toutes les données calculées**.**

3.3.4. Dilution

Le but de la dilution est d'obtenir une quantité de spermatozoïdes suffisante pour une utilisation en insémination artificielle (soit 18 millions de spermatozoïdes par paillette de 0.25ml) mais aussi pour maintenir la viabilité des spermatozoïdes

La dilution est réalisée dans des biberons en verre gradués, stériles**.** Pour cela, le volume de dilueur indiqué par le spectrophotometre est ajouté à l'éjaculat qui est toujours maintenu à 37°C au bain marie.

3.3.5. Refroidissement et mise en paillettes

Après la dilution, les biberons sont déposés dans un réfrigérateur à +4°C pendant 3heures. Une fois refroidie, la semence sera conditionnée en paillettes fines, d'un diamètre de 2 mm et d'un volume de 0.25 ml. Le remplissage, l'impression (nom du taureau, son numéro d'identification, la date de collecte et l'indentification du centre d'insémination) et soudage des paillettes sont réalisés par une machine de remplissage et de soudage (MRS3). Cette dernière se trouve dans une vitrine réfrigérée à +4°C. Les paillettes sont ensuite disposées sur des rampes de congélation (à raison de 100 paillettes par rampe)**.**

3.3.6. Congélation

La première étape de la congélation est effectuée dans une cuve (Digit Cool). Durant cette étape, la température est abaissée progressivement, grâce à des vapeurs d'azote, de +4°C à -140°C. Après 7 minutes, les paillettes sont récupérées du Digit Cool puis sont plongées dans de l'azote liquide à -196°C**.**

3.3.7. Deuxième contrôle de qualités de la semence et stockage

Ce contrôle permet de vérifier l'effet de la congélation sur la qualité de la semence produite. Pour cela, 24 heures après leur congélation, quelques paillettes sont choisies au hasard. Elles sont décongelées dans de l'eau tiède pendant 30 secondes. Elles sont ensuite séchées leur contenu est examiné au microscope photonique afin de vérifier si les spermatozoïdes ont gardé leur motilité. Si la congélation n'a pas eu d'effet négatif sur la qualité de la semence, les paillettes sont déposées dans des gobelets, eux-mêmes placés dans des canistères. Ces derniers sont plongés dans des biostats (BT) d'azote liquide. Une vérification régulière du niveau d'azote est effectuée. Après 24heures de la collecte, la semence congelée est transférée dans la banque de semence qui sera conservée ainsi indéfiniment**.**

3.3.8. Test de viabilité par le Cytomètre

Avant et après chaque manipulation, un lavage est effectué à l'aide d'eau distillée, d'eau de javel et une solution de lavage appelée EasyClean **(Figure 20)**. 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 lui de chaque éjaculat est mélangé avec 199ul d'eau distillée **(Figure 21)**, 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 **(Figure 22)**.

Sur la première fenêtre qui apparait sur l'interface du logiciel Cytosoft IMV, l'espèce bovine est sélectionnée et le type d'analyse, dans ce cas « viabilité », est choisi**.** 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**.** Une fois l'analyse terminée, les résultats sont récupérés sous forme d'un tableau de données (fichier Excel) et de graphiques correspondants (nuages de points).

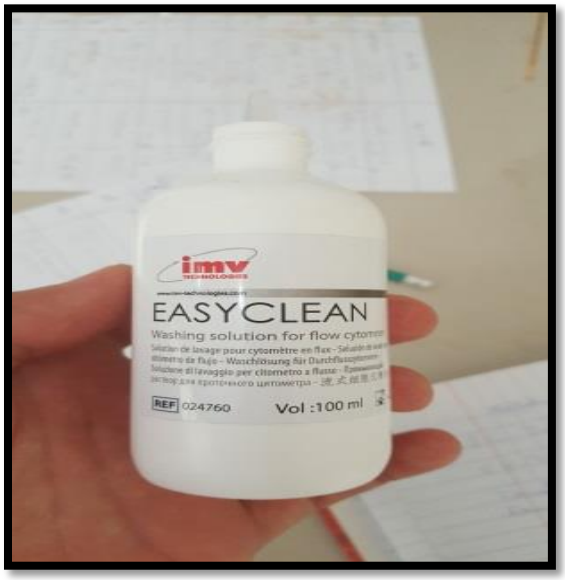


Figure 20 : Solution de lavage. (EASYCEAN)

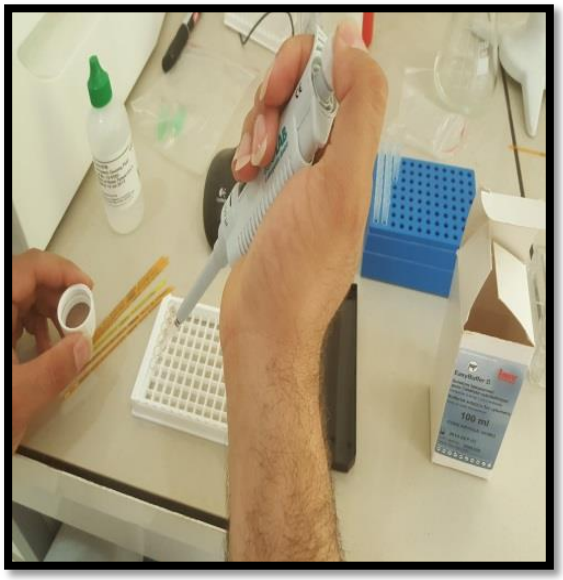


Figure 21 : Mélange de chaque éjaculat avec 199 µl d'eau distillée.

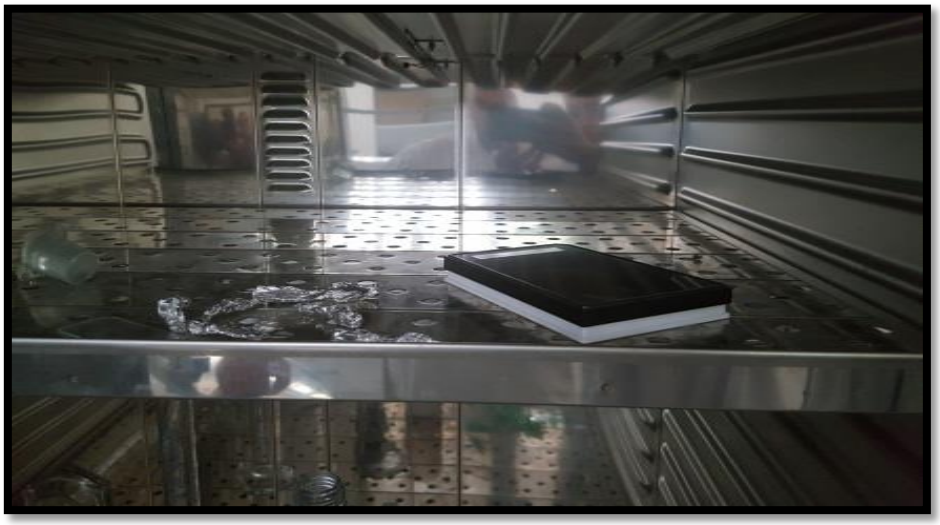


Figure 22 : L'incubation.

1. Résultats

Le but principal de notre travail a été, de déterminer la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et des spermatozoïdes décongelés par analyse cryométrique, afin de pouvoir comparer entre ces derniers en déterminant les paramètres spermatique.

1.1. Collecte de sperme

La collecte a été effectuée grâce à la méthode du vagin artificiel, utilisée pour toutes les récoltes effectuées au niveau du CNIAAG. En effet, les taureaux utilisés pour la production sont calmes et dociles et ont été longtemps entrainés à ce type de collecte. Les résultats de la collecte auquel j'ai assisté ont été reportés à partir des spermiogrammes correspondants **(Tableau 3).**

Tableau 3 : Résultats des spermiogrammes.

Nom du taureau	Race	Qualité de sperme pure	Volume de récolte (ml)	Concentration (Spectrophotomètre) Million/ml	Volume de dilution (ml)
Jetstream	Montbéliarde	65/40	7	897	66
Jeffrey (deux éjaculats)	HO pie rouge	70/40	12.5	1104	148
Jopic	HO pie rouge	70/40	9	912	87
Jojoba	Montbéliarde	70/40	3.5	1665	64.5
Winzer	Fleckvieh	70/40	7	1332	101

1.2. Spectrophotométrie

L'utilisation du spectrophotometre nous a permis de calculer la concentration pour les cinq échantillons analysés dans un lapse de temps très court**.** En effet, il s'agit d'une méthode récente fiable et d'une précision satisfaisante, très utilisée dans les centres de production. Cependant, le spectrophotomètre doit être recalibré régulièrement (une fois par an, au minimum) à partir de comptages de référence, effectués à l'aide d'une cellule hématimétrique afin de tenir compte des éventuelles dérives liées au dilueur ou à l'appareil lui-même **(Cabannes, 2008).**

1.3. Cytométrie en flux

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 vert, représente le taux de spermatozoïdes vivants, la seconde, colorée en rouge représente les débris. Les graphiques obtenus doivent être traités pour optimiser la précision lors de la lecture **(Figure 23).**

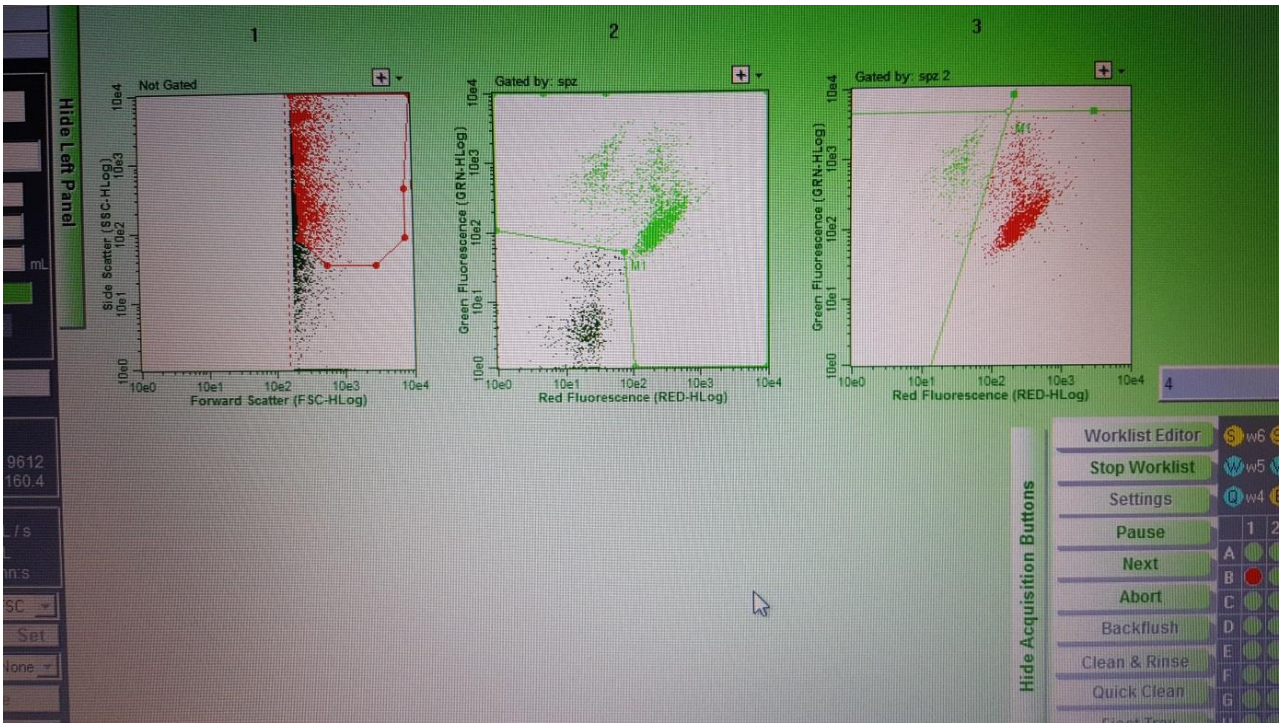


Figure 23 : Résultat du test de viabilité obtenu par le Cytomètre en flux **(1)** premier graphique obtenu à l'état brut **(2)** traitement du graphique pour éliminer les débris du résultat **(3)** résultat final du test ne présentant que les spermatozoïdes vivants (en vert) et les spermatozoïdes morts (en rouge).

1.4. Viabilité des spermatozoïdes réfrigérés

Les résultats obtenus après l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés en s'appuyant sur l'analyse cytométrique, sont enregistrés et interprétées sous forme graphique sur l'histogramme qui suit.

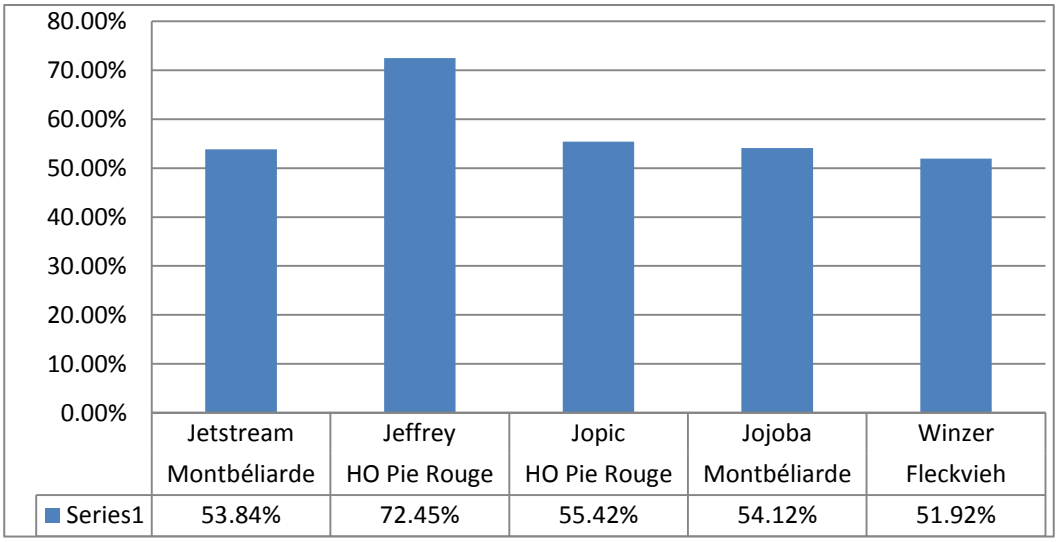


Figure 24 : Les taux de viabilité des spermatozoïdes réfrigérés des différents taureaux.

Selon les résultats obtenus, on remarque que les spermatozoïdes appartenant à l'espèce Jeffrey sont les plus résistants à la réfrigération avec une fréquence maximale, qui représente **72,45%** de viabilité. Chez les autres taureaux les taux varient de **51,92%** jusqu'à **55,42%**.

1.5. Viabilité des spermatozoïdes décongelés

Les résultats obtenus après l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes décongelés en s'appuyant sur l'analyse cytométrique, sont enregistrés et interprétées sous forme graphique sur l'histogramme qui suit.

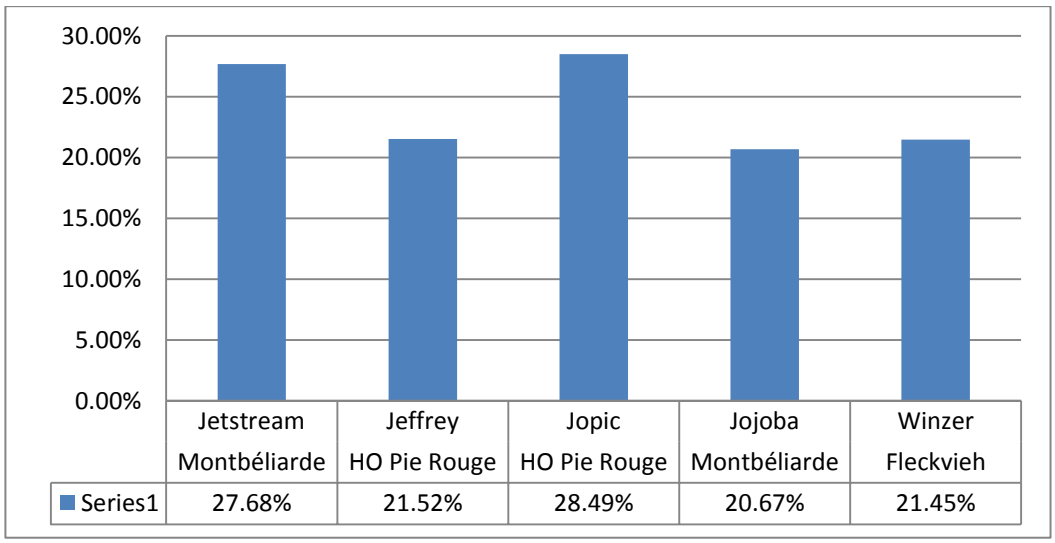


Figure 25: Les taux de viabilité des spermatozoïdes décongelés des différents taureaux.

Selon les résultats obtenus, on remarque que la viabilité des spermatozoïdes après la décongélation est diminuée jusqu'à ce qu'elle ait atteint moins de 30% pour tous les taureaux.

2. Discussion

Les prélèvements se font aux moments les plus frais de la journée. Cette programmation permet d'éliminer les effets négatifs de la chaleur sur la production du sperme. En effet, la chaleur porte atteinte à la spermatogenèse.

Le taux de viabilité des spermatozoïdes réfrigérés varie de 51.92-72.45%. Après la décongélation le taux de survie a diminué et varie de 20.67 – 28.49%.

Il existe des différences significatives ($p < 0.05$) entre le nombre de spermatozoïdes vivants avant congélation et après la décongélation.

Les facteurs de variation de la viabilité des spermatozoïdes sont multiples, notamment les caractéristiques individuelles de chaque animal, la concentration des semences, le dilueur, le temps de refroidissement, le mode de congélation, de décongélation et d'incubation de la semence.

Des études ont démontré que la capacité de fertilisation de la semence bovine décongelée pouvait être jusqu'à sept fois plus faible que celle du sperme frais. C'est que le froid intense affecte la membrane plasmatique du spermatozoïde. On estime par ailleurs à 50 % le volume de spermatozoïdes qui ne survivent pas à la procédure de congélation/décongélation. Selon (**Janice L. Bailey, 2000)**

Au nombre des facteurs d'influences susceptibles de modifier la résistance des spermatozoïdes à la congélation, d'autres auteurs ont montré l'effet de l'acrosome, du système hypothalamo-hypophysaire, de l'épididyme et de la teneur en cholestérol des éjaculats sur la qualité de la semence. Le type de dilueur peut influencer également la capacité des spermatozoïdes à résister au choc de température. L'effet de la durée de l'incubation sur la viabilité des spermatozoïdes est d'autant plus marqué que la dilution de la semence est élevée. Le contact des spermatozoïdes avec le liquide séminal, produit des effets divers qui selon l'espèce en cause, se révèlent favorable, nuls ou défavorables sur la qualité de la semence : (**ENNEN *et al.,)***, (**LENZ *et al.,)*** chez le taureau **(DARIN-BENNET *et al.,)*** **(QUINN *et al.,)*** chez le bélier.

Certains laboratoires d'Europe éliminent tout lot de semence congelée qui à l'issue de cinq heures d'incubation, contient moins de 20 % de spermatozoïdes vivants.

La proportion des spermatozoïdes mobiles dans le sperme dilué (semence), avant congélation et après dégel, est un élément précieux d'appréciation de sa qualité. Elle permet de connaître le nombre de spermatozoïdes vivants présents dans la dose prévue pour l'insémination, ainsi que la manière dont ils ont supportés les différentes manipulations. Plusieurs auteurs cités par **(ADAMOUN'DIAYE 1994)** ont observé une corrélation positive entre le pourcentage des spermatozoïdes vivants et le taux de conception chez les vaches inséminées avec la semence non congelée ou congelée.

Dans la plupart des centres d'inséminations artificielles, dans les conditions habituelles de travail, il faut au moins 12 millions de spermatozoïdes pour inséminer une vache. Les différences significatives enregistrées sont justifiables par les pertes dues aux manipulations des spermatozoïdes avant congélation et au moment de la décongélation

Conclusion et perspectives

L'insémination artificielle joue un rôle important dans l'amélioration génétique des animaux d'élevage et son efficacité dépend en grande partie de la qualité de la semence utilisée. De ce fait, un contrôle rigoureux du sperme doit être inclut dans tous les protocoles de production afin de garantir une semence de bonne qualité.

Notre étude nous a permis d'évaluer la facilité, la rapidité et la fiabilité de deux méthodes utilisées dans les examens de routine pour le calcul de la concentration du sperme par la spectrophotométrie ainsi que pour le contrôle de la viabilité des spermatozoïdes par la cytométrie en flux.

Chaque méthode présente ses avantages et ses limites. En effet, bien que l'évaluation de la concentration en spermatozoïdes avec les cellules hématimétriques soit considérée comme la méthode de référence, il a été montré que des méthodes plus récentes, comme la cytométrie en flux et la spectrophotométrie, présentent une meilleure rentabilité grâce à leur facilité, leur rapidité et leur précision

Par ailleurs, les progrès marqués par l'arrivée des sondes fluorescentes, permet de réaliser, actuellement, des analyses multiparamétriques par le Cytomètre. Ainsi, il est possible par exemple de déterminer, lors d'une même analyse la concentration ainsi que la viabilité des spermatozoïdes.

Une meilleure maitrise de l'utilisation du Cytomètre est nécessaire afin de profiter, au mieux, des multiples perspectives d'utilisation de cette méthode dont nous n'avons pu exposer qu'une infime partie dans notre étude.

Adamou-n'diaye M. : Etude des relations entre la qualité et la fécondance du sperme congelé de taureau. Thèse de Doctorat 3^{e} cycle, 1976. Université Paris VI-63 pages.

Bertrand B. (2006). Bilan et analyse de l'utilisation de l'insémination artificielle dans les programmes d'amélioration génétique des races laitiers en Afrique Soudano-Sahelienne. *Thèse de doctorat médecine vétérinaire. Ecole Nationale vétérinaire de Lyon* : 8-97.

BoujenaneI. (2012). Le sexage de la semence : rêve ou réalité. *Thèse du doctorat médecine vétérinaire.*

Bouquet A.- (2006). Amélioration de l'efficacité des programmes de sélection des bovins allaitants : de' nouveaux modèles *d'évaluation génétique. Thèse de doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agroparis Tech).*

Bouyer B. (2006). Bilan et analyse de l'utilisation de L'insémination artificielle dans les programmes D'amélioration génétique des races laitières en Afrique soudano-sahélienne. *Thèse de doctorat vétérinaire. Université claude-bernard-lyon I (médecine - pharmacie).*

Cabannes CR. (2008). Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. *Thèse de doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier. Toulouse.*

Chevalier M E. (2011). Gestion du sexe du produit en élevage bovin. *Thèse de doctorat vétérinaire. Université claude-bernard - lyon I (Médecine - Pharmacie).*

Cheng FP., Fazeli A., Voorhout WF. *et al.* (1996). Use of Peanut Agglutinin to assess the acrosomal status and the zona-pellucida induced reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17: 674-682.

Darin-bennett A., Poulos A. et White I.G. : A re-examination of the roles of phospholipids as energy substrates during incubation of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1973, **34**, 543-546.

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

Djabakou K., Fimmen H.O. et Bottger M. (1984). Examination of bull semen at CREAT.- Trypanotolerance and animal production, Avetonou (Togo): 40-44.

Eggen A. (2000). Cartographie fine d'un gène et clonage positionnel. *INRA Prod. Anim. Numéro hors-série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales»* : 133-136.

Elsik CG.,Tellam RL. et Worley KC. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window tor uminant biology and evolution. *Science,* 324: 522-528.

Ennen B.D., Berndston W.E., Mortines R.G. ET PIckett B.W.: Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0.25 ml straws. *J. Anim. Sci.*, 1976, **43**, 651-656.

Eustache, F., Jouannet, P., et Auger, J. (2003). Evaluation of flow cytométrie methods to measure human sperm concentration.*Journal of andrology, 22*(4): 558-567.

Ezekwe A.G. (1988). Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls - N'dama and Muturu.-Joint seminar on animal reproduction for african countries.-Addis-Abeba: CIPEA

Fernândez-Gago R., Dominguez JC, Martmez-Pastor F. (2013).Séminal plasma applied post thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology,* 1 -11.

Fritz S., Guillaume F., Tarres J., *et al.* (2008). Utilisation des résultats de cartographie fine de QTL en sélection chez les bovins laitiers. *Renc. Rech. Ruminants,* 15: 423-426.

Gautier M., Hayes H. et Eggen A. (2002). An extensive and comprehensive radiation hybrid map of bovine Chromosome 15: comparison with human Chromosome 11. *Mammalian Génome*13:316-319.

Gérard O. et Khirredine B. (2002). Production de semence bovine. Didacticiel de Maîtrise de la reproduction des bovins.

Graham, JK.,Kunze, E. et Hammerstedt, RH., (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry.*Biol. Reprod.,* 43: 55-64.

Gustavsson L, Rockborn G. (1964). Chromosome abnonnality in three cases of lymphatique leukaemia in cattle.*Nature,* 203: 990.

Haskouri H. (2001). Insémination artificielle et détection des chaleurs.-*In*: Gestion de la reproduction chez la vache.

Hayes H et Goddard M. (2001). The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock.*Genêt. Sel. Evol.,* 33: 209-229.

Herpin P. (2009). La génomique animale. *INRA Prod. Anim.,* 16: 1-4.

Iannuzzi L. (2007). Cytogenetics in animal production.*Ital. J. Anim. Sel,* 6 : 23-28.

Janice L. Bailey, (2000). La cryoconservation a des effets négatifs sur la semence bovine *Université Lava*
*l*http://www.scom.ulaval.ca/Au.fil.des.evenements/2000/11.23/boeuf.html
Page consultée le 29 mai 2016

Jussiau R., Montmeas L. et Papet A. (2006). Amélioration génétique des animaux d'élevage. Bases scientifiques, sélection et croisement. Chapitre II. *Edition Educagri :* p290-300.

Kabera F. (2008). Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (CNAG) de Dahra au Sénégal. *Mémoire de diplôme d'études approfondies de productions animales. Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires de Dakar.*

Labatut J. (2009). Gérer des biens communs : Processus de conception et régimes de coopération dans la gestion des ressources génétique

Laghrour W. (2012). Comparaison de deux *méthodes* de traitement de Maitrise des cycles associant la progestérone Œstrogènes et la prostaglandine f2alpha chez la Vache laitière. *Thèse de magister. Université el-hadj lakhdar Batna.*

Lenz R.W., Graves C.N. et Lodge J.R. : Influence of incubation in seminal plasma on subsequent metabolic and morphological characteristics of bovine spermatozoa.*Theriogenology*, 1977, **7**, 265-276

LePecq JB., Paoletti C. (1967). A fluorescente complex between ethidium bromide and nucleic acids.Physical-chemicalcharachterization. *J Mol Biol.,* 27: 87-106.

Lu D., Miller S., Sargolzaei M., *et al.* (2013). Genome-wide association analyses for growth and feed efficiency traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.,* 91: 3612-3633.

Parez M. et Thibier M. (1983). Contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon. *Elevage et Insémination,* 197: 3–16.

Peters AR., Bail PJH. (2004). Reproduction in cattle.Third Edition Oxford.*Blackwell Publishing,* 13: 193-195.

Prathalingam NS., Holt WW., Réveil SG *et al.* (2006). the précision and accuracy of six différent methods to détermine sperm concentration.*Journal of Andrology,* 27: 257-262.

Ponsart C, Marquant-Leguienne B., Humblot P. (2004). llème Rencontre Recherche Ruminants. Paris. 361-368.

Quinn P.I., Salamon S. et White I.G. : The effect of cold shock and deep freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial ejaculation vagina. *Austral. J. Agric.Sci.*, 1968, **19**, 119-124

Rigal GBF. (2008). Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectes à l'électroéjaculateur ou au vagin artificiel. *Thèse du doctorat.* Université Paul-Sabatier. Toulouse.

Ronot, X., Grunwald, D., Mayol, J.,F. et Boutonnant, J. (2006). La cytométrie en Flux. *Editions Tec et Doc* : 456p.

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 antadiop de dakar.*

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

Snelling WM,, Gautier M, Keelel JW., *Smith* TPL, Stone RT., Harhay GP, Bennett GL., Ihara N., Takasuga A., Takeda H., Sugimoto Y. et Eggen A. (2004). Integrating linkage and radiation hybrid mapping data for bovine chromosome 15.*BMC Genomics,* 5 : 77.

Thomas CA., Gamer DL.,DeJarnette JM. Et Marshall CE. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry.*Biol. Reprod.,* 58: 786-93.

Thibier M. (1977). La fonction sexuelle du jeune taurillon (*Bostaurus*).- Thèse : Sciences : Paris

Traore P. (1996). Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insémination artificielle. Thèse : Méd. Vét. : Rabat (IAV Hassan II)

Utsunomiya YT., O'Brien AMP., Sonstegard TS., *et al.* (2013). Detectinglociunder récent positive

Wilhelm KM., Graham JK. et Squires EL. (1996). Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analysis, flowcytometricévaluation, and zona-free hamster oocyte pénétration.*Theriogenology,* 46 : 559-578.

Résumé

De nos jours 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 actuellement de la production de semences de différentes espèces. Dans les protocoles de production et de conservation de la semence, un contrôle doit être effectué à différents niveaux afin de garantir une semence de bonne qualité dans laquelle les spermatozoïdes sont en nombre suffisant tout en préservant leur pouvoir fécondant. Selon les moyens disponibles, différentes méthodes peuvent être utilisées. La cytométrie en flux étant l'une des techniques les plus élaborées. En effet, contrairement aux techniques classiques, elle permet de contrôler un nombre de paramètres plus important.

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier deux principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences bovines : la concentration et la viabilité des spermatozoïdes. Pour cela, la concentration de la semence en spermatozoïdes a été évaluée par la méthode : spectrophotométrie et la viabilité a été évaluée par la méthode : cytométrie en flux. Nous avons ensuite effectué une étude comparative de la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et spermatozoïdes décongelés

Mots clés : Semences bovines, spermatozoïde, viabilité, cytométrie en flux. Spermatozoïdes réfrigérés, spermatozoïdes décongelés

Abstract

Today artificial insemination has become important in the field of genetic improvement of livestock. Indeed, several specialized production centers are currently involved in the production of seeds of different species. In protocols of production and conservation of seed, a check should be performed at various levels to ensure good quality semen in which the sperm are sufficient while maintaining their fertilizing power. According to available resources, various methods can be used. Flow cytometry is one of the most sophisticated techniques. In contrast to conventional techniques, it can control a larger number of parameters.

In this study we proposed to study two main parameters for assessing the quality of bovine semen: concentration and sperm viability. For this, the concentration of sperm in semen was evaluated by the method: spectrophotometry and viability was assessed using the method: flow cytometry. We then carried out a comparative study of the viability of chilled sperm and thawed sperm

Keywords: Bovin semen, spermatzoide, viability, flow cytométrie, refrigerated sperm, Thawed sperm

1. La préparation des taureaux

Les taureaux sont amenés dans la salle de monte et attachés dans les stalles d'attente. La préparation consiste à promener le taureau et à l'amener au contact des boutes en train.

Figure. Taureau attaché dans la salle d'attente.

Lorsque le taureau présente des signes d'excitation (érection, flehmen…), le taurellier lui fait effectuer plusieurs fausses montes. Elles consistent à laisser le taureau monter sur le boute en train sans lui laisser le temps de donner le coup de rein concomitant de l'éjaculation.

Figure. La fausse monte.

2. Collecte du sperme

La collecte a été effectuée grâce à la méthode du vagin artificiel, utilisée pour toutes les récoltes effectuées au niveau du CNIAAG. En effet, les taureaux utilisés pour la production sont calmes et dociles et ont été longtemps entrainés à ce type de collecte.

Le principe du vagin artificiel est de reproduire l'ensemble des sensations présentées par les voies génitales femelles lors de l'accouplement (chaleur, pression, lubrification), et de recueillir rapidement un éjaculat total et non souillé.

Après chaque utilisation, l'ensemble du vagin est entièrement démonté pour être lavé, séché et désinfecté

Figure. Vagin artificiel démonté

3. Examen du sperme

Un examen macroscopique

-Le volum**e** (en ml) est évalué par lecture directe sur un tube de collecte gradué.

-Les aspects de l'éjaculat tels que la couleur, la viscosité sont analysés par simple observation de l'éjaculat dans le tube de collecte ; un sperme normal est de couleur blanchâtre à blanc-jaunâtre et de consistance laiteuse à lactocrémeuse. Cette observation permet le plus souvent la détection d'anomalies, comme la présence de sang ou de pus.

Un examen microscopique

L’évaluation de la motilité massale

Observation sous le microscope photonique à platine chauffante l'intensité des vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes est évaluée

Note 0 : absence de mouvement des spermatozoïdes
Note 1 : léger mouvement perceptible, pas de vague
Note 2 : vagues peu nombreuses
Note 3 : vagues nombreuses
Note 4 : vagues rapides et intenses
Note 5 : tourbillons très rapides

Un sperme dont la motilité massale est inférieur ou égale à 3est généralement éliminé.

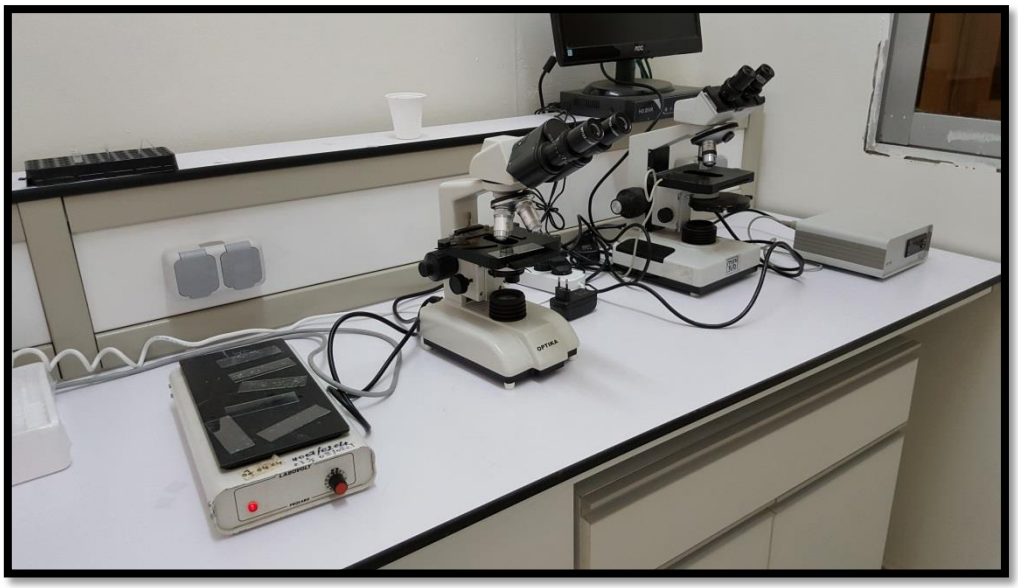


Figure. Evaluation de la motilité massale par le microscope photonique à platine chauffante.

La concentration en spermatozoïdes

Est mesurée en milliards de spermatozoïdes par millilitre à l’aide d’un Spectrophotomètre étalonné

Mesurer la concentration en spermatozoïdes de l’éjaculat.
La quantité de dilueur à apporter à l’éjaculat.
Le nombre de doses qui peuvent être produites sont alors calculées.

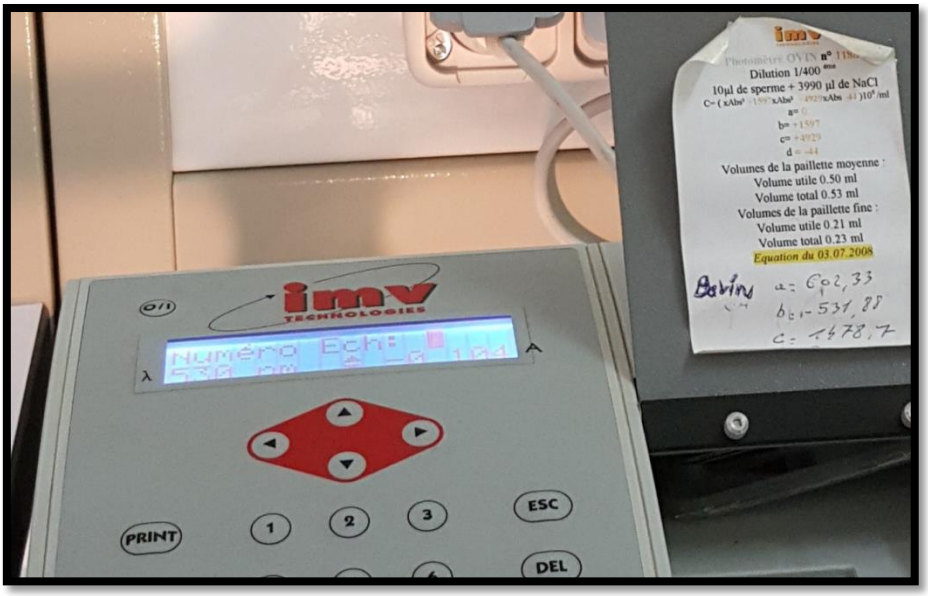


Figure. Calcule de la concentration de spermatozoïde

4. L'évaluation de la motilité individuelle

Mesurée au microscope au grossissement X40 entre lame et lamelle, elle correspond à la proportion de spermatozoïdes avec un mouvement rectiligne qui traversent le champ du microscope.

Les spermatozoïdes bougeant sur place, tournant en petits cercles ou se déplaçant en arrière du fait d'une queue repliée ne sont pas considérés comme mobiles.

5. Dilution de la semence

Le dilueur doit être porté à une température de 35°C avant d'être ajouté à la semence. Il permet d'apporter aux spermatozoïdes les éléments nutritifs et protecteurs permettant leur survie après congélation.

L'ensemble dilueur/spermatozoïdes est maintenu à 4°C pendant une heure après mélange pour réfrigérer la semence. 3 heures d'équilibration supplémentaires sont ensuite nécessaires pour permettre les échanges entre le dilueur et les cellules.

Les matériels utilisé dans cette étape est :

Le dilueur OPTIXCELL
Le diluteur MICROLAB 500

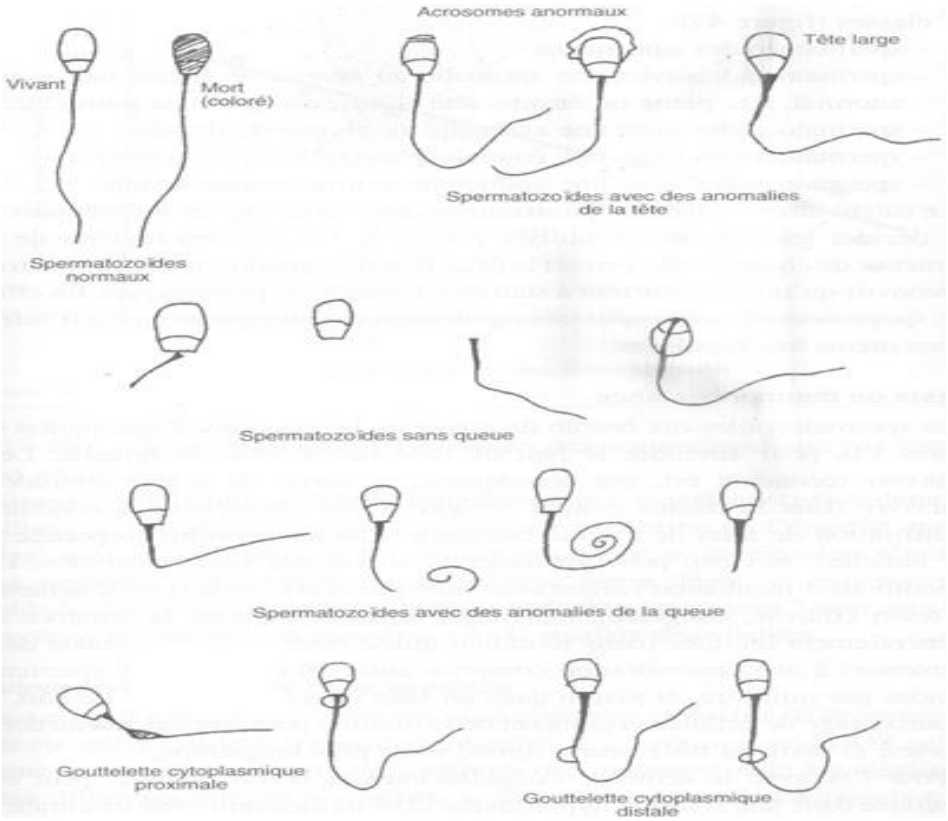
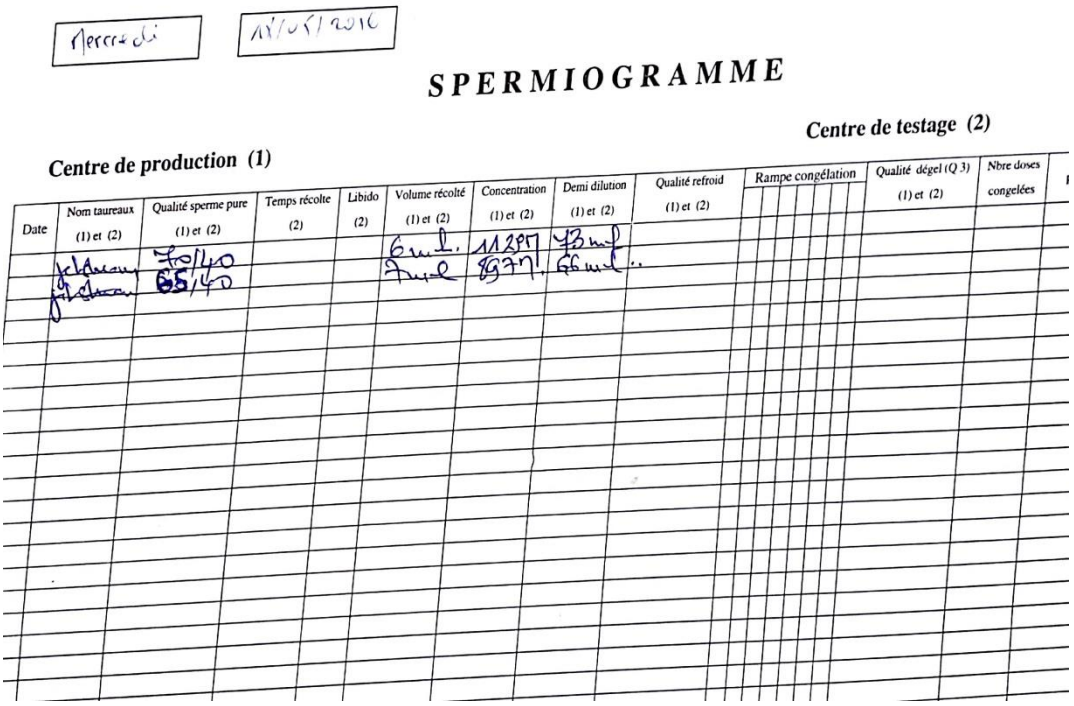


Figure. Anomalies majeures des spermatozoïdes.



Mercredi 11/05/2016

SPERMIOGRAMME

Centre de production (1) **Centre de testage (2)**

Date	Nom taureaux (1) et (2)	Qualité sperme pure (1) et (2)	Temps récolte (2)	Libido (2)	Volume récolté (1) et (2)	Concentration (1) et (2)	Demi dilution (1) et (2)	Qualité refroid (1) et (2)	Rampe congélation	Qualité dégel (Q 3) (1) et (2)	Nbre doses congelées
	Tabaou Tabaou	70/40 65/40			6 ml. 7 ml	11287 8977	43 ml 46 ml				

Figure. Le spermiogramme utilisé dans laboratoire du CNIAAG

6. Mise en paillettes

Après la dilution, les biberons sont déposés dans un réfrigérateur à +4°C pendant 3heures. Une fois refroidie, la semence sera conditionnée en paillettes fines par l'utilisation d'une machine de remplissage et de soudage.

7. Congélation

1. Refroidissement lent jusqu'à 4°C (1 h 30)
2. Refroidissement rapide jusqu'à – 196°C

8. Conservation

Les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide et stockées dans des containers.

9. Analyse de la viabilité par la méthode cytométrie en flux

Grace au Cytomètre en flux, il est possible d'analyser des solutions cellulaires à un rythme extrêmement soutenu (jusqu'à des dizaines de milliers de cellules par seconde) tout en permettant jusqu'à 500 molécules par cellule d'être enregistrées. La rapidité et sensibilité de la cytométrie en flux en fait donc une méthode d'analyse de choix pour des populations cellulaires secondaires

Le Cytomètre utilisé est l'EasyCyte 5HT, IMV qui requière l'utilisation d'un logiciel pilote nommé guavaSoft IMV et d'un Kit nommé EasyKit**.**

On a utilisé la cytométrie en flux pour analyser la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et décongelés

Avant et après chaque manipulation, un lavage est effectué à l'aide d'eau distillée, d'eau de javel et une solution de lavage appelée EasyClean.
On ajoute :

- L'eau distillée dans les positions 1 et 5 ou 9 (il faut mentionner la position qu'on a utilisée) et w1, w2, w3, w4, w5, w6.
- L'eau de javel dans la position 2.
- ICF dans les positions 3 et 4.

Figure. Les différentes positions et les mélanges de spermatozoïdes avec EasyBuffer

Après le lavage on prend 1 µl de chaque semence et on mélange avec 199ml d'EasyBuffer. On laisse le mélange pendant 10 minutes dans l'incubateur afin de commencer l'analyse de la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et décongelés

Les résultats des deux analyses

Spermatozoïdes réfrigères :

Nom du taureau	Race	Taux de viabilité des spermatozoïdes réfrigérés
Jetstream	Montbéliarde	53.84%
Jeffrey	HO Pie Rouge	72.45%
Jopic	HO Pie Rouge	55.42%
Jojoba	Montbéliarde	54.12%
Winzer	Fleckvieh	51.92%

Spermatozoïdes décongelés :

Nom du taureau	Race	Taux de viabilité des spermatozoïdes réfrigérés
Jetstream	Montbéliarde	27.68%
Jeffrey	HO Pie Rouge	21.52%
Jopic	HO Pie Rouge	28.49%
Jojoba	Montbéliarde	20.67%
Winzer	Fleckvieh	21.45%

Annexe