

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
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 Reproduction et  
Biotechnologies Animales

### Thème : Optimisation de la conservation par congélation du sperme aviaire



Soutenu le : 13/06/2013.

Réalisé par :

-MAHDID Souad.

-YAHIAOUI Karima.

Promoteur : Mr. TOUAZI L.

Co-Promoteur : Mr. IGUER-OUADA M.

Membres du jury :

Président : Mr. MOULAI R.

Examineur : Mr. NAIT MOULOUD M.

Examinatrice : Mme Belhadj-Kebbi M.

Année universitaire : 2012/2013

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
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 Reproduction et  
Biotechnologies Animales

### Thème : Optimisation de la conservation par congélation du sperme aviaire



Soutenu le : 13/06/2013.

Réalisé par :

-MAHDID Souad.

-YAHIAOUI Karima.

Promoteur : Mr. TOUAZI L.

Co-Promoteur : Mr. IGUER-OUADA M.

Membres du jury :

Président : Mr. MOULAI R.

Examineur : Mr. NAIT MOULOUD M.

Examinatrice : Mme Belhadj-Kebbi M.

Année universitaire : 2012/2013




« *Remerciements* »

*Avant de commencer, nous tenons à remercier le **BON DIEU**, le tout puissant de nous avoir guidé sur la bonne voie : du savoir et de la lumière.*

*Nous présentons nos remerciements au professeur **Iguerouada M**, Pour tous ses conseils, Pour les précieuses informations qu'il nous a fournies durant notre formation.*

*A notre promoteur **Touazi L**, qui nous a pris en charge et qui nous a orientées durant la réalisation de ce travail.*

*Nos adressons nous remerciements aux membres du jury et à tous nos professeurs de la spécialité **Reproduction et Biotechnologies Animales**.*





## *Dédicaces*

*J'exprime mon profond respect et ma sincère gratitude aux êtres qui me sont les plus chers, je leur offre ce modeste travail.*

*À mes très chers parents envers qui je garderai toujours le souvenir ému de leur bienveillance à mon égard et veillerai sans cesse à me montrer digne. Pour leur soutien, encouragement et surtout leur patience tout au long de mes études*

*«QUE DIEU LES PROTEGE ET LES GARDE POUR NOUS »*

*À mes frère : **Faouzi, Amine***

*À ma sœur : **Saloua***

*À tous mes cousins , cousines et mes tantes : **Farida, Mima , Layla et lala mira***

*À toutes mes amies, surtout **Souad, Sabrina et khoukha***

*À mes grands parents soit **maternels** ou **paternels** et à toute ma famille de proche et de lion*

*À **Djamel** mon futur mari qui m'a toujours encourager et soutenu dans les moments difficiles*

*À mon binôme **Karima** la personne dont j'ai partagée la réalisation de ce travail.*

*Enfin*

*«À toute la promotion de 2<sup>ième</sup> année MASTER. RBA 2013. »*

***Souad***







## *Dédicaces*

*J'exprime mon profond respect et ma sincère gratitude aux êtres qui me sont les plus chers, je leur offre ce modeste travail .*

*À mes parents,*

*Sans qui rien n'aurait été possible, parce que je les dois tout : de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études, d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. J'espère que vous serez fière de moi.*

*À ma sœur,*

*Parce que tu es toujours disponible pour moi et toujours tellement gentille..... Je te souhaite tout le bonheur du monde.*

*À mes 2 grands-mères, Parce qu'elles ont souvent pensé à moi durant toutes ces années.*

*À mes 2 frères Baby et Brahim pour leurs encouragements.*

*À mes tantes, mes oncles, mon cousin et ma cousine pour leurs encouragements.*

*À Souad, Sabrina et khoukha, Pour la belle amitié, la bonne humeur, et tous les bons moments passés ensemble à la fac.*

*À mon binôme Souad la personne dont j'ai partagée la réalisation de ce travail*

*Enfin*

*À toute la promotion de 2<sup>ième</sup> année MASTER. RBA 2013.*

*Karima*



# Sommaire

# Sommaire

---

## Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des illustrations	
Introduction .....	1
<b>1<sup>ère</sup> partie : revue de la littérature</b>	
Historique du sperme .....	3
<b>I) Particularité de l'appareil reproducteur mâle .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1) Anatomie de l'appareil génital mâle .....</b>	<b>3</b>
I-1-1) Les testicules .....	3
I-1-2) Les voies déférentes .....	4
I-1-3) L'appareil copulateur .....	4
<b>II) caractéristiques du sperme aviaire .....</b>	<b>5</b>
II-1) le plasma séminal .....	5
II-2) le spermatozoïde .....	5
A) Particularités du spermatozoïde aviaire.....	5
B) la membrane plasmique des spermatozoïdes.....	7
<b>II-3) caractéristiques de la semence.....</b>	<b>8</b>
II-3-1) Le volume du sperme .....	8
II-3-2) la couleur du sperme .....	8
II-3-3) La concentration .....	8
II-3-4) pH du sperme .....	9
II-3-5) la mobilité .....	9
II-3-6) La viabilité.....	10
II-4) La récolte de la semence:.....	11
II-4-1) Méthode de récolte de sperme.....	11
II-4-1-1) Le massage abdominal .....	11
II-4-1-2) Electro-éjaculation.....	11
II-4-1-3) Copulation sur boute-en-train.....	12

## Sommaire

---

<b>III)- la conservation des spermatozoïdes aviaires .....</b>	<b>12</b>
III-1) La conservation de sperme à l'état frais « la réfrigération » .....	13
III-2) La cryoconservation du sperme « la congélation » .....	13
III-2-1) Description de la technique .....	13
III-2-2) Dilution du sperme.....	14
a) Nature des dilueurs.....	14
b) Dilution de sperme frais avant congélation.....	17
III-2-3) Les cryoprotecteurs.....	17
a) Le glycérol.....	17
b) Le diméthylsulfoxyde (DMSO) .....	18
c) Diméthylacétamide (DMA) .....	18
III-3) les phases de congélation:.....	18
III-3-1) La phase d'équilibration.....	18
III-3-2) Le conditionnement.....	18
III-3-3) La congélation.....	19
a) Influence de la vitesse de refroidissement.....	19
b) Influence de la position des paillettes.....	19
III-3-4) La décongélation.....	19
<b>IV - Les cyclodextrines.....</b>	<b>20</b>
IV- 1) Structure et propriétés des cyclodextrines .....	20
IV- 2) Inclusion – Compléxation.....	21
IV 2-1) Préparation des complexes d'inclusion:.....	21
a) Par la méthode de Co-précipitation .....	21
b) Par la méthode de pétrissage (kneading) .....	21
IV -3) Les complexes déjà utilisés dans la conservation du sperme et les résultats obtenus chez différents animaux .....	22
<b>V) Le stress oxydatif.....</b>	<b>22</b>
V-1) Les Radicaux libres .....	23
V-1-1) Sources de ROS dans le sperme .....	23
V-2) La peroxydation des lipidiques .....	23
V-3) Les antioxydants .....	23



# Sommaire

---

## 2<sup>ième</sup> Partie : Matériels et méthodes

<b>I) Matériels et méthodes</b> .....	25
I-1) Matériels biologique utilisés .....	25
I-2) La récolte de la semence .....	25
I-3) Analyse de la semence .....	26
I-3-1) Matériels utilisés .....	26
I-3-2) Méthode d'analyse .....	26
a)Le volume.....	26
b) La mobilité massale.....	27
c)La mobilité progressive.....	27
d) La concentration.....	27
e) Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes .....	28
I-4) Congélation du sperme du coq .....	30
I-4-1) L'objectif .....	30
I-4-2) Matériels utilisés .....	30
I-4-3) Les milieux de congélation .....	31
I-4-4) Préparation des échantillons.....	32
I-4-5) Protocole de congélation .....	32
I-4-6) Protocole de décongélation .....	33
I-5) Analyse statistiques.....	33
<b>II) Résultats et Discussion</b> .....	34
II-1) Les caractéristiques du sperme frais .....	34
II-1-1) Caractéristiques macroscopiques .....	34 34
a) Le volume .....	34 45
b) La couleur .....	34
II-1-2) Caractéristiques microscopique .....	34
a)La concentration .....	34
b) La mobilité .....	34
II-2) Les caractéristique du sperme après congélation- décongélation .....	35
<b>Conclusion</b> .....	43
<b>Références bibliographie</b>	
<b>Annexes</b>	

# Liste des abréviations

---

## La liste d'abréviations

<b>A°</b>	Angstrom
<b>AGPI</b>	acide gras polyinsaturé
<b>ALH</b>	Amplitude of lateral head displacement
<b>α</b>	alpha
<b>BCF</b>	Beat Cross Frequency
<b>BPSE</b>	Beltsville poultry semen extender décrit par ( Sexton ,1977).
<b>β</b>	Béta
<b>γ</b>	gamma
<b>c</b>	Carbone
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>CAT</b>	catalase
<b>CD</b>	Cyclodextrine
<b>CASA</b>	Computer assisted sperm analysis
<b>Chol</b>	cholestérol
<b>CLC</b>	cholesterol loaded cyclodextrin
<b>cm</b>	centimètre
<b>DMA</b>	Diméthylacétamide
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>EK</b>	dilueur décrit par Lukaszewiz ( 2008)
<b>FEB</b>	dilueur décrit par Tselutin et al, (1995)
<b>g</b>	gramme
<b>GPX</b>	glutathion peroxydase,
<b>HDL</b>	high –density lipoprotein
<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Superoxide
<b>IA</b>	insémination artificielle

## Liste des abréviations

---

<b>Kg</b>	kilogramme
<b>L</b>	Litre
<b>LPO</b>	peroxydation lipidique
<b>Lake extender</b>	dilueur décrit par Lake et Ravie,(1981).
<b>mg</b>	milligramme
<b>ml</b>	millilitre
<b>mm</b>	millimètre
<b>mm<sup>3</sup></b>	millimètre cube
<b>mole</b>	mole
<b>mmol</b>	Millimole
<b>mOsmol</b>	Milliosmol
<b>OS</b>	stresse oxydatif
<b>PROG (PMS)</b>	Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>sec</b>	second
<b>SOD</b>	superoxide dismutase
<b>SPZ</b>	spermatozoïdes
<b>SCA</b>	sperm class analyze
<b>SyBr14</b>	Colorant fluorescent
<b>µm</b>	micromètre
<b>µl</b>	microlitre
<b>VAP</b>	Average path velocity
<b>VCL</b>	Curvilinear velocity
<b>VHDL</b>	vesicle high –density lipoprotein
<b>Vit E</b>	Vitamine E
<b>VSL</b>	Straight-line velocity

## Liste des illustrations

---

### Liste des Figures :

N°	Titre	Page
1	Organe reproducteur des volailles	04
2	Schéma de l'ultra structure d'un spermatozoïde de coq.	07
3	Photos des spermatozoïdes de coq colorés avec l'éosine-nigrosine au microscope optique.	10
4	Structures tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles (a, b, et g).	20
5	Photo des coqs de type chair Hubbard F15.	26
6	Matériels d'analyse du sperme.	
7	Photo d'analyseur informatique de sperme.	28
8	Schéma représentant les différents types de vitesse de mobilité du spermatozoïde	29
9	Matériels de congélation du sperme.	30
10	Histogramme montrant les pourcentages des spermatozoïdes statique après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD-vitE ,chol,complexe(CD-vit E-chol),control et vit E) dans le dilueur Tris.	36
11	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VAP des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dilués avec le tris.	36
12	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VSL des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.	37

## Liste des illustrations

13	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire .	37
14	Histogramme montrant les pourcentages des spermatozoïdes statiques après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD-vitE , chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le dilueur Tris.	38
15	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VSL) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dilués dans le tris.	39
16	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dilués dans le tris.	40
17	Histogramme montrant le pourcentage des spermatozoïdes statiques après la décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD-vitE, chol,complexe(CD-vit E-chol) ,control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.	41
18	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité à ligne directe (VSL) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD , CD-chol ,CD- vit E ,chol,complexe(CD-vit E-chol),control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.	42
19	Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.	42



## Liste des illustrations

---

### Liste des tableaux :

N°	Titre	Page
01	La composition de différents dilueurs de sperme.	16
02	Mécanisme d'action d'antioxydant non enzymatique.	24
03	Détermination de la note de motilité massale de la semence.	27

# Introduction

# Introduction

---

## Introduction

La conservation à basse température et la congélation des spermatozoïdes sont des méthodes privilégiées pour la diffusion du progrès génétique. La congélation permet en outre la conservation *ex situ* de la diversité génétique des oiseaux, ainsi que le désaisonnement de la reproduction favorisant la gestion de la production des géniteurs. La conservation de la diversité génétique reste aujourd'hui un challenge pour la durabilité de l'approvisionnement en ressources animales pour l'homme et la préservation de la biodiversité. Aujourd'hui, la moitié des volailles domestiques sont considérées comme menacées (**Blesbois et al, 2007**).

La conservation *ex situ* est un outil important dans la sauvegarde de la diversité génétique, surtout qu'un nombre élevée d'espèces, races et lignées sont menacés et les récents épisodes de grippe aviaires ont souligné le besoin urgent de la gestion *ex situ* des ressources génétiques. La congélation d'embryon n'étant pas encore au point chez les oiseaux, la cryoconservation du sperme est la seule méthode efficace actuellement disponible. Cependant, en raison de la variabilité des résultats obtenus, cette pratique n'est pas courante dans les élevages de volaille (**Blesbois et al, 2007**).

La cryoconservation du sperme aviaire est une biotechnologie très ancienne, nombreux sont les scientifiques qui se sont intéressés à la problématique de la congélation du sperme aviaire depuis déjà plus d'un siècle. Les premiers œufs fertiles issus de l'insémination artificielle à partir de la semence réfrigérée à été rapporté par Shaffner et al en 1940, sans l'obtention toutefois de poussins viables. C'est qu'à partir de 1949 avec la description de l'effet protecteur du glycérol sur les spermatozoïdes, que nombre d'équipes de recherches se sont intéressés à la cryoconservation du sperme du coq (**Hammerstedt, 1995**).

A présent, malgré les avancées réalisées dans le domaine de la cryoconservation, le sperme aviaires présente toujours des difficultés à la congélation qui est du aux caractéristiques physiologiques du spermatozoïde du coq qui pourraient influencer sur leurs conservation. Plusieurs fonctions cellulaires sont affectées par la congélation. Les lipides membranaires sont la cible de radicaux libres libérés par les cellules altérées, conduisant au phénomène de peroxydation. Les conséquences des altérations membranaires sont multiples et conduisent notamment à des dysfonctionnements dans l'activation de la mobilité ou dans la réaction acrosomique et la fécondation (**Labbé et al, 2003**).

## Introduction

---

C'est dans une logique d'amélioration des techniques de congélation du sperme aviaire, que s'inscrit notre travail réalisé au niveau du laboratoire de biologie animales à l'université de Bejaïa (du 14 avril au 02 mai), qui a comme objectif final l'amélioration des techniques employées jusque-là pour le sperme du coq, cela par la limitation des phénomènes oxydatifs qui surviennent lors de la congélation-décongélation. Notre approche a été de développer des milieux de conservation avec un pouvoir antioxydant important. Sachant que le spermatozoïde du coq présente une vulnérabilité à la congélation à cause de la composition en lipides de sa membrane et de la fluidité de cette dernière, nous avons agit sur deux niveaux complémentaire 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 au 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.

1<sup>ère</sup> partie

Revue de la littérature



**Historique du sperme :**

Le sperme a été découvert par Anton Van Leeuwenhoek en 1677 avec un de ses élèves, Johan Hamm. Il a été découvert par l'utilisation d'une loupe. La première recherche scientifique dans l'insémination artificielle des animaux domestiques était menée par le physiologiste italien, L. Spallanzani, en 1780. (**Fagbohun, Suliat Oluwatosin, 2006**)

La conservation du sperme a été un sujet d'intérêt depuis Spallanzani, de nombreuses tentatives de préserver les cellules spermatiques ont été faites chez différentes espèces animales. Luyet et Hodapp en 1938 ont obtenu un succès dans la congélation des spermatozoïdes de grenouille. Janel en 1938 a observé certaines cellules mobiles après décongélation du sperme, qui avait été gelées en tubes de verre à moins -79, -196 et -269 °C. Il a suggéré que la vitesse de refroidissement pourrait être importante. Un point de repère dans le domaine de l'insémination artificielle a été créé en 1949, lorsque Polge a découvert une méthode pratique pour la préservation à long terme de la semence de certaines espèces par congélation à la température de -790 C à l'aide de glace. (**Tajima, 2013**).

**I) Particularité de l'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 à la variation saisonnière et donc à la photopériode. Celle-ci influence sur le développement des gonades. L'appareil génital mâle est organisé en trois unités morphologiques et fonctionnelles qui sont les testicules, les voies déférentes et l'appareil copulateur. Un mâle sexuellement actif peut produire jusqu'à  $3 \times 10^9$  SPZ par jour, Cette production intense est assurée par le testicule qui assure la fonction de spermatogénèse mais aussi la fonction endocrine (**Etches, 1995**).

**I-1) Anatomie de l'appareil génital mâle :****I-1-1) Les testicules :**

Les testicules des oiseaux sont situés dans la cavité abdominale, en position cardio-ventriculaire. La forme et le volume des testicules varient selon l'espèce, la saison de reproduction, la génétique et l'alimentation. Chaque testicule est enveloppé d'une tunique protectrice, l'albuginé relie l'appareil copulateur par un épидидyme peu différencié, et

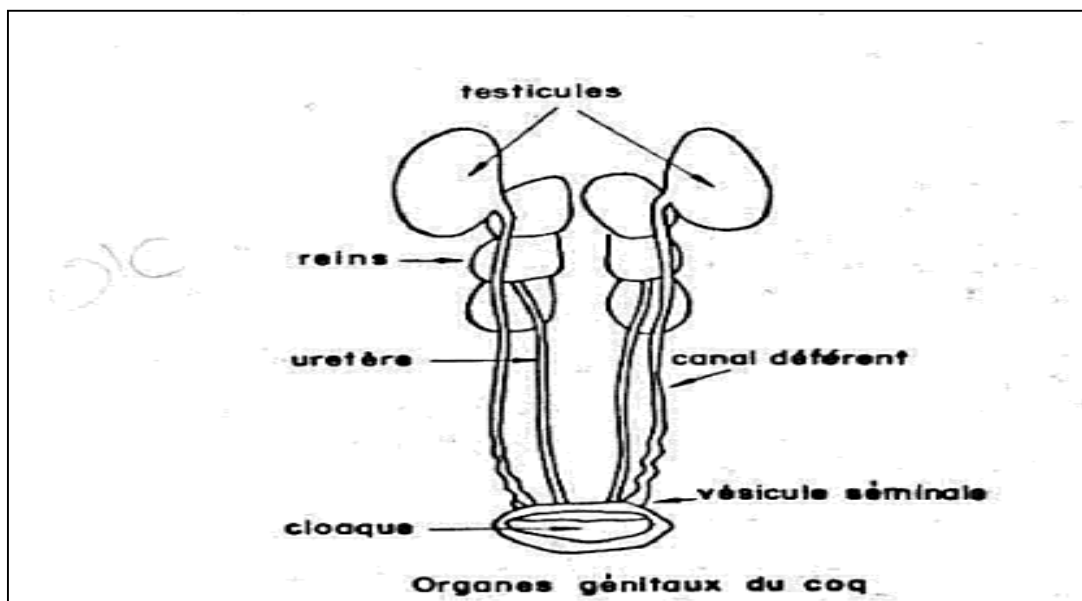
prolongé par un canal déférent dépourvu de glandes annexes (prostate, vésicule séminale, etc). (Couailler, 2005).

**I-1-2) Les voies déférentes :**

Les canaux déférents sont les principaux vecteurs de système reproducteur masculin. Représentent les moyens d'émission du sperme, et sont en contact avec le testicule à travers l'épididyme. Leur fonction est multiple: la maturation complète des gamètes mâles, et leur stockage jusqu' au moment de l'éjaculation. (Couailler, 2005).

**I-1-3) L'appareil copulateur :**

L'organe copulateur chez les oiseaux de forme extrêmement variable selon les espèces : très développé chez les anatidés (canard, oies) chez lesquelles il peut mesurer jusqu'à 15 à 20 cm, il se réduit à une simple « gouttière » d'environ de 2cm chez la pintade et est pratiquement inexistant chez le coq ou le dindon (Blesbois et Brillard, 2005).



**Figure 1 : Organe reproducteur des volailles (Blaise Mpupu Lutondo, 2012).**

**II) caractéristiques du sperme aviaires :****II-1-) 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  $\text{NA}^+$ , 20-50 mmol de  $\text{Cl}^-$ ) 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 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**).

**II-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  $\mu\text{m}$ , diamètre de 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  selon l'espèce) et mesurant au total 75 à 90  $\mu\text{m}$  (**Blesbois et Brillard, 2005**).

Il ya de grandes différences entre le sperme des mammifères et celui des oiseaux ce qui justifie le succès de la conservation in vitro du sperme des mammifères. La structure, la chimie et le métabolisme font que les spermatozoïdes d'oiseaux soient très sensibles au stress osmotique et mécanique, pour lesquelles un nombre élevé de cellules subit de graves dommages au cours des procédures de congélation /décongélation (**Cassinelli, 2011**)

**A) Particularités du spermatozoïde aviaire:****a) la tête :**

La tête du spermatozoïde aviaire présente certaine particularités physiologiques. De forme cylindrique, d'une largeur de 0.5  $\mu\text{m}$  approximativement, avec un volume cytoplasmique assez réduit et donc une capacité de déplacement réduite des cryoprotectants à l'intérieur de la tête du spermatozoïde qui font du sperme aviaire l'une des espèces les plus sensibles au processus de congélation (**Donoghue et Wishart ,2000**). La tête du spermatozoïde se compose d'un acrosome et d'un noyau.

**L'acrosome** est de forme conique et assez petit (2,5  $\mu\text{m}$  de long, 0,5 de large chez le coq). Il contient la vésicule acrosomique, structure dérivée de l'appareil de Golgi qui fonctionne comme un réservoir de calcium et contient plusieurs enzymes protéolytiques utiles au moment de la fécondation.

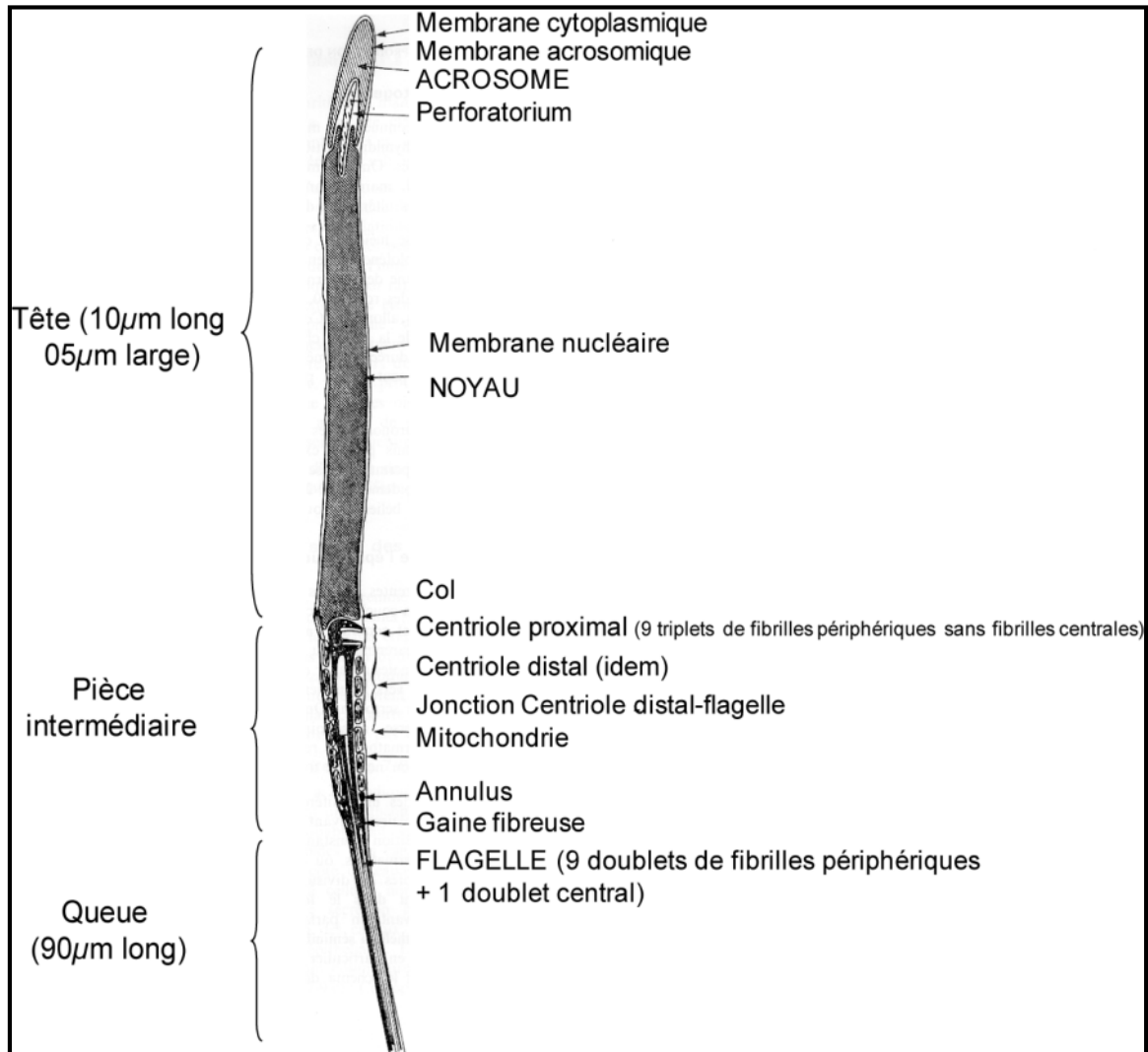
**Le noyau** est de forme filiforme, d'une taille de 0,5x6  $\mu\text{m}$  chez le coq, il est très condensé et entouré d'une double membrane nucléaire. Cette condensation extrême constitue une garantie pour la protection du noyau avant qu'il ne soit intégré à l'ovocyte. **(Blesbois, 2011).**

**b) La pièce intermédiaire :**

Mesure (5-6  $\mu\text{m}$  de long chez le coq) est située juste en dessous du noyau. Elle est composée d'un **centriole proximal**, d'un **centriole distal** très allongé entouré d'une gaine mitochondriale, l'ensemble permettant aux gamètes sans réserve énergétique d'assurer le métabolisme d'entretien et surtout la motilité du flagelle, **(Blesbois, 2011).**

**c) Le flagelle :**

Constitue la partie la plus longue du spermatozoïde (70 à 90  $\mu\text{m}$  de long chez le coq **(De Reviers, 1988)**. Le flagelle est l'élément moteur du spermatozoïde qui lui permet d'atteindre l'ovocyte et de pénétrer dans celui-ci. Il prend naissance au niveau du centriole distal de la pièce intermédiaire à laquelle sont rattachés les deux filaments centraux du complexe axonémal **(Blesbois, 2011).**



**Figure 2** : Schéma de l'ultra structure d'un spermatozoïde de coq (d'après de **Reviere, 1988**).

### **B) la membrane plasmique des spermatozoïdes aviaires :**

La composition lipidique du sperme de poulet est un élément important qui détermine la qualité et la capacité de fertilisation du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes de Poulet sont caractérisés par un niveau élevé d'acides gras n - 6 dans leur phospholipides, Cependant, le fort degré d'acide gras polyinsaturés (AGPI) typique des lipides de sperme rend ces gamètes très sensibles à la peroxydation lipidique, avec le risque conséquent de dommages aux structures cellulaires .Hammerstedt en 1993 a rapporté que la composition de la membrane des spermatozoïdes en lipide est un important



déterminant de la motilité, de l'intégrité de la membrane des spermatozoïdes, viabilité globale, sensibilité au froid et pouvoir fécondant. (**Hazim et Al-Daraji ,2012**).

La composition des membranes des spermatozoïdes n'est pas identique chez les différents espèces avicoles, les membranes des spermatozoïdes de la dinde contiennent des quantités importantes d'un acide gras (le C22 : 3n-9) qui n'existe pas chez le coq. (**Réviers Min Sauveur B ,1988**).

### **II-3) caractéristiques de la semence:**

#### **II-3-1) Le volume du sperme**

Le volume moyen de l'éjaculat du coq variait considérablement de 0,1 à 0,9 ml pour une moyenne de 0,35 ml pour les coqs reproducteurs de type chair (**Etches, 1995**). Il est important d'estimer les taux de dilutions puisque en pratique le volume de 50µl est la dose retenue pour l'insémination d'une poule. (**Etches, 1995**).

#### **II-3-2) la couleur du sperme :**

La couleur de la semence est généralement un indicateur de la densité de l'éjaculat. Le sperme du coq varie d'une suspension dense opaque à un liquide aqueux de couleur blanchâtre. La couleur peut être aussi un indicateur de contamination de la semence par les fientes où par les urines. (**Mosenene, 2009**).

#### **II-3-3) La concentration :**

La concentration en spermatozoïdes est définie comme le nombre de cellules par ml d'éjaculat. La concentration moyenne est de 3,5 milliards de spermatozoïdes par ml de sperme (**Mcgovern, 2002**), alors que peut varier considérablement chez les reproducteurs industriels de types chair (de 3 à 8 milliards par ml) (**Etches, 1995**).

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, Thoma et Malassez. Ces différentes cellules donnent des résultats assez fiables si la technique est effectuée soigneusement (**Mahmoud et al, 1997**). La cellule de Thoma est la plus utilisée, elle est composée de deux grilles, où chacune d'elle est divisée en 16 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 (**Trippel EA, 2003**)

#### **II-3-4) pH du sperme :**

Le pH du sperme aviaire varie légèrement parmi les différentes souches. La mobilité des spermatozoïdes est généralement élevée avec un pH compris entre 7,0 et 7,4 (**Mosenene, 2009**)

#### **II-3-5) la mobilité :**

L'évaluation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles par microscope est l'essai le plus utilisé au 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.

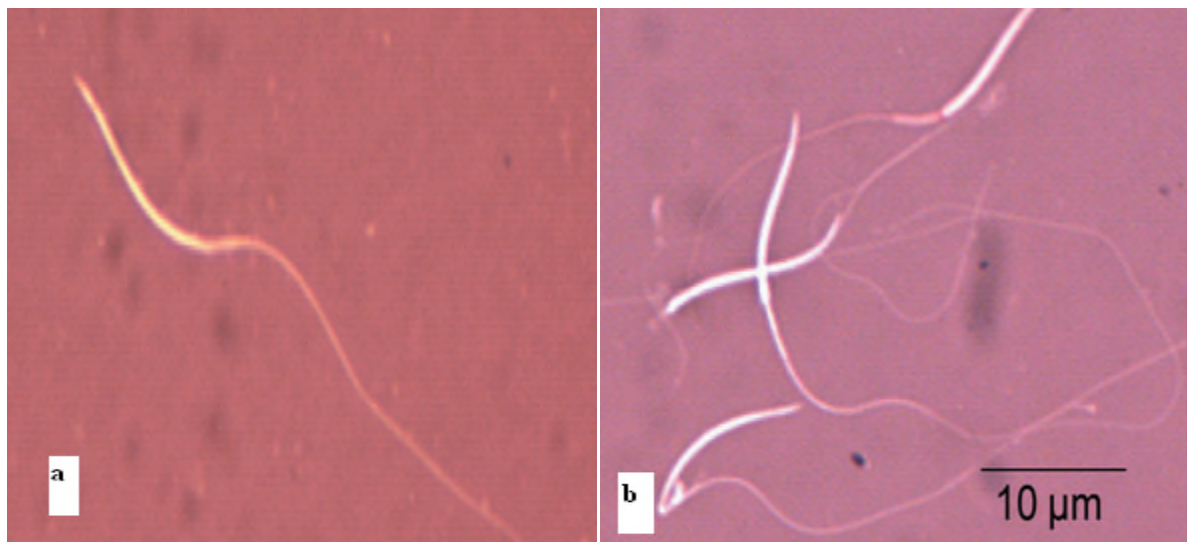
L'examen de la mobilité consiste en deux types d'évaluations, une estimation de la mobilité massale qui analyse la qualité générale de la mobilité avec une graduation allant de **0** (absence totale de mouvement) à **5** (mobilité vigoureuse), et l'évaluation individuelle des spermatozoïdes s'opère sous lamelle, elle consiste à déterminer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles ainsi que leur type de progression après une dilution préalable du sperme pur (**Etches, 1995**).

A présent, d'autres techniques d'évaluation objectives ont vu le jour dont la plus récente reste l'analyse informatisée après enregistrement préalable de vidéos de spermatozoïdes en mouvement.

**II-3-6) La viabilité**

L'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes est un critère indispensable 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**).

Récemment, de nouvelles méthodes utilisant des molécules fluorescentes ont vu le jour. Deux grandes catégories de molécules peuvent être distinguées, celles diffusant dans les cellules mortes et celles diffusant dans les cellules vivantes. Les colorations les plus couramment utilisées pour identifier les cellules mortes sont : les colorations au bisbenzimidazole comme l'Hoechst 33258 (**Hamori, 1980**), et le Propidium iodide (**Garner et al, 1995**). Pour ce qui est des molécules diffusant les cellules vivantes, on retrouve le SYBER-14 (**Garner et al, 1995**), sinon l'association SYBER-14 et Propidium iodide (**Chalah et Brillard, 1998**).



**a** : Spermatozoïde vivant et normal.

**b** : Spermatozoïdes anormaux, cassés ou morts.

**Figure 3** : Photos de spermatozoïdes de coq colorés avec l'éosine-nigrosine observés au microscope optique. (**Blesbois, 2011**).

**II-4) La récolte de la semence:**

La récolte du sperme peut avoir plusieurs objectifs: la réalisation d'une insémination artificielle, la conservation du sperme (cryoconservation ou réfrigération) ou l'évaluation de la qualité de la semence.

**II-4-1) Les méthodes de récolte du sperme aviaire:****II-4-1-1) Le massage dorso abdominal :**

La technique du massage dorso-abdominal a été utilisée pour la première fois chez la dinde en 1935 par Quinn et Burrows, et à présent, elle reste la plus utilisée et la plus facile à pratiquer (**Blanco et al, 2009**). Elle est couramment utilisée chez le coq, le dindon, le faisan et la pintade. L'absence de pénis développé chez ces espèces rend en effet difficile, voire impossible, la récolte de semence par vagin artificiel (**Sauveur, 1988**). Les mâles doivent être entraînés pendant plusieurs semaines avant de répondre correctement à la technique de massage. Cette période permet également de diminuer le stress de l'animal en l'accoutumant à la manœuvre pour limiter la contamination de la semence par les fientes. 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. Le sperme doit être indemne de toute souillure (**Pichereau, 2012**).

Il existe d'autres méthodes pour la collecte de sperme aviaire telle que :

**II-4-1-2) Electro-éjaculation:**

C'est une technique difficile à mettre en place en pratique d'élevage puisqu'elle est stressante (requiert l'anesthésie de l'animal). Elle a été appliquée chez les canards, les oies, les pigeons, les rapaces et chez une variété de psittacidés (**Pichereau, 2012**).

**II-4-1-3) Copulation sur boute-en-train:**

Chez les espèces domestiques, elle est utilisée en pratique chez le canard ou une vraie femelle est utilisée comme boute en train. La technique consiste à la maintenir sur une plateforme élevée de 10 centimètres en le tenant par les pattes dans la posture habituellement observée lors de l'accouplement. Si nécessaire, ses pattes pourront être liées pour maintenir la position. Le mâle en parade est alors amené en présence de la femelle. La récolte de la semence s'effectue ici par l'intermédiaire d'un vagin artificiel (**Pichereau, 2012**).

**III)- la conservation des spermatozoïdes aviaires :**

Depuis que Shaffner et al en 1941, ont montré que des œufs fécondés pouvaient être obtenus à partir du sperme congelé du coq, de très nombreux travaux ont été entrepris pour améliorer les techniques de conservation du sperme chez les oiseaux domestiques. Très vite, les travaux initiés chez le coq ont été étendus au dindon puis au canard, au jar et à la pintade. Aujourd'hui, l'utilisation des techniques de Conservation du sperme dépend à la fois de la qualité de la descendance obtenue, et du coût de cette descendance produite sur un marché très concurrentiel (**Blesbois et Seigneurin, 1997**). De ce fait, deux types de méthodes de conservation in vitro de sperme ont été mises au point:

- l'une principalement liée à la technologie de l'insémination artificielle (IA), c'est la conservation du sperme "à l'état liquide" au dessus de 0°C (temps < 24-48 h).
- l'autre, plus coûteuse est premièrement développée Dans l'optique de la conservation des gènes (plusieurs mois-années). Ils 'agit de la congélation. (**Blesbois et Seigneurin, 1997**).

**III-1) La conservation du sperme à l'état frais (la réfrigération) :**

La réfrigération est la première technique de préservation des semences mises en œuvre chez les espèces aviaires. La dilution et le refroidissement du sperme étaient les premières interventions utilisées pour ralentir les processus cataboliques des spermatozoïdes et par conséquent de prolonger leur durée de vie à la durée nécessaire aux opérateurs pour effectuer les différentes tâches prévues dans la pratique de l'insémination artificielle (IA). La réfrigération permet la conservation de la semence à l'état liquide pendant plusieurs heures (3-48 h) (**Douard et al, 2004**)

**III-2) La cryoconservation du sperme (la congélation) :**

La congélation des spermatozoïdes chez les oiseaux est une méthode privilégiée pour la conservation *ex situ* de la diversité génétique des oiseaux mais aussi le désaisonnement de la reproduction, favorisant la gestion de la production des géniteurs (**Labbé et al, 2003**). Chez les volailles, la variabilité de réponse à la congélation de la semence est considérable selon les espèces, et à l'intérieur d'une même espèce selon les lignées.

**III-2-1) Description de la technique :**

La cryoconservation permet de garder la semence *in vitro* pendant de longues périodes, pratiquement illimitées, et consistant dans le stockage dans l'azote liquide à -196 ° C. Elle contribue au ralentissement des phénomènes biologiques, des mouvements moléculaires et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées (**Guignot, 2000**).

Les points importants à prendre en considération au cours de la cryoconservation sont: le dilueur, le taux de dilution, le taux de refroidissement, le type du cryoprotecteur, les conditions et les procédures de congélation, et le choix de l'emballage lors de la congélation /décongélation. (**Graham et Wishart, 1995**).

### III-2-2) La dilution du sperme:

Les chercheurs travaillant sur la conservation de la semence ont très vite compris l'importance de **diluer** la semence dès sa récolte, sans quoi sa durée de vie va rester limitée à une heure ou deux (**Katila, 1997**), et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes va diminuer. Ceci est dû essentiellement à deux phénomènes:

- La compétition entre spermatozoïdes pour les éléments nutritifs, et une accumulation de métabolites nocifs lorsque la semence est très concentrés (le cas du sperme aviaire).
- Les effets délétères du **plasma séminal**, puisqu'il contient des minéraux et des substances organiques qui deviennent nocives pour la semence conservée in vitro. (**Richardson et al, 1987**).

#### a) La nature des dilueurs:

Le rôle du dilueur est de préserver la fécondance des spermatozoïdes, par préservation de leurs mobilités, tamponner le milieu, apporter les nutriments énergétiques essentiels et préparer les spermatozoïdes à la congélation. (**Siudzińska et Łukaszewicz1, 2008**). Il existe des caractéristiques de bases communes qu'on retrouve dans tous les dilueurs: les facteurs pour le maintien du pH, l'osmolarité et leur composition chimique (**Chrestensen et al, 1995**):

- **Le pH:** les spermatozoïdes aviaires peuvent tolérer un pH de 6 à 8. Les résultats les plus satisfaisants de fertilisation ont été obtenus lors d'utilisation du sperme dilué à un pH de 6,8 et 7,1 (**Donoghue et Wishart, 2000**).
- **La Pression osmotique :** la pression osmotique de la suspension a une grande importance pour le maintien de la viabilité des spermatozoïdes. Le sperme aviaire peut maintenir son pouvoir fécondant avec des pressions osmolaires de 250 à 460 mOsmol / kg, alors que les recommandations sont de 325 à 350 mOsmol / kg.
- **La composition chimique:** L'acide glutamique, l'élément le plus important du plasma séminal aviaire, est devenu un élément standard de tous les dilueurs. De nombreuses solutions salines, tamponnées sont disponibles qui peuvent être utilisés, tels que le lait écrémé, l'albumine d'œuf, des antibiotiques et de la vitamine E et C. (**Siudzińska et Łukaszewicz1,2008**)

**Le jaune d'œuf :** Le jaune d'œuf du poulet a été traditionnellement utilisé comme additif pour la cryoconservation des spermatozoïdes, car il les protège contre les chocs à froid lors du refroidissement. Cependant, certains auteurs ont rapporté des effets néfastes du jaune d'œuf, puisque une baisse de la fréquence respiratoire et du potentiel de fertilisation des spermatozoïdes de coqs et de dinde ont été constatés (**Juliana et al ,2012**).

**La vitamine E :** la vitamine E est utilisée pour ses propriétés antioxydantes, elle a un rôle dans la préservation des spermatozoïdes pendant la conservation in vitro. La vitamine E est naturellement présente dans les spermatozoïdes aviaires et elle peut contribuer à la diminution de la peroxydation des lipides membranaires insaturés des spermatozoïdes lors de la congélation (**Blesbois et al, 1993**).



**Tableau 1** : composition des différents dilueurs de sperme proposé pour le coq en g/100 ml .

<b>Composition</b>	<b>BPSE</b>	<b>Lake</b>	<b>EK</b>	<b>FEB</b>
Acetate Mg	–	0,080	–	–
Citrate K	0,064	0,128	0,14	0,5
sodium -glutamate	0,867	1,520	1,4	1,92
Acetate Na,(anhydre)	0,430	–	–	–
Chlorure Mg	0,034	–	–	–
Glucose	–	0,600	0,7	–
Fructose	0 ,500	–	0,2	0,8
Phosphate K <sub>2</sub>	1,270	–	–	–
Phosphate K	0,065	–	–	–
BES	–	3,050	–	–
TES	0,195	–	–	–
NaOH M (ml)	–	5,600	–	–
Polyvinylpyrolidone	–	–	0,1	0,3
Inositol	–	–	0,7	–
Protamine sulfate	–	–	0,02	0,32

BPSE :Beltsville poultry semen extender décrit par Sexton en 1977.

Lake extender : dilueur décrit par Lake et Ravie en 1981.

EK : dilueur décrit par Lukaszewiz 2008 .

FEB :dilueur décrit par Tselutin et al 1995.

**b) La dilution du sperme frais avant congélation:**

La question de savoir si le sperme inséminé à l'état frais doit ou non être dilué est en fait liée à celle du délai d'utilisation du sperme. Ainsi, aucune dilution de sperme de coq n'est nécessaire si le délai de son utilisation ne dépasse pas les 30 à 45 minutes après sa récolte. Si se délai est dépassé, il devient utile, puis nécessaire, de le diluer et éventuellement de le refroidir. (**Réviers Min Sauveur B, 1988**).

**III-2-3) Les cryoprotecteurs:**

Les cryoprotecteurs, sont des composés organiques qui pénètrent dans la cellule pour la protéger dans son milieu pendant la cryoconservation, ils sont fait à base d'alcools de faible poids moléculaire (**Guingnot, 2005**).ces substances ont comme rôle de protéger les lipides membranaires et de limiter les effets nocifs des cristaux d'eau qui altèrent la membrane cytoplasmique et les organites intra cellulaires. Les cryoprotecteurs pénétrants augmentent la fluidité membranaire par la remise en ordre de son lipide et de sa protéine, ayant comme résultat une plus grande déshydratation à de plus basses températures et un givrage intracellulaire réduit (**Juan M et al, 2011**). Le choix de type de cryoprotecteur est très important pour avoir une bonne conservation du sperme, il existe plusieurs types de cryoprotecteurs tels que le glycérol, le dimethylsulfoxyde (DMSO), et le diméthylacétamine (DMA) qui ont été comparés sur des spermatozoïdes de volaille par la mesure de la viabilité et l'intégrité membranaire. Le glycérol apparait comme le cryoprotectant le moins délétère, suivi du DMA, et du DMSO (**Tselutin et al, 1999**).

**a) Le glycérol:**

Le glycérol est le cryoprotecteur le plus efficace pour le sperme des volailles, il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes .Le pourcentage de la glycérine à ajoutée au diluant est très importantes pour la survie de la cellule, 11% de glycérol est considéré comme la concentration optimal pour congeler les spermatozoïdes du coq. (**Long et Kulkarni, 2004**). Mais le glycérol à une forte action contraceptive, il est nécessaire de le retirer du milieu après décongélation avant l'insémination des poules. (**Seigneurin et Blesbois ,1999**), ceci est réalisé par centrifugation, ou dialyse (**Mocé et al ,2010**).

**b) Le diméthylsulfoxyde (DMSO) :**

Le DMSO est un cryoprotecteur intracellulaire qui s'est révélé moins efficace que le glycérol. 10 % de DMSO est considéré comme le pourcentage optimal pour la survie des spermatozoïdes (**Han et al, 2005**).

**c) Le diméthylacétamide (DMA) :**

Les taux de fertilité les plus élevés ont été obtenus avec le DMA avec une concentration de 6%, mais seulement quand des spermatozoïdes ont été gelés dans les granules (**Blesbois et Brillard, 2007**).

**III-3) les phases de congélation:****III-3-1) La phase d'équilibration :**

L'étape d'équilibration ou de refroidissement est l'une des plus importantes étapes où les spermatozoïdes sont maintenus à des températures de conservation de 4-5°C. (**Donoghue, et Wishart, 2000**).

**III-3-2) Le conditionnement:**

Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. (**Virginie, 2008**). Chez les oiseaux, la congélation de la semence a surtout été étudiée chez le coq. Dans cette espèce, il existe plusieurs techniques fonctionnelles de congélation du sperme, pouvant se décrire par leur mode de conditionnement (billes, paillettes, fioles). Le mode de conditionnement de la semence ayant de meilleurs résultats est celui en paillettes. Les différents essais de congélation en billes n'ont jamais permis de dépasser un taux de survie de 17 %, alors que ce taux variait de 30 % à 50 % suivant les protocoles de congélation en paillettes. Même si la raison de cette différence de réponse au conditionnement n'est pas connue, le conditionnement en paillettes est très intéressant car il permet une identification facile des semences congelées compatible avec une traçabilité optimale de la gestion des stocks (**Blesbois, 2005**). Les paillettes sont des fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrué à une extrémité par une pièce de coton, avec une contenance allant de 0,25 à 2,5ml.

**III-3-3) La congélation:**

De manière générale, la congélation des paillettes s'effectue en deux étapes : Refroidissement dans des vapeurs d'azote à  $-70^{\circ}\text{C}$  puis immersion dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  (Virginia, 2008).

**a) Influence de la vitesse de refroidissement:**

Pour limiter les effets du choc thermique et de la cristallisation intracellulaire, il est nécessaire de maîtriser la vitesse de refroidissement de la semence, dépendante de la technique utilisée. Les différentes études réalisées dans ce domaine montraient qu'une vitesse de refroidissement relativement lente donne de meilleurs résultats qu'une vitesse plus rapide, (Virginia, 2008).

**b) Influence de la position des paillettes:**

Lors de la congélation, les paillettes peuvent être placées verticalement ou horizontalement dans les vapeurs d'azote liquide. Généralement les paillettes sont placées horizontalement sur un support à une hauteur de 5 -7 centimètres au dessus de la vapeur d'azote liquide pendant une minute avec comme conséquence la baisse de la température du sperme à  $-180^{\circ}\text{C}$  avant d'être immergé dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Virginia, 2008).

**III-3-4) La décongélation:**

Le protocole de décongélation est également différent pour le sperme congelé sous forme de granulés ou paillettes. Les paillettes seront décongelées dans un bain d'eau à  $5^{\circ}\text{C}$  pendant trois minutes. Pendant la décongélation, les paillettes vont être secouées à l'aide d'un agitateur orbital (Chalah et al, 1999).

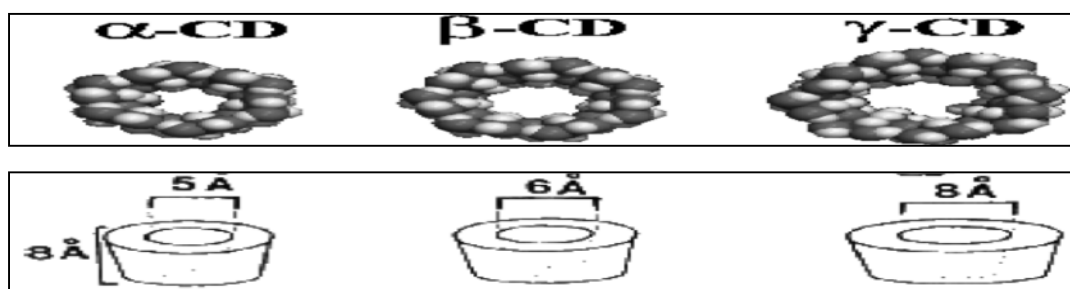
Pendant la phase de décongélation, il faut éviter tout contact de la semence avec l'eau, car celle-ci est toxique pour les spermatozoïdes. Même si une décongélation rapide est préconisée, le couple temps-température utilisé pour la décongélation dépend de la technique de congélation pratiquée (Virginia, 2008).

#### IV) Les cyclodextrines

En 1891, Villiers isolait pour la première fois un groupe d'oligosaccharides non réducteurs provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par une amylase. Villiers a nommé ce produit "cellulosine", puisqu'il ressemble à la cellulose. Il distingue deux formes cristallines qui seront identifiées plus tard comme étant les formes  $\alpha$ - et  $\beta$ -CD. En 1904, Schardinger a isolé la bactérie responsable de la production de dextrines 39. En 1930, Freudenberg et coll, démontrent que les dextrines sont constituées d'un enchaînement d'unités D-glucopyranoses liées par des liaisons glucosidiques a 1-4 et qu'elles sont cycliques. En 1949, French s'intéresse à la production de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -cyclodextrine et à leur caractérisation physico-chimique. Dans les années 50, Cramer a étudié les propriétés de complexes d'inclusion formés par les cyclodextrines. (Benhadi ,2010).

##### IV- 1) Structure et propriétés des cyclodextrines :

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques non-réducteurs obtenus industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon). Les trois types de CD les plus couramment rencontrés sont l' $\alpha$ , la  $\beta$  et la  $\gamma$ CD, qui sont constitués respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques, liées en  $\alpha$ -1,4. Les cyclodextrines présentent donc une forme torique, le côté le plus étroit étant appelé face primaire (les hydroxyles primaires y étant situés) et le côté le plus large, face secondaire. ( Weisse, 2002).



**Figure 4:** Structures tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  CD de gauche à droite) en bas, les dimensions respectives des CD.

**IV- 2) Inclusion – Compléxation:**

Les CD sont des composés de choix pour l'inclusion de molécules hydrophobes à la condition que la taille de ces invités s'accorde aux dimensions internes de la cavité. Les CD peuvent ainsi inclure partiellement ou en totalité un composé invité, ce qui donne alors lieu à la formation de complexes comportant éventuellement plusieurs molécules (1 ou 2) de CD ou de molécules invitées. La taille des CD peut être un facteur limitatif important quant à leur capacité à former des complexes d'inclusion et à leurs stabilités relatives. (Alexei et al, 2001). Un complexe d'inclusion est une espèce chimique constituée par l'association de deux ou plusieurs molécules. La molécule hôte est capable d'inclure la molécule invitée dans sa cavité, ce qui résulte en une encapsulation stable sans formation de liaison covalente.

**IV 2-1) Préparation des complexes d'inclusion:**

La préparation des complexes d'inclusion peut se faire en phase solide ou en phase liquide :

**a) Par la méthode de Co-précipitation :**

À une solution aqueuse de cyclodextrine froide, on ajoute la molécule invitée dissoute dans un solvant (acétone, éthanol, etc.), le mélange est maintenu pendant quelques heures ou quelques jours. Pour obtenir le complexe en phase solide, l'eau est enlevée par séchage à froid ou utilisation d'un spray ou filtration dans le cas où on obtient un précipité. (Benhadi, 2010).

**b) Par la méthode de pétrissage ( kneading'):**

Dans ce cas, les CDs ne sont pas dissous, elles sont mélangées avec une petite quantité d'eau dans laquelle la substance invitée a été rajoutée préalablement. Grâce au fait que le complexe CDs-eau est habituellement moins favorable que le complexe CDs-molécule invitée et parce que leurs structures cristallines sont différentes, l'inclusion peut avoir lieu. (Benhadi ,2010).

**IV -3) Les complexes déjà utilisés dans la conservation du sperme et les résultats obtenus chez les différents animaux :**

Le traitement du sperme provenant d'espèces différentes avec des cyclodextrines pré-chargé avec du cholestérol (CLC) préalablement à la congélation, en générale, améliore la qualité du sperme après congélation-décongélation (**Moce et al, 2010**). Et augmente la stabilité et la rigidité de la membrane plasmique (**Moce et Graham,2006**) , Le sperme de taureau incubées avec CLC avant la congélation, a permis de récupérer des pourcentages plus élevés de cellules mobiles et viables après cryoconservation (**Purdy et Graham,2004**) . De même, d'autres ont rapporté que les spermatozoïdes d'étalon traités avec du cholestérol chargé -méthyl- $\beta$  -cyclodextrine maintenu un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes mobiles et viables après cryoconservation du sperme que non traitée (**Graham ,1998**)

**V) Le stress oxydatif :**

Les spermatozoïdes sont soumis à de nombreuses agressions au cours des protocoles de congélation décongélation, en raison de plusieurs facteurs : le stress osmotique lors des étapes de dilution, le stress thermique lors de l'étape de l'équilibration, le stress oxydatif et les combinaisons de ces différentes conditions. Il a été également montré que le processus de cryoconservation produit de graves altérations dans la structure et la fonction des membranes plasmiques des spermatozoïdes (**Purdy, 2006**). Il ya déjà plus de soixante ans, Macleod parlait déjà du stress oxydatif comme un facteur important dans la perturbation de la fonction des spermatozoïdes, mais ce n'est que récemment que l'importance du stress oxydatif dans la fonction des spermatozoïdes normaux et anormaux est étudiée avec plus de détails (**Barry et Ball ,2008**).

L'une des raisons de la baisse de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes aux cours de la conservation est la peroxydation lipidique avec la formation de radicaux d'oxygènes (ROS). La production incontrôlée de ROS qui dépasse la capacité antioxydant du plasma séminal conduit à un stress oxydatif (OS) qui est nocif pour les spermatozoïdes. Tous les composants cellulaires, y compris les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres sont des cibles potentielles de stress oxydatif (**Partyka et al, 2012**)

**V-1) Les Radicaux libres :**

Les radicaux libres (ROS) sont des réactifs chimiques à courte durée de vie, qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés, qui jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques tels que la capacitation du sperme, hyper activation et la fusion de spermatozoïde avec l'ovocyte. Ils induisent à des dommages cellulaires résultant de l'oxydation des lipides de la membrane cellulaire (**Bansal et Bilaspu, 2011**).

**V-1-1) Sources de ROS dans le sperme :**

Ont trouve une production accrue de ROS dans le processus de congélation-décongélation du sperme. Les principaux sites de sa formation sont les mitochondries et les membranes cellulaires des spermatozoïdes, qui sont particulièrement vulnérables aux dommages causés par les changements brusques de température. (**Partyka et al, 2012**)

**V-2) la peroxydation lipidiques :**

Les acides gras polyinsaturés sont les acides gras majoritaires des phospholipides des membranes cellulaires des spermatozoïdes. Chez les volailles, ces acides gras sont majoritairement de type n-6, accompagnés dans certaines espèces comme le dindon d'un fort taux d'acides gras n-9. Ces acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent facilement subir une peroxydation lipidique (LPO) en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Partyka et al, 2012**).

**V-3) Les antioxydants :**

Les ROS peuvent être éliminées par l'action des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Le système antioxydant dans le sperme contient : des enzymes telles que la glutathion peroxydase (GPX), le superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) qui a été décrite comme un mécanisme de fonctionnement de défense contre la peroxydation lipidique (LPO) dans le sperme, et il est important dans le maintien de la viabilité et la motilité des spermatozoïdes. Cette capacité anti-oxydante des cellules spermatiques peut être insuffisante pour empêcher LPO pendant le processus de congélation-décongélation. (**Ahmet Atessahin et al, 2008**) et aussi des antioxydants naturels: vitamines A, C, E, de l'acide urique, le glutathion et les caroténoïdes. L'un des sous-produits de la décomposition du peroxyde lipidique est le malondialdéhyde, qui est couramment utilisé dans le test biochimique pour surveiller le degré de peroxydation. (**Partyka et al, 2012**).



**Tableau 2 :** Mécanisme d'action antioxydant non enzymatique :

Vitamine E	-Neutralise directement l'anion superoxyde, l'hydrogène peroxyde et le radical hydroxyle. -supprime la peroxydation lipidique. - Améliore la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte .
vitamine C	-Antioxydant à chaîne cassé. -Protège de façon compétitive la lipoprotéine de radicaux peroxyde. -Recycle la vitamine E.
albumine	- Réagit contre le radical peroxyde. -Neutralise les peroxydes lipidiques
Le glutathion	-Neutralise les anions super-oxyde. - réduire le métabolisme des radicaux H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et OH.
Super oxyde dismutase	-Neutralise des anions super oxyde intra et extracellulaire.
La catalase	-Neutralise le peroxyde d'hydrogène. -Permet de réduire la perte de mobilité.
Super oxyde dismutase	-Neutralise les anions super-oxyde (intra et extra cellulaire). -Améliore la vitesse de réaction acrosomique et la préservation de la mobilité des spermatozoïdes.
Coenzyme Q <sub>10</sub>	-C'est un agent de promotion d'énergie, il réduit les anions super-oxyde.
N -acétyl-L-Cystéine	- agit comme un précurseur du glutathion

# 2<sup>e</sup> éme partie

## Etude expérimentale

**I) Matériels et méthodes :****I-1) Matériels biologiques utilisés:****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.



**Figure 5 :** Photo du coq reproducteur de type chair Hubbard F15.

**I-2) La Récolte de la semence :**

La technique utilisée pour la récolte de la semence du coq est celle décrite par Burros et Quinn en 1937, qui est la méthode du massage dorso-abdominale. (Voir la revue de littérature).

**I-3) Analyse de la semence :**

Notre travail est réalisé au niveau de laboratoire de biologie animales bloc 12 de l'université de Bejaïa du 14 avril au 02 mai 2013.

**I-3-1) Matériels utilisés : (Figure 06)**

- la Semence récolté
- Des lames (76 x 26 mm)
- Des micropipettes graduées
- Des Tubes
- Le sérum physiologique formolé (0,9% de chlorure de sodium, 0,1% de formaldéhyde dans de l'eau distillée)
- Un microscope optique
- Des lamelles (20 x 20 mm)
- Une lame de mallassez
- l'huile à immersion



**Figure 6 :** Matériel d'analyse du sperme.

**I-3-2) Méthodes d'analyse :****a) Le volume :**

Après chaque récolte de la semence, le volume d'éjaculat est déterminé à l'aide d'une pipette graduée de 1ml.

**b) La mobilité massale (microscope optique) :**

L'examen de mobilité comporte une évaluation massale des spermatozoïdes. Le principe consiste à diluer une goutte de sperme pur au 10<sup>ème</sup> aussitôt récolté, dans du sérum physiologique, puis déposer une goutte de dilution sur une lame propre au microscope sous grossissement (10). L'évaluation massale consiste à donner une note allant de 0 (absence totale de mouvement) à 5 (mouvement vigoureux). (Voir le **Tableau 3**)

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

**Tableau 3:** Détermination de la note de motilité massale de la semence.

**c) La motilité progressive (microscopie optique) :**

L'évaluation de la mobilité progressive est réalisée au microscope sous grossissement (40), on 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.

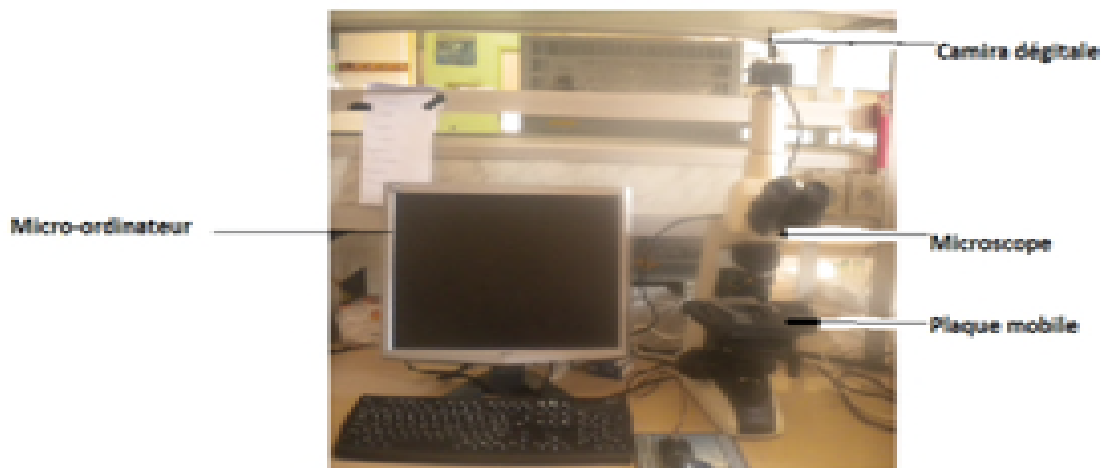
**d) La concentration (nombre de spermatozoïdes/ ml) :**

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 50µm 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 mm<sup>3</sup> et comporte 5 bandes horizontales de 5 lignes et 5 bandes verticales de 6 lignes chacune. On compte le nombre de spermatozoïdes dans le périmètre de comptage, 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 =  $1/100 \text{ mm}^3$  ; la concentration en spermatozoïdes par ml sera donnée par la formule suivante :  $C = m \times 100 \times 10^3 (\text{dilution}) \times 10^3 \text{ SPZ} / \text{ml}$ . 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 humectant 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 carré (**Balédent, 2000**).

#### e) Analyse informatique de la mobilité et de la cinétique des spermatozoïdes :

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.



**Figure 7** : photo d'analyseur informatique de sperme.

L'Analyseur informatique utilisé dans ce travail (**Figure 7**), 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 rapport à la population totale.

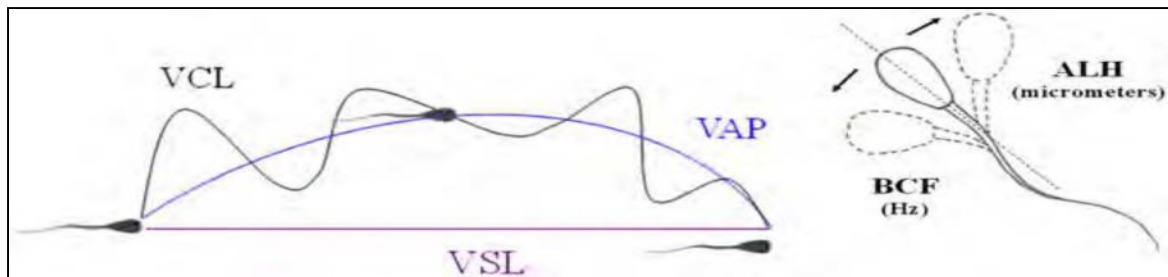
2-Les différentes vitesses de progression : (**Figure 8**)

- ❖ 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 %.( **Partyka et al ,2012**)



**Figure 8:** schéma représentant les différents types de vitesse de mobilité du spermatozoïde.

( **Partyka et al ,2012**)

**I-4) Congélation du sperme du coq :****I-4-1) L'objectif :**

L'objectif de cette étude est d'évaluer des nouveaux milieux de congélation afin d'optimiser et d'améliorer la congélation du sperme de coq.

**I-4-2) Matériels utilisés :**

- Le pool de sperme constitué à partir de la collecte des cinq coqs. Le sperme pur est dilué avec deux types de dilueurs qui sont le Tris butyrique et la solution hyperosmolaire .
- Le mode de conditionnement du sperme utilisé dans cette expérimentation est celui des paillettes de 0,25 ml.
- Le cryoprotecteur utilisé est le glycérol de 10 %, alors qu'on a testé six traitements CD, Chol, Vit E , CD-Chol, CD- Vit E et CD-Vit E-Chol.
- Un réfrigérateur pour assurer les conditions d'équilibration de la semence avec le glycérol et de diminuer la température graduellement et aussi pour la décongélation de la semence
- Une bouteille d'azote liquide .
- Une boîte polyester pour la congélation.



**Figure 9:** Matériel de la congélation du sperme.



**I-4-3) Les milieux de congélation :**

Dans le souci d'améliorer la congélation du sperme de coq, nous avons essayé l'effet de six traitements (Cyclodextrine, Vitamine E, Cholestérol, Cyclodextrine-Vitamine E, Cyclodextrine-Cholestérol et le complexe Cyclodextrine-Vitamine E-Cholestérol) qui sont obtenus au niveau de laboratoire de génie des procédés pharmaceutiques de l'université de Bejaïa, sur la congélation du sperme aviaire, dans deux milieux de dilution de la semence qui sont, le Tris butyrique et le milieu hyper-osmolaire. Le glycérol est le cryoprotecteur utilisé dans cette expérience avec un pourcentage final de 11%.

La composition des différents milieux et traitements utilisés sont :

- **Milieu 1 : Tris butyrique :** Pour une préparation de 100 ml de Tris, on mélange 100 ml d'eau distillé avec du Tris en poudre  $m = 3,025$  g; de l'acide acétique  $m = 1,676$  g et du glucose  $m = 1,250$  g.
- **Milieu 2 : La solution hyper osmotique à 450 mosm:** pour 100 ml d'une solution isotonique de NaCl (0,9%, 300 mosm), on ajoute 0,45 g de NaCl en poudre.
  
- **Les traitements :**

**CD s :** mélange de 35,5mg de CD +5ml de tris buffer(TB)

**Chol :** mélange de 20mg de Chol +5ml de TB

**Vit E :** mélange de 1,2mg de Vit E +10ml de TB

**CD-chol :** mélange de 54,3mg de CD-chol +5ml de TB(2)

**CD-vit E :** mélange de 9,2mg de CD-vit E +10ml TB(1)

**Le complexe (CD-Vit E-chol) :** mélange de 1ml de (1)+1,5ml TB+(2)

**I-4-4) Préparation des échantillons :**

**Remarque** : l'objectif d'utilisation de solution hyperosmolaire est de pouvoir faire sortir un maximum d'eau intracellulaire pour limiter la formation des cristaux.

**Contrôle** : un volume de l'un de ces dilueurs (tris ou solution hyper osmotique) glycérolé à 22% ajouté à un volume de sperme dilué pour donner une concentration finale de 11% de glycérol.

**Cyclodextrine** : un volume de CD glycérolé à 22% est ajouté à un volume de sperme pour donner une concentration finale 11 % de glycérol.

**Vitamine E** : un volume de la solution vitamine E glycérolé à 22% ajouté à un volume de sperme dilué pour donner une concentration finale 11% de glycérol.

**Cholestérol** : un volume de (cholestérol plus glycérol de 10 %) donne une concentration de 22% de glycérol ajouté à un volume de la semence dilué pour donner une concentration finale de 11% de glycérol.

**Cyclodextrine-vitamine E** : un volume de ( CD-VIT E plus glycérol de 10%) donne une concentration de 22% de glycérol ajouté à un volume de sperme dilué pour donner une concentration finale de 11% de glycérol.

**Cyclodextrine-cholestérol** : Un volume de la solution (CD-Chol plus le glycérol de 10%) donne une concentration de 22% glycérol ajouté à un volume de sperme dilué pour donner une concentration finale de 11% de glycérol.

**Le complexe(Cyclodextrine-vitamine E-cholestérol)** :Un volume de la solution (CD-VIT E-chol plus le glycérol de 10%)donne une concentration de 22% de glycérol ajouté à un volume de sperme dilué pour donner une concentration finale de 11% de glycérol .

**I-4-5) Protocole de congélation :**

Juste après la collecte, la semence est diluée au dixième soit avec du Tris butyrique où bien avec une solution hypertonique. Pour chaque collecte une analyse de la semence est faite (couleur, volume, mobilité massale et concentration à l'aide d'une cellule de Malassez). Ensuite, la semence diluée est divisée en sept aliquotes, dont un contrôle est les six autres

chacun avec un des six traitements préparés. Une fois l'échantillon préparé, il est aussitôt mis en équilibre à 4°C pendant 25 minutes. Une fois cette étape terminée, le sperme est mis en paillette de 0,25 ml par aspiration à travers une extrémité de la paillette laquelle est ensuite obturée par une poudre polyvinylique, après les paillettes sont placées horizontalement sur un support à une hauteur de 7 cm au dessus de l'azote liquide pendant une minute, pour être ensuite plongées directement dans l'azote liquide à -196°C.

#### **I-4-6) Protocole de décongélation :**

La décongélation à 5°C pendant 3 minutes dans un réfrigérateur.

#### **I-5) Analyse statistiques :**

Les données sont analysées à l'aide d'un logiciel de traitement de données « stat view », 5<sup>me</sup> version »

### **II) Résultats et discussion :**

#### **II-1) Les caractéristiques du sperme frais :**

Avant d'entamer l'optimisation de la congélation du sperme du coq, nous avons commencé par l'analyse de la semence à l'état frais juste après la récolte. Cette étape est importante parce qu'elle nous permettra d'évaluer le degré de changement apporté par la congélation en ce qui concerne le paramètre de mobilité. Les paramètres que nous avons étudiés sont : le volume, la mobilité, la couleur et la concentration de la semence.

##### **II-1-1) Caractéristiques macroscopiques :**

###### **a) Le volume :**

La lecture de volume se fait à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml, le volume d'éjaculat obtenu est faible, il varie de 100 à 300 $\mu$ l, c'est pour cela que nous avons décidé de travailler sur un pool de sperme à partir de cinq coq. Cependant, ce volume reste similaire à celui rapporté dans la littérature (**Etches, 1995**).

###### **b) La couleur :**

Le sperme des cinq coqs de type chair Hubbard F 15, est de couleur blanche avec des débris cellulaires similaires à ceux rapportés dans la littérature (**Mosenene, 2009**).

##### **II-1-2) Caractéristiques microscopique :**

###### **a) La concentration :**

La concentration de la semence varie de 2,5 à 4,4 x 10<sup>9</sup> spermatozoïdes /ml. Pour la race de poulet chaire Hubbard F15, ces concentrations restent dans la gamme décrite avec des valeurs allant de 3 à 8 x10<sup>9</sup> spermatozoïdes /ml (**Etches, 1995**).

###### **b) La mobilité :**

###### **- Valeurs obtenues par l'analyse au microscope optique :**

L'examen de la mobilité est réalisé le plus rapidement possible après la récolte, sous microscope avec une estimation à vue d'œil. Nous avons observé des mouvements très lents

et une mobilité générale de faible amplitude avec des notes allant de 2 à 3 pour la mobilité massale. La mobilité progressive, considérée comme de meilleure qualité à concernée 25 à 30% de spermatozoïdes.

### **- Valeurs obtenues par l'utilisation de l'analyseur informatique :**

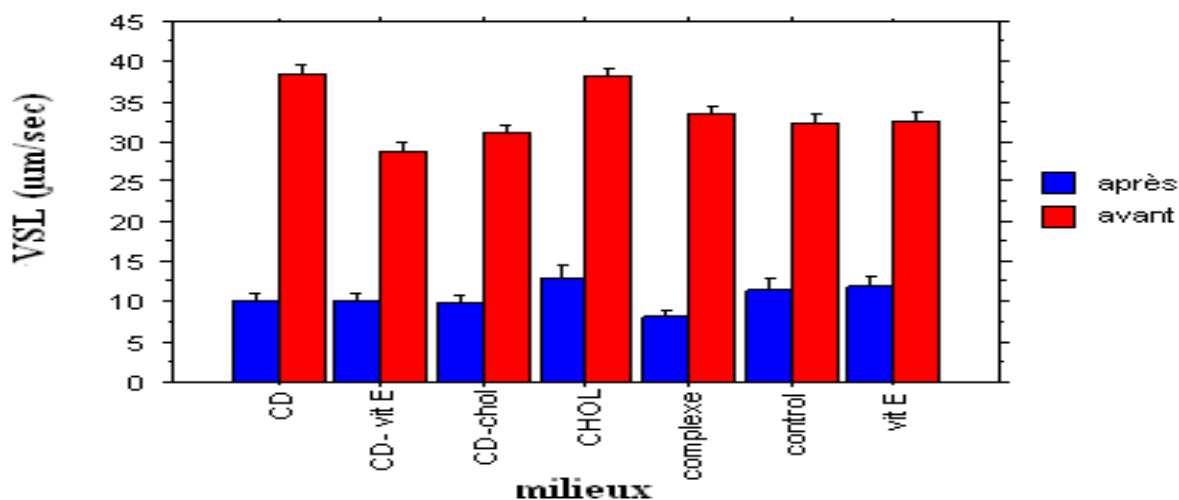
L'analyseur informatique est un outil qui fonctionne de manière automatique, il permet de générer des valeurs quantitatives objectives en dehors de l'estimation réalisée à vue d'œil et donc sujette à la subjectivité de l'évaluateur. Le pourcentage total de spermatozoïdes mobiles est de 83,88 % pour le sperme frais dilué avec la solution hyperosmolaire, et 79,27% pour le sperme dilué avec le milieu à base de tris. Ce pourcentage est similaire à celui décrit par (**Chalah et al ,1999**) allant de 88 à 95%. Dans notre travail le pourcentage de mobilité restera un facteur clé pour comparer les différents milieux de congélation qui seront utilisés.

### **II -2) Caractéristique du sperme après congélation- décongélation :**

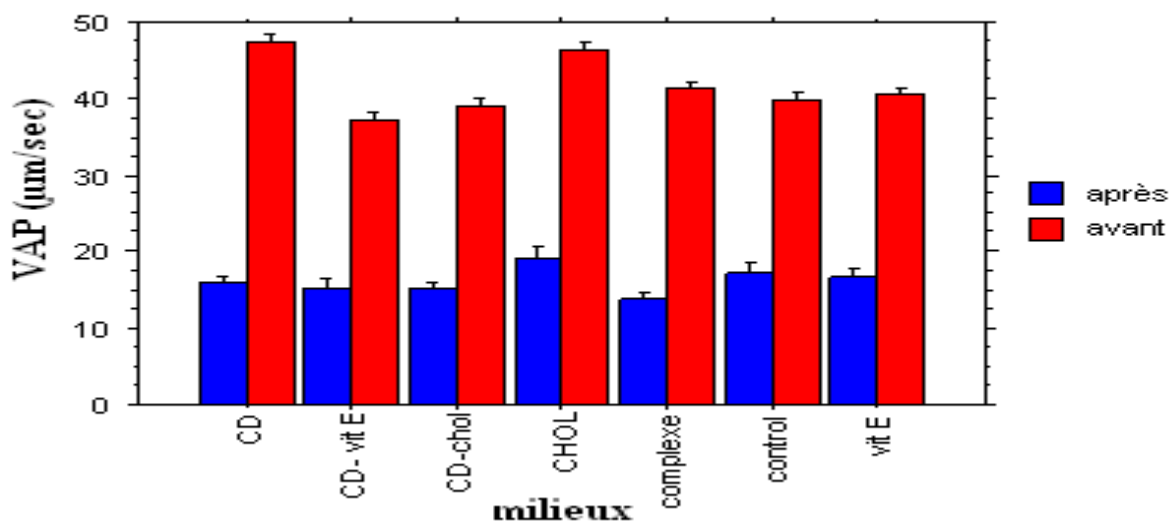
L'analyse des paramètres de mobilité après congélation-décongélation revêt une importance capitale pour se prononcer sur les méthodes et les milieux de congélation utilisés. Plusieurs paramètres de mobilité peuvent être retenus dans ce sens, cependant deux notions sont à distinguer : la première consiste en la présence de la mobilité mesurée à travers le pourcentage de mobilité, et la deuxième en la qualité de cette mobilité à travers la mesure des vitesses de progression (VAP et VSL).

Après la décongélation de la semence nous avons observé une chute importante des différents paramètres de mobilité, notamment pour ce qui est des vitesses de progression (figures 10, 11 et 12,13). Ceci met en évidence que les spermatozoïdes du coq sont très sensibles au processus de congélation-décongélation. Cela signifie aussi que beaucoup de recherche reste à faire, devant l'inaptitude des systèmes actuels de congélation, pour trouver d'autres milieux plus adéquats avec moins de formation de cristaux intracellulaires et moins d'impacts sur la membrane cellulaire(**Blesbois et Brillard ,2007**).

## Résultats et discussion

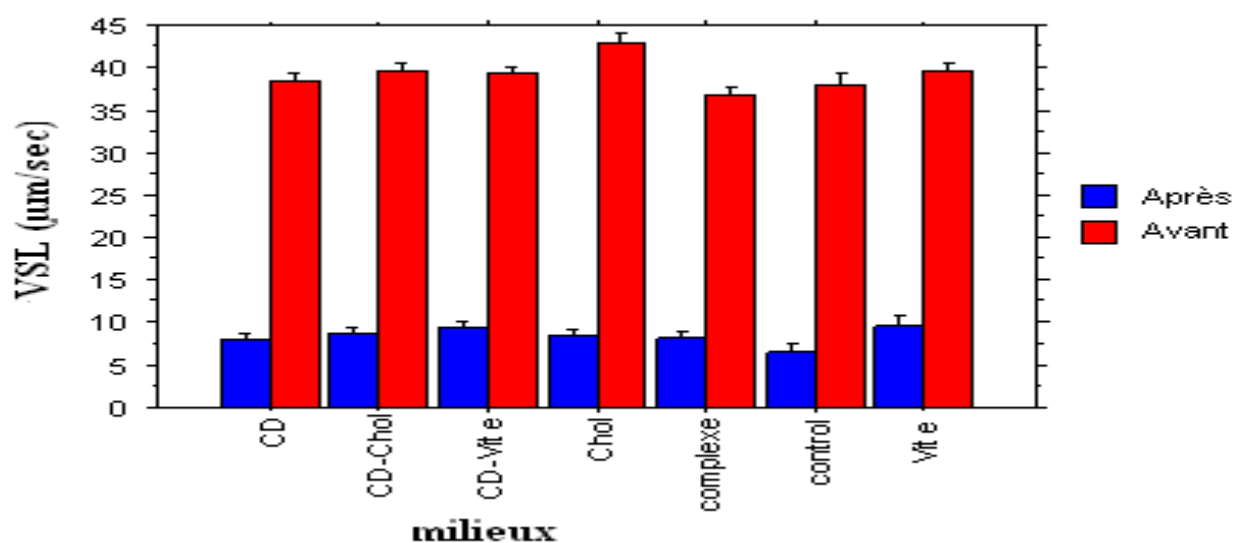


**Figure (10) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VSL des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dilués avec le tris.

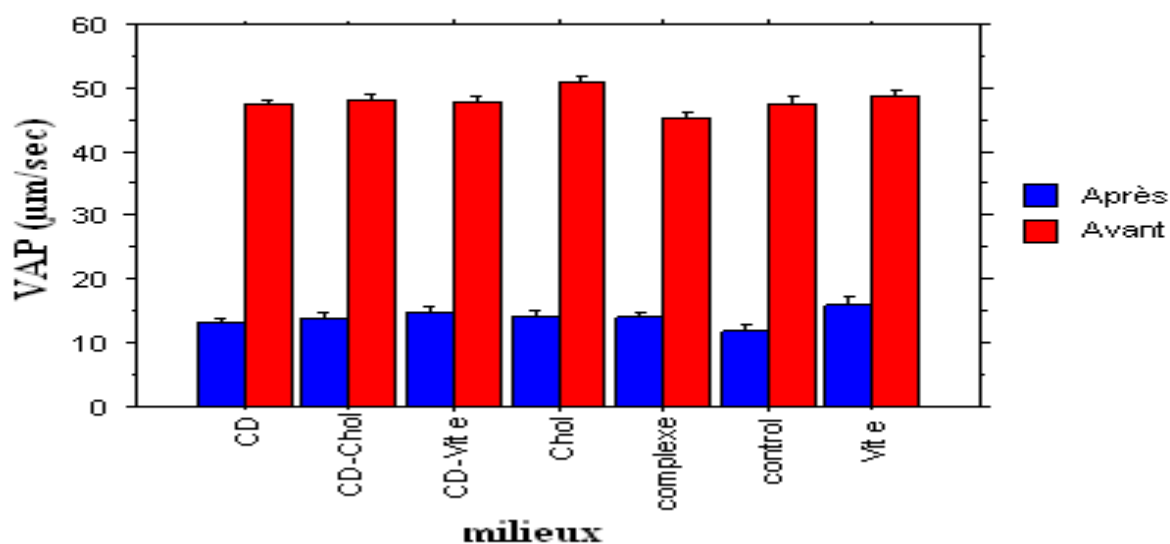


**Figure (11) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VAP des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dilués avec le tris.

## Résultats et discussion



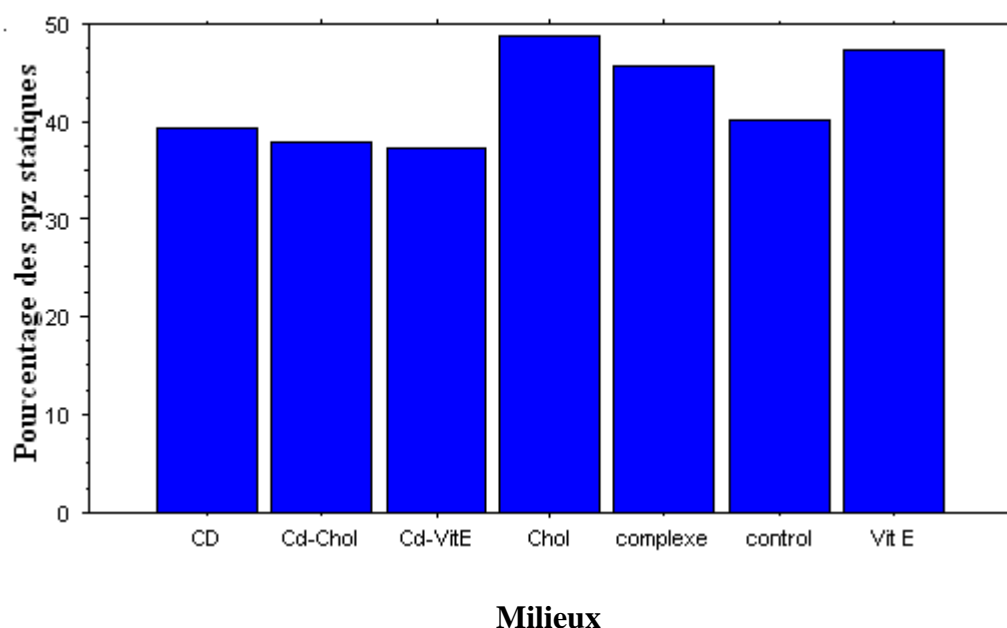
**Figure (12) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VSL des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.



**Figure (13) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité VAP des spermatozoïdes avant congélation et après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD ,CD-chol ,CD- vit E , CHOL, complexe (CD-vit E-chol), contrôle et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.

## Résultats et discussion

Sur la **figure (14)**, nous avons représenté le pourcentage des spermatozoïdes statiques pour l'ensemble des milieux de congélation utilisés et dilués dans le dilueur Tris, ces spermatozoïdes statiques sont considérés comme les plus mauvais car ne présentant pas de mobilité et donc inaptes à assurer la fécondation. Pour le control, le pourcentage des spermatozoïdes statiques après congélation-décongélation est de 40,29%. Les plus faibles pourcentages (37,33 %; 37,92% ; 39,28%) ont été observés avec CD-VitE, CD-Chol et CD, respectivement. Parmi ces résultats ils existent ceux qui sont inférieurs à ceux obtenue chez d'autres espèces à l'exemple de ceux obtenus chez l'espèce caprine (70%) (**Vianney et al , 2012**) , chez le bélier (58% ) (**Mocé et al, 2010**) et chez le taureau (40 % ) ( **Purdy PH, Graham J.K, 2004** ) pour le CD-Chol. Et ceux qui sont sensiblement proches, comme ceux obtenus par **Mocé et al, (2010)** avec 38 % chez le bélier par l'usage des CD.



**Figure (14)** : Histogramme montrant les pourcentages des spermatozoïdes statiques après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vitE , chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le dilueur Tris.

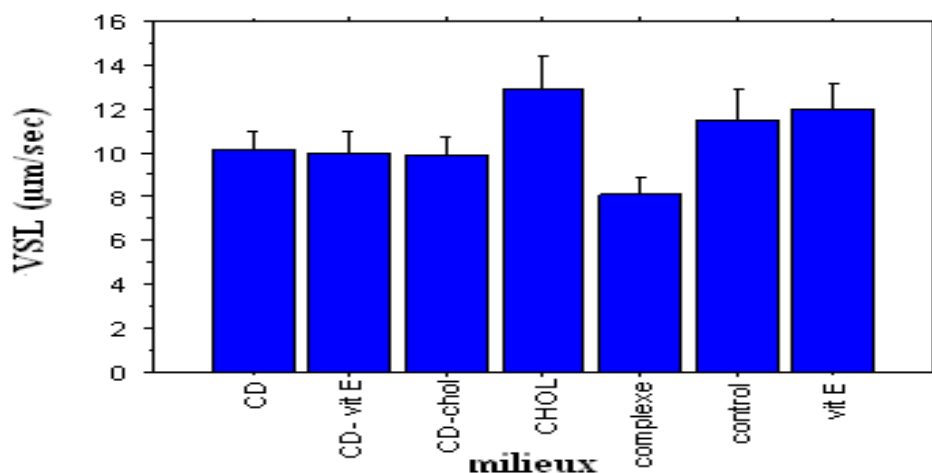
Dans notre cas, le pourcentage des spermatozoïdes est plus important dans les milieux Vit E seul et chol seul et dans le complexe comparativement au contrôle. Les CD, CD-Chol et



## Résultats et discussion

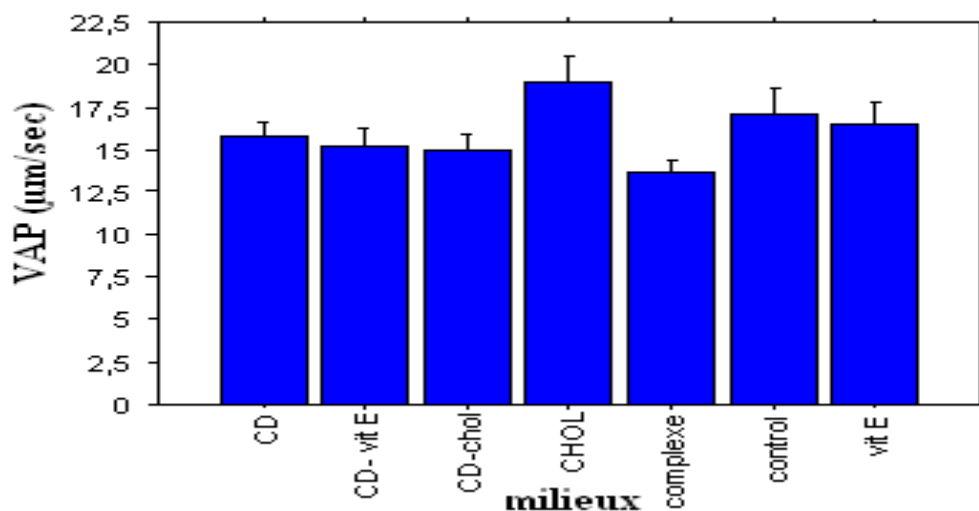
CD-VitE, sont ceux qui ont donné le moins de spermatozoïdes statiques notamment le CD-VitE. Ceci est probablement lié aux cyclodextrines qui ont contribué à mieux exprimer l'effet du cholestérol et de la vitamine E en augmentant leur solubilité dans l'environnement hydrophile des milieux de conservation.

Sur les **figures 15 et 16**, qui représentent respectivement les VSL et VAP des spermatozoïdes, nous pouvons constater que les milieux qui ont donné un pourcentage de spermatozoïdes statiques supérieur sont ceux qui ont présenté les vitesses les plus élevées. Pour la VSL, le meilleur résultat est obtenu par Chol (12,88  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) suivie de celle de la Vit E (11,98  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ). Pour la VAP, le meilleur résultat est toujours obtenu par le Chol.



**Figure (15) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VSL) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD-vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dilués dans le tris.

## Résultats et discussion



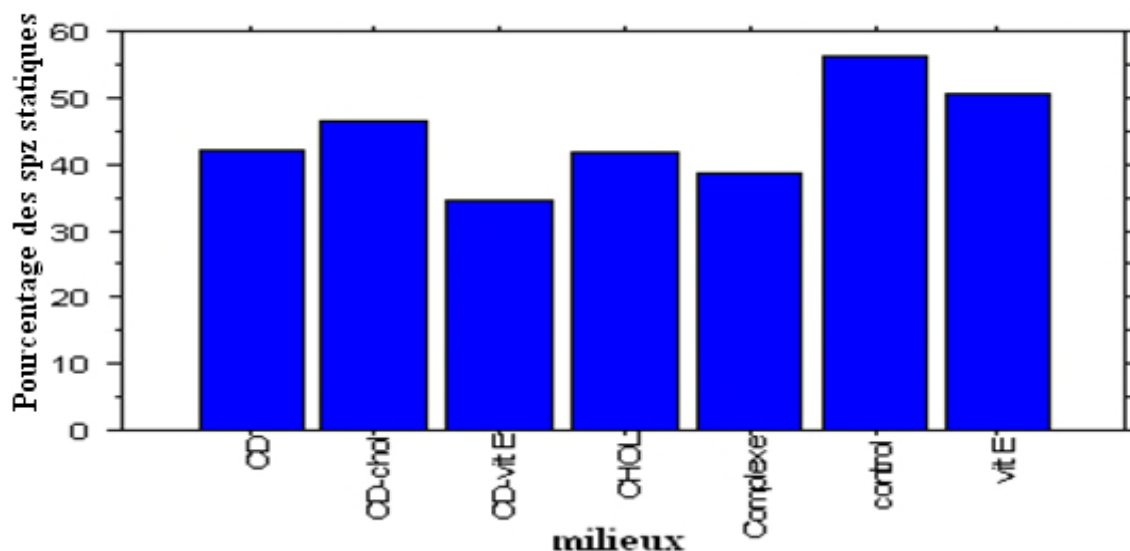
**Figure (16) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD-vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dilués dans le tris.

On peut donc retenir que quand les différents traitements utilisés sont dilués dans du tris, il ne semble pas avoir de corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes statiques et les vitesses de progression. Ceci signifie que les cyclodextrines contribuent à potentialiser l'effet du cholestérol et de la vitamine E pour la mobilité globale mais sans affecter la qualité de progression des gamètes.

Dans le présent travail, nous avons utilisé une nouvelle approche dans la conservation du sperme du coq. Elle consiste à préparer un milieu hyperosmolaire, c'est-à-dire avec une osmolarité supérieure à celle existant au niveau intracellulaire et ceci afin de forcer l'eau intra-cytoplasmique de sortir en dehors du spermatozoïde et limiter ainsi la formation de cristaux de glaces pendant la congélation, connus pour être néfastes à la qualité du sperme.

Sur la **figure 17** nous avons représenté le pourcentage des spermatozoïdes statiques pour l'ensemble des milieux de congélation utilisés et dilués dans le milieu hyperosmolaire. Pour le control, la valeur retrouvée est de 66,25%, ce pourcentage reste inférieur à celui rapporté par **Mocé et al, (2010)**, où une valeur de 85% est observée. Il est cependant, aussi remarqué que le contrôle est celui qui présente le plus de statiques par rapport à tous les autres traitements, signifiant que c'est le sperme de moindre bonne qualité. Le moins de statiques est retrouvé dans l'échantillon CD-vit E, ce qui d'ailleurs a été constaté plus haut pour le tris.

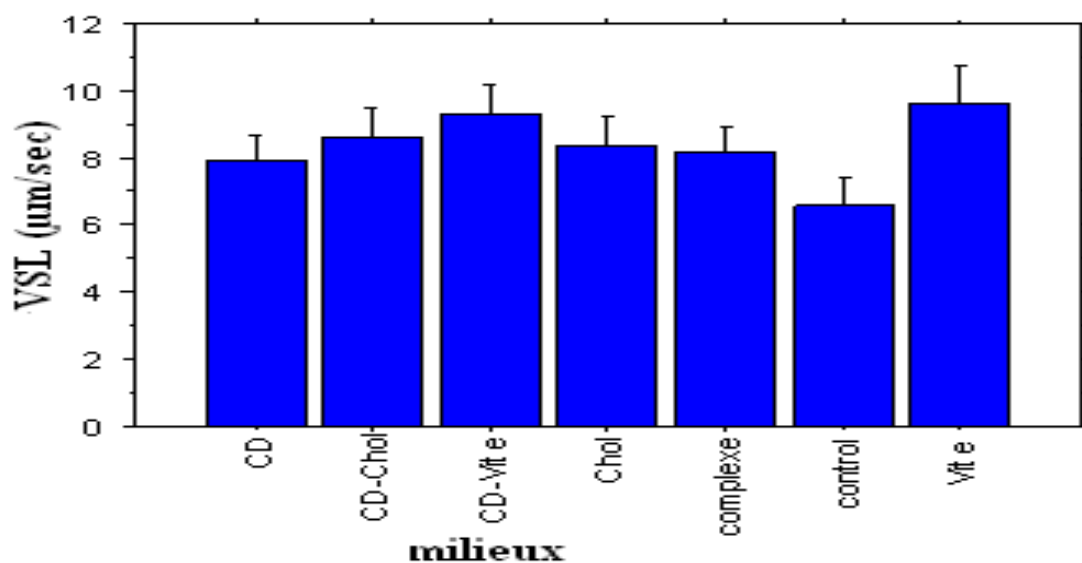
## Résultats et discussion



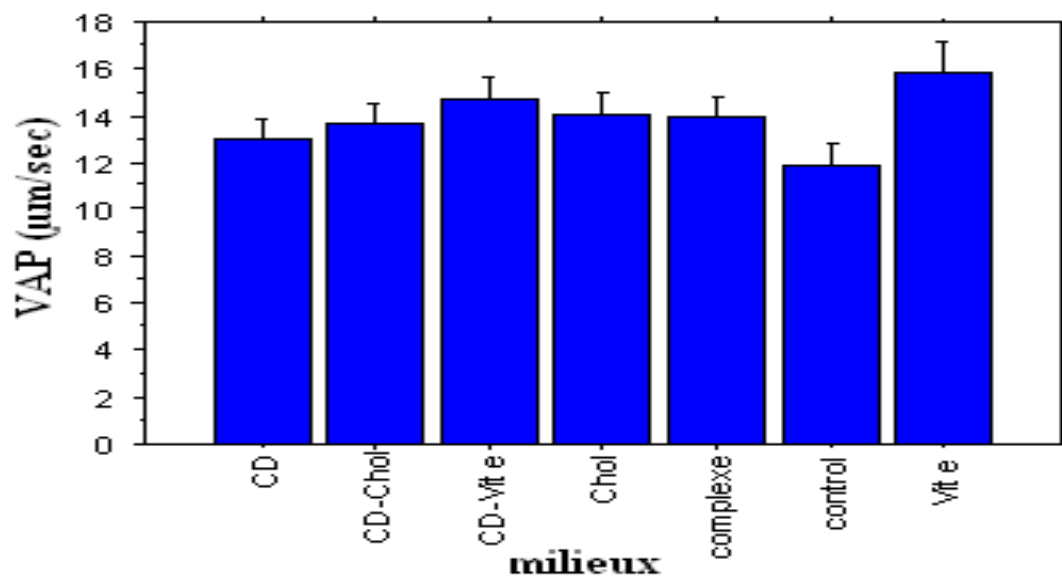
**Figure (17) :** Histogramme montrant le pourcentage des spermatozoïdes statiques après la décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD-vitE, chol, complexe(CD-vit E-chol), control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.

Pour ce qui est des vitesses de progression, VSL et VAP, nous pouvons voir sur les **figures 18** et **19**, que tous les milieux ont des valeurs supérieures à celle du contrôle. Les valeurs les plus élevées sont retrouvées dans le milieu CD-vit E de la même manière que pour le pourcentage des statiques. Ceci signifie que le fait d'utiliser un environnement hyperosmolaire ça a permis d'améliorer aussi bien la mobilité globale que les vitesses de progression des gamètes. D'ailleurs cet environnement hyperosmolaire, pourrait même être impliqué dans la potentialisation de l'effet de la vitamine E seule sans cyclodextrines, ce qui la classe au même rang, en termes de vitesses, avec le milieu CD-vit E.

## Résultats et discussion



**Figure (18) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité à ligne directe (VSL) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.



**Figure (19) :** Histogramme représentant la variation de la vitesse de mobilité (VAP) des spermatozoïdes après décongélation dans les sept milieux de congélation (CD, CD-chol, CD- vit E, chol, complexe (CD-vit E-chol), control et vit E) dans le milieu hyperosmolaire.

Conclusion

# Conclusion

---

## Conclusion :

Dans le domaine de la reproduction, la biotechnologie reste une des voies d'amélioration de la production tant quantitative que qualitative. Ces biotechnologies, dont fait partie la congélation du sperme, ont aussi comme pour but de préserver la diversité biologique. Le succès de la congélation du sperme dépend de deux facteurs principaux : la qualité de la semence et le protocole pratiqué. L'objectif de notre travail a été d'optimiser la congélation du sperme de coq par l'utilisation de nouveaux milieux de congélation. L'approche consisté en l'utilisé le cholestérol pour renforcer la membrane cytoplasmique et la vitamine E, connue pour être un puissant antioxydant. Cependant, comme ces deux molécules sont de nature lipophile, donc avec une solubilité difficile dans les milieux de congélation, nous avons utilisé les cyclodexytrines pour augmenter leur solubilité et par la même leur action.

Les différent traitements sont utilisé soit dans du tris, avec une osmolarité normale, ou dans une solution hypertonique, pour qu'en plus de l'effet protecteur du cholestérol et de la vitamine E, puisse s'ajouter la limitation de cristaux intracellulaires. Dans le milieu hyperosmolaire l'eau intra-spermatozoïdes sera forcée à sortir par osmose avec comme conséquence une limitation de la formation de cristaux de glaces intracellulaires.

Les résultats les plus satisfaisants sont ceux obtenus avec le milieu hyperosmolaire. C'est en effet dans ce milieu, en considérant la mobilité globale à travers le pourcentage des spermatozoïdes statiques, que c'est pleinement exprimé l'effet protecteur notamment du complexe CD-Vit E, suivi du complexe CD-Vit E-Cholestérol qui présentent les plus faibles taux d'immobilité. Dans cet environnement hyperosmolaire tous les traitements semblent donner de meilleurs résultats par rapport au contrôle, ce qui n'est pas observé dans le milieu isoosmolaire.

Les résultats du présent travail permettent d'envisager des applications dans le proche avenir, notamment en ce qui est des essais d'insémination à sperme congelé dans un milieu hyperosmolaire en association avec les cyclodextrines, le cholestérol et la vitamine E.

Références

Bibliographiques

### Références bibliographiques:

- Ahmet Atessahin., Mustafa Numan Bucak , Purhan Barbaros Tuncer., Meltem Kızıl (2008).** Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research* ; 77, Issue 1, 38–44.
- Alexei U., Moozyckine., Jonathan L., Bookham, Michael E., Deary and D. Martin Davies.(2001)** . Structure and stability of cyclodextrin inclusion complexes with the ferrocenium cation in aqueous solution: <sup>1</sup>H NMR studies. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, ,1858-1862.
- Bakst MR ., 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.
- Benhadi Siham (2010).** Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux cellulosiques SCD\_T\_2010\_0122\_
- Blaise Mpupu Lutondo.(2012).** Guide pratique et scientifique pour l'élevage des poules pondeuses et des et de poulets de chair .édition Harmattan RDC. page 26.
- Balédent Françoise .(2000).** cellules hématimètres, *Développement et Santé*, n°148.
- Bansal Amrit Kaur ., Bilaspur .G. S.(2011).** Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International.*, Article ID 686137, 7 pages.
- Barry A., Ball (2008).** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse\_ *Animal Reproduction Science* 107 .257–267.
- Blanco JM et a.(2009).** Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species.
- Blesbois Elisabeth .(2005)** . Mise au point d'une méthode de congélation de la semence de pintade. *Sciences et Techniques Avicoles* N° 50.
- Blesbois. E.(2011).** Gamètes et fécondation chez les oiseaux. *INRA Prod. Anim.*, 24 (3), 259-27
- Blesbois, E. and Brillard, J. P.(2007).** Specific features of in vivo and in vitro sperme storage in birds. *Animal* 1:1472–1481.)
- Blesbois. E; Coquerelle, G., Seigneurin, F., Gasseau, I.; Limouzin, C; Besnard, J Gourichon, D.; Sellier, N.; Le Bihan-duval, E.; Merat, L.; Rault, P.; Tixier-Boichard, M . (2007).** Constitution of the first French patrimonial genetic stock for ex situ management in the species *Gallus gallus*. *World Poultry Science Journal*.under press.
- Blesbois .E., Grasseau.I and Blum.G.C. (1993)** . Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4°c i.n.r.a., Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France.



## Références bibliographiques

---

**Blesbois Elisabeth ,Seigneurin François. (1997).** conservation in vitro du sperme chez les oiseaux domestiques. INRA. station de recherche avicoles,3 7380 nouzilly,france .

**Couailler Julie .(2005) .**Reproduction des animaux d'élevages.361-362P.

**Chalah, T., and. Brillard J. P. (1998) .** Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/IP). *Theriogenology* 50:487–493) .

**Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E. and Brillard, J. P.(1999) .** In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 39:185–191.

**Christensen., V.L. (1995) .** Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: Bakst, M.R., Wishart, G.J. \_Eds., Proc. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 90–106)

**Cassinelli Chiara.(2011).** la crioconservazione del materiale seminale nella specie Gallus gallus. Matricola: R07753.

**Douard V., Blesbois E., Hermier D., Magistrini M.(2004) .** Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1-13.

**Donoghue AM and Wishart GJ.(2000).** Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 213-232.

**Etches RJ, (1995) .**Reproduction in Poultry. Chap 12, 298-307.

**Fagbohun, Suliati Oluwatosin.(2011).** Effect Of Egg Yolk Extender On Cock Semen. matric number: 2006/0529.

**Garner DL et LA Johnson (1995).** Viability assessment of mammalian sperm using SYBER-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 1995; 53: 276-284.

**Graham.J.K. (1998) ,** An update on semen extenders and cryoprotectants, in: Proceedings of the 17th Technical Conference on A.I. and Reprod., Madison, WI, pp. 32–36.

**Guignot F. (2005).**cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Production. Animals. 18(1), 27-35.

**Graham J.,Wishart.(1995) .**Cryopreservation of avian spermatozoa. *Methods in molecular biology*, Vol. 38: Cryopreservabon and Freeze-Drying Protocols 1995 Humana Press Inc , Totowa, NJ.

**Hamori E (1980).** Selection of viable cells with known DNA content. *Cytometry* 1980; 1:132-135.

**Hazim J., Al-Daraji .(2012).**Influence of Adding Licorice Extract to Diluents on Semen Quality and Storage Ability of Roosters' Semen during Liquid Storage »*Adv Biol Sci*, 1(1): 8-12.

## Références bibliographiques

---

- Hammerstedt ROY H, (1995).** Cryopreservation of poultry Semen- Current Status and Economics. In: Bakst MR Wishart GJ Eds, Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 229–250.
- Han X.F., Niu Z.Y., Liu F.Z., Yang C.S., 2005.** Effects of Diluents, Cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen, International Journal of Poultry Science, 4: 197-201.
- Julián Santiago, Moreno Cristina Castano, Adolfo Toledano-Díaz, Miguel A. Coloma, Antonio López-Sebastián, María T. Prieto, Jose L. Campo.(2012)** . Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. Cryobiology Volume 65, Issue 3, December 2012, Pages 230–234.
- Juan M.,Blanco.,Julie A.,Long., George Gee., David E.,Wildt et Ann M.,Donoghue.(2011).**Comparative cryopreservation of avian spermatozoa:Benefits of nonpermeating osmoprotectants and ATPon turkey and carne sperme cryosurvival,242-248P.
- Katila T. (1997a)** .Procedures for handling fresh stallion semen. Theriogenology. **48** (7)1217-27.
- Labbé caterine., Blesbois Elisabeth ., lebouf Bernard .,Martoriati Alain .,Guillouet Philippe ., Stradaioli Guiseppe et Magistrini Michèle .(2003).**Techniques de la conervation du sperme chez plusieurs vétebrés domestique :protecton des lipidees membranaires ,intégrité du noyau et élargissement des methodes .143-157P.
- Long.J.A ., and Kulkarni .G. (2004).** An Effective Method for Improving the Fertility of Glycerol-Exposed Poultry Semen.Poultry Science 83:1594–1601.
- 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: 340-345.
- McGovern. (2002).** Reproduction In Male Broiler Breeders. The University of Georgia.
- Mosenene Thatohatsi Madaniel Bernice.(2009 )**characterization and cryopreservation of semen of four south african chicken breeds. University of the Free State Bloemfontein.
- Mocé .E, Grasseau I., Blesbois. E.(2010)** . Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. Animal Reproduction Science .Volume 122, Issues 3–4, December 2010, Pages 359–366
- Mocé .E ; Phillip .H ; Purdy ; James .k; Graham , (2010).**treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Animal Reproduction Science, Pages 236–247
- Partyka Agnieszka., Lukaszewicz Ewa.,Nizański Wojciech .(2012)** .Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semenTheriogenology ,Volume 77, Issue 8, Pages 1497–1504

## Références bibliographiques

---

**Partyka Agnieszka., Nizański Wojciech and Ochota Malgorzata .(2012).** Methods of Assessment of Cryopreserved Semen, Current Frontiers in Cryobiology, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8,

**Pichereau Alexandra .(2012)** . les techniques de prélèvement et d'insémination artificielle chez les oiseaux . Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort.

**Purdy ; P.H ; Graham J.K, (2004).** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology , Pages 36–45.

**Purdy .P.H, (2006).** A review on goat sperm cryopreservation, Small Ruminant Res. 63 (3) 215–225.

**Réviers Min Sauveur Bernard.(1988).**reproduction des volailles et production d'oeufs, INRA paris 219-449p.

**Richardson M.E., Bodine A.B., Froman D.P., Thurston R.J., (1987)** . Turkey acrosin 1. Isolation. Purification and partial characterization. Biology of Reproduction, 38: 645-651

**Seigneurin F. I, Blesbois Elisabeth. (1999)** . cryoconservation du sperme de coq. 1syaaf, 2INRA, station de recherche avicoles , 37380 .Nouzilly.

**Siudzińska.A and Łukaszewicz1 E.(2008)** . Effect of Semen Extenders and Storage Time on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds . J. Appl. Poult. Res. Spring 2008 vol. 17 no. 1 101-108

**Tajima Atsushi.(2013).**Conservation Of Avian Genetic Resources. Japan Poultry Science , 50: 1-8.

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

**Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E.(1999).**Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa Poult. Sci., 78, pp. 586–590

**Vianney SalmonChristian Lessard., Clotilde Maurice., Janice Bailey., (2012).** La cyclodextrine favorise l'incorporation du cholestérol et augmente la résistance des spermatozoïdes caprins aux températures froides .5<sup>e</sup> symposium du réseau québécois en reproduction .p 36.

**Virginie Fuertes Paméla. (2008)** .congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

**Weisse Sandrine.(2002)** . Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A, stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée. Serie Doctorat N° 741, Université Paris XI

## ANNEXES

---

**Annexe n°1** : Pourcentage des vitesses VSL et VAP obtenue après congélation lors d'utilisation du Tris comme dilueur.

	Mean	Std. Dev.
VCL, Total	27,771	23,373
VCL, CD, Après	26,358	22,981
VCL, CD-Chol, Après	26,712	19,965
VCL, CD-Vit e, Après	29,142	24,123
VCL, Chol, Après	29,614	25,457
VCL, complexe, Après	27,352	22,848
VCL, control, Après	25,153	20,407
VCL, Vit e, Après	29,650	27,181
VSL, Total	8,434	15,884
VSL, CD, Après	7,924	13,779
VSL, CD-Chol, Après	8,651	15,549
VSL, CD-Vit e, Après	9,312	17,876
VSL, Chol, Après	8,380	15,464
VSL, complexe, Après	8,177	15,981
VSL, control, Après	6,561	13,724
VSL, Vit e, Après	9,655	17,493
VAP, Total	13,942	16,813
VAP, CD, Après	13,037	14,830
VAP, CD-Chol, Après	13,701	15,869
VAP, CD-Vit e, Après	14,723	18,444
VAP, Chol, Après	14,076	16,402
VAP, complexe, Après	13,965	16,655
VAP, control, Après	11,922	14,543
VAP, Vit e, Après	15,884	19,959

## ANNEXES

---

Annexe n° 2 : Pourcentage des vitesses VSL et VAP obtenue après congélation lors d'utilisation du milieu hyperosmolaire comme dilueur.

	Mean	Std. Dev.
VCL, Total	28,795	26,091
VCL, CD, après	28,961	26,805
VCL, CD- vit E, après	28,416	26,276
VCL, CD-choi, après	27,776	24,286
VCL, CHOL, après	32,013	26,790
VCL, complexe, après	27,170	23,780
VCL, control, après	31,840	31,142
VCL, vit E, après	28,348	25,951
VSL, Total	10,332	19,799
VSL, CD, après	10,188	17,825
VSL, CD- vit E, après	9,978	19,971
VSL, CD-choi, après	9,922	19,076
VSL, CHOL, après	12,884	23,694
VSL, complexe, après	8,094	15,740
VSL, control, après	11,467	22,588
VSL, vit E, après	11,989	22,573
VAP, Total	15,697	20,438
VAP, CD, après	15,776	19,192
VAP, CD- vit E, après	15,209	20,923
VAP, CD-choi, après	15,045	19,587
VAP, CHOL, après	18,967	23,767
VAP, complexe, après	13,689	16,878
VAP, control, après	17,127	23,254
VAP, vit E, après	16,565	22,230

## ANNEXES

---

**Annexe n° 4 : pourcentage** des vitesses en fonction du milieu après congélation obtenue avec l'utilisation du milieu hyperosmolaire.

type	Pourcentage	Milieux	après
lente	16,216	control	après
moyen(M)	16,216	control	après
M progress	3,209	control	après
R progress	2,196	control	après
rapide	5,912	control	après
statique	56,25	control	après
totale	100	control	après
lente	22,523	CD	après
moyen(M)	17,117	CD	après
M progress	6,486	CD	après
R progress	3,423	CD	après
rapide	8,288	CD	après
statique	42,162	CD	après
totale	100	CD	après
lente	19,53	CHOL	après
moyen(M)	20,253	CHOL	après
M progress	5,063	CHOL	après
R progress	3,436	CHOL	après
rapide	9,946	CHOL	après
statique	41,772	CHOL	après
totale	100	CHOL	après
lente	17,013	vit E	après
moyen(M)	16,635	vit E	après
M progress	4,159	vit E	après
R progress	3,214	vit E	après
rapide	8,507	vit E	après
statique	50,473	vit E	après
totale	100	vit E	après
lente	19,142	CD-chol	après
moyen(M)	17,458	CD-chol	après
M progress	4,9	CD-chol	après
R progress	2,91	CD-chol	après
rapide	8,882	CD-chol	après
statique	46,708	CD-chol	après
totale	100	CD-chol	après
lente	23,135	CD-vit E	après
moyen(M)	19,026	CD-vit E	après
M progress	5,023	CD-vit E	après
R progress	6,088	CD-vit E	après

## ANNEXES

---

rapide	12,024	CD-vit E	après
statique	34,703	CD-vit E	après
totale	100	CD-vit E	après
lente	23,043	Complexe	après
moyen(M)	19,055	Complexe	après
M progress	5,318	Complexe	après
R progress	4,431	Complexe	après
rapide	9,453	Complexe	après
statique	38,7	Complexe	après
totale	100	Complexe	après

## ANNEXES

---

**Annexe n°5** : pourcentage des vitesses en fonction du milieu après congélation obtenue avec l'utilisation du Tris comme dilueur

type	pourcentage	milieux	après
lente	20,147	control	après
Moyenne(M)	20,147	control	après
M progress	4,688	control	après
R progress	5,897	control	après
Rapide (R)	8,845	control	après
statique	40,295	control	après
Total	100	control	après
lente	22,527	CD	après
Moyenne(M)	19,368	CD	après
M progress	5,769	CD	après
R progress	5,632	CD	après
Rapide (R)	7,418	CD	après
statique	39,286	CD	après
Total	100	CD	après
lente	16,115	Chol	après
Moyenne(M)	18,102	Chol	après
M progress	3,532	Chol	après
R progress	5,298	Chol	après
Rapide (R)	8,168	Chol	après
statique	48,786	Chol	après
Total	100	Chol	après
lente	21,548	Vit E	après
Moyenne(M)	14,264	Vit E	après
M progress	4,552	Vit E	après
R progress	6,677	Vit E	après
Rapide (R)	5,615	Vit E	après
statique	47,344	Vit E	après
Total	100	Vit E	après
lente	23,529	Cd-Chol	après
Moyenne(M)	19,9	Cd-Chol	après
M progress	4,881	Cd-Chol	après
R progress	4,881	Cd-Chol	après
Rapide (R)	8,886	Cd-Chol	après
statique	37,992	Cd-Chol	après
Total	100	Cd-Chol	après
lente	24,831	Cd-VitE	après
Moyenne(M)	18,412	Cd-VitE	après
M progress	3,209	Cd-VitE	après
R progress	5,574	Cd-VitE	après



## ANNEXES

---

Rapide (R)	10,642	Cd-VitE	après
statique	37,331	Cd-VitE	après
Total	100	Cd-VitE	après
lente	21,653	complexe	après
Moyenne(M)	16,531	complexe	après
M progress	4,075	complexe	après
R progress	3,376	complexe	après
Rapide (R)	8,731	complexe	après
statique	45,634	complexe	après
Total	100	complexe	après

## Résumé

---

### **Résumé :**

La cryoconservation est un processus entraînant de nombreux effets néfastes sur les spermatozoïdes tels que le stress oxydatif et la formation des cristaux de glaces, qui peuvent nuire à la qualité des gamètes et à la fertilité après insémination. Notre travail a pour but d'optimiser et d'améliorer la cryoconservation des spermatozoïdes du coq par l'utilisation de nouveaux milieux de congélation. Nous avons utilisés deux types de dilueurs (le Tris et la solution hypertonique) pour tester de nouveaux traitements : cyclodextrines, Vitamine E et Cholestérol, seuls ou en association (CD-Vit E, CD-Chol, et CD-Vit E-Cholestérol). Nos résultats montrent que les pourcentages de mobilité les plus élevés sont retrouvés dans l'environnement hyperosmolaire, où les complexes notamment CD-Vit E et CD-Vit E-cholestérol ont exprimé leur plein potentiel protecteur.