

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement  
Spécialité : Biologie Animale



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

**Thème**

*Etude l'intérêt de la lécithine comme  
un substituant de jaune d'œuf dans la  
conservation du sperme*

Présenté par :

***Benachour Azzedine & Aissat Fatah***

Soutenu le :25 /06/2023

Devant le jury composé de :

Mme : TALBI Asma

Mr : IGUER OUADA Mokrane

Mme : ICHALLAL-CHIKHOUNE Keltoum

Présidente

Encadreur

Examineur

**Année Universitaire : 2022/2023**

## **Remerciements**

*Le premier à qui je dois le plus de remerciement est le bon Dieu qui nous a donné la force, le courage, et la volonté pour atteindre notre objectif.*

*Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à notre encadreur Monsieur Mokrane Iguerouada, qui a suivi et encadré ce travail avec intérêt et disponibilité. Nous le remercions infiniment pour ses conseils et orientations afin de mener à bien ce travail.*

*Nos plus vifs remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce modeste travail. Nous n'oublions pas aussi de remercier tous les membres du laboratoire de (Ecosystèmes Marins et aquacoles) et le centre de recherche biotechnologique CRBT à Constantine pour l'aide qu'ils nous ont fourni lors de la conduite de nos expériences.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail :*

*A celle qui a éclairé ma vie, ma mère la plus chère au monde et à quel je ne saurais jamais exprimer ma gratitude et ma connaissance en quelques lignes.*

*Que dieu tu protège en parfaite santé et vous donne longue vie*

*A mes très chers frères, A mes très chères sœurs et pour leurs familles.*

*A mon très chère amie et au même temps mon binôme Fatah, merci pour les*

*Bons moments que nous avons passé ensemble. Merci pour ton soutien.*

*Enfin à toute la promotion biologie animales ainsi qu'à tous ceux qui m'ont aidé*

*De près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

**AZZEDINE**

*Avec une profonde humilité, je souhaite dédier cet humble travail aux personnes*

*Qui ont joué un rôle important dans ma vie.*

*A mes chers parents, que dieu les protège, je témoigne toute ma gratitude et mon amour leur soutien indéfectible a retenu en partie à la réalisation de ce travail. Leur fierté à mon regret représente la plus grande récompense.*

*A mes chers frères et sœurs, je ne saurais exprimer à quel point que je suis reconnaissant de vous avoir à mes cotés.*

*Je souhaite adresser mes pensées mon cher binôme AZZEDINE, dès le début de*

*Notre collaboration, j'ai su que nous formions une équipe solide et complémentaire, que nous avons surmonté les défis, repoussé les limites et obtenu des résultats dont nous avons être fiers.*

*A mes chers amis et compris toute la promotion de biologie animale.*

*Que chacun de vous sache que vous avez joué un rôle essentiel durant ma vie et que je suis infiniment reconnaissant de votre présence et votre soutien.*

**FATAH**

**Liste des tableaux :**

TABLEAU I:QUANTITE ABSOLUE DES PROTEINE ET DES LIPIDES DANS LE JAUNE D'ŒUF ..... 9

TABLEAU II :NOTE DES EJACULATS EN FONCTION DE LEUR MOTILITE MASSALE ..... 24

TABLEAU III :NOTES ATTRIBUES AU EJACULATS AU FONCTION DE LEUR MOTILITES  
INDIVIDUELLE..... 24

TABLEAU IV :NOTE D'APPRECIATION DE LA MOTILITES PROGRESSIVES DES SPERMATOZOÏDES 25

TABLEAU V :REPRISANTATION LES DIFFERENT MILIEUX DE DILUTION..... 35

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1 :</b> STRUCTURE CHIMIQUE DE LA LECITHINE.....	2
<b>FIGURE 2:</b> EXTRACTION DE LA LECITHINE A BASE DU HUILE .....	5
<b>FIGURE 3:</b> REPRESENTATION DE STRUCTURE INTERNE DE JAUNE D'ŒUF .....	6
<b>FIGURE 4 :</b> STRUCTURE FOLLICULAIRE .....	7
<b>FIGURE 5:</b> REPRESENTATION DES STRUCTURE DE HDL,LDL ET PHOSVITINE .....	11
<b>FIGURE 6:</b> LE MECANISME DE PROTECTION DES SPERMATOZOÏDES AVEC LE JAUNE D'ŒUF .....	14
<b>FIGURE 7:</b> APPAREILLE REPRODUCTRICE MALE .....	14
<b>FIGURE 8:</b> <i>MORPHOLOGIE D'UN TESTICULES</i> .....	15
<b>FIGURE 9:</b> MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES.....	17
<b>FIGURE 10:</b> VAGINE ARTIFICIELLE .....	21
<b>FIGURE 11:</b> UN TESTICULE FRAIS.....	31
<b>FIGURE 12:</b> ENSEMBLE DE MATERIEL UTILISES .....	32
<b>FIGURE 13:</b> PRODUITS UTILISES POUR LA PREPARATION DE LA LECITHINE .....	32
<b>FIGURE 14:</b> ETAPES DE PREPARATION DE LA LECITHINE .....	33
<b>FIGURE 15:</b> PRODUIT CONSTITUANT LE TRIS .....	34
<b>FIGURE 16:</b> AGITATION DE TRIS .....	34
<b>FIGURE 17:</b> LES MILIEUX UTILISES .....	35
<b>FIGURE 18:</b> ETAPE DE LA RECOLTE DU SPERME.....	36
<b>FIGURE 19:</b> LE SYSTEME CASA.....	37
<b>FIGURE 20:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DE LA VSL EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION.....	39
<b>FIGURE 21:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DE LA VCL EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION.....	40
<b>FIGURE 22:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DES SPERMATOZOÏDES A PROGRESSIFS MOYENS EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION .....	41
<b>FIGURE 23:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DES SPERMATOZOÏDES A PROGRESSIFS RAPIDES EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION .....	42
<b>FIGURE 24:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DES SPERMATOZOÏDES RAPIDES EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION ....	43
<b>FIGURE 25:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DE LA LINEARITE DES SPERMATOZOÏDES EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION .....	44
<b>FIGURE 26:</b> HISTOGRAMME REPRESENTANT LES VALEURS DE LA VAP EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION .....	45

## Table des matières

Introduction .....	1
chapitre I :Généralités.....	2
I.1    Lécithine .....	2
I.1.1    Définition : .....	2
I.1.2    Composition et structure : .....	2
I.1.3    Origine :.....	3
I.1.4    Propriété de la lécithine :.....	3
I.1.5    Extraction : .....	3
I.1.6    Utilisation : .....	5
I.2    Jaune d'œuf.....	6
I.2.1    Définition : .....	6
I.2.2    Formation du jaune d'œuf.....	7
I.2.3    Composition chimique du jaune d'œuf .....	9
I.2.4    Les constituants majeurs du jaune d'œuf.....	9
I.2.5    Les fonctions biologiques du jaune d'œuf .....	12
I.2.6    Application du jaune d'œuf dans la conservation des spermatozoïdes :.....	13
I.3    Physiologie de la reproduction : .....	14
I.3.1    Anatomie :.....	14
I.3.2    Testicule : .....	15
I.3.3    Structure testiculaire :.....	15
I.3.4    Épididyme : .....	16
I.3.5    Spermatozoïdes : .....	16
Chapitre II : la cryoconservation de sperme.....	18
II.1    Définition :.....	18
II.2    Historique .....	18
II.3    Objectif :.....	19
II.4    Etapas de la conservation .....	20
II.4.1    Récolte :.....	20
II.4.2    Evaluation.....	22
II.4.3    Préparation de la semence .....	25
Chapitre III :la conservation de sperme avec le jaune d'œuf et la lécithine .....	28
IV.    Matériel et méthodes .....	31
IV.1    . Objectif de travail : .....	31

IV.2	Collecte de la semence : .....	31
IV.2.1	Matériel biologique : .....	31
IV.2.2	Préparation des milieux .....	32
V.	Résultats et discussion : .....	38
VI.	Conclusion : .....	46
	Référence bibliographique .....	
	Résumé.....	

## Liste des abréviations

VLDL : lipoprotéines très basse densité

LDL : Les lipoprotéines de faible densité

HDL : Les lipoprotéines de haute densité

APC : agents cryoprotecteurs

ADN : acide désoxyribonucléique

AV : vagin artificiel

C° : degré Celsius

ml : millilitre

µl : microlitre

µm : micromètre

S : second

Mg : milligramme

NaCl : chlorure de sodium

UI : unité international

TPM : tour par minute

tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

CASA: Computer Assisted Sperm Analyzer

VSL: Velocity Straight Line

VCL: Velocity Curvilinear Path

PM: progression moyenne

PR : progression rapide

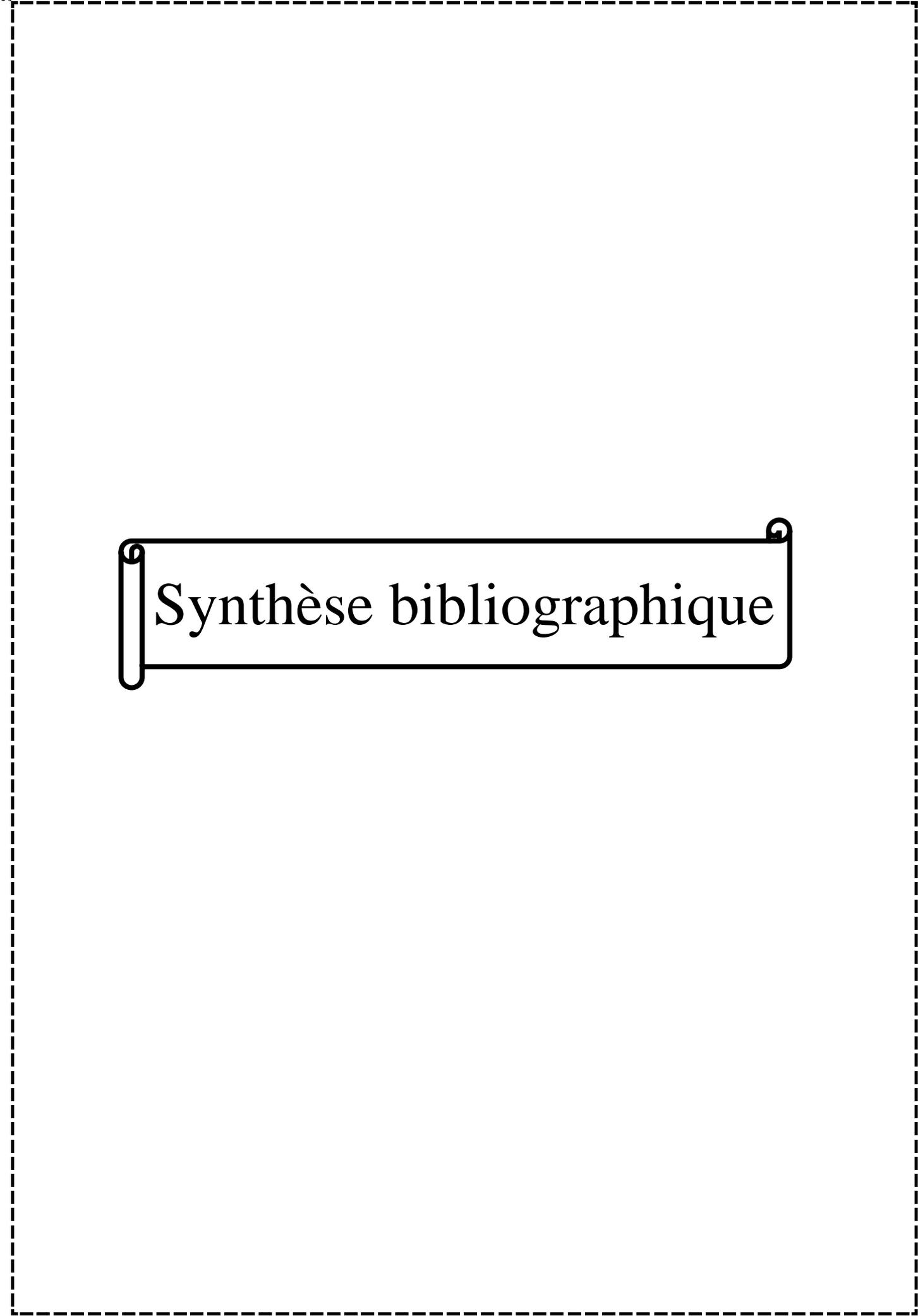
R : rapide

VAP : Velocity Average Path

LIN : Linearity

Léc/léci : lécithine

JO : jaune d'œuf



# Synthèse bibliographique

## Introduction

Le rôle de la cryoconservation du sperme dans la reproduction animale est indéniable (**Forouzanfar et al., 2010**), mais cette technique peut entraîner des dommages structurels et fonctionnels à différents compartiments des spermatozoïdes, surtout au niveau des membranes cellulaires (**Parks & Graham, 1992**). En effet, lors du processus de refroidissement, l'un des premiers effets indésirables observés est la désorganisation de la structure membranaire. Afin de réduire les dommages causés par le froid, des diluants sont utilisés, et la composition de ces diluants joue un rôle crucial dans la protection des spermatozoïdes.

Bien que le jaune d'œuf ait été traditionnellement utilisé comme principal agent cryoprotecteur pour la congélation du sperme chez de nombreuses espèces, d'autres substances ont désormais pris le relais. Le jaune d'œuf présente un risque de contamination microbienne, ce qui peut entraîner la production d'endotoxines. Cela réduit la fertilité des spermatozoïdes et augmente le risque de transmission de maladies, ce qui est particulièrement préoccupant dans le cas des échanges internationaux de sperme. En tant qu'alternative aux composants d'origine animale, la lécithine de soja, principalement composée de phosphatidylcholine, a émergé. De nombreuses études ont confirmé l'efficacité de la lécithine de soja dans la préservation des spermatozoïdes chez différentes espèces, notamment la chèvre, le bélier, l'homme et le chat. Actuellement, plusieurs formulations commerciales contenant de la lécithine de soja sont disponibles sur le marché (**Nadri et al., 2019**).

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer l'intérêt de la lécithine en tant que substituant du jaune d'œuf dans la conservation du sperme. La lécithine, un phospholipide naturellement présent dans les membranes cellulaires, est reconnu pour ses propriétés émulsifiantes et stabilisantes. Bien qu'elle soit utilisée dans diverses applications industrielles et pharmaceutiques, son utilisation potentielle dans la conservation du sperme reste peu explorée. Notre objectif principal est donc de déterminer si la lécithine peut être utilisée comme un substituant efficace et sûr du jaune d'œuf dans les milieux de conservation du sperme. Pour atteindre cet objectif, nous mettrons en œuvre une méthodologie comprenant l'évaluation de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes, ainsi que des études comparatives avec des échantillons conservés dans des milieux contenant du jaune d'œuf.

## I. Généralités

### I.1 Lécithine

#### I.1.1 Définition :

La lécithine est un phospholipide constitué d'acide phosphorique, de choline, de glycérol et d'un ou deux acides gras. On la trouve dans certains tissus corporels ainsi que dans certaines plantes. Bien qu'elle soit souvent associée aux compléments alimentaires, la lécithine est une substance naturelle qui est régulièrement générée lors des processus digestifs normaux. Elle est présente dans les tissus d'autres animaux et de certaines plantes. L'isolement initial de la lécithine a été réalisé en 1847 par Théodore Gobly à partir du jaune d'œuf, et son appellation dérive du terme grec pour "œuf", lekhitos. Elle peut également être obtenue à partir d'autres sources telles que le soja, le colza, le coton, les graines de tournesol, les œufs et d'autres graisses animales (Anna, 2022).

#### I.1.2 Composition et structure :

La lécithine est un mélange complexe contenant environ 65 à 75 % de phospholipides, ainsi que des triglycérides et de plus petites quantités d'autres substances. Les principaux phospholipides présents sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et les phosphatides contenant de l'inositole (Scholfield, 1981).

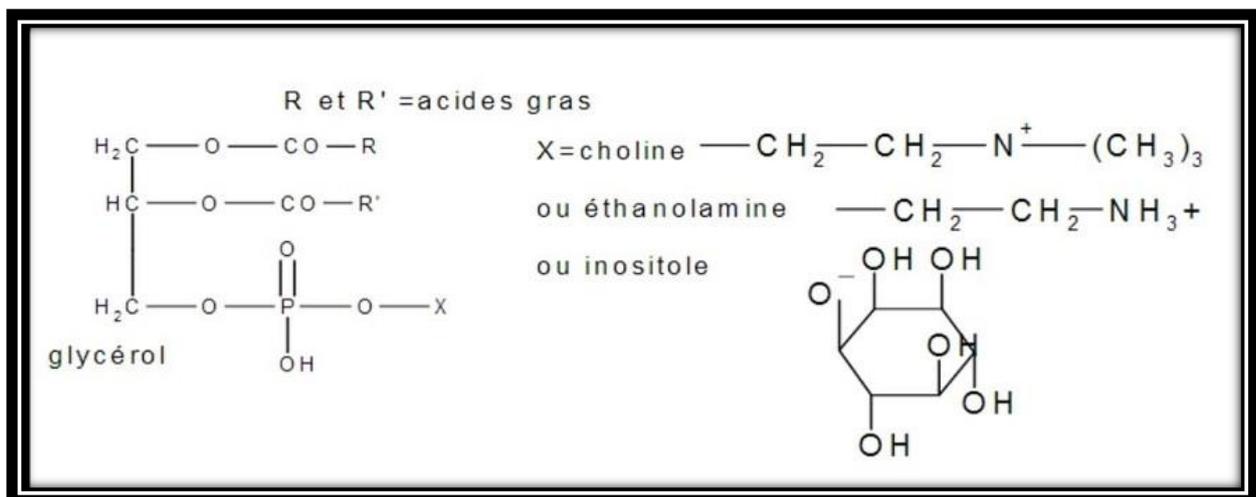


Figure 1 : structure chimique de la lécithine (DENIL Marie et LANNOYE Paul, 2001).

### **I.1.3 Origine :**

Il existe plusieurs sources de lécithine, notamment la lécithine d'origine animale que l'on retrouve principalement dans le jaune d'œuf, ainsi que la lécithine d'origine végétale telle que la lécithine de tournesol et de soja.

### **I.1.4 Propriété de la lécithine :**

La lécithine est un additif couramment utilisé dans l'industrie alimentaire en raison de son rôle d'émulsifiant. Son principal avantage réside dans sa capacité à rendre homogène une solution contenant plusieurs phases non miscibles, ce qui est particulièrement utile pour mélanger des ingrédients qui ont tendance à se séparer, tels que l'huile et l'eau. Les molécules de lécithine possèdent à la fois un pôle lipophile, qui a une affinité pour les corps gras, et un pôle hydrophile, qui a une affinité pour l'eau. Cette propriété les rend amphiphiles, ce qui signifie qu'elles peuvent interagir avec les deux phases et stabiliser l'émulsion. La capacité de la lécithine à stabiliser les émulsions est due à sa structure moléculaire, qui lui permet de former une couche interfaciale entre les deux phases et d'empêcher leur séparation. En résumé, la lécithine joue un rôle essentiel dans la création de produits alimentaires tels que les sauces, les crèmes et les produits de boulangerie, car elle permet d'obtenir des textures homogènes et stables (**Morelle, 1965**).

### **I.1.5 Extraction :**

Les lécithines proviennent de trois origines différentes, les lécithines naturelles extraites de l'œuf, les lécithines naturelles extraites de l'huile et les lécithines de synthèse.

#### **I.1.5.1 Lécithine extrait de jaune d'œuf :**

Il existe différentes méthodes d'isolement de la lécithine à partir du jaune d'œuf, qui impliquent l'utilisation de solvants organiques de qualité analytique tels que le chloroforme et le méthanol pour extraire tous les lipides polaires et non polaires. En laboratoire, on utilise généralement trois protocoles d'extraction lipidique : le protocole de Folch, le protocole de Bligh Dyer et l'extraction par précipitation. Le protocole de Folch est similaire à celui de Bligh Dyer, à l'exception d'une étape supplémentaire de lyophilisation du produit initial. Ces trois méthodes permettent d'obtenir des fractions lipidiques insolubles qui permettent de déterminer la présence ou l'absence de la phase lipidique dans l'échantillon (**Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959**).

**I.1.5.1.1 Méthode de Folch (1957) :**

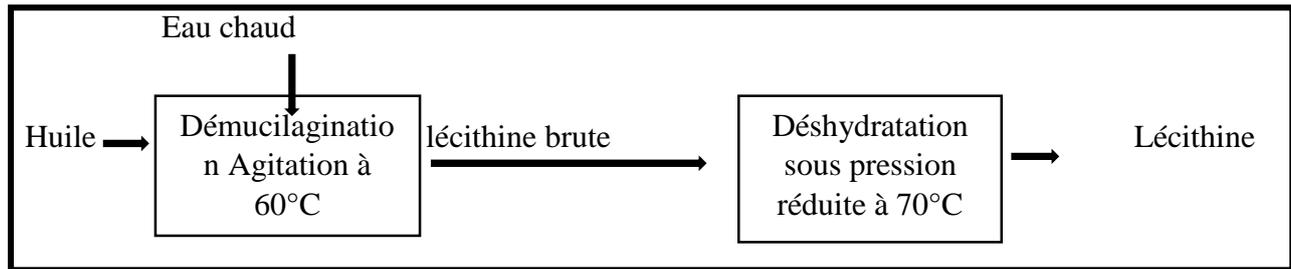
À l'origine, la méthode de Folch, ou protocole de Folch, a été développée pour l'extraction et la purification des lipides totaux à partir de tissus animaux. Cette méthode implique une extraction à froid en utilisant un mélange de solvants apolaires tels que le chloroforme et des solvants polaires comme le méthanol, dans un rapport de 20:1 en volume. Le mélange obtenu est ensuite lavé à l'eau pour obtenir un extrait brut.

**I.1.5.1.2 Méthode Bligh Dyer (1959) :**

La méthode actuelle, basée sur la technique de Folch, utilise un système de solvants similaire, bien que les proportions volumiques diffèrent (chloroforme-méthanol 1:2, v/v), suivie d'une extraction au chloroforme. Cette approche présente un avantage significatif en termes de réduction de la consommation de solvant par rapport à la méthode de Folch, car le ratio solvant/échantillon est de 3/1 pour la méthode de Bligh & Dyer, contre 20/1 pour la méthode de Folch. La méthode de Bligh & Dyer a été initialement développée pour extraire les phospholipides à partir de muscles de poissons à faible teneur en lipides et à forte teneur en eau. Cependant, cette méthode sous-estime la teneur en lipides des échantillons de tissus marins contenant plus de 2% de lipides. Par conséquent, la méthode de Bligh & Dyer, dans sa forme non modifiée, n'est pas adaptée à l'extraction des lipides des microalgues, dont la teneur en lipides dépasse souvent les 10%. Malgré cela, de nombreux laboratoires continuent de l'utiliser (Iverson et al., 2001).

**I.1.5.2 Lécithine extrait d'huile :**

La lécithine végétale est généralement extraite à partir de l'huile de soja. Une fois que l'huile de soja raffinée est extraite, on peut obtenir de la lécithine commerciale. Pour réduire la solubilité des phospholipides dans l'huile, de 1% à 3% d'eau est ajoutée. Le mucilage présent dans l'huile gonfle au contact de l'eau, formant ainsi une suspension aqueuse de phospholipides bruts. Ce processus est appelé démulcination, permettant ainsi d'extraire la lécithine de l'huile(**figure2**). La lécithine ainsi obtenue est un mélange de phospholipides (50%), de triglycérides (35%) et de glycolipides (10%). Il existe également des lécithines déshuilées plus pures disponibles sur le marché, ne contenant que des phospholipides et des glycolipides (Morelle, 1965).



**Figure 2:** extraction de la lécithine à base du huile

### **I.1.5.3 Lécithine synthétique :**

Selon Multon (2002), en 1883, HUNDESHAGEN et GILSON semblent avoir réalisé la première synthèse de la lécithine, mais leurs produits n'étaient pas purs car leur hydrolyse ne libérait pas le composant caractéristique de la lécithine naturelle. La synthèse moderne, développée par BAER et ses collaborateurs, permet d'obtenir des phospholipides, dont la plupart sont de type "naturel" lorsque l'acylation est réalisée avant la phosphorylation du glycérol. Le glycérol utilisé dans la synthèse est obtenu à partir d'huile de colza hydrogénée par glycolyse. Le produit final est un mélange contenant environ 4% de glycérides, 1% de phospholipides neutres, 40% de sels d'ammonium d'acide phosphatidique et 5% de sels d'ammonium d'acide phosphorique (Multon, 2002).

### **I.1.6 Utilisation :**

#### **I.1.6.1 Industrie alimentaire :**

La lécithine est largement utilisée dans l'industrie alimentaire, notamment dans la pâtisserie, les boissons et les confiseries. Elle est présente dans 10 groupes d'aliments et joue divers rôles tels que l'émulsification, le contrôle de la cristallisation, l'humectation des poudres, les agents de démoulage, les compléments alimentaires, les agents de brunissement et les agents anti-éclaboussures dans les margarines. Elle est également utilisée dans les équipements de transformation alimentaire en tant qu'agents de démoulage, lubrifiants et revêtements conservateurs pour les aliments. Des études ont été menées sur les fonctions de la lécithine de soja dans les émulsions, mettant en évidence les facteurs responsables de leur stabilité et de leurs propriétés. Les principales utilisations de la lécithine dans les aliments comprennent les agents de démoulage pour les moules, les aides à la séparation des produits et les applications résistantes à la chaleur. Les lécithines de démoulage pour moules sont conçues pour former des barrières lipidiques fluides assurant une séparation rapide et propre de la surface de cuisson (List, 2015).

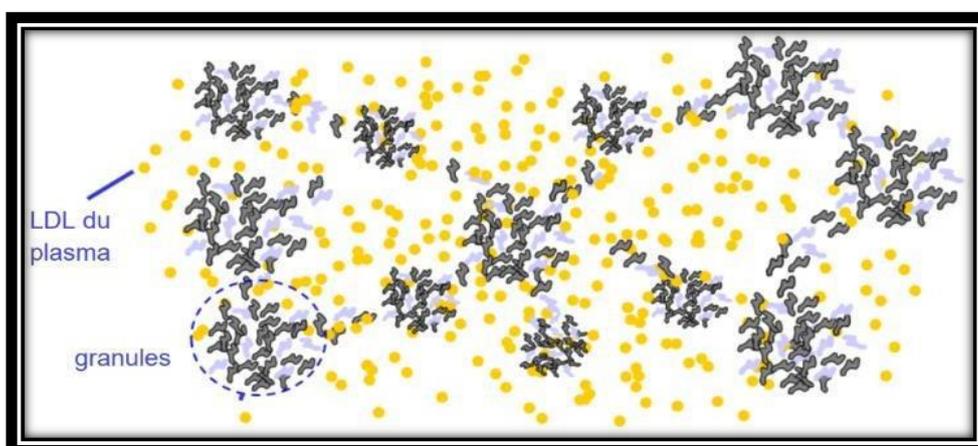
### I.1.6.2 Autre utilisation industriel de la lécithine :

La lécithine trouve également de nombreuses applications en dehors du domaine alimentaire. Elle est utilisée comme adhésif, adsorbant, inhibiteur de corrosion, lubrifiant, agent de démoulage, peinture, catalyseur, revêtement, détergent, explosif, et bien d'autres encore. Dans ces applications, la lécithine offre des propriétés fonctionnelles telles que l'antioxydation, la dispersion et la stabilisation. Elle est utilisée dans des industries variées comme le papier, les textiles, les cosmétiques, l'agriculture, l'environnement, etc. Dans l'alimentation animale, la lécithine est utilisée comme émulsifiant, améliorant la digestion et favorisant la prise de poids. Les dosages de la lécithine varient en fonction des applications, allant de 0,05% à 1,5% ou plus. En résumé, la lécithine présente de nombreuses utilisations polyvalentes en dehors du domaine alimentaire, offrant diverses fonctionnalités selon les besoins spécifiques de chaque application (List, 2015).

## I.2 Jaune d'œuf

### I.2.1 Définition :

Le jaune d'œuf, également appelé vitellus, fait référence au contenu du sac vitellin présent dans l'œuf. Il est considéré comme une source de nutriments assez intéressante pour les êtres humains. Il se présente sous la forme d'une dispersion de granules dans une phase aqueuse continue (**figure 3**). Les protéines sont associées aux lipides, aux glucides et aux minéraux. La plupart des lipides se trouvent sous forme de lipoprotéines, ce qui leur confère un caractère hydrophile et les maintient en solution (Nathier et Dufour, 2005).



**Figure 3:**représentation de structure interne de jaune d'œuf(Anton et al, 2013)

## I.2.2 Formation du jaune d'œuf

### I.2.2.1 Développement de l'ovocyte

Lors de l'éclosion, l'ovaire d'une poule contient environ 12000 ovocytes primaires qui sont les gamètes disponibles pour toute sa vie. A ce stade, les ovocytes ont terminé leur division méiotique et se trouvent en prophase de la première division. Seulement un peu moins de 2000 de ces ovocytes seront effectivement développés pour produire des œufs.

Peu après l'éclosion, les ovocytes entrent dans une phase d'augmentation au cours des premières semaines. Pendant cette phase, les ovocytes se différencient en formant un épithélium folliculaire et accumulent des protéines provenant de la granulosa ou du fluide périvitellin. La plupart des follicules primordiaux restent inactifs pendant les années suivantes, et beaucoup d'entre eux disparaîtront par atrophie. Seuls quelques follicules continuent leur croissance en accumulant des protéines et des lipides.

Un bon développement folliculaire nécessite une sélection des follicules qui se produit quotidiennement. Les follicules sélectionnés accumulent rapidement des protéines et des lipides provenant du foie, ce qui correspond à la phase de follicule en plein accroissement. A ce stade, le follicule présente une structure caractéristique comprenant différentes couches, telles qu'une couche périvitelline acellulaire, granulosa, la couche basale, les thèques internes et externes, ainsi qu'un tissu conjonctif. Cette structure spécifique et bien vascularisée permet de collecter les lipoprotéines circulantes et les transporter vers le jaune d'œuf en formation (Moran 1987)

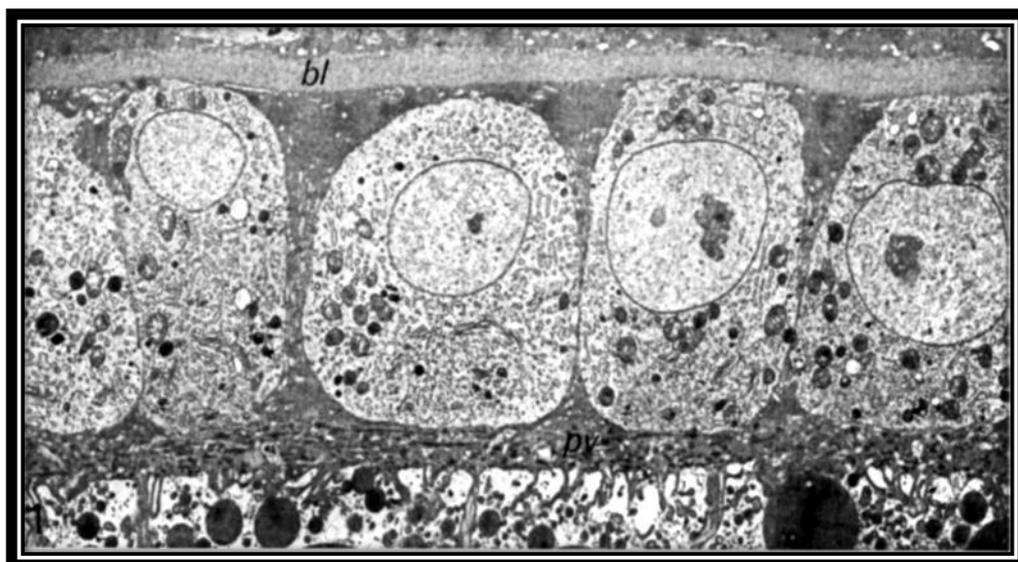


Figure 4 : structure folliculaire(Moran 1987)

### I.2.2.2 Chronologie et régulation du dépôt du jaune (vitellogenèse)

La vitellogenèse est un processus crucial dans le développement des œufs chez les poules. Pendant cette phase, le vitellus, également appelé jaune d'œuf, s'accumule progressivement dans l'ovocyte en vue de l'ovulation. La vitellogenèse débute dès le stade juvénile de la poule et se termine juste avant l'ovulation, avec une période critique de 7 à 11 jours durant laquelle environ 98 % du jaune est déposé de manière linéaire. Cependant, ce dépôt de jaune cesse brusquement 2 à 3 heures avant l'ovulation. La production régulière d'un œuf par jour est rendue possible grâce au développement synchronisé d'un groupe de follicules sur l'ovaire, parmi lesquels seul un follicule est capable de maturité et est prêt à être ovulé. Ce processus garantit une ponte continue chez les poules (Nys, 2010).

La vitellogenèse est un processus qui conduit à la maturation des ovocytes qui se déroule en trois étapes :

- **La phase initiale (d'accroissement lent)** : correspond au dépôt de quelques goutteles lipidiques. Il faudra 4 à 5 mois pour que les ovules passent d'un diamètre de 1 à 2 centièmes de millimètre à presque 1mm.
- **La phase (intermédiaire)** : correspond au développement des follicules sélectionnés qui atteindront un diamètre de 4 mm. Elle se caractérise par un dépôt de protéines essentiellement mais également de quelques lipides. Cette phase se conduit sur 60 jours et aboutit à ce que l'on appelle le vitellus blanc.
- **La phase de (grand accroissement)** : se déroule de 7 à 11 jours avant l'ovulation. La croissance de l'ovule s'accélère rapidement et son poids passe de 200 mg à 15-18 g. Durant cette phase, les couches successives de jaunes sont déposées.

La vitesse avec laquelle s'effectue cette croissance rapide du jaune varie avec l'âge de l'animal. Le poids des jaunes augmente avec l'âge de la poule (Nys, 2010).

### I.2.2.3 Synthèse hépatique des constituants du jaune

A l'exception des immunoglobulines, la plupart des protéines présentes dans le jaune, ainsi que les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol, sont synthétisés par le foie de la poule. Les besoins en protéines chez les poules sexuellement matures dépendent à la fois de leurs besoins de maintien et de leurs besoins pour la formation des œufs. À la maturité sexuelle, la lipogenèse est multipliée par 10. L'acquisition de la maturité sexuelle chez la poule correspond à une forte stimulation de la synthèse de certaines protéines déjà présentes

dans le foie de la poule immature, ainsi qu'à l'induction de la synthèse des nouveaux composants spécifiques du jaune. Cette synthèse des constituants du jaune par le foie est contrôlée principalement par les produits œstrogènes, notamment par la thèque des petits follicules. La production d'œstrogènes et de progestérone 2 à 3 semaines avant la production du premier œuf favorise également le développement des organes reproducteurs et des caractères sexuels secondaires. En fin de compte, le jaune est une émulsion d'eau, de lipoprotéines riches en triglycérides (lipoprotéines très basse densité ou VLDL) et de protéines, principalement la lipovitelline et la phosvitine, auxquelles s'ajoutent de nombreux autres constituants en quantités mineures (Moran, 1987).

### 1.2.3 Composition chimique du jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est essentiellement composé de lipides et de protéines. Ces derniers doivent être considérés comme un ensemble, tous les lipides (phospholipides et triglycérides) sont associés à au moins 02 protéines (vitelline et vitellénine). Les lipides du jaune d'œuf sont représentés à 65-70 % de graisses neutres (triglycérides) et à 25-30 % de phospholipides.

**Tableau I :** Quantité absolue des protéines et des lipides dans le jaune d'œuf

Protéines : 3,2 g	Quantité absolue	Lipides 6,4g	Quantité absolue
Livétines (hydrosolubles)	0,4 à 1,0	Triglycérides	4,1
Phosvitines	0,5	Phospholipides	1,9
Vitellines (dans H.D.L)	0,4 à 1,5	Cholestérol	0,25
Vitellénine (dans L.D.L)	0,9	Vitamines	0,13

### 1.2.4 Les constituants majeurs du jaune d'œuf

Les constituants du jaune d'œuf peuvent être séparés en fractions par centrifugation.

#### 1.2.4.1 Les lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL, qui constituent principalement le jaune d'œuf, sont composées de 83 à 89 % de lipides et de 11 à 17 % de protéines. Elles contiennent un noyau de lipides neutres, tels que les triglycérides et les esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de phospholipides et de protéines en contact avec la phase aqueuse. Les LDL présentes dans le jaune d'œuf sont dérivées des lipoprotéines précurseurs appelées les VLDL (lipoprotéines de très basse densité), qui sont synthétisées dans le foie de la poule (Schneider et al., 1990).

#### 1.2.4.2 Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

Les HDL constituent environ 17 % de la matière sèche du jaune d'œuf et représentent 36% de ses protéines. Ils se présentent sous forme de dimères composés de 80 % de lipides et 20 % de

protéines. Les HDL sont issue des vitéllogénines, qui sont des macroprotéines granulaires synthétisées par le foie. Les vitéllogénines subissent une protéolyse par la cathepsine D une fois qu'elles sont phénoménales dans le jaune. Elles se séparent alors en un complexe HDL-phosvitine et lipovitelline (Schneider, 2009).

#### **I.2.4.3 Phosvitine**

La phosvitine, qui constitue principalement les granules, représente environ 3 % de la matière sèche du jaune d'œuf. Cette protéine est fortement phosphorylée et contribue à 80 % des protéines présentes dans le jaune d'œuf. La phosvitine est très hydrophile et possède une grande affinité pour les cations, ce qui en fait le principal transporteur de fer dans le jaune d'œuf. Elle est également capable de se lier à d'autres ions tels que le calcium, le magnésium, le manganèse ou le cobalt (Greengard et al., 1964).

#### **I.2.4.4 Livétines**

Les livétines, qui font référence aux protéines globulaires présentes dans le plasma, ne sont pas associées à des lipides. Elles représentent environ 11 % de la matière sèche du jaune d'œuf et environ 30 % de ses protéines totales. Ces protéines sanguines se trouvent dans le jaune d'œuf sans subir de modification. Différents types de livétines sont présents, notamment la livétine  $\alpha$  ou albumine sérique, la livétine  $\beta$  et la livétine Y, qui correspond aux immunoglobulines du jaune d'œuf (Moran, 1987).

#### **I.2.4.5 Les lipides**

Les lipides constituent la composante principale du jaune d'œuf, représentant environ 60 % de sa composition. Ils se répartissent dans les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les lipoprotéines de basse densité (LDL). Parmi ces lipides, on trouve principalement des triglycérides (environ 65 %), des phospholipides (environ 29 %), du cholestérol (environ 5 %) et des acides gras libres (moins de 1 %).

#### **I.2.4.6 Les triglycérides**

Présentent une distribution d'acides gras qui est très similaire à celles des lipides totaux. Environ 30-35 % sont des acides gras saturés, 40-45 % sont mono-insaturés et 20-25 % sont polyinsaturés.

### I.2.4.7 Les phospholipides

Sont riches en acides polyinsaturés. Ils sont principalement composés de phosphatidylcholine (76 %) et phosphatidyléthanolamine (20 %). D'autres phospholipides sont présents en quantités infimes.

### I.2.4.8 Le cholestérol

Représente 5 % des lipides totaux du jaune d'œuf. Le transport du cholestérol vers le jaune se fait via les VLDL et dans une moindre mesure via la vitéllogénine. La concentration du cholestérol dans le jaune d'œuf ne dépend donc que de sa concentration dans les VLDL. Ce cholestérol est essentiel pour l'établissement de la structure et des propriétés des VLDL (Belitz, Grosch et Schieberle, 2009).

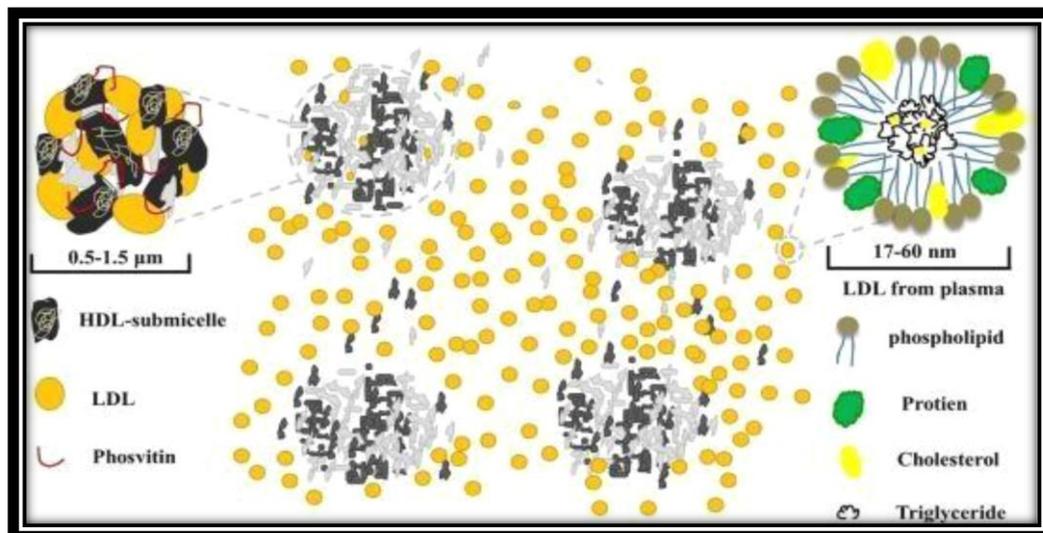


Figure 5:représentation des structure de HDL,LDL et phosvitine (Anton et al, 2013).

### I.2.4.9 Les vitamines et les pigments :

Les molécules liposolubles, telles que les vitamines A, D, E, ainsi que les caroténoïdes sont également présentes dans le jaune d'œuf. Les caroténoïdes sont responsables de sa coloration, allant d'un jaune très pale à un orange soutenu. Principalement composés de xanthophylles, les caroténoïdes sont présents dans le jaune d'œuf exclusivement (Baribeau, 2004).

#### **I.2.4.10 Les protéines mineures du jaune d'œuf :**

Le jaune d'œuf contient également de nombreuses autres protéines, bien que leur concentration soit généralement faible. L'identification de ces protéines a été rendue possible grâce aux techniques de protéomique à haut débit. Jusqu'à présent, ces analyses ont permis d'identifier environ 260 protéines dans le jaune d'œuf (**Man et al., 2008 ; Farinazzo et al., 2009**). Ces études ont confirmé la présence de protéines majeures telles que l'albumine sérique, les apovitellines, la phosvitine et les glycoprotéines du jaune. De plus, on trouve des molécules mineures comme les apolipoprotéines, les protéines liant les vitamines (rétinol, vitamine D, biotine, riboflavine), les immunoglobulines Y, les protéases et les antiprotéases, ainsi que des enzymes antioxydantes et d'autres protéines présentes dans le sérum sanguin.

#### **I.2.5 Les fonctions biologiques du jaune d'œuf**

##### **I.2.5.1 Fonction nutritive**

Les protéines présentes dans le jaune d'œuf constituent une réserve importante de nutriments pour l'embryon. Elles sont facilement digestibles, ce qui favorise le développement de l'embryon dans un environnement clos où les déchets ne peuvent être évacués. En plus de leur valeur nutritionnelle, certaines de ces protéines ont des rôles biologiques spécifiques, tels que le transport et le stockage de vitamines (comme la "riboflavin-binding protein", la "vitamin-D-binding protein" et l'avidine) ou d'ions métalliques (comme l'ovotransferrine et la phosvitine). De plus, de nombreuses activités biologiques potentielles ont été révélées en comparant ces protéines à des homologues présents dans d'autres espèces (**Mann et al., 2008 ; Farinazzo et al., 2009 ; D'Alessandro et al., 2010**).

##### **I.2.5.2 Protection de l'embryon**

Le jaune d'œuf contient différentes molécules dotées d'un potentiel antimicrobien. Ces molécules se divisent en deux catégories : les immunoglobulines, qui font partie du système immunitaire adaptatif, et les protéines du système de défense innée (**Réhault-Godbert et al., 2011**).

Les immunoglobulines sont transmises de la poule à l'embryon par le biais du jaune d'œuf (**Morrison et al., 2002**). Elles jouent un rôle dans l'immunité de l'embryon en développement, car le système immunitaire du poussin ne se forme que plus tard, après l'éclosion. Cette composante "immunoglobuline" joue un rôle crucial dans la protection précoce de l'embryon. Les protéines du système de défense innée contenues dans le jaune d'œuf

comprennent des protéines chélatrices de fer ou de vitamines, le lysozyme, des antiprotéases, ainsi que d'autres protéines telles que les histones (**Maclachlan et al., 1994 ; Réhault et al., 2007 ; Mann et al., 2008 ; Farinazzo et al., 2009 ; Réhault-Godbert et al., 2011**).

### **I.2.6 Application du jaune d'œuf dans la conservation des spermatozoïdes :**

Pendant le processus de cryoconservation, les cellules sont soumises à divers stress, tels que des variations thermiques et osmotiques lors du refroidissement, ainsi que la formation ultérieure et la récupération des cristaux de glace. Ces changements sont l'un des principaux facteurs responsables de la mort des spermatozoïdes sur le plan biophysique. Afin de minimiser ces effets négatifs, il est nécessaire d'utiliser des agents cryoprotecteurs (APC) qui pénètrent dans la membrane cellulaire. Ces APC permettent d'augmenter la fluidité des cellules, de les déshydrater partiellement, de faire baisser leur point de congélation et ainsi de réduire la formation de cristaux de glace à l'intérieur des cellules (**Rosato et Laffaldano, 2013**).

#### **I.2.6.1 Jaune d'œuf, cryoprotecteur :**

Le jaune d'œuf est couramment utilisé dans les solutions de dilution pour la cryoconservation des spermatozoïdes, généralement à une concentration de 10 à 20 % (**Mocé et Vicente, 2009**). Les phospholipides présents dans le jaune d'œuf peuvent contribuer à atténuer les dommages causés par le refroidissement des spermatozoïdes en se liant aux lipoprotéines de faible densité (LDL) présentes dans la membrane cellulaire et en augmentant sa perméabilité. Cependant, ils n'altèrent pas la composition ni les propriétés physiques de la membrane cellulaire (**Andrabi, 2007**) (**Figure 6**).

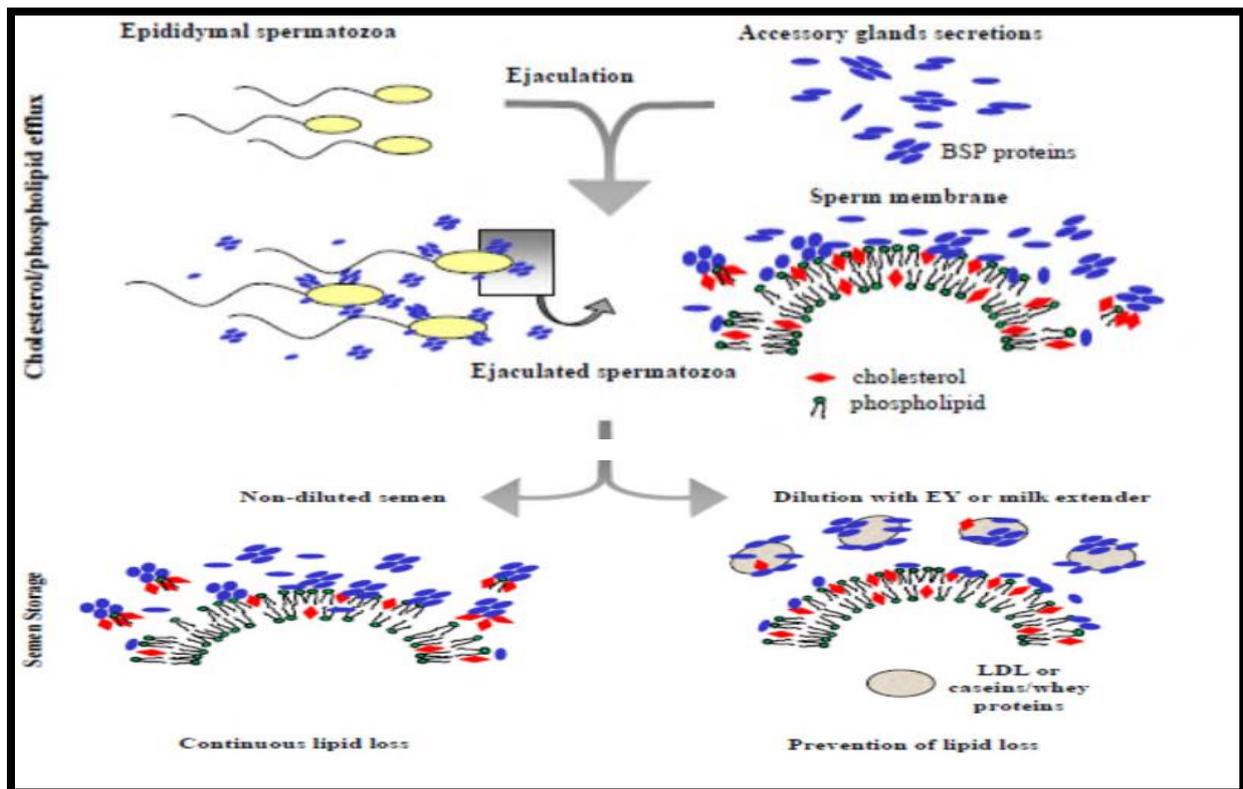


Figure 6: le Mécanisme de protection du spermatozoïdes avec le jaune d'œuf (Manjuath et al., 2002)

### I.3 Physiologie de la reproduction :

#### I.3.1 Anatomie :

Comprend les testicules, les glandes annexes et les voies spermatiques, qui sont responsables du transport du sperme et de son dépôt dans les voies génitales femelles.

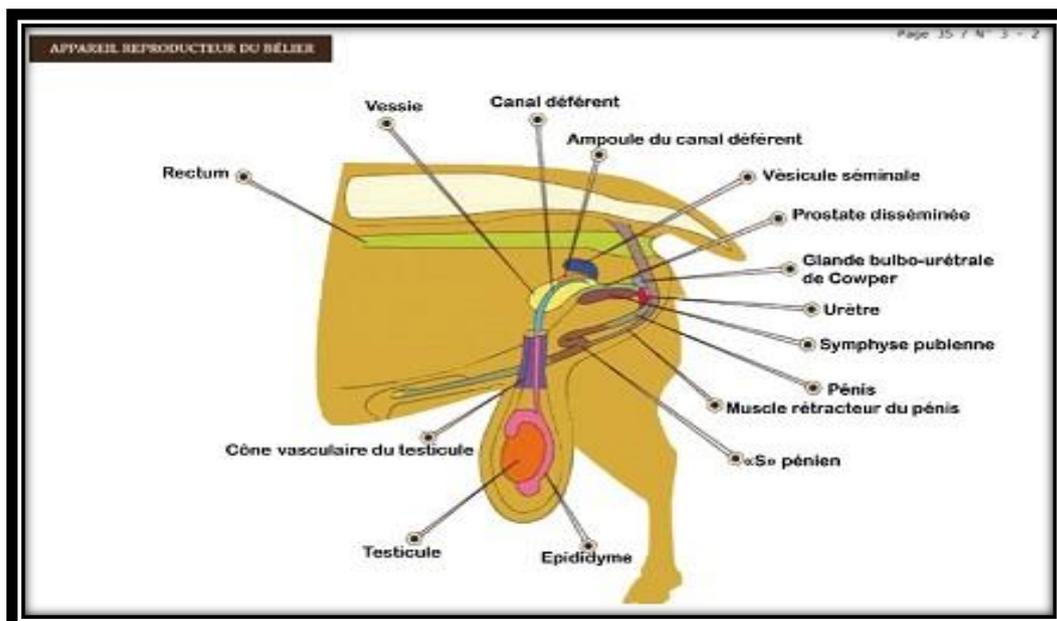


Figure 7: appareil reproductrice male (Pastorale, 2021).

### 1.3.2 Testicule :

Les testicules sont les organes reproducteurs masculins responsables de la production de spermatozoïdes (spermatogenèse) et de la synthèse de la testostérone, l'hormone sexuelle principale chez les mâles. La descente des testicules et leur migration à travers le canal inguinal commencent très tôt chez les béliers et les boucs, entre le 100e et le 105e jour de vie fœtale. La migration est généralement terminée avant le cinquième mois de gestation (Boukhliq et al., 2018).

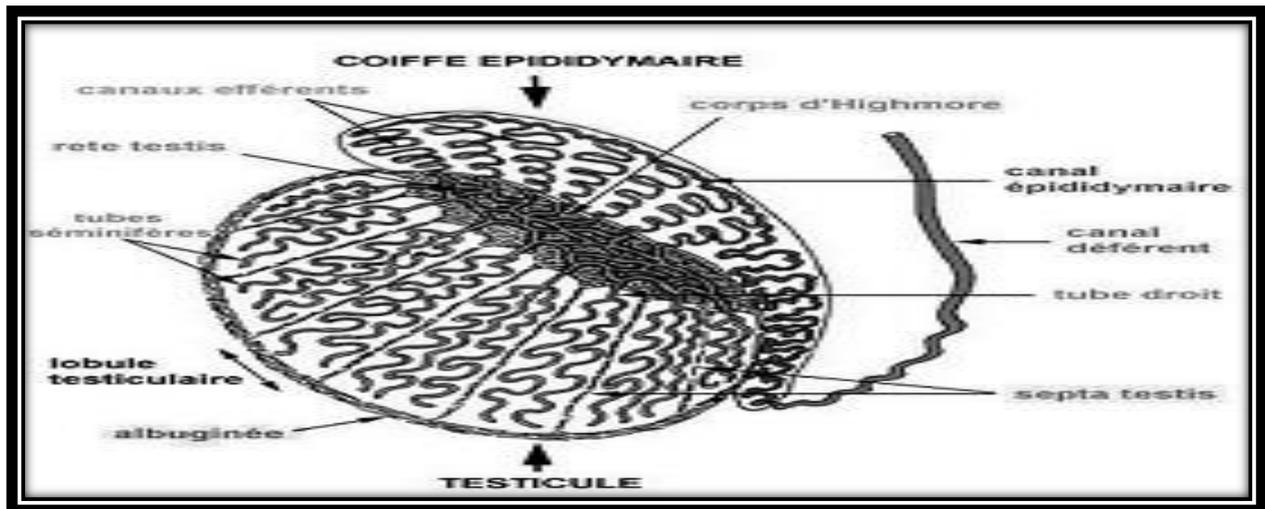


Figure 8: morphologie d'un testicules (Baril et al., 1993)

### 1.3.3 Structure testiculaire :

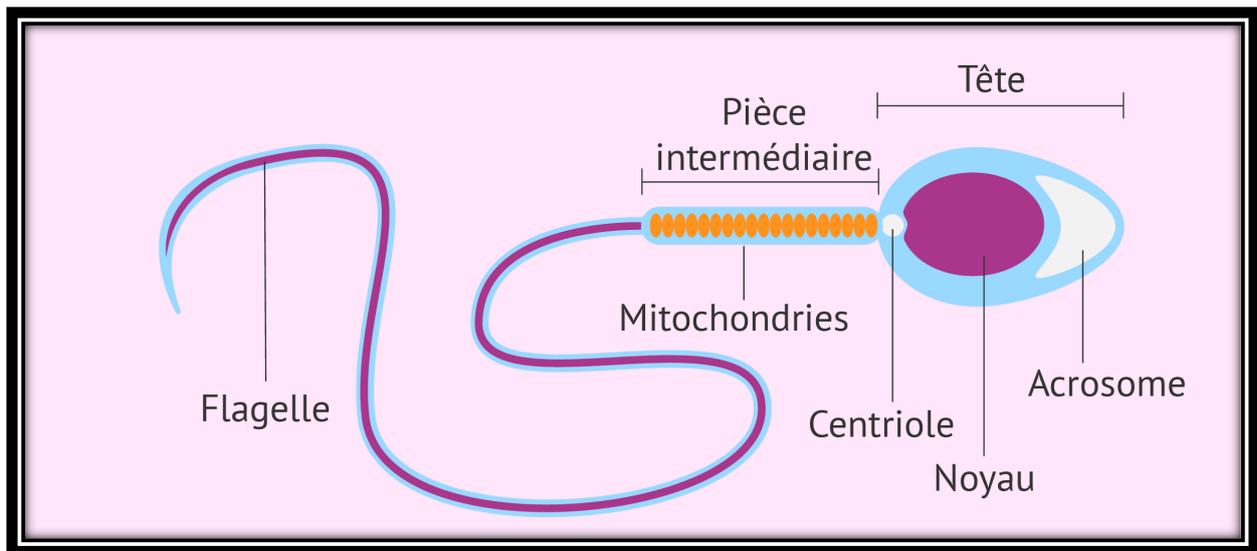
La structure des testicules est composée de couches fibreuses, en particulier l'albuginée et le parenchyme testiculaire, qui est le tissu principal. L'albuginée envoie des radiations (septulatestis) qui forment des lobules contenant les tubules séminifères. Ces radiations convergent vers la partie centrale du testicule, où un tissu conjonctif longitudinal s'étend du haut au bas de chaque testicule, formant le médiastin testis. À ce niveau, les tubules séminifères se connectent aux canaux collecteurs qui constituent le rete testis. Ce dernier transporte les spermatozoïdes vers la tête de l'épididyme. Les tubules séminifères se divisent en deux types : les tubules enroulés, nombreux et principalement responsables de la production de spermatozoïdes, et les tubules droits qui se terminent par le rete testis. Les tubules séminifères sont composés de spermatogonies et de cellules sustentaculaires connues sous le nom de cellules de Sertoli. Les spermatozoïdes sont formés par un long processus de division cellulaire et de maturation. Dans le tissu conjonctif lâche entre les tubules séminifères, se trouvent des cellules spécialisées dans la production de testostérone, appelées cellules de Leydig (Boukhliq et al., 2018)

### **1.3.4 Épididyme :**

L'épididyme est en effet un organe situé sur le bord postérieur du testicule, et il joue un rôle crucial dans la maturation et le stockage des spermatozoïdes. Lorsque les spermatozoïdes quittent les canaux efférents du testicule, ils pénètrent dans l'épididyme. Au sein de l'épididyme, les spermatozoïdes subissent un processus de maturation qui les rend mobiles et aptes à la fécondation. Ce processus se déroule en plusieurs étapes et est essentiel pour que les spermatozoïdes soient capables de fertiliser un ovule. Pendant leur passage dans l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur motilité, ce qui signifie qu'ils deviennent capables de se déplacer de manière autonome grâce aux mouvements de leur flagelle. De plus, ils subissent des modifications au niveau de leur membrane et de leur cytoplasme, ce qui améliore leur fonctionnalité et leur capacité à pénétrer dans l'ovule lors de la fécondation (**Baril et al., 1993**).

### **1.3.5 Spermatozoïdes :**

Le spermatozoïde est en effet une petite cellule mesurant environ 5 micromètres de diamètre, ce qui la rend beaucoup plus petite que l'ovule. Il possède une queue mobile appelée flagelle, mesurant environ 60 micromètres de long. Afin d'être léger et mobile pour atteindre rapidement l'ovule, le spermatozoïde réduit son cytoplasme au minimum et compacte son ADN. Sa tête est recouverte d'une structure appelée acrosome, qui contient des enzymes nécessaires pour percer la membrane de l'ovule. Le spermatozoïde est une cellule haploïde, ce qui signifie qu'elle contient la moitié du matériel génétique de l'individu. Cette moitié est obtenue lors du processus de méiose, qui se produit au cours de la spermatogenèse dans les tubes séminifères des testicules, où les cellules germinales primordiales subissent des transformations. La principale fonction du spermatozoïde est de contribuer à transmettre la moitié du patrimoine génétique à l'embryon futur. Étant donné que le spermatozoïde est un gamète produit par un individu de sexe masculin, son chromosome sexuel peut être soit X, soit Y, et il détermine le sexe de l'embryon (tandis que l'ovule contient toujours un chromosome X).



**Figure 9:**Morphologie des spermatozoïdes (Antonio,2017). .

## II. la cryoconservation de sperme

### II.1 Définition :

Le terme "cryoconservation" fait référence à la conservation de semences, de sperme, d'embryons ou de micro-organismes à des températures extrêmement basses. Cette technique permet d'éliminer l'eau et de réduire considérablement l'énergie cinétique moléculaire ainsi que la diffusion, favorisant ainsi un stockage potentiellement très long. La conservation du sperme consiste à préserver le sperme des animaux, en particulier dans le cas des espèces d'animaux d'élevage, en vue d'une utilisation future dans le cadre de l'insémination artificielle. Cette technique est importante pour la dissémination des traits génétiques d'une race animale à travers différents élevages, en utilisant des techniques de biotechnologie de la reproduction, et pour améliorer la qualité génétique des animaux d'élevage en sélectionnant les meilleurs reproducteurs. De plus, la conservation de la semence est un outil essentiel pour préserver les races animales menacées d'extinction en stockant leur sperme dans des banques de gènes animaux (Anass, 2022).

### II.2 Historique

Avant l'avènement de la conservation cryogénique, il existait des méthodes connues pour conserver la viande, telles que les engelures et l'hibernation. Au 17<sup>ème</sup> siècle, Robert Boyle, un pionnier de la chimie moderne, a mené des études sur les effets des températures négatives sur divers animaux. Dans son ouvrage intitulé "New Experiments and Observations Touching Cold" (1668), Boyle a suggéré la possibilité de congeler et décongeler lentement certains animaux pour les préserver. Il pensait que les basses températures pouvaient ralentir la décomposition des tissus animaux et améliorer leur conservation.

Dans les années 1930, Basile J. Luyet, un scientifique suisse, et son équipe ont expérimenté la préservation des cellules animales en les déshydratant avant de les congeler. Luyet a publié un article intitulé "Revival of Frog's Spermatozoa Vitriified in Liquid Air" dans lequel il exposait des spermatozoïdes de grenouille à l'air liquide pendant quelques secondes avant de les plonger dans l'eau, espérant ainsi éviter la formation de cristaux de glace. Toutefois, ce n'est qu'à partir des années 1940 que la cryobiologie moderne a réellement émergé grâce aux travaux de B. Luyett dans son livre "Life and Death at Low Temperatures", où il étudiait la solidification à basse température sans formation de glace dans les matériaux biologiques. Les

recherches de Luyett ont inspiré d'autres études sur la préservation des organes, notamment celles menées par le cryobiologiste Greg Fahy dans les années 1980.

Parallèlement, le biologiste français Jean Rostand a expérimenté la congélation de cellules avec du glycérol dans les années 1940, ce qui a inspiré Robert Ettinger à poursuivre ses recherches sur la cryogénéisation des êtres vivants des décennies plus tard. En 1949, les scientifiques britanniques Christopher Polge, Audrey Ursula Smith et Alan Sterling Parkes ont fait une découverte révolutionnaire sur les propriétés cryoprotectrices du glycérol dans leur travail intitulé "Revival of Spermatozoa after Dehydration and Vitrification at Low Temperatures". Ils ont examiné les effets de différentes concentrations de glycérol sur la protection des cellules et leur toxicité en utilisant du sperme humain, de lapin et de volaille. Leurs découvertes ont permis de trouver un équilibre entre la protection des cellules et la toxicité, mais cela reste encore un défi dans l'industrie de la cryopréservation aujourd'hui.

En 1952, Christopher Polge et Lionel Edward Aston Rowson ont réussi à congeler du sperme de taureau pour une utilisation ultérieure dans l'insémination artificielle des vaches, démontrant ainsi la viabilité du sperme après congélation. Cette découverte a révolutionné l'utilisation de la congélation de sperme pour l'insémination artificielle chez les bovins et d'autres mammifères. En 1954, les chercheurs Jerome Sherman et le professeur Raymond Bunge ont développé une technique pour congeler et décongeler le sperme humain tout en maintenant sa viabilité, permettant à trois femmes de tomber enceintes grâce à l'utilisation de sperme préalablement conservé. Cette découverte a révolutionné la fertilité humaine et a ouvert la voie à la conservation de sperme pour une utilisation ultérieure dans l'insémination artificielle.

En 1972, les scientifiques Mazur, Leibo, Whittingham et Wilmut ont annoncé la naissance des premiers petits de souris issus d'embryons cryopréservés, ouvrant ainsi la voie au développement de protocoles de cryopréservation pour d'autres mammifères, y compris les êtres humains (**Jennifer, 2022**).

### II.3 Objectif :

- Le sperme peut être obtenu et utilisé à l'avenir pour l'insémination intra-utérine ou la fécondation in vitro.
- Permet de conserver le potentiel génétique des mâles.

- Est une méthode utile pour la conservation des ressources biologiques des animaux d'élevage et même chez les animaux sauvages, la cryoconservation est nécessaire pour le stockage et le transport de sperme à travers les pays et pour la préservation des animaux en voie de disparition (**Kaneko et al., 2014**)

## **II.4 Etapes de la conservation**

### **II.4.1 Récolte :**

Il existe plusieurs méthodes de collecte de sperme :

#### **II.4.1.1 Vagin artificiel :**

Les vagins artificiels, également connus sous l'acronyme AV, sont des dispositifs couramment utilisés pour collecter le sperme de différentes espèces animales, notamment les bovins, les équidés, les ovins, les caprins, les lagomorphes et les félidés (**Derivaux, 1971**). Pour assurer l'efficacité de cette méthode de collecte de sperme, il est nécessaire que le mâle concerné soit conscient, peu effrayé par la présence humaine, et qu'il éprouve une forte motivation à éjaculer plutôt qu'à attaquer les personnes présentes. Le fonctionnement de l'AV repose sur une stimulation thermique et mécanique qui permet de provoquer l'éjaculation chez l'animal. Le dispositif est composé d'un tube avec une doublure externe en caoutchouc pouvant contenir de l'eau, et d'une doublure interne lubrifiée juste avant l'utilisation. La doublure externe est remplie d'eau chauffée entre 42 et 48 degrés Celsius. Différents types d'AV sont disponibles selon l'espèce animale considérée, notamment pour les taureaux et les lapins, et un accessoire appelé "cône directeur" est également utilisé pour la collecte de sperme chez les chiens (**Derivaux, 1971**).

Le procédé de collecte de sperme avec un AV implique que le mâle s'accouple avec le dispositif, ce qui permet au pénis de l'animal de s'engager dans le tube et d'éjaculer dans la doublure interne lubrifiée. Pour garantir le succès de la collecte, il est recommandé de laisser l'animal effectuer les mouvements de pénétration par lui-même plutôt que de tenter de glisser le dispositif sur son pénis. Le comportement de l'animal pendant l'accouplement avec l'AV dépend de son espèce et de son tempérament. Bien que l'utilisation d'une femelle pour stimuler l'accouplement puisse être envisagée, cette pratique est moins courante car les femelles, sauf en période de chaleur, ont souvent peu d'intérêt pour le processus d'accouplement avec un AV, ce qui peut causer des blessures. De plus, si l'utilisation de l'AV n'est pas couronnée de succès, cela peut conduire à la fécondation de la femelle ou à la

transmission de maladies vénériennes au mâle, Pour la collecte de sperme chez les taureaux, un bœuf dressé est généralement utilisé, tandis que pour les étalons, un mannequin est souvent employé (**Derivaux, 1971**).



**Figure 10:**vagin artificielle (*Melissa & R, 2002*)

#### **II.4.1.2 Collecte manuelle :**

De nombreux individus masculins peuvent être incités à déclencher une éjaculation en appliquant une pression et un massage sur le pénis. Une fois le mâle excité, un dispositif de collecte de sperme consistant en un cône directeur spécifique attaché à un tube est introduit sur le pénis pour faciliter la récupération du sperme. Cette technique est couramment utilisée pour la collecte de sperme chez les porcs et les chiens. Une période d'entraînement initiale peut être recommandée, et la présence d'une femelle en œstrus pour stimuler le mâle est souvent bénéfique, en particulier lorsque le mâle est timide (**Melissa & R, 2002**).

Un autre type de stimulation utilisé occasionnellement chez les taureaux implique la caresse des ampoules (canal déférent terminal), des vésicules séminales et de la prostate à travers la paroi rectale. Cependant, dans la plupart des cas, le taureau doit être maintenu en position debout dans une goulotte et sous sédation pour permettre la relaxation et l'extrusion du pénis (**Melissa & R, 2002**). En conjonction avec un cathéter urétral, cette technique peut être utilisée pour obtenir un éjaculat stérile.

Le sperme peut également être régulièrement prélevé chez les poulets et les dindes en utilisant une forme de manipulation digitale (**Melissa & R, 2002**).

### **II.4.1.3 Spermatozoïdes épидидymaire :**

Le prélèvement de sperme de l'épididyme est une technique utilisée pour conserver le sperme d'animaux de grande valeur génétique dans différentes espèces (Sana, 2022). Cette méthode est utilisée lorsque la capacité de reproduction de l'animal est compromise en raison d'une blessure grave, d'une castration médicale ou du décès de l'animal. Le sperme prélevé par flush épидидymaire peut être utilisé pour féconder des ovocytes in vitro.

Les prélèvements peuvent être effectués jusqu'à douze heures après le décès de l'animal s'il est conservé au froid. Certains propriétaires et éleveurs souhaitent conserver le sperme de leurs animaux après la castration ou le décès pour obtenir de nouvelles progénitures. Il est également possible de prélever du sperme épидидymaire sur un animal vivant sous anesthésie locale ou générale en utilisant une microponction du canal déférent et une canule introduite à travers le scrotum pour collecter le sperme dans une petite fiole. Chaque épидидyme est soigneusement séparé du testicule par dissection. La queue et le canal déférent sont isolés, permettant ainsi la récupération des spermatozoïdes à l'aide de deux méthodes spécifiques, la méthode de flottaison et la technique de flush rétrograde.

Dans la méthode de flottaison, également connue sous le nom de méthode d'incision, l'épididyme caudal et le canal déférent sont incisés à plusieurs endroits. Par la suite, ils sont lavés avec une solution de 2,5 ml d'alcool à 70 °C, préalablement chauffée à une température de 37 °C. Ensuite, ils sont suspendus dans un dilueur pour semence, permettant ainsi une diffusion progressive des spermatozoïdes dans le dilueur, ce processus prenant environ dix minutes.

Quant à la technique de flush rétrograde, elle implique la collecte du contenu de la lumière du tubule épидидymaire en perfusant soit de l'huile de paraffine, soit une solution de chlorure de sodium (NaCl) dosée à 0,9 %, à partir du canal déférent. Cette perfusion est réalisée à l'aide d'une aiguille maintenue en place par un clamp. Le sperme est recueilli en incisant l'organe au niveau de la moitié de la partie caudale de la queue de l'épididyme (Sana, 2022)

## **II.4.2 Evaluation**

### **II.4.2.1 Evaluation macroscopique :**

#### **a. Volume :**

Lorsqu'on évalue l'éjaculat, il est possible de mesurer précisément le volume en utilisant un tube de collecte gradué. Ce volume peut varier considérablement, allant de 0,5 à 14 ml, et il est influencé par divers facteurs tels que l'âge, la race, l'alimentation, l'état de santé, les conditions de collecte, ainsi que la fréquence des prélèvements. En moyenne, chez un taureau adulte, le volume éjaculé est d'environ 6 ml, tandis que chez les jeunes taureaux, il est généralement d'environ 2 ml.

#### **b. Couleur :**

La coloration normale du sperme chez le taureau est généralement ivoire-crème ou blanc-laiteux, avec des variations possibles en fonction de la concentration des spermatozoïdes. L'éjaculat peut présenter une gamme de couleurs allant du blanc clair au jaune vif. L'aspect typique est généralement homogène et crémeux. Cependant, il est important de noter que le sperme pathologique peut présenter différentes couleurs selon les cas. Il peut être brunâtre, rosé, bleuâtre, jaunâtre, rougeâtre ou grisâtre. Ces variations de couleur peuvent indiquer des problèmes ou des anomalies dans la composition ou la santé du sperme (Ezekwe A.G., 1988).

#### **c. Viscosité :**

Une bonne viscosité est synonyme d'une bonne concentration en spermatozoïdes.

#### **II.4.2.2 Evaluation microscopique :**

Consiste à évaluer la motilité, la morphologie et la concentration de sperme

##### **➤ Motilité :**

C'est un indicateur crucial pour évaluer la vitalité et la survie des spermatozoïdes. Il permet d'évaluer la mobilité globale des échantillons de sperme collectés (motilité en masse et motilité individuelle), ainsi que la mobilité des spermatozoïdes individuels dans l'échantillon dilué.

##### **➤ Motilité massale :**

L'évaluation du sperme se fait au microscope à un grossissement de x10. Lors de l'examen microscopique d'une goutte de sperme non diluée, l'observateur analyse les mouvements et l'effet du déplacement des spermatozoïdes dans le liquide séminal. À la fin de l'observation, une note de 0 à 5 est attribuée à chaque éjaculat en fonction du mouvement de masse des spermatozoïdes. Certains chercheurs convertissent ensuite cette note en un

pourcentage estimé de spermatozoïdes mobiles. La norme minimale pour un éjaculat correspond à un mouvement de masse satisfaisant, généralement caractérisé par un mouvement tourbillonnant (note supérieure à 3), équivalent à environ 60% de spermatozoïdes mobiles (**Gacem, 2016 ; Fidèle, 2008**).

**Tableau II:** note des éjaculats en fonction de leur motilité massale (**Gacem, 2016**) (**Fidèle, 2008**).

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

#### ➤ **Motilité individuelle**

Lors d'un examen, une observation minutieuse du mouvement des spermatozoïdes à travers le champ microscopique est réalisée. Les mouvements normaux des spermatozoïdes se caractérisent par des oscillations régulières et une progression constante. Cette observation permet d'estimer approximativement le pourcentage de spermatozoïdes vivants et d'attribuer une note de 0 à 5 en fonction de la qualité du sperme. Les spermatozoïdes qui se déplacent en ligne droite sont considérés comme mobiles, tandis que ceux qui tournent en rond ou ont une mobilité réduite sont considérés comme moins mobiles. Pour être considéré de bonne qualité, un sperme doit présenter au moins 60 à 70% de spermatozoïdes vivants (**Gacem, 2016 ; Sana, 2022**).

**Tableau III :** notes attribués au éjaculats en fonction de leur motilité individuelle

Critère	note
Absence des spermatozoïdes : azoospermie	0
Absence des spermatozoïdes : spermatozoïdes mort	1
25% De spermatozoïdes vivants	2
60% De spermatozoïdes vivants	3
80% De spermatozoïdes vivants	4
100% De spermatozoïdes vivant	5

#### ➤ **Mobilité progressive :**

Cette méthode permet d'évaluer le véritable déplacement des spermatozoïdes. La vitesse de progression est évaluée de manière subjective par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent présenter des mouvements

oscillants, caractérisés par des vibrations sans direction définie, ainsi que des mouvements fléchants, se déplaçant rapidement en ligne droite. Les spermatozoïdes sont classés sur une échelle de 1 à 5 en fonction de leur type de mouvement. (Sana, 2022)

**Tableau IV:** note d'appréciation de la motilités progressives des spermatozoïdes (Sana, 2022)

Note	INTERPRETATION
0	Pas de mouvement
1	Mouvement oscillant légers sans progression
2	Mouvement oscillant et progression faible
3	Mouvement oscillant fléchant et progression lente régulière
4	Mouvement fléchant et progression régulière vers l'avant
5	Mouvement fléchant avec progression rapides vers l'avant

➤ **Morphologie des spermatozoïdes :**

Le procédé d'examen morphologique permet de distinguer les spermatozoïdes normaux des anormaux, ainsi que les spermatozoïdes vivants des morts. Cette méthode repose sur une coloration sélective des organes spécifiques, en fonction de leur état de normalité ou d'anomalie, ainsi que de la vitalité des cellules. La morphologie est évaluée à partir de frottis de sperme colorés avec des encres telles que l'encre de Chine, le Giemsa, l'éosine-aniline ou le bleu de bromophénol. Pour être considéré comme valide, le sperme doit contenir moins de 25 % de spermatozoïdes anormaux et plus de 60 % de spermatozoïdes vivants. (Gacem, 2016 ; Fidèle, 2008).

### II.4.3 Préparation de la semence

#### II.4.3.1 Dilution :

Le milieu de dilution utilisé doit être sûr pour les spermatozoïdes, offrir une protection contre le froid et réduire la croissance microbienne. Pour cela, des substances bactéricides ou bactériostatiques telles que le sulfanilamide (0,3 %), la pénicilline (500 à 1000 UI/ml) et la streptomycine (1 mg/ml) sont ajoutées aux milieux de dilution. Les milieux les plus couramment utilisés comprennent du lait préchauffé et écrémé, auxquels sont ajoutés 10 % de jaune d'œuf de poule et des antibiotiques pour renforcer leur pouvoir protecteur. Une autre option populaire est une solution de citrate de sodium (2,9 %) combinée avec du jaune d'œuf (25 %). Dans le but de minimiser les risques potentiels de transmission de maladies entre espèces, l'utilisation de milieux de dilution synthétiques devient de plus en plus répandue (Gacem, 2016).

Le taux de dilution nécessaire dépend de la concentration de spermatozoïdes souhaitée dans la dose de sperme, ainsi que du volume et de la concentration de spermatozoïdes de l'éjaculat prélevé.

#### **II.4.3.2 Conditionnement :**

La conservation des semences se fait généralement en fractionnant la semence en doses fécondantes, qui peuvent être utilisées à court, moyen ou long terme. Les paillettes en plastique sont la forme de conservation la plus courante et pratique. Ces paillettes sont des tubes creux spéciaux d'une contenance de 0,25 ou 0,5 ml. Elles sont ouvertes d'un côté et équipées de deux boules de coton pour contenir la semence. L'autre côté est scellé automatiquement après le remplissage de la paillette à l'aide d'une machine de remplissage et de soudage. Lorsque la semence est destinée à une utilisation future, la paillette est identifiée et comporte des informations permettant de tracer l'origine de la semence, telles que le nom du géniteur, la race, le numéro de code, la date de récolte, le numéro de récolte, le centre ou le lieu de production.

##### **II.4.3.2.1 Congélation :**

La conservation de la semence dépend de son mode d'utilisation, comme suit :

- Pour une utilisation immédiate, les semences en paillettes sont maintenues dans un bain-marie (thermos) à une température de 36-38°C.
- Pour une utilisation dans les 24 à 48 heures, la semence peut être conservée au frais. Les dilueurs utilisés permettent de préserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes à une température de +5°C pendant 46 à 72 heures.
- Pour une utilisation à long terme, après le conditionnement, la semence est conservée dans une bonbonne contenant de l'azote liquide à une température de -196°C. La congélation est réalisée progressivement à l'aide de machines spécialisées ou manuellement. Les paillettes sont d'abord congelées à -140°C au-dessus d'une vapeur d'azote liquide pendant 9 minutes, puis plongées dans l'azote liquide. Après quelques jours, un test de congélabilité est effectué sur la semence avant sa conservation. Ce test évalue la vitalité des spermatozoïdes après décongélation en examinant leur motilité individuelle. Si la semence présente une bonne congélabilité, elle est sélectionnée et conservée pour une utilisation future en insémination artificielle.

#### II.4.3.2.2 Effet de la congélation sur les spermatozoïdes :

La cryoconservation du sperme est un procédé essentiel en biologie pour préserver la diversité génétique. Cependant, la congélation et le dégel des spermatozoïdes entraînent des dommages significatifs à leur structure et à leur fonction. Pendant la congélation, la formation de glace dans le milieu de dilution provoque une déshydratation des spermatozoïdes et altère leurs membranes. De plus, la congélation peut entraîner la formation de glace à l'intérieur des cellules, ce qui est mortel pour elles. Afin de maximiser la survie des spermatozoïdes, un taux de refroidissement optimal doit être utilisé, rapide pour éviter les effets néfastes de la concentration élevée des solutés du milieu, mais suffisamment lent pour éviter la formation de glace intracellulaire.

Le dégel des spermatozoïdes est effectué rapidement en les plaçant dans un bain d'eau à 37 °C pendant une minute. Lors du dégel, la glace fond, réduisant rapidement la concentration des solutés dans le milieu. Cependant, l'entrée d'eau dans les spermatozoïdes pendant le dégel peut causer des dommages supplémentaires à leurs membranes. Les membranes subissent également des changements de phase lors du réchauffement, ce qui altère leur structure et leur fonctionnalité. Le dégel peut également endommager l'acrosome et les membranes des spermatozoïdes.

La cryoconservation affecte également la capacité fécondante des spermatozoïdes. De plus, elle entraîne une perte de protéines membranaires et une diminution de la capacité des spermatozoïdes à se lier aux cellules de l'oviducte. Des altérations de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes peuvent également survenir. Le processus de cryoconservation entraîne également une détérioration de la qualité du sperme en raison de la production excessive de radicaux libres d'oxygène pendant les cycles de congélation et de décongélation des spermatozoïdes. Cette détérioration est principalement due à la présence d'acides gras polyinsaturés dans les membranes des spermatozoïdes, qui se lient à l'oxygène et génèrent des radicaux libres. Bien que les spermatozoïdes aient des systèmes antioxydants pour neutraliser ces radicaux libres, ils peuvent être insuffisants pour éliminer l'excès de radicaux libres générés, entraînant un stress oxydatif, des dommages à l'ADN et une perte de fonction cellulaire (Anass, 2022).

### III. La conservation de sperme avec le jaune d'œuf et la lécithine.

De nombreuses espèces, ont fait l'objet d'études approfondies sur les effets de la cryoconservation sur la fonction et la fertilité des spermatozoïdes. La cryoconservation compromet l'ultrastructure du sperme, en particulier la membrane plasmique et les membranes acrosomiques externes. Elle entraîne également une induction de la capacitation prématurée, une réaction acrosomique, une altération de la fonction mitochondriale et donc une réduction de la motilité spermatique. Ces effets sont considérés comme les plus significatifs de la cryoconservation sur le sperme(Layek et al., 2016).

L'utilisation des cryoprotecteur telle que le jaune d'œuf dans la conservation peut également protéger les spermatozoïdes des effets néfastes de la cryoconservation en fournissant des nutriments, des antioxydants et des facteurs de croissance qui aident à maintenir la qualité et la viabilité des spermatozoïdes(Jeyendran, 1995) et augmente la capacité de fécondation des spermatozoïdes lorsqu'il ce présents dans des diluants pour le stockage du sperme à température ambiant (Bergeron & Manjunath, 2006).

Les premières études impliquant des spermatozoïdes d'animaux de ferme ont suggéré que les fractions de lipoprotéines et de phospholipides présentes en grande quantité dans le jaune d'œuf peuvent protéger l'intégrité de la membrane cellulaire des spermatozoïdes contre les effets négatifs du froid lors des procédés de refroidissement et de congélation. Cette protection peut être attribuée aux propriétés de ces composés lipidiques(Jeyendran, 1995) ,Le mécanisme dans lequel le jaune d'œuf protégé les spermatozoïdes au cour de la conservation reste inconnu mais des études suggère que Les protéines BSP trouvées dans le plasma séminal peuvent endommager la qualité du sperme car elles entraînent la perte de lipides importants tels que le cholestérol et les phospholipides de la membrane du sperme. Toutefois, il est intéressant de noter que ces effets négatifs peuvent être atténués grâce à l'interaction des facteurs du plasma séminal avec les lipoprotéines de basse densité (LDL) présentes dans le jaune d'œuf, ce qui peut favoriser la conservation du sperme à l'état liquide ou congelé(Bergeron & Manjunath, 2006) Des études ont été entreprises dans le but d'évaluer l'impact de la concentration en jaune d'œuf sur la qualité des spermatozoïdes cryoconservés on utilisent des différent méthodes et protocoles. Les résultats ont démontré que l'ajout de jaune d'œuf permet une meilleure conservation des spermatozoïdes, en les protégeant contre les chocs thermiques, en améliorant leur survie et leur mobilité, et en préservant l'intégrité de

la membrane acrosomique, et augmente la fertilité des spermatozoïdes, (**Anand et al., 2017**), (**Dong & Vandervoort, 2009**), (**Fernandez-Santos et al., 2006**)

D'autre étude réalisée par, (**Iguer-ouada & Verstegen, 2001**), ont démontré les effets des différents dilueurs sur l'acrosome. L'étude a révélé de manière explicite l'existence d'un effet protecteur du jaune d'œuf contre la réaction acrosomique spontanée. En effet, pour toutes les conditions de mobilité et pour tous les dilueurs étudiés, le taux de réaction de l'acrosome des spermatozoïdes était toujours significativement inférieur lorsqu'il y avait addition de jaune d'œuf dans le milieu. Cette action bénéfique du jaune d'œuf sur l'intégrité de l'acrosome, ainsi que l'observation antérieure de sa préservation, sont décrites pour la première fois chez le chien. Le mécanisme exact par lequel le jaune d'œuf stabilise l'acrosome reste à élucider, mais il est possible que cet effet protecteur soit directement médié par une action sur la membrane acrosomique.

Bien que couramment utilisé pour la conservation du sperme, le jaune d'œuf présente un risque de contamination microbienne qui peut réduire la fertilité des spermatozoïdes et augmenter le risque de transmission de maladies (**Marco-Jimenez et al., 2004**)

Afin de réduire les risques de contamination, plusieurs études ont exploré la substitution du jaune d'œuf par d'autres cryoprotecteurs présentant un potentiel de contamination significativement moindre. Parmi ces alternatives, la lécithine, qui possède des propriétés similaires à celles du jaune d'œuf, a fait l'objet d'une attention particulière (**Zhao et al., 2021**) et (**El-Sisy et al., 2016**). Ces études ont démontré que l'ajout de la lécithine en tant que substitut de jaune d'œuf améliore de manière significative la viabilité des spermatozoïdes pendant la conservation. L'utilisation de la lécithine de soja peut prévenir les dommages causés aux spermatozoïdes lors de la cryoconservation en atténuant l'efflux de cholestérol ou de phospholipides, ce qui réduit la formation de cristaux de glace intracellulaires et par conséquent, le cryodommage (**Sun et al., 2021**)

Les effets cryoprotecteurs de la lécithine pourraient s'expliquer par une interaction entre les protéines plasmatiques séminales et les LDL présentes dans les dilueurs, ainsi que par la formation d'un film protecteur à la surface des membranes des spermatozoïdes qui les préserve des cristaux de glace (**El-Sisy et al., 2016**).



# Partie pratique

#### IV. Matériel et méthodes

##### IV.1 . Objectif de travail :

L'objectif de ce travail est de substituer le jaune d'œuf par la lécithine pour la conservation du sperme épидидymaire de bélier dans une température de 4°C.

##### IV.2 Collecte de la semence :

##### IV.2.1 Matériel biologique :

Des gonades fraîches d'une race de bélier récupérées après leur abattage



**Figure 11:**Un testicule frais

##### IV.2.2 Matériel de collecte :

- Seringue.
- Tube de collecte
- Lame bistouri
- NaCL
- Micropipette 10 $\mu$ L 100 $\mu$ L et 1000 $\mu$ L
- Agitateur
- Une balance
- Papier absorbant



Figure 12: ensemble de matériel Utilisés

### IV.2.3 Préparation des milieux

#### IV.2.3.1 Préparation de la lécithine :

##### A. Matériel à utilises :

- Une balance
- Un agitateur
- Microonde

##### B. Produit utilises :

- Phosphatidilcholin
- Eau ultra pure



Phosphatidilcholin

eau ultra pure

Figure 13: produits utilisés pour la préparation de la lécithine

##### C. Méthode de préparation :

1. À l'aide d'une balance on a pesé 0,25g de lécithine brute.
2. On mélange la lécithine avec 25 ml de l'eau ultra pure chaude à 50°C.

3. Sur un agitateur on agite la solution à 55°C et dans 700 TPM pendant 30min.
4. On centrifuge la solution pendant 15min a 1800 g.
5. A la fin avec un filtre à seringue de 0,45 µm on filtre la solution.
6. La solution est mise dans un flacon prêt à l'utilisation.



Figure 14: étapes de préparation de la lécithine

*Préparation de tris 100ML et 50ML :*

Matériel utilisés

- Un bécher.
- Une balance.
- Agitateur
- Micropipette.
- Flacon.

Produit utilisés

- Eau ultra pure.
- Acide citrique.
- Pénicilline.
- Streptomycine.
- Fructose.
- De tris.



**Figure 15:** produit constituant le Tris

Pour 100ml de tris :

3,028g Tris.  
1,25g de fructose.  
1,7g d'acide citrique.  
0,100g de streptomycine.  
0,068g de pénicilline.

Pour 50ml de tris :

1,514g tris.  
0,625g fructose.  
0,85 acide citrique.  
0,05 g streptomycine.  
0,034g pénicilline.

#### IV.2.3.1.1 Méthode de préparation :

Pour préparer le tris, on mélange les produits mesurés avec 100 ml d'eau ultra pure dans un flacon. Ensuite, on place le flacon dans un agitateur.



**Figure 16:** agitation de tris

#### IV.2.3.2 Extraction de jaune d'œuf :

- On a séparé le jaune d'œuf du blanc
- On a mis le jaune d'œuf sur un papier pour éliminer tout le blanc

- Avec une seringue on aspire le jaune d'œuf pour le mettre dans des tubes de collecte

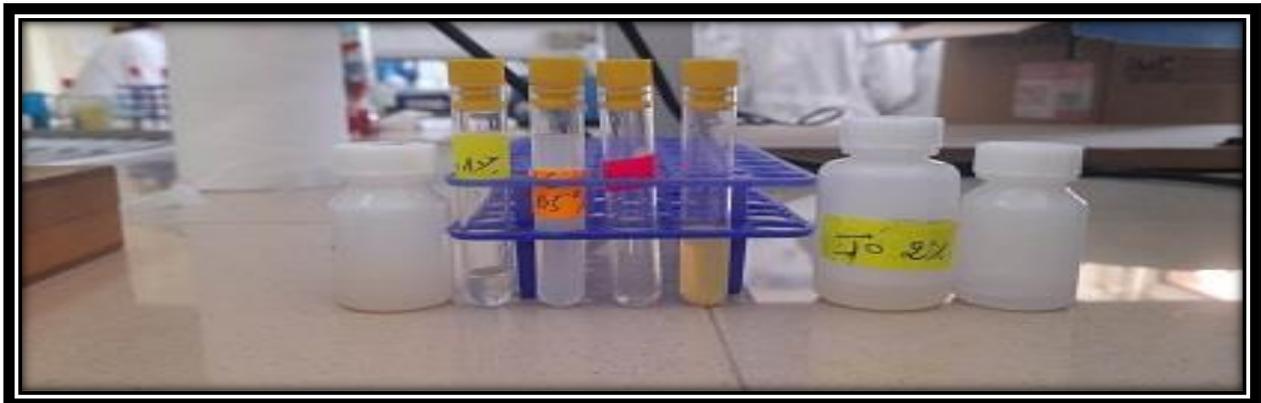
#### IV.2.3.3 La dilution de sperme :

Nous avons préparé sept milieux de dilution avec un rapport de (1/4) (sperme/dilueur) :

- Tris
- 20% Jaune d'œuf: Pour 3ml = 2.5ml de tris + 0.5 de jaune d'œuf
- 2% jaune d'œuf : 1ml (tris+jaune d'œuf 20%)+ 9 ml de Tris
- 1% Lécithine
- 0,5% Lécithine : Pour 3ml = 1,5ml (lécithine 1%)+ 1,5ml de Tris
- 0,25% lécithine : Pour 3ml= 1,5ml (lécithine 0,5%)+ 1,5ml de Tris
- 0,1% lécithine : pour 200μL = 20μl (lécithine 1%) + 180μl de Tris

**Tableau V** : les différents milieux de dilution

milieux	QUANTITE
Sperme +tris	50 μL +150μL(1/4)
Sperme + (20% jaune d'œuf + tris)	50μL +150μL(1/4)
Sperme +( 0,5% lécithine + tris)	50μL +150μL (1/4)
Sperme + (1% lécithine + tris)	50μL +150μL(1/4)
Sperme +( 2% jaune d'œuf + tris)	50μL +150μL (1/4)
Sperme +( 0.25% lécithine +tris)	50μL +150μL (1/4)
Sperme +( 0.1% lécithine +tris)	50μL +150μL (1/4)



**Figure 17:** les milieux utilisés

#### IV.2.3.4 Méthode de récupération de sperme :

1. Séparation de l'albuginée,
2. La tête de l'épididyme et le canal déférent sont délicatement dissociés du testicule à l'aide d'un bistouri.
3. L'épididyme est séparé du tissu testiculaire adjacent, puis une injection de solution de tris est effectuée pour faciliter la séparation des tubules séminifères.
4. Par la suite, en utilisant une seringue vide, une légère pression est appliquée,
5. On réalise une incision au niveau de la queue de l'épididyme pour récupérer le sperme dans un Eppendorf.
6. Sperme épидидymaire

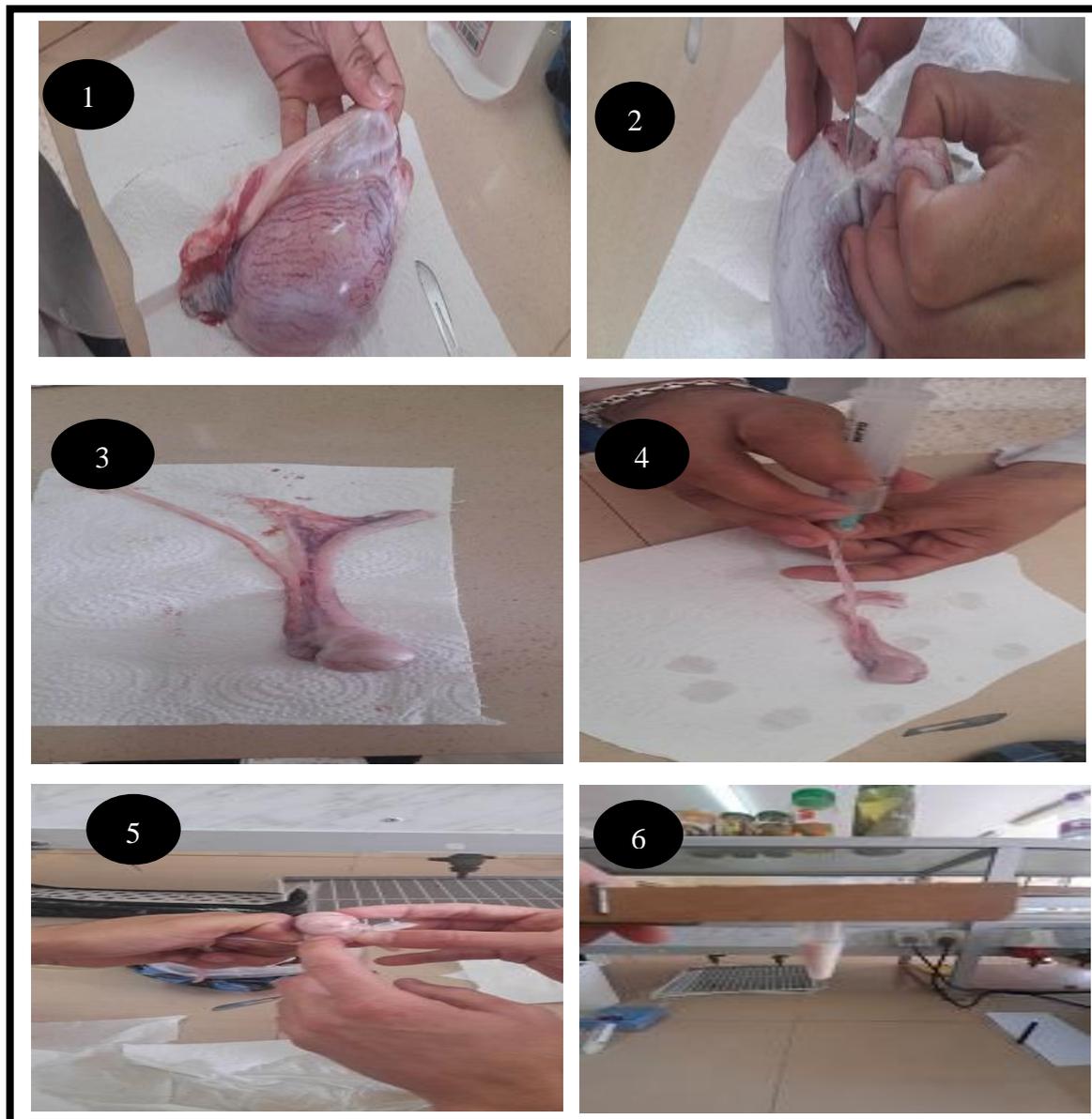


Figure 18:étape de la récolte de sperme

#### IV.2.3.5 Evaluation de sperme :

##### IV.2.3.5.1Analyse macroscopique :

###### a. La couleur :

Le sperme récupéré doit être de couleur blanchâtre à l'œil nu

###### Le volume :

Le volume est lu directement sur l'épandeur gradué (il varie entre 0,5ml et 1ml.)

##### IV.2.3.5.2Analyse microscopique :

Le système CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*) est une technologie utilisée pour l'analyse de la motilité. Ce système se compose d'un moniteur, d'un microscope

équipé d'une caméra qui permet de visualiser les images des spermatozoïdes sur l'écran de l'ordinateur. Les échantillons de spermatozoïdes sont placés dans une solution de tris sur une lame de Makler, et les images sont ensuite affichées simultanément sur l'écran de l'ordinateur, permettant ainsi une évaluation précise et objectif des caractéristiques des spermatozoïdes.



**Figure 19:** le système CASA

- Après avoir évalué la qualité de sperme, les analyse ont été poursuivies à quatre moment distincts (T0, T1, T2, T3).

T0= a température ambiante. (15 min après la dilution)

T1= après 24h de refroidissement

T2= après 48h de refroidissement

T3= après 72h de refroidissement

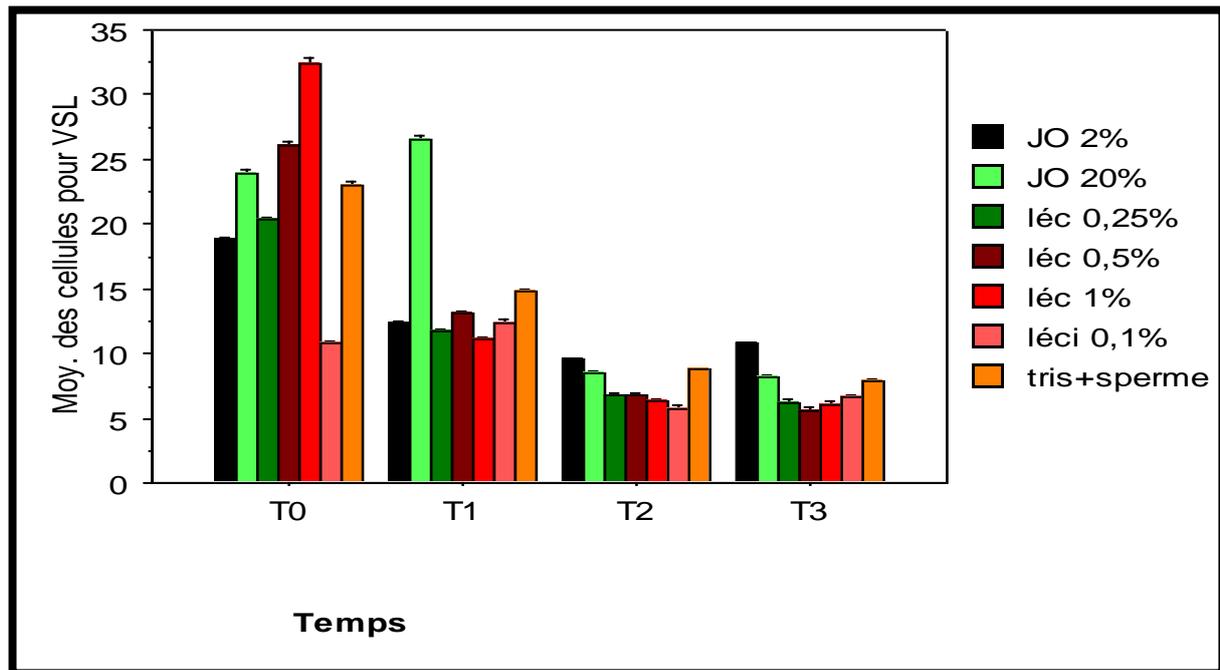
## V. Résultats et discussion :

### V.1 Les résultats de la VSL :

La (**Figure 20**) présente la vitesse moyenne de déplacement (VSL) en fonction du temps. À T0, les résultats indiquent une diminution progressive de la VSL des spermatozoïdes à mesure que la concentration de lécithine diminue. À une concentration de lécithine de 1%, la VSL est de 32,4  $\mu\text{m/s}$ , correspondant à la meilleure vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Cette valeur est supérieure à celles observées pour les concentrations de jaune d'œuf à 2% et 20%, qui sont respectivement de 18,75  $\mu\text{m/s}$  et 23,92  $\mu\text{m/s}$ . Même la valeur pour le milieu de contrôle Tris (18,75  $\mu\text{m/s}$ ) est inférieure à celle de la lécithine à 1%. Lorsque la concentration de lécithine est réduite à 0,5%, la VSL diminue légèrement pour atteindre 26,04  $\mu\text{m/s}$ . À 0,25% de lécithine, la VSL chute à 20,28  $\mu\text{m/s}$ , indiquant une réduction plus significative de la vitesse de déplacement. Enfin, à 0,1% de lécithine, la VSL atteint 10,83  $\mu\text{m/s}$ , ce qui représente une diminution notable de la vitesse de déplacement. En comparaison, la VSL du jaune d'œuf à 2% est d'environ 18,75  $\mu\text{m/s}$ , suggérant une vitesse de déplacement réduite des spermatozoïdes par rapport à la concentration de jaune d'œuf à 20% qui présente une valeur d'environ 23,92  $\mu\text{m/s}$ . Ces résultats suggèrent que la lécithine à 1% a un effet protecteur similaire aux résultats obtenus par **Salmani et al. (2014)** pour les spermatozoïdes de bélier, indiquant probablement un effet précoce de la lécithine à 1% avant la réfrigération.

Lorsque nous comparons la VSL à T1 (après 24 heures) par rapport à T0, nous observons une diminution significative dans la plupart des groupes, à l'exception du groupe témoin JO 20% où une légère augmentation de la VSL est observée, atteignant 26,56  $\mu\text{m/s}$ . De plus, le groupe traité avec de la lécithine à 0,1% maintient sa VSL à un niveau similaire à celle de T0. Ces résultats contredisent ceux de l'étude menée par Salmani et al. en 2014, ce qui peut être attribué à plusieurs facteurs pouvant affecter la qualité du sperme pendant la période de réfrigération. Il a été suggéré que la lécithine protège les phospholipides de la membrane des spermatozoïdes et augmente leur tolérance au processus de refroidissement (**Forouzanfar et al., 2010**), mais cela n'a pas été observé dans notre expérience.

À T2 et T3, une diminution considérable de la VSL est observée, ce qui suggère que les milieux utilisés ne peuvent pas interagir avec les spermatozoïdes à long terme.



**Figure 20:** Histogramme représentant les valeurs de la VSL en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

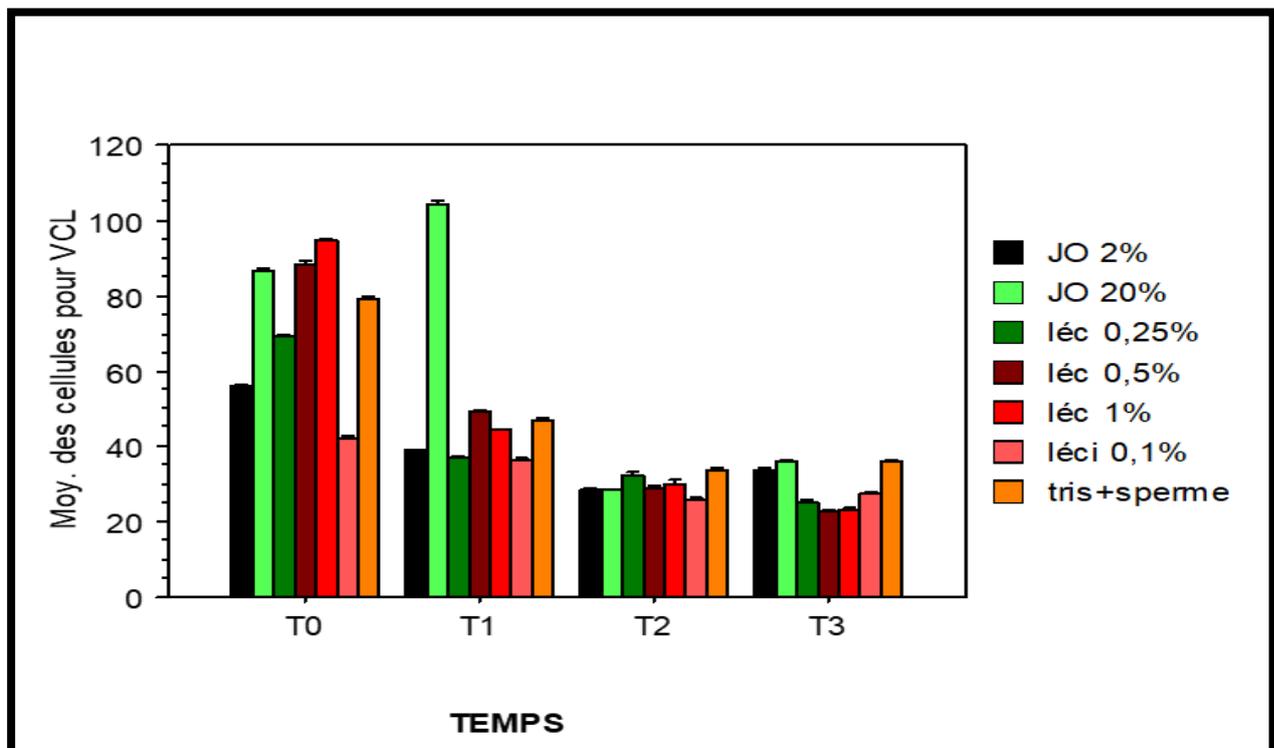
## V.2 Les résultats de la VCL :

À T0, on constate que la VCL (vitesse curviligne linéaire) est la plus élevée pour la lécithine à 1%, atteignant une valeur de  $94,41 \mu\text{m/s}$ . Ensuite, la lécithine à 0,5% et le milieu de contrôle JO 20% ont des valeurs respectives de  $88,53 \mu\text{m/s}$  et  $86,94 \mu\text{m/s}$ , montrant une légère diminution. Une diminution plus prononcée est observée dans le milieu de contrôle Tris, avec une VCL de  $79,37 \mu\text{m/s}$  par rapport aux milieux précédents. Cela indique un effet améliorateur de la lécithine à 1% et des milieux de contrôle sur les spermatozoïdes.

À T1, il a été constaté que la VCL du milieu JO à une concentration de 20% augmentait de manière significative par rapport à T0, atteignant une valeur de  $104,39 \mu\text{m/s}$ . Cette augmentation peut être attribuée à l'interaction des phospholipides présents dans le milieu JO avec les membranes des spermatozoïdes, ce qui les protège des effets néfastes du froid. Cette interaction stabilise la structure membranaire et préserve l'intégrité des lipides constitutifs des membranes. Par conséquent, les spermatozoïdes traités avec du JO 20% ont une plus grande tolérance au processus de refroidissement, ce qui se traduit par une amélioration significative de leur VCL par rapport à T0 (R.S Jeyendran & D.Barisic, 1995). Cependant, les autres

milieux ont montré une diminution significative de leur VCL en raison de l'absence de l'effet protecteur des milieux.

Aux moments T2 et T3, une proportion considérable de spermatozoïdes non viables a été observée, ce qui indique que les milieux ne sont pas capables d'offrir une protection à long terme. Il est important de noter que la diminution de la VCL et l'augmentation de la mortalité des spermatozoïdes observées à T2 et T3 peuvent être attribuées à différents facteurs, tels que l'absence de l'effet protecteur des milieux, les conditions environnementales, les interactions entre les composants du milieu et les spermatozoïdes, ainsi que d'autres facteurs inhérents aux échantillons de spermatozoïdes.

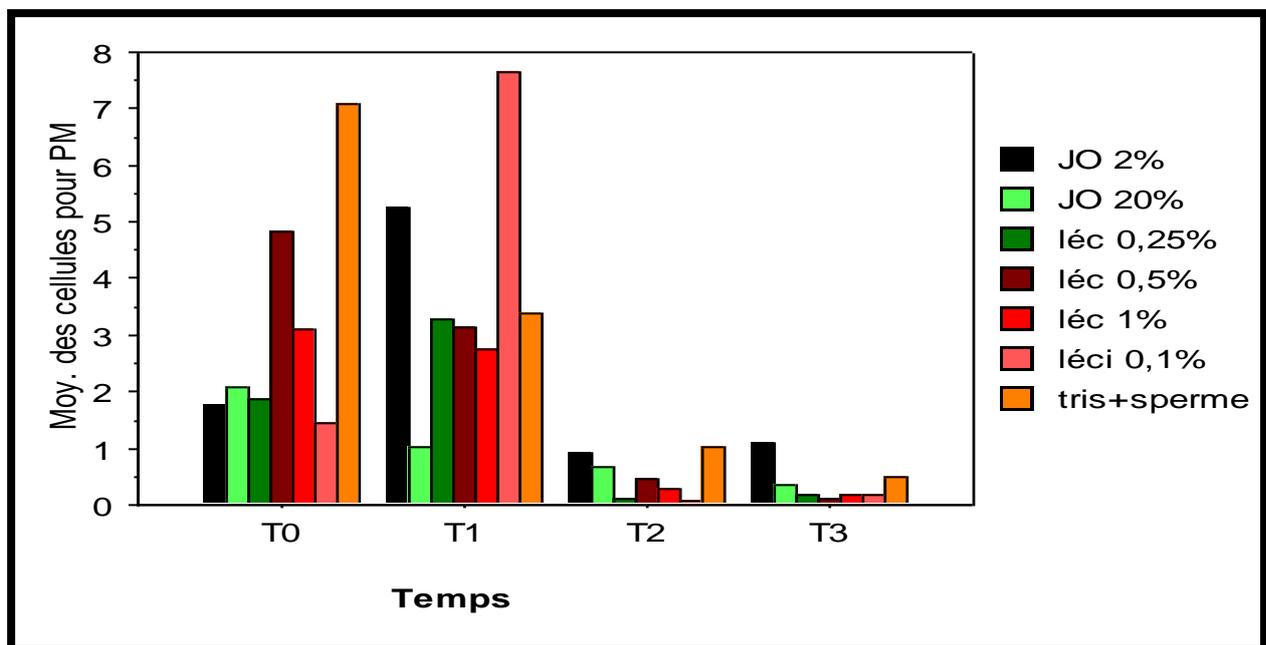


**Figure 21:** Histogramme représentant les valeurs de la VCL en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

### V.3 Les résultats des spermatozoïdes progressifs moyens (PM), progressifs rapides (PR) et rapides (R) :

À T0, les résultats montrent que le milieu contenant du Tris présente les pourcentages les plus élevés de spermatozoïdes à progression rapide (PR) (49%) (**figure 23**) et de spermatozoïdes à progression moyenne (PM) (7,2%) (**figure 22**) par rapport aux milieux contenant différentes

concentrations de lécithine et même par rapport au milieu de JO. Dans les milieux contenant de la lécithine, on observe une diminution des pourcentages de spermatozoïdes à progression moyenne et à progression rapide à mesure que la concentration de lécithine diminue, à l'exception de la concentration de 0,5% de lécithine qui affiche un pourcentage plus élevé (4,5%) de spermatozoïdes à progression moyenne. En ce qui concerne les spermatozoïdes rapides (R) (**figure 24**), les pourcentages les plus élevés sont observés dans les milieux contenant 20% de JO et une concentration de 0,5% de lécithine, atteignant 49%. Une concentration de lécithine de 1% présente également un pourcentage supérieur de 42%, tandis que le Tris présente un pourcentage inférieur de seulement 15%, tout en restant supérieur à celui observé dans la progression moyenne. En comparaison avec les résultats de l'étude de Salmani et al. en 2014, on peut dire qu'il n'y a pas de différence significative en termes de motilité des spermatozoïdes à T0. Cependant, les variations de viscosité entre les milieux pourraient expliquer les différences observées, car une viscosité élevée peut influencer la vitesse et les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes.

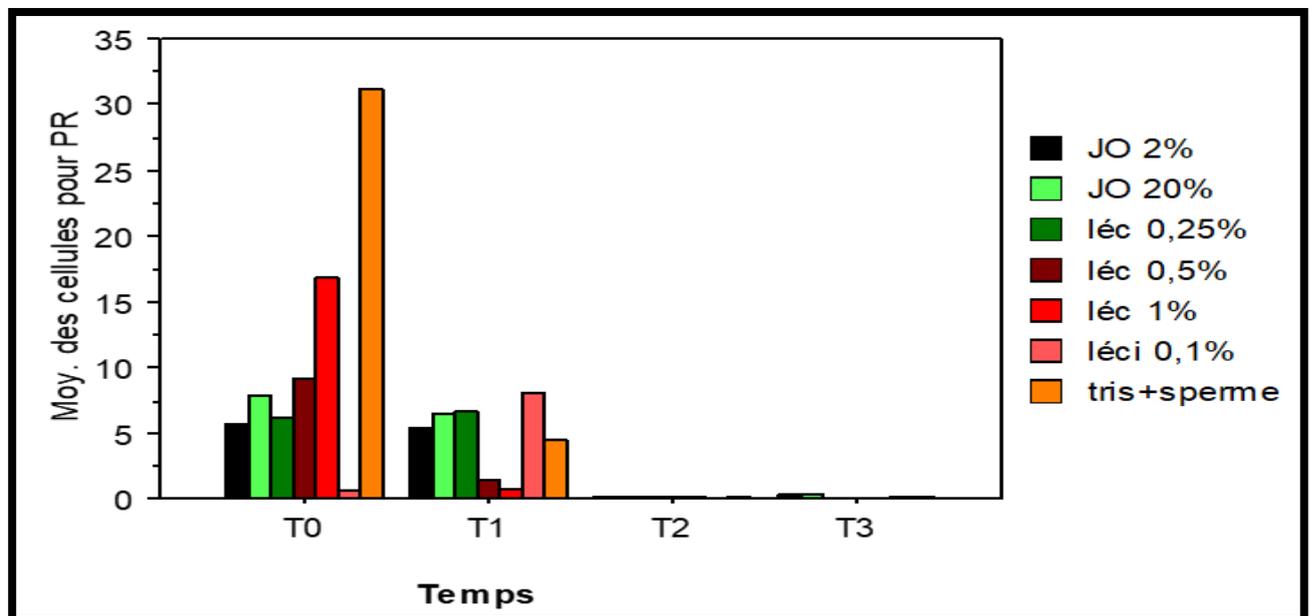


**Figure 22:** Histogramme représentant les valeurs des spermatozoïdes à progressifs moyens en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

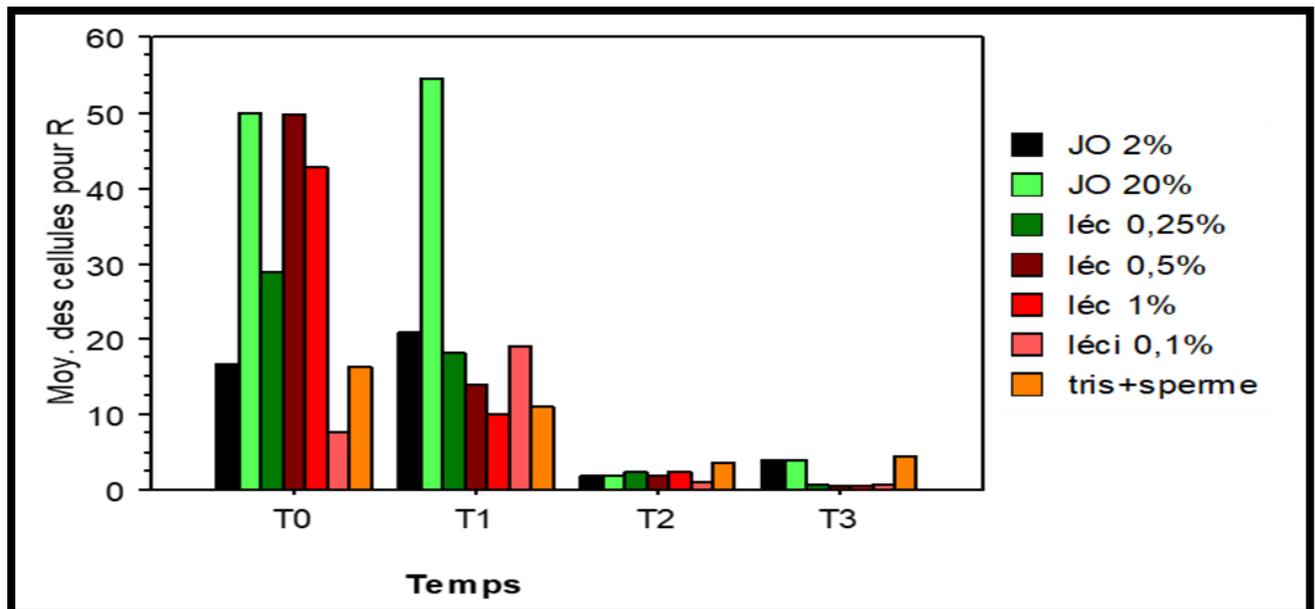
À T1, après 24 heures de réfrigération, on constate une chute notable du pourcentage de spermatozoïdes à progression rapide pour tous les milieux, tandis que les spermatozoïdes à

progression moyenne dans le milieu contenant 0,1% de lécithine et le JO 2% connaissent une augmentation de leur mobilité, atteignant respectivement 7,5% et 5,1% par rapport à 1,3% et 1,5% à T0. Cela suggère que les spermatozoïdes à progression rapide à T0 sont devenus à progression moyenne à T1, et cela est dû à l'absence de l'effet protecteur qui peut maintenir la mobilité des spermatozoïdes après la réfrigération. De plus, le jaune d'œuf à 20% a réussi à maintenir le pourcentage de spermatozoïdes rapides même après 24 heures de réfrigération.

À T2 et T3, on observe une absence totale de mouvement, ce qui indique la mort des spermatozoïdes.



**Figure 23:** Histogramme représentant les valeurs des spermatozoïdes à progressifs rapides en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation



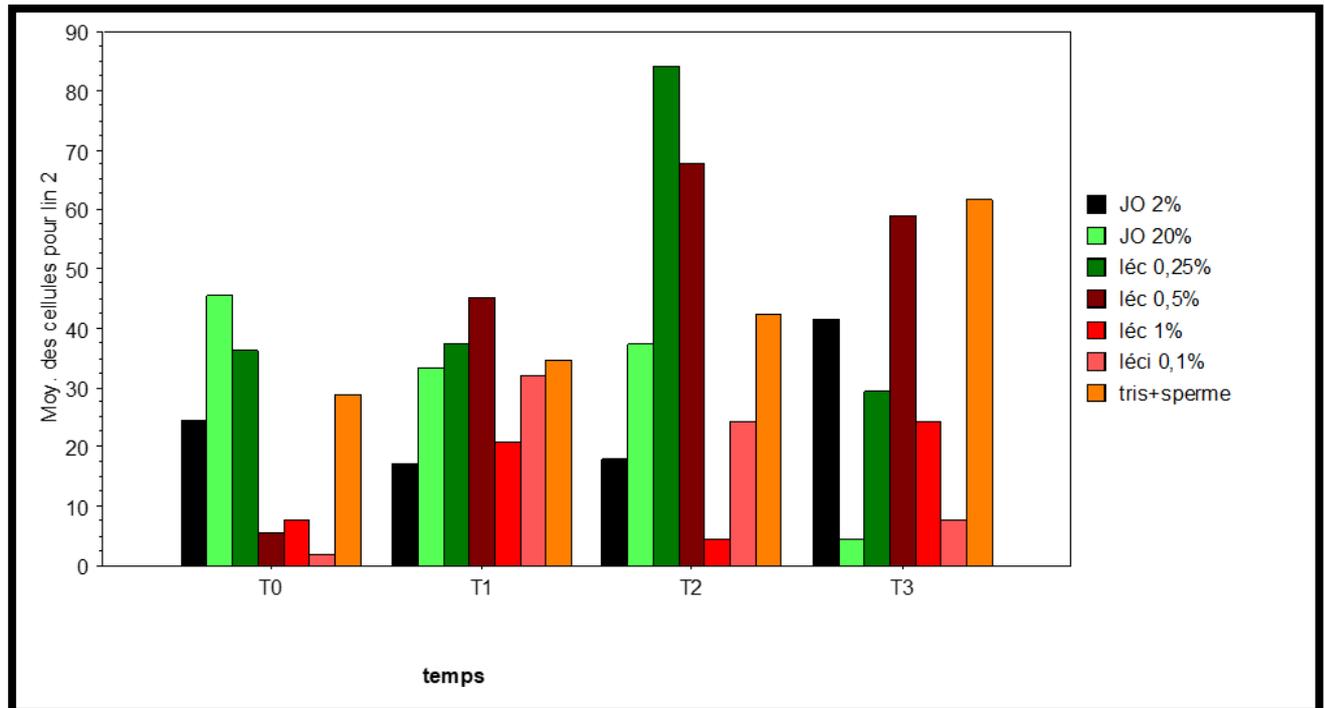
**Figure 24:** Histogramme représentant les valeurs des spermatozoïdes rapides en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

#### V.4 Les résultats de la linéarité :

Les résultats indiquent des variations significatives du pourcentage de linéarité des spermatozoïdes. À T0, on observe que le milieu de conservation du jaune d'œuf à 20% présente le taux de linéarité le plus élevé (45,5%), suivi de la lécithine à 0,25% avec une valeur de 38%. À T1, une diminution générale de la linéarité est observée dans la plupart des milieux, à l'exception notable de la lécithine à 0,5% qui montre une augmentation remarquable avec un pourcentage de linéarité de 45%. À T2 (après 24 heures), la lécithine à 0,25% se distingue avec un pourcentage de linéarité remarquablement élevé de 84,5%, tandis que les autres milieux présentent des améliorations ou des diminutions variables par rapport à T1. Enfin, à T3, on observe une récupération de la linéarité dans le milieu de jaune d'œuf à 2% et dans le Tris, qui présente une augmentation progressive avec un pourcentage de 61,5%.

En résumé, les données révèlent des fluctuations dans la linéarité des spermatozoïdes en fonction des milieux de conservation et des moments d'analyse. Certains milieux tels que le jaune d'œuf à 20%, la lécithine à 0,25% et le Tris présentent généralement des taux de linéarité plus élevés. En comparant nos résultats à ceux d'une autre étude de Salmani et al. en 2014, nous constatons des similitudes. Cela suggère que les agents cryoprotecteurs interagissent pour minimiser les dommages causés par le froid et la déshydratation des cellules, préservant ainsi l'intégrité de la membrane des spermatozoïdes. Ils peuvent également contribuer à maintenir la viabilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes pendant

le processus de conservation. En ce qui concerne les paramètres spermatiques tels que la linéarité, l'utilisation de la lécithine et du jaune d'œuf peut potentiellement avoir des effets bénéfiques sur la conservation de la semence du bélier (**Forouzanfar et al., 2010**).



**Figure 25:** Histogramme représentant les valeurs de la linéarité des spermatozoïdes en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

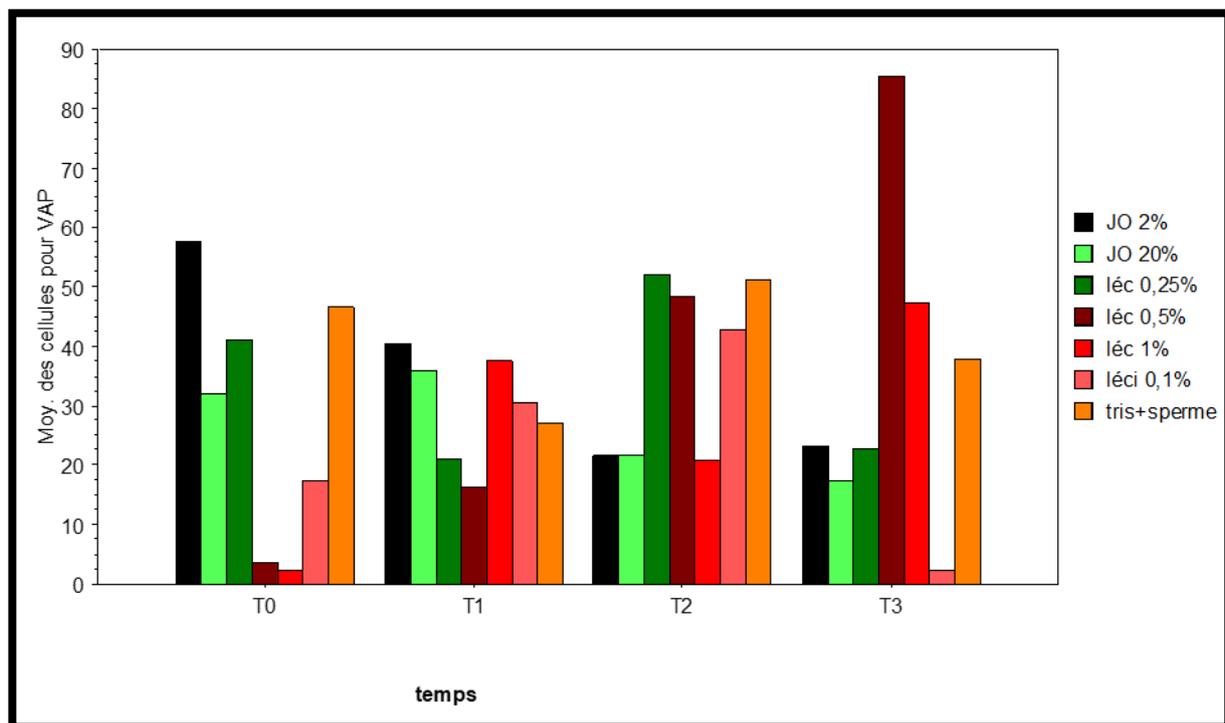
#### V.4 Les résultats de la VAP :

Les résultats montrent qu'à T0, le milieu de conservation du jaune d'œuf à 2% présente la VAP la plus élevée (58  $\mu\text{m/s}$ ), suivi du milieu contenant de la lécithine à 0,25% avec une valeur de 40  $\mu\text{m/s}$ , ce qui suggère une mobilité élevée des spermatozoïdes. En revanche, les autres milieux contenant différentes concentrations de lécithine (0,5%, 1%, 0,1%) affichent des VAP considérablement plus faibles (3,5  $\mu\text{m/s}$ , 2  $\mu\text{m/s}$ , 17,5  $\mu\text{m/s}$  respectivement) à T0.

À T1, les vitesses de déplacement des spermatozoïdes ont généralement diminué par rapport à T0 dans la plupart des milieux de conservation. Le jaune d'œuf à 2% présente une légère diminution de la mobilité avec une VAP de 40  $\mu\text{m/s}$  par rapport à T0. Le milieu de Tris présente la VAP la plus basse à T1, avec seulement 28  $\mu\text{m/s}$ , ce qui indique une mobilité réduite. Il s'agit donc d'un milieu de contrôle.

À T2, on observe des variations significatives. Les VAP dans le jaune d'œuf restent stables à 20  $\mu\text{m/s}$ , ce qui indique une mobilité réduite mais constante. La lécithine à 0,25% et 0,5% montre une amélioration de la mobilité avec des VAP de 51  $\mu\text{m/s}$  et 49  $\mu\text{m/s}$  respectivement. À T3, la lécithine à 0,5% montre une augmentation significative de la mobilité avec une VAP de 87  $\mu\text{m/s}$ .

Il est intéressant de noter que les résultats sont similaires aux paramètres spermatisques tels que la linéarité (en %) et la vitesse VAP (en  $\mu\text{m/s}$ ) trouvés dans l'article de (Salmani et al. en 2014). Cette augmentation progressive de la VAP des spermatozoïdes dans le milieu de lécithine à 0,5% suggère un effet protecteur contre le stress oxydatif et le maintien de la motilité en raison de ses propriétés émulsifiantes et antioxydantes.



**Figure 26:** Histogramme représentant les valeurs de la VAP en fonction des différents traitements en fonction du temps de conservation

## **VI. Conclusion :**

En conclusion, il est évident que la lécithine peut avoir un effet bénéfique ou un intérêt significatif sur les spermatozoïdes dans les 24 premières heures après la réfrigération, en améliorant des paramètres essentiels tels que la vitesse (VSL), la progression rapide (PR) et la linéarité. Ces résultats nous encouragent à poursuivre les expérimentations et les recherches afin de trouver une alternative au jaune d'œuf, capable de maintenir la viabilité et la mobilité des spermatozoïdes à long terme lors de la réfrigération.

## Référence bibliographique

- Alessandro, A., P. G. Righetti, E. Fasoli, and L. Zolla.** (2010) The egg white and yolk interactomes as gleaned from extensive proteomic data. *Journal of Proteomics*.73 (5),1028-1042.
- Anand, M., Baghel, G., & Yadav, S.** (2017). Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbari buck semen. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 560-565. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1232265>
- Anass, B. moula.** (2022). La conservation du sperme chez les ovins. <https://fr.linkedin.com/pulse/la-conservation-du-sperme-chez-les-ovins-anass-ben-moula?trk=pulse-article>
- Andrabi S. M. H.,** (2007). Fundamental Principles of Cryopreservation of Bos taurus and Bos Indicus Bull Spermatozoa. Mini Review, *International Journal of Agriculture & Biology*, 9(2), 367-369.
- Anna, V.** (2022). Lécithine : Propriétés et usages—Améliore ta Santé. Consulté 24 mai 2023, à l'adresse <https://amelioresetasante.com/lecithine-proprietes-et-usages/>
- Anton, M.** (2013).Eggyolk: structures, functionalities and processes.*Journal of the science of Food and Agriculture*, 93 (12), 2871-2880.
- Antonio, B.** (2017). Structure du spermatozoïde : Morphologie d'une forme typique. inviTRA. <https://www.invitra.fr/spermatozoide/structure-du-spermatozoide/>
- Baril, G., Chemineau, P., & Cognie, Y.** (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. FAO.
- Belitz, HD, Grosch, W., & Schieberle, P.** (2009). Chimie alimentaire. Springer
- Baribeau H,** 2004 L'œuf Site : <http://www.reseau.proteus.net>
- Bergeron, A., & Manjunath, P.** (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338-1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Bligh, E. G., Dyer, W. J.,** (1959).A rapid method of total lipid extraction and purification.*Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Boukhliq, R., Allali, K. E., & Tibary, A.** (2018). Anatomie et examen échographique des organes génitaux chez le bélier et le bouc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(2), 226-240.
- Derivaux J.** (1971). Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège.-Edition Derouaux.-175p.
- DENIL Marie et LANNOYE Paul,**( 2001).Guide des additifs alimentaires, les précautions à prendre. Frison-Roche, Paris, p.56
- Dong, Q., & Vandervoort, C. A** (2009a). Effect of Egg Yolk on Cryopreservation of Rhesus Monkey Ejaculated and Epididymal Sperm. *Journal of Andrology*, 30(3), 309-316. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.006395>
- El-Sisy, G. A., El-Nattat, W. S., El-Sheshtawy, R. I., & Abo El-Maaty, A. M.** (2016). Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based

extender during bulls' semen preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6), 514-518. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.10.011>

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

**Fernandez-Santos, M., Estes, M., Soler, A., Montoro, V., & Garde, J.** (2006). Effects of Egg Yolk and Cooling Rate on the Survival of Refrigerated Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 114-118. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00649.x>

**Fidèle, K.** (2008). Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au Centre National d'Amélioration Génétique (CNAG) de Dahra au Sénégal. <https://beep.ird.fr/greenstone/collect/eismv/index/assoc/MEM08-1.dir/MEM08-1.pdf>

**Farinazzo, A., U. Restuccia, A. Bachi, L. Guerrier, F. Fortis, E. Boschetti, E. Rasoli, A.Citterio, and P. G. Righetti.** Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Chromatography A*. 2009. 1216 (8) ,1241-1252.

**Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., & Nasr-Esfahani, M. H.** (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>

**Gacem,abdelbasset.** (2016). Etude des paramètres spermatiques :Comparaison entre la viabilité des spermatozoïdes réfrigérés et spermatozoïdes décongelés. [file:///C:/Users/Pc/Desktop/1.page%20de%20garde-merged%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Pc/Desktop/1.page%20de%20garde-merged%20(1).pdf)

**Greengard, O., A. Sentenac, and N. Mendelsohn.** Phosvitin, the iron carrier of egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1964. 90 406-407.

**Iguer-ouada, M., & Verstegen, J. P.** (2001). Long-term preservation of chilled canine semen : Effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2), 671-684. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00435-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00435-6)

**Iverson S.J., Lang S.L.C., Cooper M.H.** (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids*, 36, 11, pp. 1283-1287

**Jennifer, O.** (2022). La cryopréservation : Un bref rappel historique. Consulté 26 mai 2023, à l'adresse [https://www.tomorrow.bio/fr/poste/cryopreservation-breve-histoire?fbclid=IwAR31OpO3C4bOqPILYy9KNGunt50CJTtRV2v1Olw\\_QOXMfeFH28Xop0cfq5o](https://www.tomorrow.bio/fr/poste/cryopreservation-breve-histoire?fbclid=IwAR31OpO3C4bOqPILYy9KNGunt50CJTtRV2v1Olw_QOXMfeFH28Xop0cfq5o)

**Jeyendran, R.** (1995). TEST-yolk media and sperm quality. *Human Reproduction Update*, 1(1), 73-79. <https://doi.org/10.1093/humupd/1.1.73>

**Kaneko, T., Ito, H., Sakamoto, H., Onuma, M., & Inoue-Murayama, M.** (2014). Sperm Preservation by Freeze-Drying for the Conservation of Wild Animals. *PLoS ONE*, 9(11), e113381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113381>

**Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E.** (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>

**List, G. R.** (2015). Soybean Lecithin : Food, Industrial Uses, and Other Applications. In *Polar Lipids* (p. 1-33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50005-4>

**Maclachlan, I., J. Nimpf, and W. J. Schneider.** Avian riboflavin binding-protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *Journal of Biological Chemistry*.1994.269 (39), 24127-24132.

**Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M.** 2002. Major proteins of bovine seminal Plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*,67:12501258.

**Mann, K.** Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*. 2008 8(11), 2322-2332.

**Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Moce, E., Viudes-de-Castro, M., Vicente, J., & Rodriguez, M.** (2004). Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(6), 438-441. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00537.x>

**Melissa, R., & R, B.** (2002). Consulté le Avril 20, 2023, sur Colorado State University: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/collection.html>

**Mocé E. Vicente J.S., 2009.** Rabbit sperm Cryopreservation: A Review. *Animal Reproduction Science*, 110 : 1-24.

**Moran, E. T.** Protein requirement, egg formation and the hens ovulatory cycle. *Journal of Nutrition*. 1987. 117 (3), 612-618.

**MORELLE, jean.** (1965). *Chimie et biochimie des lipides (VARIA, Paris, Vol. 1, p. 283-298).*

**Morrison, S. L., M. S. Mohammed, L. A. Wims, R. Trinh, and R. Etches.** Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology*. 2002. 38 (8), 619-625.

**Multon, J.-L.** (2002). *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires : À l'exclusion des produits utilisés au niveau de l'agriculture et de l'élevage pesticides, hormones etc (3e éd).* Tec & doc.

**Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., Tar, M., & Mohammadi Sangcheshmeh, A.** (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, 133, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology>.

**Nathier Dufour, N.** (2005). *Les œufs et les ovoproduits.* Educagri Edition. 78 p.

**Nys, Y.** Structure et formation de œuf. In: F. NAU, C. GUERIN-DUBIARD, F. BARON, AND J.L. THAPON, editors. *Science et technologie del'œuf.* Paris. Lavoisier, 2010, 161-237

**Parks, J. E., & Graham, J. K.** (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)

**Pastorale, A. (2021).** Appareil reproducteur mâle et ses pathologies Exemple des béliers. <https://www.alliance-elevage.com/informations/article/appareil-reproducteur-male-et-ses-pathologies-exemple-des-beliers>.

**Perry, M. M. and A. B. Gilbert.** Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *Journal of Cell Science*. 1979. 39 257-272.

**Réhault, S., M. Anton, F. Nau, J. Gautron,** and Y. Nys. Biological activities of the egg. *Productions Animales*. 2007. 20 (4), 337-347.

**Réhault-Godbert, S., V. Hervé-Grépinet, J. Gautron, C. Cabau, and M. Hincke.** Molecules Involved in Chemical Defence of the Chicken Egg. In: Y. NYS, M. BAIN, AND F. VAN HIMMERSEEL, editors. *Improving the Safety and Quality of Egg and Egg Products*. Cambridge, UK. Woorhead Publishing, 2011, 83-132.

**Rosato M. P. et Iaffaldano N.,** 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the Effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin Plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79: 508-516.

**Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., & Sharafi, M.** (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008>

**Sana, H.** (2022). TRAVAUX PRATIQUES EN THERIOGENOLOGIE. [https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours\\_Ligne/cours\\_22\\_23/Physio\\_rep\\_A3/TP\\_1.pdf](https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/cours_22_23/Physio_rep_A3/TP_1.pdf)

**Schneider, W. J.** Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development. *Gen Comp Endocrinol*. 2009. 163 (1-2), 18-23.

**Schneider, W. J., R. Carroll, D. L. Severson,** and J. Nimpf. Apolipoprotein VLDL-III inhibits lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins in the laying hen. *Journal of Lipid Research*. 1990. 31 (3), 507-513.

**Scholfield, C. R. (1981).** Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(10), 889-892. <https://doi.org/10.1007/BF02659652>

**Sun, L., He, M., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D.** (2021). Beneficial Influence of Soybean Lecithin Nanoparticles on Rooster Frozen–Thawed Semen Quality and Fertility. *Animals*, 11(6), 1769. <https://doi.org/10.3390/ani11061769>

**Zhao, J.-Q., Xiao, G.-L., Zhu, W.-L., Fang, D., Li, N., Han, C.-M., & Gao, Q.-H.** (2021). Ram semen preserved at 0°C with soybean lecithin Tris-based extender substituted for egg yolk. *Animal Bioscience*, 34(2), 192-197. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0118>

## Résumé

Les diluants de sperme contenant du jaune d'œuf comme cryoprotecteur peuvent présenter des risques hygiéniques et sont difficiles à standardiser. Le principal objectif de notre travail est de substituer le jaune d'œuf par la lécithine dans la conservation du sperme à une température de 4°C en se basant sur des techniques faciles à maitre on ouvre dans notre laboratoire. Pour substituer le jaune d'œuf nous avons utilisé différentes concentrations de lécithine (1%,0,5%,0,25% et 0,1%) et nous avons étudié ses effets sur la mobilité des spermatozoïdes à quatre temps (T0, 24h, 48h et 72h), l'évaluation des spermatozoïdes est réalisée par le système CASA.et les paramètre étudiés sont là ; VSL, VCL, VAP, LIN, PM, PR, R. Les résultats montrent que l'effet de la lécithine 1% a exprimé une meilleur VSL et VCL a T0 (température ambiante) par rapport aux autres milieux. Tandis que la lécithine 0,5% a présenté de meilleurs taux de spermatozoïdes rapides. La lécithine 0,25% a montré une meilleure linéarité et une meilleure VAP.

**Mots clés :** jaune d'œuf, lécithine, substituant, conservation

## Abstract

Sperm diluents containing egg yolk as a cryoprotectant can pose hygiene risks and are difficult to standardize. The main objective of our work is to substitute egg yolk with lecithin in sperm preservation at a temperature of 4°C, using easily applicable techniques in our laboratory. To substitute egg yolk, we used different concentrations of lecithin (1%, 0.5%, 0.25%, and 0.1%) and studied its effects on sperm motility at four time points (T0, 24h, 48h, and 72h). Sperm evaluation was performed using the CASA system, and the parameters studied were VSL, VCL, VAP, LIN, PM, PR, and R. The results show that the 1% lecithin had a better VSL and VCL at T0 (room temperature) compared to other media. Meanwhile, the 0.5% lecithin exhibited higher rates of fast spermatozoa. The 0.25% lecithin showed better linearity and VAP.

**Keywords :** egg yolk, lecithin, substitute, preservation