

REPUBLIQUE ALGERINENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA - BEJAIA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES DE L'ENVIRENEMENT

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de

Master

En Reproduction et Biotechnologies Animales

Thème

**Exploration des caractéristiques du sperme
épididymaire chez le Charolais (post-mortem)**

Présenté par

BENCHEIKH Lamia

KEBBI Azzeddine

Promoteur

Monsieur IGUER-OUADA Mokrane

Jury

Président : Mr **AYAD A.**

Examineur : Mme **BELBACHIR A.**

Melle **RAHMANI A.**

Année 2012-2013

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant pour tous ces dons accumulés tout au long de notre vie et de nous avoir permis, aujourd'hui, la réalisation de notre projet de fin cycle, encore un rêve qui se réalise grâce à Dieu.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et nos remerciements à notre promoteur Mr IGUER-OUADA M. pour avoir éveillé notre intérêt pour la discipline valorisée par sa disponibilité et son aide précieuse, qui nous a permis de mener à terme notre travail.

Veillez croire en l'expression de notre profonde reconnaissance et de nos profonds respects

Nos remerciements vont également à Mr NABI B. qui nous a apporté une aide efficace tout au long de ce travail tant par son aide technique et scientifique. Merci également à tous le personnel du laboratoire de Biologie animale et on tien aussi à remercier Mr Fatmi et ces deux étudiantes Chafia et Sara du département de Génie des Procédés.

Nous voudrions encore exprimer nos vives gratitudes et nos sincères remerciements à :

Mr AYAD A. Vous nous faite l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence de jury

Mme BELBACHIR A. et Melle RAHMANI A. nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail et de siéger parmi les membres de jury.

Dédicaces

Avec les sentiments de la plus profonde humilité, je dédie ce modeste travail :

A mes parents que dieu les protège :

En témoignant de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien. Je leur suis très reconnaissants. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

A mon chère frère: Mokrane ;

A mes deux petites sœurs Yasmine et Ines ;

A mes cousins, cousines et à toute ma famille, grand et petit ;

A ma chère binôme Lamia et à sa famille ;

A tous mes amis(es) ; Atmane, Cherif, Hamid, Nassime, Lakhdar, Adiriane, Faycal, Karima, Chafia, Sara, Mima, Naima ...

Azzeddine

Dédicaces

Cet événement de ma carrière universitaire me donne la grande opportunité de dédier ce modeste travail :

*A*vec l'aide de dieu tout puissant est enfin achevé ce travail, lequel je dédie à toutes les personnes qui me sont chères ;

A ma mère et mon père pour lesquels aucun mot ne saurait exprimer mes profonds sentiments en leur égard ;

A ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance ;

A ceux qui m'ont soutenu nuit et jour durant tout mon parcours ;

A mon frère Idriss

A mes deux sœurs Dyhia et Sihem

A mon cher binôme Azzeddine et sa famille ;

A tous mes amis (es) : Imane, Zahia, Chafia, Sara ...

Lamia

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie bibliographiques

Chapitre I : Présentation de la race bovine charolaise.....3

I.1. Origine de la charolaise.....3

I.2. Histoire de la charolaise.....4

I.3. Description morphologique et génétique.....4

I.3.1. Morphologie et standard de la race.....4

I.3.2. Particularités génétiques.....5

I.4. Aptitudes et potentiel.....5

I.4.1. Bonne capacité de croissance.....5

I.4.2. Bonne race bouchère.....5

I.4.3. Bonnes qualités des femelles6

I.4.4. Race rustique et docile.....7

I.5. Croisement et Reproduction chez la race charolaise.....7

I.5.1. Insémination artificielle.....7

I.5.2. Transplantation embryonnaire.....8

Chapitre II : Physiologie de l'épididyme.....9

II.1. Structure de l'épididyme.....9

II.1.1. Anatomie.....9

II.1.2. HISTOLOGIE DE L'EPIDIDYME.....10

a. Les cellules principales.....11

b. Les cellules apicales.....11

c. Les cellules claires.....11

d. Les cellules en halo.....12

e. Les cellules basales.....12

II.2. Fonction de l'épididyme.....14

II.2.1. Transite épидидymaire.....14

II.2.2. Réabsorption de l'eau et des ions.....14

II.2.3. Action des Protéines.....15

II.2.4. Régulation du cholestérol.....16

II.2.5. Maturation des spermatozoïdes.....16

II.2.6. Protection des spermatozoïdes.....	17
II.2.7. Régulation des fonctions de l'épididyme.....	17
a. Les androgènes.....	18
b. Interaction épididyme-testicule-spermatozoïdes.....	19
Chapitre III : Intérêt du sperme épididymaire et les différents techniques de récoltes.....	20
III.1. Intérêt du sperme épididymaire.....	20
III.2. Techniques de récolte du sperme épididymaire.....	21
Chapitre IV : Méthodes d'évaluation de la qualité dans l'espèce bovine.....	22
IV.1. Evaluation macroscopique.....	22
IV.1.1. Volume.....	22
IV.1.2. Couleur.....	22
IV.1.3. Viscosité et consistance.....	22
IV.1.4. PH.....	23
IV.2. Evaluation microscopique.....	23
IV.2.1. La mobilité massale.....	23
IV.2.2. La mobilité individuelle.....	24
a. Evaluation avec méthode classique.....	24
b. Evaluation avec analyseur assistée par ordinateur.....	24
IV.2.3. La Numération ou concentration.....	25
a. La Cellule de Thoma.....	25
b. Le spectrophotomètre.....	26
IV.2.3. La morphologie.....	27
IV.2.4. La viabilité.....	28
a. Le test hypo-osmotique.....	28
b. Le teste d'Eosine-Négrosine.....	29

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes.....	30
I. Obtention de spermatozoïdes épididymaire.....	30
I.1. Récupération des organes.....	30
I.2. Dissection de l'épididyme.....	30
I.3. Récolte de la semence.....	32
II. Evaluation de la qualité de la semence épididymaire.....	33
II.1. Analyse macroscopique.....	33
II.1.1. Volume.....	33
II.1.2. Couleur.....	33

II.2. Analyse microscopique	33
II.2.1. Mobilité massale	33
II.2.2. Mobilité individuelle	34
II.2.3. Concentration	34
II.2.4. Viabilité.....	34
II.2.5. Morphologie.....	34
III. Evaluation de Conservation de la semence collectée	35
III.1. Préparation des complexes cyclodéxtrines/cholestérol/ Vitamine E.....	35
III.2. Analyse informatique de la mobilité sperme épидидymaire.....	36
Chapitre II : Résultats et Discussion	37
II.1. Analyse des paramètres spermatiques épидидymaire.....	37
II.2. Conservation du sperme épидидymaire.....	40
II.2.1. Evolution des vitesses des spermatozoïdes à température ambiante.....	40
II.2.2. Evolution des vitesses des spermatozoïdes conservés au frigidaire (5°C).....	41
II.2.3. Evolution des pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides et statiques conservés à température ambiante.....	43
II.2.4 Evolution des pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides et statiques conservés au frigidaire (5°C).....	44
Conclusion et perspectives	47
Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 01 : Taureau adulte de race charolaise.....	3
Figure 02 : Vache de race charolaise au pré.....	6
Figure 03 : Représentation schématique du testicule et de l'épididyme.....	10
Figure 04 : Organisation schématique des principaux types de cellules dans l'épididyme.....	13
Figure 05 : Fonction de l'épithélium épидидymaire.....	15
Figure 06 : Mécanisme d'action des hormones stéroïdes.....	18
Figure 07 : Collecte de semence avec la méthode « retrograde-flushing ».....	21
Figure 08 : Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes.....	27
Figure 09 : Spermatozoïde du taureau	28
Figure 10 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes après le test hypo-osmotique...28	
Figure 11 : Spermatozoïde mort et spermatozoïde vivant après coloration. à l'éosine-négrosine.....	29
Figure 12 : Testicule après l'avoir dépourvu de tunique vaginale.....	30
Figure 13 : Epididymes juste après leurs dissections et leurs isolations des testicules.....	31
Figure 14 : Epididyme après l'avoir dépourvu des tissus en excès.....	31
Figure 15 : Récolte de la semence par la méthode rétrograde.....	32
Figure 16 : Semence épидидymaire pure et fraîchement collectée.....	32
Figure 17 : Microscope ayant servie à l'évaluation des caractéristiques microscopique de la semence.....	33
Figure 18 : Analyseur informatique de marque SCA utilisé pour le calcule des vitesses de progressions des spermatozoïdes.....	36
Figure 19 : Histogrammes représentant les paramètres spermatiques épидидymaire de charollais.....	39
Figure 20 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les milieux de conservation utilisés à température ambiante.....	40
Figure 21 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les milieux de conservation à 5°C.....	41
Figure 22 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les groupes de milieux reconstitués, dans la conservation à 5°C (2) et à température ambiante (3).....	42

Figure 23 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à température ambiante.....	43
Figure 24 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à 5°C.....	44
Figure 25 : Histogrammes représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans les groupes de milieux reconstitués, dans la conservation à température ambiante.....	45
Figure 26 : Histogrammes représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à 5°C dans les groupes de milieux reconstitués.....	46

Liste des tableaux

Tableau 01 : Formes commercialisation du charolais.....	06
Tableau 02 : Résumé des actions hormonales de l'épididyme.....	19
Tableau 03 : Notation de la mobilité massale du sperme.....	23
Tableau 04 : Note d'appréciation des spermatozoïdes.....	24
Tableau 05 : Liste des milieux.....	35

Introduction

Introduction

La race charolaise est une race française, destinée principalement à la production viandeuse dont les individus sont porteurs d'un grand potentiel génétique qui s'avère très important à exploiter en Algérie. L'utilisation d'un taureau charolais en croisement permet d'améliorer grandement les aptitudes bouchères des races locales et ainsi permettre la diffusion de sa génétique, de plus le charolais à une grande capacité à s'adapter aux climats de différents milieux (**DUDOUE**T., 2010).

La vache charolaise à une bonne production laitière, elle est réputée pour être la meilleure laitière des races à viande. Cela assure au veau une bonne croissance qui s'élève en moyenne à 1600 g/jour. Entre 15 et 18 mois après la naissance, un tourillon peut atteindre un poids de 425 kg et peut atteindre ponctuellement des valeurs de croissance allant jusqu'à 2000 g/jour (**DEVILLE**., 2009).

En Algérie, vu les intérêts économiques qu'apporte cette race nous avons observé une augmentation considérable de son importation durant ces dernières années. Plusieurs éleveurs ont tenté de faire reproduire la race charolaise en présentant les taureaux à leurs femelles, mais c'est resté sans succès. Les taureaux charolais ont présenté un manque d'intéressement aux femelles en chaleur probablement dû à un manque de libido.

Nous nous sommes alors posé la question sur l'activité de reproduction des taureaux importés. Sommes-nous face à des individus qui sont incapables de se reproduire ce qui pourrait induire un manque d'exploitations leur de potentiel génétique.

Comme chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparait au niveau de l'épididyme. Le sperme collecté à ce niveau est tout-à-fait exploitable en insémination artificielle soit juste après la collecte ou après conservation (**GUERIN, et al.**, 2003).

C'est dans ce contexte, que s'inscrit le premier objectif du présent travail qui consiste à collecter le sperme de l'épididyme après abattage (post-mortem) des animaux afin de vérifier si la qualité des spermatozoïdes est bonne. Le second objectif serait de trouver un moyen pour conserver la semence épидидymaire si elle est de bonne qualité. Pour ce faire nous avons mis au point une méthode nouvelle qui n'a pas été déjà testé et dont le principe et de préparer différents milieux de conservation associant les Cyclodextrines avec le Cholestérol et la Vitamine E.

Partie bibliographiques

I. Présentation de la race charolaise

La charolaise est une race bovine française originaire de la région de Charolles en Bourgogne. Son élevage marque encore la région, où elle est présente depuis très longtemps. D'abord animal de trait spécifique à cette région, cette vache bien adaptée au commerce de la viande a été élevée dans le Nivernais tout proche, puis dans une majeure partie de la France puis dans une majeure partie du monde. Vouée principalement à la production de viande dont les individus sont de grand gabarit et de couleur blanche unie tirant parfois vers le crème (DEVILLE., 2009).



Figure 01 : Taureau adulte de race charolaise (www.concoursvaches.fr)

I.1. Origine de la charolaise :

Nombreuses sont les hypothèses quant à l'origine de la race charolaise. Certains pensent qu'elle serait issue d'un bétail ramené des croisades par les seigneurs de Damas, grande famille noble du sud de la Bourgogne. Pour d'autres, tel Sanson, zootechnicien français du XIX^{ème} siècle, cette race aurait pour origine la race jurassique, dont le berceau s'étendait au sud des monts du Jura (des ancêtres auraient été retrouvés dans des gisements préhistoriques suisses). Elle se serait alors déplacée vers l'ouest, en Bourgogne et en particulier la vallée de l'Arconce qui traverse les régions Charollaise et Brionnaise.

Toutefois, des études menées par l'INRA sur les relations génétiques entre les principales races bovines françaises la mettent à mal puisqu'elles apparentent la charolaise aux races du rameau blond et rouge du Sud-ouest comme la limousine, la blonde d'Aquitaine et la Salers.

Quelle que soit son origine, il est établi que la race charolaise est présente depuis longtemps dans les bocages du Charolais et du Brionnais aux environs de la bourgade de Charolles d'où elle tire son nom (BOUQUET A., 2009).

I.2. Histoire de la charolaise :

La race Charolaise est la principale race spécialisée pour la production de viande en France et est présente dans toutes les régions d'élevage de bovins.

Jusqu'au 18^{ème} siècle, cette race s'est développée localement dans son berceau natal, sur les coteaux environnant la ville de Charolles (Saône-et-Loire). Les animaux, destinés à la boucherie de l'agglomération lyonnaise, étaient sélectionnés pour leur conformation bouchère.

Au début du 19^{ème} siècle, la race s'est établie dans la région Nivernaise puis dans le centre de la France (Allier, Cher, Côte d'Or). A cette époque, elle était utilisée pour sa double aptitude, la viande et le trait. Le recours au croisement avec la race Durham s'est alors répandu dans la Nièvre et le Centre de la France pour essayer d'améliorer la précocité des animaux, mais il n'a pas perduré au-delà de 1850 parce qu'il a provoqué une diminution de la rusticité, de l'aptitude au trait et du rendement des carcasses.

En 1864, des éleveurs ont fondé le Herd-book de la race Nivernaise Charolaise à partir des métissages Durham-Charolais. Les éleveurs de Saône-et-Loire, plus réticents au croisement, et dont les animaux étaient d'un type plus maigre et rustique, ont créé le Herd-book de la race Charolaise en 1882. Ces deux livres généalogiques ont fusionné en 1919. Dès la fin du 19^{ème} siècle, les qualités bouchères et maternelles de la charolaise ont séduit les éleveurs vendéens (DEVILLE., 2009).

I.3. Description morphologique et génétique

I.3.1. Morphologie et standard de la race

Le standard de la race décrit de façon précise les caractéristiques morphologiques visibles communes aux animaux d'une même population raciale.

Selon l'article 13 du règlement intérieur du Herd-Book Charolais, les animaux de race Charolaise présentent les caractéristiques suivantes :

- Robe uniformément blanche ou quelque fois crème, sans taches,
- Tête relativement petite, courte, à front large, à profil plus ou moins plat, à chignon rectiligne, à chanfrein droit et court, cornes rondes, blanches, allongées, oreilles moyennes, minces et peu garnies de poils, yeux grands et saillants, joues fortes, muflle large,

- Poitrine profonde, côte ronde fondue avec l'épaule, un dos horizontal et très musclé, rein très large et épais, hanches légèrement effacées, très larges, ainsi que la croupe,
- Culotte rebondie et très descendue, ligne du dessous parallèle à celle du dos,
- Queue sans saillie trop prononcée, effilée et terminée par une touffe de crins fins,
- des membres bien d'aplomb,
- Peau ou cuir d'épaisseur moyenne, mais très souple.

(<http://www.charolaise.fr/Caracteristique>, consulté le 05 mai 2013)

I.3.2. Particularités génétiques

Une mutation du gène de la myostatine existe en race charolaise, engendrant le caractère culard chez certains animaux. Ceux-ci présentent alors une hypertrophie musculaire, mais également une plus grande finesse des os et une meilleure valorisation des fourrages, mais sont moins fertiles et posent des problèmes de dystocie lors du vêlage. L'allèle incriminé est toléré en race charolaise, mais il est peu souhaité en raison des problèmes qu'il peut entraîner (HANSET, 2005).

La couleur blanche caractéristique de la race charolaise est également liée à une particularité génétique. C'est une mutation du gène responsable de la structure des mélanosomes qui en est à l'origine. Cette mutation génère des mélanosomes non fonctionnels qui ne peuvent pas produire correctement les pigments comme la mélanine, d'où la couleur très claire (diluée en fait) de la charolaise (GIRARDOT et al., 2003).

I.4. Aptitudes et potentiel

I.4.1. Bonne capacité de croissance

Elle se caractérise également par une très forte capacité de croissance. Celle-ci s'élève en moyenne à 1 100 g par jour dans les 120 premiers jours et peut atteindre ponctuellement des valeurs de 2 000 g par jour (Numéro spécial du bulletin de l'élevage français-SOPEXA, 2000).

I.4.2. Bonne race bouchère :

La charolaise est une excellente race bouchère, appréciée pour la qualité de sa viande persillée et avec une faible teneur en gras. Elle doit essentiellement cette caractéristique à son passé d'animal de trait (Numéro spécial du bulletin de l'élevage français-SOPEXA, 2000). La charolaise peut être commercialisée comme animal de boucherie sous diverses formes, comme l'indique le tableau suivant (tableau 01).

Tableau 01: Formes de commercialisation du charolais

Forme de l'animal	Âge à l'abattage (mois)	Poids vif (kg)	Poids de carcasse (kg)
Taurillon	15 à 18	700	420
Génisse lourde	24 à 36	plus de 600	plus de 350
Vache de boucherie	plus de 36	720	430
Bœuf	plus de 30	700 à 770	420 à 460

(<http://www.charolaise.fr/Caracteristique>, consulté le 05 mai 2013)

I.4.3. Bonnes qualités des femelles :

Les vaches charolaises sont appréciées pour leurs qualités d'élevage et leurs bonnes fertilités et la production laitière.

Leurs vêlage se passe généralement sans difficulté mais aujourd'hui, différentes recherches visent à améliorer encore plus la facilité de naissance des veaux et à réduire les vêlages difficiles et ainsi minimiser l'intervalle entre la première et la deuxième mise bas.

La charolaise a une bonne production laitière, et est réputée pour être la meilleure laitière des races à viande. Cela assure au veau une bonne croissance.



Figure 02 : Vache de race charolaise au pré (www.concoursvaches.fr)

I.4.4. Race rustique et docile

La charolaise est une race rustique, qui se montre capable de s'adapter à des milieux très différents. Elle montre de grandes capacités à utiliser ses réserves graisseuses en cas de période de sécheresse dans des régions chaudes. Par ailleurs, elle est réputée pour sa capacité à valoriser des fourrages grossiers, ce qui, combiné à sa forte capacité d'ingestion.

La docilité de la charolaise est également un de ces atouts. Elle permet un gain de temps et une meilleure sécurité pour l'éleveur, notamment lorsqu'il doit manipuler les animaux. Ce caractère est d'autant plus intéressant pour la conduite de grands troupeaux en élevage extensif Source : (<http://www.charolaise.fr/Caracteristique>, *consulté le 05 mai 2013*).

I.5. Croisement et Reproduction chez la race charolaise

La race charolaise est très utilisée en croisement, car l'utilisation d'un taureau charolais permet d'améliorer grandement les aptitudes bouchères des veaux de races laitières notamment. Ainsi, en France, sur les 500 000 vaches croisées, pas moins de 40 % l'étaient avec un taureau charolais (**Recensement général agricole en France, 2000**).

Exporté dès le XIX^e siècle, la race charolaise a également pu servir dans de nombreux pays à améliorer les performances de races locales, les produits du croisement étant mieux adaptés au climat local que la charolaise, et mieux conformé que les animaux locaux. Source : (<http://www.brg.prd.fr/brg/pages/rga/bovins/15.php>, *consulté le, 05 Mai 2013*).

Le choix et tri du point de vue génétique des meilleurs animaux qui seront destinés à la reproduction passent tout d'abord par une évaluation individuelle en impliquant différentes mesures. C'est le contrôle de performances qui est la conformation musculaire, le développement squelettique et les caractéristiques raciales. Des techniques de plus en plus efficaces sont appliquées et permettent d'améliorer la reproduction des animaux, comme l'insémination artificielle ou la transplantation embryonnaire (**MEILLER et VANNIER., 1994**).

I.5.1. Insémination artificielle

En effet, il n'y a pas besoin d'un très grand nombre de taureaux pour assurer la fertilisation des femelles, un taureau pouvant saillir plusieurs femelles, voire des milliers dans le cas de l'insémination artificielle. Comme les besoins en nombre sont faibles, on peut se permettre d'appliquer une sélection plus stricte qui passe par une meilleure connaissance des qualités génétiques des animaux. L'insémination artificielle, mise au point bien

antérieurement, a permis d'avoir un grand nombre de descendants du même mâle, alors qu'on ne pouvait avoir plus d'un descendant d'une femelle par campagne de reproduction.

I.5.2. Transplantation embryonnaire

De telles opérations sont aujourd'hui couramment pratiquées.

Sur le plan de la sélection, l'intérêt de cette technique est de permettre la diffusion du progrès génétique par la voie femelle et pour l'éleveur, le transfert d'embryons présente plusieurs avantages : il peut à la fois accélérer le progrès génétique du troupeau et commercialiser les produits de ce progrès en conservant le potentiel génétique dans son élevage. C'est ce qu'a permis le transfert embryonnaire : augmenter par unité de temps le nombre de descendants d'une même femelle (**LEGRAND, 2003**).

Chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît dans l'épididyme (GUERIN et al., 2003) le long de leur passage par les différents niveaux de ce dernier sous l'influence de plusieurs facteurs et de protéines dont un certain nombre reste encore méconnu.

II.1. Structure de l'épididyme

II.1.1. Anatomie (figure 03)

L'épididyme se situe sur la face postérieure du testicule, c'est un long tube rétréci, une fois déroulé le canal de l'épididyme peut mesurer entre 40 à 80 m chez les bovin et l'étalon (SULLIVAN., 2004).

L'épididyme est hautement différencié, il est composé de trois parties anatomiquement bien distinctes : La tête (région proximale), dont le segment initial se trouvant immédiatement après le *retetestis*, est reliée au hile du testicule par les canaux efférent, le corps (partie médiane) et la queue (région distale) ces régions sont également subdivisées en plusieurs segments (JOHNSTON et al., 2005).

Chacun d'entre eux étant délimité par des cloisons conjonctives, cette subdivision repose sur des analyses ultra structurales ainsi que sur l'étude des activités enzymatiques et fonctionnelles de l'organe.

La queue est en continuité avec le canal déférents, la paroi de ce tube est entourée d'une mince couche de fibres musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (BRITAN., 2006).

Le canal déférent fait suite au canal épидидymaire, ce canal s'engage dans le trajet inguinal où il contribue à former le cordon testiculaire, il pénètre dans la cavité abdominale et atteint la face dorsale de la vessie formant un très léger renflement pelvien avant de se jeter dans l'urètre (VAISSAIRE et al., 1977).

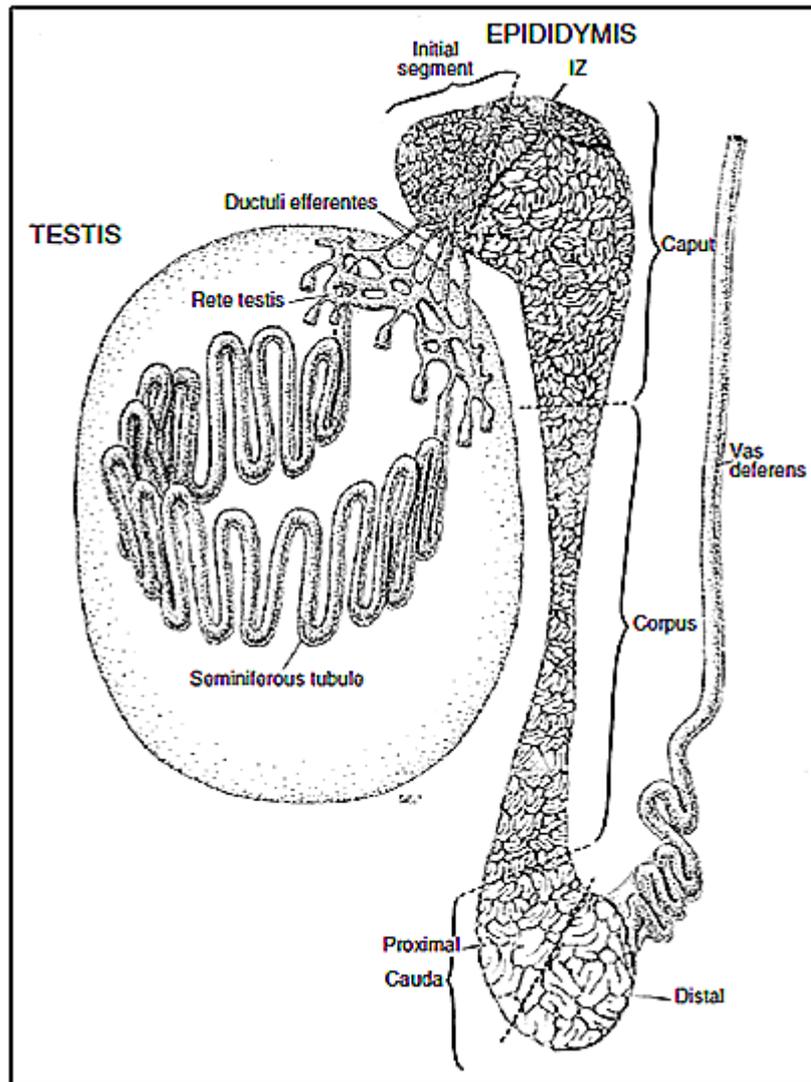


Figure 03 : Représentation schématique du testicule montrant des tubules séminifères et le rete testis, les canaux efférents, l'épididyme et canal déférent. Les principales régions de l'épididyme (iZ, le segment initial zone intermédiaire, tête, corps, région proximale et distale de la queue) sont indiqués (ROBAIRE et al., 2006).

II.1.2. Histologie de l'épididyme (Figure 4 et 5)

L'épithélium épididymaire est constitué de différents types de cellules. Certaines cellules se trouvent sur toute la surface du canal épididymaire et d'autres sont spécifiques de chaque région de l'épididyme.

Parmi les cellules qui se trouvent au niveau de l'épididyme les cellules basales, apicales, claires, halos et les cellules principales.

a. Les cellules principales (figure 04)

Les cellules principales sont les plus nombreuses, constituent 65-80 % de la population de cellules épithéliales épидидymaire totales. Ces larges cellules prismatiques présentent des caractéristiques structurales variables d'un segment à l'autre (**HERMO et ROBAIRE., 2002**). Ces cellules présentent un noyau basal ainsi que des stéréocils qui diminuent en longueur entre la tête et la queue épидидymaire. De plus, la hauteur des cellules diminue, alors que leur largeur augmente, tout au long du canal. Ces cellules prismatiques sont très actives quant au transport et à la sécrétion de petites molécules organiques, à la synthèse et à la sécrétion de protéines, et à l'absorption du fluide et de particules (**ROBAIRE et VIGER, 1995**). Ces cellules ne se divisent pas chez l'adulte (**HERMO et ROBAIRE., 2002**).

b. Les cellules apicales

Ces cellules se trouvent généralement dans la tête de l'épididyme mais peuvent aussi se voir dans d'autres secteurs de l'épididyme tel que la zone intermédiaire. Elles ont un noyau sphérique en position apicale et n'entrent pas en contact avec la membrane basale (**MARTINEZ-GARCIA et al., 1995**). Elles établissent une expression de glutathion-S-transférase et des enzymes lysosomales différentes des cellules ciliées et leur cytoplasme est très riche en mitochondries (**HERMO et al., 2004**). Les protéines sécrétées par ces cellules sont différentes de celles produites par les autres types de cellules (**ÉMOND., 2007**). Leurs fonctions résident dans la capacité d'endocytose (**MARTINEZ-GARCIA et al., 1995**) et de production d'enzymes protéolytiques (**ÉMOND., 2007**), et interviennent dans l'acidification du fluide épидидymaire (**MARTINEZ-GARCIA et al., 1995**).

c. Les cellules claires

Ces cellules sont larges, contiennent un grand nombre de vésicules de tailles différentes dans leur région apicale, d'endosomes et de lysosomes dans la région centrale et des gouttelettes lipidiques dans leur partie basale (**ROBAIRE et VIGER., 1995**). Cette distribution d'organites est cohérente avec une fonction de l'élimination active du matériel depuis la lumière épидидymaire (**BRITAN., 2006**). En effet Elles ont une capacité d'endocytose plus grande que celle produite par les cellules principales qui leur sont adjacentes. Elles absorbent un grand nombre de protéines de manière spécifique et participent à la capture de composants provenant du fluide et des gouttelettes cytoplasmiques détachées du flagelle (**SERRE et ROBAIRE., 1999**). Ces cellules serviraient activement à enlever le matériel de la lumière du tubule (**ROBAIRE et VIGER., 1995**).

De plus, les cellules apicales ont un rôle dans l'acidification du fluide épидидymaire.

d. Cellules en halo

Ces cellules sont présentes sur toute la longueur de l'épididyme elles se situent habituellement à la base de l'épithélium (**HERMO et ROBAIRE, 2002**). Leur cytoplasme renferme un grand nombre de granules très denses. Elles renferment aussi un grand nombre de mitochondries, de petites vésicules apicales et plusieurs réticulums endoplasmiques (**HERMO et al., 2004**). Elles sont petites, avec une bordure étroite et possèdent un cytoplasme clair. Le nombre de ces cellules augmente avec l'âge des mâles. Il a été suggéré qu'elles seraient composées de lymphocytes T et leurs actions seraient impliquées dans la barrière immunologique de l'épididyme. Il s'agirait donc d'un système immunitaire primaire pour cet organe (**SERRE et ROBAIRE, 1999**).

e. Cellules basales

Les cellules basales représentent 10-20% de la population des cellules épithéliales de l'épididyme. Ce sont de petites cellules allongées localisées tout au long du canal épидидymaire, elles sont à proximité de la membrane basale, elles forment un réseau en dessous des cellules principales (**SORANZO et al, 1982**). Elles ne sont pas en contacte directe avec la lumière du tubule. Ces cellules possèdent des puits recouverts dans le plasma du côté opposé à la membrane basale, ce qui laisse suggérer des récepteurs servant de médiateur entre les facteurs provenant des cellules principales et ceux venant du sang (**ÉMOND., 2007**).

Elles peuvent avoir un rôle de cellules immunitaire en raison de leur capacité à l'expression de l'antigène porté par les macrophages (**ROBAIRE., 2006**), elle jouent aussi un rôle dans l'élimination des radicaux libres ainsi que dans la protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épididymaire (**ÉMOND., 2007**).

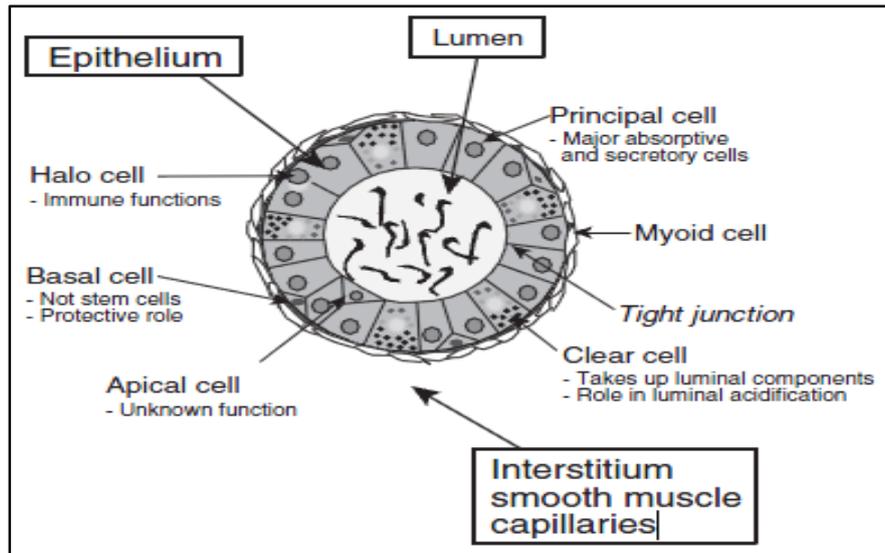


Figure 04: Organisation schématique des principaux types de cellules dans l'épididyme observée au microscope optique des trois compartiments de l'épididyme ainsi que la position relative et de la distribution de chacun des principaux types de cellules qui sont illustrées. Les principales fonctions associée à chaque type de cellules sont également identifiées (ROBAIRE., 2006).

II.2. Fonction de l'épididyme (figure 05)

II.2.1. Transit épидидymaire

La spermatogenèse chez le bovin dure 41 jours, les spermatozoïdes une fois libérés dans la lumière du tube séminifère, ils seront transportés à travers les canaux efférents, à leur sortie du testicule les spermatozoïdes ne sont pas matures ni fécondants. Les spermatozoïdes de taureau passent 8 à 11 jours maximum dans l'épididyme et durant ce trajet ils subissent plusieurs modifications (**ORGEBIN., 1961**).

Le transport a lieu contre une pression hydrostatique croissante du testicule à la queue de l'épididyme, et se produit même lorsque l'écoulement de fluide à partir du testicule est empêché par la ligature de l'efférent ductile.

Il est peu probable que ces mécanismes sont les seuls responsables du transport des spermatozoïdes. L'épididyme est entouré par un muscle lisse, avec une couche d'épaisseur croissante et l'innervation adrénergique est plus proximale par rapport à des régions distales. Par conséquent, le mécanisme responsable de la conduite du contenu à travers la lumière de l'épididyme en repos a été principalement attribuable au rythme de contractions musculaires du muscle lisse entourant le tubule épидидymaire.

Les contractions des muscles lisses du tubule épидидymaire et le transit des spermatozoïdes sont influencés par plusieurs facteurs, à la fois hormonaux et neuronaux (**ROBAIRE, 2006**)

II.2.2. Réabsorption de l'eau et des ions

L'épididyme a la même origine embryonnaire que les reins, c'est pour cela qu'il a une certaine ressemblance avec cette organe, surtout en ce qui concerne la réabsorption de l'eau et des ions. Chez le taureau 95% de fluide testiculaire est réabsorbé dans le segment initial de l'épididyme ce qui engendre une augmentation de la concentration des spermatozoïdes. La réabsorption de l'eau associée au mouvement des ions (réabsorption Na^+ et du Cl^- sécrétion ions K^+ et phosphates) abouti à une diminution d'un rapport Na^+ / K^+ entre la tête et la région caudale (**THIBAUT et al., 2001**).

L'importance physiologique de la micro-ionique n'est pas claire, mais elle peut être impliquée dans le développement de la mobilité des spermatozoïdes (**ROBAIRE, 2006**).

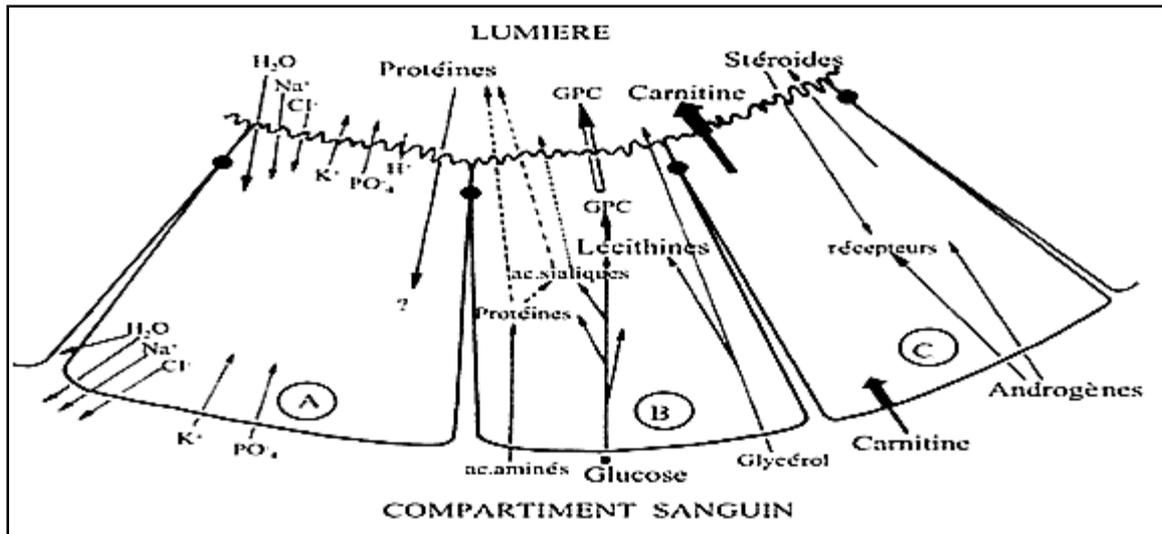


Figure 05 : Fonction de l'épithélium épididymaire (THIBAUT *et al.*, 2001)

A : fonction de réabsorption, B : fonction de sécrétion, C : fonction de concentration

II.2.3. Action des Protéines

L'épididyme a deux fonctions, réabsorption d'eau, sécrétion et absorption des protéines, ces deux fonctions sont responsables d'augmentation de la concentration luminale et des spermatozoïdes pendant le transport dans la partie antérieure de l'épididyme pour atteindre le maximum dans la queue ; où l'activité sécrétoire de l'épithélium est maximale en fonction du nombre de protéines néo-synthétisées et l'intensité de la sécrétion qui correspond à la concentration maximale de sperme.

Cet effet peut faciliter les interactions entre les protéines et les spermatozoïdes au niveau luminal spécifiquement dans cette région épididymaire restreinte.

On trouve aussi des protéines dans le fluide épididymaire venant des sécrétions du testicule comme l'albumine et la transferrine qui provenaient de sécrétions des cellules de Sertoli. La présence dans le liquide épididymaire de plusieurs autres protéines connus pour être intracellulaire, pourrait se traduire à partir du résidu cytoplasmique de spermatozoïdes tels que les gouttelettes cytoplasmiques ou de vésicules membranaires sécrétées par l'épithélium épididymaire. 40% des protéines trouvées chez le bovin se trouve dans les autres espèces à l'exception des deux isoformes de la gelsoline qui ne sont pas trouvés chez d'autres espèces (CLEMENCE *et al.*, 2011).

Ces protéines épididymaire ont trois rôles important, elles assurent la survie et la protection des spermatozoïdes au cours du transit dans l'épididyme, d'autres modifient le revêtement membranaire et interviennent directement dans la maturation et celles qui

collabore dans le fonctionnement de l'organe lui-même pour réguler l'activité des cellules selon les régions (THIBAUT et al., 2001).

II.2.4. Régulation du cholestérol

Durant le passage épидидymaire, les spermatozoïdes sont soumis à de nombreux changements, l'un d'entre eux est la modification de la concentration du cholestérol. Le cholestérol joue un rôle crucial pendant la maturation du sperme dans les épидидymes. L'épididyme de Taureau et de la souris ont la capacité de synthétiser le cholestérol de l'acétate [1-14C]. Cette synthèse de cholestérol s'est avérée dépendante d'androgène.

La concentration en cholestérol du sperme change lors de son passage épидидymaire elle diminue de la tête à la queue de l'épididyme. Les phospholipides également diminuent de la tête de l'épididyme à la queue chez les ovins mais elle reste relativement stable chez le rat et la souris. Dans l'épididyme, les cellules principale sécrètent dans la lumière de petites vésicules membranaire, appelées les epididymosomes. Ces sécrétions ou « ampoules » ont été repérées dans les épидидymes du taureau. Les epididymosomes ont leur propre rapport cholestérol/phospholipide variant selon les espèces de 0.5 chez la souris à 2.0 chez le taureau. Pendant le transport par l'épididyme, des epididymosomes transfèrent le cholestérol au sperme épидидymaire (STOUT., 2012).

II.2.5. Maturation des spermatozoïdes

La maturation et la capacité de se mouvoir des spermatozoïdes sont acquises par les protéines du fluide luminal tout au long de l'épididyme jusqu'à la queue où ils seront stockés (KIRCHHOFF et al., 2004).

La capacité de se mouvoir est liée au changements de concentration de différentes composantes comme les ions, l'AMPc et les protéines qui vont interagir avec le spermatozoïdes lors de son transit dans l'épididyme (ÉMOND., 2007).

Les spermatozoïdes subissent des changements structurels au cours du transit épидидymaire: la migration de la gouttelette cytoplasmique le long du flagelle des spermatozoïdes ; remodelage de la partie acrosomiale ; changements nucléaires de la chromatine des spermatozoïdes et certains organites de la queue et des changements dans la membrane plasmique (ROBAIRE., 2006).

Ces changements membranaires permettent aux spermatozoïdes de reconnaître l'ovocyte par des récepteurs spécifiques et acquièrent leur pouvoir fécondant dans la partie caudale (THIBAUT et al., 2001).

II.2.6. Protection des spermatozoïdes

Il est clair que la barrière hémato-épididyme permet la production d'un microenvironnement du liquide luminal spécialisé important pour la maturation des spermatozoïdes.

Cependant, cette barrière joue un rôle essentiel dans la protection des spermatozoïdes matures. En outre, une série de mécanismes de défense élaborés aident à protéger les spermatozoïdes du système immunitaire contre une réaction auto-immune (**ROBAIRE., 2006**).

II.2.7. Régulation des fonctions de l'épididyme (figure 06)

Le contrôle des fonctions de l'épithélium épididymaire fait appel à un réseau complexe de molécules très variées et d'origines diverses, qui vont agir spécifiquement au niveau du noyau des cellules de l'épithélium épididymaire pour réguler l'expression des gènes cibles, et réguler le complexe hormone /récepteur pour agir sur les fonctions physiologiques de cet organe. Cette liaison va permettre le recrutement de Co-régulateurs de l'ARN polymérase pour transcrire le gène cible et ainsi produire le signal de l'hormone. Cette liaison mènera entre autres à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Plusieurs gènes sont déjà connus pour être androgène dépendants comme la *Gpx5*, le *carbonicanhydrase 2* (*Car2*) et le *carbonicanhydrase 4* (*Car4*). On distingue les facteurs endocrines arrivant par la voie systémique ; les facteurs lumicrines apportés par la lumière du canal épididymaire ; et enfin les facteurs paracrines et/ou autocrines produits par les cellules avoisinantes ou les cellules elles-mêmes (**BRITAN., 2006**).

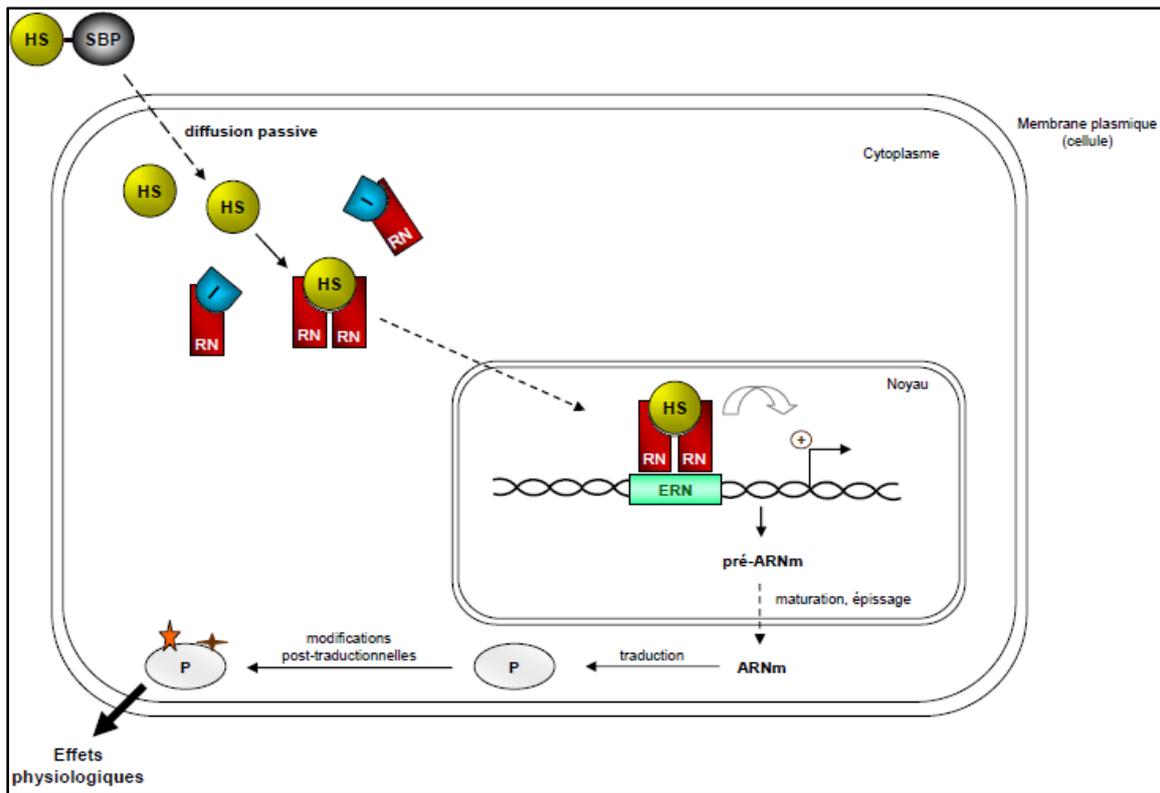


Figure 06: Mécanisme d'action des hormones stéroïdes (BRITAN A, 2006).

HS: hormone stéroïde ; SBP: protéine de transport des hormones stéroïdes (sexsteroid binding protein) ; I: inhibiteur ; RN: récepteur nucléaire ; ERN: élément de réponse au récepteur nucléaire ; P: protéine

a. Les androgènes :

L'épididyme dans sa structure et ces fonctions est en grande partie contrôlé par les androgènes. Lorsqu'on parle d'androgènes, on fait référence à la testostérone qui arrivant par voie sanguine portée par la SBP (*sexsteroid binding protein*) et par le fluide testiculaire liée à la ABP (*androgen binding protein*) au niveau de l'épididyme, et médiée par son métabolite 5 α -dihydrotestostérone (DHT) qui constitue les ligands reconnus par les récepteurs des androgènes de l'épididyme (BRITAN ., 2006).

Les androgènes exercent deux types d'effets sur l'épididyme et le tractus génital mâle : Une action trophique et métabolique générale, et une action plus spécifique au niveau de certains gènes, via l'existence de facteurs de régulation (ARE : éléments de réponse aux androgène) agissant au niveau du promoteur. Certaines protéines sont entièrement contrôlées par la testostérone tout le long du tube (THIBAUT et al., 2001).

Lors d'une castration, on perd tout le fonctionnement de l'épididyme par contre lors de l'injection de testostérone l'organe reprend son fonctionnement (JONES., 2004).

b. Interaction épididyme-testicule-spermatozoïdes:

L'épididyme dépend aussi de la présence de facteurs de fluide luminal provenant du testicule (lumicrine) ou de l'épididyme lui-même (tableau 2). Sans les facteurs testiculaires du fluide luminal, de nombreuses cellules spermatiques du segment initial vont subir l'apoptose dans les 24 heures.

Les sécrétions protéiques de l'épididyme lui-même dépendent aussi des androgènes et des facteur testiculaire (**THIBAULT et al., 2001**).

Les protéines sécrétées par l'épithélium épididymaire en une interaction directe avec la membrane du spermatozoïde au cours de la maturation (**THIBAULT et al., 2001**).

Tableau 2 : Résumé des actions hormonales de l'épididyme (**BRITAN., 2006**):

Hormone	Action dans l'épididyme
Œstrogène	Synthèse 17 β œstradiol
Progestérone	Déclenche la réaction acrosomique des spermatozoïdes, Augmentation des récepteurs à p4 lors du transit épididymaire en l'occurrence au cours de la maturation épididymaire et durant le processus de capacitation
FSH	Transport testostérone vers l'épididyme
LH	Maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme
Ocytocine	Synthétisé localement par l'épididyme. Contraction tube séminifère et du tube épididymaire. Transport des spermatozoïdes lors dutransit épididymaire. Transport des spermatozoïdes lors de l'éjaculation.
Mélatonine	Protections des cellules épithéliales et des spermatozoïdes contre dommage oxydatif.
Angiotensine II	Contrôle de transport des ions et du fluide dans l'épididyme par action paracrine et ou/autocrine de l'angiotensine II.
Prostaglandines	Sécrétion des ions et du fluide épididymaire.

III.1. Intérêt du sperme épидидymaire

Après la mort d'un animal, les spermatozoïdes dont les mâles restent vivants pendant une période déterminée. Si ces gamètes sont récupérés et employées pour produire des embryons par des techniques de reproduction assistée il est possible d'avoir des progénitures même après que les animaux soient morts (SONGSASEN et al., 1998). Dans ce contexte, la collecte des spermatozoïdes épидидymaire des animaux morts, la cryoconservation et l'utilisation de la fécondation in-vitro sont des outils utiles pour sauver le matériel à haute valeur génétique des animaux fortement productifs et à intérêt économique ou des espèces qui présentent un risque d'extinction (MARTINS et al., 2007).

III.2. Techniques de récolte du sperme épидидymaire :

On peut prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant sous anesthésie générale avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent en lui introduisant un petit tube (canule) et permettre à son extrémité d'avancer à l'extérieur à travers le scrotum pour la collection du sperme dans une petite fiole (DEUTSCHER et al., 1974).

Comme on peut aussi procéder à une collecte post-mortem à partir d'un animale mort. Trois méthodes principales de récupération de sperme épидидymaire post-mortem ont été adoptées dans différentes espèces domestiques et sauvages :

- **La méthode de découpage « cutting method »**

Cette technique consiste à réaliser plusieurs coupes avec une lame sur la partie caudale de l'épididyme et le fluide spermatique émergeant des tubules est rassemblé (Kaabi et al., 2003).

- **La méthode « float-up »**

La méthode **float-up** a été décrite par CARY et al., en 2004. La partie caudale de l'épididyme et le canal déférent sont incisés avec un scalpel dans une boîte de pétris, lavé avec 2.5 ml de solution (alcool à 70°) chauffée à 37°C et ensuite transférée dans une deuxième boîte de Pétri et lavée encore avec 2.5 ml de la même solution (alcool à 70°). La suspension de sperme obtenue à partir des deux étapes de lavage est filtrée à travers une passoire inoxydable de 200 µm et rassemblée dans un tube en verre (CARY et al., 2004).

- **La méthode « retrograde-flushing »** (figure 07)

La méthode de rinçage rétrograde est décrite par MARTINEZ-PASTEUR et al., en 2006. Les parties caudales et les canaux déférents sont isolés du reste de l'épididyme en faisant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corps et de la partie caudale proximale. Ensuite, une aiguille est introduite dans la lumière du canal déférent. Le fluide spermatique est alors rincé avec une seringue chargée avec 4 ml d'une solution isotonique chauffée à 37°C dans une direction rétrograde en allant du canal déférent vers la partie caudale (MARTINEZ-PASTEUR et al, 2006).

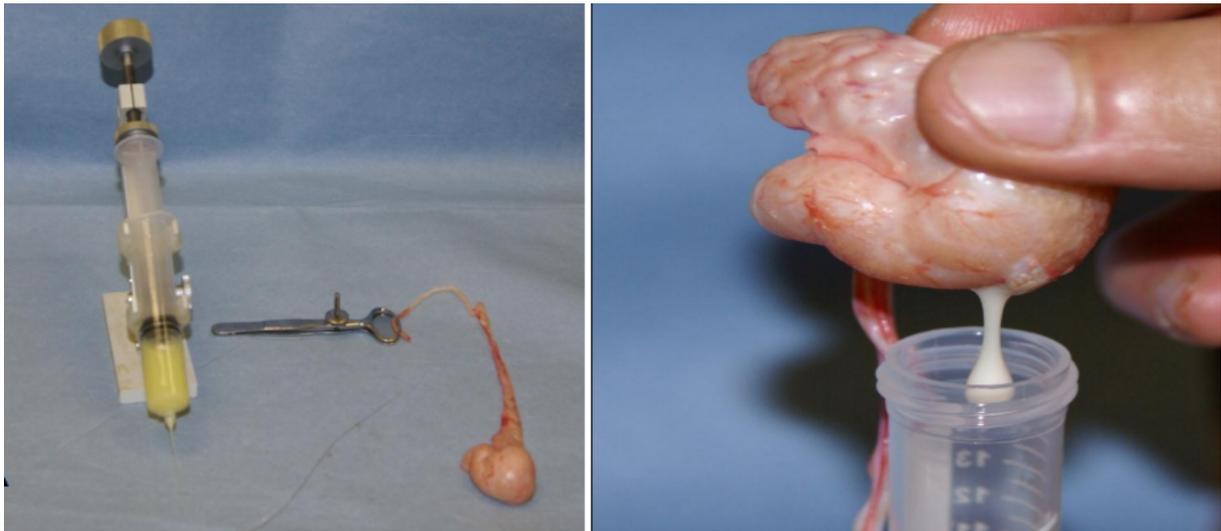


Figure 07 : Collecte de semence avec la méthode « **retrograde-flushing** » (STOUT., 2012)

Dans le but d'optimiser ces dernières méthodes, plusieurs auteurs ont fait des comparaisons sur le rendement qualitatif et n'ont trouvé aucune grande différence.

Le retrograde-flushing a été utilisé chez plusieurs espèces, l'étalon (CARY et al., 2004), le cerf, et le taureau (TURRI et al., 2011). Cette méthode semble donner de meilleurs résultats quand elle est comparée au « float-up » et à la méthode « cutting » (MARTINEZ-PASTEUR et al, 2006).

Les différentes méthodes d'évaluation nous permettent de connaître la qualité de la semence au niveau macroscopique et microscopique. La qualité de la semence est fortement corrélée à sa fécondance, sa viabilité, sa résistance dans les voies génitales femelles et sa résistance aux différentes techniques de conservation. Une évaluation de la qualité spermatique est donc indispensable à réaliser avant toute utilisation de la semence pour détecter d'éventuelles anomalies des spermatozoïdes (**POSIERE., 2002**).

IV.1. Evaluation macroscopique

Il s'agit de la première étape à réaliser juste après la récolte. On procède à un examen visuel du sperme dans le tube de récolte qui permet d'apprécier le volume, la couleur et la consistance de la semence.

IV.1.1. Volume

Il varie en fonction de l'âge, de la race, de la préparation du taureau, de l'alimentation et pour un même taureau, des facteurs psychiques et environnementaux. Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte gradué (**CABANNES., 2008**).

Pour les taureaux de la race Holstein, le volume de l'éjaculat est de 2 à 13 ml avec une moyenne de 6.6 ml. Quant au volume du sperme épидidymaire, il varie entre 3.6 et 6.0 ml avec une moyenne de 4.86 ml (**ALAPATI et al., 2009**).

IV.1.2. Couleur:

La couleur est analysée par simple observation de la semence dans le tube de collecte ; un sperme normal est de couleur blanchâtre à blanc-jaunâtre (**RIGAL., 2008**).

La variation et les changements de couleur peuvent être causés par :

- Diminution de concentration
- Présence de sang, phénothiazine (Rosâtre)
- Présence d'éléments sanguins dégénérés (Brunâtre) (**HANZEN., 2008**)

IV.1.3. Viscosité et consistance

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet la semence est d'autant plus visqueuse que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse » (**CABANNES., 2008**).

La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signifie une pathologie (**DUPLAN et PAREZ., 1987**).

IV.1.4. PH

La mesure du pH apporte également des renseignements non négligeables puisque toute variation du pH par rapport au pH optimum va avoir une répercussion néfaste sur les spermatozoïdes.

Le pH d'une semence bovine normale est être 7 et 7.5 où les valeurs des caractéristiques de motilité, de viabilité, et l'activité mitochondriale sont élevées.

Le pH inférieur à 6.5 ou supérieur à 8 a comme conséquence la diminution de la plupart des paramètres (paramètres cinétiques, viabilité, activité mitochondriale, et morphologie) (CONTRI et al., 2012).

IV.2. Evaluation microscopique

En plus de l'évaluation macroscopique, il existe une autre méthode plus approfondie qui est l'analyse microscopique. Elle consiste à étudier la motilité, la concentration et la morphologie des spermatozoïdes. Ces examens sont réalisés pour déterminer la qualité de la semence.

IV.2.1. La mobilité massale

La motilité massale est effectuée à 38°C à partir du sperme pur, immédiatement après la récolte.

La conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence engendre une turbulence observée sous forme de vague avec un microscope à faible grossissement.

Une note de 0 à 5 est attribuée en fonction de l'intensité des vagues observables. Voir le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Détermination de la note de motilité massale de la semence (CHEMINEAU et al., 1993).

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

La mobilité massale peut varier selon les facteurs suivants (HANZEN., 2008) :

- Concentration
- Pourcentage de spermatozoïdes mobiles
- Vitesse de déplacement des spermatozoïdes
- Présence de contaminants chimiques, urine ...

IV.2.2. La mobilité individuelle

a. Evaluation avec la méthode classique

Le sperme est examiné au fort grossissement (x200) entre lame et lamelle au microscope optique après dilution afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le pourcentage de spermatozoïdes qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés spermatozoïdes fléchants (DUMONT et FONTBONNE., 1992 ; FONTBONNE., 1995).

Tableau 4 : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes (CHEMINEAU et al., 1993).

Note	Motilité individuelle
0	Pas de déplacement des spermatozoïdes
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblements du spermatozoïde, oscillations de la queue
2	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement
3	Les spermatozoïdes effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement
4	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe
5	Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes

Cet examen ne permet cependant pas de trancher sur la fertilité du mâle avec certitude car des spermatozoïdes mobiles peuvent présenter des anomalies morphologiques de la membrane plasmique ou de l'acrosome qui auront des répercussions sur la fertilité mais pas sur la mobilité (EILTS., 2005).

b. Evaluation avec analyseur assistée par ordinateur

Des systèmes d'analyse vidéo-micrographique assistée par ordinateur (système CASA) permettent une mesure automatique objective. Ces appareils ont connu un essor important ces

dernières années. Leur principe est basé sur l'étude des trajectoires de la tête du gamète qui sont un bon reflet de l'activité flagellaire. Après acquisition (enregistrement avec un logiciel dédié) et mémorisation des images et séquences des têtes spermatiques, les données sont analysées par un logiciel spécifique à chaque système. L'étude d'une trajectoire peut se faire de façon précise à partir de 30 points. Une centaine de trajectoires peuvent être analysées en quelques secondes (**GRIZARD et JIMENEZ., 1997**).

Les paramètres couramment retenus pour l'évaluation du mouvement sont la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse linéaire (VSL), l'index de linéarité (LIN), l'amplitude du débattement latéral de la tête (ALH) et la fréquence de rotation de la tête (BCF) (**GUERIN et JOUANNET, 1988 ; LANNOU et al., 1992**).

Ces systèmes ne doivent pas a priori remplacer les analyses classiques mais ils permettent de mettre en évidence certaines anomalies du mouvement non décelables par l'observation simple.

IV.2.3. La Numération ou concentration

La numération est la détermination du nombre de spermatozoïdes dans un échantillon de sperme. Elle peut être effectuée par des méthodes automatisées comme le spectrophotomètre ou par des méthodes manuelles en utilisant des lames spécialisées comme la cellule de Thoma (**LOVE., 2012**).

Plusieurs chambres de comptage sont utilisées pour procéder au comptage classique de la concentration (Thoma, Neubauer, Buker-Turk et Makler). Les différences entre les hematocymètres sont liées à la méthode de calcul (**MAKLER., 1984**).

a. La Cellule de Thoma

Avec une dilution de la semence au centième avec une solution de fixation réalisé avec du NaCl et formol. Après comptage de 5 carrées parmi les seize que contient la cellule de Thoma, une formule permet ensuite de calculer la concentration des spermatozoïdes en fonction du taux de dilution (**BRIFFAUT., 2008**):

$$\text{Spermatozoïdes / mL} = \underbrace{[(R1+R2+R3+R4+R5) / 5]}_{\text{Moyenne des Spermatozoïdes par carré}} * \underbrace{100}_{\text{Facteur de dilution}} * 250 * 1000$$

Moyenne des Spermatozoïdes par carré Facteur de dilution

R : nombre de spermatozoïdes par carré

b. Le spectrophotomètre

Dans les méthodes automatisées, on utilise le plus souvent un spectrophotomètre.

Avec un spectrophotomètre, on mesure l'absorbance d'un flux lumineux à travers le sperme dilué à une longueur d'onde 535 nm. Dans la cuve de 1 ml de spectrophotomètre on dilue 20 à 40 μ l de sperme dans un sérum physiologique. Le rapport de la densité optique finale sur la densité optique émise est corrélé à la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon considéré.

C'est une méthode de comptage rapide mais peu précise si la semence contient des débris et des gouttelettes cytoplasmiques cela affectera l'exactitude de cette méthode (CHRISTENSEN et al., 2004).

IV.2.3. La morphologie

L'étude morphologique se fait par observation au microscope après la coloration à l'éosine-négrosine, afin de détecter les anomalies de forme de la tête et de la queue du spermatozoïde qui sont classées en deux catégories: majeures et mineures (figure 8).

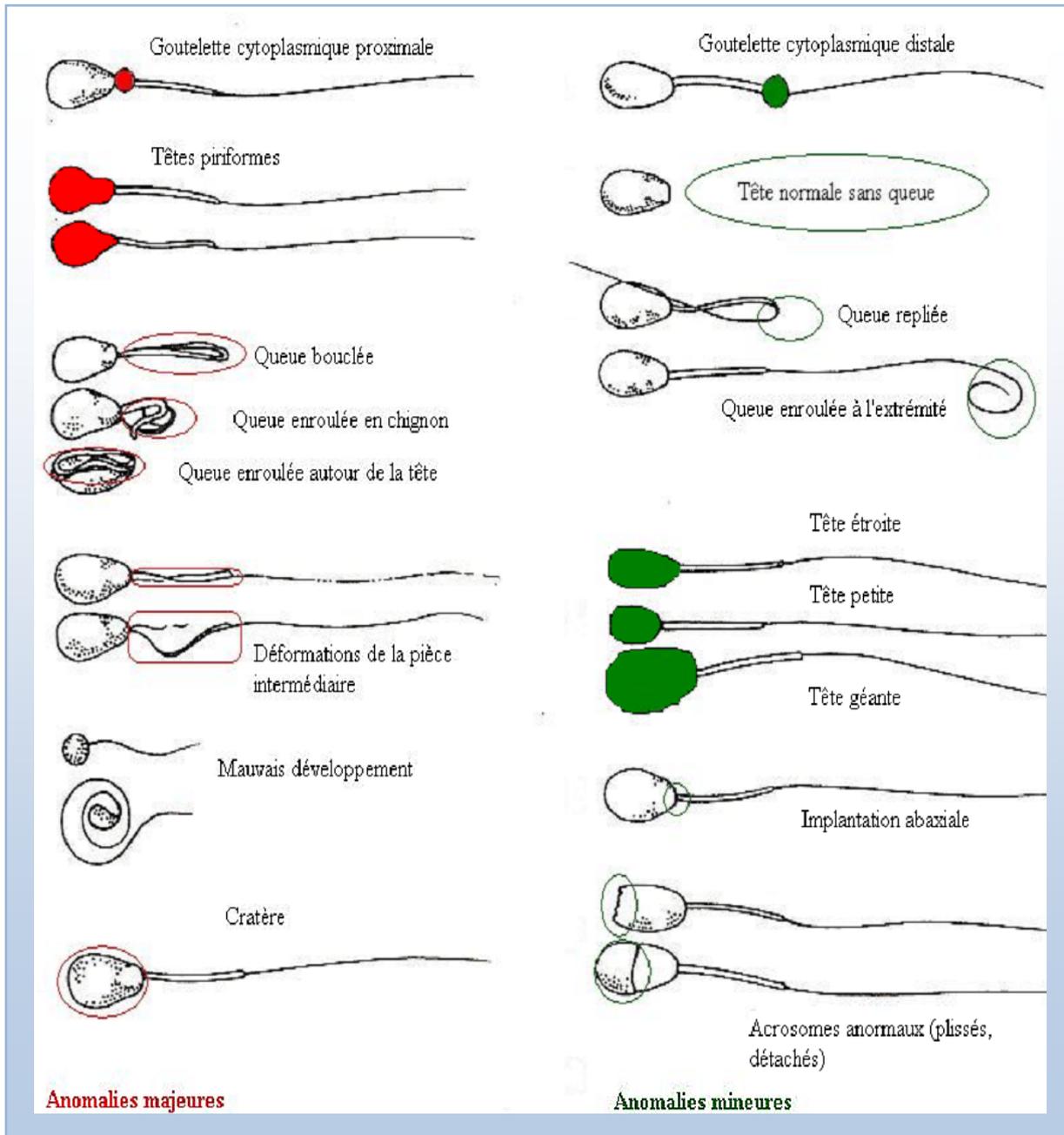


Figure 08: Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes (OTT et al., 1987)

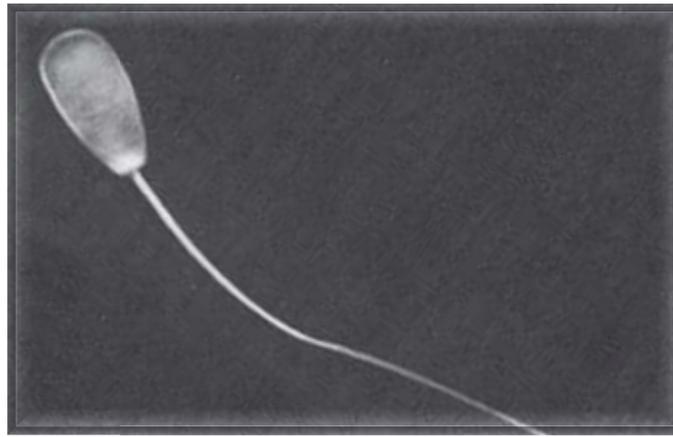


Figure09: Spermatozoïde du taureau (HANZEN., 2008)

Plusieurs études ont montré que les défauts de morphologie des spermatozoïdes peuvent être à l'origine d'un dysfonctionnement pendant la spermatogenèse (ZEROBIN et BERTSCHINGER., 1978), le transfère épидидymaire (VAN RENSBURG *et al.*, 1966), le stockage dans l'épididyme (BLOM., 1950 ; SWANSON et BOYD., 1962), pendant l'éjaculation où après l'éjaculation (BIALY et SMITH, 1958 ; WILLIAMS et SAVAGE, 1927).

IV.2.4.La viabilité

Deux teste se présente à nous pour apprécier le pourcentage des spermatozoïdes vivants :

a. Le test hypo-osmotique

Ce test permet d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. Il fut utilisé dès 1966 sur les spermatozoïdes de taureaux. En effet, les cellules présentant une membrane plasmique intacte ont la capacité de se déformer, ce phénomène est particulièrement visible au niveau de la queue des spermatozoïdes comme le montre la figure 10 (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

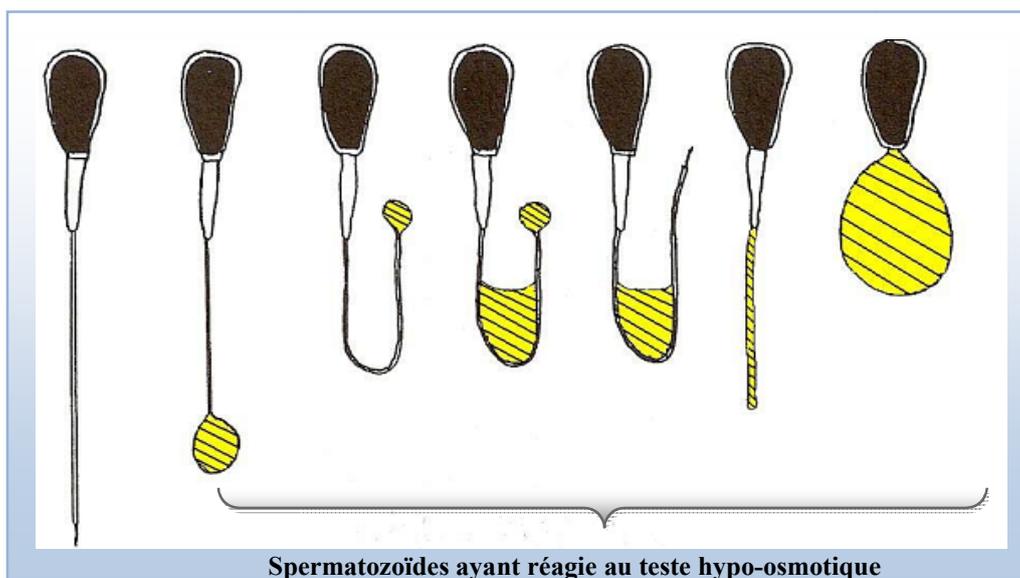


Figure 10: Modifications morphologiques des spermatozoïdes après le test hypo-osmotique.

Dans une solution hypo-osmotique, les spermatozoïdes normaux prennent un aspect recourbé de leurs flagelles voire enroulé alors que les anormaux ne se déforment pas et restent longilignes (**FONTBONNE., 1999**).

La préparation de la solution hypo-osmotique varie selon les auteurs : Chun-Xia a pris 7,35g de citrate de sodium et 13.51g de fructose dissous dans un litre d'eau (**ZOU et al., 2000**) et HISHINUMA et SEKINE ont utilisé de l'eau ultra-pure comme solution hypotonique.

La semence est mélangée à une solution hypotonique puis le mélange est incubé au bain-marie à 37°C. Les spermatozoïdes sont ensuite observés au microscope optique à contraste de phase. Un volume de 40 µL de sperme est mis dans 1ml de la solution hypo-osmotique ajustée à 100±5 mOsm par dilution avec l'eau distillé puis incubé à 37°C pendant 1h (**BACINOGLU., 2008**). Une analyse sous lame et lamelle au microscope optique avec un grossissement 40, suivie d'une observation d'un totale de 200 spermatozoïdes dans des champs différents pour évaluer les cellules qui ont une queue enroulé et ainsi définir le pourcentage des spermatozoïdes vivants (**ZOU et al., 2000**).

b. Le teste d'Eosine-Négrosine (Figure 11)

Il s'agit d'une coloration d'exclusion, car les membranes des spermatozoïdes vivants ne laissent pas pénétrer le colorant (reste blanc) alors que celles des spermatozoïdes morts laissent pénétrer le colorant (deviennent roses) (**SWANSON et BEARDEN., 1951**).

On prend une goutte de semence pure ou diluée et on la mélange avec deux gouttes d'éosine-négrosine, puis on réalise un frottis à partir du mélange obtenu. Une fois la lame séchée, on procède à une observation et un comptage de 200 cellules au microscope optique avec un grossissement x100 en variant les champs d'observation (**CABANNES., 2008**).

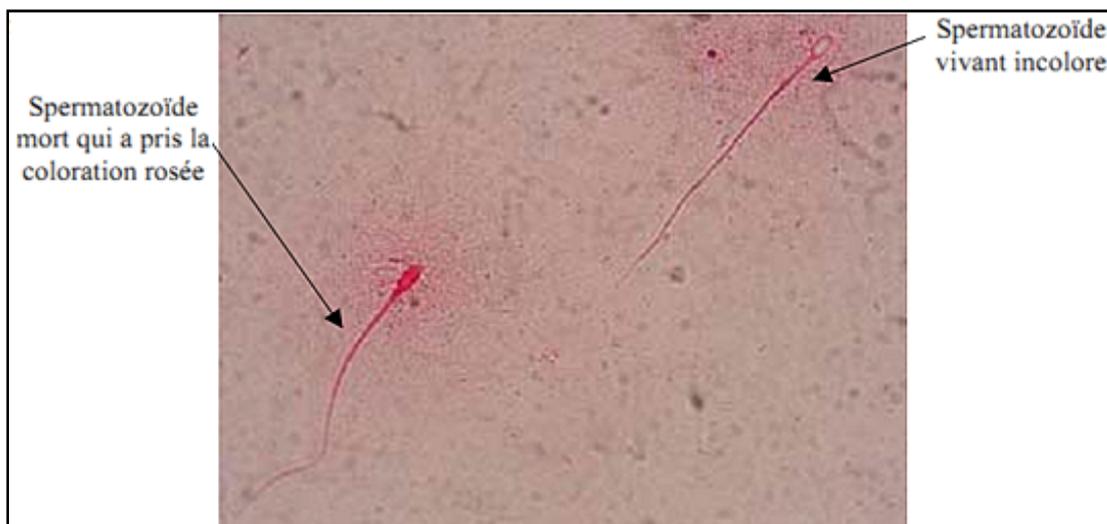


Figure 11: Spermatozoïde mort et spermatozoïde vivant après coloration à l'éosine-négrosine (**POSIERE., 2002**)

Partie expérimentale

I. Obtention de spermatozoïdes épидидymaire :

Pour l'ensemble des expériences du travail présenté, les spermatozoïdes épидидymaire ont été recueillis sur des organes prélevés après abattage de l'animal à l'abattoir communal de Bejaia. Le contenu de la région caudale est récupéré à l'aide de la méthode de **rinçage rétrograde** « **retrograde-flushing** ».

I.1. Récupération des organes :

Les testicules des taureaux charolais ont été récupérés à l'abattoir tôt le matin pendant les mois Février-Mars juste après abattages des animaux puis transportés au laboratoire à température ambiante.

I.2. Dissection de l'épididyme :

Le matériel qui est utilisé pour la dissection est un Bistouri (lame tranchante), une Pince et des ciseaux.

La dissection de l'épididyme est réalisée comme suite :

- Les tissue qui enveloppent le testicule et l'épididyme ont été enlevé avec un bistouri (figure 12)



Figure 12: Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.

- Puis on isole complètement l'épididyme et le canal déférent du testicule avec un bistouri et on le rince avec de l'eau et il est séché avec du papier absorbant (Figure 13).



Figure 13: Epididymes juste après leurs dissections et leurs isolations des testicules

- Puis il est nettoyé des tissus en excès et du tissu conjonctif est isolé avec les vaisseaux Sanguins pour éviter toute contamination de la semence avec le sang (Figure 14).



Figure 14: l'épididyme après l'avoir dépourvu des tissus conjonctifs

I.3. Récolte de la semence :

Comme indiqué dans la figure 15, la semence est récoltée avec la méthode rétrograde : l'aiguille d'une seringue remplie d'air (3) est introduite dans la lumière du canal déférent, un clamp est placé juste à la fin de la queue et début du corps épидидymaire (1). Une incision est réalisée au niveau de la queue de l'épididyme (2) et un tube gradué (Eppendorf) est placé juste en dessous afin de récolter la semence (4).

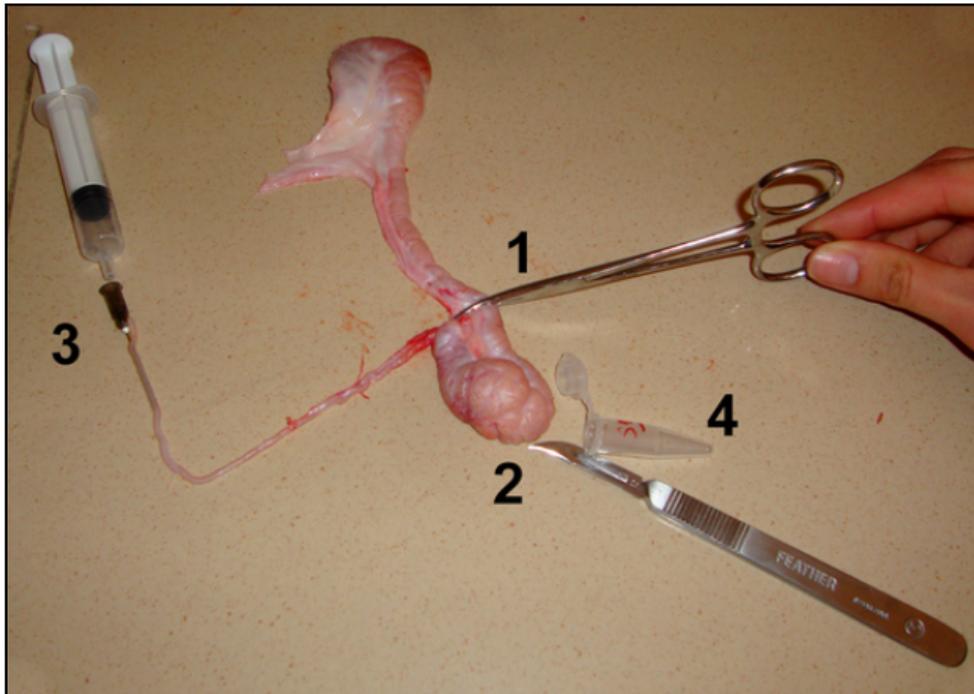


Figure 15: Récolte de la semence par la méthode rétrograde

- La semence est collectée dans un tube et elle est fin prête à être analysée



Figure 16 : Semence épидидymaire pure et fraîchement collectée

II. Evaluation de la qualité de la semence épидидymaire :

Après la récolte on passe aussitôt possible à l'évaluation du sperme pour l'analyse macroscopique et microscopique (volume, couleur, mobilité massale, mobilité individuelle, concentration, morphologie et viabilité).

II.1. Analyse macroscopique :

C'est une analyse faite à l'œil nu elle consiste à mesurer le volume récolté et de noter la couleur de la semence.

II.1.1. Volume :

Le tube utilisé pour la récolte est un eppendorf gradué donc le volume est lu directement sur le tube.

II.1.2. Couleur

La couleur de la semence est analysée par simple observation dans le tube de collecte.

II.2. Analyse microscopique

II.2.1. Mobilité massale :

Une goutte de semence est mise sur une lame puis observée sous microscope (figure 17) optique avec un grossissement 10 pour évaluer la mobilité massale qui est noté de 0 à 5.

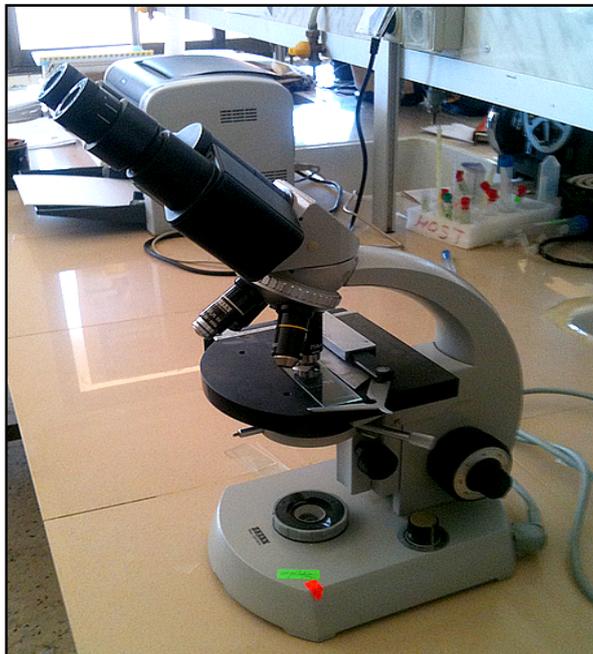


Figure 17 : Microscope ayant servi à l'évaluation des caractéristiques microscopiques de la semence.

II.2.2. Mobilité individuelle

La dilution est faite avec le tris buffer à 1 :7, puis à l'aide d'une pipette de 10µl une goutte est mise entre lame et lamelle puis observée avec un microscope optique avec un grossissement 40, une note est attribuée selon une échelle de 0 à 5.

II.2.3. La concentration :

La cellule de Thoma est utilisée Pour calculer la concentration des spermatozoïdes. Une solution hypertonique (solution de fixation) est préparée avec 10ml de formole dilués dans un litre de NaCl, le but est de tuer les spermatozoïdes pour faciliter leur comptage.

- Un volume de 10µl de semence pure est dilué dans un volume (1 :400) de solution de fixation puis laissé reposer pendant 10 minutes.
- Les deux chambre de la cellule de Thoma ont été remplies avec 10µl chacune, laissés stabiliser pendant 10 minutes. Le comptage des spermatozoïdes est fait sous microscope optique au grossissement 40.
- La concentration des spermatozoïdes est donnée en millions par ml.

II.2.4. Viabilité :

Pour ce teste la méthode qui est choisi est le teste hypo-osmotique. La solution hypo-osmotique est préparée avec une solution isotonique + eau distillé (1 :1).

Pour effectuer ce teste on a mélangé 10µL de semence avec 40µl d'eau distillée 60 mOsm puis incubés pendant 10 minute.

Sous microscope optique au grossissement x40, les cellules gonflées sous forme du nombre 8 représentent les cellules spermatiques viables et les autres qui non pas cette aspect sont considérées comme mortes. 200 cellules ont été comptées dans différent champs d'observation. Le pourcentage des cellules vivantes est donné comme suit :

$$\% \text{ SPZ vivants} = \frac{\text{Nombre de SPZ gonflés} \times 100}{\text{Nombre de SPZ totaux comptés}}$$

II.2.5. Morphologie :

Le test éosine-négrosine est utilisé: une goutte de 10µl de semence diluée est mise sur une lame avec une goutte d'éosine et deux gouttes de négrosine le tout est mélangé avec un embout.

Le frotti est réalisé puis la lame est laissée sécher. 200 cellules sont comptées dans différent champs.

Les différentes formes des cellules spermatiques sont évaluées (cellules normales, anomalies de la tête, anomalies du flagelle, anomalies de la pièce intermédiaire).

III. Evaluation de Conservation de la semence collectée

Dans notre travail nous avons étudié la conservation du sperme épидидymaire collecté. Nous avons préparé des milieux de conservation que nous avons testés à température ambiante et à 5°C (réfrigérateur).

III.1. Préparation des complexes cyclodextrines/cholestérol/ Vitamine E

Les complexes sont préparés par les étudiants du Département du Génie des Procédés Pharmaceutiques de l'Université de Bejaïa, dans le cadre de réalisation d'un mémoire de Master. Comme la vitamine E (puissant antioxydant) n'est que partiellement soluble dans un environnement hydrophile (milieux de conservation des spermatozoïdes), sa solubilité est augmentée par les cyclodextrines. Ces dernières sont des molécules qui présentent une cavité lipophile qui piège la vitamine E et une périphérie hydrosoluble qui permet la solubilité dans le milieu de conservation et véhiculer ainsi la vitamine E vers les cellules spermatiques. La Vitamine E exerce son effet protecteur en luttant contre le stress oxydatif qui survient lors de la conservation des gamètes. Le cholestérol est aussi ajouté pour renforcer la membrane cytoplasmique pour mieux résister à ce stress. Le cholestérol est incorporé dans les cavités de cyclodextrines pour augmenter sa solubilité. En plus des cyclodextrines, le PEG (polyéthylène glycol) est utilisée pour augmenter la solubilité de la vitamine E et du cholestérol. On a utilisé les milieux représentés dans le tableau ci-dessous en deux séries :

Tableau 05 : Liste des milieux utilisés dans la conservation des spermatozoïdes

Milieu	Nom complet
Vit E	Vitamine E
PMBCD	Perméthyl Beta Cyclodextrine
BCD C1	Beta Cyclodextrines concentration 1
BCD C2	Beta Cyclodextrines concentration 2
HPBCD	Hydro Perméthyl Beta Cyclodextrines
PEG C1	Polyéthylène Glycol concentration 1
PEG C2	Polyéthylène Glycol concentration 2
PMBCD-Vit E	Perméthyl Beta Cyclodextrines-Vitamine E
BCD-Vit E	Beta Cyclodextrines-Vitamine E
HPBCD-Vit E	Hydro Perméthyl Beta Cyclodextrines-Vitamine E
PEG-Vit E	Beta Cyclodextrines-Vitamine E
PMCD	PerméthylCyclodextrines
COMPELEXE	Cyclodextrines-Cholestérol- Vitamine E

CONTROLE	Tris Buffer
CHL	Cholestérol
PEG-CHL	Polyéthylène Glycol-Colesterol
PMBCD-CHL	Perméthyl Beta Cyclodextrines-CHL
HPBCD-CHL	Hydro-perméthyl Beta Cyclodextrines
HPBCD	Hydro-Perméthyl Beta Cyclodextrines

- **Série 01 :**

Les temps d'analyses sont faits à T0 et T1 en température ambiante

- **Série 02 :**

Les temps d'analyse à T0 à température ambiante, à T1 après 2h de réfrigération à 5°C et à T2 après 24h de réfrigération.

III.2. Analyse informatique de la mobilité sperme épидидymaire :

Après dilution 1:7 des semences les différents milieux de conservation, on a procédé à leur analyse par un système d'analyse informatique de la mobilité spermatique de marque SCA (Sperm Class Analyzer) (figure 18). Cet outils est basé sue l'analyse automatique de vidéos de spermatozoïdes en mouvement, il génère des valeurs objectives comme les vitesses de progression des gamètes. Les échantillons sont analysés à T0 et à différents autres temps jusqu'à ce que la mobilité devienne de mauvaise qualité.

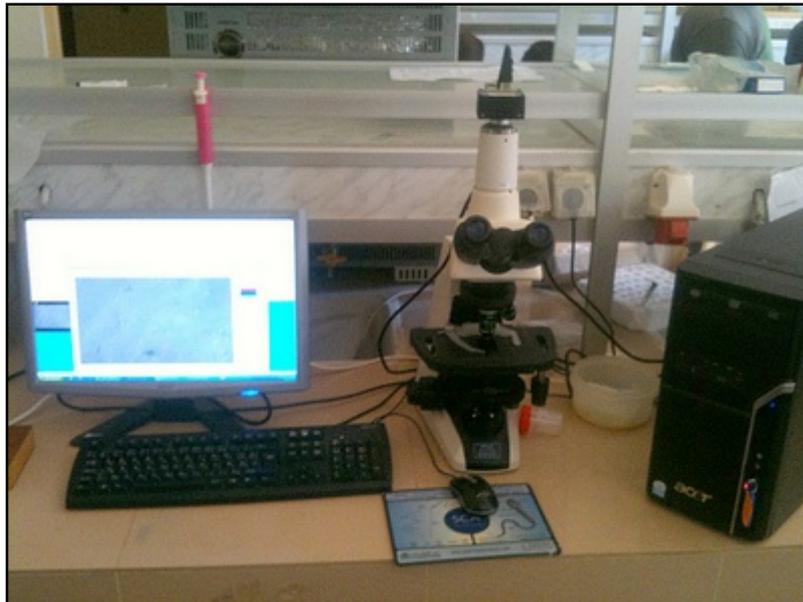


Figure 18 : Analyseur informatique de marque SCA utilisé pour le calcul des vitesses de progressions des spermatozoïdes.

Résultats et discussion

II. 1 Analyse des paramètres spermatiques épидидymaire.

Dans le cadre du présent travail, nous nous sommes fixés comme objectif de répondre à cette question. Ainsi, des testicules de charollais sont récupérés au niveau de l'abattoir de Bejaïa et le sperme épидидymaire est collecté, pour enfin analyser les différents paramètres spermatiques.

Sur la figure 19, sont représentés tous les paramètres analysés. Durant notre travail nous avons utilisés 10 testicules de charollais un seul de la race limousine, elle aussi importée en Algérie pour son potentiel viandeux. Cependant cette dernière, est faiblement présente et c'est la raison qu'on ne l'ait trouvée qu'une seule fois à l'abattoir. La mobilité massale, la morphologie et la concentration n'ont pu être réalisées pour la race limousine.

Pour le volume de sperme collecté (figure 19 A), il est en moyenne de 0,64ml pour le charollais et de 0,5ml pour le taureau limousin. Chez le charollais 50% des individus ont des volumes supérieurs à 0,5ml. Ces volumes sont dans l'ordre rapporté pour le sperme épидидymaire où GOOVAERTS (2006) signale une moyenne de 0,83ml. ALAPATI (2009) lui, rapporte un volume moyen de 4,86ml. Cependant, ce dernier a utilisé la méthode de collecte rétrograde par rinçage et où le volume de la semence pure est comptabilisé avec le liquide de rinçage.

Pour la concentration du sperme épидидymaire (figure 19 B), elle varie d'un individu à l'autre, avec une concentration moyenne de $583,86 \times 10^6$ spz/ml, la concentration minimale est de $136,25 \times 10^6$ spz/ml, et la concentration maximale de 802,25 spz/ml. Ces variations pourraient être liées à l'âge de l'animal, et donc à l'état de maturation de la fonction sexuelle. Malheureusement nous n'avons pas pu obtenir des renseignements sur ce facteur. MARTINS *et al*, en 2007 a rapporté une concentration moyenne de 440×10^6 spz/ml alors qu'ALAPATI *et al*, en 2009, a rapporté une concentration moyenne de $1,2 \times 10^9$ spz/ml. Les résultats obtenus dans le cadre de notre travail, semblent dans la gamme de ce qui est rapporté pour le sperme épидидymaire.

Pour la mobilité massale (figure 19 C), elle ne présente pas les mêmes valeurs quand elle est estimée sur du sperme pur et quand ce dernier est dilué dans un milieu à base de tris. En sperme pur, elle est en moyenne de 1,5 alors que dans le sperme dilué elle est de 3,25. Ce fait est lié à la nature même du sperme épидидymaire qui est dépourvu des sécrétions de glandes annexes qui sont riches en molécules activatrices de la mobilité. Le milieu tris contient du glucose qui a probablement stimulé la mobilité spermatique. Nos résultats de

mobilité massale sont similaires à ceux rapportés par GOOVAERTS (2006), MARTINS (2007) et TURRI (2011).

Pour la mobilité individuelle (figure 19 D), il ne semble pas exister de différences entre le taureau charolais et le limousin. Le charolais présente une moyenne de 2,89 ce qui est proche de ce qui est rapporté par GOOVAERTS 2006 pour la race Holstein.

Concernant la viabilité (figure 19 E), là aussi on ne décèle pas une différence entre les deux races avec des valeurs similaires à la bibliographie (GOOVAERTS., 2006; TURRI., 2011).

L'analyse de la morphologie (figure 19 F), montre un pourcentage moyen de 77,33% en spermatozoïdes normaux, ce qui est en accord avec MARTINS (2007), TURRI (2011). Cependant GOOVAERTS (2006), n'a rapporté que 37,3% de spermatozoïdes normaux pour le sperme épидидymaire, ceci pourrait être lié à l'âge des animaux, ou à l'endroit de récolte au niveau de l'épididyme, les spermatozoïdes collectés au niveau de la queue de l'épididyme sont ceux présentant le moins d'anomalies.

Nous pouvons donc retenir sur la base de l'ensemble des paramètres que la qualité du sperme du charolais reste tout à fait normale et probablement apte à assurer une fertilité normale.

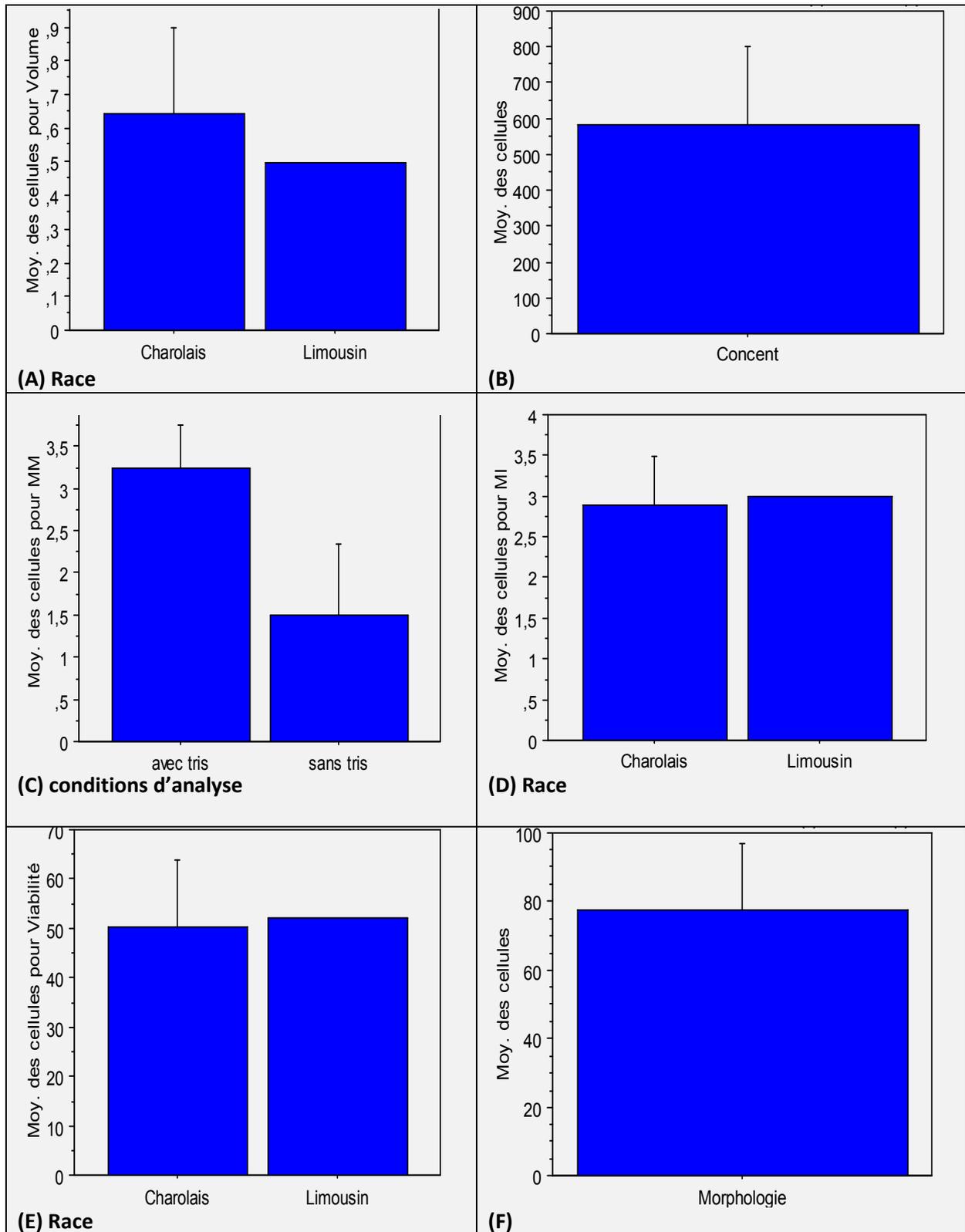


Figure 19 : Histogrammes représentant les paramètres spermatisques épидидymaire de charollais. A : Volume (ml), B : concentration spermatisques ($\times 10^6$ Spermatozoïdes/ml), C : mobilité massale (note), D : mobilité individuelle (note), E : Viabilité (%), F : morphologie (%).

II.2. Conservation du sperme épидидymaire

II.2.1 Evolution des vitesses des spermatozoïdes à température ambiante.

Dans l'évaluation de la qualité du sperme conservé nous avons utilisé un analyseur informatique qui permet de générer des résultats quantitatifs objectifs qui nous renseignent sur la qualité des gamètes. Il permet notamment de mesurer les vitesses de progressions. Sur la figure 20 sont représentées les VSL des spermatozoïdes conservés à température ambiante.

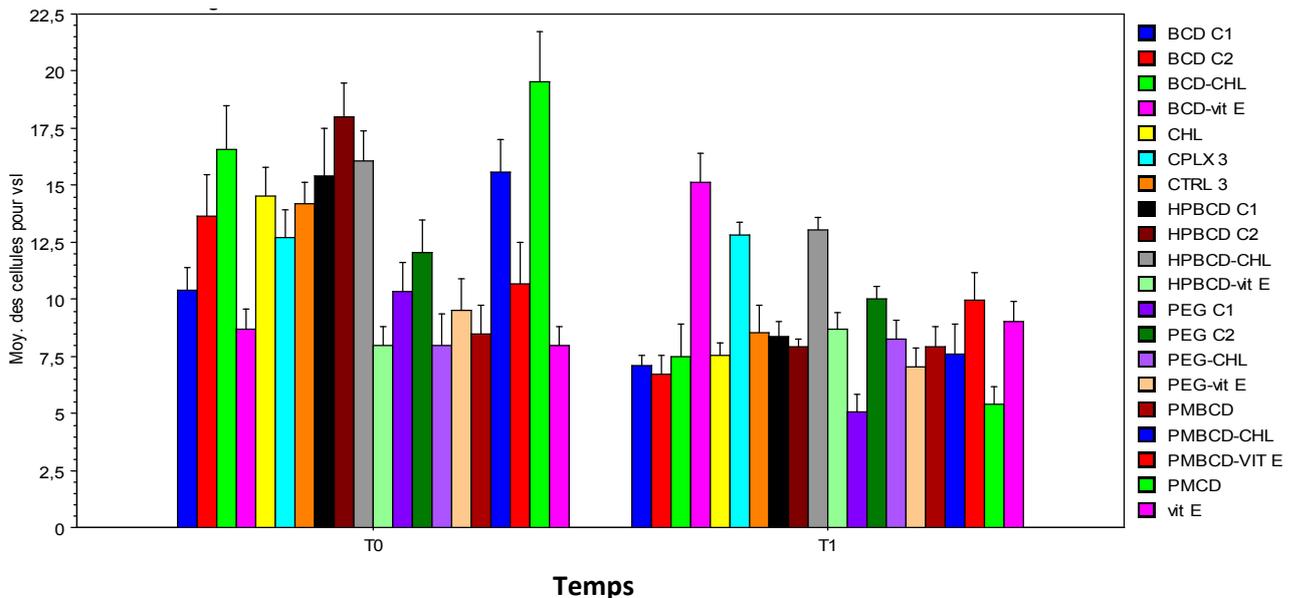


Figure 20 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les milieux de conservation utilisés à température ambiante.

- En comparant T1 (après deux heure d'incubation à température ambiante) à T0 (premier temps d'analyse) on remarque que les vitesses des SPZ traités par la β CD-Vit E, l'Hp β CD-Vit E et la Vit E a augmenté d'une part, d'autre part les vitesses des SPZ traités avec le CPLX et avec la PM β CD-Vit E sont presque les même. Sinon pour les autres traitements elles ont diminué.
- En comparant à T1 les vitesses des SPZ traités par rapport au contrôle on peut constater que celles-ci ont augmenté pour les SPZ traités par la β CD-Vit E, l'Hp β CD-Chl, la PM β CD-Vit E, le PEG, la Vit E et le CPLX.

Le CPLX apparait comme étant le traitement satisfaisant en termes de vitesse et ceci pourrait être expliqué par un phénomène de synergie entre les deux molécules Chl et VitE misent en disposition du SPZ à l'aide des CDs.

Le CHL contribue à l'augmentation de la vitesse des SPZ sans pour autant renforcer leur membrane, et la Vit E grâce à sa qualité d'antioxydant joue aussi un rôle dans l'augmentation de la vitesse des SPZ par rapport au contrôle.

II.2.2 Evolution des vitesses des spermatozoïdes conservés au réfrigérateur (5°C).

Sur la figure 21 est représentée les VSL de spermatozoïdes conservés au frigidaire à 5°C pendant 24 heures.

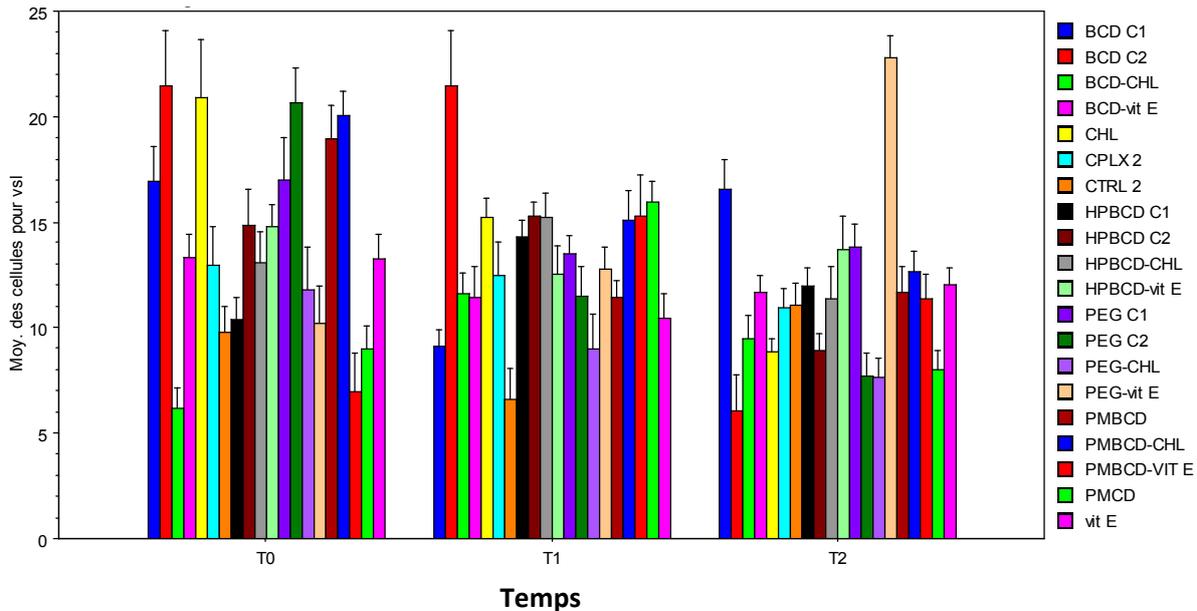


Figure 21 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les milieux de conservation à 5°C.

- En comparant T2 (après 24 heures de réfrigération à une température de 5°C) à T0 (premier temps d'analyse) on remarque que les vitesses des SPZ traités par la β CD-Chl, la PEG-Vit E et la PM β CD-Vit E a augmenté, on remarque aussi que les vitesses des SPZ traités avec le CPLX et la β CD-Vit E et avec la Vit E seule sont presque les même. Sinon pour les autres traitements elles ont diminué.
- En comparant à T2 les vitesses des SPZ traités par rapport au contrôle (CTRL) on peut constater que celles-ci ont augmenté pour les SPZ traités par la β CD-Vit E, l'Hp β CD-Vit E, le PEG-Vit E, le PEG, la Vit E et les trois CDs. Sinon pour les autres elles sont pratiquement égales.

L'augmentation des vitesses des SPZ entre T0 et T2 traités avec la β CD-Chl s'explique par le fait que le Chl a joué son rôle de cryoprotecteur en renforçant la barrière de la membrane des SPZ.

Pour mieux synthétiser les résultats de VSL nous avons créé quatre groupes de milieu, le contrôle (C) qui regroupe les molécules individuelles, CCHL qui regroupe le complexe à base seulement de cholestérol, CVitE qui regroupe le complexe à base seulement Vit-E et CVitE-CH qui regroupe les complexes associant Vitamine E et Cholestérol. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 21 aussi bien à 5°C qu'à température ambiante. Il est tout à fait évident de constater, qu'au dernier temps, les vitesses sont plus conservées dans les complexes cyclodextrines-vitamine E pour la réfrigération et cyclodextrines-cholestérol-vitamine E à température ambiante. L'association cyclodextrines soit avec la vitamine E ou cholestérol semble prometteuse pour la conservation des paramètres de mobilité.

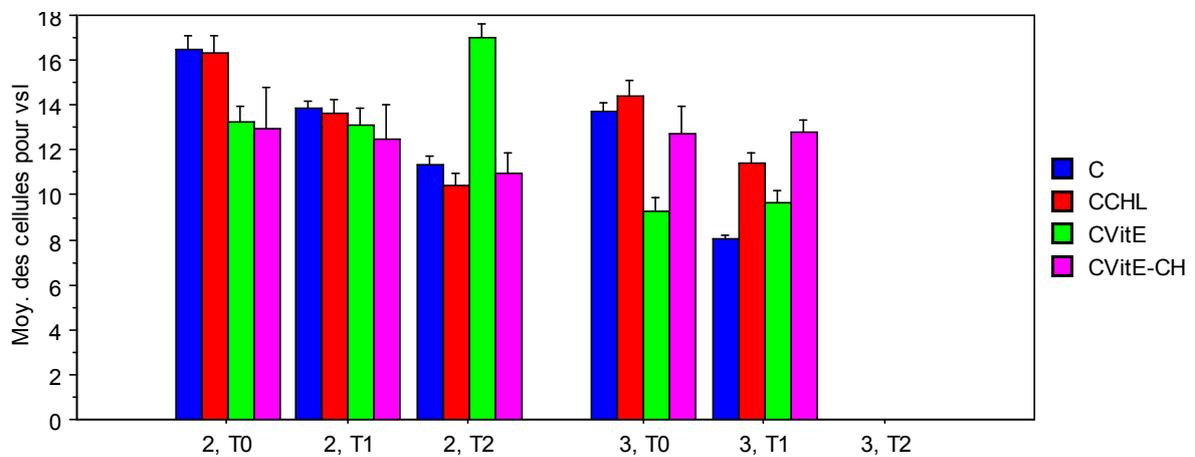


Figure 22 : Histogrammes représentant les VSL des spermatozoïdes dans les groupes de milieu reconstitués, dans la conservation à 5°C (2) et à température ambiante (3).

II.2.3 Evolution des pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides et statiques conservés à température ambiante

Les pourcentages des spermatozoïdes (SPZ) progressifs rapides et statiques en fonction des différents traitements sont représentés sur la figure 23.

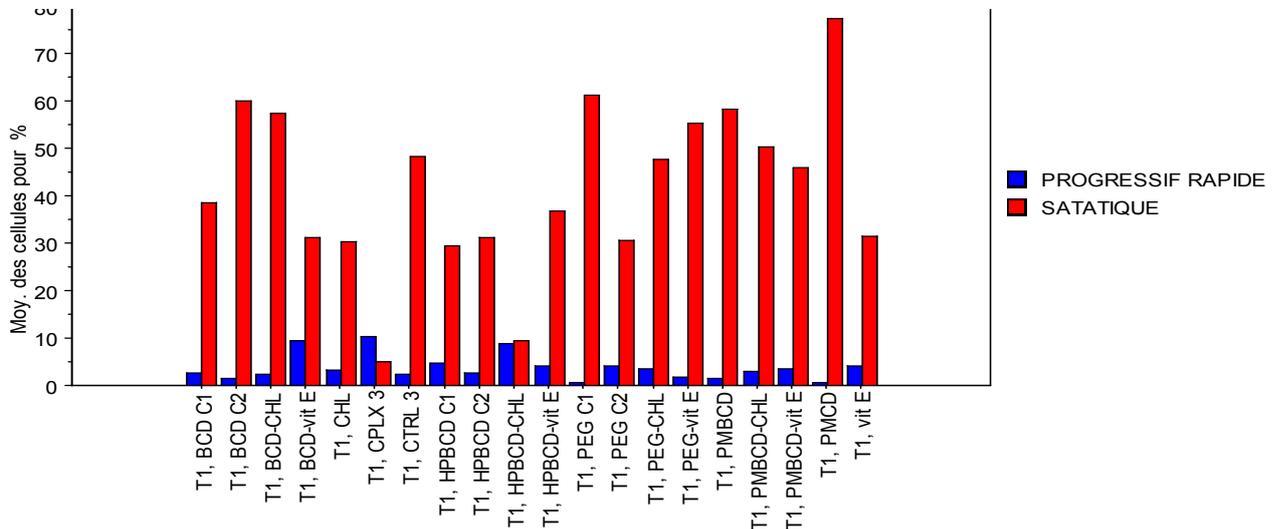


Figure 23 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à température ambiante.

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que les progressifs rapides ceci dans tout les traitements et contrôle.
- Pour les statiques, on remarque trois valeurs maximales obtenues pour la PMβCD, PEG et βCD, atteignant 77,4% pour la PMβCD.
- Pour les SPZ progressifs rapide on remarque également des valeurs maximales obtenues pour la βCD-Vit E, HpβCD-CHL et le CPLX (c'est à dire Vit E-CD-CHL), atteignant 10,4% avec le mélange de (Vit E, CD, Chl) (CPLX).
- En comparant le pourcentage des SPZ statiques par rapport au contrôle on remarque que pour la PMβCD il est nettement supérieur ainsi que pour la βCD et le PEG. Sinon pour les autres traitements ils sont presque égaux. Cela signifie, que pour le CPLX et pour la HpβCD-Chl il est très inférieur.
- En comparant le pourcentage des SPZ progressifs rapides par rapport au contrôle, on voit bien que pour la βCD-Vit E, HpβCD-Chl et le CPLX, il est supérieur. Sinon pour les autres traitements il est pratiquement inférieur.

Le CPLX apparait comme étant le traitement le plus satisfaisant en termes de SPZ statiques et mobiles, ceci pourrait être expliqué par un phénomène de synergie entre les deux molécules cholestérol et Vitamine E misent en disposition du SPZ à l'aide des CDs.

Le fait d'avoir plus de mobilité dans les complexes à base de Vit E, prouve que cette molécule a joué son rôle d'antioxydant.

Le fait d'avoir plus de mobilité par rapport au contrôle prouve que le Chl a renforcé les barrières membranaires cellulaires des SPZ.

II.2.4 Evolution des pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides et statiques conservés au réfrigérateur (5°C).

Les pourcentages des SPZ progressifs rapides et statiques en fonction des différents traitements sont représentés sur la figure 24.

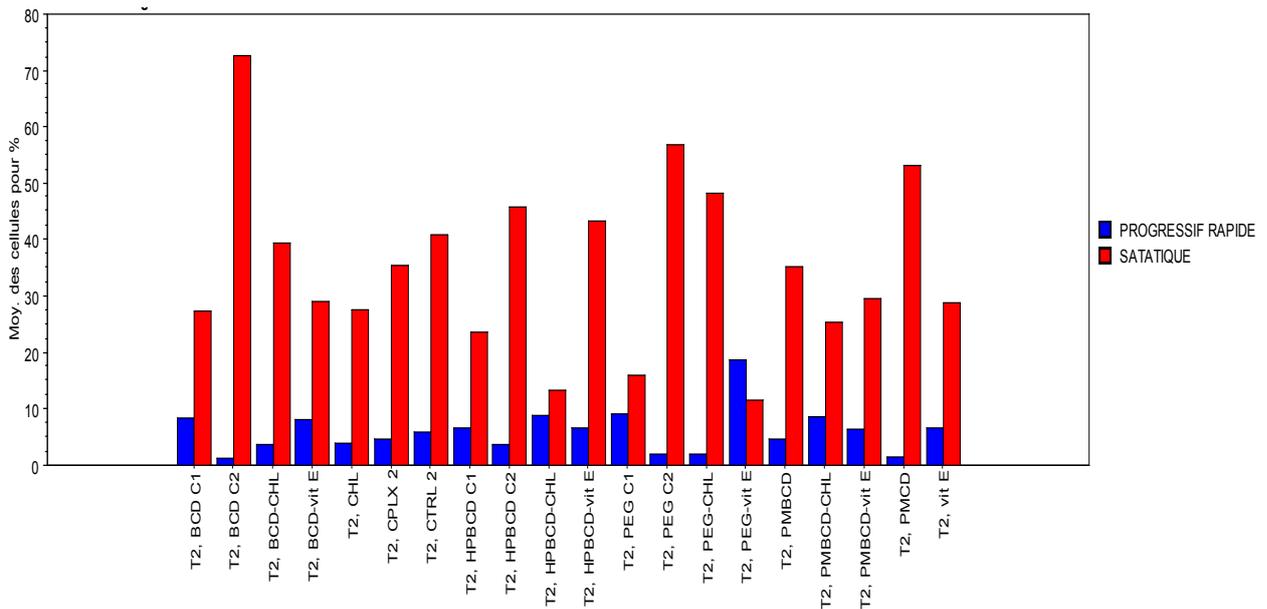


Figure 24 : Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à 5°C.

- Le pourcentage des SPZ statiques est extrêmement plus important que celui des progressifs rapides ceci dans tout les traitements et contrôle.
- Pour les statiques, on remarque trois valeurs maximales pour la β CD, PEG et PM β CD, atteignant ,73% pour la β CD.
- Pour les SPZ progressifs rapides on remarque également trois optimums pour le PEG-Vit E, PEG et M β CD-Chl atteignant 18,81% avec le PEG-Vit E.
- En comparant le pourcentage des SPZ progressifs rapides par rapport au contrôle, on voit bien que pour le PEG-Vit E, l'HP β CD-Chl, le PEG, la PM β CD-Chl et la Vit E il reste supérieur. Sinon pour les autres traitements il est pratiquement égal.
- La diminution du pourcentage des SPZ statiques traités par le PEG-Vit E, l'HP β CD-CHL est due au rôle antioxydant de la Vit E d'une part et d'autre part au rôle que joue le CHL

à basse température en renforçant la barrière de la membrane des SPZ par rapport à la température ambiante où nous n'avons pas réellement pu constater cet effet. Cela explique aussi l'augmentation des pourcentages pour les SPZ progressifs rapides traités par ces derniers par rapport au contrôle.

En créant les mêmes catégories de milieux que pour la VSL (C, CCHL, CVit E et CVitE CHL) Nous pouvons voir qu'à température ambiante (figure 21) et au dernier temps (T1), le complexe associant les cyclodextrines, la vitamine E et le cholestérol est celui qui présente le plus de spermatozoïdes progressifs et le moins de spermatozoïdes statiques. Pour la conservation à 5°C, c'est le complexe cyclodextrines vitamine E qui donne les meilleurs résultats.

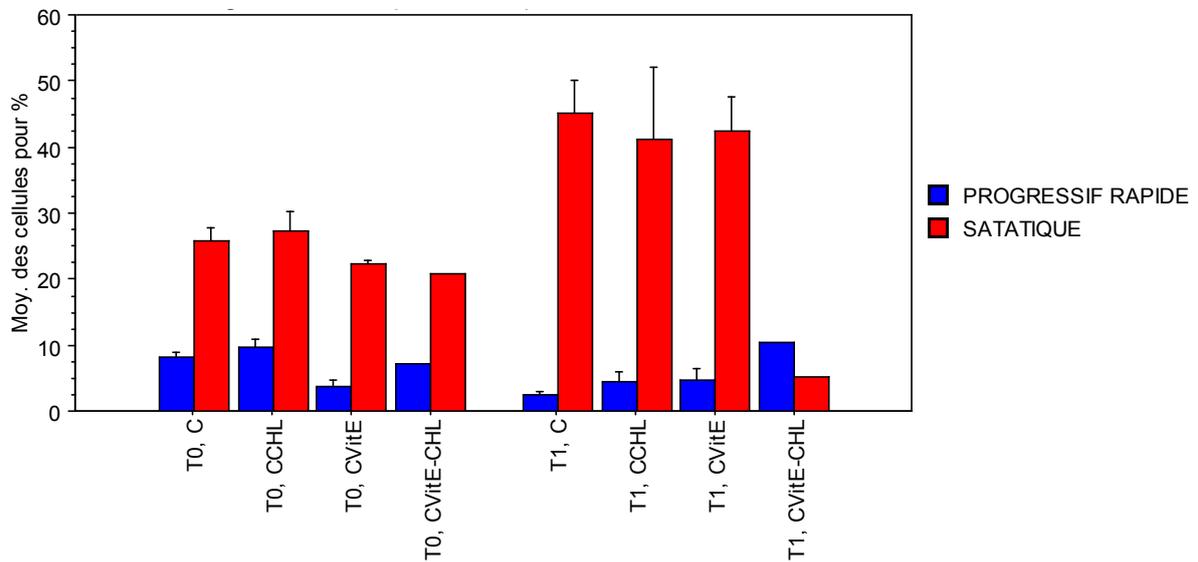


Figure 25 : Histogrammes représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans les groupes de milieux reconstitués, dans la conservation à température ambiante.

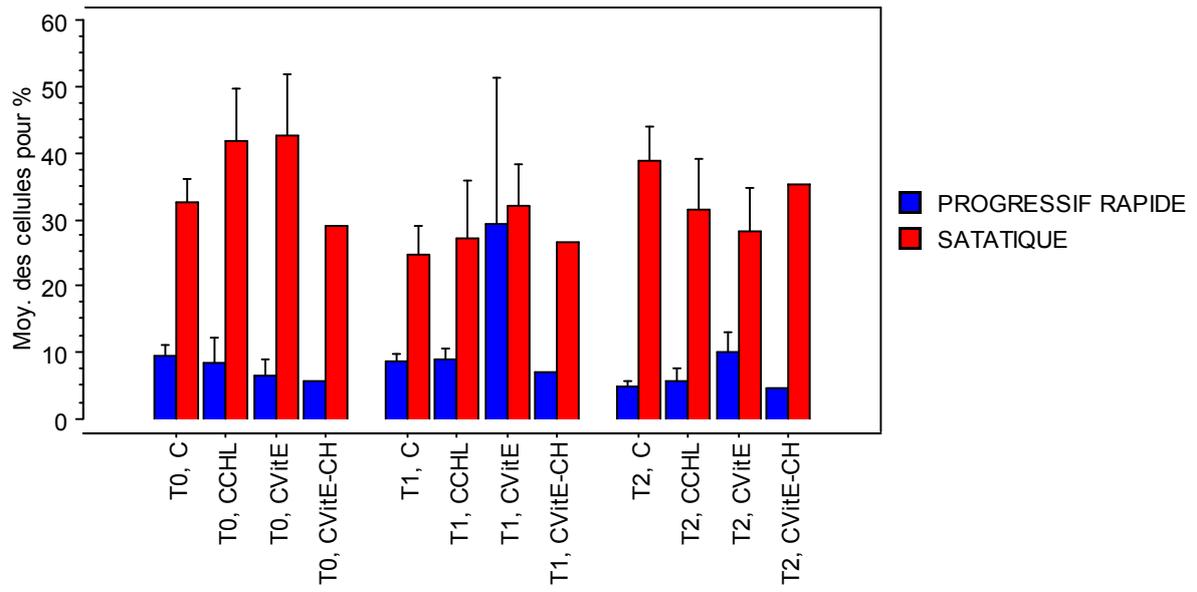


Figure 26 : Histogrammes représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides et statiques dans la conservation à 5°C dans les groupes de milieux reconstitués.

Conclusion

Conclusion et perspective

L'objectif que nous nous sommes fixé au début du présent travail est d'évaluer la qualité du sperme épидидymaire des taureaux charolais importés en Algérie. Le choix du travail s'est imposé par le vœu des éleveurs d'exploiter le potentiel génétique de cette race par accouplement avec leurs femelles, mais ne parviennent pas à le faire probablement à cause de l'altération de la libido des mâles. Après abattage des animaux nous avons utilisé la méthode rétrograde de récolte du sperme épидидymaire, par injection de l'air au niveau du canal déférent.

Les résultats obtenus ont montré que la qualité du sperme épидидymaire est dans les standards rapportés dans la littérature, et ceci en considérant tous les paramètres spermatiques à savoir : volume, concentration, mobilité, morphologie et viabilité.

Après collecte et analyse, nous avons conservé le sperme à température ambiante et au réfrigérateur à 5°C. Nous pouvons retenir que pendant les deux premières heures à température ambiante que la qualité du sperme reste acceptable. Ce fait revêt une importance capitale car dans les conditions de la ferme, le sperme épидидymaire pourrait être stocké le temps du transport de l'abattoir pour être inséminé. A 5°C, la conservation est encore meilleure.

Les milieux développés ont montré un potentiel intrinsèque à conserver la mobilité spermatique. Il est particulièrement à retenir que les cyclodextrines permettent une meilleure potentialisation de l'effet du cholestérol et de la vitamine E en augmentant leur solubilité. De même, l'association des trois molécules en même temps, semble offrir une solution complémentaire ou à solubilisation optimale par l'usage des cyclodextrines, le cholestérol agit sur la membrane cytoplasmique pour augmenter sa solidité et la vitamine E qui joue le rôle d'un anti-oxydantes.

Au terme du présent travail, nous pouvons donc retenir que la qualité du sperme épидидymaire des taureaux charolais est de bonne qualité. Des perspectives de son utilisation par insémination artificielle méritent d'être explorées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

ALAPATI, R., STOUT, M., SAENZ, J., GENTRY JR, G. T., GODKE, R. A., et DEVIREDDY, R. V. (2009). Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 59(2), 164-170.

B

BACINOGLU, S., TAŞ, M., CIRIT, Ü., ÖZDAŞ, Ö. B., et AK, K. (2008). The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal reproduction science*, 104(1), 38-46.

BARTH.A.D. (2007). Sperm accumulation in the ampullae and caudaepididymides of bulls.. *Animal reproduction science*, 102,238-246.

BIALY J, SMITH VR. (1958).Influence of seminal vesicular fluid on morphology of bull spermatozoa. *J Dairy Sci*; 41,422–8

BIOM, E. (1950).Interpretation of spermatic cytology in bulls.*Am Fertil Soc*;1:223–30.

BOUQUET, A. (2009). Amélioration de l'efficacité des programmes de sélection des bovins allaitants: de nouveaux modèles d'évaluation génétique (doctoral dissertation, université agroparis-Tech).

BOUQUET, A., RENAND, G., et PHOCAS, F. (2009). Evolution de la diversité génétique des populations françaises de bovins allaitants spécialisés de 1979 à 2008. *Productions animales*, 22(4), 317.

BRIFFAUT, A. S. (2007). Congélation de la semence canine: détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard - Lyon I).

BRITAN, A. (2006). *Développement, optimisation et utilisation d'un système cellulaire de l'épithélium épидидymaire murin: approches moléculaires* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

C

CABANNES, C. (2008). *Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine* (Doctoral dissertation, Université Toulouse 3).

CARY, J. A., MADILL, S., FARNSWORTH, K., HAYNA, J. T., DUOOS, L., et FAHNING, M. L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(1), 35.

CHEMINEAU, P., BARIL, G., COGNIE, Y., GUERIN, Y., LEBOEUF, B., ORGEUR, P., & VALLET, J. C. (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins .Chapitre 4.Collecte et conservation de la semence. FAO.

CHRISTENSEN, P., STENVANG, J. P., et GODFREY, W. L. (2004). A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *Journal of andrology*, 25(2), 255-264.

CLEMENCE, B., VALERIE.,ANA-PAUMATEIXEIRA G., GATTI J,DACHEUX J,DACHEUXF.(2011). Identification des protéines luminal et sécrétée dans l'épididyme haussier. *Journal of Protéomes*, 74,59-78.

CONTRI, A.,GLORIA, A., ROBBE, D., VALORZ, C., WEGHER, L., et CARLUCCIO, A. (2012). Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal reproduction science*, 136(2013), 252-259.

D

Daniel MEILLER, Paul VANNIER, (1994), Éleveurs et élevage. *Le charolais*, Châlons-sur-Saône, ANCR.

DERVILLE, M., PATIN, S., & AVON, L. (2009). *Races bovines de France: origine, standard, sélection.* France Agricole Editions.

DEUTSCHER, G. H., WELLS, M. E., et BATTAGLIA, R. A. (1974). Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and the effects of in vivo storage in Angus bulls. *Journal of animal science*, 39(6), 1136-1143.

DUDOUET, C. (2010). *La production des bovins allaitants.* France Agricole Editions.

E

EILTS, B. E. (2005).Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64(3), 685-691.

ÉMOND, É. (2007).*Modulation de l'expression des gènes de l'épididyme par la présence des spermatozoïdes* (Doctoral dissertation, Université Laval).

ERIC W. SWANSON AND H. J. BEARDEN. (1951)An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *J ANIM SCI*, 10:981-987.

F

FONTBONNE A. (1995).*Infécondité du chien mâle.* Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elsevier, Paris, Volume 5, 1-13.

FONTBONNE A.(1999)Infécondité du chien mâle. In : Encyclopédie Vétérinaire. Pathologie de la reproduction, Paris, 1-13.

FONTBONNE, A., & BADINAND, F. (1996).Prélèvement et examen de la semence chez le chien. *Les indispensables de l'animal de compagnie. Dumond*199(6), 153-159.

G

GRIZARD Geneviève, Clément JIMENEZ. PHYSIOLOGIQUES, B. (1997). Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. *Progrès en Urologie*, 7, 496-504.

GIRARDOT, M., GUIBERT, S., LAFORET, M. P., LEVEZIEL, H., JULIEN, R., & OULMOUDEN, A. (2003). Exploitation des gènes de la coloration de la robe pour une traçabilité raciale des produits d'origine bovine. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 33-36.

GOOVAERTS.I.G.F., HOFLACK.G.G., VANSOOM.A., DEWULF.J., NICHI.M., KRUIF.A., BOLS.P.E.J. (2006). Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two cauda epididymides of the same bull. *Theriogenology* 66, 323-330.

GUERIN J.F., JOUANNET P (1988). Le mouvement du spermatozoïde humain et son évaluation. *Contr. Fert. Sex.*, , 16, 555-558.

GUERIN, Y., LOCATELLI, Y., COMIZOLLI, P., MAUGET, R., MERMILLOD, P., LEGENDRE, X., et DACHEUX, J. L. (2003). Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. *Les actes du BRG*, 4, 173-183.

H

HANSET, R. (2005). Le gène culard sous toutes ses formes. *Journal Le Sillon* .

HANZEN, C. (2012). Sémiologie: La propédeutique de l'appareil reproducteur du mâle et l'examen du sperme des ruminants.

HERMO, L., AND ROBAIRE, B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In the epididymis from molecules to clinical practice, RA Hinton, ed. *New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers*, pp. 81-102.

HERMO, L., KRZECZUNOWICZ, D., et RUZ, R. (2004). Cell specificity of aquaporin's 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. *JAndrol* 25, 494-505.

J

JOHNSON, A. L., et HOWARDS, S. S. (1975).Intra tubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 228(2), 556-564

JOHNSTON, D. S., JELINSKY, S. A., BANG, H. J., DICANDELORO, P., WILSON, E., KOPF, G. S., et TURNER, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of reproduction*, 73(3), 404-413.

JONES, R. (2004).Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biology of reproduction*, 71(5), 1405-1411.

K

KAABI, M., PAZ, P., ALVAREZ, M., ANEL, E., BOIXO, J. C., ROUISSI, H., ...et ANEL, L. (2003).Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 60(7), 1249-1259.

KIRCHHOFF, C., ARAKI, Y., HUHTANIEMI, I., MATUSIK, R. J., OSTERHOFF, C., POUTANEN, M., .et ORGEBIN-CRIST, M. C. (2004).Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1), 83-94.

L

LANNOU, D., GRIVEAU, J. F., LE PICHON, J. P., et QUERO, J. C. (1992).Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reproduction*, 7(10), 1417-1421.

LEGRAND, S. (2003). Transfert embryonnaire en race charolaise en clientèle, étude des facteurs de réussites liés à la receveuse et à l'embryon (Doctoral dissertation).

LOVE, C. C. (2012). Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 464-466.

M

MAKLER, A., FISHER, M., et LISSAK, A. (1984). A new method for rapid determination of sperm concentration in bull and ram semen. *Theriogenology*, 21(4), 543-554.

MEILLER, D., VANNIER, P. (1994). *Le charolais*, Châlons-sur-Saône, ANCR, (ISBN 2-907376-02-0), « Éleveurs et élevage ».

MARTINS, C.F., RUMPF, R., PERIER, D.C., DODE, M.N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses embryo production. *Animal reproduction science*, 101, 326-331.

MARTINEZ-PASTOR, F., GARCIA-MACIAS, V., ALVAREZ, M., CHAMORRO, C., HERRAEZ, P., PAZ, P. D., et ANEL, L. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65(3), 471-485.

MARTINEZ-GARCIA, F., REGADERA, J., COBO, P., PALACIOS, J., PANIAGUA, R., et NISTAL, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27, 195-206.

O

ORGEBIN, M C. (1961). Etude du transit épидидymaire des spermatozoïdes de taureau marqué à l'aide du p³². *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biol.* 1-2.

OTT, R. S., GOFFAUX, M., et THIBIER, M. (1987). Examen morphologique des spermatozoïdes. *EI. & Ins*, 22, 15-20.

P

PAREZ, M., & DUPLAN, J. M. (1987). L'insémination artificielle bovine: reproduction, amélioration génétique.

POSIERE, S. (2002). récolte de la semence de chats (*Felis catus*) par électro-éjaculation et par dissection de l'épididyme; comparaison des méthodes, essai de cryoconservation avec un diluer canin (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).

R

ROTA, A., PENZO, N., VINCENTI, L., et MANTOVANI, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(7), 1415-1420.

ROBAIRE, B., et VIGER, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *BiolReprod* 52, 226-236.

RIGAL, F. (2008). Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel (Doctoral dissertation, Université Paul-Sabatier de Toulouse).

ROBAIRE, B., HINTON, B. T., et ORGEBIN-CRIST, M. C. (2006). The epididymis. *Physiology of reproduction*, 1, 1071-1148.

S

SERRE, V., AND ROBAIRE, B. (1999). Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *BiolReprod* 57, 705-714.

SORANZO, L., DADOUNE, J. P., et FAIN-MAUREL, M. A. (1982). Segmentation of the epididymal duct in mouse an ultra structural study. *Reprod NutrDev* 22, 999-1012.

SULLIVAN, R. (2004). Maie fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci* 82-83, 341-347.

STOUT, M. A. (2012). Comparison of Epididymal and Ejaculated Sperm Collected from the Same Holstein Bulls (Doctoral dissertation, Louisiana State University).

SWANSON EW, BOYD LJ. (1962). Factors affecting coiled-tail spermato-zoa in the bull. *AmJ Vet Res*;23, 300–9.

SWANSON EW, BEARDEN HJ. (1951). An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *J ANIM SCI*, 10:981-987

T

THIBAUT, C., et LEVASSEUR, M. C. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Editions Quae*.

TURRI, F. E. D. E. R. I. C. A., MADEDDU, M., GLIOZZI, T. M., GANDINI, G., et PIZZI, F. (2012). Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reproduction in domestic animals*, 47(5), 712-717.

V

VAISSAIRE, J. P. (1977). Sexuality and reproduction of domestic and laboratory mammals. *Maloine SA Editeur*.

VAN RENSBURG SWJ, VAN RENSBURG SJ, DE VOS WH.(1966). The significance of the cytoplasmic droplet in the disintegration of semen in Guernsey bulls. *Onderstepoort J Vet Res*.33, 169–84.

W

WILLIAMS WW, SAVAGE A. (1927). Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls: a review with additional notes. *Cornell Veterinarian*.17.374–85.

Z

ZEROBIN VON K, BERTSCHINGER HJ (1978). Diploid DNA-content in sperms of Brown Swiss bulls. *Zuchthyg* 13:113–20

ZOU, C. X., & YANG, Z. M. (2000).Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*, 53(7), 1477-1488.

Résumé

L'objectif du présent travail vise à évaluer la qualité du sperme épидидymaire et à le conserver à température ambiante et à 5°C. Les taureaux concernés sont de race charolaise, connue pour son potentiel viandeux important. Le sperme de l'épididyme est collecté après abattage des animaux. Les résultats obtenus montrent que le sperme reste de bonne qualité.

La conservation du sperme aussi bien à température ambiante qu'à 5°C a permis de conserver les paramètres de mobilité de manière satisfaisante. Les meilleurs milieux de conservation semblent être ceux associant cyclodextrines, vitamine E et cholestérol.

Mots clés : Epididyme, charolais, évaluation, conservation.

Abstract

The objective of this work is to evaluate the quality of epididymal sperm and keep it at ambient temperature and at 5 ° C. Bulls concerned is Charolais breed, known for its potential in meat yield. The sperm from the epididymis is collected after slaughter of animals. The results obtained show that the sperm is good quality.

The sperm storage at ambient temperature and 5° C allowed perserving parameters of mobility in satisfactory manner. The best association of cyclodextrins, vitamin E and cholesterol gives us best results of semen storage.

Keywords: Epididymis, Charolais, evaluation, storage, conservation.