

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Mémoire de Fin de Cycle

*En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master II en Biologie et Physiologie
Animale Comparée.*

Option : Reproduction et Biotechnologies Animales.

Thème

*Optimisation de la Conservation par Réfrigération
du Sperme Aviaire*

Réalisé par :

- M^{elle} AMRANE Yasmina.
- M^{elle} HIDRI Nesrine.

Membres du jury :

Président : M^r Iguer-Ouada M.

Examineurs : M^r Nait Mouloud M.

M^{me} Belhadj -Kebbi M.

Promoteur : M^r Touazi L.

Promotion : 2012/2013

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous à protégé, aidé, et soutenu, jusqu'à pouvoir « mener la graine au fruit » nous nous incluions pour dire :

« Dieu Merci ».

Nos remerciements les plus sincères à : **M^r Iguer-Ouada.M**, d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions, également **M^{me} Belhadj -Kebbi.M** et **M^r Nait Mouloud.M**, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement notre promoteur **M^r Touazi.L** pour ses orientations et ses aides qu'elle nous à accordé.

Enfin nos vifs remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont soutenus moralement, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.



Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Chapitre I : Revue de la littérature	
I-Appareil reproducteur et Sperme Aviaire	3
I-1- Anatomie d'appareil reproducteur mâle	03
I-1-1- Les testicules.....	03
I-1-2- les voies déférentes.....	03
I-1-3-l'organe copulateur.....	04
I-2- Le sperme aviaire :.....	06
I-2-1-La spermatogenèse :	06
I-2-2- Le Spermatozoïde:	08
I-2-3-La morphologie de spermatozoïde :.....	09
I-2-4- Le plasma séminal :.....	09
I-3-contrôle de développement testiculaire dans les espèces avicoles.....	10
I-4-Rôle de la photopériode :.....	10
I-5-Choix des males futurs reproducteurs :.....	10
I-6-Méthodes de collection de sperme chez les espèces aviaires:.....	10
II-Le Méthodes d'évaluation du sperme	11
II-1-Méthodes traditionnel	11
II-1-1- Concentration :	11
II-1-2-La mobilité :	12
II-1-3- La morphologie :.....	12
II-1-4- La viabilité :.....	12
II-2- Les nouvelles méthodes d'évaluation du sperme aviaire	13
II-2-1- Le spectrophotomètre :.....	13
II-2-2- Analyse de sperme avec CASA (Computer Assisted Semen Analysis).....	13

II--2-2-1-Valeurs cinématiques mesurées par le CASA	14
III-Les méthodes de conservation de sperme :.....	16
III- 1- Conservation de la semence à l'état frais (réfrigération) :.....	16
III-1-1- Description de la technique :.....	16
III-I-2- Les différentes étapes de la réfrigération :	16
III-I-2-a- La dilution :.....	16
III-I-2-b- la composition des déférents dilueurs :.....	17
III-I-2-c- Le taux de dilution	18
III-I-3- Le refroidissement :	18
III-I-4- les effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes :.....	18
IV- Stress oxydatif	19
IV-1- définition :.....	19
IV-2-Les différent type des radicaux libers (ROS) :.....	19
IV-3-Source de ROS au niveau du spermatozoïde :.....	19
IV-4- Systèmes antioxydants:.....	20
IV-4-1- Le système antioxydant enzymatique	20
A- superoxyde dismutase(SOD) :	20
B- les glutathions peroxydases (GPX) ou (GSH-PX) :.....	20
C-catalase(CAT) :	20
IV-4-2 Système antioxydant non-enzymatique :	21
A- La vitamine E ou L' a-tocophérol :.....	21
B- Vitamine C :.....	22
C- Glutathion:.....	22
IV-5- Les dégâts oxydatifs sur le sperme :	22
IV-5- 1- peroxydation des lipides :.....	22
IV-5- 2-Oxydation des protéines :	23
IV-5- 3- oxydation de l'ADN :	23
Chapitre II : Matériel et Méthodes	25
I- Matériel et méthodes.....	25
I-1-Animaux:	25

I-2-Récole de la semence	25
I-3- Analyse de la semence :.....	25
I-3-1-Volume.....	25
I-3-2 -Motilité massale (microscopie optique).....	25
I-3-3- Motilité progressive (microscopie optique).....	26
I-3-4- Concentration (nombre de spermatozoïdes/ ml).....	26
I-4-Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes avec un system informatique :.....	27
I-5-Réfrigération du sperme aviaire.....	28
I-5-1- Objectif du travail:.....	28
I-5-2- Matériels utilisés :.....	28
I-5-3- Préparations des échantillons	28
I-6- Analyses statistiques :	29
Chapitre III : Résultat et discussion.....	30
I-Analyse de la semence avant réfrigération.....	30
I-1- Le Volume spermatique.....	30
I-2- Mobilité des spermatozoïdes.....	30
I-3- Concentration spermatique :.....	30
II- Analyse de la semence après réfrigération.....	30
II-1- La mobilité progressive et statique des spermatozoïdes	30
II-2-Les vitesses de progressions des spermatozoïdes : VSL, VAP et VCL:.....	31
Conclusion	36

Liste des abréviations

AGPI : Acide Gras Polyinsaturés.

ALH: Lateral Head Displacement.

BCF: Beat Cross Frequency.

BES: *N* – Bis(2-hy- droxyethyl) -2-aminoethane acide sulfonique.

CASA: computer Assisted Sperm Analysis.

CAT: Catalase.

CD: Cyclodextrine.

Ch: Cholesterol.

Cm: Centimeter.

FSH: Follicle Stimulating Hormone.

g: gramme.

GnRH: Gonadotrophine Releasing Hormone.

GPX: Glutathons peroxydase.

GSH:Gama-Glutanyl systeiny-Glycine.

GSSG:Glutathion Oxyde.

GST:Glutathion tamponné.

H: heur.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogene superoxyde dismutase.

HDL: High Density Lipoprotein.

HEPES: C₈H₁₈N₂O₄S.

HSP: Heat shock Protein.

IA: Insémination Artificielle.

Kg: Kilogramme.

LH :Luteinizing Hormone.

LIN: Vitesse linéarités de mobilité du sperme.

LPO : Lipide peroxidation.

M mol: Millimole.

MDA: malondialdehyde.

Mg: Milligramme.

ml: Millilitre.

Mosm/Kg: Milliosmoles par Kilogramme.

µl: Microlitre.

µm: Micromètre.

NADPH : Nicotinamide Adinine Dinucleotide Phosphate Hydrogene Oxydase.

OH : Hydroxyle.

PH: Potentiel Hydrogène.

PNN: Neutrophiles Polynucleares.

ROS: Radicaux Libres.

SO: Stress Oxydant.

SOD: Action du superoxyde dismutase.

SPZ : spermatozoïdes.

STR: Linéarité du chemin moyen.

TB : Tris Buffer.

TES: N-tris(hydroxymethyl-aminoethane)sulphonic.

Tris:(hydroxymethyl)-aminomethane.

VAP: Average Path Velocity.

VHDL: Very Low Density Lipoprotéine.

VLC: Curvilinear Velocity.

VSL: Straight-Line Velocity.

WOB: vacillation.

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
01	Schéma représentant l'appareil reproducteur du coq	5
02	Diagramme de la spermatogenèse chez le coq	7
03	Schéma représentant le spermatozoïde de coq	8
04	L'analyseur informatique de sperme	14
05	Schéma représentant les différents types de vitesse de mobilité du spermatozoïde	15
06	La représentation schématique des ROS avec les dommages cellulaires.	21
07	La balance de stress oxydatif.	24
08	Pourcentages de spermatozoïdes mobiles progressifs (PR) et les statiques (S) du sperme de coq conservé	31
09	Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VSL) des spermatozoïdes en fonction du temps.	33
10	Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes en fonction du temps.	34
11	Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VCL) des spermatozoïdes en fonction du temps.	35

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Pages
01	Composition des unités de diluer utilisées pour stocker le sperme de poulet pour 24 h à 4C	17
02	L'évaluation massale consiste à donner une note allant de 0 à 5.	26
03	Préparation des différents traitements utilisés.	29

L'augmentation de la demande d'Insémination Artificielle (IA) dans l'industrie avicole, oblige à mettre l'accent sur l'approvisionnement en permanence des centres d'IA avec de la semence de bonne qualité, et afin de pouvoir tirer profit des avancées technologiques réalisées dans les techniques d'IA avicoles, il serait primordial d'améliorer les conditions de stockage de la semence fraîchement collectée. Sachant que le volume collecté par éjaculat est très faible, alors que sa concentration en spermatozoïdes est très élevée, de l'ordre de quelques milliards de spermatozoïdes par millilitre, il est plus qu'indispensable de diluer le sperme pur avec un dilueur approprié avant son utilisation dans un programme d'IA ou de stockage.

En élevage avicole, et en absence de moyens de stockage efficace de la semence *in vitro*, le sperme du coq comme celui de la dinde, doit être inséminé à l'état pur dans la demi-heure qui suit son prélèvement (**Brillard et Reviers., 1989**). L'allongement de cet intervalle, soit par l'utilisation de dilueurs, soit par la réfrigération des spermatozoïdes, pourrait être à l'origine de l'émergence des élevages spécialisés en reproducteurs mâles et pouvoir ainsi maximiser la production spermatique avec des mâles génétiquement supérieurs (**Etches., 1995**). A présent, ce concept de stud farm (élevage de reproducteurs mâles), est largement répandu dans l'industrie de la dinde en Amérique du nord alors qu'il peine encore à avoir le jour dans le continent Européen (**Bagley., 1995**).

Actuellement, l'un des inconvénients majeurs en pratique de l'IA, est la courte période de conservation de la viabilité des spermatozoïdes à 4°C, qui ne dépasse pas quelques heures (6 à 24 heures), alors que le sperme pur est utilisé aussitôt après la récolte. En pratique, le sperme doit être dilué, est refroidi, si le délai de son utilisation doit atteindre ou dépasser quelques heures (6 à 24 heures), alors que la fécondance du sperme refroidi est souvent moins bonne (diminution de 20 à 25% du taux de fécondation des œufs) (**Brillard., 2003**)

Bien que l'insémination avec du sperme stocké *in vitro* présente des avantages considérables (transport de la semence à distance du lieu de sa récolte, organisation du moment de la collecte des mâles en dehors des heures d'IA et avoir la possibilité de voir émerger des élevages spécialisés en mâles reproducteurs et d'autres en femelles), mais elle permet aussi d'éviter les altérations de congélation-décongélation observés lors de la cryoconservation à des températures négatives. Pour cela, l'intérêt pour l'amélioration de la technique de conservation de la semence aviaire à présent, est plus qu'une priorité pour les industriels mais aussi pour les chercheurs. Pour y répondre à ces questions, il est important d'optimiser les techniques de conservations notamment par : amélioration des milieux de conservations et essayer de maintenir la viabilité et la fécondance des

spermatozoïdes jusqu'au moment de l'IA par la lutte contre les phénomènes oxydatifs touchant essentiellement les membranes cellulaires.

C'est dans cette optique, que nous nous sommes intéressés particulièrement dans ce présent travail à savoir l'amélioration des milieux de conservation du sperme du coq à 4°C, en limitant les phénomènes oxydatifs survenant lors de la réfrigération. L'approche suivie était de développer des milieux de conservation avec un pouvoir antioxydant important. Sachant que le spermatozoïde du coq présente une vulnérabilité à la réfrigération à cause de la composition en lipides de sa membrane et de la fluidité de cette dernière, nous avons agi sur deux niveaux complémentaires dans la préparation des milieux de stockages. Le premier point, consiste à renforcer la membrane cytoplasmique par l'ajout du cholestérol et le deuxième point par l'ajout de la vitamine E connue comme un puissant antioxydant. Cependant, comme la solubilité de ces deux molécules lipophiles reste faible dans les milieux de conservation, qui sont de nature hydrophile, nous avons associés ces molécules aux cyclodextrines pour pallier à cet inconvénient. Les effets de l'association cyclodextrine, Vitamine E et cholestérol en complexe n'ont pas été décrit dans la littérature.

I-Appareil reproducteur et Sperme Aviaire :

I-1-Anatomie d'appareil reproducteur mâle :

L'appareil génital mâle des oiseaux présente quelques particularités anatomiques et physiologiques, comparé à celui des mammifères. La reproduction des espèces avicoles est soumise aux variations saisonnières, et donc principalement à la photopériode. Celle-ci influence le développement des gonades et la maturation des gamètes. L'appareil génital des mâles consiste en deux tractus droit et gauche constitués chacun d'un testicule (figure 1), d'un épидидyme et d'un conduit déférent sinueux qui chemine le long de l'uretère (**Sauveur et de Revirés.,1988**).

I-1-1- Les testicules :

Les testicules des oiseaux sont situés dans la cavité abdominale, en position cranio-ventrale par rapport aux reins. La spermatogenèse se déroule à la température centrale de l'animal (41-43°C) (**Etches., 1995**). Les dimensions et donc le poids de chaque testicule varient considérablement avec l'âge (coq : 5-15mg à l'éclosion à 20-40g chez l'adulte), mais d'autres facteurs tels que l'origine génétique, l'alimentation ou la saison sexuelle participent au maintien d'une grande variabilité de développement entre individus. (**Blesbois et Brillard., 2005**).

Chaque testicule est enveloppé d'une tunique protectrice, l'albuginée, et relié à l'appareil copulateur par un épидидyme peu différencié et prolongé par un canal déférent dépourvu de glandes annexes (prostate, vésicules séminales, etc.). Le parenchyme testiculaire est constitué de deux parties bien distinctes : les tubes séminifères qui produisent les spermatozoïdes et le tissu inter-tubulaire (interstitiel), qui est en partie responsable de la fonction endocrine des testicules. (**Blesbois et Brillard., 2005**)

I -1-2- Les voies déférentes :

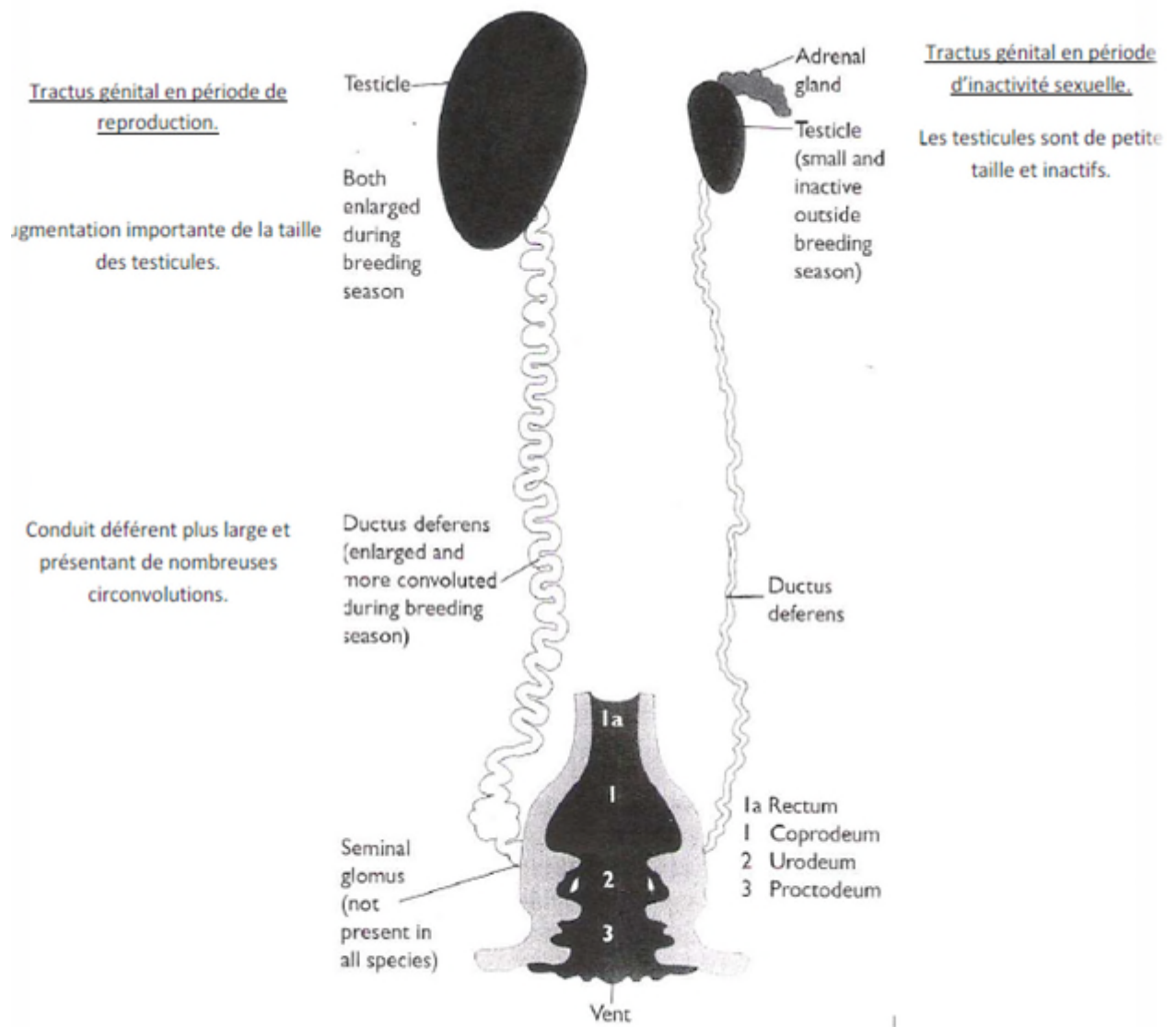
Les tubes séminifères se terminent à proximité immédiate du hile testiculaire où ils se connectent avec les tubules du rete testis, eux-mêmes reliés aux canaux efférents, qui débouchent latéralement dans le canal épидидymaire. (**Sauveur et de Revirés., 1988**).

Les tubes séminifères sont le lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes, renferment deux catégories de cellules : des cellules somatiques et des cellules germinales (**Blesbois et Brillard., 2005**).

I-1-3-L'organe copulateur :

Chez les oiseaux l'organe copulateur est de forme extrêmement variable selon les espèces, très développé chez les anatidés (canards, oies) il peut mesurer jusqu'à 15-20 cm, alors qu'il se réduit à une simple « gouttière » d'environ 2cm chez la pintade. Il est pratiquement inexistant chez le coq ou le dindon.

La région de dépôt du sperme dans les voies génitales femelles est de ce fait variable d'une espèce à l'autre, une spécificité qui doit être prise en compte pour utiliser avec succès l'insémination artificielle dans ces espèces. **(Blesbois et Brillard., 2005).**



Légende : Testicle = testicule ; Adrenal gland = glande surrénale ; Ductus deferens = conduit déférent ; Seminal glomus = glomus séminal.

Figure 1 : Anatomie du tractus génital mâle au repos et en période de reproduction (Pichereau., 2012)

I-2-Le sperme aviaire :**I-2-1-La spermatogenèse :**

La spermatogenèse est l'ensemble des processus de multiplication et différenciation cellulaires des cellules de la lignée germinale mâle. A partir des spermatogonies, elle aboutit à la production des spermatozoïdes. Au cours de la spermatogenèse, deux évolutions essentielles se produisent :

- la réduction du nombre de chromosomes de $2n$ à n , au cours d'une méiose, division propre aux cellules de la lignée germinale.
- La maturation des cellules germinales aboutissant, à partir de spermatides, à des cellules très hautement différenciées, les spermatozoïdes.

La spermatogenèse se déroule en quatre phases (figure 2) : la multiplication des spermatogonies, l'accroissement des spermatocytes I, la réduction chromatique et la différenciation des spermatides (la spermiogenèse). La durée de la spermatogenèse des oiseaux domestiques est de 20-21 jours, de 64 à 72 jours chez l'homme, alors quelle est en moyenne de 49 jours chez le bélier (**Thibault et Levasseur., 2001**).

cycle des spermtogonies souches

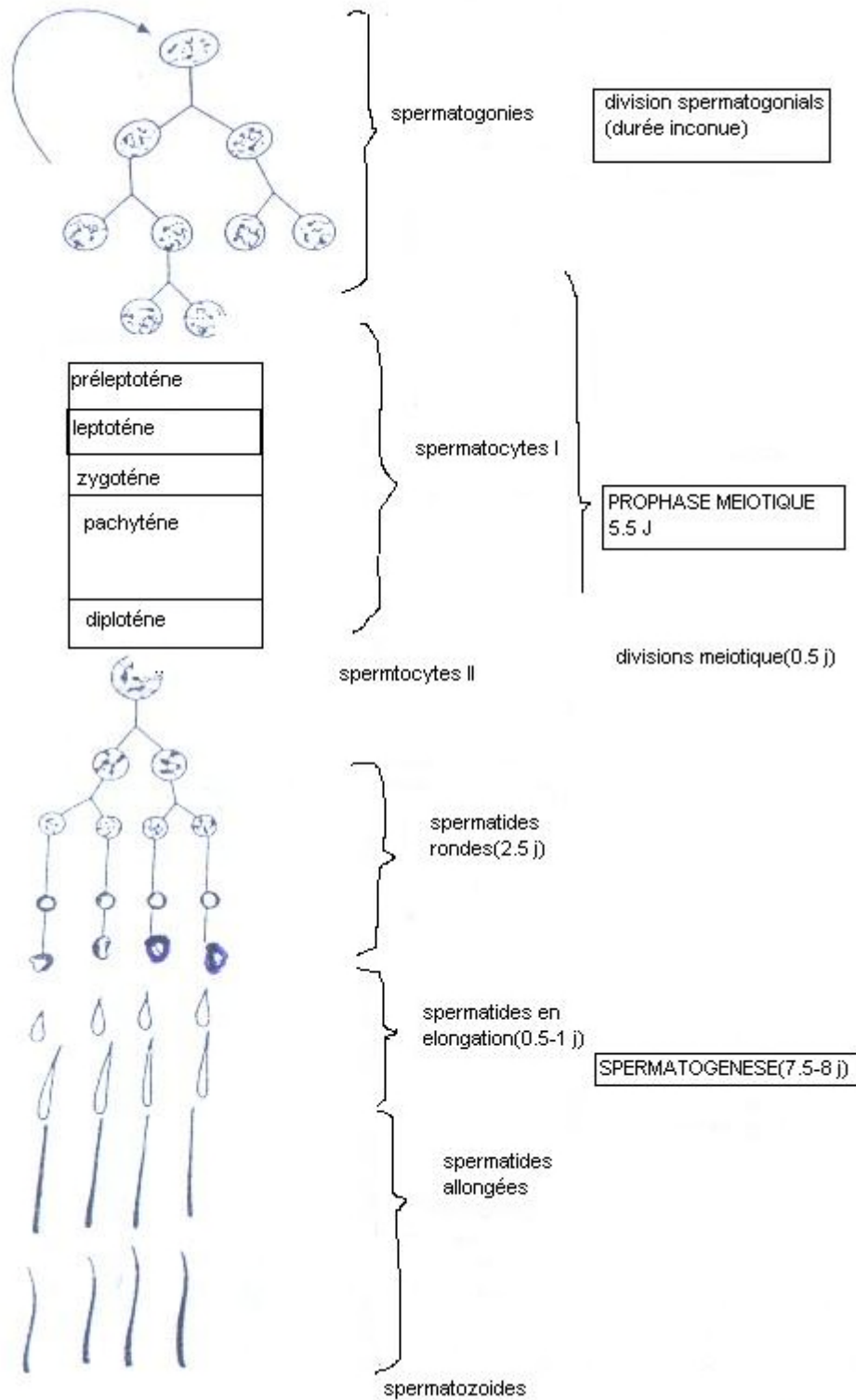


Figure 2: Diagramme de la spermatogenèse chez le coq (Sauveuretde Revires., 1988).

I-2-2- Le Spermatozoïde:

Les spermatozoïdes des espèces avicoles ont un morphotype assez proche les uns des autres. Chez le coq, le dindon, la pintade ou encore le canard, les spermatozoïdes ont un noyau filiforme (longueur de 10-15 μm , diamètre de 0,5-0,7 μm selon l'espèce) et mesurent au total de 75 à 90 μm . (Blesbois et Brillard.,2005)

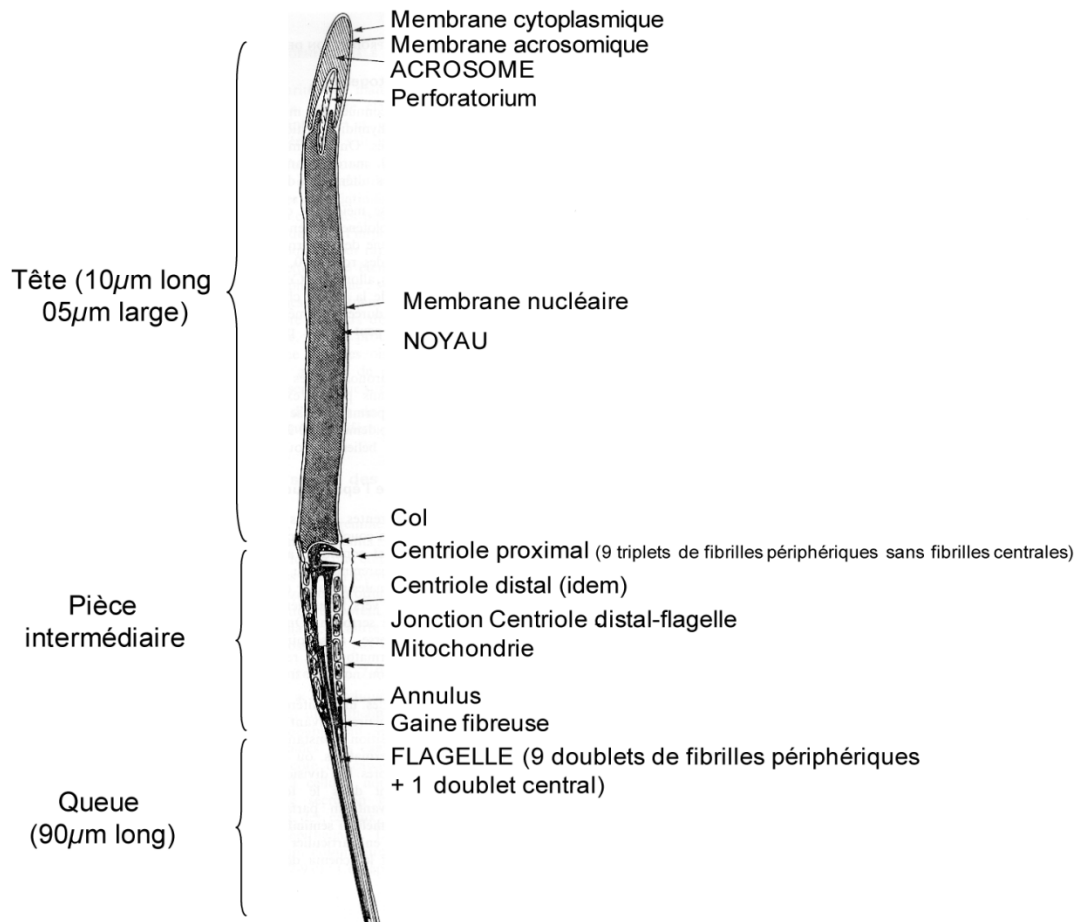


Figure 3 : Schéma de l'ultra structure d'un spermatozoïde de coq.(d'après de Revires., 1988)

I-2-3-La morphologie de spermatozoïde :

Les spermatozoïdes des Galliformes présentent certaines caractéristiques physiologiques qui pourraient influencer sur la conservation de la semence. La morphologie de la tête du spermatozoïde du coq est cylindrique et pas beaucoup plus large en diamètre que la queue (approximativement 0,5 μ m de plus). La longueur de la queue du spermatozoïde du coq est presque huit fois plus longue que la tête. (Donoghue et Wishart.,2000)

Au niveau structural, le noyau est surmonté d'un acrosome conique à structure granulaire.

IL contient une chromatine extrême condensée afin de protéger le stock génétique qui serait totalement inactif sous cette forme.

La pièce intermédiaire (coq, dindon) formée de deux centrioles l'un proximal et l'autre distal, ce dernier étant lui même entouré d'un nombre variable de mitochondrie (une trentaine chez le coq) en position hélicoïdale qui assurent le métabolisme énergétique nécessaire à la production d'énergie pour l'entretien cellulaires et la mobilité. La pièce intermédiaire se prolonge par un flagelle (queue) fin et peu chromophile. Il y a très peu de cytoplasme dans le spermatozoïde et aucune structure de réserve énergétique. Les structures subcellulaires des spermatozoïdes sont protégées par une membrane plasmique ayant aussi des fonctions d'interface et d'échanges entre le milieu intracellulaire et le milieu extérieur. (Blesbois et Brillard., 2005)

Après leur production dans les testicules ,les spermatozoïdes acquiescent leur mobilité dans l'épididyme ; puis s'accumulent dans la partie basse des voies déférentes où leur stock peut représenter jusqu'à quelque jours de production testiculaire (de 2 à 3 chez le coq).les voies déférentes se terminent par deux papilles éjacultrices entourée chacune d'un muscle sphincter que se contracte lors de l'éjaculation et évacue brutalement les spermatozoïdes vers l'urodæum (partie médiane du cloaque)puis l'organe copulateur quand il existe. (Blanco et al .,2009)

I-2-4- Le plasma séminal :

Les spermatozoïdes éjaculés baignent dans un plasma séminal issu des sécrétions des cellules du tractus génital mâle. Ce plasma séminal est un milieu biologique complexe, riches en sels (140 mmol de NA^+ , 20-50 mmol de Cl^-) et en glutamate (80 mmol), dix fois moins concentré en

protéines que le sang et avec comme protéine majeure le sérum albumine. Il contient aussi de nombreuses vésicules lipidiques et lipoprotéines (HDL, VHDL) mais il est par contre très pauvre en glucose. Ce milieu biologique stimule la mobilité des gamètes et est efficace pour assurer le transit des spermatozoïdes depuis les voies génitales mâles jusqu'aux voies génitales femelles en cas d'accouplements naturel. Il est cependant très vite éliminé par la suite et ce n'est pas du tout un bon milieu de conservation in vitro des spermatozoïdes. (Blesbois et Brillard., 2005)

I-3- Contrôle du développement testiculaire dans les espèces avicoles :

La reproduction des espèces avicoles est soumise aux variations saisonnières de l'environnement et en particulier à celles de la photopériode, qui agit via la stimulation du système nerveux central en induisant la production de GnRH (*gonadotrophin releasing hormone*), capable de stimuler la production d'hormones gonadotropes (LH, FSH) au niveau hypophysaire. Ces dernières, secrétées d'une manière pulsatile, régulent le développement gonadique en particulier celui des testicules. (Blesbois et Brillard., 2005)

I-4-Rôle de la photopériode :

Chez le coq, la durée d'éclairage a une influence importante sur le développement testiculaire pendant la puberté mais aussi sur l'évolution des testicules à l'âge adulte.(de Reviers.,1977)

Le développement testiculaire est retardé chez des coqs soumis à des jours décroissants comparés à des jours croissants, mais le passage à des jours longs à 24 semaine d'âge conduit à un poids testiculaire plus élevé. (de Reviers.,1996)

I-5-Choix des mâles futurs reproducteurs :

Dans les élevages de reproducteurs, le choix des mâles sur des critères de production, spermatiques notamment, n'est pas utilisé comme moyen de sélection dans les élevages industriels. Le choix des mâles futurs reproducteurs est très important cela se fait en principe dans les deux ou trois mois qui précèdent l'entrée en ponte, le choix et la mise en place s'effectueront en novembre ou en décembre.

I-6-Méthodes de collecte de sperme chez les espèces aviaires:

Il existe en pratique plusieurs méthodes de collecte du sperme aviaire : la plus couramment utilisée en pratique est la méthode du massage abdominale, cette technique a été décrite pour la première

fois chez la dinde en 1935 par Burrows et Quinn. C'est la technique la plus facile et la plus pratiquée notamment chez le coq, le dindon, le faison et la pintade.

Pour stimuler le mâle, il faut lui masser l'abdomen d'une main et le bas des reins de l'autre. Quand le phallus est érigé, poser une main sur le bas du dos et de l'autre, pincer à la base du phallus érigé, puis utiliser un aspirateur pour recueillir le sperme. (Donoghue et Wishart, 2000)

La deuxième méthode : est par l'électroéjaculation été appliquée chez les canards, oies et les pigeons où l'éjaculat fréquemment sont souillés avec l'urine. (Blanco, 2009)

II- Les méthodes d'évaluation du sperme :

L'évaluation de la semence dans le cadre d'un programme d'IA est primordiale à plusieurs titres. Elle permet d'avoir des informations sur la qualité de la semence afin de pouvoir sélectionner et ne garder que les meilleurs mâles, et aussi pouvoir déterminer les taux de dilution de la semence afin d'adapter les quantités à inséminer. L'analyse de la semence permet de déterminer le potentiel du sperme à fertiliser l'ovule qu'il soit frais, réfrigéré ou congelé, en utilisant des méthodes rapides et pas coûteuses et qui soient les plus objectives possibles. L'évaluation du sperme aviaire peut être réalisée soit par les techniques microscopiques traditionnelles soit par d'autres nouvelles techniques.

II-1 - Les Méthodes traditionnelles :

La méthode traditionnelle permet l'analyse de certains paramètres qui sont la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes, la mobilité des gamètes et le pourcentage d'anomalies morphologiques ainsi que la viabilité des spermatozoïdes. L'inconvénient majeur de cette technique est la subjectivité des résultats générés surtout pour l'évaluation de la mobilité. C'est donc l'examineur qui estime la qualité de la mobilité des spermatozoïdes, et qui reste une appréciation personnelle conditionnée par l'expérience de ce dernier. (Partyka et al., 2011)

II-1-1- Concentration :

L'objectif de la mesure de la concentration, est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure en utilisant le minimum de semence possible. Elle doit être connue avant l'insémination afin de déterminer le taux de dilution nécessaire avant insémination. Plusieurs cellules de comptages sont disponibles sur le marché, les plus couramment utilisés sont : Makler, Neubauer et l'hémocytomètre. Ces différentes cellules donnent des résultats assez fiables si la technique est effectuée soigneusement (Mahmoud et al., 1997).

L'hémocytomètre (Thomas) la cellule la plus utilisée est composée de deux grilles, où chacune d'elle est divisée en 20 grands carreaux, eux-mêmes divisés en 16 petits carreaux. Chez le coq, la mesure est réalisée après 10 à 15 minutes de décantation afin que les spermatozoïdes puissent se déposer sur le fond de la lame. Malgré sa facilité d'utilisation, elle présente l'inconvénient d'être consommatrice de temps (**Sauveur., 1989 et Trippel., 2003**).

II-1-2-La mobilité :

L'évaluation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles par microscope est l'essai le plus utilisé en laboratoire. Toutefois, cet examen reste complexe à réaliser en raison de l'absence de critères objectifs d'analyse. L'examineur donne un jugement sur la qualité de mobilité de plusieurs millions de spermatozoïdes en mouvement. L'examen de la mobilité consiste en deux types d'évaluation, une estimation de la mobilité massale qui analyse la qualité générale de la mobilité avec une graduation allant de **0** (absence totale de mouvement) à **5** (mobilité vigoureuse). L'évaluation individuelle des spermatozoïdes s'opère sous lamelle, elle consiste à déterminer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles ainsi que leur type de progression.(**Santiago-Moreno et al .,2012**)

II-1-3- La morphologie :

L'évaluation de la morphologie du spermatozoïde peut servir comme indicateur de certains désordres de la spermatogenèse. Une meilleure estimation de la morphologie dépendrait donc du type de coloration utilisée, du colorant lui-même et de la préparation (**Bilgili et al.,1985**).

Plusieurs techniques de coloration sont utilisées pour mettre en évidence des anomalies morphologiques. Les colorations les plus communément utilisées en laboratoire sont la coloration à l'éosine-nigrosine et l'aniline bleu-éosine. Les spermatozoïdes normaux et vivants possèdent une membrane plasmique intacte empêchant l'entrée de l'éosine. Les spermatozoïdes endommagés vont concentrer l'éosine puisque leur membrane plasmique est perméable et prendront une couleur rouge au microscope (**Lake., 1978 ; Lukaszewicz et al.,2008**).

II-1-4- La viabilité :

L'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est un des critères indispensables dans l'évaluation spermatique surtout pour la détermination des doses adéquates pour l'IA. Il existe plusieurs techniques de colorations pour l'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes, la plus couramment utilisée est la coloration à l'éosine-nigrosine, elle présente l'avantage de permettre simultanément l'évaluation de la morphologie et de la viabilité des spermatozoïdes (**Bakst et Cecil .,1997**).

II-2-Les nouvelles méthodes d'évaluation du sperme aviaire

Devant les nombreux problèmes rencontrés en utilisant les méthodes traditionnelles, plusieurs approches sont actuellement proposées pour mieux objectiver l'analyse spermatique. Les nouvelles méthodes visent à mieux évaluer la concentration, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes. En plus de ces paramètres, l'exploration des capacités fonctionnelles des gamètes est à présent possible.

II-2-1- Le spectrophotomètre :

L'estimation de la concentration spermatique est importante dans un programme d'AI, afin d'inséminer l'ensemble des femelles avec des doses correctes et précises. Le spectrophotomètre peut être utilisé pour l'estimation de la concentration spermatique. Le principe consiste en un faisceau de lumière qui va traverser l'échantillon, l'absorbance notée à 550 nm est directement liée aux mouvements de la population spermatique de ce dernier. (Atiq et al., 2011)

II-2-2- Analyse de sperme avecCASA (Computer AssistedSemenAnalysis)

Un système CASA (Computer AssistedSemenAnalysis ou analyse de sperme assistée par ordinateur) est un équipement qui permet d'évaluer de manière automatique, objective et standardisée la concentration, la mobilité, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes d'un échantillon. La plupart de ces systèmes sont basés sur des techniques d'analyse d'images (figure 4). D'autres techniques d'analyse existent, cependant elles ne sont pas considérées comme des systèmes CASA. (Wilson-Leedy.,2006)

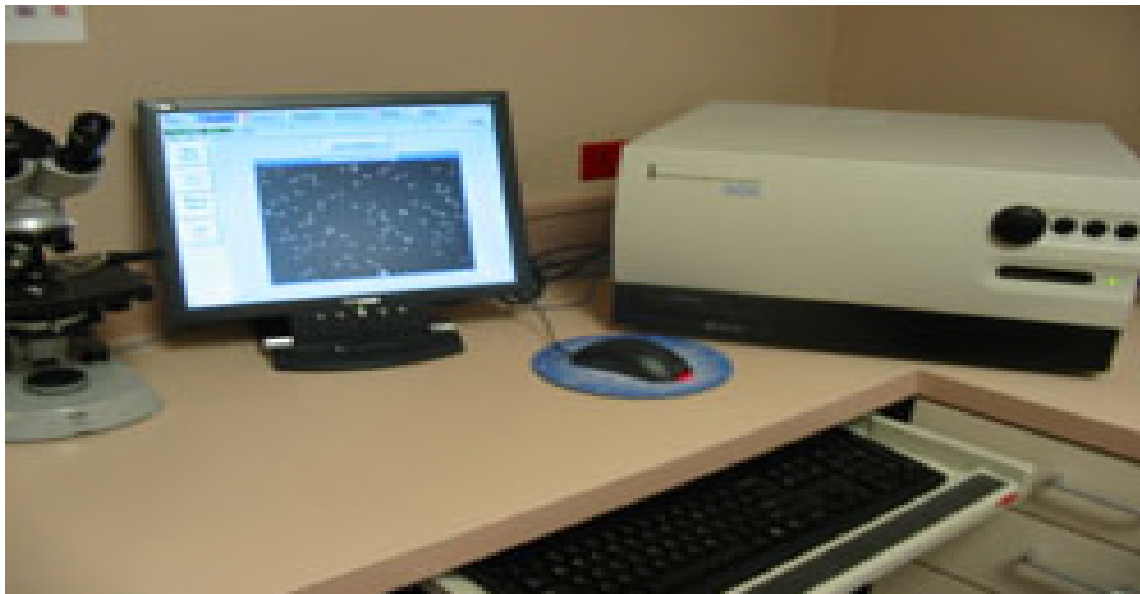


Figure 4: Analyseur informatique du sperme (CASA)

II--2-2-1-Valeurs cinématiques mesurées par CASA

L'Analyseur informatique fournit des données intéressantes sur les différents mouvements et trajectoires des spermatozoïdes, et des valeurs cinématiques sont déterminées pour chaque spermatozoïde (figure 5). Les valeurs des différentes vitesses de progression des spermatozoïdes les plus importants sont cités ci-après :

La VSL (Straight-Line Velocity) : c'est la distance entre le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet, en ligne droite.

- **La VCL** (curvilinear velocity): c'est la distance totale parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

- **La VAP** (velocity average pathway): c'est l'équivalent de la VCL après lissage de son trajet.

- **L'ALH** (amplitude of lateral head displacement): c'est la distance balayée par la tête du Spermatozoïde durant son déplacement.

La BCF (beat cross frequency): c'est la fréquence par laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.

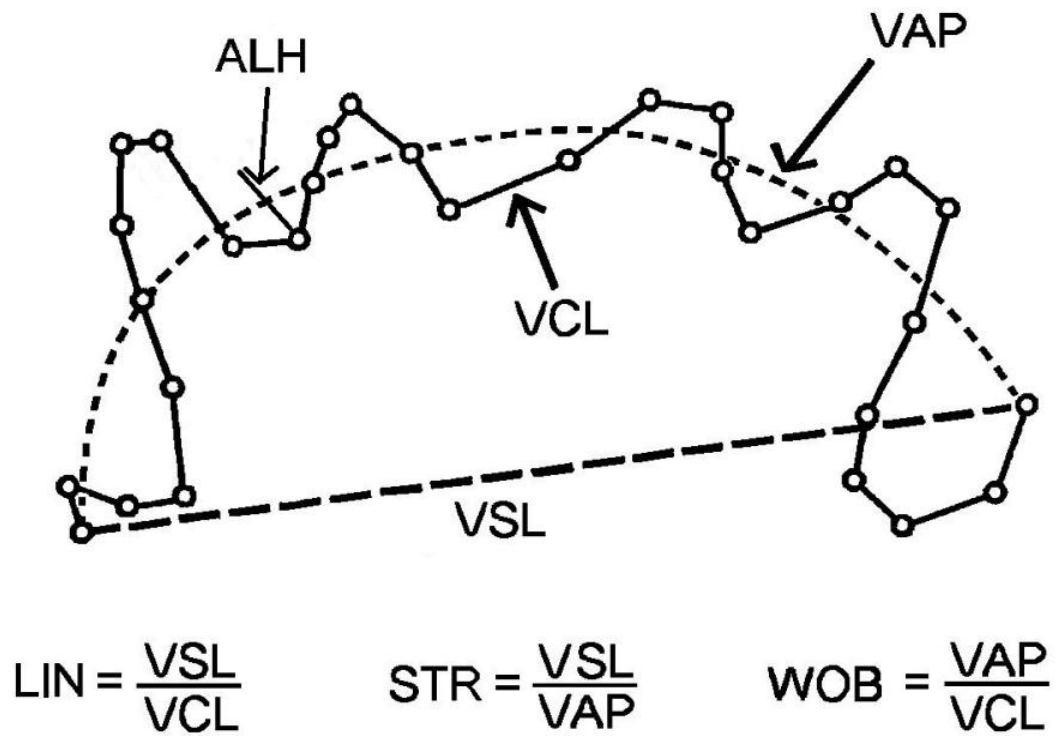


Figure 5 : Schéma représentant les différents types de vitesse de mobilité du spermatozoïde.

III-Les méthodes de conservation de sperme :

La conservation du sperme aviaire peut se faire par deux méthodes : la réfrigération à une température allant de 2 à 5°C et la congélation à des températures négatives.

III- 1- Conservation de la semence à l'état frais (réfrigération) :

III-1-1- Description de la technique :

La réfrigération du sperme aviaire à l'heure actuelle présente ses limites puisque les durées de stockage à 4°C sont limitées dans le temps (6 à 24h). En pratique industrielle de l'IA chez les espèces aviaires, le sperme est utilisé à son état pur, autrement, une dilution est nécessaire pour pouvoir garder longtemps les chances de fécondances des spermatozoïdes (**Decuadro-Hansen., 2004**).

III-1-2- Les différentes étapes de la réfrigération :

III-1-2-a- La dilution :

La longévité des spermatozoïdes réfrigérés dépend du dilueur utilisé, ce dernier doit répondre à un certain nombre de critères qui sont:

- ❖ **Le pH** : le pH du dilueur est important à plusieurs titres. Les spermatozoïdes seront inactivés à des pH basiques et ces derniers vont se réactiver à des pH acide. Il a été montré que les spermatozoïdes conservés à un pH de 6,1 pendant 24h, conservaient en l'état de leurs pouvoir fécondant en réduisant l'activité métabolique des cellules stockées. D'autres études suggèrent un pH compris entre 6,8 et 7,1 pendant le stockage à 5°C afin de garder toutes les chances de fécondances des spermatozoïdes (**Donoghue et al., 2000**)
- ❖ **Eléments nutritifs** : les cellules spermatiques requièrent du substrat énergétique pour leur mobilité mais aussi pour leur survie. Il est admis en pratique de la réfrigération aviaire, que le fructose est plus efficace que le glucose ou l'inositol (**Christensen., 1995**)
- ❖ **Osmolarité** : Les spermatozoïdes de volaille peuvent maintenir leurs capacités de fertilisation dans les diluants avec des osmolarités allant de 325 à 350 mosM/kg (**Christensen., 1995**).
- ❖ **Substances lipoprotéines** : Quelle soit d'origine animale ou végétale, leur rôle est d'augmenter la mobilité spermatique alors que leur effet sur la fécondité est minime (**Bakst et Cecil., 1997**).

- ❖ **Antibiotiques:** Parfois au moment de la collecte, des micro-organismes au niveau du cloaque peuvent contaminés la semence fraîchement récoltée, alors qu'il est indemne de toutes contaminations au niveau des voies déférentes. Nombre de dilueurs contiennent des antibiotiques à des doses bactéricides (**Christensen., 1995**).

III-1-2-b- la composition des différents dilueurs :

Il existe à présent plusieurs dilueurs utilisées au niveau des laboratoires mais aussi en industries avicoles dans les plans d'insémination artificielle. Le dilueur par sa composition, apporte les nutriments nécessaires aux spermatozoïdes, sert à la dilution de la semence surtout que le sperme aviaire est très concentré et assure un arrêt temporaire du métabolisme des spermatozoïdes.

Tableau 1: Composition des unités de dilueur utilisées pour stocker le sperme de poulet pour 24 h à 4°C (valeurs en grammes par 100 ml d'eau distillée)

Composition	Les dilueurs		
	A	B	C
Sodium glutamate	1.35	1.4	1.92
Potassium citrate $\times H_2O$	0.128	0.14	0.5
Potassium acetate			
Sodium acetate	0.51		
Magnesium acetate $X 4H_2O$	0.08		
Glucose	0.8	0.7	
D-Fructose		0.2	0.8
Inositol	0.7	0.3	
Polyvinylpyrrolidone		0.1	
Protamine sulfate		0.02	
Anhydrous sodium hydrogen phosphate		0.98	0.32
Anhydrous sodium dihydrogen phosphate		0.21	
pH	7.2	7.3	7.05
Osmotic pressure (mOsmol/kg)	310	390	320

A = dilueur de Lake (1960)

B= Dilueur EK de Łukaszewicz (2002) C = Dilueur de Tselutin et al (1995).

III-1-2-c- Le taux de dilution :

Le facteur de dilution varie considérablement parmi les éjaculats puisqu'il existe une variabilité intra et inter individus. Le taux de dilution dépend fortement de la concentration du sperme (**Lukaszewicz., 2000**). En pratique, une dose fécondante doit avoir au minimum 50×10^6 de spermatozoïde, alors qu'en pratique d'insémination les doses usuelles varient de 150 à 250 millions de spermatozoïdes par insémination. (**lake et al., 1985**)

Il faudra donc considérer les éléments suivants pour déterminer le volume de dilueur à ajouter au sperme.

- Le volume de sperme récolté
- La concentration du sperme
- La proportion de spermatozoïdes vivants dans le sperme
- La proportion de spermatozoïdes qui seront altérés par les manipulations techniques. (**Lake et de Ravies., 1981**)

III-1-3-Le refroidissement :

La conservation de la semence fraîche en vue d'IA nécessite des températures de stockage allant de 4 à 15 °C). La conservation de la semence fraîche entre 15–20 °C maintient le métabolisme des spermatozoïdes mais les rend plus sensibles aux éléments toxiques métabolisables.

III-1-4- les effets de la réfrigération sur les spermatozoïdes :

Lors de la réfrigération, les spermatozoïdes subissent des agressions qui sont susceptibles d'altérer leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. La réfrigération de la semence de 37°C à 4°C met en jeu des remaniements des membranes des spermatozoïdes qui sont regroupés sous le nom de choc froid. Celui-ci provoque la perte du pouvoir fécondant et à la mort cellulaire. L'une des conséquences de ce choc est l'oxydation des membranes cellulaires (**Magistrini., 1999**).

Dans une étude comparative, **AX et Lodge.,1975** ont montré que les conséquences d'une réfrigération est moins néfastes pour les spermatozoïdes que celles de la congélation. Les caractéristiques de la semence (mobilité, vitalité, intégrité membranaire et acrosomiale et la morphologie des spermatozoïdes) réfrigérée sur de courtes périodes (inférieures à 48 heures), sont supérieures à celles de la semence congelée. Les mêmes auteurs ont démontrés que plus le temps de réfrigération augmente, plus la qualité de la semence se détériore.

IV- Stress oxydatif :

IV-1- définition :

Pour définir le stress oxydant il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres (ROS). Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataire) sur l'orbite électronique la plus externe, formés lors du métabolisme de l'oxygène. Très réactives, instables, et possèdent un temps de demi-vie extrêmement court.

(curtay et robin.,2000)

Le stress oxydant (SO), est défini par **Dean et Jones.,2008** comme l'incapacité pour un organe ou des cellules de se défendre contre l'agression des radicaux libres». Il résulte d'un déséquilibre de la balance « prooxydants-antioxydants » en faveur des prooxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires.

IV-2-Les différent type des radicaux libres (ROS) :

Les radicaux libres cellulaires rapportés les plus communs sont hydroxyle (OH^\bullet), superoxyde (O_2^\bullet) et oxyde nitrique (NO^\bullet). Même que d'autres molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le peroxydinitrite (ONOO^-) qui ne sont pas des radicaux libres.

(Uttaraet *al.*, 2009)

IV-3-Source de ROS au niveau du spermatozoïde :

Le sperme est en particulier susceptible de l'attaque par ROS à cause des limites des mécanismes antioxydant, leur activité métabolique élevée et le taux d'acide gras polyinsaturés (AGPI) contenu de leurs membranes. (**Bonisoli-Alquati., et al. 2011**)

Dans le sperme, les ROS sont générés par les neutrophiles polynucléaires (PNN) et les cellules germinales. Les PNN sont la source principale ils produisent l'anion superoxyde (O_2^\bullet) via le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène oxydase (NADPH).

L'anion superoxyde, peu réactif, est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), spontanément ou par l'action du superoxydedismutase (SOD). Même si l' H_2O_2 n'est pas

un ROS au sens strict, il est décrit comme appartenant à cette famille ; c'est un intermédiaire stable, capable de traverser les membranes lipidiques et il permet de générer des radicaux hydroxyles ($^\circ\text{OH}$), particulièrement toxiques. La présence de quantité élevée de cellules germinales immatures

ou de spermatozoïdes morphologiquement anormaux dans le sperme est généralement associée à un stress oxydant. (Pons-Rejraji et al., 2009)

Habituellement, la formation intracellulaire de ROS est le résultat de la fuite d'électrons des mitochondries qui mène à la diminution du nombre de spermatozoïdes.

Le déclin de l'activité mitochondriale après cryopreservation pourrait être lié à l'augmentation de la production de ROS (Prtyka et al., 2012).

IV-4- Systèmes antioxydants:

Contre l'attaque de ROS, les cellules du sperme sont bien équipées par de systèmes de défense antioxydants.

Les antioxydants sont les facteurs principaux de la défense contre le stress oxydative induit par les radicaux libres (Bansal et Bilaspuri, 2011). L'antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont enzymatiques et non-enzymatique (Cillard et Cillard, 2006).

Une cellule aérobie contient des substrats et enzymes pour empêcher ou limiter la formation et la propagation de ROS, mais les défenses antioxydants des spermatozoïdes sont relativement faibles (Prtyka et al., 2012).

IV-4-1- Le système antioxydant enzymatique : il contient trois familles enzymatiques

A- superoxydedismutase(SOD) :

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂ (2O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂) qui peut être pris ensuite en charge par des enzymes à activité peroxydase. (Gutteridge et John., 1995)

B- les glutathions peroxydases (GPX) ou (GSH-PX) :

Qui réduisent l' H₂O₂ et divers hydroperoxydes lipidiques (cholestérol, cholestérol-esters, phospholipides), elles sont présentes dans des membranes oxydées ou des lipoprotéines oxydées le long du tractus génital masculin, ainsi que dans le liquide séminal et les spermatozoïdes.

C-catalase(CAT) :

Réagit efficacement avec l'H₂O₂ pour donner de l'eau et de l'O₂, la CAT est localisée principalement dans le peroxysome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme,

(Mustafa., 2008 et Partyka.,2012) montreront la présence de cette enzyme dans les spermatozoïdes et le plasma séminal des aviaires.

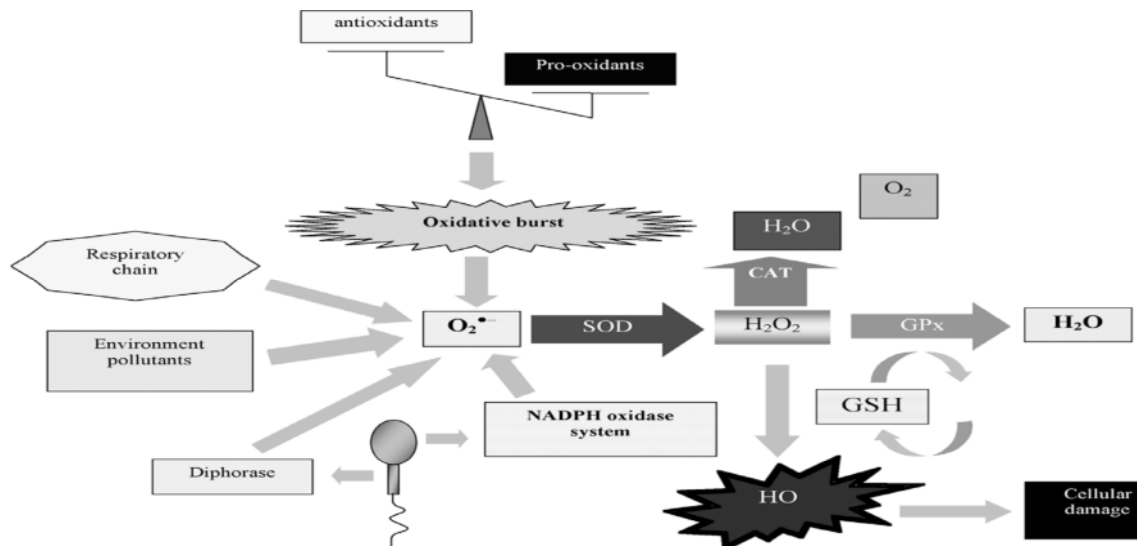


Figure 6 : La représentation schématique des ROS avec les dommages cellulaires. CAT = catalase; GPx = glutathion peroxydase; GSH = glutathion réduit; SOD = dismutase de superoxyde

IV-4-2 Système antioxydant non-enzymatique :

Ces substances antioxydantes constituent la première ligne de défense. Cependant, leur action est limitée car elles ne peuvent servir qu'une seule fois si elles ne sont pas régénérées.

A- La vitamine E ou L'a-tocophérol:

Elle est liposoluble existe essentiellement dans les membranes et lipoprotéines et fonctionne comme scavengers (piégeurs) d'ROS, prévenant l'oxydation des phospholipides et des lipides en général. (Agarwal et Sekhon., 2010)

La vitamine E est un inhibiteur bien connu de peroxydation de lipide dans des membranes biologiques, agit en tant qu'extracteur du peroxyde de lipide [LOO[•]] et alcoyle [LO[•]] des radicaux et empêche les dommages oxydants dans le sperme. (Zaniboni, et al.,2005)

Elle protège également la membrane des spermatozoïdes pendant la dilution et la conservation par le froid. En augmentant l'apport alimentaire de vitamine E chez le dindon, le coq, le jars, on

augmente la quantité de vitamine E dans le sperme, et par conséquent la stabilité des membranes des spermatozoïdes. (Surai, *et al.*, 2007)

B- Vitamine C :

Hydrosoluble, elle est considérée comme la première ligne de défense antioxydante contre les radicaux présents dans la phase aqueuse en raison de sa capacité à donner un électron puis un proton à de nombreux substrats.

C- Glutathion:

Le glutathion (L-gamma-glutamyl-cystéinyl-glycine, GSH) est le thiol intracellulaire le plus abondant. Il convertit les ponts disulfures (S-S) des protéines oxydées en thiols (2 SH) et agit comme substrat de la GPx et de la GST. Le glutathion tamponne l'état redox cellulaire grâce à ses 2 formes : réduite (GSH) et oxydée (GSSG). (Badade *et al.*, 2011).

IV-5- Les dégâts oxydatifs sur le sperme :

Les ROS produits par les spermatozoïdes ont un rôle important dans des processus physiologiques normaux tels que la capacitation de sperme, réaction acrosome, entretien de la capacité de fertilisation et la stabilisation des mitochondries.

La production des ROS est un processus physiologique normal mais un déséquilibre entre la génération de ROS et le balayage de l'activité est nuisible au sperme et est associée à l'infertilité masculine (Bansal *et Bilaspuri.*, 2011).

IV-5- 1- peroxydation des lipides :

La membrane plasmique du spermatozoïde des volailles est composée principalement de phospholipides (60 à 80%) et de cholestérol libre (10 à 30%) (Blesboiset *al.*, 1998).

La peroxydation lipidique des membranes cause la perte de fluidité et l'augmentation de la perméabilité de (H) et d'autres ions, quelques produits finaux de fragmentation de peroxyde sont également cytotoxiques. (Gutteridge *et John.*, 1995).

Les membranes cellulaires sont un des emplacements primaires de dommages pendant le refroidissement ou la congélation-décongélation. Lukaszewicz *et Prtyka* (2012) montreront que pendant la conservation du sperme des coqs que le pourcentage des spermatozoïdes avec une membrane plasmique intact chute à 37,3% avec l'augmentation significative simultanée de la concentration du produit final de la peroxydation de lipide MDA (malondialdéhyde), et ceci dans le plasma séminal et dans les cellules spermatiques. (Prtyka *et al.*, 2012)

IV-5- 2-Oxydation des protéines :

Même si les protéines sont moins sensibles à l'attaque des radicaux libres que les lipides, l'oxydation des protéines peut entraîner la mort de la cellule (**Guidet.,1992**).

Plusieurs modifications oxydatives peuvent être induites directement par les ROS ou indirectement par les réactions secondaires des sous-produits du stress oxydant.

La méthionine et la cystéine sont particulièrement vulnérables à l'attaque de la quasi-totalité des ROS. L'attaque oxydative directe et indirecte de certains acides aminés (Lysine, Arginine, Proline, méthionine, Cystéine, Lysine) conduit à la formation de protéines carbonylées et de produits dérivés (aldéhydes et cétones) ainsi que des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bityrosine intra et inter-chaînes (**Berlett et Stadtman., 1997**)

Les dommages résultant de l'oxydation des protéines sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Parmi ces modifications fonctionnelles on note l'inactivation des enzymes mitochondriales retentissant ainsi sur la capacité respiratoire cellulaire ou encore l'inactivation des protéines membranaires affectant le transport ionique. Toutefois, la cellule développe des systèmes capables de reconnaître, dégrader et régénérer les protéines endommagées (protéasome) ainsi que des systèmes stabilisateurs (heatshockprotein [HSP])(**Youssef., 2008**)

IV-5- 3- oxydation de l'ADN :

Le stress oxydant est l'un des effecteurs majeurs des dégâts de l'ADN et d'une façon plus générale, de la qualité du sperme.

Les ROS agissent sur la qualité de l'ADN, non seulement en induisant une oxydation des bases de l'ADN et une fragmentation mais aussi en favorisant la formation d'adduits, qui déforment la structure des bases, notamment guanine et adénine avec un blocage de la transcription.

(**Ménézo et al.,2012 ,Cocuzza Marcello et al., 2007**)

Ces dégâts nucléaires, membranaires et mitochondriaux représentent un facteur de risques de faible taux de fécondation, d'anomalies du développement embryonnaire préimplantatoire et de fausses couches (**Pons-Rejraji, et al., 2009**)

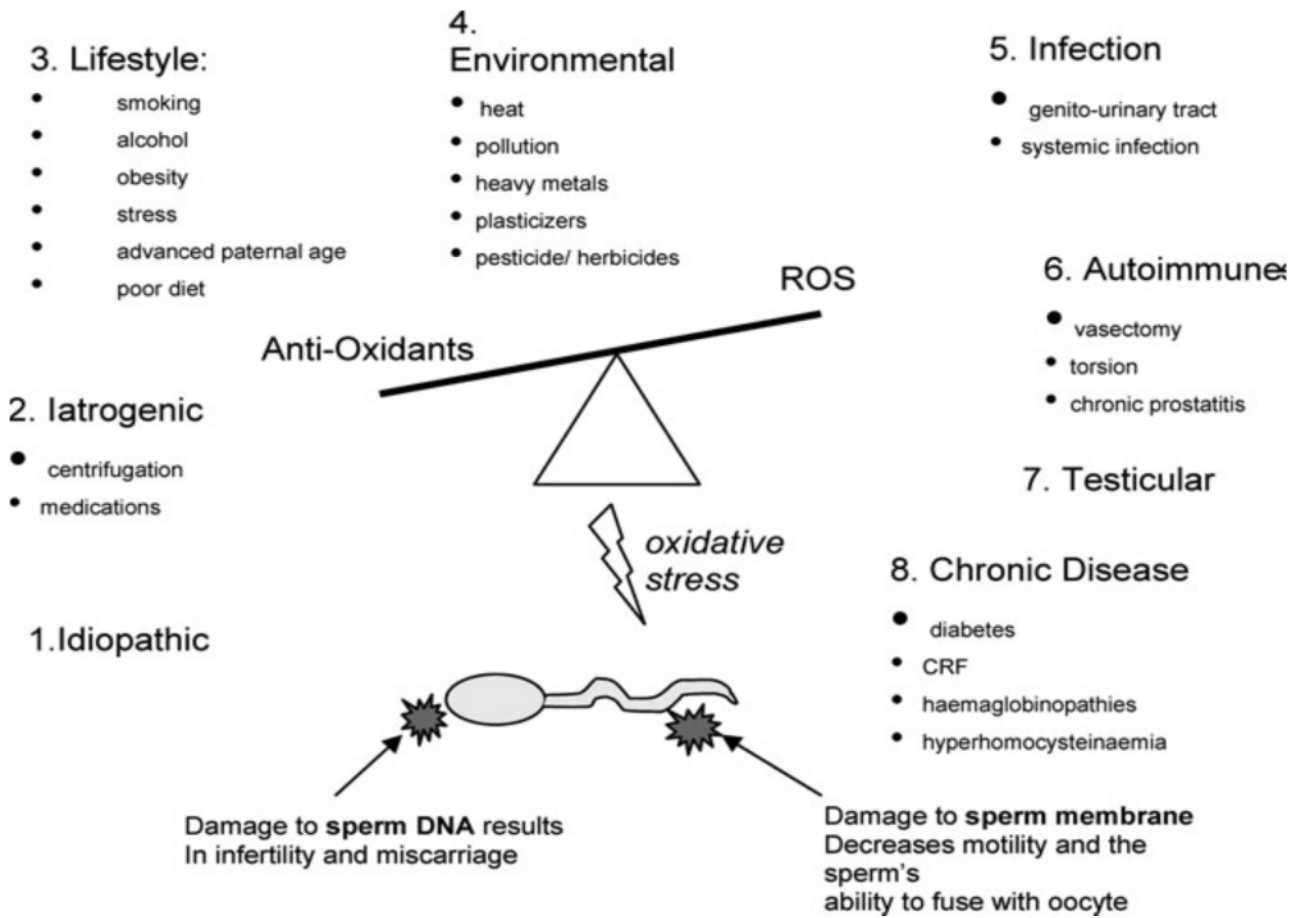


Figure7 : La balance de stress oxydatif (d'après : Tremellen., 2008)

I-Matériel et méthodes :**I-1-Animaux:**

Durant notre étude, nous avons travaillé sur une souche reproductrice de type chair Hubbard F15. Les animaux ont été élevés au sol selon les recommandations du sélectionneur pour les deux périodes d'élevage (poussinière et production). Pour des besoins pratiques, les mâles âgés de 26 semaines étaient logés dans des cages individuelles, recevaient 14h de lumière par jour et 125 grammes d'aliment contenant 17% de protéine.

Les mâles ont été entraînés à la collecte de la semence par massage dorso-abdominal 2 à 3 fois par semaine durant la période expérimentale.

I-2-Récole de la semence :

La technique la plus utilisée pour la récolte de la semence du coq reste celle décrite par **Burros et Quinn (1937)**. L'opération se pratique à deux personnes. La première personne prend l'animal et le place ventralement sur un genou. Ensuite, il masse le bas du dos de l'animal d'une main et relève la queue de l'autre, ce qui provoque l'éversion du cloaque et des papilles génitales. La seconde personne tient les pattes d'une main et le récipient de collecte de l'autre afin d'aspirer le sperme émis en faisant très attention de ne pas récolter de fèces, urine, urate ou du sang. Les semences anormales ou souillées ont toujours été écartées. La semence des cinq coqs récoltés été mélangé pour chaque essai

I-3- Analyse de la semence :**I-3-1-Volume :**

Le volume de l'éjaculat est très variable en fonction des individus. La lecture se fait à l'aide d'un tube gradué sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat.

I-3-2-Motilité massale (microscopie optique) :

L'examen de mobilité comporte une évaluation massale des spermatozoïdes. Le principe consiste à diluer une goutte de sperme pur au 10^{ème} aussitôt récolté, dans du sérum physiologique, puis déposer une goutte de dilution sur une lame propre au microscope sous grossissement (10).

Tableau 3 : L'évaluation massale consiste à donner une note allant de 0 (absence totale de mouvement) à 5 (mouvement vigoureux).

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

I-3-3-Motilité progressive (microscopie optique) :

L'évaluation de la mobilité progressive est réalisée au microscope sous grossissement (40), en déposant une goutte de semence diluée entre lame et lamelle. On estime alors le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, qui traversent le champ microscopique avec une vitesse plus au moins grande. Après examen de cinq champs différents, l'estimation de la mobilité progressive en pourcentage de mobiles est établie.

I-3-4- Concentration (nombre de spermatozoïdes/ ml) :

L'examen de la concentration spermatique est réalisé avec la cellule de Malassez. La cellule de Malassez est une lame de verre épaisse, sur laquelle est gravée une grille avec des carrés de 50 μ m de côté. La lamelle plus épaisse qu'une lame classique, est positionnée exactement à 0,2 mm au-dessus d'un creuset de la lame. La cellule de comptage mesure 1 mm³ et comporte 5 bandes horizontales de 5 lignes et 5 bandes verticales de 6 lignes chacune. On compte le nombre de spermatozoïdes dans les quatre rectangles composés de 20 petits carrés situés aux quatre coins du quadrillage (= N) et on fait la moyenne des quatre valeurs trouvées ($m = N/4$). Etant donné que le volume d'un rectangle = 1/100 mm³ ; la concentration en spermatozoïdes par ml sera donné par la formule suivante : $C = m \times 100 \times 10^3$ (dilution) x 10³ SPZ / ml.

Les différentes étapes à suivre pour un comptage à l'hématimètre sont les suivantes : prélever précisément 0,01 ml de semence pure et diluer dans 10 ml de sérum physiologique formolé (0,9% de chlorure de sodium, 0,1% de formaldéhyde dans de l'eau distillée), puis homogénéiser la solution. Préparer l'hématimètre en pressant fortement la lamelle sur les côtés de la grille, afin de permettre une adhésion de la lamelle à l'hématimètre. Déposer une goutte de solution sans bulle d'air, en bordure de la lamelle. La gouttelette par capillarité, se répartit alors entre lame et lamelle. Laisser reposer quelques minutes afin que les spermatozoïdes se déposent sur le fond de la lame. Enfin, placer la lame sur la platine du microscope avec un grossissement 40. Le champ du microscope couvre la surface d'un grand carreau. (Balédent., 2000)

I-4-Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes avec un system informatique :

L'analyse informatique de la cinétique des spermatozoïdes ou test CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) a pour l'objet l'analyse de la trajectoire des spermatozoïdes in vitro. L'Analyseur informatique utilisé dans ce travail permet de générer un certains nombres de paramètres qui sont les suivants :

- 1- Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles : c'est l'ensemble des spermatozoïdes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par apport à la population totale.
- 2- Les différentes vitesses de progression :
 - la VCL (curvilinear velocity): c'est la distance totale parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.
 - VSL (velocity straight line) : vitesse qui prend en considération le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet.
 - VAP (velocity average pathway): c'est l'équivalent de la VCL après lissage de son trajet.
 - ALH (amplitude of lateral head displacement): c'est la distance balayée par la tête du spermatozoïde durant son déplacement.
- 3- Le pourcentage de spermatozoïdes statiques : c'est l'ensemble de spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- 4- Le pourcentage de spermatozoïdes rapides : c'est le pourcentage de spermatozoïdes ayant une VAP supérieure à 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$.

5-Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs : PROG (=PMS) : pourcentage de spermatozoïdes progressifs, c'est-à-dire pourcentage de spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$ et une linéarité supérieure à 75 %.

I-5-Réfrigération du sperme aviaire :

La conservation du sperme par réfrigération à 4 °C consiste à réduire la mobilité et le métabolisme des spermatozoïdes sans toutefois atteindre des températures négatif à 4°C permettant son utilisation future sans compromettre la fertilité de ce dernier.

I-5-1- Objectif du travail:

L'objectif de cette étude est d'évaluer des nouveaux milieux de conservation de la semence du coq à 4°C.

I-5-2- Matériels utilisés :

Le pool de sperme utilisé dans cette étude provient de la collecte de cinq coqs. Une moitié est utilisée pour cette étude alors que la deuxième est utilisée pour la congélation. Le sperme pur est aussitôt dilué dans du Tris butyrique.

I-5-3- Préparations des échantillons :

Pour une préparation de 100 ml de tris butyrique on mélange 100ml d'eau distillé avec de 3,028 g de Tris en poudre, 1,675g de l'acide citrique et de 1,250g de D-glucose.

Après avoir analysé au microscope la mobilité des spermatozoïdes de chaque échantillon et s'assurer que le pool de sperme est de bonne qualité. On ajoute 2 ml de la solution à base de tris butyrique qu'on a préparé précédemment à 200 μl de sperme pur. A ce volume est ajouté un volume égale des traitements utilisés (Vitamine E, cholestérol, cyclodextrine, vitamine E-cyclodextrine, cholestérol-cyclodextrine, vitamine E-cyclodextrine- cholestérols (complex).

Tableau 3 : Préparation des différents traitements utilisés.

Cyclodextrine (CD)	Cholesterol (Chol)	Vitamine E Vit E	Association CD-Chol	Association CD-VitE	Complexe (CD-Chol-Vit E)
35,5 mg de CD + 5 ml de tris buffer (TB)	20 mg de Chol + 5ml de TB	1,2 mg VitE + 10 ml de TB	54,3 mg de (1) + 5 ml de TB (2)	9,2mg (2) + 10 ml de TB (1)	1 ml de (1) + 1 ml de (2) + 1,5ml TB

Analyses statistiques :

A l'aide d'un logiciel de traitement de données « statview », les données sont analysées par utilisation des statistiques descriptives pour chaque paramètre étudié.

I- Analyse de la semence avant réfrigération :**I-1- Le Volume spermatique :**

Les volumes collectés pour chaque analyse variaient de 0,8 à 1,2 ml par pool. Les faibles volumes récoltés sont dus essentiellement aux conditions stressantes dans lesquelles sont entretenus les cinq coqs utilisés pendant l'expérience.

I-2- Mobilité des spermatozoïdes :

Pour l'ensemble des répétitions, les notes attribuées à la mobilité massale variaient de 2 à 3. En effet, ces notes moyennes de mobilités peuvent être expliquées par : le jeunes âge des reproducteurs (26 semaines), et par le fait que ces mêmes reproducteurs ne sont pas suffisamment habitués aux gestes de collecte, et puis par la durée du trajet séparant le lieu de collecte au laboratoire sis à l'université de Bejaia.

I-3- Concentration spermatique :

La cellule de Mallassez a été choisie pour la mesure de la concentration durant l'expérimentation. Les concentrations des pools variaient de 2,3 à 3,5 .10⁹ SPZ/ml. La disparité des concentrations parmi les pools pourrait s'expliquer probablement par le jeune âge des reproducteurs. Les valeurs de concentrations obtenues dans notre travail restent proches de celles décrites dans la littérature, 2.10⁹ SPZ/ml pour la même souche Hubbard F15. (**Riaz et al.,2004**)

II- Analyse de la semence après réfrigération :

L'objectif principal de cette étude est de pouvoir prolonger la période de conservation de la viabilité de la semence du coq.

II-1- La mobilité progressive et statique des spermatozoïdes :

La **figure 8** présente les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et les spermatozoïdes statiques lors de la conservation de la semence pendant 24h à 4°C dans sept milieux contenant chacun un traitement spécifique. On observe clairement la supériorité des traitements complexe (cyclodextrine, cholestérol et vitamine E) et l'association CD-vit-E. pour ces deux milieux, les pourcentages de mobiles progressifs rapides avoisinent les 15%, alors que les mobiles totaux sont d'environ 75% pour, avec un avantage pour le complexe en terme de mobilité. Pour le groupe contrôle, le pourcentage de statique dépasse les 40%, alors que le pourcentage de progressifs rapides est

quasiment nul puisqu'il est de seulement de 3%. En comparant l'ensemble des milieux utilisés dans notre étude, deux milieux peuvent être intéressants pour la réfrigération pendant 24h. Le milieu CD-VitE présente l'avantage de l'effet antioxydant puissant de la vitamine E qui est mieux solubilisé et protégé avec la présence de la cyclodextrine, alors que le complexe (CD-Chol-VitE) présente l'avantage de l'association de l'effet antioxydant de la vitamine E, de l'effet protecteur du cholestérol sur les membranes cellulaires qui sont les plus vulnérables à la conservation mais aussi par l'effet protecteur de la cyclodextrine durant la conservation aussi bien sur la vitamine E que sur le cholestérol.

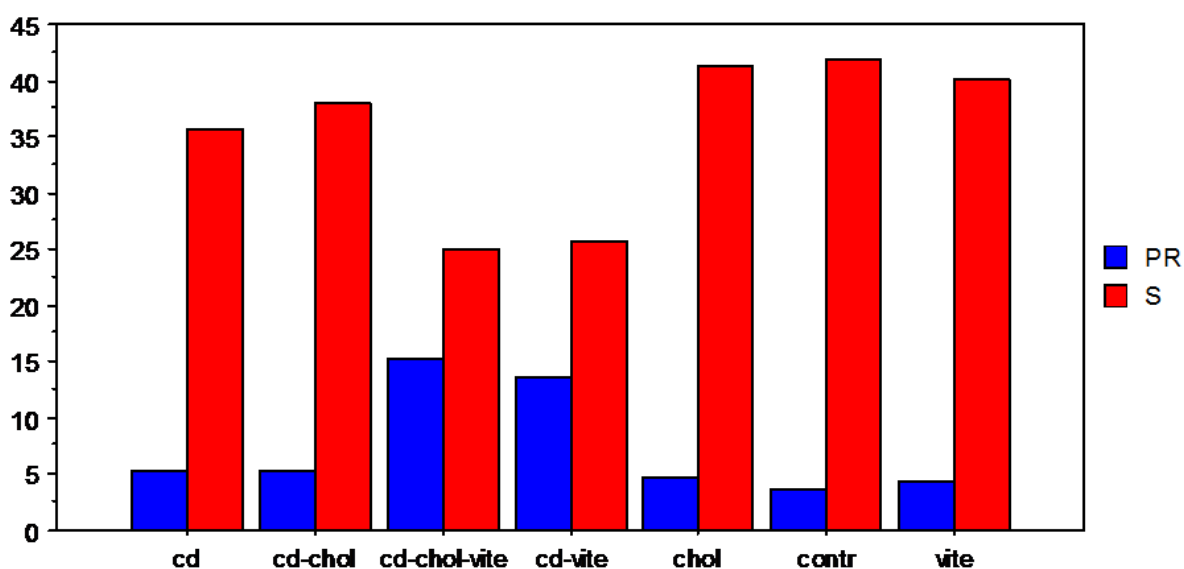


Figure 8 : Pourcentages de spermatozoïdes mobiles progressifs (PR) et les statiques (S) du sperme de coq conservé à 4°C dans du Tris butyrique avec six traitements différents après 24 h de réfrigération.

II-2- Les vitesses de progressions des spermatozoïdes : VSL, VAP et VCL:

Sur les figures 9, 10 et 11, on observe l'évolution des vitesses dans les différents milieux utilisés. Les analyses réalisées à T0 et T1 ne montrent pas de différence parmi les milieux, à l'exception du cholestérol à T0 et de la vitamine E à T1. Alors qu'une diminution progressive de toutes les vitesses (VSL, VAP et VCL) est constatée à partir de T2 parmi tous les échantillons

(figure 9, 10 et 11). L'analyse après 6 h (T4) de conservation montrait une augmentation de la VSL, de la VAP et de la VCL aussi bien dans le contrôle qu'avec la cyclodextrine seule comme traitement, avec un avantage pour le milieu cyclodextrine. Après 24 heures de conservation, on observe une augmentation des trois vitesses mesurées dans deux traitements : le complexe (cyclodextrine, cholestérol et vitamine E) et CD-VitE. Les vitesses VSL avoisinaient donc les 25µm/seconde alors qu'elles étaient entre 30 et 35µm/seconde pendant la première analyse. La même tendance est aussi observée aussi bien avec la VAP qu'avec la VCL, puisque ces dernières sont très proches des vitesses obtenues juste après la réfrigération (T0 et T1).

Les résultats des vitesses obtenus avec le complexe mais aussi avec la CD-VitE confirment les résultats de mobilité de la figure 8, puisque les trois vitesses mesurées sont de loin les meilleures avec ces deux milieux, avec un avantage pour le complexe (cyclodextrine, cholestérol et vitamine E). La aussi, avec l'association de l'effet antioxydant de la vitamine E, de l'effet protecteur membranaire du cholestérol et de l'effet protecteur de la cyclodextrine sur les deux molécules, l'effet sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après 24h de conservation est plus qu'important, chose qui va se traduire sans doute par un effet positif sur la fécondance des spermatozoïdes conservés dans ces milieux.

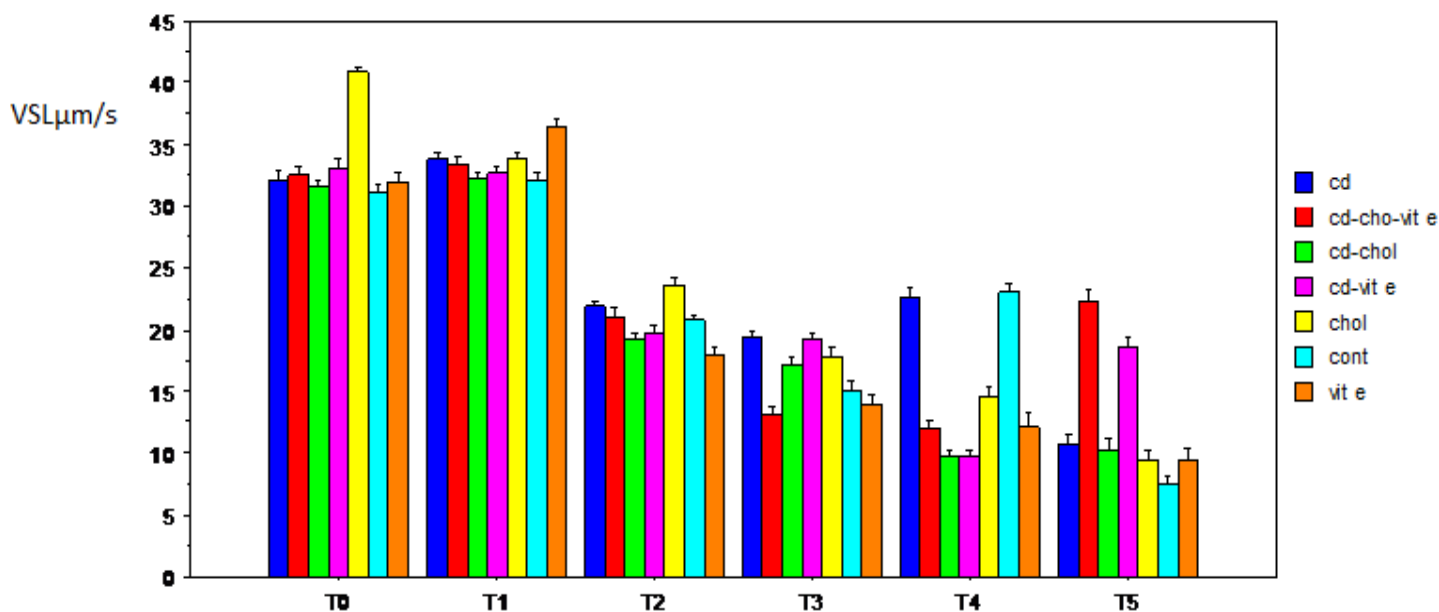


Figure 9: Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VSL) des spermatozoïdes en fonction du temps (de T0= après la collecte, T1=1,5 h, T2=3 h, T3=4,5h, T4=6h, T5=24h) après la collecte dans les sept milieux de conservation utilisés dans l'expérimentation.

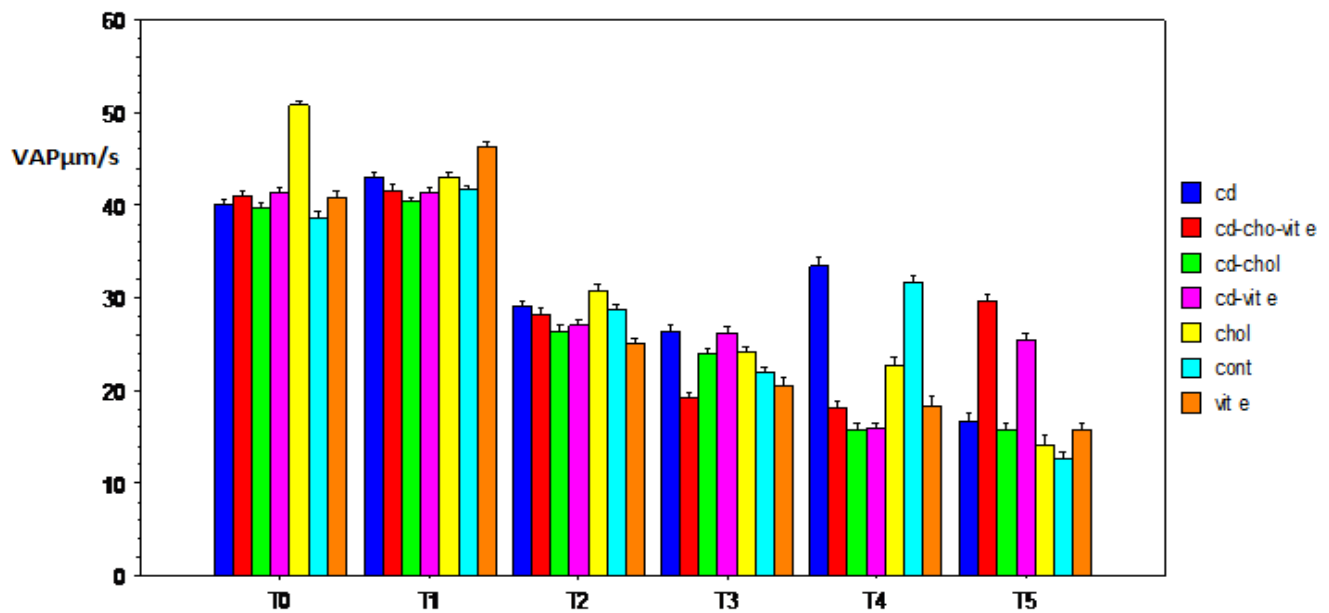


Figure10 :Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes en fonction du temps (de T0= après la collecte, T1=1,5 h, T2=3 h, T3=4,5h, T4=6h, T5=24h) après la collecte dans les sept milieux de conservation utilisés dans l'expérience

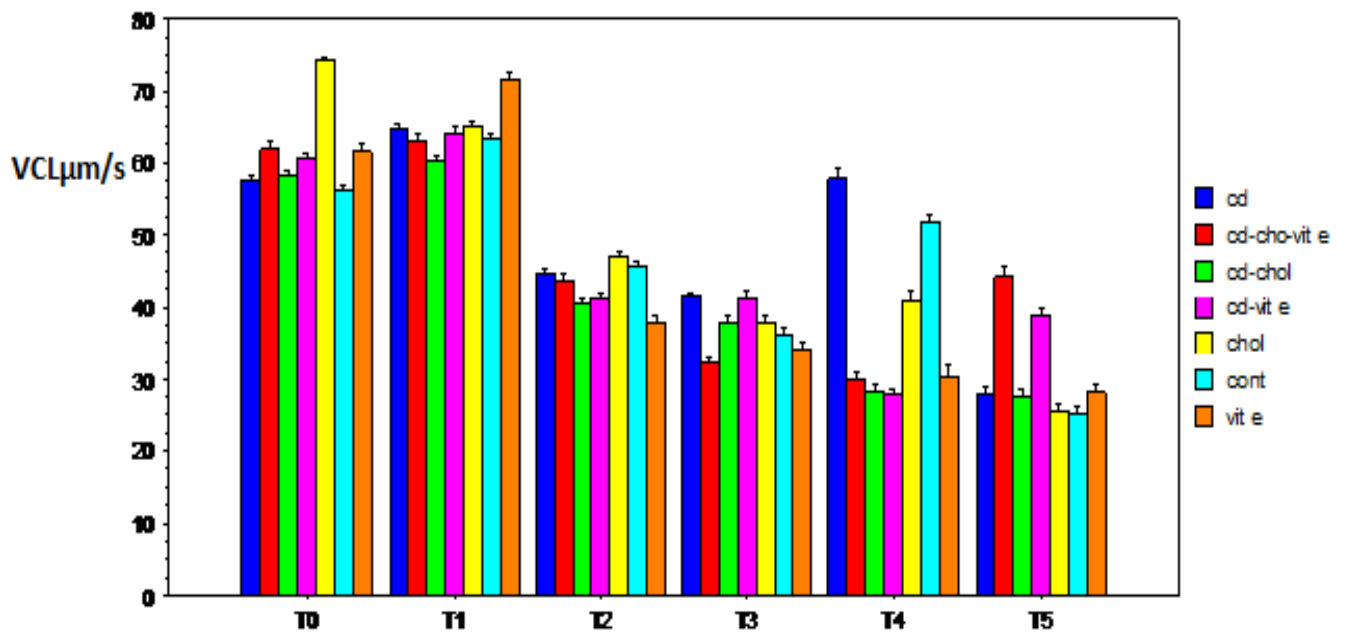


Figure11 : Histogramme montrant la variation de la vitesse de mobilité (VCL) des spermatozoïdes en fonction du temps (de T0= après la collecte, T1=1,5 h, T2=3 h, T3=4,5h, T4=6h, T5=24h) après la collecte dans les sept milieux de conservation utilisés dans l'expérience.

Conclusion

Conclusion :

Ces dernières années, avec les progrès concernant l'insémination artificielle et les techniques de conservation du sperme, la reproduction aviaire a connu un essor considérable. Cependant, les résultats de conservation tant en congélation qu'en réfrigération restent encore insatisfaisants. La congélation particulièrement nécessite un équipement lourd et spécifique. C'est pourquoi les structures ne disposant pas d'un tel matériel se sont tournées vers la conservation par réfrigération. C'est justement dans ce contexte que s'inscrit notre travail avec comme objectif l'amélioration de la réfrigération du sperme du coq. Nous avons développé de nouveaux milieux en considérant trois composantes, la vitamine E, le cholestérol et les cyclodextrines. Le cholestérol pour solidifier la membrane cytoplasmique, la vitamine E pour lutter contre le stress oxydatif et les cyclodextrines pour augmenter la solubilité des deux premières molécules. Les résultats obtenus sont satisfaisants et permettent de conclure, que l'association cholestérol, vitamine E et cyclodextrines est la formule la plus intéressante signifiant une action complémentaire de ces trois facteurs.

Dans l'avenir, il serait intéressant de compléter les essais réalisés jusque-là par des tests de fertilités in-vivo ou bien in-vitro afin de confirmer le statut du sperme congelé à 4°C.

Référence Bibliographiques

A

- ✓ **Agarwal Ashok et Sekhone Lucky., 2010.** The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 13(4), pp217-225.
- ✓ **Andreea Hortanse Anghel, Stela Zamfirescu, D. Coprean et Dorina Nadolu., 2011.** Antioxidant additives on cytological parameters of refrigerated ram semen. *Seria Zootehnie*. Vol. 53pp 294-298.
- ✓ **Atiq Naima., Nemat Ullah., S. M. H. Andrabi et Shamim Akhter., 2011.** Comparison of Photometer with Improved Neubauer Hemocytometer and Makler Counting Chamber for Sperm Concentration Measurement in Cattle. *Pak Vet J*. 31(1). pp83-84.
- ✓ **AX. R. L et J. R. Lodge., 1975.** Rooster Spermatozoa Motility, Forward Progression, and Fertility after Storage at 25, 5, or -196°C in Various Extenders. *Cryobiology*. 12.ppp 93-97

B

- ✓ **Badade Z. G. et P. M. Samant., 2011.** Role of Oxidative Stress in Male Infertility. *J Biomed Sci and Res.*, Vol 3 (2), PP 385-391.
- ✓ **Bagley LG., 1995.** Risks and Benefits of the stud farm: Bakst MR Wishart GJ Eds, Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp176–183.
- ✓ **Bakst MR et Cecil HC.,1997.** Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. Sperm viability. I. Nigrosin/ eosin stain for determining live/dead and abnormal sperm counts. The Poultry Science Association, Inc., Savoy, Illinois, pp 29–34.
- ✓ **Balédent F., 2000.,** Les cellules hématimètres, *Développement et Santé*, n°148.
- ✓ **Bansal Amrit Kaur et G. S. Bilaspuri., 2011.** Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International* Volume 2011, Article 686137, p7 .
- ✓ **Berlett. Barbara S. et Earl R. Stadtman., 1997.,** Protein Oxidation in Aging, *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol.272,No.33.,pp.20313-20316.
- ✓ **Bilgili SF, Renden JA et KJ Sexton.,1985.** The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. *Poultry Science* (64) 2358–2361.

Référence Bibliographiques

- ✓ **Blanco. J.M., D.E. Wildt ., U. Hoñfle ., W. Voelker et A.M. Donoghue., 2009.** Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endonerd avian species .*Theriogenology* . 200-213.
- ✓ **Blesbois .E, I. Grasseau et J.C. Blum., 1998.** Effects Of Vitamin E On Fowl Semen Storage At 4°C. *Theriogenology* 39.pp771-779.
- ✓ **Blesbois E et JP Brillard., 2005.** Reproduction des animaux d'élevage. Deuxième édition. Chap 15, p358-369.
- ✓ **Brillard. J.P., 2003.** Practical aspects of fertility in poultry. words *Poultry Journal*, Vol. 59. pp441-446.

C

- ✓ **Christensen VL., 1995:** Diluents, dilution, and storage of Poultry semen for six hours. In: Bakst MR Wishart GJ Eds, Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 176–183.
- ✓ **Cillard Josiane et Pierre Cillard., 2006.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL VOL.* 13 N° 1.pp28-29.
- ✓ **Cocuzza Marcello, Suresh C. Sikka, Kelly S. Athayde et Ashok Agarwal., 2007.** Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. *International Braz J Urol* Vol. 33 (5): pp603-621,
- ✓ **Curtay.J-P et Robin J-M., 2000.** Intérêt des complexes antioxydants, centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.pp 33.

D

- ✓ **de Reviere. M., 1977.** Le développement testiculaire chez le coq V.- Action de variations progressives de la durée quotidiennes d'éclairément. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 17(2). pp179- 186.
- ✓ **de Reviere. M., 1996.** Photopériodisme, développement testiculaire et production de spermatozoïdes chez les oiseaux domestiques. *INRA. Prod, Anim.* 9 (1).pp35 – 44.
- ✓ **Dean P. Jones., 2008.** Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849–C868.

Référence Bibliographiques

- ✓ **Decuadro-Hansen. G.,** 2004. La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32.pp 887–893.
- ✓ **Donoghue. A.M et G.J. Wishart.,** 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62. pp213–232.

E

- ✓ **Etches RJ, 1995 :** Reproduction in Poultry. Chap 12, pp298-307.

G

- ✓ **Gutteridge John M.C.,1995.,** Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of tissue damage *Clin. Chem.* 41/12, pp1819-1828

L

- ✓ **Lake PE 1978.** The principles and practice of semen collection and preservation in birds. In: Symposium of Zoological Society, London,p p. 43.
- ✓ **Lake. P. E et O. Ravie., 1981.** An attempt to improve the fertility of stored fowl semen with certain additives in a basic diluent. *Reprod. Nutr. Dévelop.*21 (6B). pp1077-1084.
- ✓ **Lake. P. E., O .Ravie et D. Waddington., 1985.** Some Effects of the composition of inseminated semen and the site of its eposition on fertility in *Gallus domesticus..* *Animal Reproduction Science.* 9.pp 273- 284.
- ✓ **Łukaszewicz.,. E., 2000.** Effects of Semene Filtration And Dilution Rate on Morphologie and Firtility of Frozen Gander Spermatozoa. *Theriogenology.* 55. pp181-1829.

M

- ✓ **Magistrini. M., 1999.** L'insémination artificielle chez les équins. INRA. Haras. pp 347-349.

Référence Bibliographiques

- ✓ **Mahmoud AM, Deporter B, Piens N et FH Comhaire.,1997.** The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril.* 68:pp 340-345.

- ✓ **Ménézo.Y, F. Entezami , I. Lichtblau , M. Cohen ,S. Belloc , M. Brack., 2012.** Stress oxydant et fertilité : fausses évidences et mauvaises recettes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 40 :pp 787–796
- ✓ **Mustafa Numan Bucak , Ahmet Atessahin , Abdurrauf Yuce., 2008.** Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research* 75 ,pp128–134.

P

- ✓ **Partyka Agnieszka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski., 2011.** Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis*) semen. *Theriogenology* 76. pp843–850.
- ✓ **Partyka Agnieszka., Ewa Łukaszewicz., Wojciech Nizanski., 2012.** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77, pp1497–1504.
- ✓ **Pichereau Alexandra., 2012.** La technique de prélèvement et d'insémination artificielle chez les oiseaux. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort, Thèse de doctorat. pp 11.
- ✓ **Pons-Rejraji. H , B. Sion , F. Saez , F. Brugnon,L. Janny etG. Grizard., 2009.** Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37 ,pp 529–535.

R

- ✓ **Riaz A, Aleem M, Ijaz A, Saeed MA et A Latif ., 2004.** Effect of collection frequency on the semen quality of broiler breeder. *Br Poult Sci.* Dec;45(6):pp823-7.

Référence Bibliographiques

S

- ✓ **Santiago-Moreno Julián , Cristina Castaño , Adolfo Toledano-Díaz , Miguel A. Coloma ,Antonio López-Sebastián , María T. Prieto et Jose L. Campo., 2012.** Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology* 65.pp 230–234
- ✓ **Sauveur, B et M. de Revires. 1988.** Reproduction des volailles et production des œufs. INRA Edition, Paris : pp449.
- ✓ **Surai.Peter F., PhD., DSc., 2007.** Natural Antioxidants in poultry Nutrition: new developments susceptibility to peroxidation. *Theriogenology* 66 , pp877–886.

T

- ✓ **Trippel EA, 2003 .**Estimation of male reproductive success of marines fishes. *J Northw. Atl. Fish. Sci.* Vol. 33, 81-113.

U

- ✓ **Uttara Bayani, Ajay V. Singh, Paolo Zamboni et R.T. Mahajan., 2009.** Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*,7, 65-74.Vol. 272, No. 33, pp. 20313–20316.

Y

- ✓ **Youssef Hala., 2008.** L'obésité de l'adolescent Libanais : étude épidémiologique et effets d'un exercice aigu et chronique sur le stress oxydant d'adolescentes en surpoids. Thèse de doctorat.pp28-30.

W

- ✓ **Wilson-Leedy JG et Rolf L. Ingermann ., 2006.** Computer analyseur de sperme assisté. *Theriogenology*.67. pp666-669.

Z

Référence Bibliographiques

- ✓ **Zaniboni Luisa, Rita Rizzi et Silvia Cerolini ., 2005.** Combined effect of DHA and a-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. Theriogenology. 34,9767-9772.

Résumé :

L'objectif de cette étude était d'analyser l'effet de différents traitements (CD, Chol, Vit E, CD-Chol, CD-Vit E, CD-Chol-Vit E) sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes du coq après réfrigération. Après une conservation in vitro à 4°C pendant 24 heures, nous avons observé que le meilleur milieu de stockage est celui CD-Cho-Vit E. Ce résultat est rendu possible par une action complémentaire de trois facteurs : le cholestérol qui a renforcé la solidité de la membrane cytoplasmique, la vitamine E qui a lutté contre le stress oxydatif et la cyclodextrine qui leur a permis à ces deux molécules d'exprimer leur potentiel en augmentant leur solubilité.

Mots- clés : coq, Sperme , Réfrigération.